

密度和温度对萼花臂尾轮虫 产卵量和混交雌体的影响^{*}

杨家新 黄祥飞

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 用小球藻(*Chlorella sp.*)为食培养萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*), 食物浓度约 1×10^6 cells/mL, 温度 25℃, 光照强度约 4000 lx, 昼长比 LD=18:6。在 1.0mL、0.5mL 和 0.25mL 培养液中同时进行单个体和群体培养。结果发现: 1) 单个体培养时每个母体平均产卵量分别为 12.0, 13.8 和 7.8 个; 后代个体中混交雌体的百分比分别是 46.38%, 53.49% 和 55.83%。2) 群体培养时, 每个母体平均产卵量分别为 8.7, 3.1 和 2.65 个, 随密度增加而减少; 后代个体中混交雌体百分比分别为 41.70%, 53.59% 和 54.26%。群体培养的密度为 4.0ind./mL 与 2.0ind./mL, 2.0ind./mL 与 1.0ind./mL 混交雌体的百分比差异不明显。母体密度高低与后代混交雌体百分比间具有明显相关性。在上述培养条件下, 轮虫为 1.0ind./mL 时, 进行单个体培养, 分别用急剧冷休克(SS)、逐渐冷休克(GS)和恒温对照(C)进行处理, 结果表明: 个体平均产卵量分别为 10.8、9.2 和 12.6 个。后代混交雌体百分比分别为 32.85、20.7 和 16.87, SS 和 C 处理后其混交雌体比例具显著差异, 而 SS 和 GS, GS 和 C 处理间没有显著差异。

关键词 萼花臂尾轮虫 混交雌体 密度 温度 产卵量

1 前言

轮虫(Rotifer)是淡水浮游动物中的一个重要类群,也是当前养殖业中不少特种水产品的开口饵料和优质食物。可是,当前我国对轮虫繁殖生物学的研究甚少,如能搞清一些重要环境因子,如密度、温度对轮虫种群中非混交雌体(amictic female)及混交雌体(mictic female)形成的影响,这样既可为延长轮虫指数增长期创造稳定的生产条件,另一方面又可为生产轮虫休眠卵提供理论依据。

有关轮虫混交雌体形成的原因,国外学者众说纷纭,莫衷一是^[1~5]。Buchner 提出:轮虫混交雌体的出现与其拥挤效应(Crowding effect)密切相关,他首先固定培养液的体积,通过改变轮虫数以调整密度,其结果为混交雌体的比例与密度呈正相关;他又固定轮虫数,改变培养液体积以调整密度时,混交雌体的比例与密度不呈正相关。Gilbert 认为轮虫在幼体期间向环境分泌、排泄出某种化学物质可诱导混交雌体的产生^[2]。D' Abramo 认为种群密度增

* 国家自然科学基金资助项目(编号:39270098)。

收稿日期:1995-06-01;接受日期:1996-04-22。

作者简介:杨家新,男,1964年生。1989年湛江水产学院毕业,现为中国科学院水生生物研究所博士生,主要从事轮虫繁殖生物学研究。

加一定程度时,水体的光照条件受到影响,藻类的光合作用降低,使种群食物供应受到限制,最终导致混交雌体的产生^[6]。

本试验以淡水常见的优势种萼花臂尾轮虫为对象,研究种群密度和环境温度对其产卵量的影响和对后代混交雌体形成的诱导作用,以期为轮虫工厂化生产提供理论依据。

2 材料与方 法

2.1 实验材料的培养

实验材料是在湖水温度 25℃左右时,用 25 号浮游生物网从东湖中捞取的样品,在解剖镜下挑选一个健壮、携带非混交卵的雌体为试验亲体,在实验室内进行“克隆”培养。轮虫培养液采用 Gilbert 配方。以小球藻为食物,为避免小球藻培养基的影响。投喂前用轮虫培养液(用离心机在 4000 转/min 下离心 30min)反复冲洗 3~4 次,然后再用轮虫培养液把小球藻密度调至 1×10^6 cells/mL,光照强度约 4000 lx,昼长比 LD18:6,温度 25 ± 1 ℃。培养期间每天更换一次培养液并检查轮虫产卵的状况,使轮虫密度低于 1.0 个/mL。

