

化学物质诱导泥蚶幼虫附着变态的研究*

方建光 匡世煥 孙慧玲 梁兴明 刘志鸿 李锋 牛锡端

(农业部海水养殖病害与生态重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 1996年8~9月间在室内用8种化学诱导物对泥蚶变态前期幼虫进行附着变态诱导实验。结果表明, 8种药物对泥蚶幼虫的变态均有一定的诱导作用。其中, 3-HT、EPI和NE对幼虫变态的诱导作用极显著, 有效浓度范围较广; KCl和Ala的诱导作用较显著, 有效浓度范围较窄; 而Try、CABA和Ach只有某些浓度组的诱导效果明显, 诱导效率对浓度的信赖性较强。从诱导物浓度来看, 10^{-4} mol/L的Ala、GABA和 10^{-5} mol/L的EPI诱导效果最好, 与对照组相比, 变态率均提高12%以上。不同处理时间试验表明, 处理时间的长短与幼虫的变态率无一致的相关性关系, 因药而异; 总的来看, 处理时间不超过8 h的诱导效果较好, 时间过长诱导率降低(GABA除外)。其中, 用 10^{-5} mol/L的Ala处理1~4 h或 10^{-5} mol/L的EPI处理4 h效果最好, 与对照组相比, 变态率均提高25%以上。8种药物中, 只有Try表现出对幼虫明显的毒性影响, Try的浓度越高, 处理时间越长, 幼虫的死亡率越高, 用 10^{-4} mol/L的Try处理幼虫3 h, 死亡率达89%。

关键词 泥蚶, 幼虫, 附着变态, 化学诱导物

双壳类幼虫发育至眼点幼虫期或足面盘幼虫阶段, 即能发生变态, 此期的幼虫很容易受特异性环境诱导物的诱导在适宜的附着基上或栖息地完成附着变态过程^[1]。对贝类变态诱导的研究在理论上有助于了解其附着变态的机制, 实践上可服务于经济贝类的苗种生产和有害贝类的防治。研究表明, 多种化学物质包括金属离子和具有神经活性的化合物如氨基酸类, 胆碱类和儿茶酚氨类神经递质或其类似物能有效地诱导贝类幼虫附着变态^[2~5]。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国传统的滩涂贝类, 近年来其自然资源锐减。由于对其附着变态过程缺乏足够的认识, 苗种生产技术仍不成熟, 严重地制约了其海水养殖业的发展。为了完善泥蚶的苗种培育技术, 有必要对它的附着变态过程及机理进行研究。本文试验了8种化学诱导物对泥蚶变态的诱导效果, 以增进对附着变态机理的了解。

1 材料和方法

1.1 泥蚶幼虫

从胶南市棋子湾海珍品育苗厂取回壳长为140~145 μ m的D型幼虫, 在室温25~29℃和盐度28条件下暂养于75 L玻璃钢方箱中。主要饵料为等边金藻和角毛藻, 投喂量从早期的 10^4 /ml到后期的 5×10^4 /ml。日换水量为2/3。

1.2 化学诱导物

8种化学诱导物见表1。由于Ala、Try、GABA、3-HT、EPI、NE和Ach的浓度梯度跨度大, 每种诱导物采用 10^{-2} mol/L与 10^{-4} mol/L 2种母液。KCl的母液浓度为1 mol/L。母液用该化合物的结晶或粉末溶于经过滤和消毒的海水中(EPI和NE由于水溶性差, 先溶于少量0.5 mmol/L的稀HCl中)。所有母液均为即配即用。

1.3 实验方法

幼虫长至约190 μ m时, 约有50%的幼虫发育至匍匐幼虫期, 取此期幼虫进行实验。先用筛绢将匍匐幼虫浓缩, 再定量均分到实验用50 ml小烧杯

收稿日期: 1997-06-02

* 国家攀登计划B“海洋生物优抗研究”资助项目(PDB 6-3-2)

中。每个烧杯中幼虫总数约为 300 个。药物处理期间不换水, 不加饵。药物处理后, 用新鲜海水冲洗 3 遍, 尔后养于同一烧杯中待观察。实验结束时按次生壳的有无判定是否变态, 即已长次生壳者为变态个体。将每个烧杯中所有幼虫和稚贝置于解剖镜下统计计数; 同时记录死亡个体, 以统计死亡率。统计比较用 Microsoft Excel 5.0 软件的单因子方差分析, 置信度为 95%。

实验共分以下 2 组:

(1) 测定 8 种化学诱导物不同浓度处理对幼虫附着变态的影响, 处理时间为 3 h。每种化学诱导物分 5 个浓度梯度, 其中 KCl 的梯度为 10、15、20、25、30 mmol/L, 其它 7 种诱导物的梯度系列均为 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} mol/L。另设 4 个对照组。

