

三品系中国卤虫卵的激活和提高孵化率的研究

陈马康 王发进 童合一

(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘要 在室温、4℃或-25℃,用温度—CO₂系列激活(或处理)河北乐亭、青海尕海和山东羊口卤虫卵,并以空气和饱和 NaCl 溶液系列处理作对照,其结果为:(1)乐亭卤虫卵经4℃—100% CO₂处理90天,孵化率可达93.3%;尕海卤虫卵经-25℃—20% CO₂处理60天,孵化率可达90.2%等;而羊口卤虫卵孵化率提高幅度不大。(2)用CO₂处理乐亭卤虫卵时,无论在室温或4℃—100% CO₂时,其孵化率上升趋势都比空气、饱和 NaCl 溶液系列的处理效果好;(3)用温度—CO₂系列处理尕海和羊口卤虫卵,其孵化率上升趋势,都不及饱和 NaCl 溶液系列。

关键词 卤虫休眠卵,激活,孵化率

在许多水产经济动物育苗中,作为苗种的生物饵料——卤虫(*Artemia*)初孵的无节幼体,占有极为重要地位。我国卤虫资源十分丰富[卞伯仲 1990,任慕莲等 1996],但市售国产卤虫卵质量大多低劣,杂质含量高,孵化率低,大多在40%~60%之间,少有80%以上者,故提高国产卤虫卵质量已成为当务之急。

刚产下的卤虫休眠卵具有某种内源生理机制,保持在滞育状态,即使在适宜条件下,其孵化率也很低。只有经过某种特定环境的刺激才能终止滞育,恢复正常生理代谢。滞育状态被消除的活性卵(activated cysts)或静止卵(quiescent cysts)在外部环境适宜时,可孵育出无节幼体。国内对卤虫卵滞育的研究起步较晚,用于滞育的方法有脱水、低温、光照、3%~5% H₂O₂、3%甲醛和淡水处理等十多种[卞伯仲 1990,李茂堂等 1982,陈清潮等 1975,杨娜等 1989],但未见用CO₂激活的报导。本文主要阐述以CO₂为主要激活手段,并与空气及饱和 NaCl 溶液处理作比较,研究我国三品系卤虫卵激活的结果,为卤虫卵加工提供新的有关参数、途径,以利于我国卤虫卵加工国产化的进程。

1 材料和方法

1.1 材料

卤虫休眠卵(以下简称卤虫卵)于1996年8月10日至16日分别采收于青海尕海盐湖和山东羊口盐田(已阴干三天),于1996年10月1日采收于河北乐亭盐田。

1.2 方法

孵化率测定:称取0.25g卤虫卵,倒入100 mL量筒,加入100 mL盐度为35海水(由浓缩海水和自来水配制),充气使卵悬浮1小时后,用微量吸液管吸取5个样品,每个约100粒卵,

移至滤纸上,在解剖镜下计算卵数(C_i),然后将样品分别用海水冲至 100 mL 烧杯中,再加入孵化用海水至 80 mL,放入光照培养箱并保持 25℃和 2 000 lx 光照进行静水孵化。48 小时后,滴加碘液,计算 5 个样品的无节幼体数(N_i)。孵化率 = $N_i/C_i \times 100\%$ 。

用温度— CO_2 系列处理:将三品系卤虫卵各 1 g 放入锥形瓶,充以 CO_2 气体,占该瓶体积的 20% 或 100%,然后放置在室温、4℃和 -25℃的空气中进行处理(室温为 5~32℃,自 1996 年 8 月 20 日至 1997 年 2 月 7 日,以下均同)。

用温度—空气系列和温度—饱和 NaCl 溶液系列处理对照:将三品系卤虫卵分别放置在室温、4℃和 -25℃的空气中进行处理,或将三品系卤虫卵分别浸泡在饱和 NaCl 溶液中,然后放置在室温、4℃和 -25℃的空气中进行处理。

