

关于轮虫休眠卵孵化的若干术语的探讨 *

DISCUSSION ON TECHNICAL TERMS RELATED TO HATCHING THE ROTIFER RESTING EGGS

周 利 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

咸淡水轮虫 (主要指褶皱臂尾轮虫 *Brachionus plicatilis* 和圆形臂尾轮虫 *B. rotundiformis*) 是目前海水鱼类及甲壳类动物种苗培育的重要活饵料。轮虫休眠卵作为最理想的轮虫储存形式,其在水产养殖中的应用价值和意义深受各国学者的关注,休眠卵的“休眠”和“孵化”等相关生物学内容亦得到广泛深入的研究。其中关于孵化问题,郑严等 1979 年、1991 年^①、1994 年^②,王琦等 1980 年, Balopapung 等 1997 年^[3], Gilbert 1974 年, Hagiwara 等 1985、1989、1990、1995 年, Mnko 等 1983 年, Pourriot 等 1993 年已就各种内外因素对休眠卵孵化的影响进行了大量探讨。然而,前人报道中所涉及的有关休眠卵孵化的术语或指标,不同的作者往往有不同的理解和计算方法,目前尚未见到专门报道对各有关术语提出统一、明确的定义或标准。本文就此方面作一初步探讨,文中讨论了若干个用于分析轮虫休眠卵孵化过程、评判其孵化质量的重要术语(指标)的定义以及彼此间的区别和联系,供商榷。

鉴于休眠卵的孵化首先始于休眠期的终止,故探讨孵化问题应首先对“休眠期”的内涵作进一步分析。众所周知,轮虫休眠卵亦即受精卵,是轮虫有性生殖的产物,因其自母体产出后卵内胚胎表现为滞后发育,即使在最佳环境下也需要过一段时间才能孵化,故称“休眠”,又称“滞育”(Diapause)。实际上,这是受精卵卵内胚胎的“后熟”(Postmature)过程,此间卵对任何外部环境刺激均不反应,故而轮虫可借此状态度过不良环境。后熟过程表现为休眠卵由体内排出后,卵内胚胎仍缓慢发育一段时间。据 Hagiwara 等 1995 年报道,此过程包括胚外间隙 (Extraembryonic space, 又称“气室”)的逐渐形成、细胞核数目的持续增加、外层卵膜的继续加厚等,这一时期亦称为内滞育期 (Internal diapause period),其长短主要与温度有关,温

度越低历时越久;相应地,已完成后熟过程的胚胎处于外滞育期 (External diapause period)。外滞育期的休眠卵已获得在适宜环境中孵化的能力,但若仍处于孵化抑制条件下(如黑暗、低温、干燥)则会继续保持“休眠”状态。由此可见,通常所说的休眠期实际上包括内滞育期和外滞育期两个阶段,严格说来应仅限于前者,而长期储存的休眠卵大部分时间均处于外滞育期。因此可以说,孵化就是休眠卵在一定环境条件刺激下,外滞育期终止(即所谓“打破休眠期”)、滞育胚胎重新启动发育并最终破膜而出的过程。对休眠期的上述认识,有助于理解以下所要探讨的有关孵化的若干术语中的时间概念。

已知,卤虫卵 (Atemia cysts) 作为另一种在世界各地海水育苗场广为应用的重要活饵料源,其孵化质量的评判已有一套明确定义的术语或标准,如孵化时间 T_0 与 T_{90} 、孵化率、孵化速率、孵化效率、孵化(产)量等^[1](另见郑严等^③)。但由于轮虫休眠卵(简称轮虫卵)无论在生物学特性还是在生产、采收、储存的技术条件等方面均与卤虫卵显著不同,故不能完全套用。因此,本文所探讨的有关轮虫卵的孵化术语(指标)中,有的借鉴于卤虫卵的相应术语,有的系首次提出,仅供参考。

* 承蒙郑严教授悉心审改,谨致衷心感谢。

① 郑严、李茂堂、田凤琴、宋光泽、周利、王莉萍. 轮虫休眠卵形成、采收、贮存和应用(1985~1990)。中国科学院海洋研究所科学技术档案——脊 25-1 号。1991。

