

化学物质诱导变态后紫贻贝稚贝的生长及存活

杨金龙¹, 李一峰¹, 沈和定¹, SATUITO Glenn Cyril², KITAMUTRA Hitoshi²

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki, Japan 852-8521)

摘要:在以往实验的基础上, 跟踪调查了筛选出的化学诱导物质对紫贻贝(*Mytilus edulis*)幼虫变态后的生长和成活率的影响, 并比较了其与相同条件下自然诱导物、微生物膜诱导后的稚贝的生长和成活率。实验结果表明, 肾上腺素、苯肾上腺素、可乐宁、KCl 和 NH₄Cl 5 种化学物质均成功地诱导了该种幼虫的变态, 其变态后稚贝同微生物诱导变态后的稚贝以相同的速度生长, 且在培育过程中无死亡稚贝出现。因此, 这些化学物质可作为该种养殖以及海洋防污染研究中幼虫变态的有效人工诱导物。

关键词:紫贻贝(*Mytilus edulis*); 稚贝; 化学物质; 生长; 成活率

中图分类号:Q179.5

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2009)10-0092-05

许多海洋无脊椎动物在变成附着成体之前, 有一个浮游幼虫阶段。幼虫其浮游生活, 短则几分钟, 长则达数月。大多数海洋无脊椎动物的幼虫只有在外界环境因子的影响下才能完成附着和变态^[1~6]。因此, 理解和控制海洋无脊椎动物幼虫的附着变态行为对于水产养殖苗种生产技术的改善和海洋防污技术的发展具有极其重要的理论意义和实践意义^[5]。

大量的实验证据已表明来源于各种自然附着基的化学诱因(chemical cues)参与到许多海洋无脊椎动物幼虫的附着和变态, 然而到目前为止, 只有如 jacaranone、 δ -tocotrienol、游离脂肪酸等很少的几种天然诱导物质被分离和鉴定^[7~9]。因此, 利用人工诱导化学物质研究其对海洋无脊椎动物幼虫的附着变态机理成为有效的途径之一。

不同化学物质如神经递质^[6, 10~14]、阳离子^[15~18]已经被报道能诱导包括水螅虫、苔藓虫、多毛类、软体动物、藤壶、海胆和海鞘等海洋无脊椎动物幼虫的附着变态。此外, 有机溶剂等也被报道能诱导腹足类等幼虫的附着变态^[19]。然而, 不同种类海洋无脊椎动物幼虫对同种化学物质的反应也不尽相同。例如, 肾上腺素能诱导牡蛎、贻贝、扇贝等幼虫的附着变态^[11, 20~22], 却对藤壶幼虫的附着变态无任何影响^[13]。尽管这些化学物质的作用方式和机理还不为人所知, 但研究表明这些物质可能模拟来源于自然附着基的天然诱导物质或者是直接作用于神经系统^[7~9, 16, 20]。许多学者正致力于调查, 其目的是获得更多的有关知识和信息, 以有助于阐明这些幼虫的附着变态机制^[13, 23]。此外, 一些学者们也在尝试筛选高效的诱导活性物质和抑制活性物质, 为养殖

经济种类的苗种技术的改善和海洋防污技术的开发提供理论依据和对策^[6, 11, 12, 15, 18, 21, 22]。

目前, 化学物质对贻贝幼虫附着变态的影响研究已有许多报道^[6, 11, 18, 21, 24~27], 然而关于这些化学物质诱导变态后稚贝的生长和存活的研究却鲜见报道。本实验主要在作者们以往研究的基础上^[6], 跟踪调查了筛选出的化学诱导物质对紫贻贝(*Mytilus edulis*)幼虫变态后的生长和成活率的影响, 并比较了其与相同条件下自然微生物膜诱导后的稚贝的生长和成活率, 以期为该种养殖过程中的人工育苗技术的改进以及海洋防污研究提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 幼虫培养

人工授精用的成体紫贻贝, 采自日本长崎市多良町长崎县综合水产试验场附近的码头或购于三重县磯部町的矢附近的一个养殖场。依照 Yang^[6] 所述方法进行人工授精和幼虫的培育。

