

# 萼花臂尾轮虫交配行为和受精作用研究

席贻龙\*, 黄祥飞

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

**摘要** 萼花臂尾轮虫的交配行为大致可分为 5 个阶段。除雌雄性比为 1:2 和 1:3 时混交雌体的受精率为 100% 外, 其余性比下混交雌体的受精率皆无显著的差异。可受精的混交雌体百分率和具受精能力的雄体百分率皆随年龄的增大而下降。所有的混交雌体在出生后的 4h 内均易于受精, 以后随着龄长(  $X$ , h ) 的增加, 可受精的混交雌体百分率(  $Y$ , % ) 呈非线性下降:  $Y = 166.6386 - 17.813X + 0.4837X^2$ 。当龄长达 18h 时, 所有的混交雌体皆不易受精。雄体在出生后的 8h 内, 90.63% ~ 91.61% 的个体均具有受精能力, 以后随着龄长(  $X$ , h ) 的增加具受精能力的雄体百分率(  $Y$ , % ) 呈线性降低:  $Y = 152.5054 - 6.6329X$ 。雌雄性比和雌雄交配时的年龄对产休眠卵的混交雌体的产卵量都无显著的影响。

**关键词** 萼花臂尾轮虫, 性比, 年龄, 交配行为, 受精作用, 休眠卵

## Mating behavior and fertilization of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*

XI Yi-Long, HUANG Xiang-Fei, Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

**Abstract** The mating process of *Brachionus calyciflorus* may be separated into five phases. There was no significant effect of sex ratio of female to male between 1:1 and 6:1 on the percent fertilization, except that the percent fertilizations were all 100% when the sex ratio was 1:3 and 1:2. The percentage of mictic females that could be fertilized and males that were capable of fertilization declined with their aging. All mictic females were susceptible to fertilization until age 4h. Susceptibility declined non-linearly according to the quadratic equation  $Y = 166.6386 - 17.813X + 0.4837X^2$ . By age 18h, all mictic females no longer could be fertilized. Only 90.63% ~ 91.61% of newborn male were capable of fertilization. This level of fertility held until age 8h, then declined linearly:  $Y = 152.5054 - 6.6329X$ . There were no significant effects of the sex ratio and the age of the copulating mictic female and male on the number of resting eggs produced by one fertilized mictic female.

**Key words** *Brachionus calyciflorus*, sex ratio, age, mating behavior, fertilization, resting egg

文章编号: 1000-093X(2000)02-0177-07 中图分类号: Q959.181 文献标识码: A

单巢目轮虫的孤雌生殖常因有性生殖的出现而终止。混交雌体的产生是有性生殖的开始, 而雌雄个体间的交配及随之发生的受精作用则是休眠卵产生的必不可少的环节。有关轮虫的交配行为, 已有一些报道<sup>[1-3]</sup>, 而雌雄年龄对混交雌体受精率的影响研究, 主要集中于西氏晶囊轮虫(*Asplanchna sieboldi*)、褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)和红臂尾轮虫(*B. rubens*)等<sup>[4-7]</sup>。本研究以萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)为对象, 实验室内对其交配行为进行了观察, 同时研究了雌雄性比及年龄对其受精率及产卵量的影响, 旨在为轮虫繁殖生物学尤其是休眠卵形成机理研究积累资料。

### 1 材料和方法

**1.1 轮虫的来源和预培养** 实验用萼花臂尾轮虫于 1997-03 由武汉东湖水体沉积物中的休眠卵孵化而得。实验室内 25 ± 1℃、自然光照(光照强度约 30lx, L:D = 14:10)下“克隆”培养, 培养液采用 Gibert 的配方

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 轮虫休眠卵形成和萌发机理的生态学研究(编号 39870158)

