

ЗООЛОГИЯ

УДК 591.52 : 577.472

С. В. Добрецов, С. З. Чикадзе, А. И. Раилкин, Ю. В. Плахотникова

ИНДУКЦИЯ ОСЕДАНИЯ ЛИЧИНОК *MYTILUS EDULIS* И *GONOTHYRAEA LOVENI**

Оседание и метаморфоз личинок — важные этапы в жизненном цикле прикрепленных (седентарных) беспозвоночных животных. От того, насколько успешным будет выбор личинками субстрата для прикрепления, зависит их дальнейшее выживание и развитие. В настоящее время для большинства видов-обрастателей установлено, что выбор субстрата личинками осуществляется не случайным образом [1, 4, 25]. Химические и физические сигналы от макроводорослей, пленок микрообрастания и беспозвоночных животных стимулируют или ингибируют оседание личинок [4, 15, 22]. Наши исследования, проведенные на Белом море, позволили установить, что гидроидные полипы *Gonothyraea loveni* (Allman) (Cnidaria, Hydrozoa), а также мидии *Mytilus edulis* (L.) (Bivalvia, Mollusca) распределены на литорали и сублиторали Белого моря неравномерно [2, 13, 14]. Химические вещества, индуцирующие оседание личинок вышеперечисленных видов, до настоящего времени остаются неизвестными.

Установлено, что нейротрансмиттеры — гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), холин и его производные (ацетилхолин, фосфатидилхолин), L-дигидроксифенилаланин (ДОФА), а также ионы металлов Na, K, Li вызывают оседание и метаморфоз личинок моллюсков (например, *Haliotis rufescens*, *Copinus* spp., *Teredo* spp.), сидячих полихет (*Phragmatopoma lapidosa californica*) и иглокожих (*Strongylocentrotus droebachiensis*) [20, 22]. В лабораторных экспериментах показано, что ГАМК, выделяемая красными водорослями, является индуктором оседания и метаморфоза личинок морского ушка *H. rufescens* [18]. Учеными установлено, что действие этого вещества основано на связывании со специфическим рецептором, который активирует аденилатциклазу, регулирующую уровень циклического аденоzinомонофосфата (цАМФ) в клетке. Следствием этих процессов является запуск программ поиска субстрата, оседания и метаморфоза [19].

Можно предположить, что химические вещества, близкие к ГАМК и ДОФА, способны индуцировать оседание и метаморфоз личинок мидий *M. edulis* и гидроидного полипа *G. loveni*. Цель данного исследования — изучить влияние химических индукторов (гамма-аминомасляной кислоты; дигидроксифенилаланина; KCl; изобутилметилксантина и ацетилхолина) на оседание личинок мидии съедобной *M. edulis* и гидроидного полипа *G. loveni*.

* Исследование выполнено при поддержке гранта для молодых кандидатов наук вузов Санкт-Петербурга (№ PD-0.2-1.4-190).

© С. В. Добрецов, С. З. Чикадзе, А. И. Раилкин, Ю. В. Плахотникова, 2003

Материал и методика.

Эксперименты проводили на Морской биологической станции СПбГУ (о. Средний, губа Чупа Кандалакшского залива Белого моря) в период массового оседания планул *G. loveni* и педивелигеров мидий *M. edulis*. Планул *G. loveni* получали в лаборатории непосредственно перед опытами. Для этого колонии гидроидного полипа со зрелыми гонофорами собирали в литоральной зоне Белого моря (губа Чупа, о. Борщовец). Гидроидов отделяли вместе с гидроризой и фрагментами водорослей, к которым они были прикреплены. В лаборатории гидроидных полипов помещали в небольшие, хорошо аэрируемые аквариумы или кристаллизаторы с отфильтрованной морской водой (температура воды 17–18 °С). Выход планул из гонофор индуцировали согласно методике Д. В. Орлова и Н. Н. Марфенина [3]. Педивелигеров мидий *M. edulis* получали для экспериментов по оригинальной методике [13]. Затем личинок мидий смывали в кристаллизатор и использовали в экспериментах сразу после получения.

