

DOI: 10.5846/stxb202109282719

葛雅丽, 张峰, 曹漫漫, 罗彤, 席贻龙. 大型和小型萼花臂尾轮虫的遗传和生活史特征比较研究. 生态学报, 2023, 43(13): 5491-5504.

Ge Y L, Zhang F, Cao M M, Luo T, Xi Y L. Comparison of the genetic and life history characteristics between large and small *Brachionus calyciflorus* morphs. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(13): 5491-5504.

大型和小型萼花臂尾轮虫的遗传和生活史特征比较研究

葛雅丽^{1,3}, 张峰¹, 曹漫漫¹, 罗彤², 席贻龙^{1,3,*}

1 安徽师范大学生态与环境学院, 芜湖 241000

2 安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000

3 安徽省高校“生物环境与生态安全”省级重点实验室, 芜湖 241000

摘要:近年来,有关生物个体大小变异规律的研究已经成为生活史对策研究的重要内容之一。研究发现,大小相似的萼花臂尾轮虫(*Brachionus Calyciflorus*)母体所产休眠卵孵化出的不同克隆后代个体大小变化显著,其中,最大个体是最小个体体积的 6.25 倍。推测种群内产生不同大小的后代个体是轮虫应对环境变化的一种适应性进化策略,然而目前对上述不同大小轮虫克隆的遗传和生活史特征的研究尚未见报道。以 mtDNA COI 基因和 rDNA ITS 序列作为分子标记,比较了个体大小差异显著的不同克隆萼花臂尾轮虫的遗传分化程度和分类地位,并在不同温度(20℃、25℃、30℃)和不同斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)食物密度(1.0×10⁶、3.0×10⁶、5.0×10⁶个/mL)下比较了它们的生活史特征。结果表明,萼花臂尾轮虫种群内个体大小变异并非由于遗传特征的明显分化所导致,大型和小型个体轮虫克隆在两种分子标记上并不构成姐妹种,且两种形态型间还存在共享单倍型。温度、食物密度、轮虫形态型,以及温度和食物密度各自与轮虫形态型之间的交互作用,均显著影响轮虫的生活史特征。小型轮虫在 1.0×10⁶个细胞/mL 食物密度下显著延长了胚胎和幼体的发育时间,缩短了生殖期历时;大型轮虫在 1.0×10⁶个细胞/mL 和 3.0×10⁶个细胞/mL 食物密度下显著延长了幼体的发育时间,但是其用于胚胎发育和生殖的时间却不随食物密度的变化而变化。各温度和食物密度条件下,大型轮虫的生殖期历时、平均寿命和世代时间均显著延长,或有延长趋势;而两者的种群增长能力之间的差异却因温度和食物密度的不同而异。20℃、25℃以及 3.0×10⁶个细胞/mL 和 5.0×10⁶个细胞/mL 食物密度下两种形态型轮虫的生殖能力相似;30℃条件下小型轮虫的生殖能力更强;1.0×10⁶个细胞/mL 食物密度下大型轮虫的生殖能力更强。小型轮虫在各温度和各食物密度下均未产生混交雌体后代,而大型轮虫在 20℃低温下有较高的后代混交率。因此,大型和小型个体轮虫克隆具有显著不同的生活史策略,且利用有性生殖直接产生个体体积明显变异的不同克隆后代是萼花臂尾轮虫适应不可预测环境变化的一种“赌注策略”。

关键词:萼花臂尾轮虫;个体体积;形态;遗传分化;生活史特征

Comparison of the genetic and life history characteristics between large and small *Brachionus calyciflorus* morphs

GE Yali^{1,3}, ZHANG Feng¹, CAO Manman¹, LUO Tong², XI Yilong^{1,3,*}

1 College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

2 School of Ecology and Environment, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

3 Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety in Anhui Province, Wuhu 241000, China

Abstract: In recent years, studies on the size variation of organism have become an important component of life history

基金项目:国家自然科学基金项目(32070463);安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室、重要生物资源保护和利用研究安徽省重点实验室专项基金;安徽省高校协同创新项目(GXXT-2020-075)

收稿日期:2021-09-28; **网络出版日期:**2023-03-07

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ylx1965@126.com

strategy research. In this study, the significant body size variations of different *Brachionus calyciflorus* clones hatched by resting eggs produced by different mothers with the same body size were found, and the largest body size was 6.25 times that of the smallest one. It is hypothesized that producing offspring with different body sizes in rotifer population is an adaptive evolutionary strategy to cope with environmental changes. However, few attempts have been made to investigate the genetic and life-history characteristics of those large and small rotifer clones. Hereby, in the present study, the genetic differentiation and classification status were compared between large and small *B. calyciflorus* clones by molecular markers of mtDNA COI genes and rDNA ITS sequences, and their life history characteristics were also examined at 20 °C, 25 °C, 30 °C and 1.0×10^6 , 3.0×10^6 , 5.0×10^6 cells/mL food densities of *Scenedesmus obliquus*. The results showed that body size variations in *B. calyciflorus* population were not attributed to a marked divergence of genetic traits. Large and small rotifer clones showed no differentiation of sibling species by the two molecular markers, and two morphs had the shared haplotypes. Temperature, food density, rotifer morphotype, and the interactions between temperature or food density and rotifer morphotype all significantly affected life history characteristics of *B. calyciflorus*. At the food density of 1.0×10^6 cells/mL, small rotifers displayed longer embryo and juvenile periods and shorter reproduction period markedly. Large rotifers did not reveal significant changes of embryo and reproduction periods in response to food level variation, but showed longer juvenile period at 1.0×10^6 and 3.0×10^6 cells/mL food densities. Compared to small rotifers, the reproduction period, average lifespan and generation time of large rotifers became longer significantly, or tended to be longer significantly at each temperature and food density. The difference in population growth between the two morphs differed with temperature and food density. The reproductive capacities of the two morphs were similar in treatments with 20 °C, 25 °C, 3.0×10^6 , and 5.0×10^6 cells/mL food densities, but that of small and large rotifers was stronger at 30 °C and 1.0×10^6 cells/mL food density, respectively. Small rotifers did not have mictic female offspring at each temperature and food density, while large rotifers had higher proportion of mictic offspring at 20 °C. Overall, large and small *B. calyciflorus* clones had different life history strategies, and significant body size variations in offspring produced by sexual reproduction could occur by the evolution of bet-hedging strategies to adapt to environmental unpredictability.

Key Words: *Brachionus calyciflorus*; body size; morph; genetic differentiation; life history characteristics

近年来,有关生物个体大小变异规律的研究已经成为生活史研究的重要内容之一^[1-2]。在稳定的环境条件下,母体产出恒定大小的后代可能是最优的选择,然而自然界种群内的个体大小变异十分明显,这可能与不同母体的大小和营养条件以及后代个体出生时的环境等有关^[3-5]。已有的研究普遍认为,为适应环境变化,母体会选择最佳的能量分配对策,以权衡后代大小和数量之间的关系,而且认为后代大小和后代的适合度是正相关的^[6-7]。自然界中,由于生理和机体构造等原因,后代大小超过一定界限时其适合度会降低^[8-9]。因此,产生过大或者过小的后代都可能会直接增加个体适合度成本。同一母体所产生的后代大小之间也可能会表现出显著差异^[10-11],这可能是母体的一种赌注对策(a bet-hedging strategy),母体通过这种策略确保其中一部分后代具有最佳的个体大小,以应对将来不可预测的环境变化^[12],这在一定程度上是一种适应策略(adaptive strategy)^[13]。而 McGinley 等^[14]研究发现,只有当母体能够严格控制后代的分布时产生大小不同的后代才有意义。

轮虫(Rotifer)是水体中广泛分布的一类浮游动物,在水域生态系统食物网中起着承上启下的作用,其生活史周期短,不同种类轮虫的个体大小差异较大,其最大体长可达 4mm,最小仅约 40 μ m。单巢纲(Monogononta)轮虫的生活史是孤雌生殖、有性生殖、胚胎滞育过程的有机组合^[15],其中最显著的特征是能够产生休眠卵。一部分休眠卵会在环境适宜时萌发,而未萌发的休眠卵将不断壮大该物种的休眠卵库^[16]。由于有性生殖能够增加种群的遗传多样性,所以休眠卵不仅是轮虫借以度过不良条件的一种方式,更是对调控种群的遗传多样性及保证种群的繁衍和壮大具有重要的生物学意义^[17]。

