

不同年度收存的褶皱臂尾轮虫休眠卵的 孵化及滞育胚胎“激活”效果的研究*

周 利 相建海 郑 严

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 比较了 1985—1998 年间由同一褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)种群在实验室内历年产生并收存的休眠卵的孵化效果,并初步探讨了胚胎“激活”处理对孵化的影响。结果表明,休眠卵的收存年度或时间对其在一定孵育期内的总孵化率(*THR*)和日孵化率(*DHR*)有极显著影响(χ^2 检验, $p < 0.001$),但 *THR* 和 *DHR* 与储存时间均无显著的相关性,而是呈极大波动。同时发现“激活”作用具有促使孵化高峰提前到来、增强孵化同步性的双重功效,从而可明显缩短孵育时间,提高孵化速率。但“激活”前后多数卵样的总孵化率无显著变化($p > 0.05$)。详细讨论了可能导致孵化率波动的多种因素,例如遗传变异、培养历史、储存及孵化的环境条件等。

关键词 褶皱臂尾轮虫, 休眠卵, 收存时间, 孵化, 胚胎激活

中图分类号 Q954

20 世纪 50 年代末—60 年代初, 中国和日本学者先后发现了褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis* O. F. M. Iler)(以下简称轮虫)对海鱼幼体的饵料价值(中国科学院海洋研究所海洋鱼类繁殖研究组, 1978; Hirata, 1980), 现在, 轮虫已成为世界范围的海水鱼类和甲壳类动物苗种培育的重要活饵料。有关轮虫的繁殖与培养一直为国内外学者所关注。其中, 轮虫休眠卵作为最理想的轮虫储备形式, 其生产、储存和孵化已成为 20 世纪 80 年代以来轮虫生物学的研究热点之一(郑严等, 1979, 1991¹⁾, 1994²⁾; 王 等, 1980; Balompapueng *et al.*, 1997a, b; Dhert *et al.*, 1997; Hagiwara *et al.*, 1989, 1990, 1993a, b, 1997; Lubzens, 1981; Minkoff *et al.*, 1983; Pourriot *et al.*, 1983)。除用于生产目的外, 休眠卵的孵化还成为轮虫的有关生物学研究的良好材料来源(席贻龙等, 2000)。本文对收存于 14 个不同年度的产自同一轮虫原种(stock)的休眠卵的孵化情况进行了分析比较, 并初步观察了滞育胚胎的“激活”(activation)处理对休眠卵孵化的效应, 旨在探讨休眠卵的收存时间、储存与孵

* 新加坡国立大学分子农业生物学院“新加坡—中国生物技术项目(SCBP)”和新加坡农产与兽医局海水养殖中心的资助。周 利, 男, 出生于 1965 年 12 月, 博士, E-mail: zhouli001@sina.com

1) 郑 严, 李茂堂, 田凤琴等, 1991. 轮虫休眠卵的形成、采收、贮存和应用. 中国科学院海洋研究所科学技术档案- 卷 25-1 号(成果资料)

2) 郑 严主编, 1994. 海洋生物饵料培养原理与应用. 见: 中国老教授协会海洋经济技术分会编, 29—51(内部资料)

收稿日期: 2001-06-26, 收修改稿日期: 2002-03-18

化条件对其孵化效果的影响。

1 材料与方法

实验于1999年4月在新加坡农产与兽医局(AVA)海水养殖中心进行。

1.1 休眠卵的采收与保存

实验所用的各年度的休眠卵, 是中国科学院海洋研究所生物饵料课题组于1985—1998年间在实验室进行褶皱臂尾轮虫(青岛品系)保种培养过程中每年采收并保存的(以下将各年度卵分别简称为RE85、RE86、RE87、RE88、RE89、RE90、RE91、RE92、RE93、RE94、RE95、RE96、RE97、RE98)。保种培养期间所用的饵料种类有小球藻(*Chlorella* sp.)、等鞭金藻(*Isocrysis galbana*)、扁藻(*Tetraselmis* sp.)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、眼点拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)等; 培养介质为煮沸消毒的自然海水加蒸馏水, 盐度为15—32, 室温常年变化范围15—30℃。休眠卵形成后多沉于培养缸底部的渣滓中, 采收时用吸管将卵与渣滓一同吸出, 镜检后连同20—30ml原培养液一并转入容积为50ml的透明广口试剂瓶(渣滓过多者先用消毒海水略加淘洗后再装瓶), 加盖并标签记录, 置4—5℃冰箱中黑暗储存。

