

诱发红鲍 *Haliotis rufescens*

(软体动物门 Mollusca:腹足纲 Gastropoda)

幼体变态 γ 氨基丁酸最适浓度

R. Searcy-Bernal* C: Anguiano-Beltran

(墨西哥下加利福尼亚大学海洋研究所)

摘 要

在鲍鱼养殖中,诱发幼体变态是个关键。近来,由于效果强于其它措施, γ 氨基丁酸被越来越多的商业育苗场用作诱发剂。 γ 氨基丁酸常用浓度为根据室内控制实验所推荐的1.0微摩尔。然而,可能由于商业设施细菌负荷使诱发剂降解到含量低于要求界限,在育苗场实际应用中,效果偶尔不太理想。作为对策,也许可以在安全界限内提高 γ 氨基丁酸浓度,以便补偿细菌降解,但是,迄今,尚无资料足以支持这一抉择。本文介绍以红鲍 *Haliotis rufescens* 幼体为对象针对这一论点所进行的2个实验,这2个实验表明, γ 氨基丁酸浓度至少可以提高100%,而对幼体变态或后期幼体健康并不引起 γ 氨基丁酸含量较高场合所报告的不良影响。文中对这一结果在鲍鱼苗种生产上的重要意义予以讨论。

在鲍鱼 *Haliotis* spp. 生态研究和养殖生产中,幼体着底和变态都是重点问题。在自然生境,各种鲍鱼多半优先着底于提供特殊变态诱发生化物质的壳状珊瑚藻 (Morse, 1990; McShane, 1996)。在养殖条件下,在着底期和着底后初期,大量死亡(>90%)屡见不鲜 (Hooker and Morse, 1985; Hahn, 1989; Searcy-Bernal et al., 1992a)。在鲍鱼养殖中,传统育苗方法利用投放有附着生物板(以附着硅藻和

细菌为主)的水槽,发育完善的幼体感应附着生物所产生的变态诱发物质在水槽内着底 (Hooker and Morse, 1985; Hahn, 1989)。在育苗场,稚鲍在附着生物板上匍匐或摄食所分泌的粘液同样用于诱发着底 (Hahn, 1989; Seki and Taniguchi, 1996)。

20年前, Morse等(1979, 1979)发现,就诱发红鲍 *H. rufescens* 变态而言,附着生物板不如壳状珊瑚藻有效,并且,一种常见而又廉价

* 通信作者

的氨基酸,即 γ 氨基丁酸,像藻类诱发剂一样奏效。此类结果也见于其它鲍类有关研究,这些成果为提高鲍鱼苗种生产中采苗效果点燃新的希望(Morse et al., 1979; Morse, 1984; Hooker and Morse, 1985)。

γ 氨基丁酸大规模应用早期尝试所获结果并不理想(Akashige et al., 1981; Leighton, 1989; Slattery, 1992a),可能归因于附着生物板和采苗水槽所用海水所含细菌干扰(Morse, 1990, 1992; Searcy-Bernal et al., 1992a)。除致病影响之外,这一干扰还可能包括 γ 氨基丁酸吸收与降解,并且,通过在清洁的收容设施中使用这一诱发剂,并在变态完成(诱发后1~2天)后补加底栖微小生物供后期幼体摄食,可能将这一干扰减轻到最小程度(Morse et al., 1979; Searcy-Bernal et al., 1992a, 1992b)。在墨西哥和美国商业养殖场, γ 氨基丁酸现已常用于红鲍养殖,并且,实验结果表明,对其它鲍类应用也见成效(Morse, 1990, 1992; Searcy-Bernal, 1994a; Yang and Wu, 1995; Castro-Galvez and Searcy-Bernal, 1997; Roberts and Nicholson, 1977)。