② 郑严主编. 海洋生物饵料培养原理与应用。中国老教授协会海洋经济技术分会编,1994。29~51

③ 郑严、周利、李茂堂. 卤虫的研究和应用。简明中国水产养殖百科全书。北京:中国农业出版社。935~944(出版中)
 收稿日期:2000-11-27;修改日期:2001-04-19

1 孵化时间 T_0 与 T_{90}

T_0 和 T_{90} 分别是指一批卤虫卵“孵出第一个幼体所需的时间”和“孵出 90% 的幼体所需的时间”,其计时应从将一定数量的卵放入孵化环境之时起。时间单位可以“小时”(h)计,也可以“日”(d)计(为方便起见,本文以下讨论中所涉及的时间单位若未加说明,均以“d”计)。此二者是用来反映同一批卤虫卵孵化开始和结束时间的重要指标,它们也同样适用于描述轮虫卵的孵化。不过对于 T_{90} 的应用有必要加以讨论,当某批卵在一定观测时间内的“孵化率”(定义见下文)低于 90% 时,按原定义 T_{90} 将不存在或失去意义,而这种情形在轮虫卵中会经常发生,因此作者认为,有必要对该指标的定义略作修正。修正后的 T_{90} 应指:当某批卵在一定期限内的孵化率已知时,从一定数量的卵放入孵化环境之时起,至孵出的幼体数达到该孵化率的 90% 时所需的时间。在新定义下 T_{90} 有更广的适用范围,例如,若某批休眠卵经 10 d 的孵化观测后,发现有孵化能力的卵均已完成孵化,测得孵化率为 80%,而幼体孵出的最早时间是将卵放入孵化环境之日起的 2 d 后(即 d 3),至 d 8 时孵出的幼体数已达到或首次超过 72% (即 $90\% \times 80\%$),那么对该批卵来说, $T_0 = 2$ d, $T_{90} = 8$ d。而若按照 T_{90} 原定义,则在此情况下无法得到其值。

2 孵前期(Pre-hatching period, PHP)

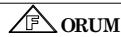
是指将某一粒轮虫卵从放入孵化环境之时起至幼体孵出之时止所经历的时间,或称潜伏期(Latent period)。它反映环境刺激对卵内滞育胚胎的“唤醒”而使之重新启动发育的过程。这一时期的长短与孵化环境有关,也因卵而异(因为每一粒卵可能在受精过程的基因重组中产生不同的基因型从而导致不同的内滞育期,完成“后熟”过程后所处的胚胎发育阶段也可能不同,故重新启动发育后到破膜阶段亦将有先有后)。据作者实验观察,休眠卵产出后若不经储存而直接促其孵化($24 \sim 28^\circ\text{C}$),一般需要较长的 PHP(13 ~ 35 d 以上不等,大概由于此时卵尚处于后熟过程,故对孵化刺激不反应);而低温($4 \sim 5^\circ\text{C}$)储存 1 a 的卵,多在 2 ~ 3 d 内即开始大量孵化。显然,PHP 直接影响着 T_0 和 T_{90} ,某批卵中最先发生孵化的那一粒卵的 PHP 亦即该批卵的 T_0 ,若该批卵中每一粒的 PHP 趋于相同,则 T_{90} 趋近于 T_0 ,此时该批卵将表现为“同步式孵化”;相反,若各粒卵的 PHP 越分散,则 T_{90} 值越

大,该批卵将表现为“分散式孵化”(定义见下文)。可见,PHP 直接制约着休眠卵的孵化进程,因而为尽可能缩短这一时期,有必要对休眠卵的休眠期(内滞育期)及其决定因素以及打破休眠期所需的最适环境条件等问题,继续深入研究。

3 孵育期(Incubation period, IP)与孵化持续期(Hatching duration, HD)

