

维生素 E 对萼花臂尾轮虫繁殖的影响

杨家新^{1,2}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 15℃下, 添加 Ve 浓度为 20~80ng/ml 时, 种群密度与培养时间呈显著相关, 其中 20 ng/ml 和 40 ng/ml 组最大种群密度分别为 76.40 ind/ml 和 65.20 ind/ml, 显著高于对照组(最大密度 12.00 ind/ml)。最大混交雌体百分率低于 10%, 对照组最大混交雌体比率为 40%。轮虫卵雌比有不同程度的提高, 但维生素浓度为 100 ng/ml 时, 对种群增长不利; 25℃下, 对照组和各添加组最大密度依次为 68.00, 122.00, 124.00, 168.00 和 236.00 ind/ml。最大卵雌比依次为 1.21, 1.25, 1.22, 1.41 和 0.69, 混交雌体百分比分别为 27.69, 19.89, 18.42, 17.02 和 12.88%; 30℃下, 最大密度依次为 113.80, 121.00, 122.80 和 151.20 ind/ml, 最大卵雌比依次为 1.50, 1.42, 0.64 和 0.96。混交雌体百分比分别为 1.76, 32.26, 37.50 和 32.00%。

关键词: 维生素 E; 萼花臂尾轮虫; 密度; 卵雌比; 混交雌体

The effect of vitamin E on reproduction of *Brachionus calyciflorus* (rotifer: monogononta)

YANG Jia-Xin (1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(8): 1663~1670.

Abstract: The change of population density, the ratio of mictic females and eggs of rotifer *Brachionus calyciflorus*, cultured in the synthetic medium containing different concentrations of vitamin E, were observed at 15, 25 and 30℃, respectively. Rotifer *Brachionus calyciflorus* was hatched from resting eggs collected from the sediments in bottom of East Lake (China, Wuhan, 114°23'E, 30°33'N). A neonate rotifer hatched from resting egg was transferred into flask containing inorganic medium described by Gilbert (1963). Stock rotifers were fed on *Chlorella pyrenoidosa*, which was grew in the HB₄ medium with light intensity about 5,000lx provided by 8 cool-white fluorescent lamps (16; 8 h light:dark cycle; temperature at 25℃) in the incubator. Before feeding, algae in log phase of growth were harvested, centrifuged at 4,000 rpm for 5 minutes, rinsed with HB₄ medium with 3 times and resuspended in rotifer culture medium.

Two neonate rotifers were placed into test tube, each tube containing 10ml of *C. pyrenoidosa* suspension (2×10^6 cells/ml) diluted with rotifer culture medium. Five different concentrations of vitamin E (0 (as control group), 20, 40, 80 and 100ng/ml) were added into each test tube, respectively. Light intensity and photoperiod as the same as above described. The experiment was designed at three different temperatures 15, 25 and 30℃. The test rotifers were checked, counted and transferred into new rotifer culture medium every 24 hours. The mictic female, amictic female, mictic egg, amictic egg and male were distinguished by the method described by Paloheimo (1974).

At 15℃, the positive correlation between population density and culturing time were presented in 20, 40 and 80 ng/ml, with correlative equation $Y = e^{(-0.3301 + 0.5441X)}$ ($r = 0.98, p < 0.01$), $Y = e^{(-0.2296 + 0.5002X)}$ ($r = 0.98, p < 0.01$) and $Y = e^{(-0.3700 + 0.3691X)}$ ($r = 0.85, p < 0.01$), respectively. The maximal density was 76.40 ind./ml in 20 ng/ml group, and 65.20 ind/ml in 40 ng/ml group, but the highest density was only obtained 12 ind./ml in control. Restrain effect was observed in

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39270098)

收稿日期: 2003-04-02; **修订日期:** 2003-11-12

作者简介: 杨家新 (1964~), 男, 河南信阳人, 博士, 副教授, 从事水产饵料生物学和浮游动物生态研究。E-mail: yangjiaxin@njnu.edu.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 39270098)

Received date: 2003-04-02; **Accepted date:** 2003-11-12

Biography: YANG Jia-Xin, Ph. D., Associate professor, mainly engaged in fisheries sciences and zooplankton ecology. E-mail: jiaxiny@publicl.

concentration of 100 ng/ml vitamin E at 15 °C. The mictic female percentage was remarkable lower in experimental groups than that in control ($p<0.01$). Eggs ratio was no significant difference between the experimental groups and control.

The population density was significantly lower in control than that in experimental groups at 25 °C, the correlative equation between density and culture time was $Y=e^{(1.4579+0.2842X)}$ ($r=0.86, p<0.01$), $Y=e^{(1.3609+0.3253X)}$ ($r=0.88, p<0.01$) and $Y=e^{(1.0166+0.3544X)}$ ($r=0.90, p<0.01$) in 40, 80 and 100ng/ml group, respectively. Highest density of rotifer was 68.00, 124.00, 164.60 and 236.20 ind./ml in 20, 40, 80 and 100 ng/ml, respectively. The mictic females percentage was 19.89%, 18.42%, 17.02% and 12.88% in 20, 40, 80 and 100 ng/ml (27.69% in control), respectively. Maximal eggs ratio was 1.21(control), 1.25, 1.22, 1.41 and 0.69 (in 20, 40, 80 and 100 ng/ml, respectively).

