

褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis*) 复合种休眠卵孵化的调控因子及其作用机制的研究^{*}

周 利 相建海
(中国科学院海洋研究所)

褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis* O. F. Müller, 以下简称 Bp) 和圆形臂尾轮虫 (*B. rotundiformis* Tschugunoff, 简称 Br) (Segers, 1995) 是轮虫门 (Rotifera) 单卵巢纲 (Monogononta) 的两个海水种或半咸水种, 过去曾分别被认为是褶皱臂尾轮虫的 L 型和 S 型品系, 现统称为褶皱臂尾轮虫复合种 (*B. plicatilis* complex) (Yufere, 2001)。由于该种分布广, 在世界范围内被广泛用作多种海水鱼的种苗培育的重要开口饵料, 因而成为单卵巢纲中最具经济意义和极受各国研究者关注的种类。作为单卵巢纲轮虫的共同特征, Bp 和 Br 轮虫进行无性生殖 (或孤雌生殖) 兼有性生殖, 两种生殖世代交替发生而完成其生活周期, 休眠卵即是有性生殖的最终产物——卵膜加厚的受精卵 (King et al., 1977a, b; Snell, 1987)。在实际生产中, 休眠卵是轮虫储存、运输和孵化应用的最理想形式; 而在生物学意义上, 它不仅是轮虫用以抵抗或度过不良环境期, 并向新的生存空间散布或拓展的特殊生活阶段, 而且可通过一定时间的休眠和一定条件下的孵化, 决定着下一生活周期的起始, 从而控制着轮虫生活周期的节奏。尤其是休眠卵经孵化而启动新一轮无性生殖世代, 一方面承传和实现了前一世代的遗传特性和基因重组结果, 另一方面也为轮虫的生殖表现和遗传特性得以在新环境下产生新的适应性变化提供了条件。鉴于上述重要的实际和理论意义, 多年来对休眠卵的休眠与孵化的研究深受各国学者的重视。Gilbert (1974)、Pourriot 等 (1983) 已就国际上的有关研究进行了详细综述, 最近席贻龙等 (1999) 结合国内的有关报道对该领域的进展亦作了进一步概括。这些论述均泛指单卵巢纲诸多种类的休眠与孵化问题, 且多数结果来自淡水轮虫的研究。本文的讨论将主要针对海水或半咸水的褶皱臂尾轮虫复合种, 就有关调控或影响其休眠卵孵化的各种内、外因子及其作用机理的研究概况作一综述。

一、内源性调控因子

休眠卵的孵化首先取决于某些内源性因子的调控。已报道的有关因子主要包括休眠期、基因型以及母代的培养历史, 这些因子有的是在卵刚刚受精的一瞬间即已确定 (如

^{*} 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4559 号。

基因型), 有的确定于休眠卵形成过程中(如母代当时的营养、生理状况), 有的则在休眠卵产出一段时间后才确定(如休眠期)。

1 休眠期

休眠卵均具有一定的休眠期, 只有度过休眠期的休眠卵才可能孵化, 因而休眠期是决定卵的最早孵化时间的主要内因。已知, 轮虫在无性生殖阶段所产的非需精卵(amictic eggs), 在适宜条件下可很快孵化, 致使种群快速增长; 而在有性生殖阶段, 受精的需精卵(mictic eggs)自母体产出后则尚需完成一个“后熟”(post-mature)过程, 即使在最适宜的环境下也要过一段时间才能孵化, 故称“休眠”, 又称“滞育”(diapause)(王家楫, 1961; Gilbert, 1974; Pourriot et al., 1983)。早在 19 世纪末即发现单卵巢纲轮虫的休眠卵并非单细胞卵, 而是一个由 3 层卵膜包被的滞育胚胎(Gilbert, 1974)。利用扫描电镜的最新观察表明, Bp 和 Br 轮虫的休眠卵也具有类似的结构, 尽管二者之间有所差异(Munuswamy et al., 1996)。据 Hagiwara 等(1995)报道, “后熟”过程表现为刚产出的休眠卵(Bp)的卵内胚胎仍处在缓慢发育中(并非真正地“休眠”), 此过程包括胚外间隙(或称“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), 此间卵对任何外部环境刺激均不反应(故轮虫可借此状态度过不良环境期); 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, 但若仍处在孵化抑制条件下(如黑暗、低温、干燥), 胚胎发育则会自动暂停于某一阶段而一直保持下去。可见, 通常所说的“休眠期”实际上包括内、外滞育期两个阶段, 内滞育期应视为休眠卵的自然休眠期(natural dormant period), 亦即休眠期的最低限, 外滞育期由于是卵在不利于孵化的外部环境强制下的休眠, 故可相应称之为强制休眠期(constrained dormant period)。长期储存的休眠卵绝大部分时间是处于强制休眠期(相当于储存期)。鉴于休眠卵的孵化就是在适宜环境因子的刺激下, 卵内胚胎终止休眠而重新启动发育直至幼体破膜而出的过程, 因而休眠卵从产出到孵化最快不能早于其自然休眠期, 但在环境条件许可的情况下孵化可发生在强制休眠期内的任何时间。