В ходе экспериментов изучали влияние ГАМК, Л-ДОФА, KCl, изобутилметилксантинта (ИБМК) и ацетилхолина (АХ) на оседание личинок мидии и гонотирии. Действие KCl исследовали в концентрации 10, 20, 30 и 40 ммоль/л. Влияние ГАМК, ДОФА, АХ и ИБМК на личинок исследовали в диапазоне концентраций от 10^{-3} до 10^{-7} моль/л. Растворы веществ в морской воде (МВ) были приготовлены непосредственно перед опытами. В качестве контроля использовали МВ. В каждую чашку Петри добавляли по 5 мл тестируемого вещества, а затем помещали по 20 личинок. Эксперимент проводили в пяти повторностях. Количество прикрепившихся личинок подсчитывали через 24 и 48 ч.

Результаты экспериментов обрабатывали статистически. В лабораторных опытах вычисляли процент осевших особей как соотношение осевших личинок к общему количеству личинок в эксперименте. Определяли средние значения и ошибку к ним. Средние значения сравнивали с помощью методов многофакторного дисперсионного анализа (пост-хог сравнение) [23]. Перед применением методов дисперсионного анализа проверяли нормальность распределения данных, а значения, выраженные в процентах, подвергали arcsin-трансформации. Если количество осевших личинок равнялось нулю, то полученное значение заменяли новым: $1/4n$, где n – число личинок в эксперименте.

Результаты. В течение экспериментов личинки мидий *M. edulis* практически не оседали на дно чашек Петри с МВ. Высокие концентрации тестируемых веществ (10^{-3} моль/л) приводили к гибели личинок мидий. KCl в концентрации 10, 20, 30 и 40 ммоль/л не влиял на оседание личинок мидий. В обоих экспериментах оседание в растворах ГАМК не отличалось ($P > 0,05$) от контроля (рисунок).

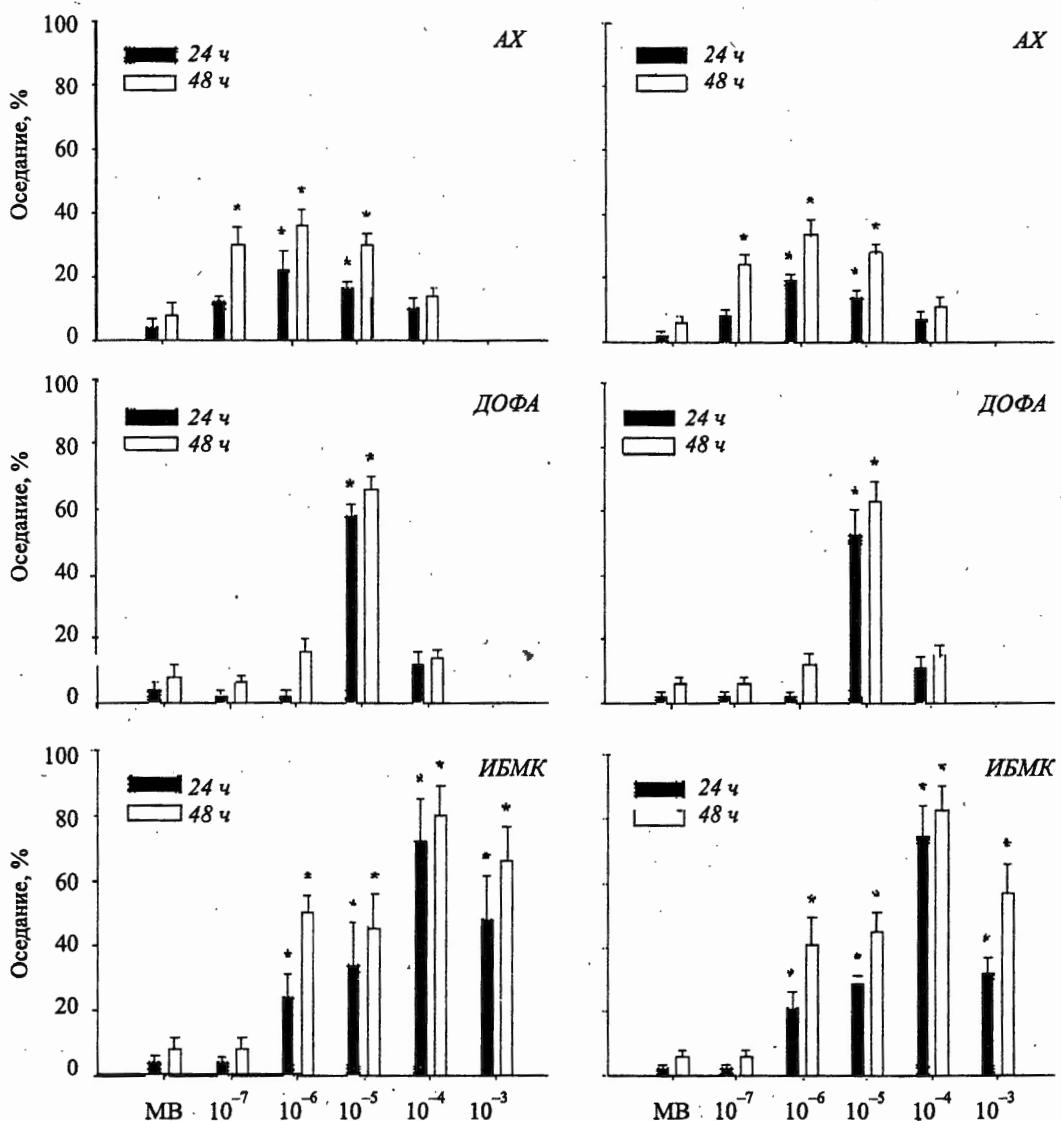
В двух повторных экспериментах АХ в концентрации 10^{-5} – 10^{-6} моль/л индуцировал оседание личинок мидий в течение 24 ч (см. рисунок). До 22% личинок оседали в растворах АХ 10^{-6} моль/л. Через 48 ч после начала эксперимента наблюдали оседание личинок в растворах АХ 10^{-7} – 10^{-5} моль/л. Более высокие концентрации индуктора не влияли на оседание личинок. В течение 24 ч до 58% личинок мидий оседало в растворах 10^{-5} моль/л ДОФА. Более высокие и более низкие концентрации ДОФА не влияли на оседание личинок. Концентрации 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} моль/л ИБМК индуцировали оседание личинок *M. edulis* (см. рисунок). В обоих экспериментах максимальный эффект ИБМК наблюдался спустя 24 ч. Процент осевших личинок в последующие 24 ч был незначительным. Концентрация 10^{-7} моль/л ИБМК не оказывала влияния на поведение педивелигеров. Несмотря на то, что ИБМК в концентрации 10^{-3} моль/л индуцировала оседание личинок, моллюски вскоре погибали.

