

化学物质对不同发育天数海湾扇贝幼虫变态的诱导

张涛, 阙华勇, 杨红生, 何义朝, 张福绥

(中国科学院海洋研究所, 山东青岛266071)

摘要:自海湾扇贝(*Argopecten irradians*)受精后第10天起, 定期取一定量海湾扇贝幼虫, 分别置于不同浓度梯度的KCl、肾上腺素、去甲肾上腺素、L-DOPA、5-羟色胺、GABA、茶碱和咖啡因等8种诱导物中, 处理时间为8 h。实验后第14天取出幼虫观察显示, 这8种诱导物对不同发育天数海湾扇贝幼虫的变态有着不同的诱导作用。 13.42×10^{-3} 和 20.13×10^{-3} mol/L的KCl对第12天幼虫的变态有抑制作用, 变态提高率为负值; 当幼虫发育至第13和14天时, 上述两浓度的KCl能够明显诱导幼虫变态, 变态率均提高20%以上, 而对于第16天的幼虫诱导作用有所减弱, 变态提高率有所降低; 26.85×10^{-3} mol/L的KCl对第12和13天幼虫的变态均有抑制作用, 变态提高率为负值, 对第14和16天幼虫的变态却有明显持续的诱导作用, 变态率分别提高22.98%和37.5%。神经递质肾上腺素、去甲肾上腺素、L-DOPA、5-羟色胺和GABA的诱导作用规律基本相似, 即对第13天海湾扇贝幼虫的变态有明显的抑制作用, 变态提高率均为负值, 而对第14天幼虫的诱导作用较显著。茶碱和咖啡因作为影响细胞内cAMP的物质, 其诱导作用规律与神经递质有所不同, 对第13天海湾扇贝幼虫变态的诱导效果最好。

关键词:化学物质; 海湾扇贝; 变态; 诱导

中图分类号:S968.313

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)03-0228-06

贝类幼虫的附着变态是在一定环境因子的诱导下完成的^[1]。幼虫在不同发育阶段对环境因子的敏感性是不同的。当幼虫自身还没有附着变态能力时, 环境因子(包括人工诱导物)对幼虫的附着变态是不起作用的。我们主要研究了KCl、肾上腺素、去甲肾上腺素、L-DOPA、5-羟色胺、GABA、茶碱和咖啡因8种诱导物对海湾扇贝不同发育天数幼虫变态的诱导情况, 旨在寻找利用人工诱导物诱导海湾扇贝幼虫变态的最佳时机, 从而为人工诱导物在海湾扇贝苗种生产中大规模应用提供数据参考。

1 材料和方法

1.1 幼虫来源

海湾扇贝幼虫由中国科学院海洋研究所徐家麦岛实验基地培育。培育温度为 $(23 \pm 1.0)^\circ\text{C}$, 盐度为

30~32。详细培育方法参见张福绥等^[2]的方法。

1.2 诱导物浓度设置与处理时间

诱导物均现用现配。首先用蒸馏水将诱导物配成10倍于目标浓度的母液备用。KCl目标浓度为 13.42×10^{-3} 、 20.13×10^{-3} 和 26.85×10^{-3} mol/L, 处理时间为24 h; 肾上腺素、去甲肾上腺素和L-DOPA均为 1.0×10^{-5} 、 5.0×10^{-5} 和 1.0×10^{-4} mol/L, 处理时间均为8 h; 5-羟色胺和GABA为 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 和 1.0×10^{-4} mol/L, 处理时间均为8 h; 茶碱和咖啡因的浓度均为 1.0×10^{-4} 和 1.0×10^{-3} mol/L, 处理时间均为8 h。

1.3 实验步骤

从第10天(从受精卵开始计时)起, 定期从徐家麦岛实验基地取一定量的海湾扇贝幼虫。实验用海水经Whatman GF/C玻璃纤维滤膜过滤。将一定量的药品母液加入盛有幼虫的过滤海水中并用过滤海水稀释至目标浓度。由于药品母液的加入而使海水盐度降低1%~10%, 对照组中加入相当量的蒸馏水, 以保持与处理组盐度一致。幼虫经过预定处理时间后, 用250目筛绢滤出, 并用过滤海水将药品