多态现象在轮虫中广泛存在,且在臂尾轮属(*Brachionus*)和龟甲轮属(*Keratella*)等的轮虫种类中尤为常见^[18]。研究发现安徽省芜湖市镜湖内萼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus*)的个体大小在一定范围内变化,其最大个体可达最小个体体积的 2.4 倍^[19]。因此,以轮虫作为模式生物研究生物个体大小等形态变化的生物学机

制和生态学意义具有重要的理论价值。此外,不同种类或同一种类不同年龄阶段的水产动物幼苗需要摄食的轮虫大小并不相同^[20],所以研究轮虫个体大小的变化规律以及生态适应机制对水产养殖也有一定的理论指导意义。

目前研究发现,影响轮虫孤雌生殖后代个体大小的因素包括外源性因素和内源性因素。外源性因素有食物资源、温度、水体含氧量和捕食者等^[21-23],内源性因素如轮虫的地理品系、种群增长阶段、母体年龄和姐妹种遗传差异等^[21,24-26]。本研究小组在实验过程中发现,同一时期采自同一湖泊内具有相同形态特征的萼花臂尾轮虫产生的休眠卵所孵化出的后代个体大小有明显差异,即通过有性生殖产生个体大小不同的后代,我们推测这是轮虫种群应对不可预测环境变化的一种生态适应策略,而并非由于遗传特征的明显分化所导致。此外,推测不同大小的轮虫后代可能具有不同的生活史对策,从而确保在不同的环境条件下有合适大小的轮虫个体能够存活和繁衍,并维持一定的种群数量。然而,上述理论推测还需要实验数据加以验证。

mtDNA COI 基因是研究轮虫遗传变异的首选分子标记^[27],真核生物的 rDNA ITS 序列也被广泛用于轮虫种间和不同地理品系间分子系统发生关系的研究^[28]。因此我们以 mtDNA COI 基因和 rDNA ITS 序列作为分子标记,研究了萼花臂尾轮虫休眠卵孵化产生的个体大小差异显著的不同克隆轮虫的遗传分化程度和分类地位,为进一步深入研究个体大小变异与轮虫种群遗传结构之间的关系提供更多的理论依据。此外,形态特征的变化可能会直接影响到轮虫的生活史类型^[28-30],而目前对于此方面的研究多涉及棘刺的有无和长度的变化对轮虫生活史对策的影响^[31-35]。因此,本研究还比较了个体大小差异显著的不同克隆萼花臂尾轮虫的生活史特征,为进一步了解轮虫个体大小变异的生态适应机制提供实验性证据。

1 材料与方法

1.1 轮虫的来源与培养

实验用萼花臂尾轮虫于 2018 年 10 月 20 日采自于芜湖市镜湖(118.38°E,31.33°N),从镜湖水样中挑取 50 个大小和棘刺形态相似的萼花臂尾轮虫在实验条件下进行群体扩大培养。培养器皿为 10mL 的玻璃试管,培养温度为 25℃,光照强度约为 130lx, L:D = 16:8。轮虫的培养基为 EPA 培养基(将 300mg CaSO₄、480mg NaHCO₃、20mg KCl 和 300mg MgSO₄溶解于 5 L 的蒸馏水中)。喂食轮虫的饵料为 HB-4 培养基^[36]培养的、处于指数增长期的、密度为 3.0×10⁶个细胞/mL 的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)。培养过程中,每 12h 悬浮 1 次沉积于试管底部的藻类食物;每 24h 更换一次轮虫培养液并加入新鲜饵料 1 次,同时除去一部分个体使轮虫种群始终处于指数增长期。

1.2 休眠卵的收集和萌发

培养过程中,更换轮虫培养液时,用微吸管从试管底部吸出当天产生的休眠卵,并转移到 1.5mL 的 EP 管中保存。持续收集休眠卵约 20d,所有收集到的休眠卵均放置于 4℃ 冰箱中避光保存一个月以上。之后将冰箱中保存的休眠卵取出,并单个置于带凹槽的 24 孔板的小孔中。向每个小孔中加入 0.5mL 含有藻类食物的轮虫培养液作为萌发液,之后将 24 孔板置于 30℃ 的光照培养箱内进行休眠卵萌发。萌发过程中每 12h 观察一次,并用玻璃吸管吸出孵化出的轮虫干雌体;每 24h 更换一次休眠卵萌发液。对孵化出的轮虫干雌体进行单克隆扩大培养,获得不同克隆轮虫种群,培养条件与 1.1 相同。

1.3 轮虫个体大小的测量

孵化出的轮虫干雌体在实验室内单克隆扩大培养一周后,每个克隆的轮虫均培养至 50 只以上,且种群密度约 10—12 个/mL。此时,用玻璃吸管从每个克隆中吸出带有非混交卵的轮虫雌体 30 只,之后用终浓度为 10% 的甲醛溶液将其固定于 EP 管中。采用 LEICA DM 2000 显微镜对上述固定的轮虫个体进行拍照,并利用 LAS V4.5 软件测量轮虫的背甲长度和宽度。轮虫个体体积(V_b)计算公式如下^[36]: $V_b = \frac{1}{5}a^2b$ 。其中 a 和 b 分别是轮虫的被甲长度与被甲宽度。

1.4 两种形态型轮虫 mtDNA COI 基因和 rDNA ITS 序列分析

1.4.1 获取大型和小型轮虫样品

在特定培养条件下轮虫雌体经过扩大培养所产生后代的个体大小是相对稳定的,因此根据 1.3 中的测量和计算结果,获得不同克隆轮虫的个体体积,并利用 SPSS 19.0 软件对轮虫的个体大小进行聚类分析,可将轮虫分为大型(个体体积: 2.4×10^6 — $5.0 \times 10^6 \mu\text{m}^3$)和小型(个体体积: 0.8×10^6 — $2.4 \times 10^6 \mu\text{m}^3$)两类,并最终建立大型轮虫 38 个克隆(编号为 B1—B38)和小型轮虫 19 个克隆(编号为 S1—S19)。提取总 DNA 之前,将每个克隆轮虫饥饿处理 24h 以上,之后用蒸馏水冲洗多次,并将活着的轮虫收集于 EP 管中,置于 -20°C 冰箱保存待用。

1.4.2 轮虫总 DNA 的提取

实验使用 Wizard™ 基因组 DNA 纯化试剂盒提取轮虫总 DNA (Promega, USA)^[37]。

1.4.3 PCR 扩增及序列测定

扩增反应在 Biometra TONE 扩增仪中进行,扩增引物和其它试剂均在南京金斯瑞生物科技有限公司合成和购买。mtDNA COI 基因的扩增引物序列为 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HCO21989 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'); rDNA ITS 序列的扩增引物序列为 LH₂ (5'-GTCCAATTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA-3') 和 Dlam (5'-CCTGCAGTCGACAKATGCTTAARTTCAGCRGG-3')。PCR 反应体系的总体积为 25 μL ,包括 2.5 μL 10 \times Buffer, 2 μL dNTPS, 0.5 μL 引物, 2 μL Mg²⁺, 3 μL DNA 模板, 0.5 μL Taq 酶, 14.5 μL 超纯水。mtDNA COI 基因序列扩增反应程序如下: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 40sec, 52 $^\circ\text{C}$ 退火 30sec, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2min, 共 35 个循环;最后 72 $^\circ\text{C}$ 充分延伸 20min; 4 $^\circ\text{C}$ 保存。rDNA ITS 序列扩增反应程序如下: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30sec, 52 $^\circ\text{C}$ 退火 30sec, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1min, 共 35 个循环;最后 72 $^\circ\text{C}$ 充分延伸 10min; 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB)电泳检测,并使用 AxyPrep™ PCR 纯化试剂盒 (AXYGEN) 纯化回收,然后与 pMD 19-T 载体 (Takara) 连接并转化到 DH5 α 大肠杆菌细胞内。用质粒提取试剂盒提取含有目的片段的质粒 DNA,用 ABI PRISM 3730 型自动测序仪进行序列测定。

1.5 两种形态型轮虫的生活史特征研究

1.5.1 轮虫的来源

根据上述聚类分析以及 mt COI 基因和 rDNA ITS 序列分析结果,挑选出个体体积差异显著且属于同一单倍型的两个轮虫克隆,即大型和小型轮虫克隆作为实验对象。