在上述处理的卤虫卵中,每隔一定时间取出一份样品并测定孵化率。从 4℃时取出的样品需在室温中放置 24 小时,从 -25℃时取出的样品需在室温中放置 10 天后进行孵化率测定。

用 t 检验法检验孵化率显著性差异。

2 结果

2.1 温度— CO_2 系列处理的效果

乐亭卤虫卵在三种温度—20% CO_2 分别处理后,孵化率都能提高,但提高幅度不同,变化规律不一。在室温—20% CO_2 处理后,孵化率随时间延续而几乎成直线上升,直到 157 天达到 89.4%;在 4℃—20% CO_2 处理后,孵化率呈上下波动状态,90 天的孵化率比 61 天和 120 天的低 22%;在 -25℃—20% CO_2 处理后,孵化率先上升后下降,到达 20 天时即提高 38.2%,91 天时达到最大值 66.0%,之后又下降。乐亭卤虫卵经室温— CO_2 和 4℃—100% CO_2 系列处理后,孵化率有明显提高,其最大增幅达 70.2%~72.7%,最高达 93.3%。在 -25℃—100% CO_2 处理后,孵化率呈先上升后下降的趋势(表 1)。

琼海卤虫卵在 -25℃—20% CO_2 处理后,孵化率呈直线上升,至 60 天达到峰值 90.2%,再呈下降趋势。室温— CO_2 和 4℃— CO_2 系列处理的孵化率都不超过 62.3%(表 1)。

羊口卤虫卵经两个低温— CO_2 处理效果均好于室温— CO_2 ,但两者增幅值差不大,其孵化率都在 59.4% 以下(表 1)。

2.2 相同温度,不同方法处理一品系卤虫卵的结果

乐亭卤虫卵:室温— CO_2 处理的孵化率呈较快上升趋势,到 63 天时分别达到 51.9%(20% CO_2)和 58.4%(100% CO_2),到 157 天时两者都达到 89.0% 以上。而空气和饱和 NaCl 溶液处理结果均不理想(图 1)。在 4℃时,100% CO_2 处理后,孵化率上升幅度很大,36 天时达到 64.8%,90 天时达到 93.3%。而 20% CO_2 和其他方法处理结果相似,上升幅度不大,都没有超过 48.7%(图 2)。在 -25℃时,其前 90 天,4 种处理结果呈较快上升趋势,其中空气处理结果变幅较大,23 天为 64.8%,60 天上升至 85.0%,而 90 天又降至 58.6%;其余三者均在 60%~78.7% 之间。120 天后饱和 NaCl 溶液处理和空气处理的孵化率仍保持较高水平,分别为 85.9% 和 83.6%。而 CO_2 处理的孵化率则明显下降至 39.8% 以下(图 3)。

表 1 温度—CO₂ 系列处理三品系卤虫卵的效果

Table 1 Effect of temperature-CO₂ system treatments on the hatchability of the three strains of *Artemia* cysts