Рассмотрим влияние химических веществ на оседание личинок *G. loveni* (таблица).

Первые личинки начинали оседать в контроле МВ только спустя 48 ч после начала экспериментов. ИБМК в концентрации 10^{-4} моль/л индуцировал оседание планул спустя 24 ч после начала экспериментов. В концентрации 10^{-3} моль/л ИБМК оказывал токсичное воздействие на личинок и не индуцировал их оседание. Остальные концентрации этого вещества не оказывали влияния на оседание планул. Все изученные концентрации АХ не индуцировали оседание планул гонотирий. Оседание личинок в растворах 10^{-7} – 10^{-3} моль/л ГАМК не отличалось достоверно ($P > 0,05$) от такого же в чашках Петри с МВ. Повышение концентрации ионов калия в МВ стимулировало оседание планул *G. loveni*. Например, в концентрации 40 ммоль/л KCl процент осевших личинок был в 4 раза больше, чем в контроле (см. таблицу). Более низкие концентра-

Эксперимент 1

Эксперимент 2



Индукция оседания личинок мидий *Mytilus edulis* химическими веществами.

На графиках представлены средние значения пяти повторностей и ошибки к ним. Растворы ГАМК и KCl не влияли на оседание личинок (не изображены на графиках). Концентрации веществ 10^{-3} моль/л были токсичными для личинок. Звездочками обозначены статистически отличающиеся ($P < 0,05$) от контроля MB значения (то же для таблицы).

ции KCl не оказывали статистически достоверного ($P > 0,05$) влияния на оседание планул.

Обсуждение. Проведенное исследование позволило установить, что оседание личинок мидий в чашках Петри с морской водой (без индукторов) не превышало 10%, а оседание планул гонотириеи — 2%. Данное обстоятельство позволяет утверждать, что

**Влияние химических веществ на оседание планул
гидроидного полипа *Gonothygaea loveni***

Вещество	Концентрация, моль/л	Оседание планул, %	
		24 ч	48 ч
ИБМК	—	0	2 ± 1
	10^{-3}	1 ± 1	1 ± 1
	10^{-4}	3 ± 1*	21 ± 8*
ДОФА	$10^{-5} - 10^{-7}$	0	2 ± 1
	$10^{-3} - 10^{-7}$	0	2 ± 1
ГАМК	$10^{-3} - 10^{-7}$	0	1 ± 1
АХ	$10^{-3} - 10^{-7}$	0	2 ± 1
KCl	4×10^{-2}	2 ± 1*	9 ± 2*
	3×10^{-2}	1 ± 1	2 ± 1
	2×10^{-2}	0	2 ± 1
	1×10^{-2}	0	3 ± 1

Примечание. Звездочками обозначены статистически отличающиеся ($P < 0,05$) от контроля МВ значения.

