

文章编号: 1000- 0615(2000)03- 0229- 06

僧帽牡蛎幼体附着和变态的诱导

柯才焕, 李少菁, 李复雪, 郑重
(厦门大学海洋系, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用外加人工化学物质检验对僧帽牡蛎眼点幼体的附着和变态诱导活性, 结果表明: 去甲肾上腺素、肾上腺素和 L- 多巴可有效诱导幼体不固着变态。在药物持续作用下, 肾上腺素的最佳诱导浓度为 $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (变态率 67.4%), 去甲肾上腺素的最佳诱导浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (变态率 52.2%), L- 多巴的最佳诱导浓度为 $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (变态率 43.0%), 而对照组变态率为 0。幼体大多在药物作用 12~ 24h 之间完成变态。三种药物诱导的变态个体中有 85% 以上是不固着变态。比较多种附着基和 EPI 的变态诱导活性, 显示同种贝壳的活性较肾上腺素还高。去甲肾上腺素诱导幼体变态效应对低盐海水有较强耐受能力, 而对高盐海水适应性差。

关键词: 僧帽牡蛎; 附着; 变态

中图分类号: S917 文献标识码: A

Induction of settlement and metamorphosis of *Saccostrea cucullata* larvae

KE Cai-huan, LI Shao-jing, LI Fu-xue, Zheng Zhong
(Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Induction of adding chemical compounds on the settlement metamorphosis of *Saccostrea cucullata* larvae was assayed. The metamorphosis of larval *Saccostrea cucullata* can be induced by epinephrine (EPI), Norepinephrine (NE), and L-DOPA. During a 48h exposure, optimum concentrations of three compounds were $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ corresponding to maximum metamorphosis rates of 67.4%, 52.2% and 43.0% respectively. Most metamorphosis occurred in the period of 12– 24 h. Over 85% of larvae metamorphosed without attachment. NE can be deprived of its inductive activity when oxidized in seawater to be orange/brown substances. Exposure time has significant influence on metamorphosis induction. NE produced the highest metamorphosis rate within 2h, and effective concentration was inversely proportional to time in the range of $5 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 5 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ during this short period. L-DOPA brought about the maximum rate within 30min in the range of $5 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A 5 min exposure to $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-DOPA may enhance metamorphosis through attachment. Comparison of inductive effect between artificial inducers and chemical active substances (CAS) that CAS is more active. NE-induced post-larvae well survived in low salinity but badly in high salinity.

Key words: *Saccostrea cucullata*; settlement; metamorphosis

收稿日期: 1999- 03- 01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39400021)。

作者简介: 柯才焕(1962-), 男, 博士, 副教授, Tel: 0592- 2183621, E-mail: chke@xmu.edu.cn

牡蛎的群聚和幼体的附着和变态机制无论对于牡蛎养殖生产或对于污损防除都是重要问题。研究者已确认了牡蛎附着诱导物质在环境中的存在, Tamburri 等^[1]证实了这种诱导物质既包含在牡蛎贝壳成分中, 也包含在贝壳表面的微生物粘液中。

在人工诱导物质的研究方面, Henderson^[2]首先试验发现儿茶酚胺类化合物可快速诱导太平洋牡蛎足面盘幼体附着和变态, 随后一些学者进行了一系列深入研究^[3-5]。除太平洋牡蛎外, 已报道肾上腺素和去甲肾上腺素在应用于东方牡蛎和褶牡蛎单体稚贝生产时效果好^[6,7]。

本研究对象僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)是我国东南沿岸主要的养殖牡蛎, 也是污损生物的重要成员之一。研究该种幼体附着和变态的化学诱导效应, 将有助于进一步阐明牡蛎幼体附着和变态的机制, 为单体僧帽牡蛎的生产和改进人工育苗技术提供有用的数据, 同时为污损生物防除提供资料。