CO ₂ 浓度 (%)	温度 (°C)	乐亭卵		尕海卵		羊口卵	
		处理时间(天)	孵化率	处理时间(天)	孵化率	处理时间(天)	孵化率
对照组		0	16.3 ^{a*}	0	26.7 ^a	0	21.8 ^a
20	室温	20	29.3 ^b	14	31.7 ^b	11	31.2 ^{bc}
		63	51.9 ^{ab}	53	30.8 ^{ab}	70	27.4 ^b
		96	61.2 ^{di}	93	30.2 ^{ab}	98	27.5 ^{ab}
		157	89.4 ^{ak}	162	25.1 ^c	162	28.9 ^{bd}
20	4°C	13	21.4 ^f	33	37.6 ^{bcg}	11	28.7 ^{bd}
		36	36.6 ^g	50	20.7 ^{cd}	60	38.4 ^{cf}
		61	42.6 ^h	90	14.9 ^d	90	35.6 ^{cdf}
		90	20.2 ^{af}	121	17.6 ^{dh}	121	41.7 ^{ce}
		120	42.4 ^h	154	16.7 ^d	154	48.0 ^e
20	-25°C	20	54.5 ^{ab}	20	32.1 ^b	13	33.4 ^c
		61	57.8 ^{cdj}	60	90.2 ^e	60	41.0 ^{ef}
		91	66.0 ⁱ	90	62.3 ^f	90	36.4 ^{cdf}
		120	38.6 ^{gh}	121	39.9 ^g	121	59.4 ^g
		150	39.8 ^{gh}	154	44.8 ^g	152	46.6 ^e
100	室温	20	27.6 ^b	14	25.9 ^a	11	32.4 ^c
		63	58.4 ^{dj}	53	15.6 ^d	148	37.7 ^{cf}
		96	54.8 ^{cd}	93	22.7 ^{gh}		
		157	89.0 ^{ak}	162	32.5 ^b		
100	4°C	13	29.2 ^b	33	26.6 ^a		
		36	64.8 ^{ij}	50	20.6 ^{cd}		
		61	66.2 ⁱ	90	15.1 ^d		
		90	93.3 ^e	121	20.1 ^{cd}		
		120	86.5 ^k	154	15.0 ^d		
100	-25°C	20	43.8 ^{hi}	20	34.2 ^{bcg}	30	49.1 ^e
		61	73.1 ^m	60	41.9 ^g	58	38.9 ^{cf}
		91	75.5 ^m	90	24.6 ^{ce}	90	43.8 ^{ef}
		120	47.4 ^{lm}	121	31.7 ^b	120	50.3 ^e
		150	19.5 ^{af}	154	22.9 ^{gh}	152	42.4 ^{ef}

*: 每列标有不同英文字母的数字间存在显著差异 (P < 0.05)

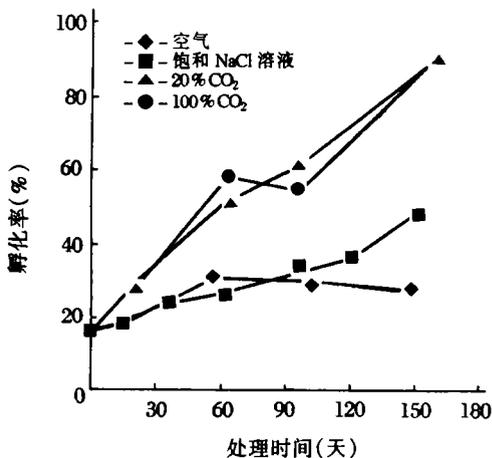


图 1 乐亭卤虫卵在室温下进行不同处理的孵化率

Fig.1 H(%) of LT cysts after various treatments at room temperature

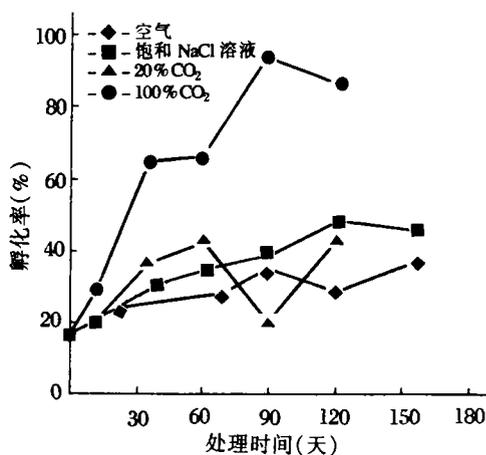


图 2 乐亭卤虫卵在 4°C 下进行不同处理的孵化率

Fig.2 H(%) of LT cysts after various treatments at 4°C

杂海卤虫卵:在室温、4℃或-25℃时,各种处理结果都以饱和 NaCl 溶液最佳。在室温和4℃时,CO₂和空气处理结果都在37.6%以下,而饱和 NaCl 溶液处理后孵化率最高可达58.8%或61.1%(图4和图5)。在-25℃时,饱和 NaCl 溶液和20% CO₂处理后的孵化率分别提高至92.8%(30天)和90.0%(60天)。前者一直可保持在该水平之上,而后者呈现大幅度下降,仅稍高于空气和100% CO₂(图6)。