(2) 测定 8 种化学诱导物不同时间处理对幼虫附着变态的影响, 处理浓度为 KCl 20 mmol/L, 其它诱导物 10^{-5} mol/L。每种化学诱导物分 6 个时间梯度, 分别为 1、2、4、8、16、32 h。另设 4 个对照组。

2 结果

2.1 不同浓度的化学诱导物对泥蚶幼虫变态的诱导作用

表 1 化学诱导物不同浓度处理的泥蚶幼体变态的提高率

Table 1 Percentage metamorphosis increment (P.M.I.) of *T. granosa* treated with chemical cues at different dose

诱导物 chemical cues	处理剂是/(mol·L ⁻¹) dose	变态提高率/% P.M.I.	F 值 F values	P 值 P values	显著性 significance
丙氨酸 Ala	$10^{-7} \sim 10^{-3}$	108.35	8.47	0.019	显著($P < 0.05$) S
色氨酸 Try	$10^{-7} \sim 10^{-3}$	11.62	0.12	0.733	不显著($P > 0.05$) N.S.
γ -氨基丁酸 GABA	$10^{-7} \sim 10^{-3}$	57.71	0.13	0.182	不显著($P > 0.05$) N.S.
3-羟酪胺 3-HT	$10^{-7} \sim 10^{-3}$	82.68	19.68	0.002	极显著($P < 0.01$) V.S.
肾上腺素 EPI	$10^{-7} \sim 10^{-3}$	122.04	13.59	0.006	极显著($P < 0.01$) V.S.
去甲肾上腺素 NE	$10^{-7} \sim 10^{-3}$	47.78	14.72	0.005	极显著($P < 0.01$) V.S.
氯化乙酰胆碱 Ach	$10^{-7} \sim 10^{-3}$	38.70	3.03	0.120	不显著($P > 0.05$) N.S.
氯化钾 KCl	$(1 \sim 3) \times 10^{-2}$	60.28	6.34	0.035	显著($P < 0.05$) S

* 3-羟酪胺即多巴胺, 文中有时也用 DOPA 代表。3-HT is Dopamine, abbreviated as DOPA in this paper.

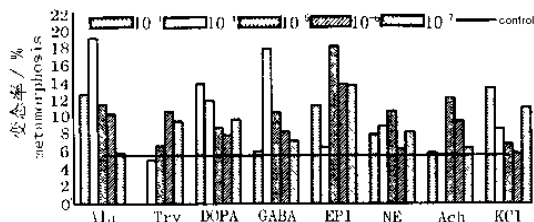


图 1 化学诱导物不同浓度处理对泥蚶幼虫变态率的影响

Fig. 1 Larval metamorphosis treated with chemical cues at different doses

从 8 种化学诱导物对幼虫的成活率的影响来

导作用

实验结果表明, 8 种化学诱导物对泥蚶幼虫变态具有不同程度的诱导和促进作用。各处理组的变态率大多数高于对照组(表 1)。将 8 种药物不同浓度处理得出的变态率分别和对照组进行比较, 方差分析表明, 3-HT、EPI 和 NE 对幼虫变态的诱导作用极显著, 这 3 种诱导物在所有试验浓度下对幼虫变态有均促进作用; KCl 和 Ala 的诱导作用较显著, 它们在多数试验浓度下对幼虫变态有促进作用; Try、GABA 和 Ach 的总体诱导效果不显著, 但其中某些浓度组的诱导效果也很明显, 它们对幼虫变态的促进作用对浓度的依赖性强。例如 10^{-4} mol/L 的 GABA 对幼体的附着变态具有很好的诱导作用。从诱导物浓度来看, 10^{-4} mol/L 的 Ala 和 GABA, 10^{-5} mol/L 的 EPI 诱导效果最好, 与对照组相比, 变态率均提高 12% 以上(图 1)。

看, 其中只有 Try 表现出对幼虫的毒性影响, 不超过 10^{-5} mol/L 的 Try 对幼虫无明显的毒性作用, 但 Try 的浓度越高, 幼虫的死亡率越高, 用 10^{-4} mol/L 的 Try 处理幼虫 3 h, 死亡率达 88.8%, 而用 10^{-3} mol/L 处理幼虫 3 h 死亡率达 100%。方差分析表明, 除 Try 外, 其它 7 种诱导物处理后幼体的死亡率与对照组无明显的差异, P 值均大于 0.05。