\* 通讯地址: 安徽芜湖市安徽师范大学生命科学学院, 邮编 241000。

收稿日期: 1999-02-07, 修订日期: 1999-05-25

作者简介: 席贻龙(1965 ~), 男, 安徽肥东县人, 教授。主要从事浮游动物生态学研究。

饵料为 HB-4 培养基<sup>[9]</sup>培养的、处于指数增长期的蛋白核小球藻。培养 2 个月以上,以轮虫所产休眠卵保种。实验前,用浓度为 0.1mg/ml 的混合藻[含  $2.0 \times 10^6$  cells/ml 斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)和  $5.0 \times 10^6$  cells/ml 的蛋白核小球藻]为食物进行预培养,起始密度为 1.0 ind./ml。第 2、3 天时用微吸管吸取带卵的雌体单个培养于杯状玻璃培养皿内,每 0.5h 收集 1 次孵化出的雌、雄幼体,分别培养于含相同食物浓度的培养皿内。

**1.2 轮虫交配行为的观察** 随机吸取龄长在 4h 内的雌性个体一个,置于特制的 24 孔、每孔容量为 2ml 有机玻璃皿内,然后加入 1~2 个龄长也在 4h 内的雄体,使雌雄个体生活于体积约 0.2ml、含浓度约 0.1mg/ml 混合藻的培养液内,室温(23~25℃)下通过实体显微镜对其交配行为进行连续观察,并用秒表记录交配过程的历时。

**1.3 雌雄性比对轮虫受精作用的影响** 按雌雄性比的不同随机吸取龄长在 4h 内的雌雄个体进行实验。当雌雄性比设计为 1:2 或 1:3 时,实验所用的雌雄个体数与之相同,但当雌雄性比设计为 1:1~6:1 时,所用雌体数皆为 8 个。实验在温度为  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、体积为 0.5ml 的培养液内进行,所用食物浓度与上述相同,但每天加入藻类 2~3 次以使之略有过剩。实验开始后 24h 移去雄体,每间隔 12h 移去已产卵的非混交雌体和产雄卵的混交雌体,仅留产休眠卵的混交雌体继续培养以观察其一生中所产的休眠卵数,并计算出产休眠卵的混交雌体数占总混交雌体数的百分比(受精率)。

**1.4 雌雄年龄对轮虫受精作用的影响** 为确定可受精的混交雌体百分率与年龄间的关系,实验时每组随机吸取各特定年龄的雌体一个,加入龄长在 4h 内的雄体 2~3 个于温度为  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、体积为 0.5ml 的培养液内进行培养。每组 48 个重复。24h 后移去雄体,48h 后观察、记录一次卵已产出的雌性个体和休眠卵数,并移去非混交雌体、产雄卵的混交雌体和休眠卵,更换培养液,投喂饵料,实验持续到所有个体死亡为止。用同样的方法研究雄体的受精力随其年龄增大而变化的情况,不同之处仅在于每组所用的雌性个体为 2~3 个,除每组的雄体具有特定年龄外,所有的雌体龄长均在 4h 以内。实验过程中,每组只要有 1 个或 1 个以上的混交雌体受精时,即可确定所用的雄体具有受精力。

## 2 结果

**2.1 萼花臂尾轮虫的交配行为** 观察结果表明,萼花臂尾轮虫的交配行为如下(1)雌雄相遇阶段。该阶段是交配过程的开始。(2)雄体以垂直于雌体身体纵轴的方向围绕着雌体作快速转动,此时雄体通过其头冠和足与雌体相接触,而雌体游动的速度明显减慢。(3)头冠定位。雄体以其头冠和雌体的头冠相接触,为交配器官插入雌体假体腔进行定位。(4)交配和输送精子。此为交配行为的主要阶段,该阶段平均历时为  $41.08 \pm 14.32\text{s}$ 。(5)雌雄个体的分离。此阶段标志着交配行为的结束。

**2.2 雌雄性比对轮虫受精作用的影响** 不同雌雄性比下萼花臂尾轮虫混交雌体的受精率和产休眠卵的混交雌体的产卵量列于表 1。表明,除雌雄性比为 1:3 和 1:2 时混交雌体的受精率为 100% 外,其余性比下的受精率间无显著差异( $P > 0.05$ ),所有性比下产休眠卵的混交雌体的产卵量间亦无显著差异。