在红鲍育苗场, γ 氨基丁酸典型用量为实验研究证明效果最好的1.0微摩尔最终浓度(Morse et al., 1979a, 1979b; Morse, 1984, 1990),与使用硅藻板相比,平均采苗率和后期幼体产量高而又稳定,但是,偶尔效果并不理想(Searcy-Bernal, 1994)。有些养殖环境可能导致细菌大量滋生,细菌可能使 γ 氨基丁酸浓度减小到诱发变态所需界限之下(Morse et al., 1976b; Searcy-Bernal et al., 1992b; Kaspar and Mountfort, 1995)。要想补偿这一潜在的细菌降解,提高用量也就是了,不过,现有报告指出,该诱发剂高含量可能产生毒性。绝大多数研究以对数尺度测试 γ 氨基丁酸浓度,并且发现,10微摩尔以上含量引起红鲍幼体畸形变态,这些幼体最终死掉(Morse et al., 1979a, 1980; Morse, 1992)。

在1~10微摩尔浓度条件下 γ 氨基丁酸

影响根本就无介绍,对于提高 γ 氨基丁酸生产应用效率来说,这一资料又必不可少。查明诱导正常变态,而不造成毒性影响的最大浓度,尤其重要。这一点若是做到了,也就可以在安全界限内提高 γ 氨基丁酸常用浓度,以便补偿潜在细菌降解。报告资料对这一焦点可供参考的为数不多的文献所提供的结果自相矛盾。Trapido-Rosenthal和Morse(1986)发现,在红鲍诱发着底方面, γ 氨基丁酸1.5微摩尔浓度像1.0微摩尔一样有效。Morse(1992)可又报告,对于皱纹盘鲍*H. discus hanai*, γ 氨基丁酸1.3微摩尔浓度诱发变态率偏低(48小时后约50%,而在1.0微摩尔条件下为80~90%),这表明该诱发剂适宜浓度范围很窄。

本文介绍2个实验,实验目的在于评估10微摩尔以下浓度对红鲍变态诱发和成活、生长影响。

材料与方 法

1996年6月和1997年4月,承蒙当地一家商业养殖场(鲍鱼养殖场)惠赠红鲍早期面盘幼体(受精后3~4天),这些幼体按在别的报告(Searcy-Bernal et al., 1992a, 1992b)所描述的方法养殖在海洋研究所所辖设施(恩塞纳达)。按后面所述程序完成2个实验(每批幼体1个实验)。变态启动采用诸如呈现匍匐行为、头部触角3~4个突起等常用标准确认(Hooker and Morse, 1985; Hahn, 1989)。

在第1个实验中,试用0, 0.5, 1, 2, 5和10微摩尔6个 γ 氨基丁酸浓度,在第2个实验中,试用0, 1, 2, 3, 5和10微摩尔6个 γ 氨基丁酸浓度,实验利用2个6穴组织培养皿(穴经34.6毫米,试验容积5毫升)。每一浓度按随机区组设计安排给每个培养皿各穴。每穴投放15~20个7日龄旺兴幼体。所用海水(经1微米滤器过滤,紫外线照射)每隔1天换1次,并加有氯霉素(10毫克/升)。在2个实验中,试验容器搁置在恒定的荧光灯照条件下(约50微爱因斯坦/秒/米²)。在实验1中,

水温为 16~18℃;在实验 2 中,水温为 18~20℃。

实验开始 48 小时后,利用光学显微镜(100×)评估成活和变态诱发态势。面盘细胞脱落作为认定变态诱发启动标准(Leighton, 1989;Hahn, 1989)。在这一评估结束,各穴(包括对照)接种培养硅藻细胞(舟形藻 *Navicula incerta*, 2×10^4 个细胞/厘米²),以饲养早期后期幼体。到第 10 天,再次评估成活状况,并通过显微摄影图像数字分析测定壳长。

