

氯化钾诱导仿刺参(*Apostichopus japonicus*) 幼虫附着变态的研究*

韦秀梅¹ 杨顶珑¹ 王圣¹ 姜绪¹ 刘相全¹ 杨建敏¹ 房景辉²

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071)

摘要 以不同浓度的氯化钾(KCl)溶液处理仿刺参(*Apostichopus japonicus*)樽形幼虫, 处理不同时间后, 分析 KCl 对仿刺参幼虫附着变态的诱导作用。结果表明, 使用较低浓度的 KCl 溶液(10、30 和 50 mmol/L)分别诱导仿刺参樽形幼虫 6、12 和 24 h 均可以显著提高其附着变态率, 诱导 24 h 附着变态率分别提高 27.67%、32.67%和 19.67%。较高浓度的 KCl 溶液(100、300 和 500 mmol/L)也可以诱导仿刺参幼虫附着变态, 但随着 KCl 浓度的升高和诱导时间的延长, 幼虫死亡率逐渐升高。低浓度 KCl 溶液, 特别是在 30 mmol/L 诱导仿刺参幼虫 12 h 时, 可以显著提高幼虫的附着变态率, 增加发育的同步性, 降低死亡率, 对仿刺参幼虫变态的诱导效果较好。

关键词 KCl; 仿刺参; 樽形幼虫; 变态; 诱导

中图分类号 Q253 **doi:** 10.11693/hyhz20140900239

海洋无脊椎动物幼虫的附着变态是在一定因子的诱导下完成的。已有研究表明, 金属离子(K^+ 、 Ca^{2+} 、 Rb^+ 和 Cs^+)、左旋多巴(L-DOPA)、GABA、5-羟色胺(5-HT)、胆碱及其衍生物、脂肪酸类和儿茶酚胺等对海洋无脊椎动物幼虫的附着变态均有一定的诱导作用(Couper *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996; 刘春林等, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007; Matsuura *et al.*, 2009)。其中, K^+ 的诱导效果明显并且应用范围较广, 受到研究者的普遍关注。

氯化钾(KCl)溶液中的 K^+ 通过影响细胞膜电位, 使细胞膜去极化, 诱导海洋无脊椎动物幼虫变态(Baloun *et al.*, 1984; Yool *et al.*, 1986)。KCl 可以诱导多种软体动物幼虫附着变态(Baloun *et al.*, 1984; Eyster *et al.*, 1988; Yool *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1995; 柯才焕等, 1998; Bryan *et al.*, 1998; 张涛等, 2003), 也可以诱导棘皮动物幼虫附着变态(王波等, 2002; 刘春林等,

2008)。在 K^+ 诱导海胆幼虫附着变态的研究中发现, 用 K^+ 浓度为 30—100 mmol/L 的海水浸泡紫海胆(*Anthocidaris crassispina*)的后期八腕幼虫 10—60 min, 24 h 后其变态率在 90%以上; 50mmol/L 的 KCl 诱导虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)幼体 5—10h, 可提高其变态率并降低死亡率(王波等, 2002; 刘春林等, 2008)。另外, K^+ 对马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)和光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)等棘皮动物的幼虫均有诱导变态效果(王波等, 2002; 刘春林等, 2008), 但尚未见其诱导仿刺参(*Apostichopus japonicus*)幼虫附着变态的研究。

与其它棘皮动物类似, 附着变态期是仿刺参幼虫向成体转变过程中一个必不可少的关键时期。仿刺参幼虫在附着变态期对外界环境因子的变化比较敏感, 最易发生大批量死亡。因此, 幼虫附着变态率的高低决定着仿刺参育苗的成败, 如何提高幼虫的附

* 海洋公益性行业科研专项经费项目, 201305001 号; 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金, BS2012HZ027 号; 烟台市科技发展计划项目, 2012133 号; 山东省现代农业产业技术体系——刺参创新团队(SDAIT-08); 水生动物营养与饲料“泰山学者”岗位经费资助。韦秀梅, 博士, 助理研究员, E-mail: xiumeiwei@hotmail.com

