

几种轮虫需精卵休眠时间的初步研究^{*}

金送笛 李永函 孙玉芳

(大连水产学院, 116023)

摘 要 本文报道了角突臂尾轮虫(*Brachionus angularis*)、萼花臂尾轮虫(*B. Calyciflorus*)、褶皱臂尾轮虫(*B. Plicatilis*)部分新产需精卵的自然休眠期分别为9天、6-7天、大于12天;晶囊轮虫(*Asplanchna. spp*)部分需精卵的休眠时间为8-11h。光照是轮虫新产需精卵萌发的必要条件。缺氧、适度阴干和冷冻处理都能提高轮虫新产需精卵的萌发率。本文讨论了掌握休眠时间,提高轮虫需精卵萌发率在大规模增殖轮虫生产中的意义。

关键词 轮虫, 新产需精卵, 休眠时间

轮虫在水产经济动物苗种生产中作为鲜活饵料起着极其重要的作用,其需精卵是池塘轮虫自然增殖的物质基础,也是集约化培养轮虫的重要“种源”。有关轮虫需精卵萌发的研究 Богословский^[9]、Gilbert^[4]、Pourriot, R; Snell, T. W^[7]等已做过许多报道;李永函^[2]等也对鱼池轮虫需精卵的分布和萌发进行过研究,但至今国内外未见晶囊轮虫需精卵休眠期的报道,对其它轮虫需精卵休眠时间的专门研究和系统报道也很少,且观点颇不一致^[1,3,5,8]。为探明池塘习见轮虫需精卵的休眠时间,为敞池增殖轮虫提供理论依据,我们对几种轮虫新产需精卵的萌发和影响因素进行了研究。

材 料 与 方 法

(一)臂尾轮虫新产需精卵的萌发实验

欲知轮虫需精卵的休眠时间,必须选择刚产出的卵。方法是用浮游生物网在培养池中滤取抱需精卵的雌体,盛于广口瓶中,用搅动和趋光法将卵和虫体分离,可获未经处理的需精卵,对其特殊处理按以下办法进行。

1. **冷冻处理** 将抱卵雌体分装于小塑料瓶内,加甘油液作保护剂,置冰箱(-18℃)中冷冻。
2. **缺氧处理** 使抱卵雌体密集猝死密封保存于暗处。
3. **阴干失水处理** 吸抱卵雌体于盖玻片上让其自然适度阴干(刚阴干),再反复加水润湿

收稿日期: 1995-08-31。

^{*} 农业部八·五重点研究项目。

——阴干(约 5 次)。

各类实验开始前,按设计方案取出样本(冷冻的先解冻),清洗并剔除异物,分装于 10ml 小瓶中,添加曝气自来水,在室温(19~21℃)室内自然光照或黑暗环境中培养。试验开始 24h 后每天用碘液固定 1~2 个小瓶,并全部计数幼轮虫和未萌发卵。为避免雌体产夏卵繁殖,必须每天吸出尚未固定的各瓶中的幼轮虫并计数。萌发率按下式计算:

$$H = \frac{R}{E + R} \cdot 100\%$$

H——萌发率 E——未萌发卵(个) R——幼轮虫(个)

(二)晶囊轮虫新产需精卵的萌发实验

用以下三种方法获得晶囊轮虫新产需精卵。(1)密集抱卵雌体,缺氧三天后挑选成熟卵(呈黑色);(2)在培养皿中密集抱卵雌体约 2h,取已产出的成熟卵;(3)剖取雌体卵巢中尚未产出的卵(色稍淡)。将获得的卵盛于 15ml 的小培养皿中并加经充分曝气的自来水,在室温(21.5~23℃)自然光照下培养,每 6h 观察一次,发现幼轮虫立即吸出计数。

当年需精卵,系当年春季所采之卵在低温(<4℃)缺氧条件下保存 2 个月的样本。实验时与新产需精卵在相同条件下培养。由于当年需精卵已完成其自然休眠期,所以,它的萌发时间即可视为该种轮虫在相同温度下胚胎发育所需要的时间,从而可计算出新产需精卵的休眠时间。