At 30 °C, the significantly positive correlation between density and culture time was found, the correlative equation was $Y=e^{(-0.8151+0.5203X)}$ ($r=0.86, p<0.01$), $Y=e^{(0.4564+0.4628X)}$ ($r=0.95, p<0.01$), and $Y=e^{(-0.1477+0.8539X)}$ ($r=0.92, p<0.01$), and $Y=e^{(1.0283+0.4239X)}$ ($r=0.84, p<0.01$) in 20, 40, 80 and 100 ng/ml groups ($Y=e^{(-0.0268+0.3342X)}$ ($r=0.84, p<0.01$), control), respectively. The maximal population density was 113.80, 121.00, 122.80 and 151.20 ind./ml in groups of 20, 40, 80 and 100 ng/ml (67.20 ind./ml in control), respectively. Meanwhile, the mictic female percentage was 1.76%, 32.26%, 37.50% and 32% in each experimental groups, respectively. The maximal eggs ratio was 1.50, 1.42, 0.64 and 0.96 in each experimental groups, respectively.

Key words: vitamin E; *Brachionus calyciflorus*; population density; egg ratio; mictic female

文章编号:1000-0933(2004)08-1663-08 中图分类号:Q959.181 文献标识码:A

维生素对水生生物的代谢调控具有重要意义,如鱼类缺乏维生素 B₁₂时常造成食欲不振、生长缓慢和贫血等症状,缺少维生素 E(Ve)时,鱼苗存活率降低。这些维生素鱼类本身不能合成或很少合成,必须从饲(饵)料中补充,尤其在鱼类高密度、集约化生产中更为重要。利用添加维生素培养的轮虫对鱼类的生长具有直接或间接益处^[1~4]。

许多研究表明,捕食性晶囊轮虫(*Asplanchna*)的大量繁殖,常使培养的萼花臂尾轮虫种群在短时间内崩溃。用富含 Ve 成分的纤细裸藻(*Euglena gracilis*)培养的萼花臂尾轮虫作为晶囊轮虫的食物时,能诱导后者出现有性生殖进而抑制其种群的增长^[5~12]。在轮虫培养中,添加适量的 Ve 既能促进萼花臂尾轮虫种群的增长和提高其种群密度,又能控制晶囊轮虫种群,因而在生产实践上具有潜在应用前景。

本研究旨在通过研究不同温度条件下, Ve 对轮虫种群密度、卵雌比和混交雌体百分率的变化,得出维生素最佳添加剂量,为轮虫工厂化生产提供适宜的添加剂。

1 材料与方法

1.1 试验材料的“克隆”培养

湖水温度 25 °C 左右时,用 25 号浮游生物网从武汉东湖中(114°23'E, 30°33'N)捞取样品,在解剖镜下挑选一个活泼健壮、携带非混交卵的雌体为试验亲体,在实验室进行“克隆”培养。轮虫培养液采用 Gilbert 的配方^[13]。以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)(HB₁培养基)为食物,投喂前用轮虫培养液在 4,000 转/min 下反复离心冲洗几次,再用轮虫培养液把小球藻浓度调至 1.0~2.0×10⁶ cells/ml,光照强度约 4,000 lx,昼长比 L:D=18:6,温度 25±1 °C。培养期间,每天更换 1 次培养液并检查轮虫的产卵状况,轮虫密度控制在 1.0 ind./ml 左右。

1.2 维生素液的配制

把 100 mg 乳化后的 Ve 用双蒸馏水配成 10 μg/ml 母液待用,使用时用轮虫培养液和离心浓缩的小球藻配成不同的浓度。

1.3 轮虫的实验培养

以容量为 30ml 的玻璃试管为培养管, Ve 浓度梯度为 0(对照), 20, 40, 80 和 100ng/ml, 各培养管中小球藻浓度均为 2×10⁶ cells/ml, 每个培养管中加入两个轮虫, 放入光照培养箱中进行培养, 温度、光照时间和光照强度同^[14]。实验设置 5 组重复。

1.4 轮虫雌体类型和卵的鉴定与计数

每隔 24h 在解剖镜下镜检,计数归类。更换等量新鲜培养基,放回培养箱继续培养。及时检查藻类浓度调整藻液浓度。按混交雌体、非混交雌体、混交卵、非混交卵和雄性个体归类计数。类别鉴定、混交雌体百分率和(非混交)卵雌比(Eggs ratio)的计算方法同 Paloheimo^[15]。

2 结果

2.1 15 °C 时添加维生素 E 对轮虫种群密度、混交雌体百分率和卵雌比的影响

2.1.1 对轮虫种群密度的影响(表 1)15 °C, Ve 浓度为 20 ng/ml 时(以下简为 ng),第 6 天密度由 22.00 ind./ml (以下简为

ind.)快速上升到 76.40 ind.,密度与培养时间呈显著相关: $Y=e^{(-0.3301+0.5441X)} r=0.98, p<0.01$;Ve 浓度为 40 ng 时,增长趋势与 20 ng 组相似,7~9d 分别达 33.40,44.40 和 65.20 ind.,密度与培养时间之间呈显著相关: $Y=e^{(-0.2296+0.5002X)} r=0.98, p<0.01$;80 ng 组,前 5d 轮虫密度均在 5.0 以下,第 8 天最高,仅为 15.4 ind.,密度与培养时间亦呈显著的指数相关: $Y=e^{(-0.3700+0.3691X)} r=0.85, p<0.01$;100 ng 组,密度从接种时的 2.00 下降至第 5 天的 1.00,从第 6 天起又略有回升,最高密度 5.80ind.(第 8 天)。对照组密度一直较低,只在第 6 天达到 12.00 ind.,其余时间均不超过 10.00 ind.。