通讯作者: 房景辉, 博士, E-mail: hui861@163.com

收稿日期: 2014-09-09, 收修改稿日期: 2014-10-18

着变态率、缩短附着变态时间成为仿刺参苗种生产中亟待解决的问题。本研究探讨 KCl 对仿刺参幼虫附着变态的诱导作用, 比较不同浓度 KCl 溶液以及处理时间对仿刺参幼虫附着变态和发育的影响, 旨在为提高仿刺参苗种生产的技术水平提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 幼虫来源与培养条件

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)樽形幼虫由山东蓬莱海益水产有限公司提供。培养期间海水温度为 18—19°C、盐度为 31—32。实验分两组: 烧杯组和六孔板组, 其中烧杯组的幼虫培养密度为 0.1 个/mL, 投喂人工饵料(红酵母、螺旋藻、海泥和干酵母); 六孔板组的幼虫培养密度为 1 个/mL, 投喂新月菱形藻。

1.2 实验操作与管理

实验海水经 0.22 μ m 滤膜过滤, 实验处理根据 KCl(国药集团化学试剂有限公司)浓度高低分为低浓度组(10、30 和 50 mmol/L)和高浓度组(100、300 和 500 mmol/L)。实验分为两部分, 烧杯组实验目的是分析 KCl 对仿刺参幼苗附着变态的影响; 六孔板组实验目的是观察诱导后各时间点仿刺参幼虫变态发育情况, 统计各期幼虫数量, 分析 KCl 对仿刺参幼苗发育的影响。

烧杯组实验: 将 1 L 不同浓度的 KCl 溶液注入 2 L 烧杯中, 每个烧杯放置 100 个仿刺参樽形幼虫进行诱导。低浓度组分别诱导 6、12 和 24 h, 高浓度组分别诱导 10 和 30 min。以未添加 KCl 的过滤海水处理组为对照, 每个处理设置三个平行。诱导结束后, 将实验组幼虫用 200 目筛绢滤出, 并在过滤海水中继续培养 5 d。培养过程中使用经 200 目筛绢过滤的人工饵料投喂。培养结束时, 计算烧杯内幼虫取食饵料留下的斑点, 计作附着幼虫数量。

六孔板组实验: 取 10 mL 不同浓度的 KCl 溶液于六孔板中, 每孔放置约 10 个仿刺参樽形幼虫进行诱导。低浓度组分别诱导 6、12 和 24 h; 高浓度组分别诱导 10 和 30 min, 以未添加 KCl 的过滤海水处理组为对照, 每个处理设置三个平行。诱导结束后, 将实验组仿刺参幼虫用 200 目筛绢滤出, 并在过滤海水中继续培养, 培养饵料为新月菱形藻, 分别在 12、24、36、48、60、72、96 和 120 h 时于显微镜下观察仿刺参发育情况并统计樽形幼虫、五触手早期幼虫、五触手晚期幼虫、稚参和死亡个体数, 分析在不同浓度 KCl 作用下仿刺参幼虫变态发育情况。

1.3 数据计算与处理

附着变态率(%) = $100 \times \text{附着变态幼虫数} / \text{总幼虫数}$

死亡率(%) = $100 \times \text{幼虫死亡数} / \text{总幼虫数}$

数据的统计分析采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析和 *T* 检验, 使用 Duncan 法进行多重比较, 以 $P < 0.05$ 为差异显著水平。

2 实验结果

2.1 KCl 对仿刺参幼虫附着变态的诱导

烧杯组实验结果显示: 在低浓度 KCl 诱导实验组中, 对照组仿刺参幼虫附着变态率为 38.33%, 处理组幼虫的附着变态率为 53.67%—71.00%, 比对照组提高 15.34%—32.67%。在相同 KCl 浓度条件下, 不同处理时间组之间的显著差异性见图 1a。实验组仿刺参幼虫附着变态率均显著高于对照组($P < 0.05$); 在 10 mmol/L 处理浓度下, 随处理时间增加, 实验组幼虫附着变态率显著提高($P < 0.05$); 在 30 mmol/L 处理浓度下, 24 h 处理组显著高于其它两实验组($P < 0.05$); 而在 50 mmol/L 处理浓度下, 各实验组间差异不显著($P > 0.05$)。另外, 相同处理时间条件下, KCl 浓度对幼虫附着变态率影响显著($P < 0.05$)。如 6 h 处理条件下, 30 mmol/L 组的幼虫附着变态率显著高于 10 和 50 mmol/L 组($P < 0.05$); 24 h 处理条件下, KCl 浓度为 10 和 30 mmol/L 时的幼虫附着变态率均显著高于 50 mmol/L 时的幼虫附着变态率($P < 0.05$)。在本实验中, 30 mmol/L (24 h) 实验组仿刺参幼虫附着变态率最高, 为 71.00%; 50 mmol/L (12 h) 实验组仿刺参幼虫附着变态率最低, 为 53.67%。