结 果

(一)几种臂尾轮虫新产需精卵的萌发

从表 1 可以看出如下结果。

1. 在适宜条件(18~21℃、DO 丰富、自然光照)下,经 3 天和 5 天缺氧腐败处理的蓴花臂尾轮虫部分新产需精卵,在培养的第 5 天和第 3 天开始萌发,和缺氧时间一并计算均为 8 天。凡缺氧时间超过 8 天(10~30 天)者,都在培养的第二天开始萌发。表中未经缺氧处理的对照组,在所观察的 6 天内均未见萌发。
2. 光照对蓴花臂尾轮虫新产需精卵的萌发率有重要影响。光照组比暗组萌发率平均高出 3~8 倍,但对需精卵开始萌发的时间却看不出明显的影响,只有缺氧 20 天样本中,有光比暗处早萌发了一天。
3. 萌发率有一定的突发性,主要表现在缺氧时间适度(10~20 天)并有光照的条件下,萌发率并不随培养时间的延长而增加。

从表 2 可以看出如下结果。

1. 经冷冻 2、3、5 天的蓴花臂尾轮虫新产需精卵,分别在培养 6、5、3 天时开始萌发,计冷冻时间在内均为 8 天,冷冻时间超过 8 天者,在第 5—2 天开始萌发。
2. 光照对经冷冻后的蓴花臂尾轮虫新产需精卵的萌发影响十分明显,在无光环境中,除冻 30 天组偶见幼体外,其余在 14 天内都未萌发。

表 1 蓼花臂尾轮虫新产需精卵经缺氧处理后的萌发率(%) (18~21℃)

Table 1 The hatchability of the fertilized eggs freshly produced by *B. Calyciflorus* after anoxic state treatment(%) (18~21℃)

培养时间 (天) Culture periods (days)	缺氧 3 天 Anoxic state for 3 days 有光 Light	缺氧 5 天 Anoxic state for 5 days 有光 Light	缺氧 10 天 Anoxic state for 10 days 有光 Light	缺氧 20 天 Anoxic state for 20 days 有光 Light	缺氧 20 天 Anoxic state for 20 days 暗 Dark	缺氧 30 天 Anoxic state for 30 days 有光 Light	缺氧 30 天 Anoxic state for 30 days 暗 Dark	对照组 Control group 有光 Light
1			0	0	0	0	0	0
2			64.5	53.9	0	8.2	12.7	0
3		6.1	29.0	45.1	2.9	6.8	3.3	0
4		4.3	65.1	21.1	15.6	8.3	11.3	0
5	4.8		62.5	37.0	1.4	11.1	6.3	0
6			27.9	18.8		9.3	1.1	未见萌发 No hatching
7	13.9		45.8	12.7	3.7	20.5	4.6	因
8	15.2		58.3	36.2	2.7	28.3	1.1	故
9			41.5	24.1	2.8	32.9	6.1	终
10		36.8	54.0	29.0	1.3	25.8		止
11		35.9	29.6	38.1	0.8		5.6	观
12		43.9	41.1					察
平 均 Average	11.3	25.4	47.2	31.6	3.5	16.8	5.8	

表 2 冷冻处理的蓼花臂尾轮虫新产需精卵萌发率(%)

Table 2 The hatchability of the fertilized eggs of *B. Calyciflorus* after being frozen(%) (18~21℃)