1.2 诱导幼虫变态的化学物质

实验所用的化学物质、生产厂家及所在地如表 1 所示。肾上腺素、苯肾上腺素和可乐宁母液的配制, 通过将这些诱导物溶解于 0.22 μm Millipore 过滤海水(0.22 μm FSW)或者是先将其溶于 0.3~0.5 mL

收稿日期:2009-06-15;修回日期:2009-07-25

作者简介: 杨金龙(1980-), 男, 山东烟台人, 博士, 副教授, 研究方向: 主要从事海洋生物与环境及海洋化学生态学等方面的研究, 电话: 021-61900440, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

盐酸,再稀释至 100 mL 0.22 μm FSW。KCl 和 NH_4Cl 母液的配制是通过直接将这 2 种化学物质溶于 100 mL 0.22 μm FSW。本实验所采用的浓度是 Yang^[6] 实验中诱导幼虫最高变态百分比时的浓度。母液和测试溶液均在实验的当天进行配制。

表 1 实验所用的化学物质、生产厂家、母液及测试溶液浓度

Tab. 1 Chemical compounds tested in the assays and their respective manufactures and concentrations of stock and test solutions

化学物质	生产厂家	浓度(mol/L)	
		母液	测试溶液
肾上腺素	Sigma (St Louis, Mo)	1×10^{-3}	1×10^{-4}
苯肾上腺素	Wako (Osaka, Japan)	1×10^{-3}	1×10^{-4}
可乐宁	Wako (Osaka, Japan)	1×10^{-3}	1×10^{-4}
KCl	Wako (Osaka, Japan)	1×10^{-1}	3×10^{-2}
NH_4Cl	Wako (Osaka, Japan)	1×10^{-1}	1×10^{-2}

注:Sigma 为 Sigma 公司 (St Louis, Mo);Wako 为 Wako 和光纯药工业株式会社 (Osaka, Japan)

1.3 幼虫变态实验

实验所用成熟幼虫的壳长均大于 309 μm 。幼虫变态实验参照 Yang^[6] 的方法进行。每 20 个幼虫被放入每个含有 20 mL 测试溶液的玻璃培养皿 ($\Phi 60 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ 高)。幼虫经过 24 h 浸泡处理后,用 0.22 μm FSW 冲洗 3 次,再将幼虫转移至盛有 20 mL 0.22 μm FSW 的玻璃培养皿。实验开始后的第 72 h 观察幼虫的变态和死亡。幼虫的变态通过稚贝的贝壳生长来判断。每种药品浓度实验时,至少重复 2~3 次。此外,每次实验时,3 个盛有 20 mL 0.22 μm FSW 和 20 个幼虫的培养皿,作为空白对照组。所有的实验均在 17°C 黑暗的条件下进行。

1.4 化学物质和微生物膜诱导变态后稚贝的培育

各种化学物质和微生物膜作为诱导物,变态后的稚贝被用于培育实验。在实验中,微生物膜诱导变态后的稚贝作为对照组。从各种化学物质和微生物膜诱导变态后的稚贝中各随机选取 40 个稚贝,放入盛有 30 mL 过滤海水 (Whatman 玻璃纤维滤膜,GF/C;1.2 μm ,FSW) 的玻璃培养皿 ($\Phi 90 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ 高),在 17°C 黑暗的条件下培育 2 周。培育期间,投喂纤细角毛藻,稚贝培育前 9 d 投喂密度为 10 万个/mL,随着稚贝的发育,从第 10 天起投喂密度增大至 20 万个/mL。在整个培育期间,每隔 1 d 换水 1 次。

每周 2 次对 6 组的稚贝的生长和成活进行观察和记录。对于每组来讲,稚贝的生长通过测量 20 个

稚贝壳长的增长的平均值来表示。

1.5 统计分析

通过稚贝占每个培养皿中总个体数的百分比表示变态诱导活性。各种化学物质和微生物膜的变态诱导活性则通过 Kruskal-Wallis Test 进行评估分析。稚贝的成长率通过单因素方差分析 (one-way of Analysis of Variance, ANOVA)。所有的统计计算均采用 JMP 统计软件进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 化学物质和微生物膜对紫贻贝幼虫变态的影响

