

DOI: 10.3724/SP.J1118.2011.00202

浒苔提取物对太平洋牡蛎受精卵孵化的抑制效应

王超^{1,2}, 于仁成¹, 周名江¹

1. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 清华大学 深圳研究生院 广东 深圳 518055

摘要: 针对 2007–2009 年间在黄海海域形成“绿潮”的大型绿藻浒苔(*Enteromorpha prolifera*), 研究了其 3 种不同极性有机溶剂(甲醇、丙酮、氯仿)提取物对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)受精卵孵化的影响。结果表明, 在 48 h 内, 浒苔的甲醇和丙酮提取物对太平洋牡蛎受精卵孵化有较强的抑制作用, 高浓度提取物能够完全抑制太平洋牡蛎受精卵孵化至 D 型幼虫, 而氯仿提取物对太平洋牡蛎受精卵孵化的影响没有明显的浓度–效应关系。应用乙酸乙酯和石油醚对浒苔的甲醇提取物进行液–液萃取, 并探讨了乙酸乙酯相和石油醚相中的浒苔提取物对牡蛎受精卵孵化的影响, 结果表明, 石油醚相和乙酸乙酯相中的浒苔提取物对牡蛎受精卵孵化均有很强的抑制效应。上述研究表明, 浒苔中存在能够抑制太平洋牡蛎受精卵孵化的活性物质, 这类物质应具有较高的极性。[中国水产科学, 2011, 18(1): 202–207]

关键词: 浒苔; 太平洋牡蛎; 受精卵; 孵化

中图分类号: S949; X173

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2011)01–0202–06

2007–2009 年, 黄海海域连续 3 年暴发大规模绿潮, 肇事种被鉴定为绿藻门浒苔属的浒苔(*Enteromorpha prolifera*)^[1]。根据分子系统发育研究结果, 浒苔属(*Enteromorpha*)与石莼属(*Ulva*)应该合并为石莼属^[2], 因此, 也有文献将浒苔归于石莼属。以往研究表明, 绿潮会影响近海生态环境^[3–4], 导致生物多样性降低、海水透明度下降、生境破坏及养殖业损失等^[5–9]。黄海海域的浒苔绿潮影响海域面积大、持续时间长^[10], 可能引起的生态环境效应特别令人关注。

通常认为, 绿潮的危害主要来自于绿藻与其他藻类之间的营养竞争、绿藻呼吸和腐烂过程中的溶解氧消耗, 以及绿藻腐烂分解过程中产生的有毒有害物质, 绿藻本身对于其他海洋生物并没有显著的急性毒性效应。但是, 近年来越来越多的研究证据表明, 大型海藻也会产生一些防御性化合物, 影响其他海洋生物的生长和繁殖^[11]。

Nelson 等^[12]研究发现, 石莼类绿藻能够产生具有化感效应的物质, 其水溶性提取物会抑制微藻的生长和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的幼体发育。因此, 黄海海域的大规模绿潮发生期间, 浒苔也有可能通过产生化感物质, 危及海洋生物和近海生态系统。

牡蛎是一类具有较高经济价值的贝类, 广泛分布于中国沿海。其中, 太平洋牡蛎是主要的养殖品种之一。本研究以太平洋牡蛎作为研究对象, 初步研究了绿潮期间采集的浒苔样本对太平洋牡蛎受精卵孵化的影响, 旨在为全面认识浒苔绿潮的危害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 浒苔样品的采集和处理

浒苔样品于 2009 年 5 月采自青岛第一海水浴场。将采集的新鲜浒苔去除杂藻, 用海水反复清

收稿日期: 2010–03–16; 修订日期: 2010–07–07。

基金项目: 国家 973 计划项目(2010CB428705); 科技部支撑计划项目(2008BAC49B01); 基金委创新研究群体科学基金项目(40821004)。