培养时间 (天) Culture periods (days)	冻 2 天 Frozen for 2 days 有光 Light	冻 3 天 Frozen for 3 days 有光 Light	冻 5 天 Frozen for 5 days 有光 Light	冻 10 天 Frozen for 10 days 有光 Light	冻 15 天 Frozen for 15 days 有光 Light	冻 15 天 Frozen for 15 days 暗 Dark	冻 20 天 Frozen for 20 days 有光 Light	冻 20 天 Frozen for 20 days 暗 Dark	冻 30 天 Frozen for 30 days 有光 Light	冻 30 天 Frozen for 30 days 暗 Dark
1					0	0	0	0	0	0
2					0	0	0	0	1.5	0
3			0.94		1.7	0	0	0	0.9	0
4			4.97		1.5	0	0	0		0
5		4.99	8.0	5.3		0	2.35	0		0
6	9.3	2.4	4.2	1.4	13.3	0	1.63	0		0
7	6.1	15.5	7.6	7.7	1.8	0	1.27	0	3.1	0
8	2.9	5.6	14.6	22.9	17.0	0	5.6	0	27.3	6.0
9	6.8	15.3	5.0			0	24.3	0	20.4	1.2
10	5.6	8.1	33.3			0	13.0	0	34.1	0.7
11	27.4	13.5				0	21.9	0	32.3	0.4
12	16.7	8.5				0	17.5	0	55.5	0
13	12.1					0		0	20.4	1.9
14	12.1					0		0	46.7	
平 均 Average	10.86	9.24	9.83	9.32	7.1		10.94		24.2	2.04

从表 3 可见, 未经处理的对照组和试验组(缺氧、阴干)的角突臂尾轮虫新产需精卵, 均在培养的第 11 天开始萌发, 但萌发率后者较前者高近 5 倍。

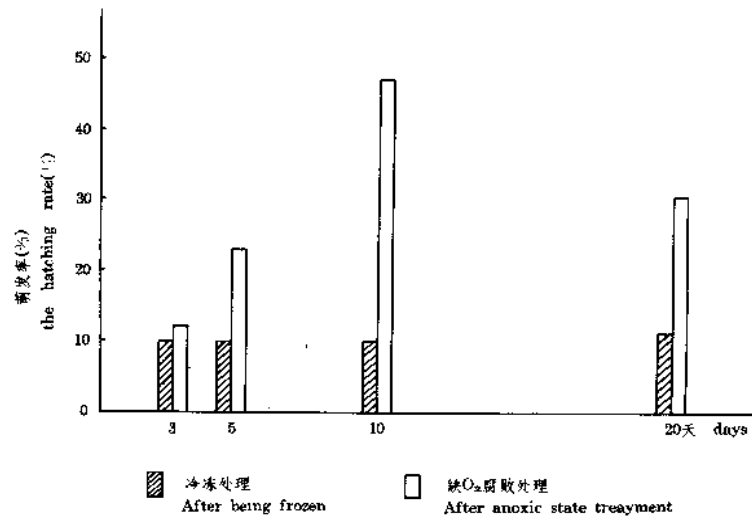


图1 蓴花臂尾轮虫新产需精卵经缺氧腐败与冷冻处理后萌发率比较

Fig.1 A Comparative hatching rate of the fertilized eggs freshly produced by *B. Calyciflorus* in anoxic and frozen conditions

表3 角突臂尾轮虫新产需精卵萌发状况(19~20℃, 室内自然光照)

Table 3 The hatching rate of the fertilized eggs freshly produced by *B. angularis* (19~20℃, natural light)

项 目 Item	未经处理的需精卵 (对照组) 第11天 Without treatment of fertilized eggs (control group) (1) (2)		缺氧腐败 24h 处理 的需精卵 第11天 The fertilized eggs after anoxic state treatment for 24h (1) (2)		多次、适度阴干处理 的需精卵 第11天 The fertilized alternative wetting and drying for several times (1)
未萌发卵数(个) No hatching eggs (ind)	174	44	52	72	240
幼轮虫数(个) Infant rotifer(ind)	7	2	9	19	60
萌发率(%) Hatching rate (%)	3.9	4.3	14.5	20.9	20.0

从表4可见,褶皱臂尾轮虫新产需精卵在培养的第12天开始萌发,但在整个培养期内萌发率都不高(<5%)。

(二) 晶囊轮虫新产需精卵的萌发

从表5可见,在水温21.5~23℃并有光照的条件下,部分刚离体的需精卵培养42~45h可以萌发;未离体的需精卵则需50h才萌发;离体2个多月的当年卵只要36h便可萌发。离体后缺氧3天者34h萌发,如加海水浸泡6h则28h就可孵出幼轮虫,算上浸泡时间亦为