各种化学物质和微生物诱导后,所获得稚贝的百分比如图 1 所示。所有空白对照组中均无变态的稚贝出现。微生物膜显著地诱导了幼虫的变态 ($P < 0.05$)。实验开始后的 72 h,各种化学物质对紫贻贝幼虫均表现出显著的诱导活性 ($P < 0.05$)。在所测试的 5 种化学物质中,各种物质间诱导效果差异显著 ($P < 0.05$), 1×10^{-4} mol/L 肾上腺素诱导幼虫变态率最高,达 85%;其次,依次为 NH_4Cl , 可乐宁, KCl 和苯肾上腺素,诱导活性范围为 31%~78%。

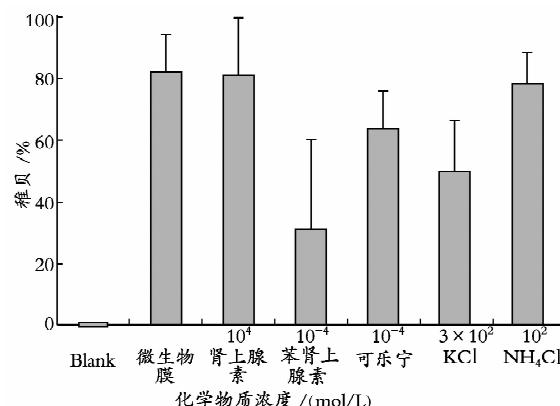


图 1 不同化学物质诱导紫贻贝幼虫变态后稚贝的百分比

Fig. 1 Percentages of *Mytilus galloprovincialis* post-larvae in different chemical compounds

2.2 化学物质和微生物膜诱导变态后稚贝的生长和存活

各种化学物质和微生物膜诱导变态后,稚贝的生长如图 2 所示。培育 2 周后,肾上腺素、苯肾上腺素和可乐宁 3 种神经递质诱导后,稚贝的平均壳长分别增至 779, 777 和 758 μm 。KCl 和 NH_4Cl 诱导变态后的稚贝的平均壳长,2 周后分别增至 712 和 739 μm 。作为对照组,微生物膜诱导变态后的稚贝,在 2 周培育后平均壳长达到 803 μm 。各种化学物质

和微生物膜诱导变态后,稚贝的壳长日平均生长速度和存活率见表 2。各组间稚贝的壳长日平均生长速度无显著差异($P>0.05$);为 $27\sim33\text{ }\mu\text{m/d}$ 。在整个培育过程,存活率也无显著性差异($P>0.05$),同时无死亡的稚贝个体出现。

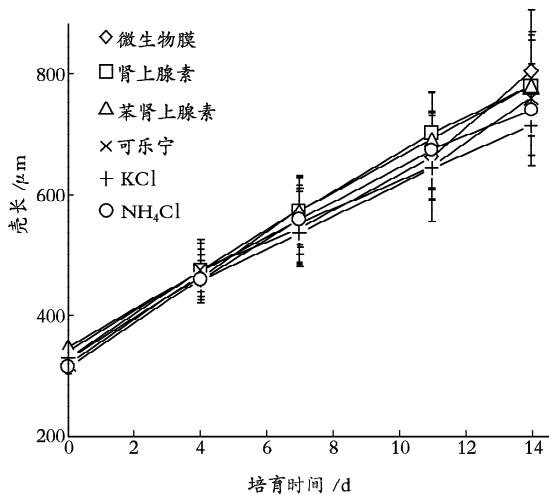


图 2 不同化学物质和微生物膜诱导变态后稚贝壳长的生长

Fig. 2 Shell growth of *M. galloprovincialis* post-larvae that metamorphosed using different chemical compounds and microbial biofilms

表 2 不同化学物质和微生物膜诱导变态后稚贝的壳长生长和存活率

Tab. 2 Growth in shell length and survival rates of *M. galloprovincialis* post-larvae obtained using different chemical compounds and microbial biofilms as inducers

诱导物	壳长($\mu\text{m/d}$)	存活率(%)
微生物膜	33 ± 10	100
肾上腺素	32 ± 4	100
苯肾上腺素	31 ± 4	100
可乐宁	31 ± 8	100
KCl	27 ± 4	100
NH ₄ Cl	30 ± 10	100

