

生态因子对蚤状溞休眠卵萌发率的影响

陆正和^{1,2} 杨家新¹

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京)

(2. 淮海工学院海洋与水产学院 222005 江苏 连云港)

[摘要] 蚤状溞(*Daphnia pulex*)休眠卵在不同生态条件下累积萌发率的结果显示:萌发温度为 20℃~25℃时萌发率较高,缺氧保存的休眠卵能够萌发,而有氧保存的不能萌发,曝气自来水作为萌发液萌发率较高,过滤池水较低,而曝气水和休眠卵形成时的原液居于二者之间;休眠卵缺水几乎不能够萌发,萌发率与光照时间长短无关($p > 0.05$);休眠卵保存大约 1 个月左右萌发率较高,带水低温萌发率较高,干燥低温次之,常温干燥保存最低。

[关键词] 生态因子,蚤状溞,休眠卵,萌发率

[中图分类号] Q958.1, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)03-0078-05

0 引言

枝角类是淡水浮游生物的重要类群,也是众多经济水生动物的理想开口饵料,在池塘养殖的苗种培育阶段,水体中枝角类的出现时间和数量对鱼苗的生长具有重要意义。在培育鱼苗时,清塘后的枝角类休眠卵的萌发过程影响枝角类数量的增长,进而影响鱼苗的生长。对于有关枝角类休眠卵的激活研究已见报道,冷冻、干燥对大型溞休眠卵萌发试验也有一些资料^[1-6],但有关蚤状溞休眠卵孵化时不同生态因子对其萌发率的影响及保存方式对萌发的生态学效应的研究未见报道,本实验通过以上条件对蚤状溞休眠卵萌发率的影响作一些探讨,为渔业生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 枝角类培养和休眠卵的采集

蚤状溞(*Daphnia pulex*)从南京乌龙潭公园池塘中采集,挑选携带非混交雌体的、健康活泼的雌溞进行“克隆”培养,以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)〔用 HB₃ 号培养基〕为食,温度 25℃,水为曝气的自来水(使用前充氧 24 h 以上),光照强度为 1 350 lx,光照时间比(L:D=12:12)。

第一批休眠卵的形成,在 500 mL 的烧杯中加入小球藻液,蚤状溞增殖到一定密度时,利用滤网隔离,移出部分培养液,使种群密度急剧增加,产生拥挤效应,种群自然变化产生休眠卵。多次收集保存在磨口称量瓶中,加入休眠卵形成时的培养容器中的原液和藻液于 -4℃ 的冰箱中避光保存,保存时间为 14 d,同时一个带盖密闭(缺氧),一个敞口(有氧)。

第二批休眠卵的形成,在 500 mL 的烧杯中加入蛋白核小球藻,培养温度为 25℃,使种群在短期里迅速增殖并且在种群较多时每天换水和藻液。利用微吸管一定培养液,使种群的相对密度迅速提高同时降温到 15℃,以利于休眠卵的产生。把同一天产生的休眠卵吸出,转移到带盖的称量瓶中,各瓶分别加入藻液及休眠卵形成时的培养容器中的原液,然后置于 -4℃ 的冰箱中避光保存,保存时间分别为 7、14、21、28、35、42 d。另用滤纸吸干休眠卵低温(-4℃)保存,时间为 14 d。

此外另一部分休眠采用干燥常温(20℃)、带水低温(-4℃)、干燥低温(-4℃)三种方法保存休眠卵 7~70 d。

1.2 第一批休眠卵的萌发

培养皿(直径为 5.5 cm)中分别放入曝气自来水、休眠卵形成时的培养容器中的原液及曝气自来水(1:

收稿日期:2004-04-24。

基金项目:江苏省科技厅水产三项工程资助项目(PJ2002-31)、江苏省教育厅自然科学基金(00KJB240001)资助项目。

作者简介:陆正和,1970-,淮海工学院海洋与水产学院助教,主要从事水生生物学的教学与研究,E-mail: lugh@ sina.com

通讯联系人:杨家新,1963-,南京师范学院生命科学院副教授,主要从事水生生物的教学与研究,E-mail: jiaxiny@ public1. ppt. js. cn

万方数据

1) 过滤池水 15 mL,加入保存(缺氧和有氧处理)14 d 蚤状溞休眠卵 20 个,在光照时间比为 $L:D=1:1$,光强为 1 350 lx,温度 15℃、20℃、25℃、30℃下孵化,每天更换一次萌发液。