2.2 雌体鉴别

试验组轮虫产的卵孵化后,立即用吸管移至一培养皿中进行隔离培养用以鉴定子代轮虫的类别。每一母体所产的后代均集中在同一培养皿中。根据其成熟后携带卵的大小、每次携带卵的数目以及卵的胚胎发育状况鉴别雌体类型^[2,7]。轮虫所产之卵均为椭圆形,雄性卵数目多,一般均在 5 个以上、个体较小,长、短径一般在 $100 \sim 100 \mu\text{m} \times 75 \sim 85 \mu\text{m}$ 之间,它的大小只有非混交卵的 2/3 大;非混交卵无色、透明、可见胚胎发育过程,尤其在胚胎早期可见咀嚼器的几丁质板;混交雌体受精后形成褐色的休眠卵,长径一般超过 $150 \mu\text{m}$ 以上。

2.3 单个轮虫在不同培养液中的试验

取 3 个容积为 2.0mL 的凹槽玻璃培养皿,分别加入 1.0、0.5、0.25mL 轮虫培养液,其中小球藻浓度约 1×10^6 cells/mL,从上述培养液中用微吸管挑出 50~100 个龄长少于 4.0h 的仔轮虫,随机取样,每个培养皿中加入一个,并按(2.1)的方法进行培养。

2.4 群体培养实验

取 3 组培养皿,每个培养皿中加 2mL 轮虫培养液。按(2.3)法加入 2、4、8 个轮虫然后按(2.1)方法进行培养。

2.5 温度刺激实验

取 3 组容量为 2mL 的凹槽培养皿,加入 1mL 轮虫培养液,第 1 组预先从 25℃降至 5 ± 1 ℃,移入一个轮虫,置于 5 ± 1 ℃状态下培养 2h 作为急剧冷休克处理(Sudden cold shock, SS)。第 2 组移入轮虫后在 1h 内从 25℃逐渐降至 5℃,并使之在此状态下培养 1h,作逐渐降温(Gradual cold shock GS)处理。第 3 组维持在 25 ± 1 ℃作为对照组(Contrast, C)。经降温处理的 SS、GS 组重新转置于 25 ± 1 ℃状态并同 C 组一起按(2.1)光照下进行培养。设置 10 组重复。

3 结果

3.1 不同量培养液对轮虫平均产卵量及混交雌体形成的影响

3.1.1 单个体培养对轮虫的平均产卵量及混交雌体比例的影响 在 25 ± 1 ℃时,萼花臂尾

轮虫从孵出到首次产卵大约 20h 左右, 48~60h 后陆续死亡。表 1 列出了单个个体在不同培养液中雌体平均产卵量和后代混交雌体百分比。

表 1 单个非混交雌体轮虫在 1.0、0.5、0.25mL 培养液中平均产卵量和后代混交雌体百分率

Tab.1 The average number of eggs and percentage of mictic females of offspring produced by a single amictic female in the medium of 1.0, 0.5 and 0.25 mL

组 别	1.0mL 培养液		0.5mL 培养液		0.25mL 培养液	
	混交雌体	非混交雌体	混交雌体	非混交雌体	混交雌体	非混交雌体
1	4.0	7.0	8.0	11.0	4.0	5.0
2	7.0	6.0	7.0	6.0	6.0	3.0
3	7.0	7.0	6.0	5.0	5.0	3.0
4	5.0	5.0	7.0	4.0	5.0	4.0
5	5.0	7.0	8.0	7.0	2.0	2.0
雌体总数	28	32	36	33	22	17
产卵总数	60		69		39	
平均产卵数(个)	12.0 ± 1.58		13.8 ± 3.35		7.8 ± 2.17	
混交雌体百分率(%)	46.38 ± 7.15		53.50 ± 7.65		55.83 ± 9.03	

在 1.0、0.5mL 培养液中, 每个雌体的平均产卵量分别为 12.0 个和 13.8 个, 但当培养液降到 0.25mL 时, 平均产卵量下降到 7.8 个。在 3 个试验组中每个个体所需空间以 0.5mL 较合适; 在该试验中, 萼花臂尾轮虫的平均产卵量高出何志辉的平均数为 3~6 个的结果^[8], 与 Gilbert 提出的数据(15.0 个)较为接近^[2]。对孵化出的后代个体进行雌体类型鉴定结果发现, 培养液体积从 1.0、0.5 降到 0.25mL 时, 后代混交雌体的百分比由 46.38%、53.50% 增加到 55.83%。方差分析证明: 每个个体所占空间的大小对萼花臂尾轮虫混交雌体形成具有明显的诱导效应($F=2.24, \alpha=0.05$)。

