

冷冻对轮虫休眠卵萌发率的影响

刘青 金送笛 刚健 覃永秋 陈红艳 李永函

(农业部海洋水产增养殖重点开放实验室,大连水产学院,大连 116023)

摘要 对在不同冷冻时间和冷冻强度下臂尾轮虫休眠卵的萌发率进行了测试,结果显示,褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)休眠卵在 -18°C 冷冻20 d,萌发率提高13.9%; -30°C 冷冻60 d,萌发率提高14.4%;室外经整个冬季冻后,萼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus*)、壶状臂尾轮虫(*B. urceus*)休眠卵的萌发率平均提高了1~3倍,而角突臂尾轮虫(*B. angularis*)的萌发率却降低了近1倍。 -80°C 强冷冻2 d,褶皱臂尾轮虫休眠卵萌发率从39.5%降至1.6%。同时,本文探讨了冷冻影响轮虫休眠卵萌发的机理以及冷冻处理在北方轮虫土池生产中的实际意义。

关键词 轮虫,休眠卵,冷冻,萌发率

轮虫作为众多水产经济动物的开口饵料,已被广为利用。有关休眠卵的促浮、激活等研究工作已见报道^[1-4],冷冻对萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)新产休眠卵萌发的试验也有一些资料^[5]。但冷冻对池塘沉积物中轮虫休眠卵萌发的影响,及其生态学效应的研究尚未见报道。

近几年在敞池大规模培养轮虫的生产实践中发现,我国北方经冻底的池塘中,轮虫种群出现早、生物量大,似乎冷冻除能促进休眠卵的上浮外,对休眠卵的萌发也起到积极的作用,为探索这一问题,我们对沉积物中几种臂尾轮虫休眠卵进行了冷冻处理后的萌发实验。

1 材料与方法

1.1 材料

褶皱臂尾轮虫(*B. plicatilis*)休眠卵采自大连县辽河三角洲河蟹养殖公司2号池(池水较深,长年不冻底);萼花臂尾轮虫、角突臂尾轮虫(*B. angularis*)和壶状臂尾轮虫(*B. urceus*)休眠卵采自大连劳动公园荷花池(不冻底)和通辽热电厂鱼场3、4号池(3号池秋冬干塘,为冻塘;4号池一直积水,为不

冻塘)。均用李永函等^[6]设计的柱形采泥器采集底泥。

1.2 方法

1.2.1 冷冻时间与冷冻强度影响的测定 将底泥分成若干份,放入不同温度的冰箱内至一定天数后取出, 4°C 下解冻。以 4°C 冰箱冷藏的底泥作为对照组。

1.2.2 自然上浮卵的冷冻 自然上浮卵为由风力刮至池水表面的褶皱臂尾轮虫休眠卵(水温为 13°C)。取上浮卵的同时从底泥中浮选卵,2种卵在 -18°C 下分别冻1 h和24 h后取出解冻,同时取未冷冻的上浮卵和浮选卵作为对照组。

1.2.3 干冻底泥 试验池为秋冬排水的干冻塘($-15\sim-25^{\circ}\text{C}$),对照池为一直积水的池(不冻塘($1\sim 2^{\circ}\text{C}$))。两池均富含萼花臂尾轮虫、角突臂尾轮虫和壶状臂尾轮虫的休眠卵,早春分别采集底池。

1.2.4 萌发率的计算 将上述不同的底泥用精盐高渗液^[6]浮选卵,冲洗后,将卵分别置于含有充分曝气的10 ml小瓶中(褶皱臂尾轮虫为盐度15~20的半咸水,其它轮虫为自来水),瓶口用300目筛绢覆盖,加胶塞倒置于水中,在 $16\sim 18^{\circ}\text{C}$ 水温下培养。

透明小瓶置自然光照,小瓶涂以黑染料并缠黑胶布为无光,每组实验装瓶10~16个,每次固定2

收稿日期:1998-05-04

*农业部九五重点项目(渔95-B-96-07-05)资助

~4个平行样,计数。

萌发率 $H = [R / (E + R)] \times 100\%$ H - 萌发率/%; R - 幼轮虫/个; E - 未萌发休眠卵/个。

2 结果

2.1 冷冻时间对轮虫休眠卵萌发率的影响

实验表明,褶皱臂尾轮虫休眠卵经-18℃冷冻10、20、30 d后,在17~18℃水温,有光照条件下,萌发率分别比对照组(47.5%)提高了1.9%、13.9%和13.0%;无光照条件下,萌发率分别比对照组(32.7%)提高了11.5%、15.2%和13.8%。经 t 检验, -18℃下冷冻20 d对休眠卵萌发率的影响显著 ($t = 3.04$ $t > t_{0.01}$)。