1.2 未经“激活”处理的各年度休眠卵的孵化(实验A)

将各年度卵样从4℃冰箱取出后, 分别置于直径90cm的培养皿中, 加入适量消毒的人工海水(由美国产“Instant Ocean”牌海盐加蒸馏水配制, 盐度为20), 置解剖镜下检查卵的数量和外观。然后用自动定量移液管从每年度样品中各挑取50粒形态饱满、色泽桔红的卵, 等分为两组分别放入两个24-室细胞培养皿中(每室预先加入2ml上述人工海水, 放25粒卵), 加盖(非密封)后置于25—28℃室温下孵化, 光照强度及光周期分别为400 lx(白色荧光灯)和L:D=24:0。整个过程在4h内完成。从实验开始之日(D0)起, 每24h定时镜检一次, 记录已孵化的卵数, 并将孵出的轮虫幼体挑出另养。第4天(D4)完成数据记录后结束实验。

1.3 经“激活”处理的各年度休眠卵的孵化(实验B)

本实验通过“介质替换”对休眠卵进行激活处理: 即先将待孵化的卵从原储存介质中取出并转入新鲜的孵化介质(消毒海水), 然后放回原储存环境(低温、黑暗)下继续保存, 此时卵内滞育胚胎将在新介质的刺激下重新启动发育; 一段时间后, 再将卵取出并置于适宜孵化环境下促其孵化, 最后与未经激活处理的卵的孵化结果相对照, 以判断激活作用是否对休眠卵的孵化效果有显著改善。具体实验操作是: 在实验A中完成卵的挑取工作后, 直接从各年度卵样中另挑取部分卵, 分别转入装有10ml上述人工海水的有盖指管瓶中, 放回4℃冰箱; 96h后将各卵样重新取出, 从中各挑取50粒(RE89、RE94因卵量有限, 分别只取40和36粒; RE87和RE95卵量过少, 不计入本实验), 并完全按实验A的步骤和条件进行后续孵化实验, 从而使孵化结果可与实验A相对照。

1.4 休眠卵孵化效果的指标与统计分析

休眠卵的孵化效果通常用孵化率来表示。不过, 由于该指标是指孵出的幼体数占休眠卵总数的百分比, 实际上是孵化试验结束时的“累积孵化率”(杨家新等, 2000), 不能确切反映本文所要分析的各年度休眠卵孵化过程的动态变化(如孵化同步性、孵化速率等)。因而作者将时间概念(以“日”为单位)引入该指标, 将其划分为“日孵化率”(daily hatching

rate, *DHR*) 和“总孵化率”(total hatching rate, *THR*), 分别用来指示各年度休眠卵的孵化进程及最终孵化结果。*DHR* 是指将一定数量的卵置于孵化环境之时起每 24h 孵出的幼体所占的百分率, 用以实时指示每日孵化的动态变化。*THR* 则是指一定数量的卵在某个设定的孵育期内孵出的幼体总数所占的百分率, 可用来指示某批卵总的孵化能力。后者亦即孵育期终止时各个 *DHR* 的累计总和, 等同于上述的累积孵化率。以 χ^2 检验分别判断 *DHR* 和 *THR* 在不同收存年度间以及“激活”前后的卵样中是否存有显著差异, 以回归分析判断卵的收存年度与以上二指标是否相关。

2 结果

2.1 未经“激活”处理的各年度休眠卵的孵化(实验 A)

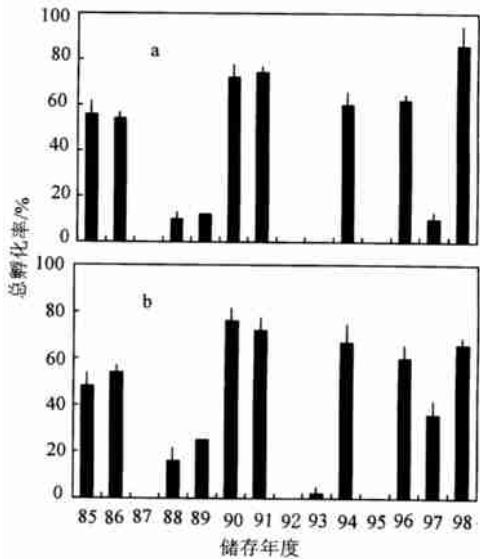


图 1 不同收存年度的褶皱臂尾轮虫休眠卵的总孵化率比较

Fig. 1 Comparison of total hatching rates between the resting eggs collected and preserved in different year
a. 未经激活处理(before activation); b. 经激活处理(after activation). 图 2 同