收稿日期:2001-06-04。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970588)。

作者简介:张涛(1971-), 男, 博士, 从事贝类繁殖发育生物学和贝类实验生态学方面的研究工作, E-mail: tzhang@ms.qdio.ac.cn

通讯作者:杨红生, E-mail: hshyang@ms.qdio.ac.cn

冲洗干净,放入6孔细胞培养板中完成剩余实验周期。6孔细胞培养板每孔海水体积约为10 mL,幼虫50~100个。14 d(从实验开始后计时)后用碘液固定幼虫,在解剖镜下检查幼虫变态率和死亡率。以海湾扇贝幼虫长出次生壳为变态标志。每个处理组均设3个平行。

2 结果

2.1 KCl对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

结果见图1。 $13.42 \times 10^{-3} \sim 26.85 \times 10^{-3}$ mol/L的KCl对第10天幼虫的变态有一定的诱导作用,变态率与对照组相比均有所提高;但当幼虫发育至第12天时,KCl对幼虫的变态产生了一定的抑制作用,变态率均低于对照组;当幼虫发育至第13天时, 13.42×10^{-3} 和 20.13×10^{-3} mol/L的KCl能够明显地提高变态率,分别提高20.88%和23.52%,但 26.85×10^{-3} mol/L的KCl依然对幼虫变态有抑制作用,变态率低于对照组;当幼虫发育至第14天时, $13.42 \times 10^{-3} \sim 26.85 \times 10^{-3}$ mol/L的KCl对幼虫的变态均有明显的诱导作用,变态率与对照组相比,分别提高24.09%、25.88%和22.98%;当幼虫发育至第16天时, 13.42×10^{-3} 和 20.13×10^{-3} mol/L的KCl对幼虫变态率的提高有所降低,而 26.85×10^{-3} mol/L的KCl对幼虫变态率的提高却继续增加,达到37.5%。

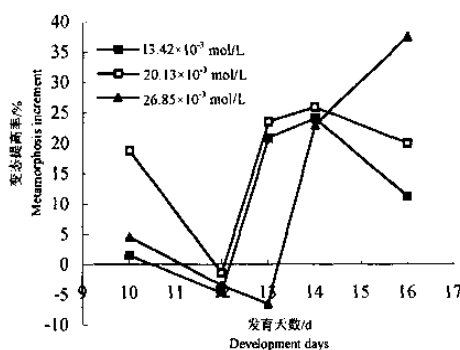


图1 KCl对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

Fig.1 Effects of KCl on metamorphosis in larval bay scallop *A. irradians*

2.2 肾上腺素对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

结果见图2。肾上腺素对13日龄幼虫的诱导效果最差,变态率均低于对照组,而对于14日龄幼

虫的诱导效果最好,变态率与对照组相比均提高20%以上,分别为23.93%、34.92%和21.53%。

2.3 去甲肾上腺素对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

结果见图3。去甲肾上腺素对13日龄以前幼虫的诱导效果较差,变态率与对照组相比基本没有提高,变态提高率大部分为负值。当幼虫发育至第14天时, 1.0×10^{-5} 和 5.0×10^{-5} mol/L的去甲肾上腺素对幼虫变态的诱导作用最强,变态提高率分别20.41%和16.57%,第16天时诱导效果较差,变态提高率均低于10%。 1.0×10^{-4} mol/L的去甲肾上腺素在本实验条件下(处理时间为8 h),对第10~16天幼虫的变态诱导作用均较差,变态提高率均低于5%。