для оседания и прикрепления личинок должны существовать специфические химические индукторы. К сходным выводам пришли и другие исследователи [3, 16].

Добавки KCl и ГАМК не оказывали влияния на оседание мидий. Подобные данные отмечались ранее в литературе. Так, повышенное содержание ионов калия в МВ (5–20 ммоль/л KCl) и добавки ($10^{-6} - 10^{-4}$ моль/л) ГАМК не вызывают оседание и метаморфоз личинок мидий [16]. Нами было также установлено, что растворы ГАМК не влияют на оседание личинок гонотирией. В то же время KCl в концентрации 40 моль/л индуцировал оседание и метаморфоз планул. В литературе отмечается, что повышение концентрации ионов K^+ в МВ стимулировало оседание и метаморфоз личинок *Haliotis rufescens* [5, 18, 27], а также планул *Hydractinia echinata* [24].

В нашем исследовании ИБМК индуцировал оседание как личинок мидий *M. edulis*, так и планул *G. loveni*. Эффективные концентрации индуктора в обоих случаях были низкими (10^{-4} моль/л для *G. loveni* и $10^{-4} - 10^{-6}$ моль/л для *M. edulis*), поэтому можно предполагать, что ИБМК по своему действию близка к естественным индукторам оседания личинок. По-видимому, в данных экспериментах влияние ИБМК на оседание личинок было связано с увеличением уровня ц-АМФ в рецепторных клетках мидий и гонотирий. Как показали исследования на моллюске *Haliotis rufescens* [19], гипотетическая схема индукции оседания может выглядеть следующим образом: лиганд (сигнальное вещество) взаимодействует с рецептором, который, в свою очередь, связан с G-белком. Белок изменяет свою структуру и воздействует на фермент аденилатциклазу. Активизированная аденилатциклаза расщепляет АТФ до ц-АМФ. Увеличение концентрации ц-АМФ в рецепторных клетках личинки приводит к запуску программ оседания и метаморфоза. К сожалению, механизмы индукции оседания личинок с помощью ц-АМФ остаются до сих пор не исследованными. Показано, что ц-АМФ каким-то образом увеличивает концентрацию ионов кальция в рецепторных клетках личинок, что в конечном итоге приводит к индукции оседания личинок [20]. Литературные данные и материалы настоящего исследования показывают, что ИБМК индуцирует оседание и метаморфоз усоногого рака *Balanus amphitrite* [9,10], полихет *Phragmatopoma lapidosa* и *Hydroides elegans* [8, 17], гидроидного полипа *G. loveni* (данное исследование), а также моллюсков *H. rufescens* [6] и *M. edulis* (данное исследование). Таким образом,

можно предположить, что механизм индукции оседания, описанный выше, универсален для личинок многих групп беспозвоночных животных.

Ранее было установлено, что ДОФА индуцирует оседание личинок устриц [7, 11], полихеты *Ph. lapidosa* [20]. Кроме того, в исследовании К. Купера [12] указывалось, что ДОФА индуцирует оседание *M. edulis*, однако действующие концентрации не были установлены. В нашей экспериментальной работе впервые было показано, что ДОФА в концентрации 10^{-5} моль/л индуцирует оседание личинок мидий *M. edulis* и не оказывает влияния на оседание планул *G. loveni*. По-видимому, ДОФА неспецифически воздействует на рецепторы и нервную систему [11, 28]. В то же время некоторые исследователи полагают, что ДОФА и химически близкие молекулы могут индуцировать оседание личинок в природе [26].