未经激活的各年度休眠卵在 D4 时的总孵化率(*THR*) 如图 1a 所示, 图中“储存年度”的数字表示年度(“85”表示“1985”, 以下同)。

所考察的 14 个年度的卵样中有 4 个(即 RE87、RE92、RE93 和 RE95) 在实验期间未见孵化, 其余 10 个年度卵样的 *THR* 介于 10%—86%。 χ^2 检验表明, *THR* 随储存年度不同而有极显著差异($p < 0.001$), 但回归分析未发现二者之间存在相关性。从图 1a 中亦可看出, 随着储存时间的递减, 各年度卵的 *THR* 值并非逐渐增大, 而是呈极大波动。例如 RE85 储存期虽最长, 但其 *THR* (54%) 却是储存仅 2 年的 RE97 (10%) 的 5.4 倍; 储存期最短的 RE98 虽有最高的 *THR* (86%), 但与相隔 8 年的 RE90 (72%) 相比并无显著差异($p > 0.05$)。此外, 图 1a 还显示, 前 7 个年度的卵(RE85—RE91)¹⁾ 除 RE87 未孵化外, 其余每两个相邻年度(即 RE85 与 RE86, RE88 与 RE89, RE90 与 RE91) 的 *THR* 值十分接近, 但 RE88 与 RE89 的值 (10%—12%) 比另外 4 个年度的值 (54%—74%) 显著低($p < 0.01$); 后 7 个

年度的卵(RE92—RE98)²⁾ 除上述未孵化者外, 未表现出相邻年度 *THR* 值近似的现象, RE94 与 RE96 的值相近 (60%—62%), 显著高于 RE97 ($p < 0.01$), 但明显低于 RE98 ($p < 0.05$)。

未经激活的各年度休眠卵孵化过程的动态变化, 可通过比较它们在整个孵育期 (D1—D4) 内的日孵化率(*DHR*) 看出(图 2a)。上述可孵化的 10 个年度的卵样每日孵化情况为:

D1, 仅 RE97、RE98 有个别孵化(*DHR* 均为 2%), 其余均未孵化。

1) 1985—1991 年度的休眠卵由郑严收集保存
2) 1992—1998 年度的休眠卵由周利收集保存

D2, 有 7 个年度的卵样(RE85、RE86、RE90、RE91、RE94、RE96、RE98) 表现为突发性大量孵化, 即具有明显的孵化高峰, 说明这些卵样具有较好的孵化同步性, *DHR* 介于 40%—78%, 其中除 RE98 有显著的($p < 0.01$) 最高值外, 其余各年度的 *DHR* 值无显著差异($p > 0.05$); 另 3 个卵样 RE88、RE89 和 RE97 在 D2 时孵化仅 2%—8%。