36h。产出2个月以上的当年需精卵的萌发率比其余各组高出20%以上,此外,缺氧并短时间(<6h)用海水浸泡者萌发率也有所提高。

表4 褶皱臂尾轮虫新产需精卵萌发状况(19~20℃,室内自然光照)

Table 4 The hatchability of the fertilized eggs freshly produced by *B. plicatilis*
(19~20℃, natural light)

培养时间 (天) Culture periods (day)	(1)			(2)		
	未萌发卵 (个) No hatching eggs (ind)	幼轮虫 (个) Infant rotifer (ind)	萌发率 (%) Hatching rate (%)	未萌发卵 (个) No hatching eggs (ind)	幼轮虫 (个) Infant rotifer (ind)	萌发率 (%) Hatching rate (%)
12	培养皿内出现个别小轮虫 Particular small rotifer in culture disks					
16	2688	20	0.74	1987	48	2.4
17	2670	7	0.26	1985	2	0.1
18	2623	22	0.83	1856	38	2.0
19	2418	68	2.74	1736	74	4.3
20	2258	84	3.50	1577	43	2.65

表5 新产与当年晶囊轮虫需精卵的萌发状况(21.5~23℃,室内自然光照)

Table 5 Hatching of the fertilized eggs of *Asplanchna* spp produced freshly and yearly

序号 NO	需精卵的来源 The source of the fertilized eggs	萌发率(%) Hatching rate(%)	培育时间(h) Culture time (h)
1	剖出母体内的卵 The eggs obtained by dissection	4	50
2	刚从母体产出卵 The eggs freshly produced by females	4	44
3	刚从母体产出卵 Same as No 2	3	45
4	刚从母体产出卵 Same as No 2	10	42
5	刚产出卵用海水浸泡15分 Freshly produced eggs emerged in sea water for 15 minutes	12.5	42
6	新产卵缺氧腐败3天 The fresh eggs after anoxic state for 3 days	11.1	34
7	新产卵缺氧腐败3天后用海水浸泡0.5h Eggs freshly produced in anoxic state for 3 days emerged in sea water for 0.5h	17.5	34
8	新产卵缺氧腐败3天后用海水浸泡6h Newly produced eggs administrated by anoxic state for 3 days followed emerge in sea water for 6h	7.0	28
9	当年需精卵(对照组)* Yearly fertilized eggs (Control group)	37.9	36

*春季采集在缺氧、低温下(4℃左右)保存60天后进行实验,实验温度是20~22℃。

The eggs collected in spring and kept in anoxic state and frozen (about 4℃ for 60 days) (20~22℃)

结 果 与 讨 论

(一) 几种臂尾轮虫需精卵的自然休眠期

本试验表 3 说明,角突臂尾轮虫新产需精卵在适宜条件下培养到第 11 天即有部分开始萌发,可见其休眠时间为 10 天。

表 1 显示,蓼花臂尾轮虫新产需精卵缺氧处理不足 8 天者,其萌发时间等于缺氧时间加培养时间,均为 8 天;而缺氧大于 8 天者,则在培养的第 2 天开始萌发,这说明缺氧过程亦即是其休眠的过程,同时说明 8 天应为其部份需精卵开始萌发的时间。表 2 的数据表明,冷冻 2—5 天的蓼花臂尾轮虫新产需精卵在第 8 天(计冷冻时间在内)开始萌发,再次说明开始萌发的时间应为 8 天。但冷冻处理时间大于 8 天的几组,多数不在培养的第二天而是在 3—5 天后才开始萌发。该结果和缺氧处理的情况不相同,可视为较长时间的深冷冻带来了休眠(后熟)进程的停滞。有关蓼花臂尾轮虫部分新产需精卵的休眠时间还可从表 1 对照组得到佐证,尽管该组数据因故未能记录完善,但培养 6 天仍无幼体孵出,足见其需精卵的休眠时间当大于 6 天。以上两种臂尾轮虫需精卵开始萌发的时间(10 天或 8 天)均包括了胚胎发育时间。根据温度与臂尾轮虫需精卵萌发时间的自然对数关系式 $\ln y = 9.71 - 2.11 \ln x$ ^[2] 计算,休眠终止后的需精卵在 18~21℃ 时,胚胎发育所需时间约为 35h。扣除这 35h,部分角突臂尾轮虫需精卵的休眠期应为 9 天;部分蓼花臂尾轮虫需精卵的休眠期应为 6~7 天。以上结论和王家辑^[1]所指出的“轮虫需精卵在孵化前必须经过几个星期至几个月漫长的潜伏时间”的结论相比较要短得多,这系观测方式(王先生为室外观察,实际上是不具萌发条件的强制休眠)不同所致。而和 Ruttner^[8]所说的“有的轮虫休眠卵经极短的潜伏期后部分萌发”的观点一致。至于主要生活于半咸水中的褶皱臂尾轮虫需精卵的休眠时间,本实验所得数据至少为 12 天(表 4),这与 Ito^[5]所报道的 7~12 天一致,但和 Atsushi^[3]所指出的“褶皱臂尾轮虫需精卵在有光条件下一个多月有零星萌发”的结论相差甚大。这是否为地域差别所致,尚待进一步探讨。