Показано, что АХ и derivatives ацетилхолина индуцируют оседание личинок моллюсков *Crassostrea gigas*, *Phestilla sibogae*, *H. rufescens* [11, 19], а также полихеты *Ph. lapidosa* [21]. Как правило, исследователи полагают, что действие АХ на личинок не является специфическим, так как ацетилхолин влияет на рецепторы личинок не напрямую, а косвенно, воздействуя на синаптические соединения нервной системы личинок. В нашем исследовании установлено, что АХ в концентрации $10^{-5} - 10^{-7}$ моль/л стимулирует оседание личинок мидий *M. edulis*, но не влияет на оседание личинок гидроидного полипа *G. loveni*. Данное обстоятельство согласуется с высказанным ранее предположением о неспецифическом характере действия АХ. По-видимому, ацетилхолин может воздействовать на нервную систему личинок мидий и таким образом индуцировать их оседание, тогда как планулы гонотищей, имеющие лишь рецепторные клетки, не подвержены влиянию АХ.

Каким образом исследованные химические вещества влияли на оседание личинок мидий *M. edulis* и гидроидного полипа *G. loveni*? Концентрации химических веществ 10^{-3} моль/л и выше были токсичными для личинок. С одной стороны, это может быть связано с подавлением биения ресничек жабр моллюсков, с другой — может быть вызвано негативным влиянием химических веществ на метаболические процессы личинок. Из пяти исследованных веществ только два химических вещества индуцировали оседание личинок *G. loveni* и три вещества вызывали оседание мидий *M. edulis*. Несмотря на различное влияние химических веществ на оседание личинок мидий и гонотищей, было установлено, что ИБМК вызывает оседание и метаморфоз обоих видов. Данное обстоятельство может свидетельствовать о том, что уровень ц-АМФ в рецепторных клетках личинок играет определяющую роль в индукции оседания личинок разных групп беспозвоночных животных. Данное предположение планируется проверить в дальнейших исследованиях.

Авторы выражают глубокую признательность коллегам из Кильского университета (Германия) и университета науки и технологии (Гонконг) за предоставленные для экспериментов химические вещества.

Статья рекомендована проф. А. И. Грановичем.

Summary

Dobretsov S. V., Chikadze S. Z., Raikin A. I., Plahotnikova U. V. The induction of larval settlement of the *Mytilus edulis* and *Gonothyraea loveni*.

The induction of larval settlement and metamorphosis of the blue mussel *Mytilus edulis* and hydroid *Gonothyraea loveni* by chemical compounds as artificial inducers was investigated through laboratory experiments, as a part of efforts in understanding the recruitment dynamics of these important economic species in the White Sea. Gamma-aminobutyric acid (GABA), dihydroxyphenyl L-alanine (L-DOPA) and isobutyl methylxanthine (IBMX) at concentration range of 10^{-3} – 10^{-6} M, acetylcholine chloride at the concentration range of 10^{-3} – 10^{-7} M as well as KCl at 10–40 mM of elevated K⁺ were tested for their inductive effect on larval settlement in static-water laboratory bioassay, with sterilized fresh seawater (SFSW) as a negative control. IBMX induced settlement of *M. edulis* at concentrations 10^{-3} – 10^{-6} M, and stimulated settlement of *G. loveni* at 10^{-4} M. More than 60% of *M. edulis* larvae settled in the solutions of L-DOPA at 10^{-5} – 10^{-6} M. Acetylcholine chloride induced settlement of *M. edulis* larvae but had no effect on the settlement of *G. loveni*. GABA did no induce settlement of both species. Elevated K⁺ had no effect on larval settlement of *M. edulis* and at 40 mM induced settlement of planula of *G. loveni*.