本文认为, 休眠期对休眠卵孵化的影响或调控作用可暂分为两种情况: (1)自然休眠期决定着可能孵化的最早时间, 因而是影响或调控孵化的真正内源性因素; (2)强制休眠期等同于储存期, 应属外源性因素, 主要影响卵的孵化率、孵化类型等。然而, 各个休眠卵的自然休眠期的长短并非一致或恒定的, 它同时也受基因型、培养历史、储存时间及储存方法等因素的制约。

2 基因型

休眠卵的孵化受遗传因素或基因型的强烈影响。首先表现在卵的最短休眠期或自然休眠期因轮虫种或品系的不同而异, 例如在 18℃下, Bp 轮虫的 GS74 品系和 S80 品系的自然休眠期分别为 28 d 和 29 d(Pourriot et al., 1983), 而大连品系在近似温度下(18~20℃)则至少为 12 d(金送笛等, 1996), 某些淡水种类的自然休眠期甚至仅有 8~11 h 或者长达 90 d(席贻龙等, 1999)。其次, 休眠卵的孵化方式也受遗传因素的影响。休眠卵的孵化通常具有分散式和同步式两种。从轮虫自然种群中采集的休眠卵一般呈分散式孵化。基因型的多样性是导致此现象的主要原因, 可以认为这是轮虫的一种适应性机制。

它确保该物种在生存环境难以预测的情况下得以成功延续(Gilbert, 1974)。即使是同步孵化的休眠卵, 由于基因型和培养历史的不同, 在孵化率及孵化后的种群增长率和混殖水平上也会存在很大的差异(周利等, 2002; Pourriot et al., 1983)。同种轮虫的休眠卵其孵化率也将因种内发生的遗传变异而不同。据报道, Bp 或 Br 轮虫在实验室条件下培养会发生遗传变异(Hagiwara et al., 1990), 表现为实验室内培养多年的轮虫品系所产的休眠卵孵化率一般较低(40%~50%)(Hagiwara et al., 1989; Minkoff et al., 1983), 而从野外采集的相同轮虫品系所产的休眠卵孵化率则较高(90%以上)(Hagiwara et al., 1985a, b)。不过, 对此差异本文作者认为, 前者是因轮虫在实验室条件下经多年培养而出现种群世代退变之故, 后者则可能与卵的野外采集时间(季节)、储存及孵化条件等亦有关。

3. 培养历史

Bp 和 Br 轮虫休眠卵的母代的培养历史, 或母体在形成休眠卵时所处的培养条件(如盐度、温度、饵料种类等), 也与日后的孵化密切相关。例如 1960 年 Ito 研究表明, Bp 轮虫休眠卵形成时的培养介质的盐度影响其孵化所需的最适盐度: 盐度低于 5‰Cl(约相当于盐度 9)时产生的休眠卵在 10‰~18‰Cl(18~32.4)盐度范围内很少孵化; 而在 7‰~15‰Cl(12.6~27)盐度范围内产生的休眠卵, 则可在 10‰~18‰Cl 甚至更高的盐度下大量孵化(Gilbert, 1974)。休眠卵形成时的盐度对孵化后种群的混殖水平也有显著影响, 据 Hino 等(1988)报道, 在 4‰Cl 的低盐度下形成的休眠卵, 其孵化后的种群混殖率随培养介质的盐度升高而显著降低; 相反, 在 16‰Cl 的较高盐度下形成的休眠卵, 其孵化种群的混殖率则与介质的盐度没有关系。他们还发现, 温度的影响也有大体相同的趋势。在 25℃以上高水温条件下形成的休眠卵, 孵化后所得到的种群, 其混交雌体的出现率不受水温的影响; 而在 25℃以下低水温形成的休眠卵, 孵化后种群混交雌体的出现率, 在水温不超过 25℃时与温度呈负相关关系, 在 25℃以上则失去相关性(Hino et al., 1985)。由此可见, 休眠卵形成时的环境条件可成为某种内部因子的起源, 后者可使孵化产生的各品系或种群呈现很不相同的混殖水平; 或者说, 一个品系或种群的后代所发生的混殖率变化反映了母代的培养历史(Hagiwara et al., 1989)。但母代所处的环境条件如何影响休眠卵内部因子的生理机制尚不清楚。