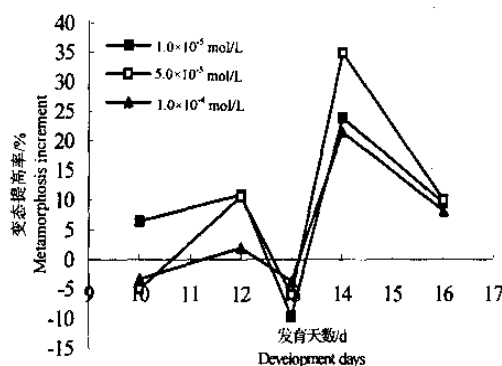


图2 肾上腺素对海湾扇贝幼虫变态诱导效果

Fig.2 Effects of EPI on metamorphosis in larval bay scallop *A. irradians*

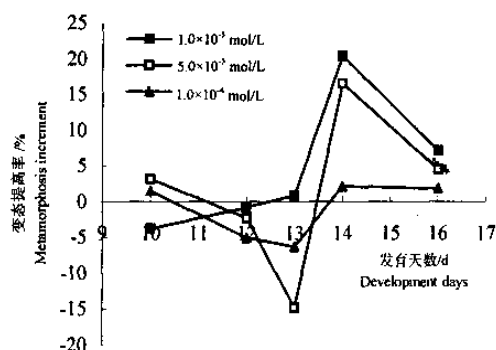


图3 去甲肾上腺素对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

Fig.3 Effects of NE on metamorphosis in larval bay scallop *A. irradians*

2.4 L-DOPA 对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

结果见图4。L-DOPA 对第13天以前的海湾扇贝幼虫的变态并没有诱导作用,反而有一定的抑制作用,幼虫变态提高率均为负值,并且随着发育时间的延长,抑制作用越来越强,在第13天时达到最强,变态提高率负值最高。 1.0×10^{-5} mol/L 的 L-DOPA 在幼虫发育至第14、16天时诱导效果较好,变态提高率分别为25.34%和25%; 5.0×10^{-5} mol/L 的 L-DOPA 在第14和16天时也有一定诱导作用,变态提高率分别为8.94%、12.41%;而 1.0×10^{-4} mol/L 的 L-DOPA 在本实验条件下,对第10~16天幼虫变态均没有明显诱导作用。

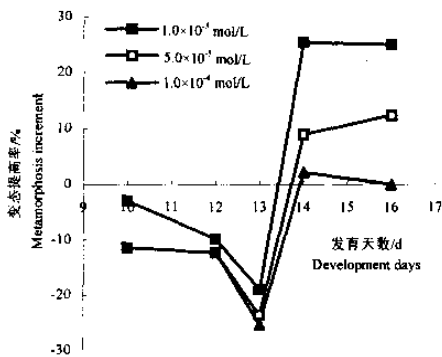


图4 L-DOPA 对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

Fig.4 Effect of L-DOPA on metamorphosis in larval bay scallop *A. irradians*

2.5 5-羟色胺对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

结果见图5。对于第13天以前的海湾扇贝幼虫,随着发育时间的延长,5-羟色胺的诱导效果越来越差,变态提高率在第13天时均为负值,而在第14天时变态提高率均最高,分别为24.96%、28.95%和24.46%。

2.6 GABA 对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

结果见图6。GABA 的诱导效果规律类似于5-羟色胺,对第13天以前的海湾扇贝幼虫,随着发育时间的延长,GABA 的诱导效果越来越差,变态提高率在第13天时均为负值, 1.0×10^{-6} 和 1.0×10^{-5} mol/L 的 GABA 在第14天时变态提高率均最高,分别为21.89%和21.25%,在第16天时诱导效果也较好,但较第14天的幼虫变态提高率有所降低,分别为17.67%和11.14%。 1.0×10^{-4} mol/L 的 GABA 对第10~16天幼虫变态的诱导效果均较