作者简介: 王超(1982–), 男, 博士研究生, 从事有害藻华和生态毒理学研究。E-mail: milesdemail@gmail.com

通讯作者: 于仁成, 研究员。E-mail: reyu@qdio.ac.cn

洗后,再用蒸馏水冲洗,用滤纸吸去水分,−20℃冰冻保存。

实验前将保存的浒苔样品解冻,在 60℃下烘干 24 h 后,用研钵研磨成粉末。采用 3 种不同极性的有机溶剂甲醇、丙酮和氯仿(色谱纯)分别提取浒苔干粉中的活性成分,提取过程如下:取 10 g 浒苔干粉与 100 mL 有机溶剂混合放置在 20℃的黑暗环境中震荡提取 24 h,以高速离心机 3 000 r/min 离心 5 min 后,吸取上层清液,沉淀用上述方法重复提取 2 次,将 3 次提取液合并,以旋转蒸发器减压浓缩至干。所得的提取物分别用上述 3 种有机溶剂各 10 mL 重新溶解,得到 3 种有机溶剂的粗提液,浓度相当于 1 000 g(浒苔干粉)/L,稀释后用于对牡蛎受精卵孵化的影响实验。

为进一步了解浒苔中活性成分的性质,采用石油醚和乙酸乙酯对甲醇粗提液中的活性物质进行液-液萃取。在 20℃下,将甲醇提取液(1 000 g/L)1 mL 以 1:1 的比例加入石油醚,重复萃取 5 次后,合并石油醚相。同样,按 1:1 的比例用乙酸乙酯萃取 1 mL 甲醇粗提液 5 次,合并乙酸乙酯相。分别将石油醚和乙酸乙酯萃取溶液减压蒸干后,溶解于 10 mL 甲醇,作为石油醚和乙酸乙酯萃取母液,其浓度均相当于 100 g(浒苔干粉)/L,用于测试石油醚和乙酸乙酯萃取物对牡蛎受精卵孵化的影响。

1.2 牡蛎受精卵孵化实验

实验所用的太平洋牡蛎亲贝由中国科学院海洋研究所生物技术中心提供,在实验室内海水中暂养,水温 18℃,暂养期间投喂新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)。取壳长(11.6±0.5) cm 的性成熟牡蛎亲贝,解剖取出精、卵,于海水中受精 10 min 后,立即用 20 μm 筛绢收集受精卵,轻轻冲洗后,重悬于海水中,取样计数受精卵密度后备用。

以 6 孔细胞培养板作为实验容器,进行浒苔提取液对太平洋牡蛎受精卵孵化影响的实验。每孔中含有 4 mL 消毒海水,实验所用海水是取自青岛太平角的无污染海水,使用前经脱脂棉过滤和高温消毒,并以 ATAGO 手提式盐度计测定盐

度。针对浒苔的甲醇、丙酮和氯仿粗提物,各设置 1 个对照组和 4 个浓度梯度,分别为 0.25 g(浒苔干粉)/L、0.50 g/L、1.00 g/L 和 2.00 g/L。各浓度组实验液以海水稀释浒苔提取液配制,同时,向低浓度组中补加适量有机溶剂,使各组中有机溶剂加入量保持一致。对照组仅添加与各实验组等量的有机溶剂。每个组都设置 3 个平行。对浒苔的石油醚和乙酸乙酯萃取物,共设置 1 个对照组和 3 个浓度梯度,分别相当于 0.50 g(浒苔干粉)/L、1.00 g/L 和 2.00 g/L。每孔加入 30 μL 受精卵液,含有 200~300 个受精卵。各孔板置于(23±1)℃恒温培养箱内于黑暗环境中完成实验。

在(23±1)℃条件下,太平洋牡蛎的受精卵经历了囊胚期(5 h)、原肠胚期(10 h)、担轮幼虫期(15 h)和 D 型幼虫期(24 h)。孵化实验共进行 48 h,实验结束后立即用鲁哥氏液固定样品,在 Nikon 显微镜下观察拍照并记录 D 型幼虫数,按如下公式计算牡蛎受精卵的孵化率。

$$\text{孵化率}(\%) = \text{D 型幼虫数} / \text{起始受精卵数} \times 100$$

1.3 统计分析

以 one-way ANOVA 对各实验组受精卵孵化率的差异显著性进行统计分析,采用 Tukey test 分析各处理组与对照组的差异显著性。当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 3 种有机溶剂粗提液对牡蛎受精卵孵化的影响