在高浓度 KCl 诱导实验组中, 仿刺参幼虫附着变态率为 54.00%—69.00%, 相对于对照组 38.33%, 附着变态率提高 15.67%—30.67%。在相同 KCl 浓度条件下, 不同处理时间组之间的显著差异性见图 1b。实验组仿刺参幼虫附着变态率均显著高于对照组($P < 0.05$); 100 mmol/L 和 300 mmol/L 处理浓度下, 不同处理时间对幼虫附着变态率的影响不显著($P > 0.05$); 而在 500 mmol/L 处理浓度下, 30 min 组显著高于 10 min 组($P < 0.05$)。另外, 10 min 实验组, 300 mmol/L 处理的幼虫附着变态率显著高于其它两处理($P < 0.05$); 而在 30 min 组内则无显著差异($P > 0.05$)。在本实验中, 300 mmol/L (10 min) 实验组仿刺参幼虫附着变态率最高, 为 69.00%; 而 500 mmol/L (10 min) 实验组最低, 附着变态率仅为 54.00%。

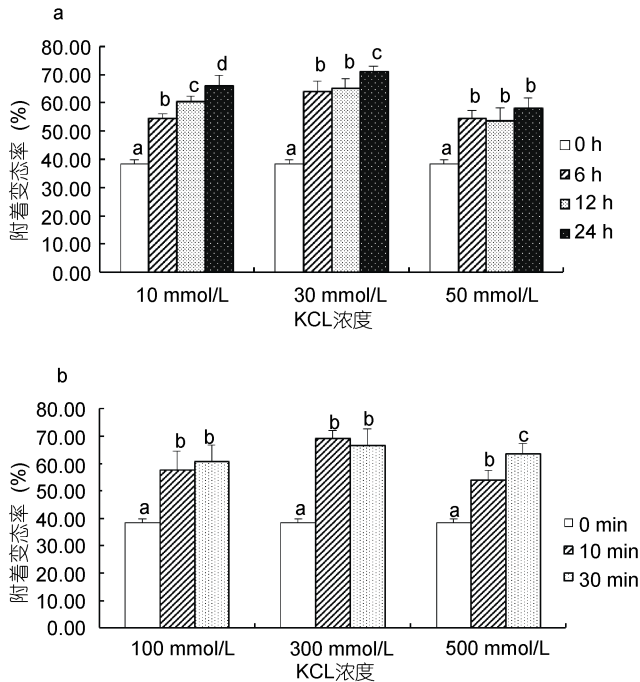


图1 不同浓度 KCl 溶液处理不同时间后仿刺参幼虫的附着变态率

Fig.1 Metamorphosis rates of *A. japonicus* larva treated with KCl in different concentrations and durations
相同 KCl 浓度条件下, 以不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