各处理组应用方差分析予以统计学比较($\alpha=0.05$)。分析前,百分比数据经角变换处理(Steel and Torrie, 1980)。为保证试验 $\alpha=0.05$,LSD(最小显著差数)多重比较按比较 $\alpha=0.0034$ 搞定(Day and Quinn, 1990)。LSD(最小显著差数)分析证实反应变量最高的处理组的浓度认定为最适浓度。

结 果

在 2 个实验中,2 天后成活率均高于 90%,未见组间统计学差异($P>0.35$)。2 个实验 48 小时变态诱发结果如图 1 所示。第 10 天成活率和壳长测定结果分别如图 2 和图 3 所示。这些变量处理影响方差分析结果列入表 1。各检验均未发现区组显著影响($P>0.40$)。

在 2 个实验中,各 γ 氨基丁酸浓度组中间,变态诱发差异显著。根据 LSD(最小显著差数)检验,在实验 1 中,最适浓度为 2 微摩尔,该浓度所产生的诱发率达 97.8%,不过,并不显著高于 5 微摩尔组(84.3%)。在实验 2 中,最高诱发率见于 1,2,3 微摩尔组(分别为 85.9,85.0,72.6%),形成 1 个齐性 LSD(最小显著差数)组(图 1,表 1)。

在实验 1 中,各 γ 氨基丁酸浓度组中间,后期幼体 10 天成活率并无显著差异,变化于 2 微摩尔组的 96.7%至 10 微摩尔组的 87.2%。然而,在实验 2 中,检出显著浓度影响,最高成活率见于 2 微摩尔组(82.9%),不过,

该值与 1 微摩尔组和 3 微摩尔组成活率(分别为 76.3%和 68.1%)之间差异并不显著(图 2,表 1)。

在 2 个实验中,后期幼体第 10 天壳长态势相近,各 γ 氨基丁酸浓度组中间,差异显著。根据 LSD(最小显著差数)检验,在实验 1 中,最大后期幼体见于 1 微摩尔组和 2 微摩尔组(平均壳长分别为 438.8 和 427.2 微米),而在实验 2 中,最大壳长见于 1,2,3 微摩尔组(平均值分别为 434.4,418.6,425.7 微米)(图 3,表 1)。

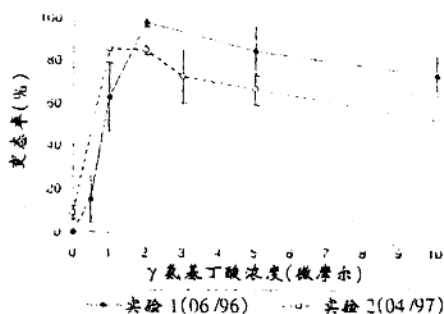


图 1 在 2 个独立的实验中以不同浓度 γ 氨基丁酸处理后 48 小时红地 *H. rufescens* 幼体变态诱发率
数据为 2 个重复(区组)平均值;垂直线段为标准误差。

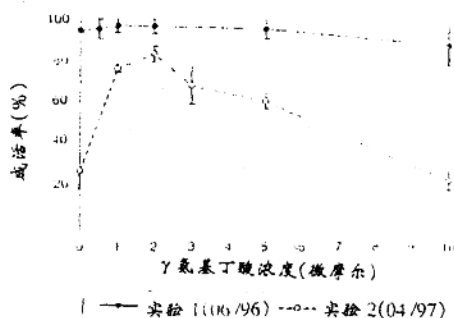


图 2 在 2 个独立的实验中以不同浓度 γ 氨基丁酸诱发着底后 10 天红地 *H. rufescens* 后期幼体成活率
各组均于着底诱发后 48 小时接种鹿柄硅藻舟形藻 *Navicula incerta*;数据为 2 个重复(区组)的平均值;垂直线段为标准误差。