关于母代饵料的影响, Hagiwara 等(1990)探讨了 Bp 和 Br 轮虫的休眠卵孵化与其母代摄食史的关系, 发现与自然种群产生的休眠卵相比, 以衣藻(*Chlamydomonas* sp.)为饵时所产的卵孵化率明显下降, 而以扁藻(*Tetraselmis tetrathele*)为饵时的休眠卵孵化率则显著升高。因此认为, 孵化率随母代的饵料不同而不同, 可能是因饵料的营养质量不同所致。他们同时还发现, 母代摄食的饵料种类会通过影响休眠卵的孵化率而影响后代的无性繁殖, 孵化率与新孵出的雌体的生育力指数(viability index, 即生育期内每日产生的后代个数)之间有正相关性。Pourriot 等(1983)报道, 母代的饵料也影响休眠卵的孵化对光刺激的反应。例如, Bp 轮虫(RUS 品系)以小球藻为饵所产的休眠卵, 在 8℃下储存 3 个月后分别置有光和无光条件下(25℃)孵化, 未发现孵化率的差别; 而小球藻与裂须藻(*Schizothrix* sp.)混合做饵所产的休眠卵, 经同样操作后发现, 明处的孵化率明显高于暗处。总之, 由于休眠卵形成时比非需精卵需要更多的能量和营养(Pourriot et al., 1983), 故休眠卵的生理生化可能特别容易受母代营养及生理的影响, 继而影响其孵化结果乃至

孵化后的生殖表现。

二、外源性调控因子

休眠卵的上述内源性因子决定着其孵化各方面的潜在(或固有)的能力及水平,但后者同时也受到诸多外源性因子的强烈影响或调控,这些因子包括休眠卵产出后至孵化前所处的环境条件(储存环境)、所经历的时间(储存期)、储存方法以及孵化时的环境条件和卵的消毒或人为处理等。

1. 储存环境与储存方法

休眠卵的储存环境应是其孵化的抑制环境(如低温、黑暗和干燥)。研究表明,温度可通过影响休眠卵自然休眠期的长短而调控其最早孵化时间及孵化方式,但对此调控效应的研究各学者的结果尚不一致。Lubzens(1981)研究显示,低温储存的休眠卵比室温储存具有更短的自然休眠期,例如新产生的休眠卵(Bp, Dor 品系),在 25% 的海水介质中经 4℃ 低温储存 7 d 即可在室温及光照下很快孵化,而室温储存的同批卵置同样条件下 3 个月也未见孵化。Hagiwara 等(1989)的研究则表明,低温储存可导致休眠卵的滞育期(自然休眠期)延长:新产生的休眠卵(Bp, 东京大学品系 8401A 克隆)经 25℃ 室温黑暗储存 15 d 后,转入光照条件下 2~3 d 即可孵化,且为同步式;而同批卵在 5℃ 低温下黑暗储存 1 个月后置同样条件下孵化,则仍表现为分散式,继续延长储存期至 6 个月,孵化才呈同步式;但储存于 5℃ 的休眠卵比储存于 25℃ 的孵化率更高。据作者实验观察(实验结果未发表),将室内培养的 Bp 轮虫(青岛品系)初产的休眠卵置 -10℃ 下冷冻保存 3 周后转至室温及光照环境,可在 4~5 d 内大量孵化(同步式),而同批卵若不经储存直接置于室温及光照下,3 周内未见孵化(孵化介质与培养介质相同),说明冷冻或低温处理可加快休眠卵孵化(即缩短自然休眠期),这与 Lubzens(1981)的观点相类似。本文认为,上述有关研究结果的不一致可能与各研究者所用的轮虫品系及培养条件不同有关,同时也反映了温度对自然休眠期的影响并不是单向的或决定性的,而可能因基因型及母代培养历史(生理状况)而异。Gilbert(1974)曾指出,(自然)休眠期长短主要取决于母体在形成休眠卵时的生理状况,而非环境因子对卵内胚胎的直接影响。但值得注意的是,从上述各研究可以看出,低温处理对休眠卵孵化方式的影响效应虽有争议,却又一致证实:低温处理后的休眠卵有更高孵化率,其有关的作用机制有待进一步研究。

休眠卵储存于暗处还是光下,是影响休眠卵孵化的另一环境要素,光对休眠卵的孵化有诱导效应。休眠卵经过一段黑暗、低温等极端环境的储存,不仅影响其孵化的时间、方式及孵化率,也影响到其孵化后代的生殖表现及种群增长率。据报道,休眠卵产出后若在黑暗及低温下储存一段时间,孵化后的克隆种群混殖率很低,非混交雌体数量增长较快;若不经储存直接在光下孵化,所得的克隆种群混殖率则较高,且较少产生非混交雌体(Hagiwara et al., 1989)。

当休眠卵储存于水环境时(即“水存法”),储存介质本身作为储存环境的主要构成者之一,也对休眠卵的孵化有一定影响。Hagiwara 等(1997)指出,以海水介质储存(5℃, 黑暗)的褶皱臂尾轮虫复合种休眠卵,孵化率会随着介质中有机物含量的升高而降低。