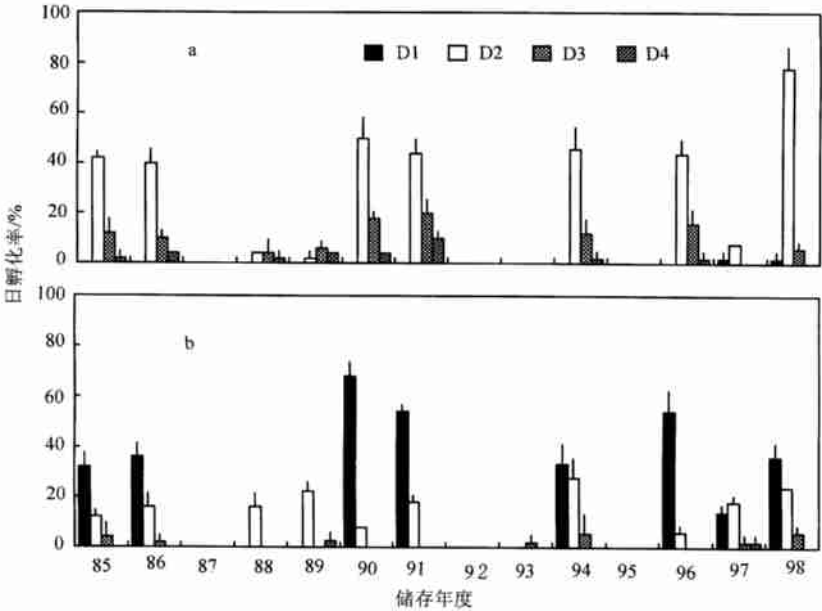


图 2 不同收存年度的褶皱臂尾轮虫休眠卵的日孵化率比较

Fig.2 Comparison of day hatching rates between resting eggs collected and preserved in different year

D3, 以上 7 个卵样的孵化水平急剧降低(至 6%—20%), RE97 已不再孵化, RE89 和 RE88 则无明显变化(4%—6%)。

D4, 各年度卵样的孵化继续减少, 除 RE91 尚有 10% 孵化外, 其余均降至 0%—4% 的极低水平。可见, 各卵样在为期 4 天的孵育期内便已完成或基本完成孵化。

2.2 经“激活”处理的各年度休眠卵的孵化(实验 B)

各年度卵经 96h 激活处理, 从冰箱取出后在镜下清晰可见卵的颜色已变淡(个别年度如 RE92 除外), 内部胚胎已成形, 甚至有胚胎活动, 说明卵确已被激活。

激活后各年度休眠卵在 D4 时的总孵化率见图 1b。本实验中, 上述未孵化的 4 个卵样除 RE87、RE95 因卵量不足而被取消外, RE92 仍始终未孵化, RE93 仅有 2% 孵化。其余 10 个年度的卵样, 有 8 个的孵化表现与实验 A 中基本相似, 仅 RE97 和 RE98 的 *THR* 比实验 A 中的相应值有显著差异, 前者表现为显著提高(升至 36%, $p < 0.01$), 而后者则相反(降至 66%, $p < 0.05$)。

然而, 激活后各年度休眠卵(仅限已孵化者)在 D1—D4 期间的每日孵化动态(图 2b)与实验 A 中的明显不同:

D1, 有 8 个卵样孵化, 且其中 7 个从一开始就表现为孵化高峰(*DHR* 介于 32%—68%, 最高者为 RE90, 而在实验 A 中这 7 个卵样的孵化高峰出现于 D2), 另一个为 RE97,

虽未表现为明显的孵化高峰(仅 14%),但也比实验 A 中的相应值高出 6 倍;暂未孵化者为 RE88、RE89 和 RE93。 χ^2 检验亦进一步表明,经过激活的休眠卵在 D1 时的 *DHR*,总体上极显著高于未经激活的卵($p < 0.001$)。由此可见,休眠卵经一定时间的激活处理可显著促进孵化高峰的提前到来。但是,与 *THR* 一样,激活前后各年度卵样在孵化高峰时的 *DHR* 值与收存年度间亦均未表现出相关关系。

D2,上述 7 个出现孵化高峰的卵样中有 5 个(RE85、RE86、RE90、RE91 和 RE96)的 *DHR* 骤降(至 6%—18%),另两个(RE94 和 RE98)也略有下降,仍保持较高的孵化水平(24%—27.8%);仅 RE97 略升(至 18%),RE88、RE89 也开始孵化,且表现为略低的孵化高峰(16%—22.5%)。

D3,RE93 刚有孵化(仅 2%),其他各年度卵样 *DHR* 降至 0%—8%的低水平。

D4,仅 RE89、RE97 尚有个别孵化(2.0%—2.5%),其余均不再孵化。

进一步比较发现,在实验 A 出现孵化高峰的 7 个年度的卵样中,除 RE98 外的各卵样在孵化头两天的累积孵化率(即 D1、D2 的 *DHR* 之和)占 4 天内总孵化率的比率范围仅为 59.5%—76.7%,而同样这些卵样在实验 B 中按同样方法计算所得的比率范围则高达 90%—100%(RE98 在这两个实验中的相应比值变化不大,介于 91%—93%),说明这些年度的可孵化卵在实验 B 中只需 2 天的时间即可完成绝大部分孵化。换句话说,上述休眠卵在实验 B 比在实验 A 中有更好的孵化同步性,使孵育期由原来的 4 天可进一步缩短为 2 天。其他几个在实验 A 中孵化水平较低的卵样(RE88、RE89、RE97)在实验 B 中 2 天内的孵化率也有显著提高(由 2%—10% 升至 16%—32%)(图 2)。可见,休眠卵经激活处理后可明显加强孵化的同步性,有利于缩短孵育期,从而提高孵化速率。但从图 1 可知,除个别年度(如 RE97)外,大多数卵样的 *THR* 在实验 A 和 B 中并无显著差异($p > 0.05$),说明激活处理对休眠卵的总孵化率无明显影响。