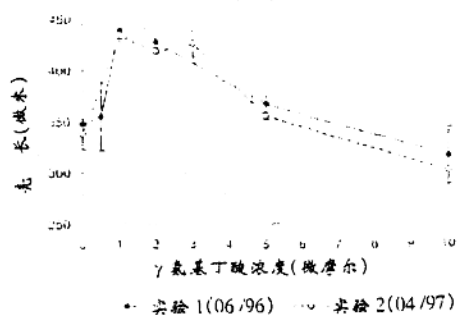


图3 在2个独立的实验中以不同浓度 γ 氨基丁酸诱发着底后10天红鲍 *H. rufescens* 后期幼体壳长
各组均于着底诱发后48小时接种底栖硅藻舟形藻 *Navicula incerta*; 数据为2个重复(区组)的平均值; 垂直线段为标准误差。

表1 在2个独立的实验中不同 γ 氨基丁酸浓度对红鲍 *H. rufescens* 变态诱发率、后期幼体成活率和生长影响方差分析检验结果

变 量	实验 编号	F	P	最适浓度 (微摩尔)
诱发变态率(48小时)	1	14.46	0.005	2.5
	2	17.53	0.003	1.2, 3
成活率(10天)	1	0.32	0.885	—
	2	14.77	0.005	1.2, 3
壳 长(10天)	1	5.74	0.039	1.2
	2	34.33	0.001	1.2, 3

LSD(最小显著差数)法检测认定齐性组的反应变量最高各组浓度视为最适浓度。

讨 论

本次研究表明,红鲍变态诱发最佳效果和早期后期幼体最佳体质见于1~2微摩尔 γ 氨基丁酸浓度,不过,最适浓度范围上限或许接近3微摩尔。这一范围比根据原有文献所能推断的要宽(Morse et al., 1979a, 1980; Morse, 1984; Hooker and Morse, 1985)。与浓度超出最适范围场合相比,在浓度处于最适范围场合,变态诱发较快,早期后期幼体成活率较高,生长速度较快。虽说在鲍鱼养殖中利用 γ 氨基丁酸主要好处在于后期幼体成活率和生长速度比较高,比较稳定,但也渴求着底诱发快一些,因为,必要时,这有助于较早安排持续流水(Searcy-Bernar, 1991a)。

1微摩尔和2微摩尔 γ 氨基丁酸浓度组之间,除了实验1中变态诱发率(2微摩尔组显著高于1微摩尔组)之外,反应变量差异并不显著(图1, 2, 3和表1)。实验1中变态诱发率差异反映1微摩尔组幼体反应较慢,并非总诱发率下降,因为,10天后,2组后期幼体成活率和生长相差不大(图2和3)。实验2所获结果进一步表明,3微摩尔 γ 氨基丁酸浓度可能依然并未超出安全浓度范围。虽然3微摩尔组平均变态率和后期幼体10天成活率低于1微摩尔和2微摩尔组,但是,其差异并不显著(图1, 2和表1)。不过,这些统计学推断不能作为结论,因为所实施的双重重复导出的乘方毕竟偏低(小于0.2)(Searcy-Bernal, 1994b)。

在2个实验中,无 γ 氨基丁酸组(对照组)48小时后变态率寥寥无几,与以前以该种为对象所进行的研究所获结果一致,在以前的研究中,对照组48小时后变态率始终不足5%(Morse et al., 1979b; 1980; Morse, 1984; Barlow, 1990)。或天性所致,或偏老的幼体对水体中诱发剂或容器内硅藻有所反应所致,有些变态出现较晚。若干研究证实,泼发鲍鱼幼体越老越对变态刺激物敏感(Morse, 1984; Barlow, 1990; Moss and Tong, 1992; Searcy-Bernal et al., 1992a; Degnan and Morse, 1995)。在实验1中,对照组中绝大多数幼体(94%)一直活到观察(10天)结束,并且,由于滞后逐渐变态,其中79%平均壳长小于最适 γ 氨基丁酸浓度组后期幼体(图3)。在实验2中,对照组绝大多数幼体(73%)在10天观察期内于变态前死掉,而活下来的后期幼体发育也不如最适 γ 氨基丁酸浓度组。0.5微摩尔组结果与对照组类似,说明 γ 氨基丁酸有效浓度界限较高。