从实验可看出,15℃下,各组增长速度均较慢,添加 20ng 和 40ngVe 后,前 6d 的种群密度显著高于对照组($p<0.01$),80ng 组变化不明显($p=0.19>0.05$)。但当 Ve 浓度高至 100 ng 时,种群密度显著低于对照组($p<0.01$)。

2.1.2 对轮虫种群混交雌体百分率的影响(表 2) 添加不同浓度 Ve 后混交雌体百分率呈现波浪状动态,20 ng 组,第 3 天开始出现混交雌体,其混交率为 10%,第 4、5 天天混交雌体又消失,第 6 天开始又重新出现混交雌体(0.91),后期上升到 6.54%(第 9 天);40ng 组的混交雌体出现稍晚(第 4 天),且在整个实验阶段一直较低,最大值出现在第 7 天(5.99%);80ng 组在培养的前 6d 中,仅在第 3 天出现过混交雌体(16.67%),然后消失,后期较高,第 7 天为 16.67%;100ng 组,只在第 8、9 天才出现混交雌体,且比率较低;对照组混交雌体百分率变化较为复杂,且比率较高,7~9d 分别达 27.08%,40.00%和 30.43%。

各组间比较显示:实验阶段,对照组混交雌体百分率显著高于各实验组($p<0.01$,t 值分别为 20.56,20.94,14.26 和 22.47)。

2.1.3 对轮虫卵雌比的影响(表 3) 20 ng 组轮虫的卵雌比第 2 天最高(2.00),其余各天呈波动变化,第 4、8 天略高(0.71 和 0.73);40 ng 组,第 3~第 7 天,从 0.33 上升到 0.59,在培养的最后两天又分别降为 0.39 和 0.19;80ng 组第 3 天才开始产卵(0.42),最大值 0.67(第 7 天);100ng 组的携卵亦呈不规则变化,第 4 天最高(1.00),随着培养时间的延续从 1.00 降到 0.14(第 8 天),第 9 天又回升为 0.50。对照组的平均卵雌比总体上较低,只在第 3 天达到 0.40,第 4 天为 0.30,随后逐渐下降。

从上述实验结果可以看出,卵雌比和密度变化基本对应,添加适量的 Ve 后,可提高轮虫卵雌比,一般在第 2 天较为明显;6~9d,随着种群密度上升,相对产卵量降低,然后维持在一定范围波动。不过从卵雌比例上看对照组和各实验组的统计学差异不显著(P 值分别为 0.12,0.07,0.44 和 0.05)。

2.2 25℃时,添加 Ve 对萼花臂尾轮虫种群密度、混交雌体百分率和卵雌比影响

2.2.1 对轮虫种群密度的影响(表 4) 25℃时,各实验组培养时间持续 12d,Ve 为 20 ng 时,密度从第 3 天的 15.2ind. 迅速增加,4~7d 分别为 46.20,72.40,63.00 和 64.80ind.,但第 9 天骤然降至 9.80,之后又迅速攀升到 35.20,87.00 和

122.00 ind.;40 ng 组,从第 1 天的 2.00 到第 5 天的 41.60,后期上升较快,第 12d 达 124.00ind.,密度增长与培养时间呈显著相关: $Y=e^{(1.4579+0.2842X)} r=0.86, p<0.01$;80ng 组,第 4 天加速增长,第 9~12 天密度维持在 80.00~168.20ind. 之间,密度与培养时间呈显著相关: $Y=e^{(1.3609+0.3253X)} r=0.88; p<0.01$;100ng 组,前 8d 轮虫种群密度均低于 30.00 ind.,最后 4d,种群密度渐渐上升到 60~240 ind. ml⁻¹之间,密度与培养时间也呈显著相关: $Y=e^{(1.0166+0.3544X)} r=0.90, p<0.01$ 。

表 1 15℃时不同浓度 Ve 萼花臂尾轮虫种群密度(个/ml)的变化

Table 1 The change of *Brachionus calyciflorus* density(individual/ml) at different concentration of vitamin E at 15℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
2	3.80	2.00	2.00	0.40	1.40
3	2.00	2.00	2.40	2.40	0.80
4	6.60	5.60	5.00	2.80	0.40
5	6.80	9.80	7.20	4.80	1.00
6	12.00	22.00	22.60	12.00	3.60
7	9.60	46.20	33.40	12.00	4.40
8	7.00	64.60	44.40	15.40	5.80
9	4.60	76.40	65.20	10.20	2.80

表 2 15℃时不同浓度 Ve 对萼花臂尾轮虫混交雌体百分率的影响

Table 2 The effect of different concentration vitamin E on percentage of mictic female in *Brachionus calyciflorus* at 15℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	5.26	0.00	0.00	0.00	0.00
3	10.00	10.00	0.00	16.67	0.00
4	6.06	0.00	4.00	0.00	0.00
5	11.77	0.00	2.78	0.00	0.00
6	8.33	0.91	0.00	0.00	0.00
7	27.08	0.87	5.99	16.67	0.00
8	40.00	5.57	4.95	10.39	3.45
9	30.43	6.54	4.29	9.80	5.71