Balompapueng 等(1997c)认为,这种条件下的孵化率降低是由于介质中存在的大量细菌侵染多孔的卵表面造成的。正常的休眠卵(Bp)外层卵膜上分布有许多直径为 $0.11 \sim 0.12 \mu\text{m}$ 的气孔,其功能可能是卵内胚胎与外部环境的物质交换通道;而在“水存”过程中已丧失孵化力的休眠卵表面,则可观察到附有大量杆状细菌,若用一定剂量的次氯酸钠(NaClO)或抗生素 sodium nifurstyrenate(NFS-Na)溶液将细菌清洗消除,卵可恢复孵化力。可见附着菌会阻塞气孔,使得卵内胚胎无法从介质中获得孵化所需的足够水平的化学刺激,如溶解氧、活性氧(Hagiwara et al., 1995)等,从而导致孵化率的降低。此外,储存于海水介质的休眠卵处于厌氧环境时,细菌作用还会产生 H_2S 之类的对卵内胚胎有害的气体(Balompapueng et al., 1997c)。不同储存介质对休眠卵孵化率的影响,最近在杨家新等(2000)就萼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus*)所作的相关研究中也得到进一步证实。不过该报道发现,休眠卵用其形成时的培养液(即“原液”)作储存介质比用新配制的无机液更有利于孵化力的保持。鉴于“原液”一般具有较高的有机物含量和细菌数量,故该结果与上述的 Hagiwara 等(1997)和 Balompapueng 等(1997c)的观点有所不符,其原因尚需进一步研究。

除“水存法”外,根据储存环境的湿度不同,还可将休眠卵以潮湿或干燥状态储存于低温下(刘卓等,1990;郑严等,1994^①),分别称“湿存法”和“干存法”。从孵化率的比较来看,这三种储存方法效果不一:水存法最好,湿存次之,干存较差(郑严等,2001)。王埭等(1980)观察了以“干存法”保存1年半的休眠卵(Bp)在不同条件下的孵化情况,结果最高孵化率不到20%。Lubzens 等(1980)的研究显示,在实验室内新产的休眠卵(Bp),若置室温下干存,其孵化力只能在3周内不发生明显下降;若置蒸馏水中冷冻(-14°C)储存,可在12周内保持孵化力不变。近来 Dhert 等(1997)则发现,休眠卵(Bp)在 4°C 下密封干存1a,孵化效率(计为1g干卵在40h内孵化出的轮虫数)下降50%,但在后续的2a储存期中则保持稳定。Balompapueng 等(1997b)尝试了更先进的干存技术,取得良好效果:将休眠卵(Bp)置 -40°C 下冷冻干燥后低压($21 \sim 75\text{kPa}$)罐存(canning),在 5°C 下保存6个月以上孵化力没有明显下降。干燥处理后的卵内胚胎含水量,是影响休眠卵孵化力的主要因子。不过冷冻干燥和罐存过程并不能消除细菌侵染。

总之,为避免细菌污染以利孵化力的保持,无论用何种储存法均有必要预先对卵进行消毒处理。但比较来看,“湿存法”或许将成为未来休眠卵保存的理想方法,它不仅可避免“干存法”在干燥和储存过程中因卵内胚胎失水过度所可能导致的孵化力下降或丧失,而且可大大减轻“水存法”中储存介质的有机废物和细菌的危害,同时也将多余水分在储存、运输中所占的空间和重量降至最低。为进一步提高孵化技术,今后尚需就休眠卵的储存方法尤其是“湿存”技术进行深入研究。

2 储存时间

在孵化抑制条件下,休眠卵能够耐受或度过相当长的强制休眠期。例如,以水存法低温(5°C 以下)、黑暗保存1a的休眠卵(Bp,青岛品系),经6~7d的孵育仍可达到90%

① 郑严主编,1994,海洋生物饵料培养原理与应用(海水鱼类种苗培育与养殖技术专题之二)。中国老教授协会海洋经济技术分会编,29~51(内部资料)

以上的孵化率(孵育条件: 盐度 32 的自然海水, 9 ~ 18℃室温)(郑严等, 1979); 本文作者最近的研究表明, 该青岛品系的轮虫休眠卵在 4℃下黑暗“水存”14 a 之久仍有一定的孵化力(Zhou et al., 2001)。有的淡水轮虫休眠卵存于水底沉淀物中达 35 a 仍可孵化(Gilbert, 1974)。不过, 对已度过自然休眠期而仍处于孵化抑制条件下的一批休眠卵而言, 由于卵内胚胎生命力随时间而自然衰减, 其孵化率将随储存期(强制休眠期)的延长而趋于降低。陈菊芳等(1998)研究发现, 萼花臂尾轮虫的初产休眠卵在低温(5℃)下储存, 50 d 之内其孵化率反而随储存期的延长而升高。本文认为, 此现象可解释为休眠卵在此期间尚未度过自然休眠期, 且它们是陆续地而非同步地完成“后熟”过程, 但当所有或大部分卵完成此过程后, 孵化率将在一定时间内相对稳定于某一水平。陈菊芳等(1998)的进一步观察也证实, 当储存期继续延长至 6 个月时, 孵化率已没有明显增加。