本研究以 3 种不同极性的有机溶剂甲醇、丙酮和氯仿提取浒苔干粉中的活性物质,并比较了 3 种粗提液对牡蛎受精卵孵化的影响。图 1 是甲醇粗提液对受精卵孵化的影响实验结果。可以看出,随着甲醇粗提液浓度的提高,太平洋牡蛎受精卵的孵化率逐渐降低,各浓度组间牡蛎受精卵的孵化率有显著差异(ANOVA, $P < 0.01$)。当甲醇粗提物浓度达到 0.5 g/L 时,受精卵的孵化率就显著低于对照组(Tukey test, $P < 0.05$),当粗提物浓度提高至 2 g/L 时,太平洋牡蛎受精卵的孵化被完全抑制。这说明浒苔的甲醇提取物能够显著抑制太平洋牡蛎受精卵的孵化。根据本实验室以往的

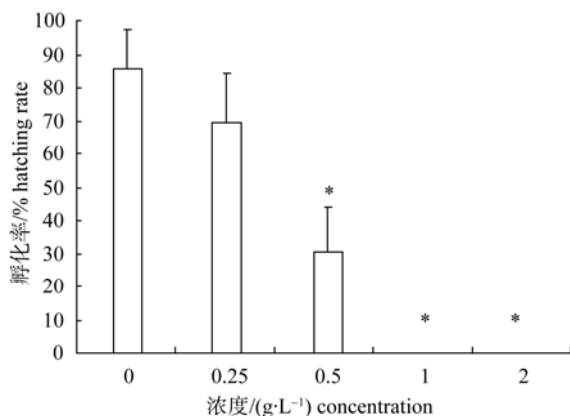


图 1 浒苔的甲醇提取物对太平洋牡蛎受精卵孵化的影响

*表示与对照组(0 g/L)相比差异显著($P < 0.05$).

Fig.1 Effects of methanol extract of *Enteromorpha prolifera* on hatching rate of fertilized eggs of *Crassostrea gigas*

*donates significant difference compared with the control(0 g/L) ($P < 0.05$).

研究数据,太平洋牡蛎受精卵在海水中的孵化率接近 100%^[13]。本研究对照组添加了与实验组等量的甲醇,牡蛎受精卵孵化率为 85%,与以往结果对比,可以看出甲醇溶剂本身对牡蛎受精卵孵化的影响不大。

丙酮粗提物对牡蛎受精卵孵化的影响如图 2 所示。可以看出,太平洋牡蛎受精卵的孵化率随粗提物浓度的增加而逐渐降低,各浓度组受精卵孵化率有显著差异(ANOVA, $P < 0.01$)。与对照组相比,当粗提液浓度为 0.5 g/L 时,太平洋牡蛎受精卵的孵化即受到明显抑制(Tukey test, $P < 0.05$),至粗提液浓度为 2 g/L 时,受精卵的孵化率降低为 0。在添加等量丙酮的对照组中,太平洋牡蛎受精卵的孵化率为 71%,说明丙酮溶剂本身对太平洋牡蛎受精卵的孵化也有一定影响。

氯仿粗提物对牡蛎受精卵孵化的影响如图 3 所示。可以看出,各浓度组间牡蛎受精卵孵化率的差异并不显著(ANOVA, $P > 0.05$),说明不同浓度的氯仿粗提物对牡蛎受精卵孵化的抑制作用不显著,没有表现出明显的浓度-效应关系。在添加等量氯仿的对照组,牡蛎受精卵的孵化率仅有 41%。可以看出,氯仿本身对牡蛎受精卵的孵化也有很大影响。