1.5.2 轮虫的预培养

实验前,将两种形态型轮虫分别进行预培养。不同温度下的预培养是将轮虫置于 20 $^\circ\text{C}$ 、25 $^\circ\text{C}$ 和 30 $^\circ\text{C}$ 的恒温光照培养箱内,以密度为 3.0×10^6 个细胞/mL 的斜生栅藻作为食物,进行为期一周以上的预培养,实验共设置 6(2 \times 3) 个组。不同食物密度下的预培养是将轮虫置于 25 $^\circ\text{C}$ 的恒温光照培养箱内,分别以密度为 1.0×10^6 、 3.0×10^6 、 5.0×10^6 个细胞/mL 的斜生栅藻作为轮虫的食物,进行为期一周以上的预培养,实验共设置 6(2 \times 3) 个组。预培养时,以 25mL 的玻璃烧杯作为培养器皿,其余培养条件和培养方法同 1.1。

1.5.3 单个体培养和生命表实验

从预培养的各烧杯中随机吸取大量带卵的非混交雌体,置于特制的 5mL 的小玻璃杯中。向小玻璃杯中加入含有藻类食物的轮虫培养液,并将之放入光照培养箱中进行轮虫培养,等待幼体孵化,培养条件与预培养相同。之后分别从各玻璃杯中吸取 60 个龄长小于 4h 的轮虫幼体,并随机平均分成两组,一组用于单个体培养实验,一组用于生命表实验。单个体培养实验开始时,将轮虫幼体置于带凹槽的 24 孔板中,每个小孔中放置 1 个轮虫个体,并加入 0.5mL 含有藻类食物的轮虫培养液,于光照培养箱中进行培养,培养条件与预培养相同。培养过程中每隔 3h 观察一次,记录轮虫的幼体阶段历时和胚胎发育期历时。之后,每隔 12h 观察 1 次,记录轮虫的生殖期历时和生殖后期历时。实验过程中,每隔 24h 更换 1 次轮虫培养液并投喂藻类食物,实验

至全部个体死亡为止。生命表实验开始时,将轮虫置于 5mL 的特制玻璃杯中,每组设置 3 个重复,即每个玻璃杯中放置 10 只幼体,并加入 3mL 含有藻类食物的轮虫培养液,于光照培养箱内进行培养,培养条件与预培养相同。实验过程中,每 12h 观察一次,记录轮虫所产的幼体数和母体的存活情况,并移出所产幼体。移出的幼体放入其它特制的玻璃杯中继续培养,待其产卵后确定雌体类型(混交雌体或非混交雌体),培养条件与预培养相同。实验过程中,每隔 24h 更换 1 次轮虫培养液并投喂藻类食物,实验至全部母体死亡为止。

1.5.4 生活史参数的定义和计算

胚胎发育期历时:指从卵的产出到幼体孵出所经历的时间;幼体阶段历时:指从幼体孵出到其产出第一枚非混交卵所经历的时间;生殖期历时:指从第一枚卵产出到最后一枚卵产出所经历的时间;繁殖后期历时:指轮虫产出最后一枚卵到其死亡所经历的时间。特定年龄存活率: X 年龄组开始时存活个体百分数率, l_x ;特定年龄繁殖率: X 年龄组平均每个个体所产的雌性后代数, m_x ;净生殖率:种群经过一个世代后的净增长率, $R_0 = \sum_0^{\infty} l_x m_x$;世代时间:完成一个世代所需要的时间, $T = \sum x l_x m_x / R_0$;种群内禀增长率:种群在特定实验条件下的最大增长率, r_m ;根据方程 $r_m = \ln R_0 / T$ 在粗略计算的基础上,再根据方程 $\sum_{x=0}^n e^{-r_m x} l_x m_x = 1$ 在 Excel 中试算求得种群内禀增长率的精确值;平均寿命:所有个体平均能活多久的观察值;后代混交率:所有雌性后代中混交雌体所占的比率。

1.6 数据的统计和分析

使用 Clustal X 1.8 软件(Thompson *et al.*, 1997)对序列进行比对,并辅以人工校对;使用 DNASTAR 软件计算序列两两之间的差异百分比;使用 DnaSP 5.1^[38]分析多态位点、简约信息位点;使用 DAMBE 软件计算单倍型和核苷酸频率;使用 MEGA 5.0 软件^[39]计算各序列间的转换颠换比和遗传距离。构建系统树时,本研究以褶皱臂尾轮虫(*B. plicatilis*)为外群,同时从 GenBank 中各引用了一条萼花臂尾轮虫姐妹种的 COI 基因和 ITS 序列,序列登录号分别为 FJ826905 和 KX495857,系统树中直接以物种名命名这两条序列。使用 Modeltest 3.7^[40]检验数据,并找出最适的参数模型;使用 PAUP 4.0b10 软件,采用启发式搜索的方法,以最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发生树,ML 树各节点的支持率以序列数据集 1000 次重复抽样检验的自引导值(Bootstrap value)表示。

采用 SPSS 19.0 分析软件和 Excel 对轮虫生活史特征相关数据进行分析,对所得到的数据作正态性分布检验(Kolmogorov-Smirnov)后,对符合正态分布的各组数据进行方差齐性检验(Levene),并应用单因素方差分析方法和多重比较方法(LSD 法)分析温度和食物密度分别对两种形态型轮虫的发育阶段历时和生活史参数的影响;应用独立样本 t 检验比较两种形态型轮虫的发育阶段历时和生活史参数之间的差异;应用双因素方差分析方法分析温度、食物密度、轮虫形态型、温度和轮虫形态型之间的交互作用以及食物密度和轮虫形态型之间的交互作用对轮虫生活史参数的影响。

本研究的实验方案流程如图 1 所示。

2 结果

2.1 两种形态型轮虫的遗传特征

2.1.1 DNA 分子序列的特点

COI 基因序列中 A、C、G 和 T 碱基的平均含量分别为 24.91%、15.33%、16.40% 和 43.36%,其中 A+T 含量(68.27%)丰富,明显大于 G+C 含量(31.73%)。所测 57 个样品(克隆)共包括 9 个单倍型。其中,S1—S8、S10—S13、S15、S16、S18、S19、B1—5、B9—11、B13—B15、B17—B21、B25、B30—32、B34—38 为一相同的单倍型(HAP1),B6、B16、B22、B24 为另一相同的单倍型(HAP2),B26—29 为一相同的单倍型(HAP3),S9、S14 和 B12 为另一相同的单倍型(HAP4);这 4 个单倍型与 B7、B8、B23、B33、S17 为互不相同的单倍型。因此,轮虫 2 种形态型间有共享单倍型。经过对比,在 662 个位点中,COI 基因序列长度为 661—662bp,单倍型 B33 的序

列长度为 662bp, 而其余序列长度为 661bp; 所有样品中共发现 17 个多态位点, 4 个简约信息位点。所有样品的转换与颠换比平均为 3.844645, 所有样品的进化距离为 0.007375, 2 种形态型轮虫间 COI 基因序列的进化距离为 0.007253, 大型轮虫的进化距离为 0.007741, 而小型轮虫的进化距离为 0.009173。不同单倍型序列差异百分比为 0.2%—1.5%, 平均为 0.75%。其中, HAP4 与其他单倍型间的序列差异较大, 百分比为 0.9%—1.5%; 而其他单倍型间序列差异百分比为 0.2%—1.4%。引入的蓼花臂尾轮虫姐妹种序列与不同单倍型间的序列差异百分比为 12.7%—13.3%, 这表明本研究中两种形态的轮虫克隆并非姐妹种。