**2.3 雌雄年龄对萼花臂尾轮虫受精率的影响** 当雌体的年龄在 4h 以内时,所有的混交雌体都易于受精。龄长 4h 以上时,混交雌体中可受精的混交雌体百分率随其年龄的增大而非线性的下降(图 1)。龄长 18h 后,混交雌体皆不能与雄体进行受精作用。龄长在 4~18 h 内的混交雌体,可受精的混交雌体百分率( $Y, \%$ )与年龄( $X, \text{h}$ )间的关系式为:

$$Y = 166.6386 - 17.813X + 0.4837X^2 \quad R^2 = 0.9647, P < 0.001$$

当 50% 的混交雌体不能被受精时,此时混交雌体的年龄(称为半受精龄长,  $LF_{50}$ )为 8.52h,约占其寿命的 10.48%。

龄长分别为 6h、10h 和 16h 的混交雌体和雄体受精后形成的产休眠卵的混交雌体的产卵量分别为  $1.33 \pm 0.52$ 、 $2.00 \pm 1.10$  和  $1.50 \pm 0.55$  ind.。统计分析结果表明,各组间无显著的差异( $P > 0.05$ )。可见,受精时混交雌体的年龄对其受精后的产卵量无显著的影响。

当雄体的年龄在 8h 以内时,约 90% 的雄体都具有使混交雌体受精的能力。龄长 8h 以上时,雄体的受精能力随着其年龄的增大而线性的下降(图 2)。龄长 22h 后,所有的雄体不再具有受精能力。龄长在 8~22h 内的雄体中,具受精能力的个体所占的百分率( $Y, \%$ )与年龄( $X, \text{h}$ )间的关系式为:

万方数据

$$Y = 152.5054 - 6.6329X$$

表 1 不同性比下轮虫的受精率和产休眠卵的混交雌体的产卵量

Table 1 Fertilization rate of mictic females and mean number of resting eggs produced by one mictic female at different sex ratio

雌雄性比	受精率( % )	产卵量( ind. )	样本量
Sex ratio of	Fertilization	Mean number of	( n )
female to male	rate	resting eggs	
1:3	100	3.00 ± 0.82	7
1:2	100	2.83 ± 0.41	6
1:1	82.61:38.76	3.05:1.22	23
2:1	88.33:31.30	2.48:0.77	27
3:1	66.71 ± 41.79	2.36 ± 0.81	15
4:1	89.71:25.09	2.40 ± 0.51	17
5:1	75.00 ± 36.65	2.77 ± 0.62	8
6:1	91.75 ± 16.50	2.69 ± 0.24	4

雌体身体的什么部位插入假体腔并输送精子)是研究的重点。首先,交配的历时在不同的种类间存在着较大的差异<sup>[3]</sup>。就同种轮虫而言,Rico-Martinez 等研究发现,产于美国 Florida 的萼花臂尾轮虫的交配历时为 63.8 ± 13.6S<sup>[3]</sup>。研究却表明,产于武汉东湖的萼花臂尾轮虫的交配历时为 41.1 ± 14.3 S。看来,轮虫的交配历时也可能因交配时环境条件的不同而产生差异。当然,同种轮虫不同品系间也可能存在着差异。其次,交配的部位也常因种类的不同而异,同种轮虫不同品系间是否存在差异亦有待进一步的研究。就萼花臂尾轮虫而言,Gilbert 观察发现,萼花臂尾轮虫的交配除了发生在混交雌体的头冠处外,身体的其他地方也可发生<sup>[1]</sup>。Rico-Martinez 却发现仅在头冠处可进行交配<sup>[3]</sup>。本研究中,虽然作者也曾发现,当两个雄体同时与一个雌体发生交配行为而其中的一个雄体已将其阴茎在雌体的头冠处插入时,另一个雄体则通过其足的末端和混交雌体体壁相连。其阴茎是否已插入雌体的体壁,作者无从知晓。但当前一个雄体完成交配行为离开雌体后,后一个雄体则迅速到达雌体的头冠处与之交配。据此,作者推测,萼花臂尾轮虫的交配主要在雌体的头冠处进行。除此以外,雌体身体的其他部位是否可以交配,仍有待于进一步的研究。再次,Nogrady 等认为,当雄体以垂直于混交雌体纵轴的方向围绕着雌体作快速运动时,混交雌体并无明显的反应<sup>[2]</sup>。本研究发现,此时的雌体游泳速度明显减慢,而当雄体对非混交雌体作出上述动作时,后者常以更快的速度游动以避开雄体。