这是两个易被混淆的术语。作者认为,前者是指将一批卵放入孵化环境以促使其卵内胚胎发育从而观测其孵化情况的一定时间段,计时是从卵放入孵化环境之时起,终止时间则人为决定。后者则指置于孵化环境中的同一批卵,自开始有幼体孵出之时起直至所有可孵化的卵全部孵出幼体之时止所持续的时间。显然,孵化持续期的长短不能人为确定,而是由内外因素(如卵本身的内滞育期、孵前期以及储存、孵化条件等)的影响所决定,既可能长于也可能短于人为设定的孵育期。例如,据作者观察,有的批次的休眠卵孵化持续期只有 2 ~ 3 d,而郑严 1994 年则记录有的可长达 66 d。当孵化持续期长于所设定的孵育期时,可将此孵育期内的这一段孵化持续期称为“观测孵化持续期”(记作 HD_0),而完整的孵化持续期则可称为“最大孵化持续期”(记作 HD_{max})。鉴于 HD_{max} 过后继续延长孵育期已没有实际意义,故孵育期的长短也并非任意设定。一批卵从放入孵化环境之时起至 HD_{max} 结束之时止所经历的孵育时间,实际上可看作该批卵的“最大孵育期”(记作 IP_{max})。若所设定的孵育期在 HD_{max} 完成之前终止,则可相应地称为“观测孵育期”(记作 IP_0)。孵育期或孵化持续期若未特别指明为最大值,可默认为观测值。

以上定义的各项术语可清晰地反映轮虫卵孵化过程的不同阶段,它们之间以及它们与相应的孵化率之间的相互关系(如图 1 所示。纵坐标上各孵化率缩写的含义参见下文)可概括如下:(1)一批卵中最先发生孵化的那一粒卵的孵前期(PHP₁)即为该批卵的 T_0 , T_0 的终点即 HD 的起点;(2) T_0 和 HD 共同构成 IP,故 $IP_0 = T_0 + HD_0$, $IP_{max} = T_0 + HD_{max}$;(3)一批卵在 IP_0 内的总孵化率观测值为 THR_0 ,当第 n 粒卵孵化时所得到的累计孵化率(CHR_n)达到 THR_0 的 90% 时,该粒卵的孵前期(PHP_n)即为该批卵的 T_{90} ;(4)当 IP_0 趋于 IP_{max} 时,HD 趋于 HD_{max} ,此时总孵化率的观测值(THR_0)亦将趋于最大值(THR_{max});(5)由于在 T_{90} 时有至少



90%的可孵化卵已完成孵化,继续延长IP意义不大,故可用 T_{90} 近似指示IP;(6)HD反映的是一批卵完成孵化所需要的时间,而对任一粒卵来说PHP过后便孵出,不存在HD,此时 $IP = PHP$ 。

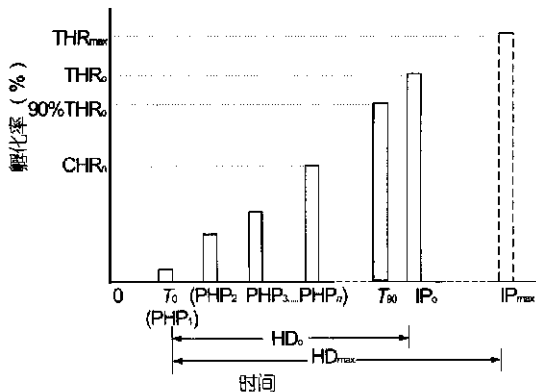


图1 轮虫休眠卵孵化过程各阶段的划分及有关术语(指标)的相互关系
(各符号所代表的术语及含义见正文)

4 分散式孵化(Sporadic hatching)与同步式孵化(Synchronous or simultaneous hatching)