ITS 序列中 A、C、G 和 T 碱基的平均含量分别为 28.75%、16.92%、18.41% 和 35.92%, 其中 A+T 含量 (64.67%) 丰富, 明显大于 G+C 含量 (35.33%)。所测 57 个样品 (克隆) 共包括 8 个单倍型。其中, B26、B35 为一相同的单倍型 (HAP1), S2—4、S6、S8、S9、S11、S12、B2、B3、B6—8、B11—13、B19、B22—24、B27—30、B32 为另一相同的单倍型 (HAP2), S19、B15、B18 为另一相同的单倍型 (HAP3), S1、S5、S7、S13—18、B1、B4、B5、B9、B10、B17、B20、B21、B25、B31、B33、B36—38 为一相同的单倍型 (HAP4)。而这 4 个单倍型与 B14、B16、B34、S10 为互不相同的单倍型。因此, 轮虫 2 种形态型间有共享单倍型。经过对比, 在 761 个位点中, ITS 序列长度都为 761bp, 所有样品中共发现 12 个多态位点, 1 个简约信息位点。所有样品的转换与颠换比平均为 1.451913, 所有样品的进化距离为 0.004337, 2 种形态型轮虫间的进化距离为 0.003300, 大型轮虫的进化距离为 0.004528, 而小型轮虫的进化距离为 0.002638。不同单倍型序列差异百分比为 0.1%—0.9%, 平均为 0.44%。其中, B14 与其他单倍型间的序列差异较大, 百分比为 0.7%—0.9%; 而其他单倍型间序列差异百分比为 0.1%—0.5%。引入的蓼花臂尾轮虫姐妹种序列与不同单倍型间的序列差异百分比为 4.9%—5.4%, 这表明本研究中两种形态的轮虫克隆并非姐妹种。

2.1.2 基于分子序列构建的系统发生树

基于 COI 基因和 ITS 序列构建的 ML 系统发生树分别支持将蓼花臂尾轮虫 9 个单倍型和 8 个单倍型分为同一支, 结合上述各单倍型间分子序列差异, 可以认为不同单倍型间不构成姐妹种 (图 2)。

2.2 两种形态型轮虫的生活史特征

2.2.1 轮虫的主要发育阶段历时

不同温度和不同食物密度下两种形态型轮虫的各主要发育期历时见表 1。除了生殖后期历时以外, 两种形态型轮虫的其余各发育阶段历时均受温度的显著影响 ($P < 0.01$); 除了小型轮虫的生殖后期历时和大型轮虫的胚胎发育期以及生殖期历时以外, 两种形态型轮虫的其余各发育阶段历时均受到食物密度的显著影响 ($P < 0.05$)。小型轮虫的幼体阶段历时和大型轮虫个体的生殖期历时均在 20℃ 下显著长于 25℃ 与 30℃ 下, 后两者间无显著差异; 小型轮虫的胚胎发育期和生殖期历时以及大型轮虫的幼体阶段和胚胎发育期历时均随着温度升高而依次显著缩短。小型轮虫的胚胎发育期历时和幼体阶段历时均在 1.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下

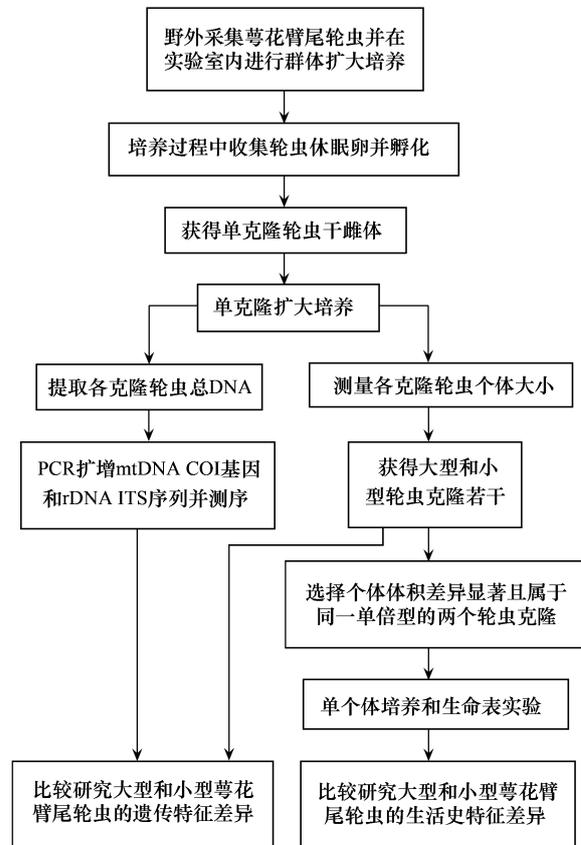


图 1 本研究的实验方案流程

Fig.1 The experimental scheme of this study

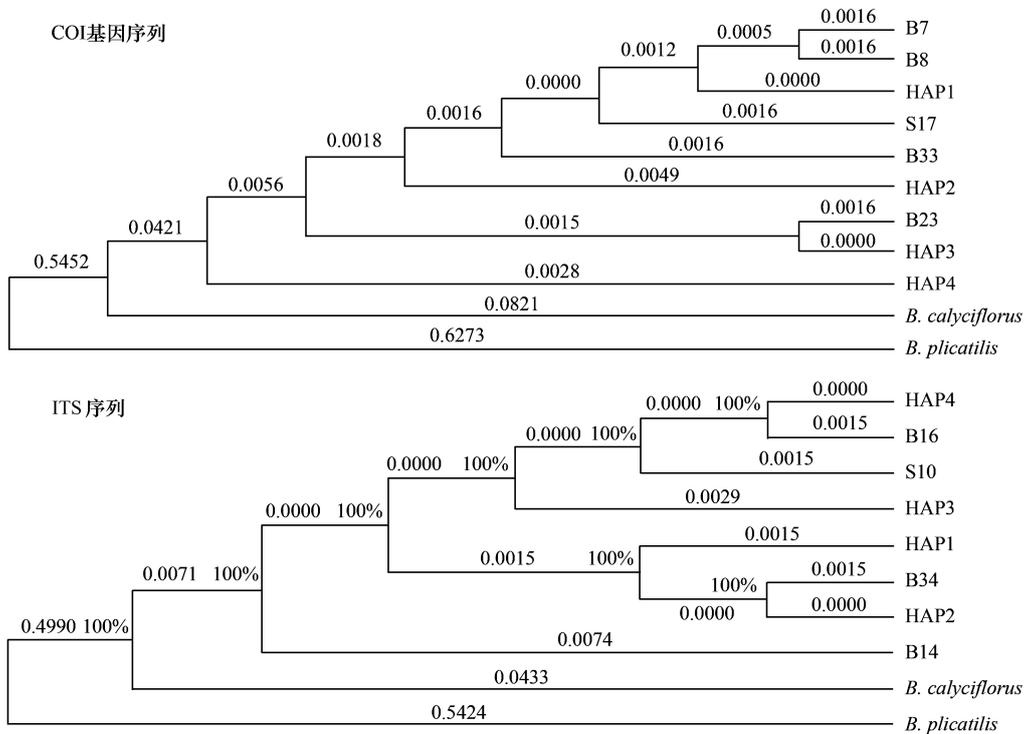


图 2 基于 COI 基因和 ITS 序列构建的萼花臂尾轮虫系统发生树

Fig.2 The phylogenetic tree of *B. calyciflorus* based on COI gene and ITS sequences

显著长于其他两个食物密度下,后两者间无显著差异;而其生殖期历时随食物密度的变化情况则相反。大型轮虫的幼体阶段历时在 1.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下显著长于其他两个食物密度下,而后两者间无显著差异;其生殖后期历时在 1.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下显著长于 3.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下,而它们均与 5.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下无显著性差异。

表 1 不同温度和食物密度下大型和小型萼花臂尾轮虫的发育阶段历时(平均值±标准误)

Table 1 Developmental durations of large and small *B. calyciflorus* at different temperatures /°C and food densities/($\times 10^6$ cells/mL) (Mean ± SE)

参数 Parameters	形态型 Morphotypes	温度 Temperature			食物密度 Food density		
		20	25	30	1.0	3.0	5.0
DEP/h	SM	16.90±0.34a *	9.00±0.20b *	8.10±0.29c *	10.10±0.34A	9.00±0.20B *	8.60±0.24B *
	LM	21.90±0.33a	10.00±0.26b	6.80±0.25c	10.20±0.27	10.00±0.26	9.90±0.26
DJP/h	SM	24.90±0.60a *	15.10±0.34b *	14.10±0.41b *	16.6±0.49A	15.10±0.34B *	14.60±0.37B *
	LM	27.20±0.56a	17.60±0.34b	12.90±0.33c	17.60±0.28A	17.60±0.34A	16.20±0.37B
DRP/h	SM	73.10±3.94a *	55.30±2.73b *	43.10±2.11c *	41.77±2.53A *	55.30±2.73B *	50.60±3.30B *
	LM	118.60±5.77a	67.40±3.62b	62.10±2.09b	62.60±3.25	67.40±3.62	67.20±3.92
DPRP/h	SM	18.40±1.88 *	20.40±1.64	16.40±1.22	21.60±1.86 *	20.40±1.64	20.00±1.85
	LM	26.40±3.07	23.60±1.95	19.20±1.69	30.00±2.35A	23.60±1.95B	24.80±1.99AB