储存期(连同自然休眠期)的长短不仅可制约休眠卵孵化发生的时间及孵化率, 还影响其孵化方式。休眠卵产生后若不加储存或短暂储存而直接孵化, 一般表现为分散式, 但经相对较长的储存期后再孵化, 则往往表现为同步式。例如, 新产的 Bp 轮虫休眠卵在 5℃下保存 1 个月, 孵化为分散式, 保存 6 个月后孵化则为同步式(Hagiwara et al., 1989); 4℃下以“水存法”黑暗储存 1 ~ 14 a 的 Bp 轮虫休眠卵, 均表现为同步式孵化(周利等, 2002)。

3. 孵化环境

大量研究表明, Bp 或 Br 轮虫休眠卵的形成受温度、盐度、饵料等外部环境因子的影响, 但休眠卵的孵化亦在极大程度上受制于外部环境。据郑严等(1979)报道, 水温 20 ~ 25℃、盐度 20 为休眠卵(Bp)的适宜孵化环境。王堉等(1980)也获得类似结果: 最适宜的孵化水温和盐度分别为 20 ~ 25℃、15 ~ 20℃; 同时还发现, 除孵化率外, 休眠卵的孵化速率和孵化持续期(周利等, 2001)主要受温度变化的影响, 而与盐度关系不大。不过由以上研究结果也可看出, 休眠卵孵化的适宜环境实际上亦是轮虫生长繁殖的适宜环境。

Minkoff 等(1983)和 Hagiwara 等(1985a)先后探讨了上述各环境因子(包括光照)对实验室和室外池培养的 Bp 轮虫休眠卵的孵化影响, 发现各自的研究对象有各自的最适孵化温度、盐度范围, 超出此范围则孵化率下降。Hagiwara 等(1985a)的结果显示, 休眠卵可在 10 ~ 30℃的温度范围内孵化, 但以 25℃下孵化率为最高。Minkoff 等(1983)的结果则表明, 最适孵化温度为 10 ~ 15℃, 且在 10 ~ 30℃温度范围内孵化率与孵化温度呈负相关性, 他们认为这种负相关性可能是由孵化介质中的溶解氧水平随温度升高而降低所致。一定水平的溶解氧对休眠卵孵化的必要性, 在淡水轮虫中也得到证实(李永函等, 1985)。此外 Minkoff 等(1983)的结果还显示, 在孵化介质中加入适量的微藻作饵料, 有助于孵化率的提高。因卵内胚胎在发育至可冲破卵膜的幼体时, 自身的能量资源已消耗殆尽, 有些幼体会在破膜而出的中途被外层卵膜卡住而“无力”挣脱, 直至死亡, 但此时若能从外界及时获得食物作为能量补充, 则有助于这部分幼体的成功孵出; 而且, 加入活体微藻还可帮助去除水中的可溶性废物(如 CO₂), 增加溶解氧, 对孵化有促进效应。Hagiwara 等(1985a)的研究还揭示了环境转换对孵化的影响: 在某个孵化环境中不能孵化的休眠卵, 转换到另一环境后可能促进其孵化, 尤其是从高盐向低盐转移对刺激孵化最有效, 不过以相反方向或者在相同盐度间转移也有一定的促进效应。因此, 对休眠卵的“唤

醒”(rousing)除受盐度变化影响外,还可能与物理胁迫(physical stress)如转移休眠卵时的手工操作有关。环境转换对孵化的促进效应,也反映了孵化介质的影响。淡水轮虫的相关研究已表明,在同样条件下保存的休眠卵用不同的介质孵化,结果差异较大(杨家新等,2000)。这说明,各休眠卵具有不同的内因背景,故所要求的最适孵化条件(包括孵化介质)亦有所不同,孵化环境或介质的转换为卵获得各自的适宜孵化条件提供了机会。

关于光照对 Bp 或 Br 轮虫休眠卵孵化的影响,有研究表明,光照是必要的孵化刺激(Minkoff et al., 1983)。虽然 Hagiwara 等(1985a)的研究发现,无论在明处或暗处,甚至无论盐度如何(在 2‰~16‰Cl, 即盐度 3.6~28.4 范围内),采自室外培养池的休眠卵(预先低温、黑暗水存 2 个月,盐度 12‰Cl)在 25℃下均有最高孵化率,但连续光照下还是比全黑暗下的孵化率更高。这也说明,光照对孵化的促进效应易受其他环境因子(如温度和盐度)的制约。Hagiwara 等(1989)进一步研究发现,将实验室培养的 Bp 轮虫新形成的休眠卵直接置光下孵化(25℃),孵化呈分散式(历时 1 个月);若将其置于黑暗中 6 个月,则一直不孵化(无论温度怎样);但若将后者重新置于光下,则呈同步式孵化。此结果进一步证实了光对孵化的重要影响。