1 材料和方法

1.1 幼体培养

僧帽牡蛎亲贝在 3~ 9 月繁殖期间取自厦门同安湾, 暂养 2~ 3d 后取出剖开, 将雌雄亲贝分开后分别挤出配子, 接着按一定比例将精子和卵子混合授精, 洗卵 3 次, 然后微量充气或静置使受精卵孵化。在 25~ 30℃下约经 5~ 10h 便发育至担轮幼体。将较早上浮、发育正常的担轮幼体引入塑料培养箱或玻璃缸中培养。面盘幼体早期投喂湛江叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*), 后期投喂湛江叉鞭金藻和亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)混合饵料。培育用水均经砂滤, 培养期间的水温为 25~ 30℃, 盐度为 25.0~ 28.9。所用实验幼体均出现明显的眼点。

1.2 人工诱导物质的活性检验

实验容器采用 24 孔塑料组织培养板, 每孔放超滤(0.22μm)海水 1.5mL, 每孔实验幼体数 35~ 100 只。供活性检验的人工诱导物质有: 去甲肾上腺素(Fluka 公司)、肾上腺素(Fluka 公司)、L-多巴(Sigma 公司)。这些化合物均先用去离子水或 0.005N 的 HCl 去离子水配成母液后使用, 配好后放置时间不超过 24 h。每个实验浓度设置 3 孔并列, 每孔加入 5×10^{-6} 青霉素以抗菌。用 Wild 解剖镜观察幼体附着和变态结果。幼体变态指标为次生壳长出、鳃发达、面盘消失和足部退化。固着的标准以用解剖针轻挑不会脱落为原则。

1.3 肾上腺素和 L-DOPA 的浓度与作用时间关系的试验

二种药物各浓度梯度在作用时间达到实验设计要求时, 将幼体用 200 目筛绢网滤出重新放回膜滤海水中, 实验容器、实验组并列数、水体及其它实验方法同 1.2。

1.4 人工诱导物质与同种贝壳诱导幼体附着和变态的比较

选取眼点比率约为 50% 的一群幼体作为实验材料, 在结晶皿中进行, 水体 20 mL, 不加抗生素, 设置附着基的为单杯实验, L-多巴($10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)设置三杯对照, 每杯幼体数 50~ 100 只。菲律宾蛤仔和文蛤的贝壳为旧贝壳。僧帽牡蛎贝壳为刚去除软体部的新贝壳, 经海水轻轻漂洗后使用。死亡的笔螅系已放置一段时间的干的笔螅枝干。

1.5 海水盐度对肾上腺素诱导幼体变态的影响

实验容器用 50mL 的玻璃结晶皿, 实验水体 30mL。分二种情况进行实验, 一是将幼体直接引入到各设置好的盐度梯度中, 同时加入 $5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 肾上腺素。二是先使幼体在各盐度梯度中适应 48h 后加入肾上腺素。幼体适应期间加入少量亚心形扁藻作为饵料。实验并列 3 杯。药物加入后 48h 观察幼体变态情况。

2 结果

2.1 人工诱导物质的活性检验

2.1.1 肾上腺素(EPI)、去甲肾上腺素(NE)、L-多巴(L- DOPA)对幼体附着和变态诱导效能检测

图1~3是三种化合物以不同浓度在持续作用下诱导僧帽牡蛎幼体附着和变态的实验结果。EPI的有效诱导浓度范围在 $5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,其中以 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导的变态率最高。NE的有效诱导浓度范围在 $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,其中以 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导的变态率最高。L- DOPA的有效诱导浓度范围在 $2.5 \times 10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,其中以 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳浓度。从变态的类型看,EPI、NE和L- DOPA在最佳浓度下诱导的游离变态占总变态数的百分比分别为95%、85%和93%。三种化合物的变态诱导活性排序为EPI> NE> L- DOPA。从诱导变态发生的时间看,三种化合物共同作用特点是在12~ 24h这段时间内幼体变态最多。可见,在持续作用条件下EPI、NE和L- DOPA诱导幼体变态的最佳浓度分别为 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

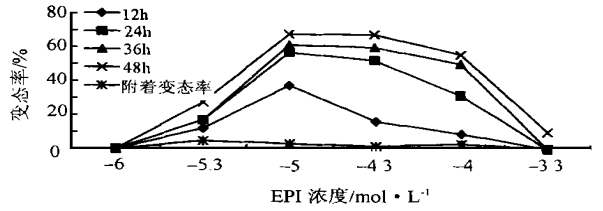


图1 肾上腺素在持续作用下对僧帽牡蛎幼体变态的诱导作用

Fig. 1 Time series of larval metamorphosis of *Saccostrea cucullata* induced by epinephrine