据Pourrot和Snell 1983年报道,轮虫休眠卵具有“分散式孵化”和“同步式孵化”两种基本孵化类型。前者是指一批卵在孵化过程中,幼体的孵出以分散的或零星的方式间隔进行,因而 HD_{max} 较长。后者则是指一批卵在孵化过程的某一时间内,大量幼体几乎同时孵出, HD_{max} 相对较短。某批卵的孵化表现为何种类型,由多种内外因素决定。一般情况下,休眠卵产生后若不加储存或短暂储存而直接孵化,表现为分散式,这可能因各卵在内因作用下有各不相同的内滞育期和孵前期,或有不同的对环境刺激的敏感水平所致。Gilbert 1974年指出,休眠卵基因型的多样性可能是分散式孵化的主要基础,这种适应性机制可确保该物种在剧变的环境条件下得以延续生存。但休眠卵经过较长的储存期后再孵化,则往往表现为同步式,可能因各卵均已度过内滞育期,从而具有近似的对环境刺激的反应能力,同时也表明储存时间、储存条件以及孵化条件对孵化类型有很大影响。必须指出的是,两种孵化类型的划分没有明确的时间标准,只能说 HD_{max} 越短孵化同步性相对越好。作者认为,若从生产角度考虑, HD_{max} 在3~5d以内的可视为同步式孵化,其同步性随着 HD_{max} 的延长而降低,当 HD_{max} 达10d以上

时可视为分散式孵化。另外,同步式孵化的卵其 IP_{max} 不一定短,还应视PHP或 T_0 的长短而定。

5 孵化率(Hatching rate, HR)

是描述休眠卵孵化结果的最常用术语或指标,通常是指一定数量的卵中所能孵出的幼体个数,以百分比表示。但据刘卓等报道^[2],卤虫卵的孵化率是指“每克卵可孵化的无节幼体数量”。后者的定义在其他文献中则是指卤虫卵孵化的另一指标“孵化效率”^[1]。作者认为,孵化率仍以百分比表示更为确切和惯用。

然而,孵化率只是一个比较笼统的术语(指标),没有明确的时间概念,况且孵化率所反映的只是孵化的结果,而不能反映孵化过程的动态变化。鉴于此,作者认为有必要根据孵化统计时间的不同,将孵化率细分为日孵化率(时间以“d”为单位时)、累计孵化率和总孵化率。

6 日孵化率(Day hatching rate, DHR)

是指将一定数量的卵置于孵化环境之时起,每24h发生孵化的卵数所占的百分率。此指标有助于判断孵化的动态过程和孵化类型:若整个孵育期内的各个DHR值表现为比较均匀的分布而未出现显著的最高值,则认为该批卵的孵化类型为分散式;若某日的DHR值显著最高,且该日前后的DHR值呈急剧下降并趋于零之势,则认为该批卵的孵化类型为同步式,DHR最大值即为该批卵的“孵化高峰”,而DHR最大值出现的当日即称之为“孵化高峰日”。有时也会接连出现两个比较接近的孵化高峰。最近作者利用DHR作指标(并结合另一指标“总孵化率”),综合分析了1985~1998连续14个年度收存的褶皱臂尾轮虫休眠卵的孵化表现,首次显示DHR在描述不同卵样的孵化过程的动态变化时是十分有用的指标^①。

通过观察比较DHR还可在很大程度上反映出某一批卵的 T_0 和 HD_{max} 的长短以及所设定的IP是否适中。作者在进行休眠卵的孵化实验中曾发现以下两例情况,可进一步说明DHR的功能:例1,某批卵在5d的IP内,DHR值分别为(由d1至d5):0%,3.5%,10.2%,17.0%,12.3%,由此可知该批卵 $T_0=1$ d,多数卵有较长的PHP,没有明显的孵化高峰日, HD_{max} 还远未结束,故总的看来属分散式孵化,应适当延长IP。(经观察,IP延长1周后总孵化率可达到82%)。例2,另一批卵在同样的IP内的DHR值分别为(由d1至d5):11.2%,43.0%,5.1%,0%,0%,说明该批卵的孵

① 周利、相建海、郑严.不同年度收存的轮虫休眠卵的孵化及“激活”效果的研究。海洋与湖沼。(已接受)

化有较好的同步性, $T_0 = 0$ d, d_2 为孵化高峰日, 约半数的卵 PHP 不超过 2 d (有的不到 24 h), HD_{max} 仅为 3 d, 故该批卵的 IP_{max} 实际上也只是 3 d, 可重新设定 IP 为 2 d 即可。

7 累计孵化率(Cumulative hatching rate CHR)与总孵化率(Total hatching rate, THR)