3.2 轮虫的老化( Aging)和雌雄性比对受精作用的影响

已有资料表明,西氏晶囊轮虫和褶皱臂尾轮虫可受精的混交雌体百分率常随其老化程度的增加而下降<sup>[4,7]</sup>。作者对萼花臂尾轮虫的研究结果与其一致,但在可受精的混交雌体百分率开始下降及混交雌体不再可以受精的年龄数据存在着明显的不同。西氏晶囊轮虫可受精的混交雌体百分率在出生后 45min 便开始

$R^2 = 0.9622, P < 0.001$

当 50% 的雄体不再具有受精能力时,雄体的年龄(LF<sub>50</sub>)为 15.45h,在此状态下雌体的平均寿命为 29.4h,因此,LF<sub>50</sub>约占其寿命的 52.55%。

龄长分别为 6h、10h 和 16h 的雄体和混交雌体受精后形成的产休眠卵的混交雌体的产卵量分别为 1.88 ± 0.35、2.00 ± 0.76 和 2.50 ± 1.20 ind.。统计分析结果表明,各组间无显著的差异(P > 0.05)。可见,受精时雄体的年龄对受精后的混交雌体产卵量亦无显著的影响。

3 讨论

3.1 关于轮虫的交配行为 轮虫的交配行为常因种类的不同而存在一定的差异<sup>[3]</sup>。交配行为中,交配的历时和交配的部位(即雄体的交配器官从混交

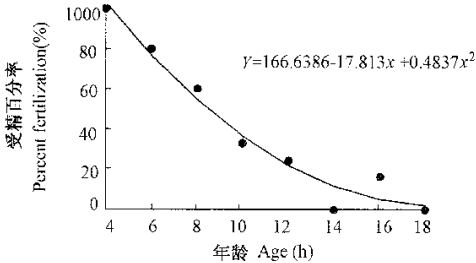


图 1 可受精的混交雌体百分率(Y, %)与其年龄(X, h)的关系

Fig.1 Female age( X, h) and percentae( Y )of mictic females that can be fertilized

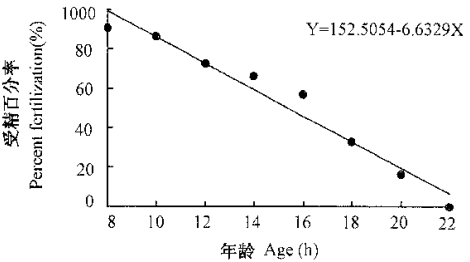


图 2 具受精能力的雄体百分率与雄体年龄的关系  
Fig.2 Male age( X, h) and percentage( Y ) of males that are capable of fertilization

下降,龄长达 4h 后不再可以受精,其  $LF_{50}$  为 1.2h,仅占其寿命的 0.66%。而褶皱臂尾轮虫在出生 4h 后开始下降,24h 后不再可以受精,其  $LF_{50}$  为 7.9h,约占其寿命的 16.7%。本研究结果表明,萼花臂尾轮虫可受精的混交雌体百分率在出生 4h 后开始下降,龄长达 18h 后不再可以受精,其  $LF_{50}$  为 8.52h,约占其寿命的 10.48%。可见,同一属的轮虫对受精作用的易感性(Susceptibility to fertilization)较为接近。而同一种轮虫的混交雌体对受精作用的易感性随其老化程度的增加而下降的原因,可能与其体内卵的发育速度以及影响该速度的生态条件有关。作者发现,当混交雌体的龄长达 18h 时,58.3% 的个体已产出雄卵。此时,即使和雄体进行了交配,但仍不再易于受精。这与 Pilarska 等的结论<sup>[5]</sup>是一致的。可见,受精作用必须发生在混交雌体生命的早期阶段。否则即使进行了交配,混交雌体仍将产出单倍体的雄卵。Snell 等推测,混交雌体达一定年龄后可能产生了某种阻止受精的机制<sup>[7]</sup>。