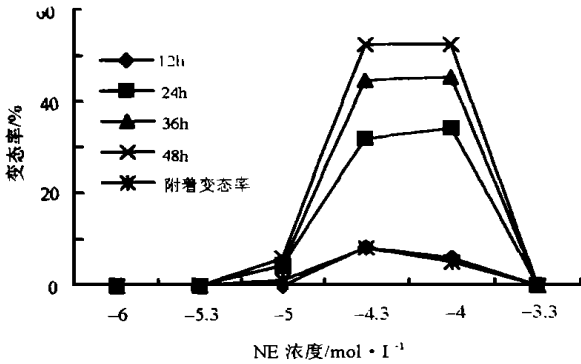


图2 NE对僧帽牡蛎幼体变态的诱导作用

Fig. 2 Time series changes of metamorphosis of *Saccostrea cucullata* induced by norepinephrine

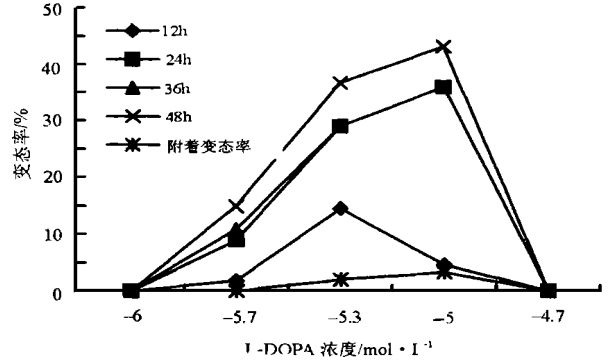


图3 L- DOPA在持续作用下对僧帽牡蛎幼体变态的诱导效应

Fig. 3 Time series changes of larval metamorphosis of *Saccostrea cucullata* induced by L- DOPA

2.1.2 肾上腺素和L- DOPA持续作用时间与幼体变态的关系

从图4可见, $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的EPI,在不同持续作用时间诱导的幼体变态的共同趋势是:在作用2h内变态率随作用时间的延长而逐步增加,作用时间超过2h变态率增加不明显。比较各不同浓度EPI诱导幼体变态率的特点可以看出,在2h作用时间内,浓度越低,变态率随作用时间的延长变化幅度越大。固着变态占总变态的比例随着时间的推移而降低(图5)。

L- DOPA在 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时作用时间在30min内诱导的幼体变态率随时间延长增幅较大,其后增加缓慢(图6~ 7)。L- DOPA浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,作用时间30min和1h诱导的变态率最高。在 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高浓度下,L- DOPA的持续作用时间以30min为最佳,作用时间超过1h便使幼体变态诱导率剧减。值得注意的是L- DOPA在 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,短时间作用(5min)可促进幼体发生固着变态。

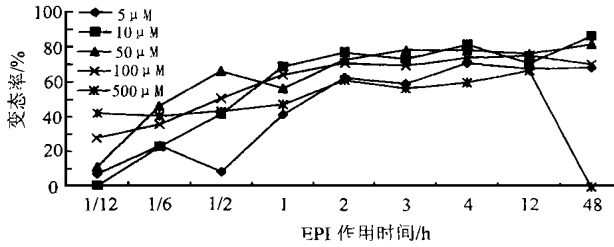


图 4 肾上腺素不同浓度作用时间对幼体变态的诱导效应

Fig. 4 Larval metamorphic rate as a function of length of exposure to epinephrine

MSL= 335.1 μm (SD= 11.5); S= 27.6; T= 28.0

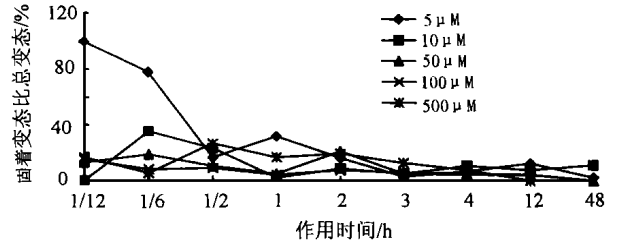


图 5 肾上腺素不同浓度不同作用时间诱导幼体固着变态占总变态的百分比

Fig. 5 Larval attaching metamorphic rate as a function of length of exposure to epinephrine

