

文章编号:1000-0615(2007)02-0178-06

塔玛亚历山大藻对海湾扇贝胚胎发育过程的影响

颜 天¹, 王丽平¹, 陈 洋^{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重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:研究了塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*) ATHK 株对海湾扇贝受精卵孵化的影响,并探讨了可能的影响机制。将海湾扇贝受精卵暴露于不同密度的塔玛亚历山大藻 ATHK 中,观察其对胚胎孵化各阶段的影响,并利用光镜和透射电镜对实验组和对照组胚胎的外部形态和内部结构进行连续观察。结果表明:该藻对海湾扇贝受精卵孵化有显著的抑制作用,其 IC_{50} 约为 800 mL^{-1} ; 2000 mL^{-1} 的 ATHK 延缓或破坏了胚胎的正常发育,胚胎内部出现大量溶酶体,原肠胚腔不能形成,且部分细胞出现胞质肿胀、线粒体自溶的现象,细胞不能进行正常的功能性分化;观察发现实验组中有些担轮幼虫的外形畸变,鞭毛发育迟缓;至 24 h(D 型幼虫)时,ATHK 组中的 D 型幼虫数量远远低于对照组($P < 0.05$),且死亡率明显高于对照组。观察还发现 ATHK 藻细胞和胚胎碰撞接触的现象,这种碰撞接触可能对有害物质的释放和转移有一定的刺激作用。

关键词:塔玛亚历山大藻;海湾扇贝;胚胎发育

中图分类号:S 963.21⁺³; S 966.2

文献标识码:A

Effects of *Alexandrium tamarense* on embryonic development of *Argopecten irradians*

YAN Tian¹, WANG Li-ping¹, CHEN Yang^{1,2}, YU Ren-cheng¹, ZHOU Ming-jiang¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* can produce paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin and has significantly impacted the marine aquaculture and human beings worldwide. We have reported that *A. tamarense* had adverse effects on the activity and early development of shellfish and *A. tamarense* ATHK strain inhibited the egg hatching of *A. irradians* significantly. However, its effects on different phases of embryonic development of scallop and its mechanism were still obscure. In order to better understand its impacts on embryonic development of scallop and its mechanism, the effect of *A. tamarense* ATHK strain on hatching of *Argopecten irradians* Lamarck was investigated, and its harmful mechanism was discussed in this paper. The fertilized eggs of *A. irradians* were exposed to *A. tamarense*, and the impacts on different phases of embryonic development of scallop were analyzed. The appearance and interior structure of the scallop larvae in the control and the experimental group were observed under optical microscope and transmission

收稿日期:2006-06-19

资助项目:科学院创新项目(KZCX2-YW-208);国家重点基础研究项目(2001CB409700);国家自然科学基金项目(20177023)

作者简介:颜 天(1969-),女,广东化州人,研究员,主要从事生态毒理学研究。Tel: 0532-82898589; E-mail: tianyan@ms.qdio.

election microscope (TEM). The results showed that ATHK inhibited the hatching of *A. irradians*, and the median inhibiting concentration (IC_{50}) was 800 mL^{-1} . ATHK at the density of 2000 mL^{-1} arrested or destroyed the embryonic development. It was observed that there were a plenty of lysosomes in embryos with swollen cells and autolyzed mitochondria, and the archenteron was not able to form in time, which may result in the failure of embryo functional development. Some of the trochophore larvae exposed to *A. tamarense* (ATHK strain) showed malformation and the flagellum couldn't develop normally. The percentage of D-shape larvae in the ATHK treatment group was significantly lower and its mortality rate was obviously higher than that in the control after 24 h exposure. It was also observed that the ATHK cells contacted the scallop embryos, which may stimulate the production of toxic substances in some way.