表 3 15℃时不同浓度 Ve 对萼花臂尾轮虫卵雌比的影响

Table 3 The effect of different concentration vitamin E on eggs ratio in *Brachionus calyciflorus* at 15℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.05	2.00	0.00	0.00	0.29
3	0.40	0.10	0.33	0.42	0.00
4	0.30	0.71	0.36	0.36	1.00
5	0.18	0.08	0.44	0.13	0.60
6	0.22	0.59	0.45	0.20	0.56
7	0.13	0.36	0.59	0.67	0.50
8	0.11	0.73	0.39	0.10	0.14
9	0.17	0.06	0.19	0.22	0.50

对照组仅在第 3 天开始加速增长,最大密度为 68.00 ind. (第 4 天),第 8 天密度骤然下降。各实验组的变动曲线大体上符合于实验种群相对静止期、指数增长期、平衡期和种群衰减期的增长规律,第 3、4 天为加倍期,密度增长呈振荡状上升。除 20ng 组外,其他各组的密度变化均极其显著高于对照组($p<0.01$, t 值分别为 0.39,18.38,13.40 和 16.40)。

2.2.2 Ve 对混交雌体百分率的变化(表 5) 25℃时,20 ng 组混交雌体百分率呈双波峰状,从第 3 天的 6.58%,逐渐上升到第 5 天的最大值 19.89%,第 7~9 天混交雌体消失,但第 10、11 天又分别上升为 2.27%,10.57%,出现第 2 次高峰。该组混交雌体百分率的变化与其种群密度的变化趋势基本一致,只在种群最大密度时(第 12 天),混交雌体百分率较低(0.49)。

40 ng 第 4、5 天分别为 7.89%,7.21%,然后下降,第 10 天升至最大值 18.67%,在最大密度为 124.00 ind 时,混交雌体百分率仅为 4.84%;80ng 组,第 6 天最高(17.02%),第 11d 次之(5.47%),其它各阶段均低于 5.00%;100ng 第 3 天出现混交雌体,其百分率为 10.94%,第 5 天混交雌体百分率最高(12.88%),在实验后期,当种群密度急剧上升到 183.00~236.00ind 时,混交雌体百分率却极低,仅为 3.56%和 2.13%,说明加入 Ve 后在促进种群增长的同时,对混交雌体的发生有抑制效果。

尽管对照组密度不高,但混交雌体第 3~5 天的混交雌体百分率均在 10%以上,第 5 天最高(27.69%)。最后几天种群数量降低后,混交雌体也较低($<5.00\%$)。统计结果表明对照组混交雌体百分率显著高于各实验组($p<0.01$, t 值分别为 2.76, 10.73,13.81 和 6.87)

2.2.3 对轮虫卵雌比的影响(表 6) 各实验组轮虫卵雌比呈双波峰的波浪状变化,培养接种后的第 2 天较高。在 20ng 组,第 2、3 天为 1.25, 0.91 ,第 12 天种群密度最高时(122.00ind),卵雌比又降到 0.36;40ng 组,第 2、3 天,卵雌比为 1.22 和 0.67,然后下降,第 8、9 天略有上升,分别为 0.80, 0.66,但当种群密度达到 80ind. 以上时(10~12 天),卵雌比分别降至 0.29,0.33 和 0.20;80ng 组接种后的 2~3d 分别为 1.41 和 0.84,随着实验种群的密度急剧上升,卵雌比缓缓下降,在种群密度最大的第 10、11 天仅为 0.38 和 0.19;100ng 组的卵雌比第 3 天最高,为 0.69,种群密度最大(第 11 天, 236.00 ind.)时,卵雌比仅为 0.17;对照组的卵雌比最大值在第 2 天出现为 1.21,然后逐渐降至第 8 天的 0.05,但第 10 天又上升至 1.0。

从上述卵雌比值看出,在种群加速增长期之前卵雌比较高,随着种群密度波动、卵雌比紧跟着波动。对照组和实验组的卵雌比没有显著差异($p>0.05$)。

2.3 30℃时,添加 Ve 后对萼花臂尾轮虫种群密度、混交雌体和卵雌比的影响

2.3.1 对轮虫种群密度的影响(表 7) 20ng 组,第 7 天开始急剧增长,第 9 天的种群密度达 113.80 ind,密度与培养时间显著相关: $Y=e^{(-0.8151+0.5203X)}$ $r=0.86$, $p<0.01$;40ng 组第 7~10 天增长幅度最大,轮虫密度分别为 85.80,119.40,121.00 和 63.6

表 4 25℃时不同浓度 Ve 萼花臂尾轮虫种群密度(个/ml)的变化
Table 4 The change of *Brachionus calyciflorus* density(ind./ml) at vitamin E different concentration at 25℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
2	4.80	4.00	4.60	4.80	4.00
3	26.00	15.20	18.20	15.40	12.80
4	68.00	46.20	38.00	38.60	27.40
5	65.20	72.40	41.60	37.60	26.40
6	47.40	63.00	26.00	35.60	27.60
7	64.40	64.80	26.00	22.40	13.40
8	4.00	17.60	27.00	36.60	28.80
9	1.20	9.80	38.60	93.20	62.80
10	2.60	35.20	83.60	164.60	183.00
11	2.00	87.00	86.60	168.20	236.20
12	0.00	122.00	124.00	80.00	94.00