2.2 甲醇粗提液各萃取相对牡蛎受精卵孵化的影响

本研究发现,甲醇能够高效地提取出浒苔中抑

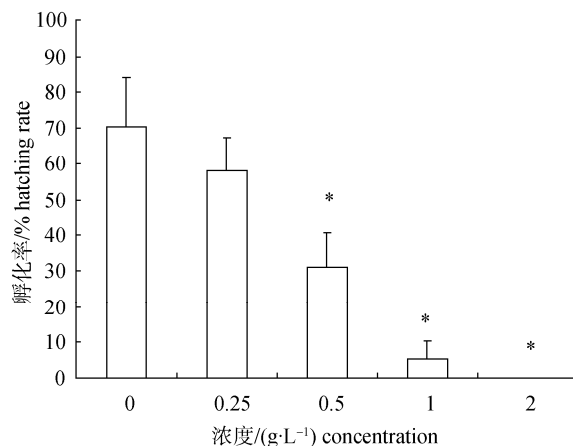


图 2 浒苔的丙酮提取物对太平洋牡蛎受精卵孵化的影响

*表示与对照组(0 g/L)相比差异显著($P < 0.05$).

Fig.2 Effects of acetone extract of *Enteromorpha prolifera* on hatching rate of fertilized eggs of *Crassostrea gigas*

*donates significant difference compared with the control(0 g/L) ($P < 0.05$).

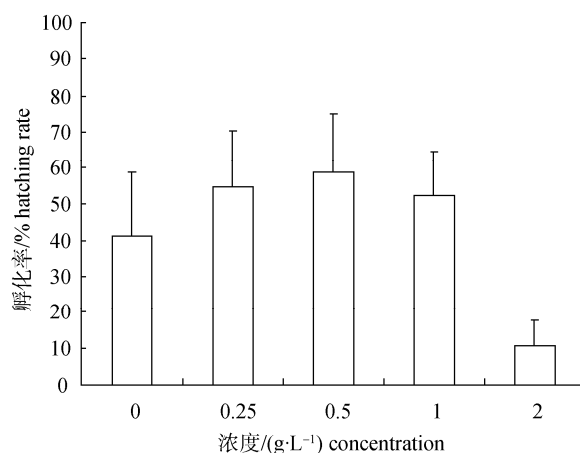


图 3 浒苔的氯仿提取物对太平洋牡蛎受精卵孵化的影响

Fig.3 Effects of chloroform extract of *Enteromorpha prolifera* on hatching rate of fertilized eggs of *Crassostrea gigas*

制太平洋牡蛎受精卵孵化的活性物质。为进一步提高活性成分的纯度,了解活性成分的性质,采用石油醚和乙酸乙酯对甲醇粗提液中的活性成分进行萃取,并测试了石油醚相和乙酸乙酯相对牡蛎受精卵孵化的影响。图 4 为不同浓度乙酸乙酯萃取物对牡蛎受精卵孵化的影响实验结果,在实验所设的 3 个浓度下,牡蛎受精卵的孵化率均为 0,而且高浓度实验组(2 g/L)中出现了大量牡蛎受精卵细胞裂解现象(图 5)。石油醚萃取相对牡蛎受精卵孵化的影响实验结果如图 6 所示,各实验组中牡蛎受精卵的孵化率也有显著差异(ANOVA, P

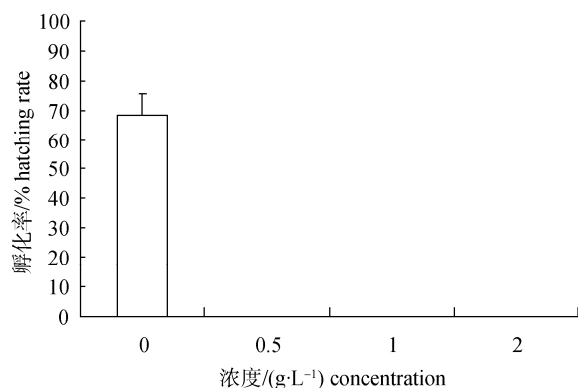


图 4 浒苔甲醇粗提液的乙酸乙酯萃取相对太平洋牡蛎受精卵孵化的影响

Fig.4 Effects of ethyl acetate phase of methanol extract of *Enteromorpha prolifera* on hatching rate of fertilized eggs of *Crassostrea gigas*