1.3 第二批休眠卵的萌发

选取第二批保存 14 d 的蚤状溞休眠卵 20 个在与 1.2 条件相同的情况下进行萌发试验。以下实验都用第二批。

1.4 不同光照时间下休眠卵的萌发试验

取存放 14 d 的休眠卵 20 个分别放入培养皿中,温度为 25℃,光强为 1 350 lx,光照时间比为($L:D$)24:0、18:6、12:12、6:18、0:24,萌发液为 15 mL 曝气自来水。

1.5 保存时间对休眠卵萌发的影响

把保存时间(7、14、21、28、35、42 d)的休眠卵 20 个分别放入培养皿中,温度为 15℃、20℃、25℃、30℃光照为 1 350 lx,萌发液为 15 mL 自来水。

1.6 不同温度对低温干燥下的休眠卵萌发实验

取保存 14 d(4℃干燥)的休眠卵进行萌发,设置温度为 15℃、20℃、25℃、30℃,其他情况与 1.3 同。

1.7 休眠卵干燥低温、干燥常温及带水低温对萌发率的影响

取分别在 -4℃干燥、原液中保存和 20℃干燥保存 7~70 d 休眠卵,在 25℃下,用曝气自来水萌发,其他情况与 1.3 同。以上试验都进行 3 个平行样,时间持续 240 h。

1.8 休眠卵萌发率的计算

萌发率 $H=[R/(E+R)]\times 100\%$

上式中, H —萌发率/%; R —幼溞/个; E —未萌发休眠卵/个。

2 结果

2.1 缺氧与有氧处理及不同萌发液对蚤状 休眠卵萌发率的影响

第一批休眠卵在原液和藻液混合液中保存(暗处 -4℃)14 d 后,缺氧保存的蚤状溞休眠卵能够萌发,而有氧条件下的休眠卵不能萌发。用曝气自来水孵化时,蚤状溞休眠卵萌发率在不同温度下(除 25℃外),情况基本相似,一般为 1.67%~5.00%之间,25℃时为 18.33%,30℃时萌发率最低,为 1.67%,15℃、20℃居中;用曝气水加原液混合时 25℃时萌发率最高,为 11.67%,20℃时次之,为 8.33%,30℃最低为 1.67%;用过滤池水时 25℃最高为 6.67%,20℃、30℃次之为 3.33%,15℃最低,不能孵出。

一方面在有氧情况下,不论采取何种萌发液都不能使休眠卵萌发,另一方面在无氧情况下保存在同一原液中的休眠卵,用不同的介质孵化,其结果差异较大,在同一温度下最高萌发率变化较大,如 25℃下曝气自来水的萌发率达 18.33%,而曝气自来水加原液为 11.67%,过滤池水为 6.67%。

表 1 休眠卵在缺氧与有氧情况下在不同孵化液中的萌发率/%

温度/℃	曝气自来水		原液与曝气自来水体积比 1:1		过滤池水	
	缺氧	有氧	缺氧	有氧	缺氧	有氧
15	3.33±2.89	0	3.33±2.89	0	0	0
20	5.00±5.00	0	8.33±2.89	0	3.33±2.89	0
25	18.33±2.89	0	11.67±2.89	0	6.67±2.89	0
30	1.67±2.89	0	1.67±2.89	0	3.33±2.86	0

2.2 休眠卵在不同温度和萌发液下的萌发率

从表 2 中可以看出,第二批休眠卵在原液和藻液中保存 14 d 后,用曝气自来水孵化,休眠卵的萌发率 25℃时最高为 25.0%,在 30℃萌发率最低为 1.67%,15℃、20℃下萌发率为 6.67%和 16.67%;用原液和曝气的自来水萌发时,30℃下休眠卵不能萌发,20℃下为 13.33%,25℃下为 21.67%,而过滤池水萌发率 15℃为 8.33%,20℃和 25℃都为 13.33%,15℃和 30℃为 8.33%和 6.67%。

2.3 不同光照时间对休眠卵萌发率的影响

表 3 为在温度为 25℃,光照强度为 1 350 lx,昼夜时间比($L:D$)分别为 24:0、18:6、12:12、6:18、0:24 时,枝角类休眠卵的萌发率,各组间的平均萌发率分别为 20.0%、23.3%、25.0%、21.67%和 3.33%,前面四组表明光照时间与萌发率无直接关系($p>0.05$),而在暗处休眠卵很难萌发,光是休眠卵萌发的必要条件,但
万方数据

非充分条件.