表 5 25℃时不同浓度 Ve 对萼花臂尾轮虫混交雌体百分率的影响
Table 5 The effect of different concentration vitamin E on percentage of mictic female in *Brachionus calyciflorus* at 25℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	15.38	6.58	2.20	0.00	10.94
4	10.58	18.61	7.89	0.00	5.11
5	27.69	19.89	7.21	2.07	12.88
6	0.43	7.94	3.85	17.02	2.90
7	4.35	0.00	3.00	3.37	1.49
8	0.00	0.00	2.86	3.57	0.00
9	0.00	0.00	7.77	3.76	3.18
10	0.00	2.27	18.67	0.21	1.75
11	3.57	10.57	1.39	5.47	3.56
12	0.00	4.92	4.84	0.00	2.13

表 6 25℃时不同浓度 Ve 对萼花臂尾轮虫雌体卵雌比的影响
Table 6 The effect of different vitamin E concentration on egg ratio in *Brachionus calyciflorus* at 25℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1.21	1.25	1.22	1.41	0.65
3	0.60	0.91	0.67	1.06	0.69
4	0.06	0.12	0.12	0.84	0.10
5	0.08	0.17	0.24	0.02	0.39
6	0.00	0.06	0.00	0.21	0.07
7	0.05	0.13	0.00	0.05	0.66
8	0.05	0.00	0.80	0.24	0.44
9	0.50	0.69	0.66	0.50	0.34
10	1.00	0.62	0.29	0.38	0.33
11	0.43	0.41	0.33	0.19	0.17
12	0.00	0.36	0.19	0.50	0.30

ind. , 密度与培养时间相关方程为: $Y=e^{(0.4564+0.4628X)}$ $r=0.95, p<0.01$; 80ng 组, 7~9d 急剧上升为 122.80, 107.40 和 103.40ind. , 密度与培养时间的相关方程为: $Y=e^{(-0.1477+0.8539X)}$ $r=0.92, p<0.01$; 100ng 组第 6~第 8 天密度在 120 ind. 以上, 第 7 天最高, 为 151.20 ind. , 第 8 天次之(141.60ind.)。密度与培养时间呈显著相关: $Y=e^{(1.0283+0.4239X)}$ $r=0.84, p<0.01$ 。

对照组仅在第 9、10 天分别达 43.2 和 67.2 ind. , 其它时间均低于 10 ind. , 呈缓慢上升趋势, 但密度和时间之间也呈显著的指数相关关系: $Y=e^{(-0.0268+0.3342X)}$ $r=0.84, p<0.01$ 。

从实验结果可看出: 在较高温度条件下, 添加不同浓度的 Ve 后, 各实验组的轮虫种群密度均显著高出对照组 ($p<0.01$, t 值分别为 7.07, 8.12, 8.31 和 4.88)。可见, 在温度较高进行轮虫高密度培养时, 适量加入 Ve 是较好的促增长措施。

2.3.2 Ve 对轮虫混交雌体百分率的影响(表 8) 各组(除 100 ng 组外)均在培养的第 3 天开始出现混交雌体, 20ng 组第 3、5 天混交雌体百分率最高, 然后消失, 在最大密度时(第 9 天)为 1.76%。40ng 组的混交雌体百分率呈单峰状变化, 第 3 天最高, 为 32.26%, 之后的培养阶段尽管密度较高, 但混交雌体百分率较低, 且在第 9~10 天混交雌体消失; 80ng 混交雌体百分率前期较高, 第 3、6 天分别为 37.5%d 和 39.58%。后期混交雌体消失; 100ng 组只在第 3 天为 32.65%, 其他时间较低。

对照组混交雌体百分率变化幅度最大, 第 3 天开始出现混交雌体并达 22.22%, 第 5 天急剧上升到 85.70%, 最后两天, 种群密度远远高出实验前期, 但此时混交雌体百分率较低, 分别为 7.41%和 5.95%。

由以上各组实验可以看出, 添加不同浓度的 Ve 后, 可减少混交雌体的出现, 其中尤以 20ng 最为显著 ($P<0.01$, t 值分别为 18.21, 19.65, 17.46 和 18.76)。

2.3.3 Ve 对轮虫雌体卵雌比的影响(表 9) 20ng, 卵雌比第 5 天最高(1.50), 第 2、4 天次之(分别达到 1.23, 1.25), 其它各试验时间在 0.30 左右波动(第 9 天除外); 40ng 组最大值第 2 天出现 1.42, 第 3~9 天呈下降趋势, 但其中第 5 天稍有回升; 80ng 组最大卵雌比也在第 2 天出现, 为 0.44, 但第 9 天降至 0.01; 100 ng 组, 第 2 天卵雌比最大, 为 0.96, 第 4 天次之, 为 0.73。对照组的卵雌比, 在培养前期较低, 第 7、8 天分别达 1.06 和 0.88, 在种群密度最大时降至 0.2 以下。实验结果也表明, 以添加 20 ng Ve 可增加轮虫雌体的携卵量。但各组间没有显著差异(p 值分别为 0.58, 0.19, 0.10 和 0.21)。

3 讨论

3.1 利用维生素培养轮虫的实践意义

目前, 随着水产品上市质量标准体系的确立, 水产品养殖中的质量控制成为养殖水产中的重要流程。水产养殖对象对维生素的需求和定量是养殖营养生理研究的主要内容。首先, 就维生素而言, Ve 是多种养殖对象必需的代谢调节剂, 大量研究表明: Ve 在海水育苗的水产生物饵料培育和饲料生产中, 是主要的添加物。鉴于维生素类物质在有机体的代谢活动中具有重要作用, 水产养殖业的饲料加工生产过程中, 添加维生素类物质已成为一项不可缺少生产工艺^[2~4, 16]。