Key words: *Alexandrium tamarense*; *Argopecten irradians*; embryonic development

甲藻塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 是一种能产生麻痹性贝毒 PSP 的有害赤潮藻种,由它们引起的赤潮在世界各地多有发生^[1],曾给贝类养殖业带来巨大的经济损失,甚至对人类的生命安全造成严重威胁^[2-3]。已有研究发现这种赤潮藻不仅能够影响贝类成体正常的生命活动^[4-7],也能够对贝类的早期发育产生不利的影响^[8-11]。一株塔玛亚历山大藻 *A. tamarense* (ATHK) 对栉孔扇贝受精卵孵化具有强烈的抑制作用,毒性与 PSP 毒素无关^[10],本研究在此基础上,进一步比较观察了该株亚历山大藻对海湾扇贝胚胎各发育阶段的影响程度,并探讨了可能的危害机制,以期更好地了解有害赤潮可能对我国贝类水产养殖业造成的影响,为制定合理、有效的开发方案和保护措施提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所用海湾扇贝亲贝(壳高:5.7 ~ 6.0 cm)由青岛金瀛海洋科技发展有限公司提供,实验室内 18 °C 暂养,投喂新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*), $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。采用温度刺激法人工诱导亲贝产卵。

塔玛亚历山大藻 (ATHK) 采自中国南海,由暨南大学提供;新月菱形藻由本所藻种中心提供。两株藻均为 f/2 培养液培养,温度 (20 ± 0.5) °C,光照 $56 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光暗比 12L : 12D。

实验所用海水引自青岛胶州湾外太平角无污染海水,使用前经沉淀沙滤,脱脂棉过滤,再经高温消毒并充分曝气使之达到氧饱和。实验时海水温度用 WMSK-401 型控温仪恒温水浴控制;盐度通过加蒸馏水来调节,用 ATAGO 手提式盐度

计测定。

1.2 方 法

实验以直径为 60 mm 规格的培养皿为容器,实验体积为 5 mL,各实验均以海水为对照,海水盐度为 (30 ± 1)。实验开始前将培养皿提前置于恒温 (23 ± 0.5) °C 水浴中,受精卵密度为 30 mL^{-1} ,即每皿 150 个。实验过程中水浴缸周围罩上黑布,造成黑暗环境。

海湾扇贝受精卵孵化的完成需要 24 h,其过程主要包括: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)。因此实验进行 24 h 后,用鲁哥氏液固定,显微镜下观察并记录 D 型幼虫数,计算受精卵的孵化率。

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

海湾扇贝受精卵的采集 实验所用受精卵的采集参照张玺等^[12]的方法:将亲贝从 18 °C 水体中取出,阴干约 1 h,再用海水冲洗 3 遍,然后放入 23 °C 水体中刺激其产卵和排精。一般亲贝先排精,如果发现精子密度较大,应立即将亲贝转移至另外的 23 °C 水体中产卵(因为精子密度较大降低受精率)。海湾扇贝为雌雄同体,待亲贝产卵后(已自然受精),立即用消毒海水洗卵并稀释受精卵液,然后取样计数待用。

不同藻细胞密度的 ATHK 影响实验 取指数生长中期的 *A. tamarense* (ATHK) 藻细胞,0.5 mL 计数框计数后,用消毒海水稀释,使培养皿中的藻细胞密度分别达到 50、100、200、300、500、1000、2000、3000、5000 mL^{-1} 。

Olympus 显微镜和 H-7000 透射电镜观察塔玛亚历山大 (ATHK) 藻细胞密度设为 2000 mL^{-1} ,每组 5 个平行,在 Olympus 显微镜下连续

比较观察对照组和藻细胞组中受精卵孵化的情况,并将胚胎用 2.5% 戊二醛前固定,1% 锇酸后固定,乙醇系列脱水,环氧树脂 EPON812 包埋, LKB NOVA 型切片机超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,最后在加速电压为 75 kV 的 H-7000 透射电镜下观察。

1.3 统计分析

实验中每组实验都有 3~5 个平行,结果表示为:平均值±标准误差。所有数据都用 Student *t*-test 进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 不同密度的塔玛亚历山大 (ATHK) 对海湾扇贝受精卵孵化的影响

图 1 为不同密度的塔玛亚历山大 (ATHK) 藻细胞对海湾扇贝受精卵孵化率的影响实验结果。由图 1 可见:随着藻细胞密度的增加,海湾扇贝受精卵的孵化率逐渐降低,藻细胞密度为 200 mL^{-1} 时,受精卵的孵化率就开始明显低于对照组 ($P < 0.05$),至 $5\,000 \text{ mL}^{-1}$ 时,受精卵的孵化率为 0。其受精卵的孵化率与藻细胞密度对数值的关系如图 2 所示。塔玛亚历山大 (ATHK) 藻细胞对海湾扇贝受精卵孵化率的半数抑制密度 IC_{50} 约为 800 mL^{-1} 。