2.2 化学诱导物不同时间处理对泥蚶幼虫变态的诱导作用

10^{-5} mol/L 浓度(KCl 20 mmol/L)的 8 种诱导

物不同时间处理对泥蚶幼体的变态均具有促进作用,Ala、Try、GABA、EPI、NE、Ach、3-HT 和 KCl 处理后幼体的变态率分别比对照组高 22.17%、10.37%、15.25%、12.12%、5.98%、8.22%、3.74%、9.08%。方差分析表明,各诱导物处理后的幼体变态率均显著高于对照组($P < 0.05$)。但处理时间的长短与幼虫的变态率无一致的相关关系,因药而异;总的来看,处理时间不超过 8 h 的诱导效果较好,时间过长诱导率降低(GABA 除外)。其中 Ala 处理不超过 4 h, EPI 处理 4 h 的诱导效果最好,变态率提高 25% 以上(图 2)。

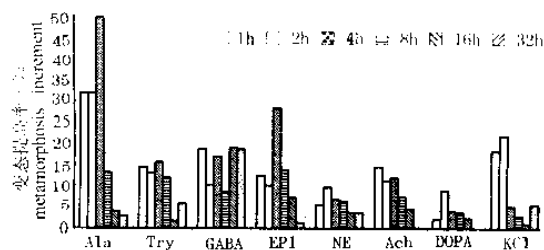


图2 化学诱导物的不同处理时间对泥蚶幼虫变态的影响
Fig.2 Increment of larval metamorphosis with chemical cues for different exposure time

从不同时间处理的死亡率来看, 10^{-5} mol/L 的 Try 处理 8 h 以上, 10^{-5} mol/L 的 Ach 处理 32 h 对泥蚶幼体的死亡率均有明显影响。其它诱导物的不同时间处理对幼体的死亡率无明显影响。

3 讨论与结语

贝类是典型的需经过变态的动物之一。贝类的变态过程既受其体内程序化的遗传机制的影响,也受外界环境因子的影响^[3]。实验表明,有多种化学诱导物可诱导贝类幼虫的变态过程。本实验所选用的 8 种化学物质都是被报道对某些贝类附着变态诱导效果较好的诱导物。但不同贝类的有效诱导物的种类及其浓度和处理时间也不完全一致。

本实验结果表明,8 种化学诱导物对泥蚶幼虫变态有不同程度的诱导作用。3-HT、EPI 和 NE 对幼虫变态的诱导作用极显著,有效浓度范围较广;KCl 和 Ala 的诱导作用较显著,有效浓度范围较窄,最佳浓度分别为 KCl 30 m mol/L, Ala 10^{-4} mol/L; Try、GABA 和 Ach 的总体诱导效果不显著,但其中某些浓度组的诱导效果也很明显(表 1),这表明其

诱导效率对浓度的依赖性较强,最佳浓度分别为 Try 10^{-6} mol/L, GABA 10^{-4} mol/L 和 Ach 10^{-5} mol/L。

胆碱类是最早被发现具有变态诱导作用的神经活性化合物^[3,6]。本实验表明用 10^{-5} mol/L 的 Ach 处理泥蚶幼虫 3 h,其变态率提高 1 倍,超过 4 h 的处理变态率逐渐降低。

GABA 也是较早发现具有附着变态诱导作用的神经活性物质之一。Morse 等^[7]首先报道它对红鲍的变态具有刺激作用。在随后的研究中, Morse 发现 GABA 对马蹄螺、芋螺、海兔、船蛆、石鳖等附着变态也具有诱导作用^[4]。本试验表明 GABA 对泥蚶幼虫的最佳诱导浓度为 10^{-4} mol/L,但 1~32 h 的处理时间对其诱导作用无明显的影响。研究表明 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ mol/L 的 GABA 对牡蛎 *Crassostrea belcheri* 的附着变态有较好的诱导作用,但对其它牡蛎如 *C. gigas*, *C. hastata*, *Perna viridis*, *C. iredalei* 等无诱导作用^[8]。

K^+ 对幼虫变态诱导作用的机制在于使幼虫体外与诱导物识别有关的受体细胞去极化,这种去极化随之引发幼虫体内的某些与变态有关的变化^[9]。已经证明适宜的 K^+ 可诱导多种软体动物附着变态^[5,9]。本实验表明,30 m mol/L 的 KCl 处理 3 h 对泥蚶幼虫变态有较好的诱导作用。