前者是指某批卵在孵育期内某一日及其之前的各 DHR 值的累计之和; 后者则指某批卵在其最大孵化持续期终止时孵出的幼体总数所占的百分率, 故亦可称为“最大总孵化率”(记作 THR_{max}), 用以指示该批卵样总的孵化能力。但鉴于某些分散式孵化的卵 HD_{max} 过长, 不易实际测得, 故为了便于比较, 作者建议用 IP 结束时 (CHR) 代替该批卵的总孵化率, 相应地可称作“观测总孵化率”(记作 THR_0)。实际上后者更为常用, 通常所说的“孵化率”一般是指此观测值。

通过计算 CHR, 可以判断某批卵在孵育期内的任一日共有多大比例的卵已孵化或尚有多少未孵化, 有利于把握孵化进程。若发现某一日 CHR 值已达到或第 1 次超过 90% THR_0 , 则可将该日视为该批卵的 T_0 (见图 1)。如上述例 2 中, d_2 时 CHR (54.2%) 已近于原 IP 结束时 (d_5) 的 THR_0 值 (59.3%), 故该批卵的 T_0 为 2 d, IP 可由 5 d 缩短为 2 d。虽然 d_3 仍有部分孵化 (DHR 5.1%), 但量太少, 若为此而将 IP 延长 1 d, 在生产上将不符合成本效益比。另外, 此例中因卵的孵化类型为同步式, 且在原 IP 的最后 2 d 的 DHR 均为 0, 故可认为该批卵已完成孵化, 虽然此时所计的 THR 并不高 (仅为 59.3%, 可能由于储存期过久或其他原因, 致使另 40.7% 的卵在同样的孵化条件下未能孵化), 但仍能很好地代表该批卵的 THR_{max} 。而在例 1 中则不然, 5 d 内的 THR_0 为 43.0%, 比较每日的 DHR 值可知该批卵的孵化基本表现为分散式, 以后尚有较大的孵化潜力, 故此时的 THR_0 不能较真实地代表其 THR_{max} 。尽管后者在经过延长孵育期 1 周后可达到 82%, 大大高于例 2 中的 THR_0 , 但若从 IP 最初几日的 CHR 比较来看, 其在生产上的应用效率显然远不及例 2 中的卵。由此可见, “孵化率”(或 THR_0) 高的卵不一定比低的卵具有更高的经济效益, 还应看它们各自的 DHR 及孵化类型如何。

8 孵化速率(Hatching speed, HS)

是用来描述休眠卵孵化快慢的指标。据郑严 1994 年报道, 卤虫卵的孵化速度是以“第一个幼虫出现的时间 (T_0) 到 90% 的幼虫都孵出 (T_{90}) 的时间”来

表示的。在此基础上, 假若根据修正后的 T_0 定义而将轮虫卵的孵化速率表述为: 从第一个幼虫出现的时间 (T_0) 到所孵出的幼虫数占观测总孵化率的 90% 时 (T_{90}) 的时间间隔 (即 T_{90} 与 T_0 之差值), 那么此“时间间隔” (或差值) 实际上是 HD 的一部分, 这样孵化速率就失去了单独作为指标的意义。况且, 据此定义可推知 T_{90} 与 T_0 的间隔 (或差值) 越小孵化速率越大, 这显然忽略了 T_0 的大小对孵化速率的影响。总之, 按上述定义孵化速率所反映的只是 HD 的长短, 而非在整个 IP 内孵化的快慢, 因此有必要从另一个角度重新考虑轮虫卵孵化速率的定义。

鉴于“速率”的本义是指单位时间内完成的变化量, 故作者认为, 孵化速率应指一定数量的卵在单位时间内完成的孵化率, 具体是指 T_0 时的累计孵化率与 T_0 的比值, 单位为“% · d⁻¹”。实际上这是 T_0 之前的各个 DHR 的平均值。据此定义计算, 上述例 1、例 2 的 T_0 分别为 5 d 和 2 d, 相应的累计孵化率分别为 43.0% 和 54.2%, 故孵化速率分别为 8.4% · d⁻¹ 和 27.1% · d⁻¹, 显然后者孵化更快。不过, 由于此孵化速率只是一定孵育期内各 DHR 的平均值, 故又可称为“平均孵化速率”(记作 HS_a), 它并不直接反映孵化过程的动态或孵化类型。据新定义, 各 DHR 值实际上就是当日孵化速率, 或称作“瞬时孵化速率”(记作 HS_i), 可用来指示每日孵化的动态变化。