2.2 KCl 对仿刺参幼虫发育变态的影响

在六孔板实验中, 对照组于 24 h 出现早期五触手幼虫, 在 120 h 早期五触手幼虫占幼虫总数的 18.52%, 晚期五触手幼虫占 22.22%, 稚参占 14.81%, 幼虫死亡率为 7.41% (图 2a); 低浓度实验组中除 30 mmol/L (12 h) 实验组外, 其它实验组于 12 h 出现早期五触手幼虫, 出现时间均早于对照组。各实验组其它阶段幼虫出现的时间也有差异, 如 10 mmol/L (6 h) 实验组, 晚期五触手幼虫出现于 36 h, 稚参出现于 60 h, 120 h 稚参比例为 33.33% (图 2b); 而 10 mmol/L (12 h) 实验组于 48 h 出现晚期五触手幼虫, 72 h 出现稚参, 120 h 稚参比例为 54.97% (图 2c); 而 30 mmol/L (12 h) 实验组晚期五触手幼虫出现于 36 h, 稚参在 72 h 出现, 120 h 稚参比例为 26.08% (图 2f)。10 mmol/L 所有实验组和 30 mmol/L (6 h)、30 mmol/L (12 h) 实验组中未出现仿刺参幼虫死亡(图 2b—f); 而 30 mmol/L (24 h)、50 mmol/L (6 h)、50 mmol/L (12 h) 和 50 mmol/L (24 h) 实验组中均出现幼虫死亡, 死亡率分别为 5.56%、23.81%、15.80% 和 11.11%; 120 h 稚参比例为 27.78%、9.52%、15.80% 和 22.22% (图 2g—j)。

在高浓度实验组中, 500 mmol/L (30 min) 实验组

早期五触手幼虫出现于 24 h, 其它各组出现于 12 h, 均早于对照组。各实验组幼虫均发生不同程度死亡, 其中 500 mmol/L (30 min) 实验组 120 h 幼虫死亡率最高为 47.39%, 稚参比例仅为 5.27% (图 3f), 而 100 mmol/L (10 min)、100 mmol/L (30 min)、300 mmol/L (10 min)、300 mmol/L (30 min) 和 500 mmol/L (10 min) 死亡率分别为: 19.99%、26.67%、21.06%、28.57% 和 22.22%; 120 h 稚参比例分别为: 24.99%、33.33%、26.33%、14.29% 和 5.56% (图 3a—e)。

3 讨论

仿刺参隶属于棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、楯手目(Aspidochirota)、刺参科(Stichopodidae), 主要分布在我国辽宁、山东、河北等北方沿海, 具有极高的营养和药用价值, 是我国北方沿海重要的经济种类之一。仿刺参的发育过程包括受精卵、囊胚、原肠胚、耳状幼虫、樽形幼虫、五触手幼虫和稚参等阶段。其中, 仿刺参幼虫从樽形幼虫发育到五触手幼虫, 由浮游转变为底栖生活, 完成附着变态, 这一过程也是其幼虫发育的最关键时期——附着变态期。该时期的仿刺参幼虫具有了附着变态能力, 并且能够保持一定的时间。此时, 仿刺参幼虫在诱导因子的诱导下可完成附着变态, 若幼虫没有适时附着, 就会发生延迟变态, 而延迟变态可能造成其大批死亡(Pechenik, 1990; Li *et al*, 2010)。在仿刺参苗种生产实践中, 幼虫附着变态率的高低是决定其苗种培育成败的重要因素。

影响海洋无脊椎动物幼虫附着变态的因子很多, 包括温度、盐度、附着基表面粗糙程度、附着基颜色、溶解氧、流速和光照等物理因子, 也包括神经活性物质、石油类产品、有机溶剂、无机化合物和无机离子等化学因子(张涛等, 2005; Li *et al*, 2010)。在诱导因子中, KCl 价格便宜, 毒副作用小, 在诱导海洋无脊椎动物附着变态中应用更为广泛。已有研究表明, KCl 可以诱导红鲍(*Haliotis rufescens*)(Baloun *et al*, 1984)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)(Yang *et al*, 1995)、杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)(Bryan *et al*, 1998)、翡翠贻贝(*Perna viridis*)(柯才焕等, 1998)、方斑东风螺(*Babylonia areolata*)(杨章武等, 2008)、墨西哥湾扇贝(*Argopecten irradians concentricus*)(张涛等, 2003)、葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)(祁剑飞等, 2013)和西施舌(*Coelomactra antiquate*)(陈素文等, 2004; 刘文彪等, 2007)等海洋软体动物幼虫的变态发