表 2 保存在原液中休眠卵在不同温度和萌发液下萌发率/%

温度/℃	曝气自来水	原液与曝气自来水体积比 1:1	过滤池水
15	6.67±2.89	13.33±2.89	8.33±2.89
20	16.67±2.89	18.33±2.89	13.33±2.89
25	25.00±5.00	21.67±7.63	13.33±2.89
30	1.67±2.89	0	6.67±2.89

表 3 不同光照时间蚤状蚤休眠卵累积萌发率

昼夜时间比(L:D)	24:0	18:6	12:12	6:18	0:24
累积萌发率/%	20.00±5.00	23.33±2.89	25.00±5.00	21.67±7.63	3.33±2.89

2.4 不同保存时间对休眠卵萌发率的影响

从表 4 中可以看出,不同温度下的休眠卵的萌发率与贮存时间有关,在温度为 15℃时,萌发率以贮存 42 d 为最高,达 13.33%;而在 20℃下,其萌发率分别为 6.67%、16.67%、18.33%、18.3%、16.67%、11.00%.本实验中休眠卵萌发时间在 14~42 d 内最佳时间.从萌发的结果来看,休眠卵在-4℃无光、缺氧的条件下保存的时间长短影响其萌发率.随着时间的延长,休眠卵的萌发率在增加,可能本实验所保存的时间在休眠卵有效范围之内.至于在 42 d 以后,休眠卵萌发率是否上升,还待进一步研究.

表 4 不同保存时间的蚤状蚤休眠卵累积萌发率/%

萌发温度/℃	保存时间/d					
	7	14	21	28	35	42
15	3.33±2.89	6.67±2.89	8.33±2.89	8.33±2.89	10.00±5.00	13.33±2.89
20	6.67±10.0	16.67±2.89	18.33±2.89	18.33±2.89	16.67±2.89	11.0±2.89
25	8.83±5.00	25.00±5.00	36.67±5.78	38.33±2.89	33.33±2.89	28.33±2.89
30	0	1.67±2.89	10.00±5.00	13.33±2.89	15.00±5.00	21.67±2.89

2.5 休眠卵保存在干燥中不同温度下的累计萌发率

如表 5 所示:低温干燥中保存的休眠卵其萌发率较低,用曝气的自来水萌发时,休眠卵的萌发率 25℃下萌发率为 8.33%,在 30℃下没有能萌发,而在 15℃和 20℃下为 1.67%和 3.33%;休眠卵在原液和曝气混合萌发率在 25℃下为 3.33%,其它情况下基本一样,萌发率范围为 0~1.67%,用过滤池水萌发,15℃下萌发率为 1.67%,20℃下为 6.67%,25℃下为 3.33%,而在 30℃萌发率为 5.00%,从以上情况来看,休眠卵在干燥保存时萌发率较低,可能与滞育卵所受的环境有关.

表 5 干燥保存的休眠卵在不同萌发液中和不同温度下的累计萌发率

温度/℃	曝气自来水	原液与曝气 自来水体积比 1:1	过滤池水
15	1.67±2.89	0.00±0.00	1.67±2.89
20	3.33±2.89	1.67±2.89	6.67±2.89
25	8.33±2.89	3.33±2.89	3.33±2.89
30	0.00±0.00	1.67±2.89	5.00±5.00

2.6 休眠卵低温和干湿处理及保存时间对萌发率的影响

如表 6 所示,休眠卵在干燥-4℃下,分别保存 7、14、21、28、35、42、49、56、63 d 后,经 240 h 萌发,休眠卵萌发率与保存时间有此关系: $Y = -0.0266X^2 + 2.0082X - 11.345$.保存 42 d 的休眠卵累积萌发率最高(28.33%),而保存 7 d 萌发率最小(1.67%).休眠卵最佳萌发时间应该为 21~49 d,萌发率在 21%~18%之间;干燥常温保存(20℃),休眠卵萌发率与保存时间的关系为: $Y = -0.0158X^2 + 1.1584X - 8.579$.保存 49 d 的萌发率最高(为 16.67%),而保存时间为 7 d 的未能萌发,在 14 d 为 1.67%,保存时间 21、28、35 d 的萌发率基本接近分别为 10.00%、13.33%和 11.00%,而在 56、63 d 萌发率很低(1.67%和 3.33%);带水低温(4℃)休眠卵孵化率与所需时间方程为: $Y = -0.0313X^2 + 2.1367X - 1.2057$.保存 42 d 萌发率最高位 38.33%,保存 7 d 的萌发率最低(8.33%),休眠卵保存的最佳萌发时间为 14~49 d,萌发率范围为 25.00~38.33%,因此进行萌发时休眠卵保存 1 个月为宜.