2.2 塔玛亚历山大 (ATHK) 对受精卵孵化过程影响的光镜和电镜观察结果

图 3 为受精卵孵化过程中在几个主要发育阶段时对照组和塔玛亚历山大藻 (ATHK) 组 ($2\,000$

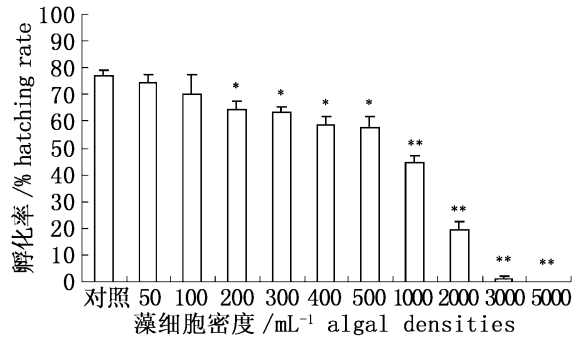


图 1 塔玛亚历山大藻株 ATHK 对海湾扇贝受精卵孵化率的影响

Fig. 1 The effects of *A. tamarensis* (ATHK) on fertilized egg hatching rate of *A. irradians*
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

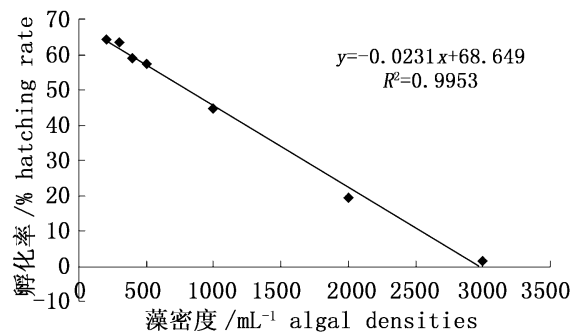


图 2 海湾扇贝受精卵孵化率与塔玛亚历山大藻 ATHK 藻细胞密度对数值间的线性关系

Fig. 2 The linear relationship between the fertilized egg hatching rate of *A. irradians* and the natural logarithms of the different densities of *A. tamarensis* (ATHK)

mL^{-1}) 中胚胎和幼虫数量的比较。由图可见,从卵裂至 5 h 时的囊胚期,塔玛亚历山大 (ATHK) 组和

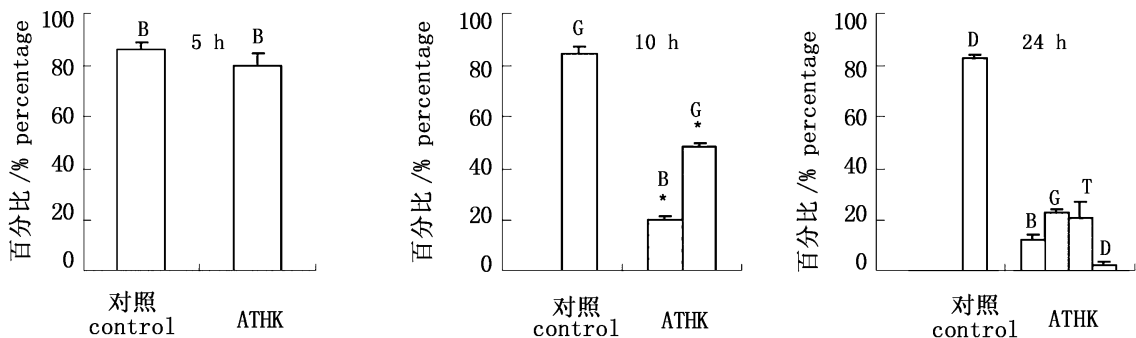


图 3 受精后 5、10 和 24 h 塔玛亚历山大藻 (ATHK) 对受精卵发育的影响

Fig. 3 At 5 h, 10 h and 24 h after fertilization, the effect of *A. tamarensis* (ATHK) on the egg hatching of scallop *A. irradians*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