3 讨论

化学物质能诱导许多海洋无脊椎动物幼虫的变态,然而这些化学物质诱导变态后稚贝的生长和存活却鲜见报道。同样,尽管本研究的作者们已经对不同化学物质对紫贻贝幼虫的变态影响效果进行了调查研究^[6],但缺乏对这些物质诱导变态后稚贝的生长和存活进行深入跟踪调查。因此本研究在以往基础上,进一步调查了紫贻贝幼虫变态后其稚贝的

生长状况。目前的研究结果表明,肾上腺素等 5 种化学物质均成功地诱导了紫贻贝幼虫的变态,并且首次证明其诱导变态后的稚贝与自然微生物膜诱导变态后的稚贝以相同速度生长。

肾上腺素,属于儿茶酚胺类物质,对多毛类的肉刺盘管虫(*Hydroides ezoensis*)^[28]、软体动物的太平洋牡蛎(*Crassotrea gigas*)^[20]、翡翠贻贝^[11]、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)^[15]和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[29]等幼虫的变态均具有诱导效果,并且已被利用在经济贝类苗种生产中,如生产单体牡蛎^[30]。目前的研究结果表明,肾上腺素同样诱导紫贻贝幼虫的变态,这与以前的研究一致^[6, 21]。而且,调查显示肾上腺素诱导变态后稚贝的生长率同自然诱导物、微生物膜诱导变态后的稚贝一样,壳长增长速度达到 $30\text{ }\mu\text{m/d}$ 以上,其增长速度明显高于以往研究^[31]中微生物膜诱导变态后稚贝的增长速度($22\text{ }\mu\text{m/d}$),这可能与培育过程中饵料等实验条件以及发育不同阶段等因素有关。在本次培育实验中,没有发现死亡的稚贝个体。这些研究结果表明该物质可能诱导了幼虫的正常变态。关于肾上腺素的作用方式和机理,已有报道,如 Satuito 等^[21]认为肾上腺素有可能直接作用于该种幼虫的神经系统,导致幼虫的变态,报告显示酚妥拉明抑制了紫贻贝幼虫的变态。这些研究表明控制幼虫变态的受体可能是类似于脊椎动物的 α 肾上腺素受体。

在目前的调查中,苯肾上腺素和可乐宁不同程度诱导了紫贻贝幼虫的变态,其变态后稚贝的生长速度与自然诱导物、微生物膜诱导变态后的稚贝生长速度一样,无任何显著差异。并且在整个培育过程稚贝无死亡现象出现,表明这些诱导物质可能诱导了幼虫的正常变态。在所测试 3 种神经递质中,肾上腺素对该种幼虫具有最高的诱导活性,超过 80% 的幼虫成功被诱导变态,作为极具潜力的诱导物,可尝试应用或推广于该种的人工养殖的苗种生产中。

许多学者的研究表明 K^+ 通过使兴奋的细胞膜去极化或者是直接作用于幼虫的神经系统,从而导致幼虫变态^[10, 16]。由于其具有显著诱导效果,作用范围广,价格不是很昂贵,从而受到很多关注^[32]。关于紫贻贝,作者们以往的研究表明其幼虫的变态反应与暴露于 K^+ 时间的长短有关,即 24 h 暴露明显诱导幼虫的变态,72 h 暴露后无幼虫变态^[6]。本研究在此基础上,跟踪调查了 24 h 暴露后稚贝的生长和存活。研究结果表明 K^+ 诱导变态后的稚贝在实验期间内的生长速度和自然诱导物微生物膜诱导变态后的稚贝一样,无任何显著性差异,并且存活率达到 100%。这些表明稚贝其生长和存活没有受到

KCl的不良影响,实验所用测试浓度和处理时间是安全有效的,可在将来育苗生产中尝试应用。

目前为止, NH_4^+ 的作用机制还尚未得知,一些学者的研究证明其能够诱导太平洋牡蛎和美洲牡蛎 (*C. virginica*)^[33]、玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*)^[34] 等幼虫的附着变态,但却对大珠母贝 (*Pinctada maxima*)^[35] 幼虫的附着无任何影响。在本研究中, NH_4Cl 表现出高的诱导活性,这与以前的研究结果相一致^[6],且其诱导变态的稚贝保持和微生物膜诱导变态的稚贝同样的速度生长。因此, NH_4Cl 作为极为有效的人工诱导物,同时具有价格优势,对提高幼虫的变态率和增加出苗量具有重要的现实意义。