最近 Hagiwara 等(1995)深入探讨了光对 Bp 轮虫休眠卵孵化的诱导效应,结果表明,光照能否引起孵化取决于光强和照射时间,可引起孵化的光强阈值大约为 4400 lux(卤素灯),照射 30 min。孵化率因照射波长不同而有极大差异,在波长 250~350 nm 范围内(水银灯)孵化率随波长的增大而提高,在 350~400 nm 时有最高孵化率。280~320 nm 为紫外线 B(UVB)的波长范围,而 UVB 一般对生物有害,或许这是卵在 350 nm 以下波长照射时孵化率较低的原因。鉴于 UV 的高能量照射可使水中有机物发生紫外光解(UV photolysis),产生氢氧基($\cdot\text{OH}$)形式的活性氧(Mopper et al., 1990),而休眠卵中的高度不饱和脂肪酸经氧化可产生前列腺素,故而 Hagiwara 等(1995)同时考察了在介质中分别加入活性氧(以过氧化氢代之)和前列腺素对孵化的影响,结果发现二者均可在暗处诱导休眠卵孵化。因此他们认为,光照对休眠卵孵化的诱导机制在于,紫外光解产生的活性氧氧化了卵内胚胎中的不饱和脂肪酸,所产生的前列腺素诱导了卵的孵化。前列腺素的主要生理作用是使生殖和循环系统的平滑肌收缩或舒张。已发现前列腺素可刺激藤壶卵内的胚胎生成肌肉组织(Hagiwara et al., 1995)。尽管轮虫休眠卵一般分布于缺乏短波长光照的水底沉渣中,而有机物的光解作用发生在水体表面,但所产生的氢氧基及其反应产物可能足以存留到浅水底部(Mopper et al., 1990)。这种光化学反应或许在自然界的休眠卵孵化过程中起主要作用。

4 休眠卵的处理

研究表明,休眠卵在储存和孵化前若经过一定的物理或化学处理,有助于孵化力的保持和提高。例如, Lubzens 等(1980)发现,室温“干存”(25 周)的休眠卵,在孵化前预先以低能量的超声波处理,可大大提高孵化率。Balompapueng 等(1997c)报道,储存期间的细菌侵染虽会降低休眠卵的孵化力,但孵化前的消毒处理显著可增加孵化力。实验显示,新采收的卵及经过储存的卵(5℃,盐度 28,暗存 5 a)在 5 d 内的孵化率分别为 26±5.8%和 0%(孵化条件:25±1℃,2000 lux 白荧光灯,盐度 4.5),若用 NaClO(1 mg/L)浸泡 1 h,孵化率可分别提高到 48±1.3%和 28±1.8%;若用抗生素 NFS-Na(5 mg/L)处理 1 h,则分别提高到 20±1.1%和 40±1.2%。Balompapueng 等(1997b)还发现,将冷冻干

燥后低温罐存 12 个月的卵, 在孵化前若经 NaClO 或 NFS-Na 消毒清洗可显著提高孵化率。值得注意的是, Balompapung 等(1997c)的上述结果同时还显示, 化学处理也可增加新采收的、一般认为是未被细菌侵染的休眠卵的孵化率。尚不清楚其实验中所用的药物及其浓度是否会增强孵化力, 但具氧化性的 NaClO 是最常用的卤虫卵去壳剂(Spotte et al., 1988), 所以它对轮虫休眠卵的促孵化效应, 可能也是源于其氧化作用(Hagiwara et al., 1995)。另据 Dhert 等(1997)报道, 休眠卵经 NaClO 消毒处理(60 mg/L, 1 h 或 40mg/L, 6h)后不影响孵化效率, 却能显著提高孵化出的轮虫的种群增长率。

因此, 作者认为, 为避免细菌侵染对孵化力的影响, 休眠卵应在形成后不久即进行适当的处理。这种处理不仅包括储存前的消毒、干燥(若干存)过程, 还应包括卵的分离与纯化, 尤其对水存法而言, 因为储存介质中有机杂质含量越高, 越不利于孵化力的保持。

三、结 语

休眠与孵化是轮虫休眠卵的两个密切相关且对立统一的生命现象和过程, 在多种内外因子的作用下, 共同构成调控轮虫生活周期的关键阶段之一。有关褶皱臂尾轮虫复合种的休眠卵孵化的影响因子及调控机理的研究, 虽已取得某些重要进展, 但迄今尚未完全清楚。近年来, 随着轮虫休眠卵的大量生产及加工储存技术的发展(郑严等, 1991^①; Balompapung et al., 1997a, b, c; Dhert et al., 1997; Hagiwara et al., 1993; Hagiwara et al., 1993, 1997; Lubzens, 1989), 尤有必要继续加强该领域的相关研究, 以搞清轮虫如何将自身与环境的相互作用反映于受精卵的形成、休眠及孵化各阶段的遗传与生理生化变化上, 从而调控或最终确定休眠与孵化的起始、终止时间以及相应的孵化表现。这不仅将在理论上进一步丰富和发展轮虫及其他具有类似生活周期的浮游动物(如枝脚类 Cladocera)的基础生物学内容, 亦将有助于实现对休眠卵的自然休眠期、孵化时间、孵化方式、孵化率以及孵化后的生殖表现的可预测性或人为可控性, 从而更进一步促进休眠卵在实际生产中的广泛应用。