表 6 不同保存方法和时间下蚤状蚤休眠卵累积萌发率/%

保存时间/d	7	14	21	28	35	42	49	56	63
干燥低温	1.67±2.89	8.33±2.89	21.67±2.89	26.67±2.89	25.00±5.00	28.33±2.89	18.33±2.89	16.67±2.89	11.67±2.89
干燥常温	0.00±0.00	1.67±2.89	10.00±5.00	13.33±2.89	16.67±2.89	11.00±2.89	10.00±2.89	1.67±2.89	3.33±2.89
带水低温	8.83±5.00	25.00±5.00	36.67±5.78	38.33±2.89	33.33±2.89	28.33±2.89	25.00±5.00	18.33±2.89	11.67±2.89

3 讨论

3.1 影响枝角类休眠卵萌发的主要因子

枝角类休眠卵的萌发分为两个阶段,即暗反应的孵育阶段和光反应的萌发阶段^[3,6]。本实验结果表明影响休眠卵萌发率主要与休眠卵的质量、暗反应阶段休眠卵的处理方式和保存时间以及萌发阶段萌发液的选择、温度、光期等有关。

早期的研究表明,模拟自然刺激可以激活休眠卵萌发。Schwartz 和 Hebert^[2]发现低温、冷冻和干燥保存都能促进溞属休眠卵萌发。Stross^[6]研究表明低温和光照是蚤状溞休眠卵萌发的必要条件,这与本研究的结果相一致。

枝角类休眠卵萌发必须要经过一定的滞育期,接受足够的刺激才能萌发^[1]。如滞育期在夏季持续几天或几周,在秋、冬季则持续几个月。滞育期的长短因种类以及外界条件而不同,即使同一个种,在同样条件下,滞育期也有变动。北极的蚤状溞休眠期为 5~13 d。在泥土中干燥 20 年以上的冬卵仍能孵出幼溞。然而,对于多刺裸腹溞通过人为的改变饵料及水温可以获得大量休眠卵^[3]。且休眠卵无休眠期,适宜条件下可以孵化。

环境条件对于枝角类的休眠卵的萌发的影响因种类而异,生态因子可通过不同的方式影响休眠卵的过程和休眠期的长短及萌发率的高低。

对于保存在 -10℃ 下,经过 7 d 的(寒冷带和温带)暗反应的蚤状溞休眠卵^[2],后在 7℃、14℃、21℃ 萌发,结果表明高寒地区的在温度高于 7℃ 下,萌发率极差,而温带的则相反,而本实验中休眠卵保存(带水 -4℃)的最佳时间为 1 个月左右。

休眠卵保存在曝露的空气环境下,未能萌发,而在氧很少的环境下,能够萌发,可能是休眠卵滞育期必须要经过一定的缺氧的逆境过程,这样才能使幼体减少代谢,促进胚胎能量的积蓄,为萌发打下基础。

休眠卵经过滞育期后,还需要一定的水温及萌发液才能萌发。从表 1、2 中看出,保存在原液中的休眠卵在 25℃ 下萌发率较高,另外在曝气自来水中萌发率高于其他情况。

光照时间是影响休眠卵萌发的主要因子,休眠卵在低温中长时间保存,在适温(15~30℃)下萌发,如果没有光照,萌发率为 3.33%,Pancella 和 Stross 也发现光可以刺激休眠卵的萌发。Stross 也发现如果没有光刺激,休眠卵萌发率不超过 2.00%。且光的刺激与休眠卵的保存时间无关。Davison 指出光的刺激作用触发了酶的活性部位物质的释放。本实验中光期长短与萌发率无关。

休眠卵在间歇水体要反复经过干涸、低温或冰冻等自然条件的变化,才能萌发。本实验中休眠卵在低温(-4℃)干燥保存情况下,休眠卵萌发率较低,在曝气自来水中萌发率低于 8.33%,而在池水中萌发率比曝气自来水稍为高一点,说明休眠卵孵化中,用带水保存比干燥保存效果好。