综上所述,神经递质肾上腺素、苯肾上腺素和可乐宁和 2 种离子化合物 KCl、 NH_4Cl 成功地诱导了紫贻贝幼虫的变态,而且这些化学物质诱导变态后的稚贝和自然诱导物微生物膜诱导变态的稚贝以同样速度生长,因此这些化学物质可能诱导了幼虫正常的变态。目前的研究将为今后的经济贝类养殖的苗种生产技术的改善和海洋防污研究提供基础数据和理论依据。

参考文献:

- [1] Crisp D J. Chemoreception in marine organisms [M]. London: Academic Press, 1974. 177-265.
- [2] Morse D E. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology [J]. *Bull Mar Sci*, 1990, **46**(2):465-483.
- [3] Pawlik J R. Chemical ecology of the settlement benthic marine invertebrates [J]. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, 1992, **30**:273-335.
- [4] Qian P Y. Larval settlement of Polychaetes [J]. *Hydrobiologia*, 1999, **402**:239-253.
- [5] McClintock J B, Baker J B. Marine chemical ecology [M]. Boca Raton: CRC Press, 2001. 431-461.
- [6] Yang J L, Satuito C G, Bao W Y, et al. Induction of metamorphosis of pediveliger larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 using neuroactive compounds, KCl, NH_4Cl and organic solvents [J]. *Biofouling*, 2008, **24**:461-470.
- [7] Yvin J C, Chevolot L, Chevolot-Magueur A M, et al. First isolation of jacaraone from an alga, *Delesseria sanguinea*. A metamorphosis inducer of pectin larvae [J]. *J Nat Prod*, 1985, **48**:814-816.
- [8] Pawlik J R. Chemical induction of larval settlement and metamorphosis in the reef-building tube worm *Phragmatopoma californica* (Sabellariidae: Polychaeta) [J]. *Mar Biol*, 1986, **91**:59-68.
- [9] Kitamura H, Kitahara S, Koh H B. The induction of larval settlement and metamorphosis of two sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispira*, by free fatty acids extracted from the coralline red alga *Corallina pilulifera* [J]. *Mar Biol*, 1993, **115**:387-392.
- [10] Pawlik J R. Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phragmatopoma lapidosa* California (Polychaeta: Sabellariidae), with a critical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae [J]. *Bull Mar Sci*, 1990, **46**(2):512-536.
- [11] 柯才焕, 李少菁, 李复雪, 等. 儿茶酚胺对翡翠贻贝幼体附着和变态的诱导 [J]. 厦门大学学报, 1995, **34**(6):975-981.
- [12] 柯才焕, 李少菁, 李复雪, 等. 僧帽牡蛎幼体附着和变态的诱导 [J]. 水产学报, 2000, **24**(3):229-234.
- [13] Yamamoto H, Tachibana A, Kawai S, et al. Serotonin involvement in larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite* [J]. *J Exp Zool*, 1996, **275**:339-345.
- [14] Boettcher A A, Targett N M. Role of chemical inducers in larval metamorphosis of queen conch, *Strombus gigas* Linnaeus: relationship to other marine invertebrate systems [J]. *Biol Bull*, 1998, **194**:132-142.
- [15] 张涛, 杨红生, 周义, 等. 化学物质对硬壳蛤幼虫变态的诱导 [J]. 海洋科学, 2005, **29**(12):59-67.
- [16] Baloun A J, Morse D E. Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda) [J]. *Biol Bull*, 1984, **167**:124-138.
- [17] Degnan B M, Souter D, Degnan S M, et al. Induction of metamorphosis with potassium ions requires development of competence and an anterior signalling centre in the ascidian *Herdmania momus* [J]. *Dev Genes Evol*, 1997, **206**:370-376.
- [18] 柯才焕, 李少菁, 李复雪, 等. 翡翠贻贝幼体附着和变态的离子控制 [J]. 海洋与湖沼, 1998, **29**(2):128-134.
- [19] Pennington J T, Hadfield M G. Larvae of a nudibranch mollusc (*Phestilla sibogae*) metamorphose when exposed to common organic solvents [J]. *Biol Bull*, 1989, **177**:350-355.
- [20] Coon S L, Bonar D B, Weiner R M. Induction of settlement and metamorphosis of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1985, **94**:211-221.
- [21] Satuito C G, Natoyama K, Yamazaki M, et al. Induction of metamorphosis in the pediveliger larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* by neuroactive compounds [J]. *Fish Sci*, 1999, **65**:384-389.
- [22] 张涛, 阙华勇, 盖明礼, 等. 化学物质对墨西哥湾扇贝幼虫变态的诱导 [J]. 动物学杂志, 2003, **38**(4):66-71.