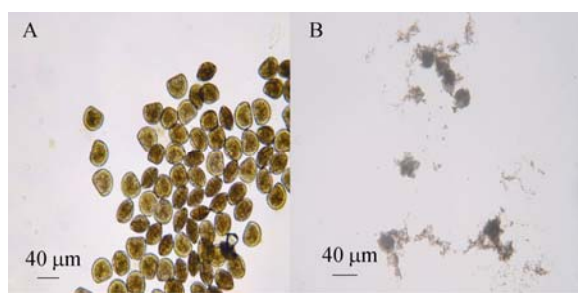


图 5 光镜下对照组 D 型幼虫(A)与乙酸乙酯提取物作用下的牡蛎受精卵细胞(B)对比

Fig.5 Photos of the D-shaped larva in the control group and decomposed eggs in group treated with ethyl acetate extract of *Enteromorpha prolifera*

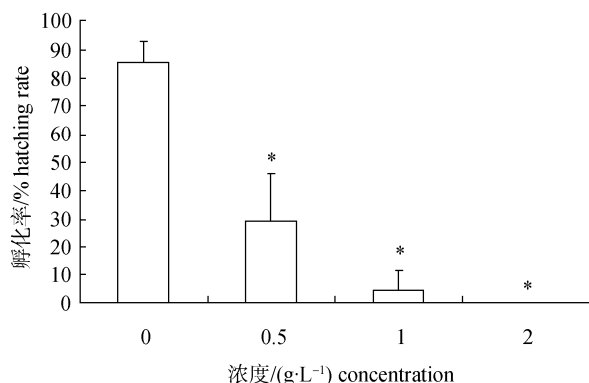


图 6 浒苔甲醇粗提液的石油醚萃取相对太平洋牡蛎受精卵孵化的影响

*表示与对照组(0 g/L)相比差异显著($P < 0.05$).

Fig.6 Effects of petroleum ether phase of methanol extract of *Enteromorpha prolifera* on hatching rate of fertilized eggs of *Crassostrea gigas*

*donates significant difference compared with the control(0 g/L) ($P < 0.05$).

< 0.01)。随着石油醚萃取相浓度的提高,牡蛎受精卵的孵化率明显降低,当浓度达到 2 g/L 时,牡蛎受精卵的孵化被完全抑制。

3 讨论

从 2007 年开始,黄海海域连年发生大规模浒苔绿潮。但是对于浒苔绿潮可能引发的生物和生态效应,目前仍缺少科学的认识。黄海海域的浒苔绿潮多出现在 6–8 月,是部分海洋生物的繁殖季节。因此,本研究选取养殖的太平洋牡蛎作为实验对象,研究了浒苔提取物对牡蛎受精卵孵化的影响,以分析浒苔绿潮对海洋生物繁殖及幼体发育的潜在影响。

贝类受精卵孵化率通常是以成活的担轮幼虫数计算,但是在本实验中,为了观察浒苔提取物对贝类幼体是否存在致畸作用,本研究将暴露时间延长至 48 h,并以成活的 D 型幼虫数计算太平洋牡蛎的孵化率,以比较不同极性有机溶剂提取物对牡蛎受精卵孵化的影响。结果表明,浒苔提取物中存在能够抑制牡蛎受精卵孵化的化合物。甲醇和丙酮粗提物浓度分别达到 1 g/L 和 2 g/L 时,可完全抑制受精卵的孵化。对比 3 种有机溶剂,甲醇的提取效率最佳,丙酮次之,氯仿提取效果最差,这说明抑制牡蛎受精卵孵化的活性物质应具有较高的极性。通过实验结果还可以看出,3 种有机溶剂本身对牡蛎受精卵的孵化也有一定的抑制效应,但以甲醇最低,氯仿最高。由于氯仿对照组中牡蛎受精卵孵化受到显著抑制,因此,氯仿提取物对牡蛎受精卵孵化的影响会在一定程度上受到氯仿毒性的干扰。综合比较有机溶剂的毒性效应及其对活性物质的提取效率,在 3 种有机溶剂中,甲醇最适合用于对浒苔中活性成分的提取。

实验进一步用石油醚和乙酸乙酯对甲醇粗提液中的活性成分进行了液-液萃取,并测试了萃取物对牡蛎受精卵孵化的影响。通过实验可以看出,乙酸乙酯萃取物对牡蛎受精卵孵化的抑制效应明显高于石油醚萃取物,前者在 0.5 g/L 浓度时就可完全抑制受精卵的孵化,而且高浓度组中出现了大量受精卵细胞裂解现象(图 5)。在乙酸乙酯