参 考 文 献

- 王家楫, 1961, 中国淡水轮虫志, 科学出版社, 17~19。
王堉、梁亚全, 1980, 褶皱臂尾轮虫繁殖和培养的研究, 海洋水产研究, 1: 27~48。
刘卓、王为详编译, 1990, 饵料浮游动物培养, 农业出版社, 1~55。
李永函、丁建华、许方学, 1985, 养鱼池轮虫休眠卵分布和萌发的研究, 水生生物学报, 9(1): 20~31。
杨家新, 黄祥飞, 2000, 环境因子对萼花臂尾轮虫休眠卵萌发率的影响, 水生生物学报, 24(4): 331~339。
陈菊芳、周洁、黄祥飞, 1998, 萼花臂尾轮虫休眠卵萌发的研究, 应用生态学报, 9(1): 67~70。
郑严、田凤琴、宋立清, 1979, 褶皱臂尾轮虫 *Brachionus plicatilis* Müller 的繁殖和培养, 海洋科学, 1: 26, 37~38。
郑严、周利, 2001, 轮虫的培养和应用, 见: 陆忠康主编, 《简明中国水产养殖百科全书》, 中国农业出版社, 921~934。
周利、相建海、郑严, 2002, 不同年度收存的褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)休眠卵的孵化及胚胎“激活”效果的研究, 海洋与湖沼, 33(6): 648~656。

① 郑严、李茂堂、田凤琴、宋光泽、周利、王莉萍, 1991, 轮虫休眠卵的形成、采收、储存和应用的研究(1985~1990)。中国科学院海洋研究所科学技术档案, 卷 25-1 号(成果资料, 未发表)。

- 周利、相建海, 2001, 关于轮虫休眠卵孵化的若干术语的探讨, *海洋科学*, 25(7): 47~51.
- 金送笛、李永函、孙玉芳, 1996, 几种轮虫需精卵休眠时间的初步研究, *中国水产科学*, 3(4): 66~72.
- 席貽龙、黄祥飞, 1999, 轮虫休眠卵形成和萌发的生态机理的研究进展, *水生生物学报*, 23(1): 73~82.
- Balompapueng, M. D., Hagiwara, A., Nishi, A. et al., 1997a, Resting egg formation of the rotifer *Brachionus plicatilis* using a semi-continuous culture method, *Fisheries Science*, 63: 236~241.
- Balompapueng, M. D., Hagiwara, A., Nozaki, Y. et al., 1997b, Preservation of resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller by canning, *Hydrobiologia*, 358: 163~166.
- Balompapueng, M. D., Munuswamy, N., Hagiwara, A. et al., 1997c, Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs *Brachionus plicatilis* Müller, *Aquaculture Research*, 28: 559~565.
- Dhert, Ph., Schoeters K., Vermeulen, P. et al., 1997, Production, disinfection and evaluation for aquaculture applications of rotifer resting eggs from Bohao Bay, P. R. China, *Aquaculture International*, 5: 105~112.
- Gilbert, J. J., 1974, Dormancy of rotifers, *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 93: 490~513.
- Hagiwara, A., Hino, A., Hirano, R., 1985a, Combined effects of environmental conditions on the hatching of fertilized eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis* collected from an outdoor pond, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51(5): 755~758.
- Hagiwara, A., Hino, A., Hirano, R., 1985b, Appearance of floating eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis*, *Suisan Zoshoku*, 32(4): 207~212 (In Japanese with English abstract).
- Hagiwara, A., Lee, C.-S., Miyamoto, G. et al., 1989, Resting egg formation and hatching of the S-type rotifer *Brachionus plicatilis* at varying salinities, *Marine Biology*, 103: 327~332.
- Hagiwara, A., Hino, A., 1989, Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixing in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*, *Hydrobiologia*, 186/187: 415~421.
- Hagiwara, A., Hino, A., 1990, Feeding history and hatching of resting eggs in the marine rotifer *Brachionus plicatilis*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1901~1907.
- Hagiwara, A., Hirayama, K., 1993, Preservation of rotifers and its application in the finfish hatchery, In: *Finfish Hatchery in Asia: Proceedings of Finfish Hatchery in Asia' 91. TML conference proceedings 3* (Lee, C. S., Su M. S. and Liao I. C. eds.), 61~71, Tungkuang Marine Laboratory, Taiwan Fisheries Research Institute, Tungkuang, Pingtung, Taiwan.
- Hagiwara, A., Hamada, K., Nishi, A. et al., 1993, Mass production of rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs in 50m³ tanks, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59(1): 93~98.
- Hagiwara, A., Hoshi, N., Kawahara, F. et al., 1995, Resting eggs of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* Müller: development and effect of irradiation on hatching, *Hydrobiologia*, 313/314: 223~229.
- Hagiwara, A., Balompapueng, M. D., Munuswamy, N. et al., 1997, Mass production and preservation of marine rotifer resting eggs, *Aquaculture*, 155: 223~230.
- Hino, A., Hirano, R., 1985, Relationship between the temperature given at the time of fertilized egg formation and bisexual reproduction pattern in the deriving strain of the rotifer *Brachionus plicatilis*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 45(1): 511~514.
- Hino, A., Hirano, R., 1988, Relationship between water chlorinity and bisexual reproduction rate in the rotifer *Brachionus plicatilis*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 1329~1332.
- King, C. E., Snell, T. W., 1977a, Sexual recombination in rotifers, *Heredity*, 39(3): 357~360.
- King, C. E., Snell, T. W., 1977b, Genetic basis of amphoteric reproduction in rotifers, *Heredity*, 39(3): 361~364.
- Lubzens, E., Fishler, R., Bendugo-White, V., 1980, Induction of sexual reproduction and resting egg production in *Brachionus plicatilis* reared in sea water, *Hydrobiologia*, 73: 55~58.
- Lubzens, E., 1981, Rotifer resting eggs and their application to marine aquaculture, *European Maricult. Soc. Spec. Publ.*, 6: 163~179.
- Lubzens, E., 1989, Possible use of rotifer resting eggs and preserved live rotifer (*Brachionus plicatilis*) in aquaculture, In: *Aquaculture Biotechnology in Progress* (De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H. and Wilkins, N. eds.), European Aquaculture Society, Bredene, Belgium: 741~750.