儿茶酚胺类神经递质被证明是多种贝类最有效的附着变态诱导物^[10]。本实验也表明,3-HT、EPI 和 NE 对泥蚶幼虫变态的诱导作用极显著,有效浓度范围广(在 $10^{-7} \sim 10^{-3}$ mol/L 范围内均能较好地诱导泥蚶幼虫变态),其中 EPI、NE 和 3-HT 的最佳诱导浓度分别为 10^{-5} 、 10^{-5} 、 10^{-3} mol/L。据报道 EPI 诱导 *C. belcheri* 变态的最佳浓度为 10^{-5} mol/L,而 *C. iredalei*, *C. gigas*, *C. lugubris*, *Saccostrea commercialis* 为 10^{-4} mol/L^[5]。 10^{-5} mol/L 的 NE 诱导 *C. belcheri*, *C. lugubris*, *S. commercialis* 效果最佳;而 10^{-4} mol/L 的 NE 诱导 *C. iredalei*, *C. gigas*, *S. virginica* 效果最佳^[8]。

本文初步对 4 大类 8 种化学物质对泥蚶幼虫的附着变态进行了研究,受实验手段和实验对象个体太小等因素的限制,无法从生化和分子生物学水平上对其变态机理进行深入的研究;对天然诱导物的附着变态诱导作用也有待于进行探索。

参 考 文 献

- 1 Eyster L S, J A Pechenik. Attachment of *Mytilus edulis* L. larvae

- on algal and byssal filaments is enhanced by water agitation. J Exp Mar Biol Ecol, 1987, 114:99~110
- 2 Cooper K. A model to explain the induction of settlement and metamorphosis of the planktonic eyed - pediveligers of the blue mussel *Mytilus edulis* L. by chemical and tactile cues. J Shellfish Res, 1982, 2:117(abstract)
 - 3 Hadfield M G. Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles. Aquaculture, 1984, 39:283~298
 - 4 Morse D E. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. Bull Mar Sci, 1990, 46:465~483
 - 5 Yool A J, S M Grau, M G Hadfield, et al. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. Biol Bull, 1986, 170:255~266
 - 6 Bonar D B. Molluscan metamorphosis: a study in tissue transformation. Amer Zool, 1976, 16:573~591
 - 7 Morse D E, N Hooker, H duncan, et al. γ - Aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis. Science, 1979, 204:407~410
 - 8 Tan S, T Wong. Induction of settlement and metamorphosis in the tropical oyster, *Crassostrea belcheri* (Sowerby), by neuroactive compounds. J shellfish Res, 1995, 14(2):435~438
 - 9 Pechenik J A, C C Gee. Onset of metamorphic competence in larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.), judged by a natural and an artificial cue. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 167:59~72
 - 10 Coon S L, D B Bonar. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) by L - DOPA and catecholamines. J Exp Mar Biol Ecol, 1985, 94:211~221

Inducement of settlement and metamorphosis by chemical cues in *Tegillarca granosa* larvae

Fang Jianguang Kuang Shihuan Sun Huiling Liang Xingming Liu Zhihong Li Feng Niu Xiduan

(Key Laboratory of Maricultural Diseases & Ecology of Ministry of Agriculture,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The competent *Tegillarca granosa* larvae were induced to metamorphose by 8 different kinds of chemical cues including DL - α - alanine (Ala), DL - tryptophan (Try), γ - aminobutyric acid (GABA), 3 - hydroxytyramine (3 - HT, or Dopamine), epinephrine (EPI), L - noradrenalin (NE), acetylcholine chloride (Ach), potassium chloride (KCl). Effects of these chemical cues on the metamorphoses and survival of *T. granosa* larvae at different concentrations and exposure times were tested during August and September, 1996.

Results show that all these chemical cues induce larval metamorphosis to some extent. In general, 3 - HT, EPI and NE can induce larval metamorphosis very significantly, and the metamorphosis rates are increased in all the treatments; KCl and Ala can induce larval metamorphosis significantly, and metamorphosis rates are increased in most of the treatments; Try, GABA and Ach can induce larval metamorphosis at very strict concentration. From single concentration treatment, 10^{-4} mol/L of Ala, GABA and 10^{-5} mol/L of EPI can induce larval metamorphosis most effectively, and the metamorphosis rate increases by over 12%. Results also show that the relationship between exposure time and metamorphosis rate varied with different chemical cues. In general, exposure time less than 8 h, the treatments can induce larval metamorphosis more effectively than a longer time. Treated with Ala(10^{-5} mol/L) for 1~4 h or EPI(10^{-5} mol/L) for 4 h, the larvae have the most effective metamorphosis, of which both the percentages increase by more than 25%. Among these 8 kinds of chemical cues, only Try has negative effects on the larvae that the higher the concentration and the longer the exposure time of Try are, the higher the larval mortality is. Treated with Try at a concentration of 10^{-4} mol/L and exposure time of 3 h, the larvae have a mortality of 89%.

Key words *Tegillarca granosa*, larva, settlement, metamorphosis, chemical cues