(二) 晶囊轮虫需精卵的自然休眠期

实验表明(表 5),休眠期早已终止的当年晶囊轮虫需精卵的萌发时间为 36h(20~22℃);缺氧 3 天以及缺氧 3 天后又经海水浸泡 0.5h 的需精卵经 34h 培养可萌发(21.5~23℃),以上可视为在不同温度下晶囊轮虫需精卵的胚胎发育时间。本实验还表明,刚离体的晶囊轮虫需精卵在水温 21.5~23℃ 条件下经 42~45h 萌发,此乃休眠时间和胚胎发育时间之和,扣除在相同温度下胚胎发育所需的 34h,其休眠时间应为 8~11h。

(三) 几种生态因子对轮虫需精卵休眠时间的影响

实验表明(表 3),角突臂尾轮虫需精卵在缺氧、阴干处理和未加任何处理的环境中,均在培养的第 11 天开始萌发(首发),但其首发率却不同,处理试验组高出近 5 倍。类似的现象在对蓼花臂尾轮虫需精卵的试验(表 1、2)中也可见到,适度缺氧和冷冻均提高了它的首发率,只不过缺氧处理的效果更为显著[图 1]。这与 Gilbert^[4]所报道的“轮虫休眠卵从腐败环境转至新鲜环境可有效地诱导萌发”的结论一致。至于光照刺激对轮虫新产需精卵萌发率的影响可从表 1、2 中得到肯定,蓼花臂尾轮虫新产需精卵经缺氧 20、30 天处理后,在相同条件下,有光组比无光组平均萌发率分别提高 9 倍和 2.9 倍;冷冻处理的实验中,无光条件下只有个别幼轮虫孵出。可见,在常温下,光照是臂尾轮虫新产需精卵萌发的必要条件,这

和“光照是结束休眠的必须条件”的观点吻合^[1]。

通常将生物在适宜条件下其休眠结构(休眠卵、休眠孢子等)处于滞育状态的时间,称为自然休眠期,以区别其在亚劣环境(温度不适、DO 不足等)下不能萌发的强制休眠期。自然休眠期是生物自身的遗传特性决定的,因而各物种均有自己大致的休眠时间。但由于休眠结构形成(产出)的时间和成熟度不尽相同,成熟度好者休眠期(后熟期)短,反之则长。轮虫需精卵也是这样,混交雌体产出的需精卵成熟度不同,休眠时间有长短,部分成熟度较好的卵,经短暂的休眠后便可萌发,而更多的待熟卵,需经过一定时间或得到某些特殊刺激(缺氧、阴干、冷冻等)后方可完成或提前完成其后熟过程。这便是前述臂尾轮虫需精卵经缺氧等处理后,首发率显著提高的原因所在。必须指出,表 2 中冷冻时间较长(10~30 天)的几组,蓴花臂尾轮虫新产需精卵开始萌发的时间多数不在培养的第二天,可见,过长时间的深冷冻,可停滞其后熟进程。此刻不可将冷冻时间计入休眠期。