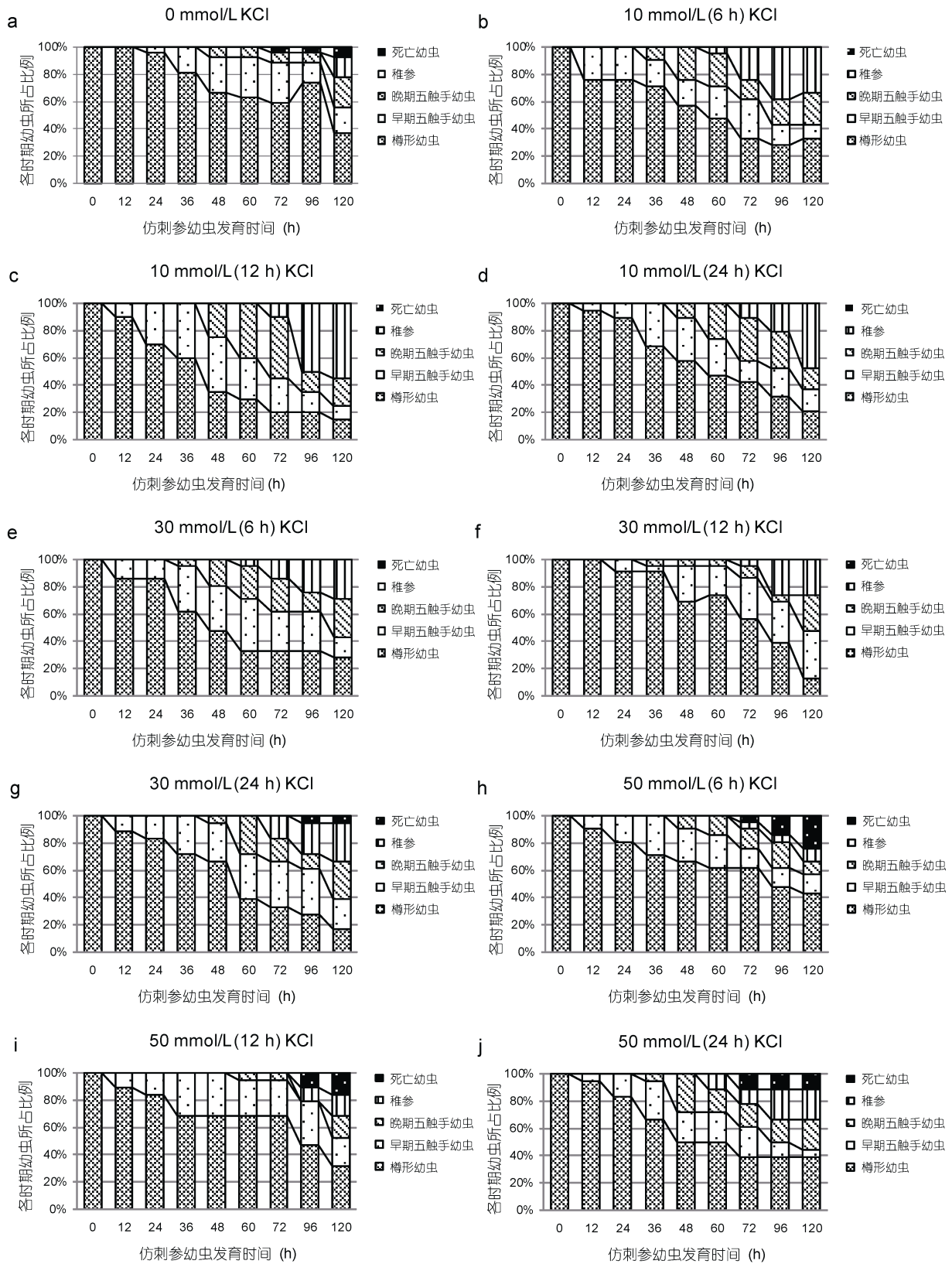


图 2 不同浓度 KCl 溶液处理后各实验组中不同发育时期仿刺参幼虫所占的比例

Fig.2 Percentages of *A. japonicus* larva during different stages of development in experimental groups treated with KCl at different concentrations

a. 0 mmol/L; b. 10 mmol/L (6 h); c. 10 mmol/L (12 h); d. 10 mmol/L (24 h); e. 30 mmol/L (6 h); f. 30 mmol/L (12 h); g. 30 mmol/L (24 h); h. 50 mmol/L (6 h); i. 50 mmol/L (12 h); j. 50 mmol/L (24 h)