和石油醚萃取液中, 主要含有脂肪酸和类黄酮等化合物, 且以脂肪酸所占的比例较高^[14]。有文献报道, 脂肪酸能够抑制赤潮异弯藻等藻类的生长^[15], 因此, 脂肪酸有可能是浒苔提取物中抑制牡蛎受精卵孵化的主要活性成分。但是, 也不能排除甲醇粗提物中藻类色素和其他有机物的作用。Gribble^[16]指出, 有些大型海藻能产生有机卤素类化合物。例如, 红藻(*Plocamium telfairiae*)能分泌出砷烯, 这种物质从毒性和结构上和市售农药林丹很相似^[17]。而林丹对中枢神经系统有急性毒性作用, 对内分泌系统有慢性毒性作用^[18]。到目前为止, 还无法确定浒苔中的生物活性物质成分, 需要开展进一步的研究。

研究结果显示, 大型海藻对海洋生物的危害效应确实存在, 并且具有一定的普遍性。由于海洋生物的胚胎和幼体要比成体更加敏感^[19-20], 因此, 也有少量研究涉及到大型海藻对海洋生物胚胎和幼体发育的影响。对红藻的研究发现, 多管藻(*Polysiphonia*)、松节藻(*Rhodomela*)和仙菜(*Ceramium*)提取液对虾虎鱼(*Pomatoschistus microps*)的胚胎和成体都有致死作用^[17], 通过比较两者的半致死浓度, 发现胚胎比成体更加敏感。在波罗的海的观测资料表明, 大西洋鲱(*Clupea harengus*)鱼卵的大量死亡伴随着褐藻腐烂现象出现, 因此推测波罗的海鲱鱼卵的大量死亡与当地大型褐藻腐烂后有毒的水溶性溢出液有关^[21]。对 2 种绿藻(*Ulva* sp. 和 *Ulvaria* sp.)的研究表明, 其水溶性提取液会抑制牡蛎受精卵的孵化和幼体发育, 并会导致胚胎畸形^[12]。但是, 这一研究并没有进一步分析绿藻中抑制牡蛎受精卵孵化的物质。本实验使用不同极性的有机溶剂从大型绿藻浒苔中提取活性物质, 并尝试通过液-液萃取进一步纯化活性物质, 研究结果为进一步了解活性物质的性质和结构奠定了基础。另外, 在本实验中, 只观测到浒苔提取物对牡蛎受精卵孵化的抑制效应, 以及部分受精卵的裂解现象, 并未观测到胚胎畸形现象, 这可能与不同藻类所产生活性物质的性质存在差异有关。

综上所述, 本研究探讨了绿藻浒苔的提取物对牡蛎受精卵孵化的影响, 初步的实验结果表明, 浒苔中存在能够抑制牡蛎受精卵孵化的活性物质, 这为进一步了解浒苔绿潮的生态效应提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 丁兰平, 栾日孝. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)的分类鉴定、生境习性及分布[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 68-71.
- [2] Hayden H S, Blomster J, Maggs C A, et al. 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera [J]. Eur J Phycol, 38: 277-294.
- [3] Fletcher R L. The occurrence of "green tides": a review [M]//Schramm W, Nienhuis P H. Marine benthic vegetation. Recent changes and the effects of eutrophication. Germany Berlin: Springer, 1996: 7-43.
- [4] Valiela I, McClelland J, Hauxwell J, et al. Macroalgal blooms in shallow estuaries: controls and ecophysiological and ecosystem consequences [J]. Limnol Oceanogr, 1997, 42: 1105-1118.
- [5] Bolam S G, Fernandes T F, Read P, et al. Effects of macroalgal mats on intertidal sand flats, an experimental study [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2000, 249: 123-137.
- [6] Norkko A, Bonsdorff E. Altered benthic prey-availability due to episodic oxygen deficiency caused by drifting algal mats [J]. Mar Ecol, 1996, 17: 355-372.
- [7] McGlathery K J. Macroalgal blooms contribute to the decline of seagrass in nutrient-enriched coastal waters [J]. J Phycol, 2001, 37: 453-456.
- [8] Nelson T A, Lee A. A manipulative experiment demonstrates that blooms of the macroalga *Ulvaria obscura* can reduce eelgrass shoot density [J]. Aquat Bot, 2001, 71: 149-154.
- [9] Franz D R, Friedman I. Effects of a macroalgal mat (*Ulva lactuca*) on estuarine sand flat copepods: an experimental study [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2002, 271: 209-226.
- [10] Liu D Y, Keesing J K, Xing Q G, et al. World's largest macroalgal bloom caused by expansion of seaweed aquaculture in China [J]. Mar Pollut Bull, 2009, 58: 888-895.
- [11] Sand-Jensen K, Borum J. Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries [J]. Aquat Bot, 1991, 41: 137-175.
- [12] Nelson T A, Lee D J, Smith B C, et al. Are 'green tides' harmful algal blooms? Allelopathic properties of Water-