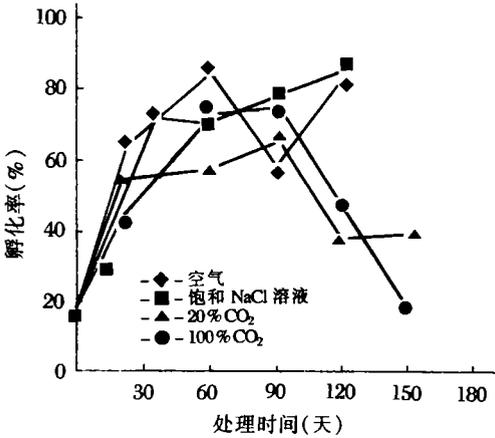


图3 乐亭卤虫卵在-25℃下进行不同处理的孵化率

Fig.3 H(%) of LT cysts after various treatments at -25℃

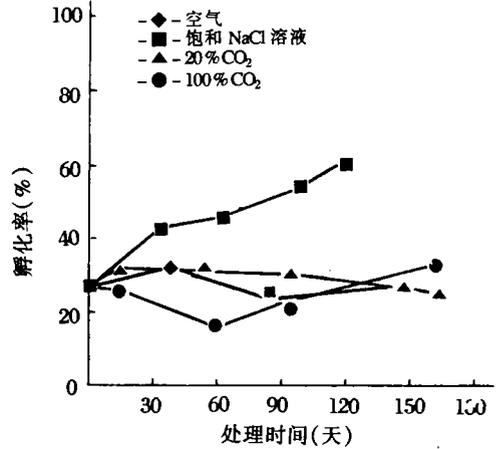


图4 杂海卤虫卵在室温下进行不同处理的孵化率

Fig.4 H(%) of GH cysts after various treatments at room temperature

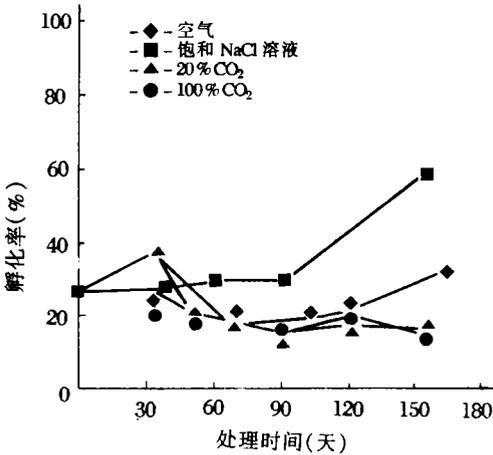


图5 杂海卤虫卵在4℃下进行不同处理的孵化率

Fig.5 H(%) of GH cysts after various treatments at 4℃

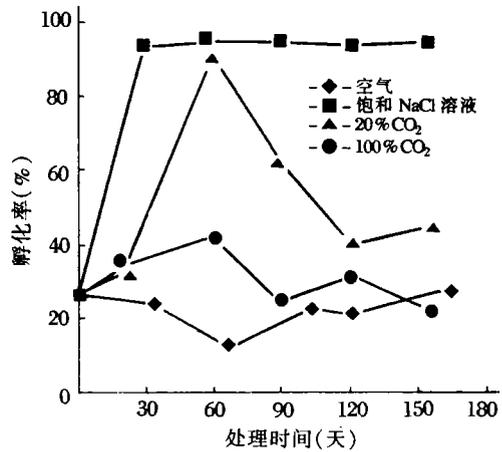


图6 杂海卤虫卵在-25℃下进行不同处理的孵化率

Fig.6 H(%) of GH cysts after various treatments at -25℃

羊口卤虫卵:均以饱和 NaCl 溶液处理结果为好。在室温、4℃和 -25℃时,处理 120~157 天,最高孵化率分别达到 53.8%、68.7%和 91.4%,而其他方法处理后的孵化率都在 59.4%以下。仅在室温时,空气处理前期稍高于 CO₂ 等方法(图 7、图 8 和图 9)。