多重比较(LSD 检验法):具相同小写字母表示同一行不同温度间无显著性差异,具相同大写字母表示同一行不同食物密度间无显著性差异;独立样本 t 检验: * 表示不同形态型间有显著性差异 ($P < 0.05$);表中符号的含义如下:DEP:胚胎发育期历时 Duration of embryo period;DJP:幼体阶段历时 Duration of juvenile period;DRP:生殖期历时 Duration of reproduction period;DPRP:生殖后期历时 Duration of post-reproduction period;SM:小型 Small morph;LM:大型, Large morph

形态型对轮虫发育期历时的影响因温度和食物密度的不同而异。20°C 时大型轮虫的各发育阶段历时均显著长于小型轮虫;25°C 时前者的幼体阶段、胚胎发育期和生殖期历时均显著长于后者;而 30°C 时前者的生

殖期历时显著长于后者,但是其幼体阶段历时和胚胎发育期历时却显著短于后者。 1.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下,大型轮虫的生殖期和生殖后期历时均显著长于小型轮虫。 3.0×10^6 和 5.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下,大型轮虫的幼体阶段、胚胎发育期和生殖期历时均显著长于小型轮虫。

温度和形态型以及食物密度和形态型对轮虫发育阶段历时影响的双因素方差分析结果表明,温度和食物密度对轮虫的胚胎发育、幼体阶段和生殖期历时均有显著影响 ($P < 0.05$),形态型对轮虫的各发育阶段历时均有显著的影响 ($P < 0.01$),温度和形态型的交互作用对轮虫的胚胎发育、幼体阶段和生殖期历时均有显著影响 ($P < 0.01$),食物密度和形态型的交互作用对轮虫的各发育期历时均无显著性影响 ($P > 0.05$)。不考虑形态型的影响时,轮虫的胚胎发育、幼体阶段和生殖期历时均随温度的升高而依次显著缩短;幼体阶段历时随食物密度的增高而依次显著缩短;胚胎发育期和生殖期历时在 1.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下分别显著长于和短于 3.0×10^6 和 5.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下,后两者间无显著差异。不考虑温度和食物密度影响时,大型轮虫的各发育阶段历时均显著长于小型轮虫(表 2 和表 3)。

表 2 温度和形态型及其交互作用对萼花臂尾轮虫发育阶段历时的影响

Table 2 Effects of temperature, rotifer morphotype and their interaction on developmental durations of *B. calyciflorus*

参数和差异源 Parameters and sources	均方 MS Mean square	平方和 SS Sum of square	df	F	P
幼体阶段历时 Duration of juvenile period					
温度 Temperature (A)	2597.15	5194.30	2	443.565	<0.01
形态型 Morphotype (B)	64.80	64.80	1	11.067	<0.01
A×B	64.95	129.90	2	11.093	<0.01
Error	5.855	1018.80	174		
胚胎发育期历时 Duration of embryo period					
温度 Temperature (A)	2450.15	4900.30	2	1027.539	<0.01
形态型 Morphotypes (B)	110.45	110.45	1	46.32	<0.01
A×B	152.45	304.90	2	63.934	<0.01
Error	2.384	414.90	174		
生殖期历时 Duration of reproduction period					
温度 Temperature (A)	31373.875	62747.50	2	80.206	<0.01
形态型 Morphotypes (B)	29337.80	29337.80	1	75.001	<0.01
A×B	4663.55	9327.10	2	11.922	<0.01
Error	391.166	68062.80	174		
生殖后期历时 Duration of post-reproduction period					
温度 Temperature (A)	389.60	779.20	2	3.276	0.057
形态型 Morphotypes (B)	980.00	980.00	1	8.241	<0.01
A×B	125.60	251.20	2	1.056	0.35
Error	118.924	20692.80	174		

2.2.2 轮虫的生命表统计学参数

不同温度和不同食物密度下两种形态型轮虫的生命表统计学参数见表 4。除了小型轮虫的后代混交率外,两种形态型轮虫其余各生命表统计学参数均受到温度的显著影响 ($P < 0.01$)。食物密度对两种形态型轮虫的净生殖率和内禀增长率均有显著影响 ($P < 0.05$),而对两种形态型轮虫的平均寿命、世代时间和后代混交率均无显著影响 ($P > 0.05$)。小型轮虫的平均寿命和世代时间均在 20°C 时显著长于 25°C 和 30°C 时,而后两者之间均无显著差异;其净生殖率和内禀增长率均随着温度的升高而依次显著增大。大型轮虫的平均寿命和净生殖率在 20°C 时分别显著长于和低于 25°C 和 30°C 时,后两者间均无显著差异;其世代时间和内禀增长率分别随温度的升高而依次显著缩短和增高;其后代混交率在 20°C 时显著高于 25°C 和 30°C 时,后两者间无显著差异。两种形态型轮虫的净生殖率和内禀增长率均在 1.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下显著低于另外两种食物

密度下,而后两者间均无显著差异。

表 3 食物密度和形态型及其交互作用对萼花臂尾轮虫发育阶段历时的影响

Table 3 Effects of food density, rotifer morphotype and their interaction on developmental durations of *B. calyciflorus*

参数和差异源 Parameters and sources	均方 MS	平方和 SS	df	F	P
幼体阶段历时 Duration of juvenile period					
食物密度 Food densities(A)	43.55	87.10	2	10.52	<0.01
形态型 Morphotypes(B)	130.05	130.05	1	31.416	<0.01
A×B	8.55	17.10	2	2.065	0.130
Error	4.14	720.30	174		
胚胎发育期历时 Duration of embryo period					
食物密度 Food densities(A)	12.95	25.90	2	6.167	<0.01
形态型 Morphotypes(B)	28.80	28.80	1	13.714	<0.01
A×B	5.85	11.70	2	2.786	0.064
Error	2.10	365.40	174		
生殖期历时 Duration of reproduction period					
食物密度 Food densities(A)	1351.439	2702.878	2	4.235	0.016
形态型 Morphotypes(B)	12267.756	12267.756	1	38.443	<0.01
A×B	286.106	572.211	2	0.897	0.410
误差 Error	319.115	55526.067	174		
生殖后期历时 Duration of post-reproduction period					
食物密度 Food densities(A)	261.60	523.20	2	2.289	0.104
形态型 Morphotypes(B)	1344.80	1344.80	1	11.767	<0.01
A×B	106.40	212.80	2	0.931	0.396
Error	114.29	19886.40	174		

表 4 不同温度和食物密度下两种形态型萼花臂尾轮虫的生命表统计学参数(平均值±标准误)

Table 4 Life table demographic parameters of two *B. calyciflorus* morphs at different temperatures and food densities (Mean±SE)

参数 Parameters	形态型 Morphotypes	温度 Temperature/°C			食物密度 Food density/(×10 ⁶ cells/mL)		
		20	25	30	1.0	3.0	5.0
ML	SM	124.400±6.66a *	89.200±2.43b *	84.400±5.56b	76.400±3.27 *	89.200±2.43 *	85.600±2.80
	LM	142.800±7.87 a	109.200±3.86 b	96.000±1.83 b	97.200±5.50	109.200±3.86	95.200±5.38
T	SM	94.450±4.29a *	65.800±0.59b *	59.270±1.17b *	63.250±2.11 *	65.800±0.59 *	64.020±1.59 *
	LM	106.410±2.03a	76.640±2.86b	66.700±0.88c	77.400±2.16	76.640±2.86	72.590±0.43
R ₀	SM	6.430±0.53a	10.100±0.43b	15.600±0.88c *	5.030±0.03A *	10.100±0.43B	9.030±0.36B *
	LM	6.300±0.64a	11.700±0.66b	12.300±0.49b	8.290±0.41A	11.700±0.66B	11.400±0.72B
r _m	SM	0.022±0.002a	0.041±0.001b	0.058±0.000c *	0.028±0.001A *	0.041±0.001B	0.040±0.001B
	LM	0.019±0.001a	0.040±0.0014b	0.049±0.000c	0.034±0.001A	0.040±0.001B	0.041±0.001B
M	SM	0±0 *	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
	LM	4.10±1.40a	0±0b	0.71±0.41b	0±0	0±0	0.53±0.27