9 孵化(能)力(Hatch ability)

是一个常用的但比较笼统的术语, 泛指某批卵总的孵化可能性或活力, 其大小可用 THR_{max} 来指示。一般所说的孵化(能)力的高低, 并无明确的时间概念, 若用 THR_0 来指示, 则应明确指出是在一定 IP 内的孵化(能)力。即使某卵样在一定 IP 内的总孵化率可能为零, 也不能因此而断定该批卵没有孵化(能)力, 或许只是需要更久的孵育时间, 或许需要其他孵化条件。

此外, 还有两个有关孵化的术语(指标)见于卤虫卵质量的评判, 即“孵化效率”和“孵化(产)量”^[1]。因二者均需称重, 不适用于评估粒度极小的轮虫卵的孵化情况, 故在此不再赘述。上述各术语(指标)从不同层面描述或反映了轮虫卵的孵化表现, 经结合运用可比较真实地获得休眠卵的总体孵化特性。但必须指出的是, 由于环境条件对休眠卵的孵化影响很大, 故在测定和比较上述各指标时应尽可能保持孵化条件的一致。虽然不同的休眠卵所要求的最适孵化条件可能有所差异, 但多数情况下不会相差太大。一般说来, 休眠卵孵化的最适条件也就是轮虫生长繁殖的最适条



件。因此,作者根据长期的实验观察并结合前人的研究报告,认为以下条件或可作为通用的孵化条件:孵化介质为消毒自然海水,盐度以蒸馏水调节至 15 ~ 20,控温在 25 ℃左右,光照强度 2 000 ~ 3 000 lx (40 ~ 60 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (日光灯),光周期 L: D= 24 h: 0 h,饵料密度 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 细胞 $\cdot \text{mL}^{-1}$ (拟微绿球藻 *Nannochloropsis oculata* 或小球藻 *Chlorella* spp.)。

进一步明确轮虫卵孵化的各有关术语或指标的定义和作用,不仅在学术上有利于休眠卵孵化过程的动态变化及孵化结果的定量分析,增加各研究者的相关工作的可比性,也可为休眠卵在实际应用中的孵化质量的评价提供统一的依据。近年来,随着轮虫休眠卵大量生产技术的进步^{①[4~6]},国内外市场已有一定批量的休眠卵产品出售。但由于种种原因(包括轮虫品系的差别,休眠卵的生产、加工、储存等方面的技术条件不同,储存期长短不一等),来源于不同产地的或同一产地不同批次的休眠卵,质量往往参差不齐,除杂质含量外,主要表现在孵化效果上。因此,有必要建

立一套标准的评估休眠卵质量的指标体系,望本文的有关讨论能对此有所助益。同时,亦望本文能为淡水轮虫休眠卵的研究和应用提供参考。

主要参考文献

- 1 陈明耀. 生物饵料培养. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- 2 刘卓, 王为祥编译. 饵料浮游动物培养. 北京: 农业出版社, 1990. 75
- 3 Balompaueng M. D., N. Minuswamy *et al.*. *Aquaculture Research*, 1997, 28: 559 ~ 565
- 4 Balompaueng M. D., A. Hagiwara *et al.*. *Fisheries Science*, 1997, 63: 236 ~ 241
- 5 Dhert Ph., K. Schoeters *et al.*. *Aquaculture International* *et al.*. 1997, 5: 105 ~ 112
- 6 Hagiwara A., M. D. Balompaueng, N. Minuswamy. *Aquaculture*, 1997, 155: 223 ~ 230

① 郑严, 周利. 轮虫的培养和应用, 《简明中国水产养殖百科全书》. 北京: 中国农业出版社, 921 ~ 934 (出版中)