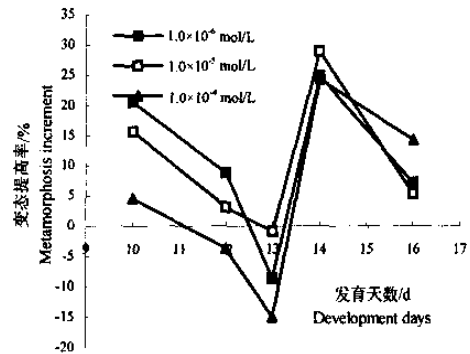


图5 5-羟色胺对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

Fig.5 Effects of 5-HT on metamorphosis in larval bay scallop *A. irradians*

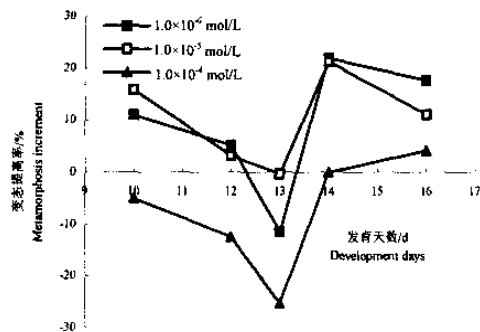


图6 GABA 对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

Fig.6 Effects of GABA on metamorphosis in larval bay scallop *A. irradians*

差,变态提高率大部分为负值,最高也仅为4.17%。

2.7 茶碱对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

结果见图7。茶碱对于不同发育天数海湾扇贝幼虫变态的诱导效果规律与前面6种神经递质的有所不同。 1.0×10^{-4} mol/L 的茶碱对第14天的幼虫诱导效果最好,变态提高率为10.33%;而 1.0×10^{-3} mol/L 的茶碱对于第13天的幼虫诱导效果最好,变态提高率为15.9%,之后变态提高率有所下降,但直到对于第17天的幼虫变态提高率还可以达到9.92%。茶碱在本实验条件下对于第10~12天海湾扇贝幼虫的变态没有明显诱导作用。

2.8 咖啡因对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

结果见图8。咖啡因对于不同发育天数海湾扇

贝幼虫变态的诱导效果规律与茶碱相似。在本实验条件下,咖啡因对于第10天幼虫的变态没有诱导作用,变态提高率为负值。 1.0×10^{-4} mol/L的咖啡因对于第10~17天幼虫的诱导效果不明显,而 1.0×10^{-3} mol/L的咖啡因对于第12天的幼虫诱导作用较明显,变态提高率为18.73%,对于第13天的幼虫诱导效果最明显,变态提高率高达30.73%,之后诱导作用逐渐减弱,对于第14、15、17天的幼虫,变态提高率分别为13.45%、11.53%和9.97%。

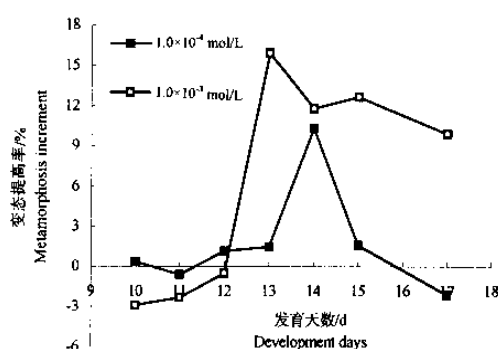


图7 茶碱对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

Fig.7 Effects of theophylline on metamorphosis in larval bay scallop *A. irradians*