多重比较(LSD 检验法):具相同小写字母表示同一行不同温度间无显著性差异,具相同大写字母表示同一行不同食物密度间无显著性差异;独立样本 t 检验;*表示不同形态型间有显著性差异(P<0.05);ML:平均寿命 Mean lifespan;T:世代时间 Generation time;R₀:净生殖率 Net reproductive rate;r_m:内禀增长率 Intrinsic rate of population;M:后代混交率 Mixis rate of offspring

形态型对轮虫生命表统计学参数的影响因温度和食物密度的不同而异。20℃时,小型轮虫的平均寿命和世代时间均显著短于大型轮虫,其后代混交率显著低于大型轮虫;25℃时,小型轮虫的平均寿命和世代时间显著短于大型轮虫;30℃时,小型轮虫的世代时间显著短于大型轮虫,但其净生殖率和内禀增长率均显著高于大型轮虫。1.0×10⁶个细胞/mL 食物密度下,大型轮虫的各生命表统计学参数(除后代混交率)均显著长于或者大于小型轮虫;3.0×10⁶个细胞/mL 食物密度下,大型轮虫的平均寿命和世代时间显著长于小型轮虫;5.0×10⁶

个细胞/mL 食物密度下,大型轮虫的世代时间显著长于小型轮虫,其净生殖率显著高于后者。

温度和形态型对轮虫生命表统计学参数影响的双因素方差分析结果表明, 3.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下,温度对轮虫的各生命表统计学参数均有显著影响 ($P < 0.05$),形态型对轮虫的平均寿命、世代时间、内禀增长率和后代混交率均有极显著的影响 ($P < 0.01$),温度和形态型的交互作用对轮虫的净生殖率、内禀增长率和后代混交率均有显著影响 ($P < 0.05$)。不考虑形态型的影响时,轮虫的平均寿命在 20°C 时显著长于 25°C 和 30°C 时,后两者间无显著差异;其世代时间和净生殖率、内禀增长率分别随温度的升高而依次显著缩短和增高;其后代混交率在 20°C 时显著高于 25°C 和 30°C 时,后两者间无显著差异。不考虑温度的影响时,大型轮虫的平均寿命和世代时间均显著长于小型轮虫,其内禀增长率显著小于后者,其后代混交率显著高于后者(表 5)。

表 5 温度和轮虫形态型及其交互作用对萼花臂尾轮虫生命表统计学参数的影响

Table 5 Effects of temperature, rotifer morphotype and their interaction on life table demographic parameters of *B. calyciflorus*

参数和差异源 Parameter and source	均方 MS	平方和 SS	df	F	P
平均寿命 Average lifespan					
温度 Temperature (A)	3147.92	6295.84	2	39.037	<0.01
形态型 Morphotypes (B)	1250.00	1250.00	1	15.501	<0.01
A×B	29.84	59.68	2	0.37	0.698
Error	80.64	967.68	12		
世代时间 Generation time					
温度 Temperature (A)	2323.237	4646.475	2	140.015	<0.01
形态型 Morphotypes (B)	457.128	457.128	1	27.55	<0.01
A×B	8.347	16.694	2	0.503	0.617
Error	16.593	199.113	12		
净生殖率 Net reproductive rate					
温度 Temperature (A)	87.472	174.944	2	75.245	<0.01
形态型 Morphotypes (B)	1.693	1.693	1	1.456	0.251
A×B	9.263	18.526	2	7.968	<0.01
Error	1.162	13.95	12		
内禀增长率 Intrinsic rate of population					
温度 Temperature (A)	0.002	0.003	2	423.119	<0.01
形态型 Morphotypes (B)	7.401×10^{-5}	7.401×10^{-5}	1	18.785	<0.01
A×B	2.644×10^{-5}	5.328×10^{-5}	2	6.762	0.011
Error	3.94×10^{-6}	4.728×10^{-5}	12		
后代混交率 Proportion of mictic offspring					
温度 Temperature (A)	0.001	0.001	2	6.74	0.011
形态型 Morphotypes (B)	0.001	0.001	1	10.853	<0.01
A×B	0.001	0.001	2	6.74	0.011
Error	0.000	0.001	12		

食物密度和形态型对轮虫生命表统计学参数影响的双因素方差分析结果表明, 25°C 条件下,食物密度对轮虫的平均寿命、净生殖率和内禀增长率均有影响显著 ($P < 0.05$),形态型对轮虫除了后代混交率以外的其余各生命表统计学参数均有影响显著 ($P < 0.05$),食物密度和形态型的交互作用对轮虫的内禀增长率有显著影响 ($P < 0.05$)。不考虑形态型的影响时,轮虫的平均寿命在 1.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下显著短于 3.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下,而它们均与 5.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下无显著差异;其净生殖率和内禀增长率均在 1.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下显著低于 3.0×10^6 、 5.0×10^6 个细胞/mL 食物密度下,后两者间均无显著差异。不考虑食物密度的影响时,大型轮虫的平均寿命和世代时间均显著长于小型轮虫,其净生殖率和内禀增

长率均显著大于后者(表6)。

表6 食物密度和形态型及其交互作用对萼花臂尾轮虫生命表统计学参数的影响

Table 6 Effects of food density, rotifer morphotype and their interaction on life table demographic parameters of *B. calyciflorus*

参数和差异源 Parameter and source	均方 MS	平方和 SS	df	F	P
平均寿命 Average lifespan					
食物密度 Food densities(A)	244.16	488.32	2	4.05	0.027
形态型 Morphotypes(B)	1270.08	1270.08	1	25.773	<0.01
A×B	58.56	117.12	2	1.188	0.338
Error	49.28	591.36	12		
世代时间 Generation time					
食物密度 Food densities(A)	13.362	26.723	2	1.313	0.305
形态型 Morphotypes(B)	563.268	563.268	1	55.344	<0.01
A×B	11.857	23.713	2	1.165	0.345
Error	10.178	122.13	12		
净生殖率 Net reproductive rate					
食物密度 Food densities(A)	31.12	62.241	2	42.958	<0.01
形态型 Morphotypes(B)	26.112	26.112	1	36.045	<0.01
A×B	1.039	2.078	2	1.435	0.276
Error	0.724	8.693	12		
内禀增长率 Intrinsic rate of population					
食物密度 Food densities(A)	0.000	0.000	2	43.853	<0.01
形态型 Morphotypes(B)	2.048×10^{-5}	2.048×10^{-5}	1	5.776	0.033
A×B	1.806×10^{-5}	3.612×10^{-5}	2	5.094	0.025
Error	3.546×10^{-6}	4.255×10^{-5}	12		
后代混交率 Proportion of mictic offspring					
食物密度 Food densities(A)	1.387×10^{-5}	2.774×10^{-5}	2	3.908	0.051
形态型 Morphotypes(B)	1.387×10^{-5}	1.387×10^{-5}	1	3.908	0.071
A×B	1.387×10^{-5}	2.774×10^{-5}	2	3.908	0.051
Error	3.549×10^{-6}	4.259×10^{-5}	12		

3 讨论

3.1 大型和小型萼花臂尾轮虫的遗传特征

由于环境因子和遗传差异等均可显著影响轮虫个体的形态特征,所以将现代分子生物学技术与传统分类学方法结合起来研究轮虫的适应性进化更有意义。许丹丹根据 COI 基因和 ITS 序列这两个分子标记进一步证实了形态上极为相似的热带龟甲轮虫(*K. tropica*)和曲腿龟甲轮虫(*k. valga*)分属不同的种类^[41]。与此同时,关于利用轮虫形态测量数据和分子序列分析研究轮虫种内进化的报道已有不少。Fu 等^[42]根据形态测量数据和等位酶分析,将褶皱臂尾轮虫分为个体大小不同的两种形态的姐妹种。根据前人的研究结果,Gómez 等^[43]依据 DNA 分子标记,认为褶皱臂尾轮虫复合体中含有 9 个姐妹种,并且主要分为大型、中型和小型 3 个进化枝。而后,Campillo 等^[44]和席貽龙等^[26]分别比较研究了褶皱臂尾轮虫和萼花臂尾轮虫姐妹种之间的形态和遗传特征差异,认为轮虫的形态测量值差异并不能作为姐妹种鉴别的可靠方法,即无法依据轮虫的形态特征甄别姐妹种,而本研究进一步证实了这一结论。本研究中,不同克隆萼花臂尾轮虫最大个体体积是最小个体体积的 6.25 倍,但是大小差异如此显著的不同克隆轮虫在 COI 基因和 ITS 序列这两个分子标记上并不构成姐妹种,而且大型和小型两种形态型间还存在共享单倍型,因此推测萼花臂尾轮虫种群中个体大小的分化和变异可能与遗传信息表达模式不同有关,然而这还需要进一步系统的研究。