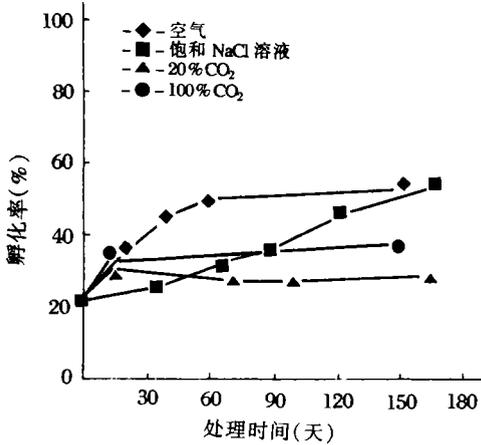


图 7 羊口卤虫卵在室温下进行不同处理的孵化率

Fig. 7 H(%) of YK cysts after various treatments at room temperature

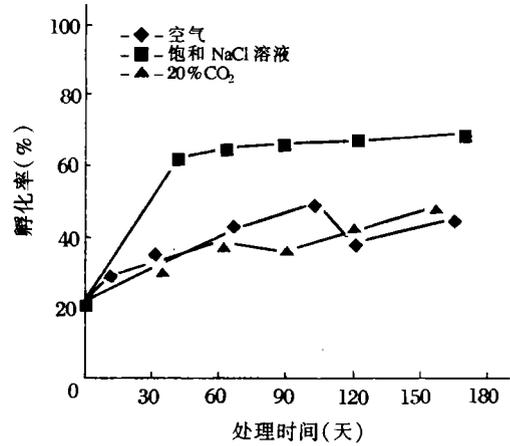


图 8 羊口卤虫卵在 4℃下进行不同处理的孵化率

Fig. 8 H(%) of YK cysts after various treatments at 4°C

3 讨论

卤虫休眠卵是一种在恶劣环境中产生的卤虫卵,这种卵会保持一段时间的滞育状态,受到某些特定环境信号激活可以终止这种状态,恢复正常代谢。终止滞育方法很多,Drinkwater 等[1990]指出 SFB(美国加利福尼亚旧金山湾)卤虫栖息在一个变动、不稳定的环境,滞育消除与脱水、低温、高浓度 CO₂ 相关。高浓度 CO₂ 是又一个激活卤虫卵的重要因子 [Drinkwater 等 1987、1990]。CO₂ 对乐亭卤虫卵的激活作用明显,其中 100% CO₂ 比 20% CO₂ 能激活更多卤虫卵。除了在 4℃—20% CO₂ 处理后活性卵提高比例较小(26%)外,其余的 CO₂ 处理中活性卵提高比例都在 50%~77%;对激活尔海卤虫卵也很有效,20% CO₂

(-25℃, 60 天)使活性卵的比例从 26% 上升到 90%;CO₂ 使羊口卤虫卵激活幅度较小(37%)。对尔海卤虫卵而言,-25℃20%CO₂ 激活效果远比 100% CO₂ 系列好。可能是 20% CO₂ 和低温协同作用更有效,而 100% CO₂ 过量的缘故。Stross[1971]曾用光和 CO₂ 促使裸腹蚤(*Daphnia*)胚胎激活,并认为它们都参与了激活过程。Sommerville [1964]也认为高压 CO₂ 能消除一种线虫的滞育。CO₂ 压力的增大降低了卤虫卵胚胎内 pH,从而如缺氧一样抑制了胚胎的呼吸和发