B: 囊胚, G: 原肠胚, T: 担轮幼虫, D: D 型幼虫

对照组的囊胚数量没有明显差异($P > 0.05$)。但在受精后 10 h, 胚胎发育至原肠胚时, *A. tamarense* (ATHK) 组中的原肠胚数量明显低于对照组($P < 0.05$), 其它的胚胎停留在囊胚期阶段。在 24 h 时, 对照组中约 83% 的胚胎发育成 D 型幼虫, 而塔玛亚历山大 (ATHK) 组中仅 3% 的胚胎发育至 D 型幼虫, 远远低于对照组 ($P < 0.001$), 其它部分胚胎分别处于囊胚期、原肠胚期及担轮幼虫期, 并且实验组内活体仅占 60%, 远低于对照组 (83%)。

图 4 为对照组和塔玛亚历山大 (ATHK) 组中胚胎和幼体死亡率和畸形率的统计比较, 发现塔玛亚历山大 (ATHK) 组中的胚胎和幼体不仅死亡率明显高于对照组 ($P < 0.05$), 而且部分胚胎和幼体出现畸形现象。

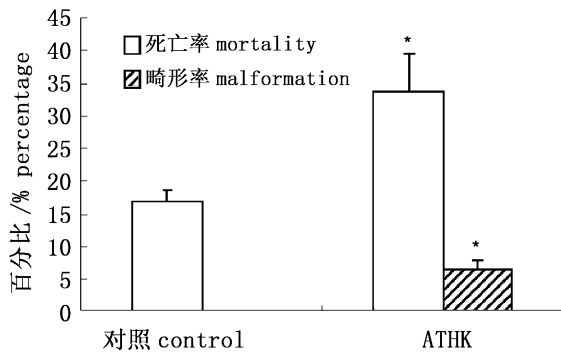


图 4 受精后 24 h 对照组和塔玛亚历山大 (ATHK) 组胚胎和幼体的死亡率和畸形率比较
 Fig. 4 The comparison of mortality and malformation of embryo at the 24 h after fertilization in the control and *A. tamarense* (ATHK) group
 * $P < 0.05$

在光镜下观察受精卵的卵裂过程中, 发现对照组和实验组中的受精卵都处于活跃的细胞分裂状态, 而且在 5 h 时对照组和实验组的囊胚期胚胎在外形上无明显的差异 (图 5-1, 2); 但在 15 h 时的担轮幼虫期, 对照组的担轮幼虫胚体拉长, 前端生有鞭毛 (图 5-3), 而实验组中部分担轮幼虫胚体呈圆形, 鞭毛细且短, 与纤毛没有明显区别 (图 5-4)。

透射电镜观察结果如图 6 所示: 10 h 时, 对照组中的胚胎已经有明显的原肠胚腔 (图 6-1, 2); 与之相比, 实验组中的胚胎不仅没有出现原肠胚腔, 在胞质中有较多的溶酶体出现, 而且部分细胞有胞质肿胀现象发生, 另外还发现多胞体的存在

和线粒体的自溶现象 (图 6-3)。同时, 实验中还发现藻细胞与胚胎接触的现象 (图 6-4), 这种碰撞接触作用可能对有害物质的释放和转移有一定的刺激作用。

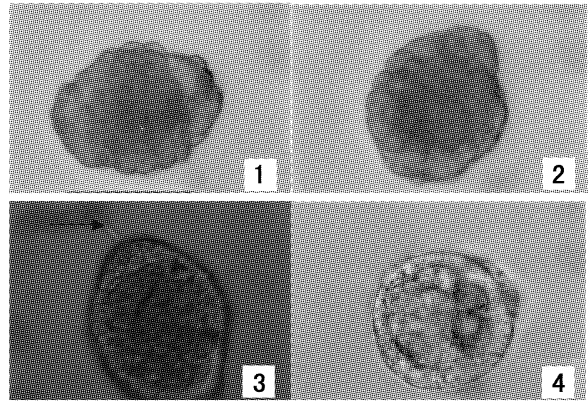


图 5 光镜下对照组 ATHK 组囊胚期胚胎(1, 2)和担轮幼虫(3, 4) (标尺 25 μm)
 Fig. 5 The blastula and trochophore larvae in the control and ATHK group under microscope
 1. 5 h 对照组囊胚期外形; 2. 5 h ATHK 组囊胚期外形;
 3. 15 h 对照担轮幼虫胚体; 4. 15 h ATHK 组畸形担轮幼虫胚体
 1. blastula in control; 2. blastula in ATHK; 3. normal trochophore larvae in control; 4. malformed trochophore larvae in ATHK