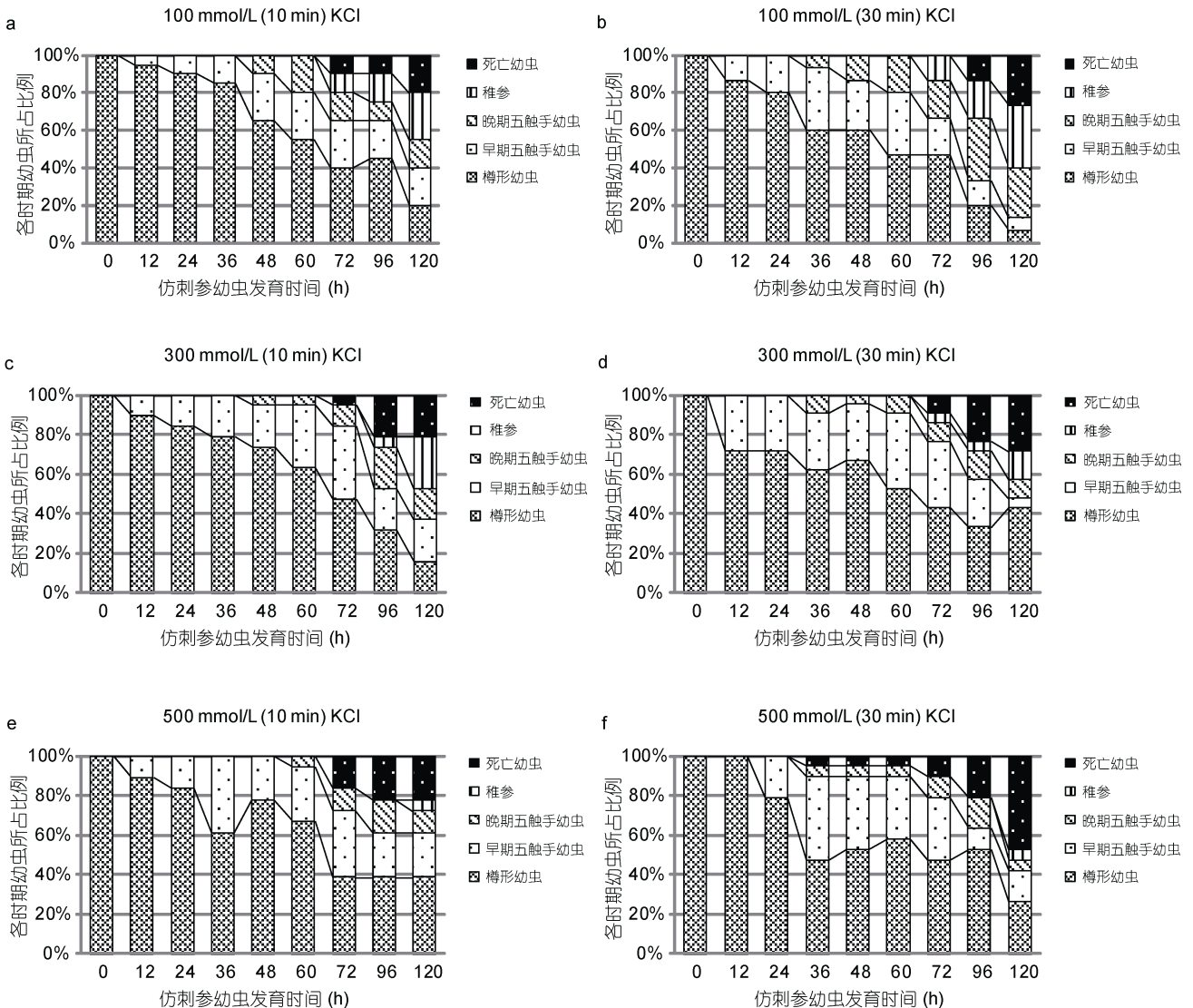


图3 不同浓度KCl溶液处理后各实验组中不同发育时期仿刺参幼虫所占的比例

Fig.3 Percentages of *A. japonicus* larva during different stages of development in experimental groups treated with KCl at different concentrations

a. 100 mmol/L (10 min); b. 100 mmol/L (30 min); c. 300 mmol/L (10 min); d. 300 mmol/L (30 min); e. 500 mmol/L (10 min); f. 500 mmol/L (30 min)