Marshall 等^[2]以五种发育模式不同的海洋无脊椎动物为对象进行研究,认为海洋无脊椎动物在卵的孵化过程中存在一种赌注策略,即母体在不可预测的环境条件下,会生育个体大小不同的后代以适应环境的变化,因为大小不同的后代可能拥有不同的生活史对策,如小个体后代繁殖能力较强,而大个体后代生存能力较强等。本研究中,来自相同生存环境、个体大小相似的轮虫母体所产生的休眠卵孵化出的不同克隆后代的个体体积有显著差异,因此推测萼花臂尾轮虫种群可以直接利用有性生殖表现出类似上述的赌注策略,种群通过这种策略确保其中一部分后代具有最佳的个体大小,以应对未来不可预测的快速的的环境变化,这在一定程度上是一种适应策略。

3.2 大型和小型萼花臂尾轮虫的生活史特征

轮虫的幼体阶段和胚胎发育期历时能够显著影响其孤雌生殖的增殖速率,因此研究轮虫发育阶段历时有助于了解轮虫种群动态变化的过程和机理^[45]。在食物充足的条件下,影响轮虫主要发育阶段历时最显著的环境因子是温度,由于温度升高,轮虫的发育速率和代谢速率会随之加快,因此一般认为轮虫的主要发育阶段历时、平均寿命和世代时间会随着温度升高而缩短^[46-48]。同时,食物密度也可以显著影响轮虫的幼体发育历时,而且影响结果还可能因轮虫地理品系的不同而异^[49]。当环境中食物较为缺乏时,轮虫获取的能量较少,会抑制自身的繁殖能力,以获得更长的寿命,忍耐至食物充足时开始繁殖^[50]。与前人的研究结论相似,本研究结果发现,大、小不同的两种形态型萼花臂尾轮虫的幼体阶段、胚胎发育和生殖期历时以及其平均寿命和世代时间均随着温度的升高显著缩短。萼花臂尾轮虫小型个体在低食物密度时显著延长了胚胎和幼体的发育时间,同时缩短了生殖期历时,推测其此时将更多地能量用于个体的生长和存活,而非用于生殖后代;而其大型个体虽然也在低食物密度时显著延长了幼体的发育时间,但是其用于胚胎发育和生殖的时间却不随食物密度的变化而发生显著变化,推测大型轮虫个体可以从母体获得较多的能量,较小范围内的食物密度变化并不会显著影响其能量的分配对策。此外,本研究中两种形态型萼花臂尾轮虫的平均寿命和世代时间均不受食物密度的显著影响,而这可能与本研究设置的食物密度变化范围较小有关^[51]。

有研究表明,轮虫的净生殖率与温度之间并无显著相关性^[52],但关于此结论还有所争议^[53];而其种群内禀增长率则受温度的显著影响^[52]。此外,食物密度是影响轮虫净生殖率和内禀增长率最重要的外源性因子之一^[54],有研究发现轮虫在较为适合的中等食物密度下有最高的净生殖率和内禀增长率^[55]。本研究中,大、小两种形态型萼花臂尾轮虫的净生殖率和内禀增长率均随温度和食物密度的升高而增大,这可能与本实验设计的食物密度变化范围较小有关。

人们普遍认为体型较大的生物体单位体积的代谢消耗率较低,因此推测大型个体的平均寿命和世代时间会显著长于小型个体,而本研究结果也符合这一推测结论。各温度和各食物密度条件下,与小型个体相比,大型萼花臂尾轮虫的平均寿命和世代时间均显著延长,或有显著延长趋势。此外,本研究还发现,尽管各温度和各食物密度条件下大型萼花臂尾轮虫的生殖期历时均显著长于小型个体,但是两者的种群增长能力之间的差异却因温度和食物密度的不同而异。20℃、25℃以及 3.0×10^6 和 5.0×10^6 个细胞/mL食物密度下大型和小型萼花臂尾轮虫的净生殖率和内禀增长率之间均无显著差异,30℃时其大型个体的净生殖率和内禀增长率显著低于小型个体,而 1.0×10^6 个细胞/mL食物密度下其大型个体的净生殖率和内禀增长率则显著高于小型个体。因此,推测温度适中、食物较丰富时大小两种形态型萼花臂尾轮虫的生殖能力相似;高温条件下其小型个体的繁殖能力相对更强;而食物匮乏时其大型个体可能具有更强的摄食能力,可以获得更多的能量,进而拥有相对更强的繁殖能力。

轮虫后代混交率是指产生的幼体中混交雌体的个数占雌性后代总数的百分比,混交雌体指轮虫中能参与有性生殖的雌体,它的产生受到一系列内源性和外源性因素的影响,如温度、食物密度、捕食压力、轮虫的地理品系和种群密度等^[56-60]。本研究中,萼花臂尾轮虫小型个体在各温度和各食物密度条件下均未出现混交雌体后代,而其大型个体在低温(20℃)下有较高的后代混交率。因此,面对低温等不利环境时,大型萼花臂尾轮虫后代的有性生殖比例显著增加,让更多的后代进入休眠阶段,以保证种群不会灭绝,并增加种群的遗传多

样性;而小型轮虫个体则可以继续营孤雌生殖,以维持或者扩大种群数量。

参考文献(References):