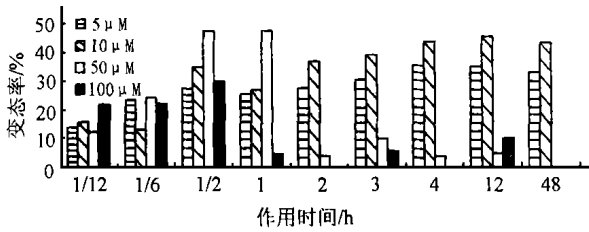


图 6 L-DOPA 不同浓度不同作用时间对幼体变态的诱导效应

Fig. 6 Larval metamorphic rate as a function of length of exposure to L-DOPA

MSL= 335.1 μm (SD= 11.5); S= 27.6; T= 28.0

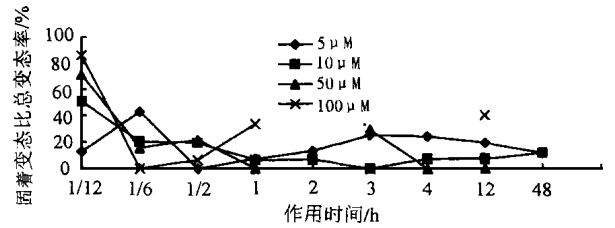


图 7 L-DOPA 不同浓度不同作用时间诱导的幼体固着变态占体总变态数的百分率

Fig. 7 Percentage rate of attaching metamorphosis of the larvae induced by L-DOPA

2.2 人工诱导物质与同种贝壳等附着基诱导幼体附着和变态的比较

从表 1 可见, L-DOPA 诱导幼体的变态率仅 9.4%, 说明该群体幼体具备的变态能力较弱, 但是同种贝壳却诱导该群体幼体高达 35.7% 固着和变态, 其诱导活性显著高于 L-DOPA。菲律宾蛤仔贝壳和文蛤贝壳无诱导幼体附着和变态的活性。死亡的笔螭表面上有少量幼体固着和变态。此外, 同种成体贝壳还可使一部分幼体固着于玻璃杯基底上并变态。

2.3 海水盐度对肾上腺素诱导幼体变态的影响

幼体不经预适应, 直接投到比原有海水较高和较低盐度的介质中时, EPI 诱导的变态率有明显的差异(表 2), 提高盐度使 EPI 诱导幼体的变态率下降, 降低盐度对 EPI 的诱导影响较弱, 降至 12 时才使诱导变态率剧降, 最适盐度范围为 15.0~ 27.0。而幼体对各盐度梯度适应 48h 后进行 EPI 诱导变态检验, 发现低盐度均无影响, 在 31 介质中幼体也因适应性调节而恢复对 EPI 的反应敏感性, 但 35 的高盐海水仍使幼体诱导变态率很低, 甚至比未适应组还低, 故可认为当海水盐度高达 35 时明显抑制 EPI 对幼体变态的诱导效应。

表 1 人工诱导和附着基诱导僧帽牡蛎幼体固着和变态的比较

Tab. 1 Comparison of larval attachment and metamorphosis of *Saccostrea cucullata* induced by artificial inducer and some substrata [MSL= 316.7 μm (SD= 13.1); S= 25.6; T= 28.0 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$]

附着基或化合物	变态类型	固着基底	变态率(%)		
			12h	24h	48h
同种贝壳	固着变态(AM)	贝壳	21.4	21.4	23.8
		培养皿表面	0	0	11.9
菲律宾蛤仔贝壳 混合附着基	游离变态(FM)		0	0	0
	总变态(TM)		0	0	0
	固着变态(AM)	同种贝壳	—	13.2	15.8
		文蛤贝壳	—	0	0
L- DOPA ($10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	游离变态(FM)		—	2.6	5.3
	固着变态(AM)		—	0	2.6
	游离变态(FM)	培养皿表面	—	1.6	1.6
			—	1.2	7.8
	总变态(TM)		—	2.8	9.4
对照	总变态(TM)		0	0	0