3.1.2 群体培养对轮虫平均产卵量和混交雌体百分比的影响 在群体培养情况下, 每个雌体的平均产卵量明显低于单体培养下的平均数(表 2)。

表 2 群体培养条件下非混交雌体轮虫在 1.0、2.0、4.0 个/mL 密度下平均产卵量和后代混交雌体百分率

Tab.2 The average number of eggs and the percentage of mictic female of offspring produced by mother amictic females at densities of 1.0, 2.0, and 4.0 ind./mL when cultured with groups rotifers

组 别	1.0(2.0 个/2.0mL)		2.0(4.0 个/2.0mL)		4.0(8.0 个/2.0mL)	
	混交雌体	非混交雌体	混交雌体	非混交雌体	混交雌体	非混交雌体
1	8.0	12	7.0	13	4.0	4.0
2	8.0	9.0	6.0	6.0	4.0	4.0
3	8.0	13	5.0	5.0	18	10
4	5.0	10	8.0	5.0	18	17
5	7.0	7.0	5.0	2.0	15	12
雌体总数	36	51	31	31	59	47
产卵总数	87		62		106	
平均产卵数(个)	8.7 ± 1.53		3.1 ± 1.21		2.65 ± 1.56	
混交雌体百分率(%)	41.70 ± 6.77		53.59 ± 13.72		54.26 ± 6.05	

在群体培养密度为 1.0、2.0、4.0 个/mL 时平均产卵量依次为 8.7、3.1 和 2.65 个;后代混交雌体百分率分别为 41.70%、53.59% 和 54.26%。随着密度的增加,平均产卵量有降低的趋势;而后代混交雌体百分率则呈上升趋势,高的母体密度与其后代混交雌体高的百分比有显著的相关性($F=3.45, \alpha=0.05$)。同时,群体培养时,密度为 4.0 与 2.0 个/mL,2.0 与 1.0 个/mL 之间没有差异(t 值分别为 0.50、1.98; $\alpha=0.05$),但密度为 4.0 与 1.0 个/mL 之间差异显著($t=2.48, \alpha=0.05$)。

3.2 温度对轮虫产卵量和后代混交雌体百分率的影响

轮虫为 1.0 个/mL 时,经不同温度刺激后,首次产卵的时间存在差异,经冷休克处理后的 GS 和恒温控制组 C 转置在 25℃ 条件,4h 后开始产卵,而 SS 处理组在同样条件下比前两者滞后 12h。不同温度处理后,轮虫平均产卵量存在较大差异。GS、SS、C 处理组平均产卵量依次为 9.2、10.8、12.6 个。除对照组(C)的平均产卵量(12.6 个)与 Gilbert 的数量(13.0 个)较接近外^[5],其它两组都较低。但受冷休克刺激程度深的 SS 组的平均产卵量反高于 GS 组。从试验结果可以看出,温度降低可使轮虫的平均产卵量降低(表 3)。

表 3 不同温度条件刺激下轮虫的平均产卵量*

Tab. 3 The average number of eggs produced by a rotifer under different stimulus of temperature.

(GS: Gradual cold shock, SS: Sudden cold shock, C: Contrast)

组别		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均 ($\bar{X} \pm Sd$)
SS	混交雌体	1	4	6	2	0	1	6	4	3	7	3.4±2.41
	非混交雌体	6	7	6	5	7	6	6	6	9	3	6.1±1.52
	产卵总量	7	12	12	11	9	8	13	14	12	10	10.8±2.25
	混交百分率	14.29	36.36	50.00	28.57	0.00	14.29	50.00	40.00	25.00	70.00	32.9±20.76
GS	混交雌体	0	1	0	3	1	0	5	2	0	1	1.3±1.64
	非混交雌体	2	1	1	10	3	8	8	8	8	1	5.0±3.68
	产卵总量	3	2	1	16	10	8	17	15	13	7	9.2±5.96
	混交百分率	0.00	50.00	0.00	23.08	25.00	0.00	38.40	20.00	0.00	50.00	20.7±20.46
C	混交雌体	2	2	2	1	1	1	3	0	5	4	2.1±1.52
	非混交雌体	13	12	12	11	6	7	15	10	7	8	10.1±3.00
	产卵总量	15	14	14	12	8	8	19	10	14	12	12.6±3.37
	混交百分率	13.33	14.29	14.29	8.33	14.29	12.50	16.67	0.00	41.67	33.33	16.9±12.00