- [1] Stearns S C. The Evolution of Life Histories. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- [2] Marshall D J, Bonduriansky R, Bussière L F. Offspring size variation within broods as a bet-hedging strategy in unpredictable environments. *Ecology*, 2008, 89(9): 2506-2517.
- [3] Hendry A P, Day T, Cooper A B. Optimal size and number of propagules: allowance for discrete stages and effects of maternal size on reproductive output and offspring fitness. *The American Naturalist*, 2001, 157(4): 387-407.
- [4] Sakai S, Harada Y. Why do large mothers produce large offspring? Theory and a test. *The American Naturalist*, 2001, 157(3): 348-359.
- [5] Einum S, Fleming I A. Does within-population variation in fish egg size reflect maternal influences on optimal values?. *The American Naturalist*, 2002, 160(6): 756-765.
- [6] Smith C C, Fretwell S D. The optimal balance between size and number of offspring. *The American Naturalist*, 1974, 108(962): 499-506.
- [7] Sargent R C, Taylor P D, Gross M R. Parental care and the evolution of egg size in fishes. *The American Naturalist*, 1987, 129(1): 32-46.
- [8] Congdon J D, Gibbons J W. Morphological constraint on egg size: a challenge to optimal egg size theory?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(12): 4145-4147.
- [9] Dibattista J D, Feldheim K A, Gruber S H, Hendry A P. When bigger is not better: selection against large size, high condition and fast growth in juvenile lemon sharks. *Journal of Evolutionary Biology*, 2007, 20(1): 201-212.
- [10] Kudo S I. Intraclutch egg-size variation in acanthosomatid bugs: adaptive allocation of maternal investment?. *Oikos*, 2001, 92(2): 208-214.
- [11] Marshall D J, Bolton T F, Keough M J. Offspring size affects the post-metamorphic performance of a colonial marine invertebrate. *Ecology*, 2003, 84(12): 3131-3137.
- [12] Koops M A, Hutchings J A, Adams B K. Environmental predictability and the cost of imperfect information: influences on offspring size variability. *Evolutionary Ecology Research*, 2003, 5(1): 29-42.
- [13] Fox C W, Czesak M E. Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annual Review of Entomology*, 2000, 45: 341-369.
- [14] McGinley M A, Temme D H, Geber M A. Parental investment in offspring in variable environments: theoretical and empirical considerations. *The American Naturalist*, 1987, 130(3): 370-398.
- [15] King C E. Comparative survivorship and fecundity of mictic and amictic female rotifers. *Physiological Zoology*, 1970, 43(3): 206-212.
- [16] Brendonck L, De Meester L. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 2003, 491(1/3): 65-84.
- [17] 周利, 相建海. 褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)复合种休眠卵孵化的调控因子及其作用机制的研究. *海洋科学集刊*, 2003, 45: 192-201.
- [18] 葛雅丽, 席贻龙, 马杰, 许丹丹. 剪形臂尾轮虫形态的时空变化及其与生态因子间的关系. *生态学报*, 2012, 32(16): 5034-5042.
- [19] 温新利, 席贻龙. 镜湖常见臂尾轮虫(*Brachionus*)种群周年动态及生活史对策. *生态学报*, 2007, 27(10): 3956-3963.
- [20] 向巍. 池塘主养黄颡鱼模式技术要点. *农家致富*, 2019, (10): 36-37.
- [21] Xi Y L, Liu G Y, Jin H J. Population growth, body size, and egg size of two different strains of *Brachionus calyciflorus* pallas (Rotifera) fed different algae. *Journal of Freshwater Ecology*, 2002, 17(2): 185-190.
- [22] Stelzer C P. Phenotypic plasticity of body size at different temperatures in a planktonic rotifer: mechanisms and adaptive significance. *Functional Ecology*, 2002, 16(6): 835-841.
- [23] Czarnoleski M, Ejsmont-Karabin J, Angilletta M J Jr, Kozłowski J. Colder rotifers grow larger but only in oxygenated waters. *Ecosphere*, 2015, 6(9): 1-5.
- [24] Sarma S S S, Rao T R. Effect of food level on body size and egg size in a growing population of the rotifer *Brachionus patulus* Muller. *Archiv fur Hydrobiologie*, 1987, 111(2): 245-253.
- [25] Schröder T, Gilbert J J. Maternal age and spine development in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: increase of spine length with birth orders. *Freshwater Biology*, 2009, 54(5): 1054-1065.
- [26] 席贻龙, 李化炳, 程新峰. 萼花臂尾轮虫种复合体内三个姐妹种的形态差异. *生态学报*, 2010, 30(13): 3645-3653.
- [27] Vawter L, Brown W M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science*, 1986, 234(234): 194-196.
- [28] Gómez A, Serra M, Carvalho G R, Lunt D H. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, 2002, 56(7): 1431-1444.
- [29] Sarma S S S, Pavón-Meza E L, Nandini S. Comparative population growth and life table demography of the rotifer *Asplanchna girodi* at different prey (*Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis*) (Rotifera) densities. *Hydrobiologia*, 2003, 491(1/3): 309-320.
- [30] Stelzer C P. Evolution of rotifer life histories. *Hydrobiologia*, 2005, 546(1): 335-346.
- [31] Xiang X L, Xi Y L, Zhang J Y, Ma Q, Wen X L. Effects of temperature on survival, reproduction, and morphotype in offspring of two *Brachionus calyciflorus* (Rotifera) morphotypes. *Journal of Freshwater Ecology*, 2010, 25(1): 9-18.

- [32] Ge Y L, Luo T, Ge C C, Zhan R, Yu J H, Xi Y L, Zhang G. Comparison of the life-history parameters and competition outcome with *Moina macrocopa* between two morphs of *Brachionus forficula*. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 6022.
- [33] Ge Y L, Zhan R, Yu J H, Xi Y L, Ma J, Xu D D. Effects of food concentration on the life table demography and morphology of three *Keratella quadrata* morphotypes. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 2018, 54: 16.
- [34] Ge Y L, Yu X J, Zhan R, Yu J H, Xi Y L, Zhang G. Comparison of life-history parameters and effectiveness in competition with *Moina macrocopa* between two *Keratella tropica* morphs. *Limnologica*, 2020, 85: 125823.
- [35] Ge Y L, Ge C C, Zhan R, Yu J H, Luo T, Xi Y L, Zhang G. Influence of two *Keratella tropica* morphs on the population dynamics of the predator *Asplanchna brightwelli*. *Journal of Plankton Research*, 2020, 42(2): 203-209.
- [36] 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.
- [37] 李瑶, 席贻龙, 王爱民, 牛翔翔, 温新利, 刘桂云. 汀棠湖蓼花臂尾轮虫姊妹种组成和生活史特征的时间变化. *生态学报*, 2014, 34(21): 6172-6181.
- [38] Librado P, Rozas J. Dna SP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [39] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [40] Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817-818.
- [41] 许丹丹. 热带龟甲轮虫和曲腿龟甲轮虫的分类地位和生活史特征 [D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2011.
- [42] Fu Y, Hirayama K, Natsukari Y. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1991, 151(1): 29-41.
- [43] Gómez A, Adcock G J, Lunt D H, Carvalho G R. The interplay between colonization history and gene flow in passively dispersing zooplankton: microsatellite analysis of rotifer resting egg banks. *Journal of Evolutionary Biology*, 2002, 15: 158-171.
- [44] Campillo S, García-Roger E M, Martínez-Torres D, Serra M. Morphological stasis of two species belonging to the L-morphotype in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*, 2005, 546(1): 181-187.
- [45] Pourriot R. Les rotifères-biologie//Barnabé G, ed. *Aquaculture*. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1986: 201-222.
- [46] Pavón-Meza E L, Sarma S S S, Nandini S. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) food level and temperature on the demography of *Brachionus havanaensis* (Rotifera): a life table study. *Hydrobiologia*, 2005, 546(1): 353-360.
- [47] 席贻龙, 黄祥飞. 温度对壶状臂尾轮虫实验种群动态的影响. *海洋与湖沼*, 2000, 31(1): 23-28.
- [48] 姚慧, 张欢, 王松波, 耿红. 温度和铜绿微囊藻毒性对蓼花臂尾轮虫生活史参数的影响. *水生生物学报*, 2020, 44(1): 206-212.
- [49] 葛雅丽, 席贻龙, 陈芳, 董丽丽, 储昭霞, 徐晓平. 食物浓度和品系对蓼花臂尾轮虫生殖期历时和混交雌体形成的影响. *生态学报*, 2005, 25(8): 1831-1837.
- [50] Kirk K. Egg size, offspring quality and food level in planktonic rotifers. *Freshwater Biology*, 1997, 37(3): 515-521.
- [51] 卢文轩, 杨坤, 张静. 食物浓度对壶状臂尾轮虫生活史特征的影响. *安徽农业科学*, 2008, 36(29): 12725-12726, 12728-12728.
- [52] Meadow N D, Barrows C H Jr. Studies on aging in a bdelloid rotifer. II. The effects of various environmental conditions and maternal age on longevity and fecundity. *Journal of Gerontology*, 1971, 26(3): 302-309.
- [53] 葛雅丽, 席贻龙, 马杰, 许丹丹. 温度对矩形龟甲轮虫生命表统计学参数和形态特征的影响. *应用生态学报*, 2011, 22(5): 1287-1294.
- [54] 项贤领, 朱晔璘, 徐秋磊, 朱凌云, 席贻龙. 盐酸四环素浓度和食物密度对蓼花臂尾轮虫生活史特征的综合影响. *生态学报*, 2017, 37(22): 7718-7728.
- [55] 宁乐锋, 席贻龙, 孙强, 周澳. 温度和食物密度对裂足臂尾轮虫 (*Brachionus diversicornis*) 生命表统计学参数的影响. *湖泊科学*, 2013, 25(2): 295-301.
- [56] Xi Y L, Huang X F. Temperature effect on the life history of three types of *Brachionus calyciflorus* females. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2004, 22(2): 192-197.
- [57] Fussmann G F, Kramer G, Labib M. Incomplete induction of mixis in *Brachionus calyciflorus*: patterns of reproduction at the individual level. *Hydrobiologia*, 2007, 593(1): 111-119.
- [58] Timmermeyer N, Stelzer CP. Chemical induction of mixis in the rotifer *Synchaeta tremula*. *Journal of Plankton Research*, 2006, 28(12): 1233-1239.
- [59] Ma Q, Xi Y L, Zhang J Y, Wen X L, Xiang X L. Differences in life table demography among eight geographic populations of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera) from China. *Limnologica*, 2010, 40(1): 16-22.
- [60] Gilbert J J. Population density, sexual reproduction and diapause in monogonont rotifers: new data for *Brachionus* and a review. *Journal of Limnology*, 2004, 63(S1): 32-36.