3 讨论

3.1 休眠卵的孵化与收存时间的关系及其影响因素

休眠卵的孵化始于休眠期的终止,因而孵化与收存时间的关系在很大程度上受休眠期长短的制约。据 Hagiwara 等(1995)报道,休眠期可分为内滞育期和外滞育期两个阶段。前者是指轮虫受精卵由母体排出后,卵内胚胎仍需缓慢发育一段时间以完成“后熟”过程,此间卵对任何外部环境刺激均不反应(故称“休眠”,又称“滞育”),借此度过不良环境,其长短由遗传因素决定,也与温度有关,温度越低历时越久。相应地,后者是指卵内胚胎完成后熟过程之后所处的阶段,此时卵已获得对环境刺激的反应能力,但若仍处在孵化抑制条件下(如黑暗、低温、干燥),则会继续保持“休眠”状态。本研究结果显示,在 4—5℃ 下黑暗储存 14 年之久的休眠卵(RE85)仍具有一定的孵化力,它们实际上早已处于外滞育期。以上二者在其他报道中则分别被称作自然休眠期和强制休眠期(金送笛等, 1996)。严格说来,休眠期应仅限于内滞育期。因此对同一批休眠卵来说,其收存时间与内滞育期的含盖程度将直接影响孵化结果。例如,经低温储存 10—50 天的蓼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus*)休眠卵,其孵化率随储存时间的延长而增大;但延长至 180 天时,孵化率则无明显增加(陈菊芳等, 1998)。这说明,相对较短的储存期正值或基本含盖卵的内滞育期,此间卵相继完成后熟过程,故表现为孵化率的逐渐增加;继续延长储存时间,卵则进入外滞育期,

后者在一定期限内对孵化率没有明显影响。但当储存期远远超过内滞育期时, 由于卵内胚胎活力的自然衰退, 孵化率将随储存期(外滞育期)的延长逐渐降低。

然而本研究结果显示, 储存 1—14 年的休眠卵的孵化率并未随储存期的延长呈现下降趋势, 反而表现为不规则波动(图 1、图 2)。作者认为, 导致此现象的原因包括以下几个方面。

3.1.1 内部因素的影响 据 Hagiwara 等(1990)报道, 轮虫在实验室条件下长期培养会发生遗传上的变化。这种变化将使同一轮虫种群存有遗传差异的个体(或克隆), 而个体间的遗传差异可能通过有性生殖的基因重组而“存储”于各自所产的受精卵(即休眠卵)中, 并将在以后的孵化和生殖过程中表现出来。作者最近对本实验所用的各年度休眠卵的混殖潜力(mixis potential)进行了比较研究(Zhou *et al.*, 2001), 结果也反映了这种个体间的遗传差异。此外, 轮虫的培养历史(包括休眠卵形成时的环境条件)不同也会导致其所产休眠卵的休眠期及孵化力的变化(郑严, 1994; Gilbert, 1974; Hagiwara *et al.*, 1990)。由于在历时十多年的保种培养过程中所用的饵料及环境条件并非一致, 轮虫种群有可能产生许多遗传变异。况且, 前、后 7 个年度的卵(即 RE85-RE91 和 RE92-RE98)是由不同作者收集, 尤其在后 7 年中, 曾多次从原种中挑出个体进行克隆化保种培养, 由此获得的休眠卵在遗传上将与前 7 年的卵有更大差异。RE85-RE91 的相邻年度有近似的总孵化率, 而 RE92-RE98 则无此表现(图 1a), 该结果进一步反映了这种遗传差异。