休眠卵的质量对萌发率的影响很大,在不同时间采集的两批卵,分别在 4℃ 下保存 14 d 后进行萌发,其萌发率第一批明显低于第二批,这是由于第一批采集的休眠卵的质量低于第二批,一方面休眠卵空鞍多,饥饿导致卵中营养不足,发育迟缓,积蓄的能量少,最终导致休眠卵萌发受阻,也有可能突然减少食物浓度和增加种群密度对产生休眠卵有促进作用。

3.2 休眠卵萌发在养殖业上的实际意义

休眠卵以何种方式贮存最好?贮存多少时间的萌发率最高?何种生态条件下,能使枝角类休眠卵在短期间萌发率最高?上述问题决定着枝角类商品化生产是否可行,能否被推广应用。在生产上,人们非常关心休眠卵的累积萌发率,因为绝大部分休眠卵在短期间孵化处理进入孤雌生殖阶段,迅速使种群密度增加,保证育苗需要。

水生态毒理学研究中,为减少实验误差,提供实验精度,必需使用同步萌发的幼溞,在短时间内获得足够的实验材料,显示同步萌发的重要性。

可见,深入研究环境因子对枝角类休眠卵萌发率的影响对枝角类集约化生产十分重要。

[参考文献]

- [1] 蒋燮治, 堵南山. 中国动物志: 淡水枝角类 [M]. 北京: 科学出版社, 1979. 24—77.
- [2] Stevens, Schwartz and Pauld D N Hebert Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia* [J]. *Freshwater Biology*, 1987, 17 (3) 373—379.
- [3] 程汉良, 刘汉. 枝角类适种探索和休眠卵的利用 [J]. *水产科学*, 1999, 18 (5) 8—11.
- [4] 李远函. 鱼塘轮虫休眠卵分布和萌发研究 [J]. *水生生物学报*, 1985, 9 (1) 20—30.
- [5] 陈菊芳, 周洁, 黄祥飞. 萼花臂尾轮虫休眠卵萌发的研究 [J]. *应用生态学报*, 1998, 9 (1) 67—70.
- [6] STROSS R G. Light and temperature requirements for diapause development and release in *Daphnia* [J]. *Ecology*, 1966, 47 (3) 368—374.

Effects of Ecological Factors on the Hatching Rate of Resting Eggs of *Daphnia Pulex* (Crustacea : Cladocera)

Lu Zhenhe^{1, 2}, Yang Jiaxin¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. School of Ocean and Fishery, Huaihai Institute of Technology, 222000, Lianyungang, China)

Abstract One mother female of *Daphnia pulex* which was collected in WulongTan garden in Nanjing was fed on diet of green algae *Chlorella pyrenoidosa* in medium of HB₄ as original material under the condition at temperature 25℃, in photoperiod of $L:D = 12:12$ (light to dark) and the intensity of illumination of 1 350 lx.

The resting eggs used in experiments were formed by means of crowding population of daphnia in test tubes, then them were collected and stored in different condition in order to used in different hatching experiments.

In order to observed the hatching rate of resting eggs which stored in oxygen and anoxia condition, the 20 individual resting eggs which stored in 14 days were placed in Petri dish and were hatched in in tap water, filtered pool water and in medium of resting eggs were formed in former at intensity of illumination of 1 350 lx at 5℃, 20℃, 25℃ and 30℃.

Another groups of resting eggs which stored in 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days were used to study the effect of stored time on hatched rate. These eggs were hatched in 15 ml aerated tap water at 15℃, 20℃, 25℃, 30℃ and in intensity of illumination of 1350 lx. the eggs stored in 14 days were used to observed the hatching rate in photoperiods of 24:0, 18:6, 12:12, 6:18 and 0:24 ($L:D$).

The resting eggs which stored in dryness an at -4℃, in medium of resting eggs formed and in dryness at 20℃ in 7~70 days were hatched at condition as described in above.

The results show that the rates of RE were higher when hatched at 20℃ and 25℃ than that in others. The RE stored in anoxic condition could be hatched but could not be hatched stored in oxygenous condition. The highest rate was observed when hatched in aerated water, on the contrary, the lowest rate was found in filtrated lake water. The rate hatched with aerated water mixed with media that resting egg formed is between the rates hatched with aerated water and filtrated pond. The RE are not to be hatched in dark. The hatching rate are not associated with the light photoperiod ($p > 0.05$). RE hatch rate highest when stored -4℃ about a month. RE stored in wet hatch better than in dry way at lower temperature. in additional, in normal temperature (20℃) the rate of RE is lowest.

Key words ecological factors, *Daphnia pulex*, resting eggs, hatching rate

[责任编辑 孙德泉]