其次, Ve 在有关微藻的生产上具有重要潜在应用价值, 如螺旋藻的生产培养中, 褶皱臂尾轮虫(*B. plicatilis*)的出现是生

表 7 30 ℃时不同浓度 Ve 萼花臂尾轮虫种群密度(个/ml)的变化

Table 7 The change of *Brachionus calyciflorus* density(ind/ml) at different vitamin E concentration at 30 ℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
2	2.20	2.60	4.80	2.20	5.00
3	3.60	2.40	6.20	3.20	9.80
4	4.00	0.80	8.00	3.20	11.20
5	4.20	1.20	11.80	8.40	35.20
6	4.20	6.60	24.60	48.00	128.80
7	3.60	23.20	85.80	122.80	151.20
8	6.60	51.40	119.40	107.40	141.60
9	43.20	113.80	121.00	103.40	84.00
10	67.20	72.20	63.60	67.40	43.60

表 8 30 ℃时不同浓度 Ve 对萼花臂尾轮虫混交雌体百分率的影响

Table 8 The effect of vitamin E on percentage of mictic female eggs to female in *Brachionus calyciflorus* at 30 ℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	8.00
3	22.22	16.67	32.26	37.50	32.65
4	40.00	0.00	7.50	18.75	14.29
5	85.70	16.67	1.69	4.76	2.84
6	0.00	3.03	1.63	39.58	2.02
7	0.00	0.00	0.70	4.07	0.00
8	15.15	11.67	1.17	0.00	0.14
9	7.41	1.76	0.00	0.00	0.00
10	5.95	0.28	0.00	0.00	0.00

表 9 30 ℃时不同浓度 Ve 对萼花臂尾轮虫卵雌比的影响

Table 9 The effect of vitamin E on rate of eggs to female of *Brachionus calyciflorus* at 30 ℃

时间 Day	对照 Control	20ng	40ng	80ng	100ng
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	1.23	1.42	0.44	0.96
3	0.38	0.25	0.58	0.38	0.29
4	0.05	1.25	0.48	0.06	0.73
5	0.00	1.50	0.31	0.31	0.24
6	0.00	0.49	0.55	0.40	0.13
7	1.06	0.33	0.27	0.13	0.13
8	0.88	0.39	0.21	0.22	0.06
9	0.22	0.05	0.01	0.01	0.01
10	0.08	0.23	0.10	0.50	0.53

产中的普遍现象,目前只有采用升高或者降低盐度等措施以期减缓轮虫的危害。是否可以借鉴 V_e 对晶囊轮虫的诱导效应来控制微藻中的轮虫,为轮虫规模化生产萼花臂尾轮虫敌害生物控制提供生物调控捷径?许多研究结果已经表明,用富含 V_e 成分的纤细裸藻(*Euglena gracilis*)培养的萼花臂尾轮虫作为晶囊轮虫的食物时,能诱导其出现有性生殖进而抑制晶囊轮虫种群的增长^[25]。 V_e 对萼花臂尾轮虫是否具有影响,影响程度如何?目前还没有这方面的报道。如果 V_e 可以很好地促进萼花臂尾轮虫的种群增加,在轮虫的工厂化生产中,直接添加适量的 V_e 既能促进萼花臂尾轮虫种群的增长和提高其种群密度,又能控制晶囊轮虫种群,避免种群在出现崩溃现象,达到稳定持续高密度生产。

本研究结果表明:在萼花臂尾轮虫的生产性培养中,添加一定剂量 V_e 是十分有益的。轮虫种群密度和生长速度均有不同程度的提高,混交雌体百分率比较适中。

3.2 V_e 对萼花臂尾轮虫种群的影响

V_e 的化学名称为生育酚(tocopherol),根据其分子结构 V_e 包括 α - β - γ - δ - ϵ - ζ -和 η -生育酚 8 种,是一类抗氧化剂,对机体生殖行为具有调节作用,一些哺乳动物雄性个体缺乏 V_e 时常常造成不育。但对轮虫有性生殖的诱导和调节作用的机理目前尚没有报道。有关 V_e 对轮虫的影响,过去的研究主要集中在晶囊轮虫属^[12,13,17~24]。一种解释是:晶囊轮虫的非混交雌体母体摄食了含有 V_e 的微藻或者食微藻的其他浮游动物后, V_e 通过非混交雌体的胃传递到胚胎组织,然后到后代的子宫,产生混交雌体后代。另外一种解释是 V_e 对晶囊轮虫的生殖调节作用表现在可以使母体形态发生变异,其后代的混交雌体百分率差异非常明显,如 V_e 是卜氏晶囊轮虫(*Asplanchna brightwelli*)、中型晶囊轮虫(*A. intermedia*)和西氏晶囊轮虫(*A. sieboldi*)的促生长刺激因子,它能使轮虫发生形态改变,产生倒钟型、十字型的后代,在融有 V_e 的介质中培养的轮虫个体比没有 V_e 介质中的个体大且具有体壁赘生物(Body Wall Outgrowths BWOs)^[25,26]。