* 混交百分率 = 混交雌体数 / (混交雌体数 + 非混交雌体数) × 100%。

经不同温度处理后,母体所产后代个体中混交雌体的百分比分别为 C 组 16.87, GS 组 20.69, SS 组 32.85。可见,随着冷休克程度的加深(C→GS→SS),后代混交雌体百分比呈增加趋势。统计分析表明:SS 和 C 处理间存在显著差异($t=2.16, \alpha=0.05$),SS 和 GS, GS 和 C 处理间没有差异(t 分别为 1.32 和 0.52, $\alpha=0.05$)。在各处理组中,有一部分试验个体携带的卵因没有孵化而无法鉴别雌体的类型。

4 讨论

4.1 密度对轮虫混交雌体形成的诱导作用

4.1.1 代谢产物 在水体中,当轮虫达到一定密度时,种群就出现混交雌体,使轮虫以两性生殖的方式产生休眠卵,而后母体死亡,休眠卵沉到水底,从而使种群密度降低。这就是典型

的密度制约(Density-dependent)的调节机制。Gilbert 认为轮虫在幼体时期,通过排泄、分泌的方式向环境中释放一种化学物质,随着种群密度的增加,该化学物质随之积累到一定水平,进而促使混交雌体出现^[5];可 Clément 认为轮虫自孵化后同时分泌两种称之为促增长因子(AFm-substance)和降低因子(DFm-substance)的相拮抗的物质。这两种物质的消长决定混交雌体的数量^[3]。可至今,上述两位学者所提出的物质均未能从水体中分离出来。

在本项实验过程中通过及时更换培养液,并把刚孵化出的轮虫及时从培养液中分离出来以减少代谢产物的影响。尽管如此,试验中轮虫孵化出的后代混交雌体百分率仍然较高。因此,据推测后代雌体的类型可能在卵细胞分裂过程中已被确定。可见随轮虫密度的增加,水体中代谢产物亦随之增加而促使混交雌体形成的猜想仍然缺乏足够的证据。

4.1.2 拥挤效应 有关“拥挤效应”,实质上是一个密度制约的种群调节机制,但存在一个“度”的问题。当单个个体拥有培养液由 0.25mL 增加到 1.0mL 时,后代混交雌体的百分率由 55.83% 下降至 46.38%;而在群体培养时,当密度由 4.0(6.0 个/1.5mL)下降至 0.66(6.0 个/9.3mL)时的混交雌体百分率由 54.26% 下降至 41.70%。可见,所谓“拥挤效应”实质是一个食物供给问题。有趣的是当培养萼花臂尾轮虫时加入其他动物,如草履虫(*Paramecium*),甚至生态位(Niche)与萼花臂尾轮虫相似的角突臂尾轮虫(*B. angularis*),观察种间拥挤效应,结果发现这两种动物对萼花臂尾轮虫种群均不产生影响。只有当角突臂尾轮虫密度高达 110~230 个/mL 时,萼花臂尾轮虫种群才出现混交雌体。因此,在轮虫规模生产时,不同种轮虫的搭配可能是一种延长指数增长期的有效途径。

4.2 温度对轮虫产卵量和混交雌体百分比的诱导效果

4.2.1 温度对萼花臂尾轮虫产卵量的影响 据研究,萼花臂尾轮虫在生活期间平均产卵量为 13 个^[2],但 Gilbert 在进行群体培养轮虫,挑选已开始产非需精卵的萼花臂尾轮虫,以纤细裸藻(*Euglena gracilis*)作为食物进行 SS、GS 和 C 处理,其平均产卵量分别为 3.78、3.73 和 3.39 个。本研究利用刚刚孵化的萼花臂尾轮虫幼体进行单个个体培养,投喂小球藻,经同样温度刺激后 3 组的平均产卵量分别为 10.8、9.2 和 12.6 个。相比之下远远高于 Gilbert 的结果^[5],而且在 Gilbert 的结果中也看不出温度刺激的影响。可是从本研究结果却明显反映出:若在轮虫性成熟以前进行冷休克刺激时,或多或少都会降低轮虫的产卵量,因此在规模培养轮虫时应尽量创造稳定的环境,特别避免温度的剧变,以期获得持续的高产。