Minkoff G., Lulzens, E., Kahan, D., 1983, Environmental factors affecting hatching of rotifer(*Brachionus plicatilis*) resting eggs, *Hydrobiologia*, 104: 61 ~ 69.

Mopper, K., Zhou, X., 1990, Hydroxyl radical photoproduction in the sea and its potential impact on marine processes, *Science* 250: 661 ~ 664.

Munuswamy, N., Hagiwara, A., Murugan, G. et al., 1996, Structural differences between the resting eggs of *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis*(Rotifera, Brachionidae); an electron microscopic study, *Hydrobiologia*, 318: 219 ~ 223.

Pourriot, R., Snell, T. W., 1983, Resting eggs in rotifers, *Hydrobiologia*, 104: 213 ~ 224.

Segers, H., 1995, Nomenclatural consequences of some recent studies on *Brachionus plicatilis*(Rotifera, Brachionidae), *Hydrobiologia*, 313/ 314: 121 ~ 122.

Snell, T. W., 1987, Sex, population dynamics and resting egg production in rotifers, *Hydrobiologia*, 144: 105 ~ 111.

Spotte, S., Anderson, G., 1988, Chemical decapsulation of resting cysts of the anostraceans *Artemia franciscana* and *Strep-tocephalus sealii* as revealed by scanning electron microscopy, *J. Crustacean Biol.*, 8: 221 ~ 231.

Yufera, M., 2001, Studies on *Brachionus*(Rotifera); an example of interaction between fundamental and applied research, *Hydrobiologia*, 446/ 447: 383 ~ 392.

Zhou L., Zheng, Y., Xiang, J. H., 2001, Study on mixis potential of rotifer resting eggs(*Brachionus plicatilis*) with different collection times and different preservation periods *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 19(3): 222 ~ 227.

STUDIES ON THE CONTROLLING FACTORS AND FUNCTIONAL
MECHANISMS FOR HATCHING OF RESTING EGGS OF
ROTIFER *BRACHIONUS PLICATILIS* COMPLEX^{*}

ZHOU Li, XIANG Jianhai
(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences)

Abstract

The rotifer *Brachionus plicatilis* complex, including *B. plicatilis* O. F. Müller(formerly called L-type) and *B. rotundiformis* Tschugunoff(formerly called S-type), as an excellent live food for many species of marine fish larvae, has been widely used in most of the modern marine hatcheries in the world. Rotifer resting eggs(i. e. dormant eggs)are considered as the best or ideal form for storage and application of the rotifers in aquaculture. Numerous studies have been therefore carried out on the resting eggs, especially on their dormancy and hatching. This paper reviews the relevant work on controlling factors of hatching, including both the internal factors(e. g. dormant period, genotype, and maternal culture history)and the external ones(e. g. preservation conditions and methods, preservation period, incubation conditions, and sterilizing or processing of the eggs). The possible functional mechanisms of these factors for the hatching of resting eggs are also discussed.

^{*} Contribution No. 4559 from the Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences
©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://v