具有受精能力的雄体百分率在一定龄长范围内较为稳定。褶皱臂尾轮虫为出生后至龄长 8h<sup>[7]</sup>,本研究中萼花臂尾轮虫与其相同。自此之后,具有受精能力的雄体百分率也随着其老化程度的增加而下降。有趣的是,目前已研究的种类中,新生的雄体中皆有一定比例的个体没有受精能力。对褶皱臂尾轮虫而言,该比例为 17%<sup>[7]</sup>,而萼花臂尾轮虫为 9%。Snell 等认为,这可能是由于某些有害的隐性基因在单倍体的雄体中得到表达而造成的。对于二倍体的混交雌体而言,这种隐性基因没有表达,所以 100% 皆可受精<sup>[7]</sup>。至于具有受精能力的雄体百分率随雄体老化程度的增加而下降的原因,目前尚不明了。Snell 等研究发现,未曾交配过的雄体所具有的活动精子的数量随着其年龄的增加而下降<sup>[10]</sup>。作者另一研究还发现,雄体的活力(游泳速度)也随着其年龄的增加而呈线性下降<sup>①</sup>。达一定年龄时,其活力可能不足以完成交配时所进行的快速运动。究竟是哪种因素抑或两种因素共同造成了雄体受精力的下降,仍不得而知。

除年龄因素外,雌雄个体间的交配主要取决于雌雄双方。混交雌体通过分泌性外激素以吸引雄体,而雄体寻找混交雌体的能力主要取决于其对性外激素的接触化学感受能力<sup>[1,11]</sup>。据此,雄体和雌体间的交配完全是随机的。本研究结果中,不同性比下混交雌体的受精率间无显著的差异也证明了这一推论。

**3.3 雌雄性和交配时的雌雄年龄与产休眠卵的混交雌体的产卵量** 本研究结果表明,萼花臂尾轮虫交配时的雌雄性和雌雄个体的年龄对交配后形成的产休眠卵的混交雌体的产卵量均无显著的影响。Snell 等研究发现,褶皱臂尾轮虫雄体一次交配所输送的精子为 2.3 个,与产休眠卵的混交雌体的平均产卵量相近<sup>[10]</sup>。从本研究的结果来看,一旦混交雌体受精(雄体至少与其交配并输送精子一次)后,休眠卵的产量可能并非由交配时混交雌体所获得的精子总数决定的。当然,该推测也有待于进一步的验证。

## 参考文献

- [1] Gilbert J J. Contact chemoreception, mating behavior and sexual isolation in the rotifer genus *Brachionus*. *J Exp Biol.* 1963 **40** :625 ~ 641.
- [2] Nogrady T, Wallace R L and Snell T W. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world: Rotifer. Vol 1. Biology, Ecology and Systematics*. SPB Academic Publishing, The Hague. 1993 **43** ~ 44.
- [3] Rico-Martinez R and Snell T W. Mating behavior in eight rotifer species using cross-mating tests to study species boundaries. *Hydrobiologia*, 1997 **356** :165 ~ 173.
- [4] Buchner H, Mutschler C and Kiechle H. Die determination der manchen- und Dauereiproduktion bei *Asplanchna sieboldi*. *Biol Zool.* 1967 **86** :599 ~ 621.
- [5] Pilarska J. The dynamics of growth of experimental populations of the rotifer *Brachionus rubens* Ehrenbg. *Pol Arch Hydrobiol.* 1972, **19** (3) :265 ~ 277.
- [6] Rutter-Kolisko A. The significance of mating process for the genetics and for the formation of resting eggs in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*, 1983 **104** :181 ~ 190.
- [7] Snell T W and Michael C. Aging and loss of fertility in male and female *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 1987 **12** :103 ~ 110.
- [8] Gilbert J J. Mictic female production in rotifer *Brachionus calyciflorus*. *J Exp Zool.* 1963 **153** :113 ~ 124.
- [9] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1991. 340 ~ 344.
- [10] Snell T W and Hoff F H. Fertilization and male fertility in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 1987 **147** :329 ~ 334.
- [11] 席贻龙, 黄祥飞. 轮虫休眠卵形成和萌发的生态机理研究进展. 水生生物学报, 1999 **23** (1) :73 ~ 82.

① 席贻龙. 萼花臂尾轮虫体眠卵形成和萌发的生态机理研究. 中国科学院水生生物研究所博士学位论文. 1999. 23 ~ 29.