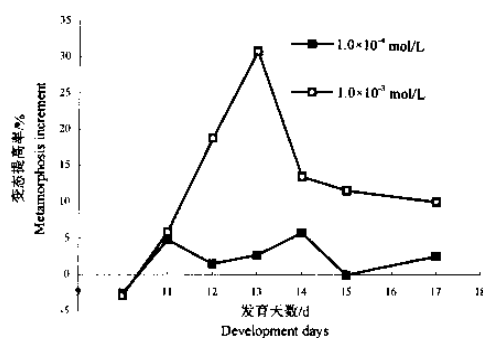


图8 咖啡因对海湾扇贝幼虫变态的诱导效果

Fig.8 Effects of caffeine on metamorphosis in larval bay scallop *A. irradians*

3 讨论

贝类幼虫的附着变态过程是在一定诱导因子的诱导下完成的,但并不是所有发育天数的贝类幼虫都对诱导因子有反应。只有当幼虫发育到一定天数

在获得了一定的能力后,才对诱导因子有反应。但贝类幼虫获得这种能力的机理尚不清楚,一般认为是神经系统参与了贝类幼虫的附着变态过程^[3-8]。本文作者在进行海湾扇贝幼虫变态机理研究过程中发现,同一种诱导物有时对不同发育天数海湾扇贝幼虫变态的诱导作用存在很大差异。基于此,设计了本实验。在前期研究中,本作者对这8种诱导物的适宜诱导浓度和适宜处理进行过详细研究,本实验所设诱导浓度和处理时间均是适宜诱导浓度和适宜处理时间,对海湾扇贝幼虫的死亡率没有明显影响。因此,在本文结果未列出幼虫死亡率的结果。从本研究结果看,KCl和作为神经递质的肾上腺素、去甲肾上腺素、L-DOPA、5-羟色胺、GABA以及影响细胞内cAMP的茶碱和咖啡因对不同发育天数海湾扇贝幼虫的诱导作用规律是不同的,主要表现在这些诱导物对第13、14天幼虫的诱导作用存在很大差别,可能与它们诱导海湾扇贝幼虫变态的机理不同有关。一般认为,K⁺是通过直接影响细胞膜的电势,使细胞膜去极化,从而诱导幼虫变态^[9-10],肾上腺素、去甲肾上腺素、L-DOPA、5-羟色胺和GABA是通过与一定的受体结合后引起一系列的生理生化反应诱导幼虫变态,而茶碱和咖啡因可能是通过影响幼虫体内cAMP含量来诱导幼虫变态。从第13天的幼虫对不同诱导物反应的变化来看,此时幼虫体内可能发生了许多与变态有关的生理生化反应。本作者发现,海湾扇贝幼虫发育到13天时(23℃)体内神经递质多巴胺和5-羟色胺含量急剧增加,比第12天的幼虫分别增加了2.8倍和5.7倍,变态后急剧下降,变态后稚贝比第13天的幼虫分别降低了25.1倍和16.4倍,这说明神经递质多巴胺和5-羟色胺可能对海湾扇贝幼虫的变态发挥了重要作用,同时也说明神经系统可能参与了海湾扇贝幼虫的变态过程^[11]。通过以上发现,可以从一方面解释本文中的现象。海湾扇贝幼虫在第13天体内分泌大量神经递质诱导变态,此时加入外界神经递质(如肾上腺素、去甲肾上腺素、L-DOPA、5-羟色胺和GABA)可能与体内神经递质产生拮抗作用,因此,肾上腺素、去甲肾上腺素、L-DOPA、5-羟色胺和GABA对第13天海湾扇贝幼虫的变态起抑制作用,而此时加入茶碱和咖啡因提高了第2信使cAMP的含量,促进了海湾扇贝幼虫对本身分泌的神经递质多巴胺和5-羟色胺的利用(多巴胺和5-羟色胺通过第2信使cAMP而起作用),因此,茶

碱和咖啡因对第13天海湾扇贝幼虫变态的诱导作用最大。许多海洋无脊椎动物,如贝类、棘皮动物、藤壶、多毛类和苔藓虫等在发育过程中都不同程度存在延迟变态(Delayed metamorphosis)现象,即幼虫具有附着变态能力后,能够保持一定时间的附着变态能力^[12]。对于不同海洋无脊椎动物,延迟变态时间则短则1天甚至几小时,长则可达上百天^[13]。延迟变态能够使一些海洋无脊椎动物幼虫对一些诱导物不敏感,甚至丧失变态能力。从本研究的结果可看出,延迟变态使海湾扇贝幼虫对诱导物的敏感性产生了不利影响,在经过1~2 d(23℃条件下受精后第13或14天)的敏感阶段之后,幼虫对诱导物的敏感性降低,诱导变态所需要的浓度增大,如 13.42×10^{-3} 和 20.13×10^{-3} mol/L的KCl对第14天以后幼虫的诱导作用开始减弱,而 26.85×10^{-3} mol/L的KCl对第16天的幼虫仍具有较好的诱导作用,变态提高率仍可达37.5% (图1)。Qian等^[14]发现多毛类 *Hydroides elegans* 幼虫也存在类似规律。本实验的结果表明,延迟变态使海湾扇贝幼虫对诱导物的敏感性受到影响,一般在受精后第13或14天对诱导物最敏感(培育温度23℃),超过这个时间,敏感性降低。因此,在海湾扇贝的苗种生产中应尽量使幼虫在海水中浮游的时间不超过14 d,尽量使幼虫早附着早变态,以避免延迟变态造成的不利影响。

参考文献:

- [1] Hadfield M G. Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles[J]. Aquaculture, 1984, 39: 283 - 298.
- [2] 张福绥, 何义朝, 刘祥生, 等. 海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 引种、育苗及试养[J]. 海洋与湖沼, 1986, 17(5): 367 - 374.
- [3] Burke R D. The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae: stimulus and response[J]. Can J Zool, 1983, 61: 1 701 - 1 719.
- [4] Hirata K Y, Handfield M G. The role of choline in metamorphic induction of *Phostilla* (Hastropoda, Nudibranchia)[J]. Comp Biochem Physiol, 1986, 84C: 15 - 21.
- [5] Leise E M, Hadfield M G. An inducer of molluscan metamorphosis transforms activity patterns in a larval nervous system[J]. Biol Bull, 2000, 199: 241 - 250.
- [6] Morse D E. Neurotransmitter-mimetic inducers of larval settlement and metamorphosis[J]. Bull Mari Sci, 1985, 37(2): 697 - 706.
- [7] Pechenik J A, Heyman W D. Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.)[J]. J Exp Biol Ecol, 1987, 112: 27 - 38.
- [8] Trapido-Rosenthal H G, Morse D E. Regulation of receptor-mediated settlement and metamorphosis in larvae of a gastropod mollusc (*Haliotis Rufescens*)[J]. Bull Mari Sci, 1986, 39(2): 383 - 392.
- [9] Baloun A J, Morse D E. Ionic control of settlement and metamorphosis in larvae *Haliotis Rufescens* (Gastropoda)[J]. Biol Bull, 1984, 167: 124 - 138.
- [10] Yool A J, Grau. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species[J]. Biol Bull, 1986, 170: 255 - 266.
- [11] 张涛, 邬华勇, 杨红生, 等. 海湾扇贝幼虫变态过程中体内神经递质含量的变化[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 15 - 20.
- [12] Coon S L, Fitt W K, Bonar D B. Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Marine Biology, 1990, 106: 379 - 387.
- [13] Pechenik J A. Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates: Does it occur? Is there a price to pay? [J] FII Ophelia, 1990, 32(1-2): 63 - 94.
- [14] Qian P - Y, Pechenik J A. Effects of larval starvation and delayed metamorphosis on juvenile survival and growth of the tube-dwelling polychaete *Hydroides elegans* (Haswell)[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1998, 227: 169 - 185.

Induction of metamorphosis of different day-old bay scallop *Argopecten irradians* by chemical cues

ZHANG Tao, QUE Hua-yong, YANG Hong-sheng, HE Yi-chao, ZHANG Fu-sui

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

Abstract: The larval *Argopecten irradians* individuals were sampled regularly after the eggs were fertilized for 10 d and exposed to solutions of KCl (concentration gradients 13.42, 20.13, 26.85 mmol/L), epinephrine (EPI, 0.01, 0.05, 0.1 mmol/L), norepinephrine (NE, the same as EPI), L-DOPA (the same as EPI), 5-HT (1.0, 10.0, 100.0 $\mu\text{g/L}$) GABA (the same as 5-HT), theophylline (0.1, 1.0 mmol/L) and caffeine (the same as theophylline), respectively, for 8 h. After 14 d, the larvae were fixed by I_2 solution and inspected. The 8 chemical cues have different effects on the larval metamorphosis at different age of days that KCl at 13.42 and 20.13 mmol/L can inhibit the metamorphosis of 12-day-old larvae, but significantly increase the metamorphosis of 13- and 14-day-old larvae with the metamorphosis increment rate $> 20\%$, and the inductive effect reduces on day 16. KCl at 26.85 mmol/L has inhibitive effect on 12- and 13-day-old larvae's metamorphosis but can promote the metamorphosis of 14- and 16-day-old larvae with the metamorphosis increment rates of 22.98% and 37.5%, respectively. The inductive effects of neurotransmitters EPI, NE, L-DOPA, 5-HT and GABA are similar that they all inhibit the larval metamorphosis on day 13 but increase the larval metamorphosis on day 14. The inductive effects of theophylline and caffeine, which influence intracellular CAMP concentration, are different from neurotransmitters that the optimum inductive effects are obtained on day 13.

Key words: chemical cues; *Argopecten irradians*; metamorphosis; induction

Corresponding author: YANG Hong-sheng. E-mail: hshyang@ms.qdio.ac.cn

欢迎订阅《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊,主要报道水产生物学基础研究、水产生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及渔船、渔业机械与仪器等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。主要服务对象是科研、教学、科技管理人员以及大专院校师生。

本刊为双月刊, A4 开本, 每期 88 页, 双月出版, 国内外公开发行。国内定价 14 元/期, 全年 84 元(含邮费)。邮发代号: 18-250, 国内统一刊号: CN11-3446/S, 国际标准刊号: ISSN1005-8737, 国外代号 4639Q。全国各地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期刊, 请直接向编辑部订阅。另备有少量合订本, 欢迎购买。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号, 邮政编码: 100039, 联系电话: 010-68673921, 传真: 010-68673931; E-mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net