从表1可见, -30℃冷冻60 d,有光照下褶皱臂尾轮虫休眠卵的平均萌发率提高了14.4%。在有光照下培养72 h,冷冻组萌发率较对照组慢,但至96 h,其萌发速率就远远超过对照组。

表1 -30℃冷冻60 d褶皱臂尾轮虫休眠卵的萌发率(培育水温17~18℃)

Table 1 Hatching rate of *B. plicatilis* resting eggs 60 d after frozen at culture temp. 17~18℃

培养时间/h culture periods	对照组 control group		冷冻60 d frozen 60 d	
	有光 light	无光 dark	有光 light	无光 dark
72	2.6±0.8	0.8±0.8	0.6±0.6	1.7±0.2
96	5.1±1.1	0.9±0.9	18.1±0.2	1.5±0.4
120	15.4±9.6	41.0±0.8	41.0±0.8	5.4±3.7
138	40.9±0.9	20.2±2.6	40.9±13.1	25.4±6.4
152	33.6±9.2	11.8±7.4	50.9±4.5	241±6.1
平均* mean	29.9	12.9	44.3	18.3

*为120~152 h的平均值。The mean value for 120~152 h.

图1所示-80℃强冷冻,褶皱臂尾轮虫休眠卵萌发率随冷冻时间下降明显,冷冻48 h,萌发率从39.5%降至1.6%。

2.2 冷冻强度对轮虫休眠卵萌发率的影响

图2表明,在-5℃、-18℃、-30℃下各冷冻5 d,萼花臂尾轮虫休眠卵的萌发率分别提高了9%、10.2%、27.3%;角突臂尾轮虫休眠卵-5℃冷冻萌发率提高了6.2%, -18℃冷冻萌发率降低了8%, -30℃冷冻萌发率则降低了15%。即角突臂尾轮虫休眠卵-5℃冷冻萌发率略有提高,低于-5℃的冷冻萌发率则下降。

结果还显示, -18℃冷冻4 d,有光照条件下褶皱臂尾轮虫休眠卵的萌发率从44.9%(4℃)提高至

57.2%;无光照下,从17.5%(4℃)提高至30.0%。-80℃冷冻4 d,有光组萌发率降至1.1%,无光组降到0.8%。

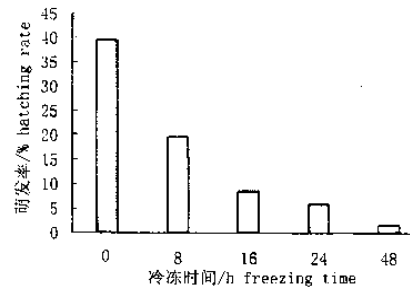


图1 -80℃下48 h内冷冻对褶皱臂尾轮虫休眠卵萌发率的影响

Fig. 1 Effects of frozen time (-80℃, within 48 h) on hatching rate of resting eggs of *B. plicatilis*

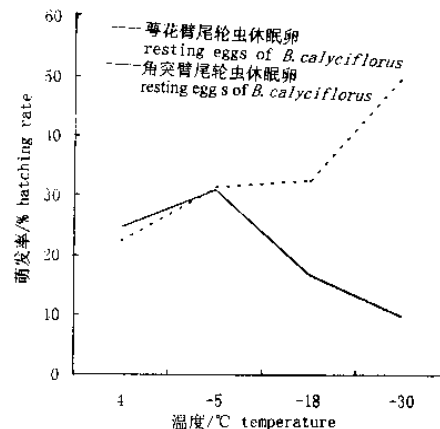


图2 不同冷冻强度下萼花臂尾轮虫、角突臂尾轮虫休眠卵的萌发率

Fig. 2 Hatching rates of *B. calyciflorus* and *B. angularis* resting eggs at different frozen temperatures

2.3 冷冻对沉积物中自然上浮卵萌发率的影响

由表2可见,水温为13℃时,自然上浮至水面的褶皱臂尾轮虫休眠卵经-18℃冷冻24 h后,其萌发率几乎下降1倍,从底泥中浮选出的休眠卵随冷冻时间延长,萌发率亦有下降趋势。