- [23] Coon S L, Bonar D B. Pharmacological evidence that alphal-adrenoceptors mediate metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. **Neuroscience**, 1987, 23:1169-1174.
- [24] Cooper K. Potential application of the chemical DOPA to commercial bivalve settlement systems (Abstract) [J]. **J shell Res.**, 1983, 3:110-111.
- [25] Eyster L S, Pechenik J A. Attachment of *Mytilus edulis* L. larvae on algal and byssal filaments is enhanced by water agitation [J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 1987, 114:99-110.
- [26] Dobretsov S V, Qian P Y. Pharmacological induction of larval settlement and metamorphosis in the blue mussel *Mytilus edulis* L. [J]. **Biofouling**, 2003, 19: 57-63.
- [27] Garc a-Lavandeira M, Silva A, Abad M, et al. Effects of GABA and epinephrine on the settlement and metamorphosis of the larvae of four species of bivalve molluscs [J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 2005, 316: 149-156.
- [28] Okamoto K, Watanebe A, Watanabe N, et al. Induction of larval metamorphosis in *Serpulid polychaetes* by L-DOPA and catecholamines [J]. **Fish Sci**, 1995, 61: 69-74.
- [29] 张涛, 阙华勇, 杨红生, 等. 化学物质对不同发育天数海湾扇贝幼虫变态的诱导 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(3):228-233.
- [30] Coon S L, Bonar D B, Weiner R M. Chemical production of cultchless oyster spat using epinephrine and norepinephrine [J]. **Aquaculture**, 1986, 58: 255-262.
- [31] Satuito C G, Natoyama K, Yamazaki M, et al. Larval development of the mussel *Mytilus edulis galloprovincialis* cultured under laboratory conditions [J]. **Fish Sci**, 1994, 60:65-68.
- [32] 张涛. 海洋无脊椎动物幼虫附着变态研究进展 [J]. 海洋科学, 2000, 24(1):25-29.
- [33] Fitt W K, Coon S L. Evidence for ammonia as a natural cue for recruitment of oyster larvae to oyster beds in a Georgia salt marsh [J]. **Biol Bull**, 1992, 182: 401-408.
- [34] Berking S, Herrmann K. Dicapryloylglycerol and ammonium ions induce metamorphosis of ascidian larvae [J]. **Roux's Arch Dev Biol**, 1990, 198:430-432.
- [35] Zhao B, Zhang S, Qian P Y. Larval settlement of the silver- or goldlip pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson) in response to natural biofilms and chemical cues [J]. **Aquaculture**, 2003, 220:883-901.

Growth and survival of the mussel *Mytilus galloprovincialis* post-larvae metamorphosed using different chemical compounds as inducers

YANG Jin-long¹, LI Yi-feng¹, SHEN He-ding¹, SATUITO Glenn Cyril², KITAMUTRA Hitoshi²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan)

Received: Jun. ,15, 2009

Key words: *Mytilus galloprovincialis*; post-larvae; chemical compound; growth; survival

Abstract: The growth and survival of *Mytilus galloprovincialis* post-larvae metamorphosed using different chemical compounds were investigated in this study to identify potential inducers in aquaculture and anti-fouling and biofouling researches. All tested chemical compounds including epinephrine, phenylephrine, clonidine, KCl and NH₄Cl induced larvae to metamorphose, and post-larvae metamorphosed using these compounds survived as juveniles and grew at the same rate as those from microbial biofilms. These chemical compounds, therefore, can be used as effective inducers of larval metamorphosis in aquaculture and antifouling and biofouling studies using juveniles.

(本文编辑:康亦兼)