4.2.2 温度对萼花臂尾轮虫混交雌体形成的影响 从试验结果来看,虽然试验材料来自不同的水域,但研究结果仍然与 Gilbert^[5]吻合;SS 和 C 处理间混交雌体百分比具有显著差异,只不过混交雌体百分比远远高于 Gilbert 的结果。可以肯定:不可预测地大幅度降温能显著增加混交雌体的百分比。因此,在轮虫的工厂化培养时,可通过控温方式,使轮虫在适宜的温度条件下以孤雌生殖的方式繁衍种群,以获得大量的轮虫;再经过急剧降温的办法使轮虫产生大量混交雌体,进而获得大量的休眠卵,使其商品化,能为渔业生产单位随时提供“种源”。

参 考 文 献

- 1 Koste W. Rotatoria. Die Radertiere Mitteleuropas. Gebr Borntraeger, Berlin, Stuttgart. 1978
- 2 Gilbert J J. Mictic female production in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *J Exp Zool*, 1963, **153**:113~124
- 3 Gilbert J J. Mictic female production in monogonont rotifers. *Arch Hydrobiol. Beih Ergebn Limnol*, 1977, **8**: 142~155

- 4 Gilbert J J. Sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna girodi*: Effects of tocopherol and population density. *J Exp Zool*, 1978, **204**: 113~112
- 5 Gilbert J J. A note on the effect of cold shock on mictic female production in *Brachionus calyciflorus*. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol*, 1977, **8**: 158~160
- 6 D'Abramo L R Ingestion rate decrease as the stimulus for sexuality in population of *Moina macrocopa*. *Limnol Oceanogr*, 1980, **25**(3): 422~429
- 7 王家楫. 中国淡水轮虫志. 北京: 科学出版社, 1961
- 8 何志辉. 淡水生物学(上册)分类学部分. 北京: 农业出版社, 1982

EFFECTS OF DENSITY AND TEMPERATURE ON THE EGG AND MICTIC FEMALE PRODUCED BY *BRACHIONUS* *CALYCIFLORUS* (ROTATORIA; MONOGONONTA)

Yang Jiaxin Huang Xiangfei

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430072)

Abstract

Brachionus calyciflorus Pallas were cultured in both single and group rotifers in the medium of 1.0, 0.5 and 0.25 mL under the experimental conditions of 25°C, light intensity about 4000 lx (LD=18:6) and the food concentration about 1.0×10^6 cells/mL of *Chlorella* sp. In single culture, the mean egg numbers per mother female were 12.0 ind., 13.8 ind. and 7.8 ind. The percentages of mictic female of offsprings were 46.38, 53.49, and 55.83 respectively. In group culture the mean egg numbers were 8.7, 3.1 and 2.65 inds., respectively. And the percentages of mictic females of offsprings were 41.70, 53.59 and 54.26 respectively. There were significant differences between the percentage of mictic females of offsprings and the densities of mother females ($F=3.45$, $\alpha=0.05$).

Put one rotifer in every dish, one of the dishes was precooled to 5°C as sudden cold shock (SS) treatment, and was kept for 2 hrs at $5 \pm 1^\circ\text{C}$, another dish was cooled gradually from 25°C to $5 \pm 1^\circ\text{C}$ during one hour, then was kept at $5 \pm 1^\circ\text{C}$ for one hour again, as the gradual cold shock (GS). After the treatment, both dishes were moved to 25°C, and cultured at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ over the experiments, the third dish was left at 25°C as contrast (C). The mean egg numbers produced by mother females were 10.8, 9.2 and 12.6 ind., respectively. The percentages of mictic female of offsprings were 32.9, 20.7 and 16.87, respectively. The results show that the difference between SS and C is significant ($t=2.16$, $\alpha=0.05$), but both differences between GS and SS, GS and C were not significant ($t=1.32$ and 0.52 , $\alpha=0.05$).

Key Words *Brachionus calyciflorus*, density, temperature, mictic female, mean egg