在2个实验中,较高 γ 氨基丁酸浓度(5和10微摩尔)有效触发变态,然而,随后发育异常,在10微摩尔场合,态势尤其突出(图1, 2, 3)。在这些实验组,行为上着底比最适浓度组还要快,并且,在48小时评估时,新壳开始

分泌。10 天后,绝大多数成活后期幼体形成原始周口壳,但是,发育就此打住,说明在所述高浓度组,变态所涉及的纷繁复杂事态进展不顺。据 Morse 等(1980)报告,以 10 微摩尔 γ 氨基丁酸所处理的红鲍幼体变态诱发变化情况类似(面盘脱落),但是,可能由于培养条件或实验幼体不同,4 天后,未见周口壳形成。

2 个实验之间变态诱发率和 10 天成活率差异可能部分归因于温度不同。实验 1 平均温度比实验 2 低 2°C ,可能减缓变态进行速度和幼体卵黄贮备利用速度,致使早期成活率较高。

从实用角度出发,本次研究主要结论在于,在红鲍养殖中,诱发幼体着底习用 γ 氨基丁酸浓度(1.0 微摩尔)至少可以加倍,所获结果不会变坏,甚至更好。以绿鲍 *H. fulgens* 幼体为对象的初步研究呈现同一态势,不过,绿鲍对诱发剂反应较慢(未发表)。依据这些和其它一些研究成果,在我们实验室和墨西哥 2 家苗种场,1.5~2.0 微摩尔 γ 氨基丁酸现已用于红鲍和绿鲍变态诱发。提高 γ 氨基丁酸标的浓度预期效果可能以设施中细菌负荷及其对 γ 氨基丁酸降解速度影响为转移(Kaspar and Mountfort, 1995)。

对其它鲍鱼要使用这一手法可能有待进一步研究,因为幼体对着底刺激物反应种间差异依然所知甚少(Searcy-Bernal, 1994a)。最近的研究表明,与在 1 微摩尔 γ 氨基丁酸浓度中相比,在 10 微摩尔氨基丁酸浓度中,皱纹盘鲍

泼实幼体变态效率更高(48 小时后变态率分别为 35% 和 60%),然而,对尔后的后期发育再无评价(Yang and Wu, 1995)。1 微摩尔 γ 氨基丁酸对黑足鲍 *H. iris* 幼体呈现中等程度诱发效果,但对弗及利亚鲍 *H. virginea* 幼体无效(2 天后变态率分别为 44% 和 3%) (Roberts and Nicholson, 1997)。最后,在 1 微摩尔和 10 微摩尔条件下, γ 氨基丁酸对杂色鲍 *H. diversicolor* 幼体诱发变态率微乎其微(48 小时后分别为 0% 和 10%) (Bryan and Qian, 1998)。要想更精确地确定 γ 氨基丁酸对各种鲍鱼的最适用量,并改进 γ 氨基丁酸在水产养殖上的应用,尚需进一步研究,以比常规对数处理还要精细的尺度测试 γ 氨基丁酸浓度。对于只在对数尺度实验中作为对象研究过不同 γ 氨基丁酸浓度诱发幼体变态的其它贝类 (Tamashiro et al., 1993; Tan and Wong, 1995; Avila et al., 1996),这一点可能同样必要。

谢 辞

笔者感谢鲍鱼养殖场惠赠鲍鱼幼体。我们同样感谢美国加利福尼亚大学 Daniel E. Morse 博士、南非开普顿大学 Peter A. Cook 博士和两位未曾属名的校阅者对原稿提出宝贵意见和建议。本研究部分受到墨西哥政府和下加利福尼亚大学补助金资助。

[译自美国《世界水产养殖学会志》

1998 年 29 卷 4 期]