3.1.2 储存条件的影响 本实验所用的各年度卵样均在低温黑暗下储存, 但储存介质(亦即轮虫的培养介质)有所不同。据报道, 休眠卵在海水介质中保存时, 其多孔的表面会遭受细菌侵染, 并可能使孵化率逐渐降低(Balompapung *et al.*, 1997b)。而且休眠卵常沉于底部渣滓中, 这会减少氧进入卵中, 已发现缺氧环境会降低沉渣中的休眠卵生存力(Hagiwara *et al.*, 1985)。本研究中各卵样的储存介质及所含渣滓不尽相同, 这将造成介质中的细菌数量和卵的氧交换水平的差异, 从而可能导致各卵样的孵化力变化不一。不同储存介质对休眠卵孵化率的影响也在淡水轮虫中得到证实(杨家新等, 2000)。

3.1.3 孵化条件的影响 休眠卵的孵化需要一定的环境条件。本研究中各年度休眠卵是在同样环境下孵化, 但效果却显著不同, 有的甚至始终不能孵化或极少孵化(如 RE87、RE92、RE93 和 RE95)。此结果符合 Gilbert(1974)的观点, 即休眠卵的孵化虽依赖于环境条件, 但也可能受某些生理和遗传因子的影响。鉴于 3.1.1 中的原因, 本实验中各批次(年度)休眠卵可能有着不同的内因背景, 故所需的最适孵化条件亦有所不同。为此应进行多种组合的环境因子(如温度、盐度、光照等)对各卵样的孵化影响实验, 以确定其各自的适宜孵化条件。可见, 探讨环境条件对孵化的影响, 需针对具有相同或相近内因背景的休眠卵, 最好选用由同一轮虫克隆所产的休眠卵(Minkoff *et al.*, 1983)。另外, 孵化介质也是影响休眠卵孵化的重要环境因子。对蓴花臂尾轮虫休眠卵的相关研究发现, 改变孵化介质的种类或更新频度均会导致孵化率的改变(杨家新等, 2000; 陈菊芳等, 1998)。本实验中各年度休眠卵形成时的培养介质和储存介质是青岛海域的自然海水, 而作者所用的孵化介质为产自美国的海盐配制的人工海水, 这种差异或许会造成某些对水质变化特别敏感的休眠卵不能孵化或极少孵化, 对此尚需进一步研究。

总之, 鉴于上述内外因素的综合影响, 作者认为, 在通常情况下不能只根据储存时间

的长短来推断不同批次休眠卵的孵化力高低。但这并不意味着休眠卵的孵化力是独立于储存时间而随机表现的,可以设想:在严格控制的统一的培养、储存和孵化条件下,由同一轮虫克隆形成的同一批休眠卵,其总孵化率将会呈现随储存时间(外滞育期)的延长而降低的相关性。

3.2 休眠卵的“激活”作用

本研究初步证实,“激活”处理不仅可促使休眠卵孵化高峰提前到来,亦可增加孵化同步性,显著缩短滞育期。这对休眠卵的实际应用很有意义,因为当需用休眠卵获得轮虫时,总希望卵能在尽可能短的时间内大量孵出,以利于快速启动轮虫的大量培养或直接用作饵料投喂鱼类幼体(Hagiwara *et al.*, 1993c)。作者认为,激活处理的效应不能简单等同于孵化条件的影响。激活应指通过某种环境刺激“唤醒”卵内的滞育胚胎而使之重新启动发育的过程,但此过程是在孵化抑制因子仍存在的情况下缓慢进行的,其目的是为了使得所有待孵化的休眠卵能够在正式转入孵化环境之时基本达到同样的胚胎发育阶段,以便尽可能获得快速、同步的孵化效果。经激活后各卵最终能否成功孵出,则主要取决于孵化条件。本研究中,实验A与B所用的孵化条件相同,故激活前后各年度卵样的总孵化率大都没有明显变化。相比之下,孵化条件的作用虽然也首先始于对休眠卵的唤醒(Hagiwara *et al.*, 1985),但唤醒后各卵便立即在相对适宜的环境中直接进入孵化状态,至于孵化的多少、快慢,则因卵本身的内因背景以及储存的时间、条件等而异。