表 2 海水盐度对肾上腺素诱导僧帽牡蛎幼体附着和变态的影响

Tab. 2 Influence of salinity of seawater on induction of larval settlement and metamorphosis of *Saccostrea cucullata* by epinephrine at $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [MSL= 339.9 μm (SD= 9.1); T= 27.0 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$]

预适应情况	变态类型	变态率(%)						
		12.0	15.0	19.0	23.0	27.0 $^{\circ}$	31.0	35.0
未经预适应	AM	0	1.6	0	6.0	5.1	6.7	2.0
	FM	10.9	62.3	56.1	58.0	69.5	33.3	26.5
	TM	10.9	63.9	56.1	64.0	74.6	40.0	28.5
经 48h 预适应	AM	0	2.3	0	0	0	3.3	0
	FM	76.3	65.1	85.7	72.5	58.1	56.7	17.9
	TM	76.3	67.4	85.7	72.5	58.1	60.0	17.9

注: * 对照组(自然海水)。

3 讨论

3.1 僧帽牡蛎幼体附着与变态的机制及其关系

从本实验结果知, L- DOPA 与 EPI、NE 虽然都能诱导幼体完成变态, 但前者还有诱导幼体附着行为的能力, 后者仅诱导变态, 这说明附着和变态是由不同的生理机制控制的二个过程, 这两个过程可能由不同的配基—受体控制。由 NE 及其衍生物与类似脊椎动物 α_1 - 肾上腺素受体结合诱导僧帽牡蛎和太平洋牡蛎幼体变态都已在药理学上获得证据^[3,8], 太平洋牡蛎幼体的 NE 含量随发育而升高也已得到证实^[3]。L- DOPA 诱导幼体附着行为后继之使幼体完成变态, 其机制可能是: L- DOPA 除了与控制幼体附着行为的受体结合或通过其他机制引起附着行为外, 还作为去甲肾上腺素的结构类似物以略低于去甲肾上腺素的效能与 α_{1A} - 肾上腺素受体^[8] 结合引起变态反应, 或是 L- DOPA 进入幼体体内在酶的作用下转化为去甲肾上腺素^[9] 后诱导变态反应。L- DOPA 在 $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\sim 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 短时间作用(5min) 可使幼体固着变态增多(图 7), 这一现象说明 L- DOPA 诱导幼体变态的机制是通过进入幼体体内在酶的作用下转化为去甲肾上腺素而发挥作用的可能性大一些。但是 L- DOPA 诱导幼体附着的效能是有限的, 较难促使幼体爬行并分泌胶质固着于基底上, 而某些微生物粘膜及其相关物质才是真正的附着诱导活性物质^[1, 10, 11]。

3.2 同种贝壳等附着基诱导幼体附着和变态的本质及与人工诱导物质的比较

与其他贝壳和死亡的笔螅相比, 僧帽牡蛎幼体对同种成体贝壳有明显的附着喜好性, 这说明同种贝壳本身或其表面微生物粘膜含有诱导幼体附着的活性物质, 而同种成体贝壳还可使一部分幼体固着于玻璃杯基底上并变态, 可见活性物质存在于微生物粘膜中的可能性较大, 这与对太平洋牡蛎的研究结果

一致^[11],当然也可能部分存在于贝壳成分中^[1]。同种贝壳诱导幼体固着和变态率显著高于 L-DOPA,说明天然诱导活性物质在结构上不同,因此在判断僧帽牡蛎幼体变态能力的获得时,使用天然活性附着基比人工诱导物质更灵敏和准确。

3.3 幼体对适宜基底识别能力和变态延迟的生态学意义

从本实验结果可知,无论是人工诱导物质或是活性附着基,实验组与对照组相比较,幼体变态率都有十分显著的差别。这些说明,僧帽牡蛎幼体附着和变态必须要有特异性的附着基或化学信息物质,否则幼体将继续浮游延迟变态直至遭遇适宜基底。僧帽牡蛎幼体所具备的这种适宜基底识别和变态延迟能力在太平洋牡蛎也具备^[12],这显然对于幼体群集固着于适于成体生长、繁殖的特定生境,确保种群的维持、扩散和繁衍,有重要的生态学意义。