- soluble extracts from two bloom-forming macroalgae *Ulva fenestrata* and *Ulvaria obscura* [J], J Phycol, 2003, 39: 874–879.
- [13] 陈桃英, 亚历山大藻对海产贝类胚胎和蒙古裸腹藻的影响及致毒机制研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006: 1–118.
- [14] 王仁君, 唐学玺, 孙俊华. 小珊瑚藻对赤潮异弯藻的化感效应[J]. 应用生态学报, 2008, 19(10): 2322–2326.
- [15] Kim M C, Yoshinaga I, Imai I, et al. A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1998, 170: 25–32.
- [16] Gribble G W. Naturally occurring organohalogen compounds [J]. Accounts Chem Res, 1998, 31: 141–152.
- [17] Eklund B, Svensson A P, Jonsson C, et al. Toxic effects of decomposing red algae on littoral organisms[J]. Estuar Coast Shelf Sci, 2005, 62: 621–626.
- [18] Sauviat M P, Pages N. Cardiotoxicity of lindane, a gamma isomer of hexachlorocyclohexane [J]. J Soc Biol, 2002, 196: 339–348 (in French).
- [19] Calabrese A, Collier R S, Nelson D A, et al. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica* [J]. Mar Biol, 1973, 18: 162–166.
- [20] Vemberg F J, Vemberg W B. Pollution and physiology of marine organisms [M]. New York: Academic Press, 1974.
- [21] Aneer G. High natural mortality of Baltic herring (*Clupea harengus*) eggs caused by algal exudates?[J] Mar Biol, 1987, 94: 163–169.

Effects of *Enteromorpha prolifera* extract on hatchability of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) eggs

WANG Chao^{1,2}, YU Rencheng¹, ZHOU Mingjiang¹

1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Graduate School of Tsinghua University, Shenzhen 518055, China

Abstract: *Enteromorpha prolifera* was the causative species of green tides in the Yellow Sea from 2007 to 2009. Three different organic solvents which were methanol, acetone and chloroform, were used to extract the dry tissue of *E. prolifera*, and the effects of extracts on hatchability of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) eggs were tested. It was found that the methanol and acetone extracts had strong inhibitory effects on hatching of oyster eggs, and their high-concentration extracts could completely inhibit the oyster eggs from developing into D-shaped larvae. The chloroform extract, however, did not show any significant concentration-dependent effects on the hatching rates of oyster eggs. The methanol extract of *E. prolifera* was further purified by liquid-liquid extraction with ethyl acetate and petroleum ether, and the ethyl acetate phase and petroleum ether phase were also tested for their effects on the hatching rates of oyster eggs. It was found that both ethyl acetate and petroleum ether extract could significantly inhibit hatching of oyster eggs. The results of this experiment suggest that *E. prolifera* can produce bioactive compounds inhibiting hatching of oyster eggs, and the compounds, probably with high polarity, can be extracted with methanol. However, the structure and characteristics of the bioactive compounds in *E. prolifera* need to be further studied.[Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 202–207]

Key words: *Enteromorpha prolifera*; *Crassostrea gigas*; eggs, hatching

Corresponding author: YU Rencheng. E-mail:rcyu@qdio.ac.cn