育。对海湾扇贝(*Argopectens irradians*)眼点幼虫诱导变态的研究发现, KCl浓度为30 mmol/L时, 诱导效果最好(于瑞海等, 2001); KCl对方斑东风螺幼虫的最佳诱导浓度为11—14 mmol/L(杨章武等, 2008)。而在诱导虾夷马粪海胆幼虫变态的研究中发现, KCl的最佳诱导浓度为50 mmol/L(刘春林等, 2008)。

本研究发现 KCl对仿刺参幼虫附着变态具有较好的诱导作用, 在10 mmol/L KCl诱导24 h和30 mmol/L KCl诱导12 h、24 h时, 仿刺参幼虫附着变态率提高至65%以上, 其中, 在30 mmol/L (24 h)实验组, 幼虫附着变态率最高, 为71.00%; 在KCl对仿刺参幼虫发育的影响研究中发现10 mmol/L (12 h)、

10 mmol/L (24 h)、30 mmol/L (6 h)、30 mmol/L (12 h)和30 mmol/L (24 h)实验组仿刺参幼虫附着变态率均有提高, 其中30 mmol/L (12 h)实验组的附着变态率提高最显著。烧杯组和六孔板组实验结果略有不同, 可能是饵料差异造成的。已有研究发现采用不同饵料培育仿刺参幼虫, 其变态成活率存在差异(隋锡林, 1989)。

本研究中, 适当浓度的KCl不仅能显著提高仿刺参幼虫附着变态率, 而且能降低幼虫的死亡率。在30 mmol/L (12 h)实验组中, 在仿刺参幼虫发育120 h后, 附着变态率高, 且没有出现幼虫死亡, 这可能是因为30 mmol/L诱导12 h, 没有影响仿刺参幼虫的正

常生理发育,而且在 30 mmol/L (12 h)实验组中,仿刺参幼虫发育同步性较好。在高浓度实验组,仿刺参幼虫附着变态大都始于 12 h,早于对照组的附着变态时间 24 h。高浓度的 KCl 也可诱导仿刺参幼虫变态发育,虽然处理时间短,但经过高浓度的 KCl 诱导后,幼虫出现了较高死亡率,导致幼虫附着变态率低。高浓度 KCl 可能影响了幼虫正常的生长和发育。综合考虑仿刺参幼虫附着变态率、发育同步性和死亡率等因素,30 mmol/L (12 h)实验组诱导效果比较理想。