(四)研究轮虫需精卵休眠及其影响因素的意义

国内对轮虫需精卵休眠时间的研究,始于本世纪中叶,最早涉足于该领域的专著是“中国淡水轮虫志”。王家骥^[1]在书中指出:“轮虫的受精卵在孵化以前,必须经过几个星期至几个月漫长的潜伏时间。温度、水质、溶氧等均恢复正常,连同渗透压的改变,可以立即促进休眠卵的孵化”。人们在沿用“休眠卵”这一概念的同时,也就承认了其漫长的休眠期。然而,从本实验结果看,几种臂尾轮虫部分需精卵的休眠时间只有 6~12 天;晶囊轮虫需精卵才 8~11h,显然这几个小时是很难称得上“休眠期”的。由此可见,把轮虫的需精卵统称为“休眠卵”似不够贴切。作者建议,还是称“需精卵或耐久卵”为宜。了解不同轮虫需精卵的休眠时间,对轮虫的大规模增殖,特别是在敞池增殖中反复利用需精卵,提高水体中轮虫生物量有重要意义;探明新产需精卵萌发的影响因子,可在生产中为轮虫增殖利用制订合适的技术措施并阐明其原理。比如,掌握了需精卵在缺氧环境中可长期保存并能提高其萌发率的原理,即可在为轮虫采“种”时,抽滤抱需精卵的雌体密集,猝死后阴干至糊状,密封保存于缺氧环境中备用。探明轮虫需精卵的需光萌发特点,可在敞池中实行浅水、清水培育,在室内则强其光源。在弄清光照、阴干和冷冻对需精卵的作用后,对于敞池增殖轮虫时所实行的“搅底、晒底和冻底”等生产措施的原理,也就不言而喻了。

参 考 文 献

- [1] 王家骥, 1961. 中国淡水轮虫志. 科学出版社。
- [2] 李永函, 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): 20-30。
- [3] Atsushi Hagiwara, 1989. Effect of incubation and preservation on resting eggs hatching in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 186: 415-421.
- [4] Gilbert, J. J., 1974. Dormancy in Rotifers. *Trans Amer Micros Soc.*, 93: 490-513.
- [5] Ito, T., 1960. On the culture of mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis* of Muller in the sea water. *Rep - Fac Fisheries, Prefect. Univ. Mie.*, 3: 708-740 (in Japanese).
- [6] Minkoff, G., E. Lubzens and D. Kahan., 1983. Environmental factors affecting hatching of rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting eggs. *Hydrobiologia*, 104: 61-69.
- [7] Pourriot, R and Snell, T. W., 1983. Resting eggs in rotifers. *Proceedings of the third international rotifer symposium held at Uppsala, Sweden, August 30 - September 4*. *Hydrobiologia*, 104: 213-224.
- [8] Ruttner-Kolisko, A. 1972. *Rotatoria, Die Binnengewässer.*, 26: 99-233.
- [9] богословский А. С., 1963. Материалы к изучению покоящихся яиц коловраток (сообщение 1) бюллетень м о - ва и с х

природы ома бкочогия, т Lxv IV (6) CTP 50 – 67.

PRELIMINARY STUDY ON LATENT PERIODS OF FERTILIZED EGGS OF SEVERAL SPECIES OF ROTIFERS

Jin Songdi Li Yonghan Sun Yufang

(Dalian Fisheries College, Dalian 116023)

ABSTRACT The natural latent periods of fertilized eggs from several species of rotifers were determined under various conditions. It was found that the natural latent periods of newly fertilized eggs were 9, 6–7, >12 days, and 8–11 hours of *Brachionus angularis*, *B. Calyciflorus*, *B. Plicatilis* and *Asplanchna* spp respectively. Light is essential for hatching. The hatchability of newly fertilized eggs can be increased by treatment after anoxic and frozen conditions alternative wetting and drying. The importance of multiplication of the rotifers in an open pond on a large scale has been also discussed.

KEYWORDS Rotifers, Fertilized eggs, Latent periods