2.4 干冻底泥对轮虫休眠卵萌发率的影响

经过整个冬季,干冻过的轮虫休眠卵萌发率因种类不同而差异很大,角突臂尾轮虫休眠卵经干冻

后萌发率从 59.2% 降至 31.7%, 蓼花臂尾轮虫休眠卵萌发率从 16.6% 提高至 32.5%, 而壶状臂尾轮虫休眠卵的萌发率则从 21.5% 提高至 76.5%。

表 2 -18℃ 冷冻对水体自然上浮的褶皱臂尾轮虫休眠卵萌发率的影响(培养水温 20~22℃)

Table 2 Effect of freezing on hatching rate of floating resting eggs of *B. plicatilis* (culture temp. 20~22℃) %

冷冻条件 freezing condition	上浮卵 floatign eggs under natural condition		浮选卵 the floated eggs of control
	水中 from water	底泥中 from mud	
未冻 before frozen	95.3	95.3	61.5
冻 1h frozen for 1h	84.4	91.1	60.3
冻 24h frozen for 24h	48.4	71.2	51.8

3 讨论

3.1 冷冻对轮虫休眠卵萌发率的效果和机理

从生理生化上讲,任何休眠卵结构要发育必伴以酶的激活,良好的气体流通是酶激活的重要条件,因此,外壳不透气常常成为卵休眠的主要原因。电镜显示,轮虫休眠卵被有 3 层致密的外壳,阻隔了与外界的气体交换^[7],在休眠阶段能抵御不良环境的同时,也限制了自身的萌发,因此只能靠自然界中微生物分泌酶类去水解其外壳使之变软,让气体透过。Богословский А С^[5]认为,发育中的轮虫只有在卵壳被水沤坏,或经冷冻、干燥而软化的时候,轮虫才能由壳中孵化出来,并指出,良好的气体条件能刺激蓼花臂尾轮虫休眠卵的发育。本实验在保证良好的气体条件和适宜水温的同时,采取适宜的冷冻方式,提高了几种轮虫休眠卵的萌发率,其机理应与 Богословский А С^[5]所述观点一致。在生物界中,由于坚实的外壳或种皮而限制自身发育的例证并不罕见,皂荚和松树种子具有坚硬而不透气的种皮,只有用浓硫酸或氨水处理使其软化,透水、透气后才能萌发^[8],其原理应和轮虫休眠卵冷冻使其软化相同。陈清潮^[9]等实验表明,我国北方天然卤虫休眠卵,经晒干用海水浸透后在 -20℃ 冰冻 60 d,孵化率比未冻组平均提高了 37.5%。何志辉^①用 -4℃ 处理裸腹蚤冬卵,取得了同样提高萌发率的效果。

然而,从本实验结果看,冷冻对于仍处于自然休眠期的卵是没有促进作用的。由于该实验样本来自春季,因此混有轮虫新产休眠卵。金送笛^[10]等指

出,褶皱臂尾轮虫新产休眠卵的自然休眠期大于 12 d,所以本实验即使冷冻 10 d 萌发率也提高甚微(只提高了 1.9%),只有经更长的时间使之完成自然休眠期后,冷冻的作用才能充分显示出来。

过强的深冷冻(-80℃)会使萌发率降低,因为这种刺激不仅软化了卵壳,而且也破坏了胚胎。壳薄而体积小的角突臂尾轮虫休眠卵,经不住较低温度(-18℃)的刺激,故而萌发率降低;而同样的冷冻温度,使体积大的蓼花臂尾轮虫、壶状臂尾轮虫休眠卵萌发率提高。

此外,休眠卵经适度冷冻其生长抑制剂有可能减少,从而加速了萌发,正如 Hembers^[11]所说,低温处理能降低休眠种子生长抑制剂的含量。

有材料指出,卤虫卵经干燥失水处理,可解除卵内类胡萝卜素和蛋白质复合体组成的休眠因子^[12]。本实验中,蓼花臂尾轮虫、壶状臂尾轮虫休眠卵在大致相同低温下,野外干冻比室内湿冻(泥冻)的效果更好,这可能与干燥失水利于解除休眠抑制剂有关。

必须指出,无论何种轮虫休眠卵,在泥中冷冻和浮选出“净冻”,其效果迥然不同(表 2),“净冻”无一例外使其萌发率降低,这与过冷使卵内出现冰晶破坏了胚胎有关。Богословский А С^[5]得出的“冷冻使蓼花臂尾轮虫休眠卵萌发率下降”的结论,正是因为他使用了净冻卵法。