本研究所采取的激活处理是通过“介质替换”方式进行,此法之所以对休眠卵有唤醒作用,可能与新介质的溶氧含量高有关,因为氧气是轮虫、卤虫、桡足类等休眠卵孵化时所必需的(Minkoff *et al.*, 1983),而且新介质的稀释作用亦可大大减轻细菌团对卵表面的微孔阻塞,从而有利于卵内胚胎对氧的获得。但此激活方式并非对所有批次的休眠卵都有同样效果,例如RE92在激活前后均不孵化。另外需要指出的是,不能排除其他外部因素参与此激活效应的可能,因为作者在为激活处理作准备的过程中,从休眠卵的挑选到介质替换的完成最少需4h,此间卵所处的温度也从4—5℃升至室温25—28℃,盐度在介质替换前后亦有差异,且此操作是在光照条件下进行。这些环境因子的变化已被证明对休眠卵孵化有刺激作用,甚至还可能包括物理胁迫(physical stress)如转移休眠卵时的手工操作的刺激(Hagiwara *et al.*, 1985)。今后尚需进一步深入研究某单一因子刺激和多因子联合刺激对休眠卵激活效应的差异。

此外需注意,本研究中所用的激活处理时间为96h,实际上该时间或许可以进一步缩短(如24—48h),应根据休眠卵的储存期而探索出最佳激活期。作者认为激活期不宜过久,否则,部分已被唤醒并发育到一定阶段的卵内胚胎在“等待”解除孵化抑制的过程中,可能因内源营养消耗过多而在日后的孵化中没有足够的能量冲破卵膜,此时激活作用将影响总孵化率。本研究中,RE98经激活处理后总孵化率反而比激活前显著低($p < 0.05$),可能就是由于该年度的卵对激活作用的敏感性远比其他年度的高,96h的激活期对它们来说相对过久,故而有部分胚胎已“无力”破膜而出。

还应说明的是,本研究所考察的休眠卵孵化率(包括THR和DHR)均系从各年度储存的休眠卵中挑选出的完整、正常的卵孵化所得,实际上各年度的卵中都或多或少有死的和不正常的卵(颜色发黑、发灰、空皮或卵膜已破)。镜下观察发现,储存期越久,“坏卵”比例

越高。其中 1985—1989 年度的“坏卵率”约高达 70% 以上, 而 1998 年度几乎没有坏卵。休眠卵长期“水存”过程中的细菌侵染, 可能是造成这种状况主要原因, 因此作者认为, 若预先对休眠卵进行分离纯化、消毒处理, 而后再放入消毒过的介质中并置冰箱保存, 这种经过改良的“低温黑暗无菌水存法”将可能更适于休眠卵的长期储存。虽然休眠卵也可干燥保存(郑严等, 1979), 但根据孵化率比较, “干存法”的效果不如“水存法”(郑严等, 2001)。有人试用冷冻干燥加“罐存”(canning)技术储存休眠卵, 以求减低细菌的影响, 结果显示, 在 5℃ 下保存 6 个月和 12 个月的卵, 3d 内的孵化率分别为 16%—20% 和 35%, 并未超过存于海水介质的对照组(Balompapueng *et al.*, 1997a)。卵内胚胎的水分丧失过多, 可能是“干存法”效果欠佳的主要原因。

4 结论

- 4.1 以“低温黑暗水存法”储存的历时 14 年的轮虫休眠卵仍有一定的孵化力。
- 4.2 由同一轮虫种群产生的、于不同年度收存的休眠卵(未经消毒处理)的孵化率, 受收存时间的显著影响, 且随储存年度的延长而呈极大波动。
- 4.3 适当的“激活”处理可显著促进休眠卵孵化高峰的提前到来、增强孵化同步性, 从而提高孵化速度, 但对总孵化率无明显影响。