参 考 文 献

- 于瑞海,王如才,田传远等,2001. 不同浓度的 KCl 对海湾扇贝眼点幼虫附着变态作用的研究. 海洋湖沼通报, 28(4): 28—32
- 王 波,张春利,张榭令等,2002. K^+ 对几种海胆幼虫变态的诱导效果. 齐鲁渔业, 19(3): 26—28
- 刘文彪,高如承,黄振彬等,2007. Ca^{2+} 和 K^+ 对西施舌幼虫附着变态的诱导. 福建师范大学学报(自然科学版), 23(5): 75—79
- 刘春林,王 伟,梁忠德等,2008. KCl 诱导虾夷马粪海胆幼体变态的研究. 水产科学, 27(4): 187—190
- 刘春林,王洪军,王洪波等,2003. 三乙醇胺诱导中间球海胆变态的研究. 水产科学, 22(4): 6—9
- 祁剑飞,曾志南,宋传福等,2013. 几种阳离子对葡萄牙牡蛎幼虫附着和变态的影响. 福建水产, 35(1): 27—31
- 杨章武,郑雅友,李正良等,2008. KCl 对方斑东风螺浮游幼虫变态的诱导作用. 海洋科学, 32(1): 6—9
- 张 涛,杨红生,周 毅等,2005. 化学物质对硬壳蛤幼虫变态的诱导. 海洋科学, 29(12): 59—66
- 张 涛,阙华勇,盖明礼等,2003. 化学物质对墨西哥湾扇贝幼虫变态的诱导. 动物学杂志, 38(4): 66—70
- 陈素文,吴进锋,陈利雄,2004. 氯化钾对西施舌眼点幼虫变态的诱导效果. 湛江海洋大学学报, 24(1): 72—73
- 柯才焕,李少菁,李复雪等,1998. 翡翠贻贝幼体附着和变态的离子控制. 海洋与湖沼, 29(2): 128—133
- 隋锡林,1989. 影响刺参幼体发育与存活率的主要因子. 海洋与湖沼, 20(4): 314—321
- Baloun A J, Morse D E, 1984. Ionic control of settlement and metamorphosis in larvae *Haliotis rufescens* (Gastropoda). Biol Bull, 167: 124—138
- Bryan P J, Qian P Y, 1998. Induction of larval attachment and metamorphosis in the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve). J Exp Biol Ecol, 223: 39—51
- Couper J M, Leise E M, 1996. Serotonin injections induce metamorphosis in Larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. Biol Bull, 191: 178—186
- Eyster L S, Pechenik L A, 1988. Comparison of growth, respiration, and feeding of juvenile *Crepidula fornicata* (L.) follow natural or KCl-triggered metamorphosis. J Exp Biol Ecol, 118: 269—279
- Li L, Li Q, Kong L F. 2010. Effects of environmental factors on larval settlement of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). J World Aquacult Soc, 41: 936—941
- Matsuura H, Yazaki I, Okino T, 2009. Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* by neurotransmitters. Fish Sci, 75: 777—783
- Pechenik J A, 1990. Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates: Does it occur? Is there a price to pay? Ophelia, 32(1—2): 63—94
- Yamamoto H, Tachibana A, Kawaii S *et al*, 1996. Serotonin involvement in larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*. J Exp Zool, 275: 339—345
- Yang Y, Wu B L, 1995. Induction of larval settlement and metamorphosis of *Haliotis discus hannai* Ino (Gastropoda, Mollusca). Chin J Oceanol Limnol, 13(1): 71—77
- Yool A J, Grau S M, Handgield M G *et al*, 1986. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. Biol Bull, 170: 255—266
- Yu X J, Yan Y, Gu J D, 2007. Attachment of the biofouling bryozoan *Bugula neritina* larvae affected by inorganic and organic chemical cues. Int Biodeterior Biodegrad, 60: 81—89
- Zhao B, Zhang S, Qian P Y, 2003. Larval settlement of the silver-ore goldlip pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson) in response to natural biofilms and chemical cues. Aquaculture, 220: 883—901

SETTLEMENT AND METAMORPHOSIS OF SEA CUCUMBER *APOSTICHOPUS JAPONICUS* LARVAE INDUCED BY POTASSIUM CHLORIDE

WEI Xiu-Mei¹, YANG Ding-Long¹, WANG Sheng¹, JIANG Xu¹,
LIU Xiang-Quan¹, YANG Jian-Min¹, FANG Jing-Hui²

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Marine Ecology Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China)

Abstract The impact of potassium chloride (KCl) solutions on settlement and metamorphosis of doliolaria larvae of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) was studied in present work. Exposure of KCl was set in a spectrum of concentration at 10, 30 and 50 mmol/L for 6, 12, and 24 h. The results showed that the metamorphosis rates were significantly increased in KCl exposure at 10, 30, and 50 mmol/L for 6, 12, and 24 h; for example in 24-h group, it increased by 27.67%, 32.67%, and 19.67%, respectively. Although higher concentrations (100, 300, and 500 mmol/L) could also induce the metamorphosis, the mortality rate might rise with increasing KCl concentration and induction time. Overall, 12 h induction in low concentrations of KCl solution, e.g., 30 mmol/L, could significantly enhance the metamorphosis rates. Therefore, the combination of KCl treatment for doliolaria larvae in 30 mmol/L for 12 h was recommended in favor of the synchronism development in less mortality rate for better induction effect.

Key words KCl; sea cucumber; doliolarias; metamorphosis; induction