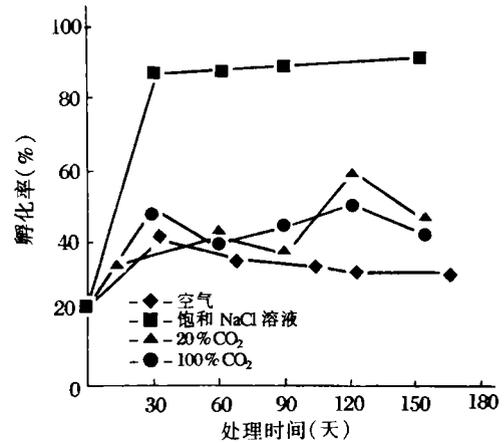


图 9 羊口卤虫卵在 -25℃下进行不同处理的孵化率

Fig. 9 H(%) of YK cysts after various treatments at -25°C

育[Drinkwater 1990]。已知 CO_2 是能够渗透至卤虫卵外表皮的最大分子[Sorgeloos 等 1986]进入胚胎后很可能参与了激活代谢过程。

和空气、饱和 NaCl 溶液的处理结果比较, CO_2 不失为一种有效的激活环境信号, 它具有重量轻、运作方便等特点。但 CO_2 来源和使用普及性不如饱和 NaCl 溶液。本试验结果表明, CO_2 作为激活手段运用于卤虫卵加工业的前景是可喜的。

参 考 文 献

- 卞伯仲. 1990. 实用卤虫养殖及应用技术. 北京: 农业出版社. 9~30
- 任慕莲, 郭 焱, 王基琳等. 1996. 中国西北盐湖卤虫生态及资源. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社. 31~52
- 李茂堂, 郑 尹, 田风琴. 1982. 去壳卤虫卵在水产养殖中的应用. 海洋湖沼通报, (1): 45~49.
- 杨 娜, 卞伯仲, 李明仁. 1989. 中国卤虫卵孵化特性的研究. 水产学报, 13(4): 285~297.
- 陈清潮, 孙道无, 黎国珍等. 1975. 卤虫卵的资源及提高孵化的方法. 动物学杂志, (3): 21~23.
- Drinkwater L E, Crowe J H. 1987. Regulation of embryonic diapause in *Artemia*: environmental and physiological signals. J Exp Zool, 241~297.
- Drinkwater L E, Clegg J S. 1990. Experimental biology of cysts diapause. In: Browne R A, et al, eds. *Artemia* Biology. the United States: CRC Press USA. 93~114.
- Stross R G. 1971. Photoperiod control of diapause in *Daphnia* IV. Light and CO_2 -sensitive phases within the cycle of activation. Biol Bull, 140: 137.
- Sommerville R I. 1964. The effect of carbon dioxide on the development of third stage larvae of *Haemonchus contortus* in vitro. Nature, 202, 316.
- Sorgeloos P, Lanous P, Léger P, et al. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. State University of Ghent, Belgium. 319.

ACTIVATION AND INCREASE IN HATCHABILITY OF THREE STRAINS OF ARTEMIA CYSTS FROM CHINA

CHEN Ma-Kang, WANG Fa-Jin, TONG He-Yi

(Fisheries College, Fisheries University of Shanghai, 200090)

ABSTRACT *Artemia* cysts from Laoting salterns in Hebei(LT cysts), Gahai salt Lake in Qinghai (GH cysts) and Yangkou salterns in Shandong(YK cysts) was activated by the CO_2 treatment at room temperature, 4°C or -25°C respectively. The control was immersed in saturated NaCl solution and exposed to the air. The results showed that: (1) Hatchability(%) of LT cysts exposed to 4°C —100% CO_2 for 90 days was 93.3% and hatchability of GH cysts exposed to -25°C —20% CO_2 for 60 days was 90.2%, while hatchability of YK cysts exposed to CO_2 had little increase. (2) Generally, hatchability of LT cysts was increased more highly by 100% CO_2 treatment at room temperature ($5\sim 32^\circ\text{C}$) or 4°C than that by air and saturated NaCl solution. (3) Hatchability in GH and YK cysts increased by CO_2 treatment was not as good as that by treatment in saturated NaCl solution.

KEYWORDS *Artemia* cysts, Activation, Hatchability