致谢 本研究承蒙新加坡国立大学分子农业生物学院(IMA)和新加坡农产与兽医局(AVA)海水养殖中心提供条件支持; 中国科学院海洋研究所田凤琴实验师参与前期的轮虫保种培养和休眠卵采收工作, 尤锋、陈本楠二位同事为本实验提供热情帮助; IMA 的栾宏奋实验师协助数据分析; 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王, 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
- 中国科学院海洋研究所海洋鱼类繁殖研究组, 1978. 咸淡水养殖梭鱼的自然繁殖观察和人工繁殖试验. 海洋科学集刊, 14: 29—68
- 郑严, 田凤琴, 宋立清, 1979. 褶皱臂尾轮虫 *Brachionus plicatilis* M. S. G. 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: 简明中国水产养殖百科全书. 北京: 中国农业出版社, 926—939
- 陈菊芳, 周洁, 黄祥飞, 1998. 蓼花臂尾轮虫休眠卵萌发的研究. 应用生态学报, 9(1): 67—70
- 杨家新, 黄祥飞, 2000. 环境因子对蓼花臂尾轮虫休眠卵萌发率的影响. 水生生物学报, 24(4): 331—339
- 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, 2000. 温度对壶状臂尾轮虫实验种群动态的影响. 海洋与湖沼, 31(1): 23—28
- Balompapueng M D, Hagiwara A, Nozaki Y *et al.*, 1997a. Preservation of resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. M. S. G. by canning. Hydrobiologia, 358: 163—166
- Balompapueng M D, Munuswamy N, Hagiwara A *et al.*, 1997b. Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs *Brachionus plicatilis* M. S. G. Aquaculture Research, 28: 559—565
- Dhert Ph, Schoeters K, Vemeulen P *et al.*, 1997. Production, disinfection P. and evaluation for aquaculture applications of rotifer resting eggs from Bohao Bay, P. R. China. Aquaculture International, 5: 105—112
- Gilbert J J, 1974. Domancy of rotifers. Trans Amer Micros Soc, 93: 490—513
- Hagiwara A, Hino A, Hirano R, 1985. 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, 1989. Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis 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, 1993a. Preservation of rotifers and its application in the finfish hatchery. In: Lee C S, Su M S, Liao I C ed. Finfish Hatchery in Asia: Proceedings of Finfish Hatchery in Asia '91. TML Conference Proceedings 3: 61—71. Tungkang Marine Laboratory, Taiwan Fisheries Research Institute, Tungkang, Pingtung, Taiwan
- Hagiwara A, Hamada K, Nishi A *et al*, 1993b. Mass production of rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs in 50m³ tanks. Nippon Suisan Gakkaishi, 59(1): 93—98
- Hagiwara A, Hamada K, Nishi A *et al*, 1993c. Dietary value of neonates from rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs for red sea bream larvae. Nippon Suisan Gakkaishi, 59(1): 99—104
- Hagiwara A, Balompapueng M D, Munuswamy N *et al*, 1997. Mass production and preservation of marine rotifer resting eggs. Aquaculture, 155: 223—230
- Hirata H, 1980. Culture methods of the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. Min Rev Data File Fish Res, 1: 27—46
- Lubzens E, 1981. Rotifer resting eggs and their application to marine aquaculture. European Maricult Soc, Spec Publ, 6: 163—179
- Minkoff G, Lubzens E, Kahan D, 1983. Environmental factors affecting hatching of rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting eggs. Hydrobiologia, 104: 61—69
- Pourriot R, Snell T W, 1983. Resting eggs in rotifers. Hydrobiologia, 104: 213—224
- 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

STUDY ON HATCHING OF ROTIFER RESTING EGGS (*BRACHIONUS PLICATILIS*) COLLECTED AND PRESERVED IN DIFFERENT YEARS AND EFFECT OF ADVANCE ACTIVATION ON DIAPAUSE EMBRYOS

ZHOU Li, XIANG Jian-Hai, ZHENG Yan

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract This paper investigated the hatching performances of resting eggs that were produced by a single stock of rotifer *Brachionus plicatilis* (Qindao strain) in laboratory and collected/preserved annually during 1985—1998; the effect of advance activation treatment to diapause egg embryos on hatching was preliminarily studied as well. The results obtained from 4 days of incubation period showed that, the collection and preservation time had extremely significant effect (χ^2 -test, $p < 0.001$) on both the total hatching rate (*THR*) and the daily hatching rate (*DHR*) among the 14 batches (years) of egg samples. Significant fluctuations, rather than a linear relationship, were found among their hatching rates as the preservation period extended. At the same time, marked effects of the “activation” on hatching performances of tested egg samples was observed: it not only significantly advanced the appearing time of the maximum *DHR* (i.e. hatching peak) ($p < 0.001$) but also further enhanced the simultaneity of hatching, resulting in incubation period shortened by half. However, the activation did not significantly change the *THR* of most of the tested egg samples ($p > 0.05$). Various internal and external factors (such as genetic changes, culture history, preservation and incubation conditions) possibly causing the above “fluctuation” were thoroughly discussed.

Key words *Brachionus plicatilis*, Resting egg, Collection and preservation time, Hatching, Embryo activation