Литература

1. Добрецов С. В., Раилькин А. И. Стратегия выбора субстрата личинками *Mytilus edulis* L. Изучение опыта промышленного выращивания мидий в Белом море // Труды Биол. НИИ СПбГУ. 2000. Вып. 46. С. 53–64.
2. Зевиня Г. Б. Биология морского обрастания. Изд-во Моск. ун-та, 1994.
3. Орлов Д. В., Марфенин Н. Н. Поведение и оседание планул гидроида *Gonothyraea loveni* (Allaman) (Hydroidea, Thecaphora) на литорали Белого моря // Книдарии: Современное состояние и перспективы исследований. Т. 2. СПб., 1995. С. 103–120.
4. Раилькин А. И. Процессы колонизации и защиты от биообрастания. Изд-во С.-Петерб. ун-та, 1998.
5. Baloun A. J., Morse D. E. Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda) // Biol. Bull. 1984. Vol. 167. P. 124–138.
6. Bassler G., Morse D. E. G-protein and diacylglycerol regulate metamorphosis of planktonic molluscan larvae // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 1867–1870.
7. Bonar D. B., Coon S. L., Walch M., Weiner R. M., Fitt W. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues // Bull. Mar. Sci. 1990. Vol. 46. P. 484–498.
8. Bryan P. J., Kreider P. Y., Qian P. Y., Chia F. S. Induction of settlement and metamorphosis of the serpulid polychaete *Hydroides elegans* by conspecific associated and pharmacological compounds // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1997. Vol. 146. P. 81–90.
9. Clare A. S., Freet R. K., McClary M. On the antennular secretion of the cyprid of *Balanus amphitrite amphitrite*, and its role as a settlement pheromone // J. Mar. Biol. Ass. UK. 1994. Vol. 74. P. 243–250.
10. Clare A. S., Thomas R. F., Rittschof D. Evidence for the involvement of cyclic AMP in the pheromonal modulation of barnacle settlement // J. Exp. Biol. 1995. Vol. 198. P. 655–664.
11. Coon S. L., Bonar D. B., Weiner R. M. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by L-DOPA and catecholamines // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1985. Vol. 94. P. 211–221.
12. Cooper K. A model to explain the induction of settlement and metamorphosis of planktonic eyed-pediveligers of the blue mussel *Mytilus edulis* L. by chemical and tactile cues // J. Shellfish Res. 1982. Vol. 2. P. 117.
13. Dobretsov S. V. Effects of macroalgae and biofilm on settlement of blue mussel (*Mytilus edulis* L.) larvae // Biofouling. 1999a. Vol. 14. P. 153–165.
14. Dobretsov S. V. Macroalgae and microbial film determine substrate selection in planulae of *Gonothyraea loveni* (Allman, 1859) (Cnidaria: Hydrozoa) // Zoosystematica Rossica. 1999b. Vol. 1. P. 109–117.
15. Dobretsov S., Qian P. Y. Effect of bacteria associated with the green alga *Ulva reticulata* on marine micro- and macrofouling // Biofouling 2002. Vol. 18. P. 217–228.
16. Eyster L. S., Pechenik J. A. Attachment of *Mytilus edulis* L. larvae on algal and byssal filaments is enhanced by water agitation // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1987. Vol. 114. P. 99–110.
17. Jensen R. A., Morse D. E. Chemically induced metamorphosis of polychaete larvae in both the laboratory and ocean environment // J. Chem. Ecol. 1990. Vol. 16. P. 911–930.
18. Morse A. N. C., Morse D. E. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surface of crustose red algae // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1984. Vol. 75. P. 191–215.
19. Morse D. E. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology // Bull. Mar. Sci. 1990. Vol. 46, № 2. P. 465–483.
20. Pawlik J. R. Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phragmatopoma lapidosa californica* (Polychaeta: Sabellariidae), with a critical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae // Bull. Mar. Sci. 1990. Vol. 46, № 2. P. 512–536.
21. Pawlik J. R. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates // Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 1992. Vol. 30. P. 273–335.
22. Rodriguez S. R., Ojeda F. P., Inestrosa N. C. Settlement of benthic marine invertebrates // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1993. Ser. 97. P. 193–207.
23. Sokal R. R., Rohlf F. J. Biometry. 2nd edn. / Ed. by W. H. Freeman. San Francisco, 1981.
24. Spider K. D., Müller W. A. Induction of metamorphosis by bacteria and by lithium-pulse in the larvae of *Hydractinia echinata* (Hydro-

zoa) // Wilhelm Roux' Archiv. 1972. Vol. 169. P. 271–280. 25. Wahl M. Living attached: Aufwuchs, fouling, epibiosis / Ed. by R. Nagabhushanam, M. Thompson // Fouling organisms of the Indian Ocean: Biology and control technology. New Delhi, 1997. P. 31–84. 26. Weiner R. M., Segall A. M., Colwell R. R. Characterization of a marine bacterium associated with *Crassostrea virginica* (the eastern oyster) // Appl. Environ. Microbiol. 1985. Vol. 50. P. 83–90. 27. Yool A. J., Grau S. M., Hadfield M. G., Jensen R. A., Markell D. A., Morse D. E. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species // Biol. Bull. 1986. Vol. 170. P. 255–266. 28. Zimmer-Faust R. K., Tamburri M. N. Chemical identity and ecological implications of a waterborne, larval settlement cue // Limnol. Oceanogr. 1994. Vol. 39, N 5. P. 1075–1087.

Статья поступила в редакцию 14 июня 2003 г.