3.2 冷冻处理在轮虫土池生产中的应用

休眠卵是轮虫培养和土池增殖的重要“种源”,其数量及萌发率直接影响水体中轮虫高峰期发生的时间。在我国北方早繁苗种生产中,轮虫高峰出现早晚是饵料与苗种生产是否同步的关键。

本实验表明,适度冷冻(-18~-30℃)可有效促进沉积物中轮虫休眠卵的萌发,我国东北地区冬季温度多在 -10~-30℃ 低温范围,只要秋季排水冻底便可达到上述目的。实践证明,采取此措施,可使池塘轮虫高峰期的时间有所提前。从实验中还看到,冷冻对一些小型轮虫如角突臂尾轮虫萌发率非但没有提高,反而大大降低了,这一结果,可适用于轮虫种群的筛选,在培育较大口径的经济水产动物,如鲟、鲢、鳙、草鱼等的开口饵料时,可采用干冻底泥的方法,降低角突臂尾轮虫等这类小型轮虫休眠卵的萌发率,以减少其在轮虫群落中的比例;相反,在培养小口径鱼类如香鱼、银鱼等的开口饵料时,就应尽量避开干冻过的池塘,以增加角突臂尾轮虫等小型轮虫的种群生物量。

①何志辉,待发表论文。

鉴于低温(冷冻)对不加保护剂冬卵的损害(表2),早春低温可能对上浮冬卵有伤害,所以在室外土池培养轮虫时要采取促浮等培养措施必须在水温稳定于轮虫的生物学零度以上后进行。否则,过早浮起的卵将会失去萌发率,造成卵资源的浪费。

参 考 文 献

- 1 金送笛,等. 冷冻对轮虫休眠卵上浮率的影响. 中国水产科学, 1995, 2(2):49~56
- 2 G. Minkoff, 等. 影响轮虫休眠卵孵化的环境因子. 水产文摘, 1983, 104:61~69
- 3 Nipkow E. Die Radertiere in plankton des zürichsees und ihre Entwicklungsphasen. Schweiz z hydrologie, 1961, 23:398~461
- 4 Pourriot R, Snell T. Resting eggs in rotifers. Hydrobiologia, 1983, 104:213~224
- 5 Богословский А. С. Материалы к изучению покоящихся яиц коловраток (сообщение 1) бюллетень м о - ва и сй природы о м д экология т Lxv IV, 1963(6):СТР 50~67
- 6 李永函,等. 养鱼池轮虫休眠卵分布和萌发的研究. 水生生物学报, 1985, 9(1):20~31
- 7 翟宝香,等. 用电镜对两种轮虫休眠卵膜的初步观察. 大连水产学院学报, 1987(1):19~27
- 8 潘瑞炽,等. 植物生理学(下册). 北京:人民教育出版社, 1979
- 9 陈清潮. 卤虫卵的资源及提高孵化率的方法. 动物学杂志, 1975(3):21~23
- 10 金送笛. 几种轮虫需精卵休眠时间的初步研究. 中国水产科学, 1996, 3(4):66~73
- 11 Hembers T. Growth inhibiting substances in buds of Fraxinus. Physiol plant, 1949, 2:37~44
- 12 刘卓,等. 饵料浮游动物培养. 北京:农业出版社, 1990. 61~62

Influence of freezing on hatching rates of resting eggs from several species of rotifers

Liu Qing Jin Songdi Gang Jian Qin Yongqiu Chen Hongyan Li Yonghan

(Key Laboratory of Maricultural Ecology, Ministry of Agriculture, Dalian Fisheries College, Dalian 116023)

Abstract Hatching rates of resting eggs from several species of rotifers were determined in various freezing periods and at different temperatures. Hatching rates of resting eggs from *Brachinous plicatilis* increased by 13.9% at -18°C in a freezing period of 20 d and by 14.4%, at -30°C in a freezing period of 60 d. Hatching rates of resting eggs from *B. calyciflorus* and *B. urceus*, exposed to dry and cold outdoor throughout a winter in North-east China, rose from 100% to 300%, while approximately 50% of the resting eggs of *Bangularis* developed at the same conditions. The hatching rates of resting eggs from *B. plicatilis* decreased from 39.5% to 1.6% at -80°C in a freezing period of 2 d. The developing mechanism of the frozen resting eggs and a practical importance of freezing treatments in rotifer culture in earthen ponds in Northern China were discussed.

Key words rotifer, resting egg, freezing, hatching rate