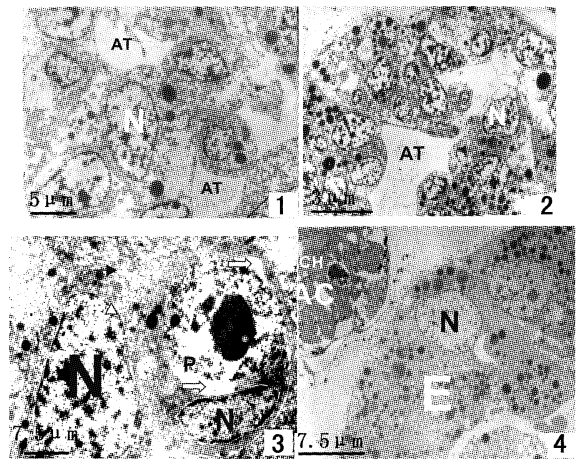


图 6 透射电镜下对照组和 ATHK 组原肠胚
 Fig. 6 The gastula larvae in the control and ATHK under TEM

AC: 藻细胞; CH: 藻细胞叶绿体; AT: 胚腔; E: 胚胎; P: 多胞体; N: 细胞核
 AC: algal cell; CH: chloroplast; AT: archenteron; E: embryos; P: polytopes; N: nucleus
 Δ 正常线粒体, \uparrow 自溶的线粒体 autolyzed mitochondria, \downarrow 胞质肿胀 swelled cytoplasm
 1, 2. 10 h 对照组胚胎; 3, 4. 10 h ATHK 组胚胎
 1, 2. embryos in control at 10 h; 3, 4. embryos in ATHK at 10 h

3 讨论

塔玛亚历山大藻 ATHK 个体较大(20 μm), 因此海湾扇贝胚胎在早期发育阶段都不能摄食该藻细胞, 而该藻产生的 PSP 毒素为细胞内毒素, 不可能接触到受精卵而产生作用, 因此, 塔玛亚历山大藻 ATHK 对扇贝胚胎早期发育阶段的毒性影响不可能由 PSP 毒素引起的, 很可能存在一种未知的毒性物质, 这种未知毒素可能位于细胞表面或由细胞分泌到胞外。Yan 等研究发现塔玛亚历山大藻株 ATHK 对栉孔扇贝受精卵孵化产生抑制作用的有害物质源于藻细胞表面^[10]。甲藻亚历山大藻细胞外被甲片, 具有两个鞭毛能运动^[13], 在显微镜的观察过程中, 经常看到胚胎和藻细胞间发生碰撞接触; 在透射电镜的观察过程中, 也发现胚胎与藻细胞接触的现象, 这种不断发生的碰撞接触, 可能会对位于藻细胞表面的毒素物质的释放或转移起到一定的刺激作用, 但有关亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化抑制作用的致毒机制及毒素的本质还有待于进一步的研究。

在贝类的生命周期中, 其早期发育阶段是个非常重要的环节, 这些正处于发育期的胚胎和幼体对环境影响因素比较敏感。事实上, 对大多生物来说, 因为早期发育阶段的组织器官还未发育成熟, 都要比成体对环境中的有害物质敏感^[14-16]。对贝类胚胎的抑制作用在其它藻种中也有发现: Gramno 等^[8]发现定金藻纲的一种藻 (*Chrysochromulina polyepis*) 使紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 的卵不能受精而且对受精卵有很高的毒性; 赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 对海湾扇贝受精卵的孵化也产生了明显的抑制作用^[17]。