V_e 对轮虫种群的增长是否有促进作用,作用效果如何,还没有见过具体报道,而 V_e 对萼花臂尾轮虫种群的增长是否有诱导作用,诱导作用的机理是什么?目前也没有相关报道。从本研究结果可看出:不同温度条件下, V_e 可以不同程度促进萼花臂尾轮虫种群增长,对种群卵雌比和混交雌体百分率也有一定调节作用。15℃条件下,添加 V_e 剂量为 20ng 和 40 ng 时,可明显提高种群密度,第 6 天轮虫密度迅速提高。剂量高于 80ng/ml 时种群增长反而不明显,其原因可能是:由于 V_e 是一种脂溶性乳剂,温度较低时,乳化后的 V_e 可能重新凝析,其溶解度降低,加之 V_e 浓度过高,会有脂滴状物浮在培养液表面,使藻类的生长受到限制。另一方面,由于轮虫是通过头冠纤毛的运动来取食的,在溶剂粘度大时易在口前形成“筛”(Screen)状结构,轮虫头冠纤毛的摆动和游泳速度受到影响,使摄食效率降低,进而影响到种群的增长^[27~30]。

表 10 25℃时不同浓度 V_e 下轮虫最大密度、最大密度出现时间和高密度持续时间比较
Table 10 Compare of population density, emergence time of highest density and persistence for density exceeded 50ind. ml⁻¹ and 100 ind. /ml at 25℃

实验组 Exp. group	最大密度 Max. density(ind. /ml)	出现时间(d) Emergence time	密度大于 50 个/L 的时间(d) time for density>50ind. /ml	密度大于 100 个/L 的时间(d) time for density >100ind. /ml
对照组	68	4	3	0
20ng	122	12	5	1
40ng	124	12	3	1
80ng	168	11	4	2
100ng	236	11	4	2

25℃时,添加 V_e 后,种群前几天的变化与对照组相似,但在高峰期后的第 3~第 7 天,经历一次种群衰减,随后重新又出现一次高峰,且比前一次高峰期密度要高出许多,维持高峰期的时间延长。如表 10,20 ng 组 10~12d 出现第 2 次高峰时密度分别达 35.20、87.00 和 122.00 ind.;40 ng 组,第 1 次高峰为 41.60ind.,第 2 次高峰为 124ind.。不加 V_e 的种群,在培养过程中

表 11 30℃时不同浓度 V_e 下轮虫最大密度、最大密度出现时间和高密度持续时间比较
Table 11 Compare of population density, emergence time of highest density and persistence for density exceeded 50ind. /ml and 100 ind. /ml at 30℃

实验组 Exp. group	最大密度 Max. density(ind. /ml)	出现时间 Emergence time	密度大于 50 个/L 的时间(d) Time for density>50ind. /ml	密度大于 100 个/L 的时间(d) Time for density >100ind. /ml
对照组	67.20	10	1	0
20ng	113.80	9	3	1
40ng	119.40	8	4	3
80ng	122.80	7	4	3
100ng	151.20	7	4	3

群密度在第 3~第 7 天曾达 68 ind. 左右,但在后期阶段,种群密度迅速降低直至种群崩溃。可见,25℃对萼花臂尾轮虫种群增长是适宜温度,若再添加一定剂量的 V_E 可以提高种群密度延长高峰时间。其他组有 3~5d 超过 50ind.,且至少有一天高于 100 ind.。

从表 11 可看出,虽然培养温度达 30℃,但如果不添加 V_E ,轮虫增长缓慢,第 10 天才出现高峰,峰值也仅在 67.20ind.;添加不同浓度的 V_E 后,不但可使轮虫高峰期提前 1~3d,而且峰值亦可大大提高,但总体而言,增长效果不如 25℃时显著。密度超过 50ind. 维持时间和 25℃时接近,但是超过 100ind. 的时间达 3d。

综合上述结果可以得出:在不同温度条件下,添加适宜维生素 E 可以不同程度增加轮虫种群密度,提高轮虫相对怀卵量,降低有性生殖混交雌体比率,延长高密度持续时间。因而维生素 E 对萼花臂尾轮虫规模化生产具有重要作用。

References:

- [1] Wang J J. *The Freshwater rotifer Fauna in China*. Beijing: Science Press, 1961. 1~288.
- [2] Liu J K. *Cultivation of the Chinese Freshwater Fishes* (Third Edition). Beijing: Science Press, 1992. 1~745.
- [3] Zhang Z Y, Tan Y J, Ou Y H. *Cultivation of the Chinese pond Fishes*. Shanghai Science & Technology Press, 1993. 167~447.
- [4] Fulks W & Main K L. *Rotifer and microalgae culture systems*. Proceedings of a U.S-Asia workshop. Honolulu, Hawaii, 1991. 1~362.
- [5] Litton J R Jr. and Gilbert J J. Analysis of tocopherol in *Rhodotorula glutinis*, *Agarius compestris* and *Euglena gracilis* using spectrofluorometry and rotifer bioassay. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1976, **21**:345~354.
- [6] Gilbert J J. Control of sexuality in the rotifer *Asplanchna brightwelli* by Dietary lipid of plant organ. *Prol. scio. Nat. Acad. Sci. U.S. A.*, 1967, **157**:1218~1225.
- [7] Gilbert J J. Alpha tocopherol and sexual reproduction in the rotifer morphism in the *Asplanchna*. *Science*, 1968a, **159**:734~736.
- [8] Gilbert J J. Dietary control of sexuality in the rotifer *Asplanchna brightwell* Gosse. *Physiol. Zool.*, 1968b, **41**:14~43.
- [9] Gilbert J J. Some notes on the control of sexuality in the rotifer *Asplanchna sieboldi*. *Limnol. Oceanogr.* 1971, **16**:309~319.
- [10] Gilbert J J. α -tocopherol in male of the rotifer *Asplanchna sieboldi*: Its metabolism and its distribution in the testis and rudimentary gut. *J. Exp. Zool.*, 1972, **181**:117~128.
- [11] Gilbert J J. Monoxenic culture of rotifer *Brachionus calyciflorus* in a defined medium. *Oecologia*, 1974, **4**:89~101.
- [12] Gilbert J. J. Dietary tocopherol and Sexual reproduction in the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna sieboldi*. *J. Exp. Zool.*, 1975, **194**:485~494.
- [13] Gilbert J J. Mictic female production in the rotifer *Brachiorus calyciflorus*. *J. Exp. Zool.*, 1963, **153**:113~124.
- [14] Yang J X, Huang X F. The effects of density and temperature on the egg and mictic female produced by *Brachionus calyciflorus* (Rotatoria: Monogononta). *Journal of Lake Sciences*, 1996, **8**(4):367~372.
- [15] Paloheimo J E. Calculation on instantaneous birth rates. *Limnol Oceanogr.*, 1974, **19**:692~694.
- [16] Awais A, Kestemont P & Micha J C. An investigation in to the mass production of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas I. An ecophysiological approach to nutrition. *Aquaculture*, 1992, **105**:325~336.
- [17] Kabay M E & Gilbert J J. Polymorphism and reproductive mode in the rotifer, *Asplanchna sieboldi*: relationship between meiotic oogenesis and shape of bodywall outgrowths. *J Exp Zool.*, 1977, **201**:21~28.
- [18] Gilbert J J. Control of morphotype frequency distributions in the population of the rotifer *Asplanchna sieboldi*: factors influencing the production of the tocopherol dependent Cruciform and Campanulate morphotype. *Ecology*, 1981, **62**(5): 1299~1310.
- [19] Birky C W Jr. Studies on the physiology and genetics of the rotifer *Asplanchna* I. methods and physiology. *J. Exp. Zool.*, 1964, **156**: 273~292.
- [20] Birky C W Jr. Studies on the physiology and genetics of the rotifer *Asplanchna* II. the genetic basis of a case of male sterility. *J. Exp. Zool.*, 1965, **158**:349~356.
- [21] Birky C W Jr. Studies on the physiology and genetics of the rotifer *Asplanchna* III. Results of outcrossing, selfing and selection. *J. Exp. Zool.*, 1967, **164**:105~116.
- [22] Birky C W Jr. The development genetics of polymorphism in the rotifer *Asplanchna* II. A method for quantitative analysis of change in morphogenesis induced by V_E and the effects short-term inheritance of effects of V_E . *J. Exp. Zool.*, 1969, **170**:157~168.
- [23] Birky C W Jr. Parthenogenesis in rotifer: the control of sexual and asexual reproduction. *Amer. Zool.*, 1971, **11**:245~266.
- [24] Birky C W Jr and Gilbert J J. Vitamin E as an extrinsic and intrinsic signal controlling development in the rotifer *Asplanchna*: uptake, transmission, and localization of α -tocopherol. *J. Embryo Exp. Morphol.*, 1972, **27**:103~120.
- [25] Gilbert J J. Polymorphism in the rotifer *Asplanchna sieboldi*: Biomass. Growth. And reproductive rate of saccate and campanulate morphotypes. *Ecology*, 1976, **57**:542~551.

[26] Gilbert J J. Rotifera. In: Reproductive Biology of Invertebrates. K G Adiyodi and R. G. Adiyodi eds. , Vol. VI, Part A. Asexual Propagation and Reproductive Strategies. Oxford&. IBH Publishing Co. PVT. LTD. New Delhi, 1993. 231~263.

[27] Boraas M E. A chemostat system for the study of rotifer alga nitrate interactions. In: Kerfoot W C, Ed. Evolution and ecology of zooplankton communities. University press of New England , Hanover, NH. , 1980. 173~182.

[28] Gilbert J J. Effect of nontocopherol component of the diet on polymorphism , sexuality, biomass, and reproductive rate of the rotifer *Asplanchna sieboldi*. *Arch. Hydrobiologie.* , 1977, **80**: 375~397.

[29] Gilbert J J. Sexual Reproduction in the rotifer *Asplanchna girod*: Effects of tocopherol and population Density. *J. Exp. Zool.* , 1978, **204**: 113~122.

[30] Gilbert J J. Control of sexuality in *Asplanchna brightwelli* threshold levels of dietary tocopherol and modification of tocopherol response by exogenous and endogenous factors. *Hydrobiologia.* , 1983, **104**: 167~173.

参考文献:

[1] 王家楫. 中国淡水轮虫志. 北京: 科学出版社, 1961. 1~288.

[2] 刘建康. 中国淡水鱼类养殖学(第 3 版). 北京: 科学出版社, 1992. 1~745.

[3] 张宗扬, 谭玉均, 欧阳海. 中国池塘鱼类养殖学. 上海: 上海科技出版社, 1993. 167~447.

[14] 杨家新, 黄祥飞. 温度和密度对萼花臂尾轮虫产卵量和混交雌体的影响. 湖泊科学, 1996, **8**(4): 367~372.