3.4 海水盐度对肾上腺素诱导幼体变态的影响

海水盐度的突变,给僧帽牡蛎幼体的渗透压调节机能施加了压力,这种影响也在 EPI 诱导僧帽牡蛎幼体变态中得以体现。幼体经 48h 在各盐度梯度适应后,即使在盐度为 12 的实验组,其 EPI 诱导变态的效能与对照组无显著差异,但在盐度为 35 的高盐组却使 EPI 的诱导变态率显著下降。可见,僧帽牡蛎幼体对低盐的适应能力较强,对高盐的适应能力较弱。这种效应特点,正好反映出僧帽牡蛎作为河口性种类对低盐的生态适应性。实际上,由于幼体变态过程涉及复杂的形态和生理变化,对环境的影响将更为敏感,故一些生态因子包括海水盐度对幼体变态的化学诱导作用的影响可以作为判断生物生态适应性的灵敏指标,这在太平洋牡蛎幼体变态对锌的敏感试验已得到证实^[13]。

3.5 应用前景

本实验结果表明,外加 EPI、NE 和 L-DOPA 等可有效诱导僧帽牡蛎眼点幼体不固着变态,这为生产单体牡蛎提供了极大的方便。在生产上,建议采用 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EPI 处理僧帽牡蛎眼点幼体 2h 以获得单体牡蛎。但务必注意筛选具发达眼点的幼体,否则无效。其次,在僧帽牡蛎室内人工育苗投放附着基时,应注意附着基的质地及其表面微生物粘膜的培养,以使眼点幼体能及时而整齐地固着和变态。此外,为防止僧帽牡蛎固着对海洋设施的污损,应着眼于破坏设施表面的微生物粘膜和干扰幼体附着行为过程。

参考文献:

- [1] Tamburri M N, Zimmer Faust R K, Tamplin M L. Natural sources and properties of chemical inducers mediating settlement of oyster larvae: A re examination[J]. Biol Bull, 1992, 183: 327~ 338.
- [2] Henderson H, Nalleen W G, Veitch F P. Gregarious settling in European and American oyster: response to surface chemistry versus waterborne pheromones[J]. Proc Natl Acad Sci, 1978, 68: 14~ 16.
- [3] Coon S L, Bonar D B. Norepinephrine and dopamine content of larvae and spat of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Biol Bull, 1986, 171: 632~ 639.
- [4] Coon S L, Bonar D B. Pharmacological evidence that alpha 1 adrenoceptors mediate metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Neurosci, 1987, 23: 1169~ 1174.
- [5] Coon S L, Bonar D B, Weiner R M. Chemical production of cultchless oyster spat using epinephrine and norepinephrine[J]. Aquac, 1986, 58: 255~ 262.
- [6] Coon S L, Fitt W K, Bonar D B. Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Mar Biol, 1990, 106: 379~ 387.
- [7] 王昭萍, 王如才. 1992. 单体褶牡蛎(*Crassostrea* sp.) 的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1992, 22(2): 125~ 132.
- [8] 柯才焕, 李少菁, 李复雪等. 控制僧帽牡蛎幼体变态的受体实验研究[A]. 首届厦门市青年学术讨论会论文集[C]. 厦门: 厦门大学出版社, 1995. 62~ 66.
- [9] 杨松榆(译). 生物化学原理(下册)[M]. 北京: 科学出版社. 1979, 791~ 796
- [10] Weiter R W, Walch M, Lahare M, et al. Effect of Biofilms of the marine bacterium *Aeromonas columbiae* (LST) on the set of the oysters *Crassostrea gigas* and *C. virginica*[J]. J Shellfish Res, 1989, 8: 117~ 123.
- [11] Fitt W K, Coon S L, Wakh M, et al. Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants[J]. Mar Biol, 1990, 106: 389~ 394.
- [12] Coon S L, Walch M, Fitt W K, et al. Ammonia induces settlement behavior in oyster larvae[J]. Biol Bull, 1990, 179: 297~ 303.
- [13] Robers S K, Bonar D B. Inhibition of metamorphosis in *Crassostrea gigas* by zinc[J]. Amer Zool. 1986, 26: 14A.