本实验中观察发现塔玛亚历山大藻对海湾扇贝受精卵的卵裂没有明显影响, 表明对受精卵孵化产生影响的物质不具有抑制细胞有丝分裂的性质。透射电镜下发现实验组中的受精卵在卵裂过程中, 细胞中出现相对较多的溶酶体。溶酶体的功能之一是具有防御功能, 溶酶体数量增多, 表明细胞受到外界环境中异物的攻击, 需要较多的溶酶体来消化异物。因此, 亚历山大藻细胞对海湾扇贝受精卵孵化的抑制作用在胚胎卵裂过程中就已经产生了, 只是因卵裂正常进行而没有表现出来; 当胚胎进入原肠胚时, 这些不利影响才明显的表现出来, 藻细胞不仅使胚胎发育减慢, 而且使部

分细胞出现胞质肿胀现象, 胚胎细胞也不能进行正常的功能性分化。很可能是有害物质通过改变胚胎内一些细胞的细胞膜对水分子及其它离子的渗透性, 导致细胞肿胀现象的发生, 从而影响了细胞的一些正常功能。原肠胚是早期胚胎发育的一个重要时期, 在这个重要阶段, 新的特异性蛋白开始合成, 胚层出现并开始分化成不同形态和功能的细胞。实验中发现塔玛亚历山大藻实验组中的胚胎不能形成原肠胚腔且有个别胚胎出现畸形, 很可能是某些特异性蛋白不能正常表达以及细胞不能进行正常分化所致。

总之, 亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的抑制作用可能是由非 PSP 的其它毒性物质引起, 与藻细胞密度成正相关。这种未知毒性物质对扇贝受精卵卵裂没有影响, 可能是通过改变细胞膜的渗透性, 而影响胚胎的正常发育。

参考文献:

- [1] Hallegraeff G M, Anderson D M, Cembella A D. Manual on harmful marine microalgae [M]. Paris: IOC Manuals and Guides, No. 33 UNESCO, 1995: 1-22.
- [2] Shummway S E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture [J]. J World Aquac Soc, 1990, 21(2): 65-104.
- [3] Lassus P, Arzul G, Erardle-Denn E, Gentien P, et al. Harmful marine algal blooms [M]. Lavoisier Paris, 1995: 513-517.
- [4] Shummway S E, Cucci T L. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on feeding and behavior of bivalve mollusks [J]. Aquatic Toxicol, 1987, 10: 9-27.
- [5] Gainey L F J, Shumway S E. Physiological effects of *Protogonyaulax tamarensis* on cardiac activity in bivalve mollusks [J]. Comp Biochem Physiol, 1988, 91C: 159-164.
- [6] Bricelj V M, Shummway S E. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation [J]. Reviews in Fisheries Science, 1998, 6(4): 315-383.
- [7] Suzuki T, Ichimi K, Oshima Y, et al. Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin profiles and short-term detoxification kinetics in mussels *Mytilus galloprovincialis* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Harmful Algae, 2003, 2(3): 201-206.

- [8] Granmo A, Havenhand J, Magnusson K, *et al.* Effects of the planktonic flagellate *Chrysochromulina polylepis* Manton et Park on fertilization and early development of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.) and the blue mussel *Mytilus edulis* L[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1988, 124: 65 – 71.
- [9] 傅 萌, 颜 天, 李 钧, 等. 塔玛亚历山大藻对墨西哥湾扇贝幼体发育的影响[J]. *海洋科学*, 2000, 24(3): 8 – 11.
- [10] Yan T, Zhou M J, Fu M, *et al.* Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1239 – 1244.
- [11] Yan T, Zhou M J, Fu M, *et al.* Effects of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on early development of the scallop *Argopecten irradians concentricus*[J]. *Aquaculture*, 2003, 217: 167 – 178.
- [12] 张 玺, 齐钟彦, 李洁民. 栉孔扇贝的繁殖和生长[J]. *动物学报*, 1956, 8(2): 235 – 353.
- [13] Hallegraef G M, Anderson D M, Cembella A D, *et al.* Manual on harmful marine microalgae[M]. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, 1995: 283 – 309.
- [14] 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.
- [15] Vernberg F J, Vernberg W B. In pollution and physiology of marine organisms [M]. New York: Academic Press, 1974.
- [16] Ostrander G. Techniques in aquatic toxicology[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996: 41 – 72.
- [17] Wang L P, Yan T, Zhou M J. Impacts of HAB species *Heterosigma akashiwo* on early development of the scallop *Argopecten irradians* Lamarck [J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1 – 4): 374 – 383.