

壶状臂尾轮虫及其休眠卵的形态学研究

闫冬春^{1,3}, 董双林¹, 黄 健²

(1.中国海洋大学 水产学院 教育部水产养殖重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 烟台师范学院 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 从乳山对虾养殖场池塘底泥中分离出数量较多的一种轮虫休眠卵, 经孵化鉴定为壶状臂尾轮虫(*Brachionus urceus*), 对该轮虫休眠卵及孵出的轮虫进行了形态学观察。扫描电镜观察发现, 壶状臂尾轮虫休眠卵表面有明显的、不规则的褶皱突起, 与已有报道略有差异, 这可能是由生活水体盐度的不同引起的; 该休眠卵表面附着一些污染物。透射电镜观察显示, 壶状臂尾轮虫细胞内线粒体密集、分泌颗粒较多, 这是与其代谢旺盛、运动活跃等机能相适应的。

关键词: 壶状臂尾轮虫(*Brachionus urceus*); 休眠卵; 形态

中图分类号: S917.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2007) 03-0013-05

轮虫是浮游动物中的一个重要成员, 是经济水生动物的开口饵料。有关轮虫休眠卵的研究, 大多限于褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)和萼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus*)两种, 而且主要论述其休眠卵的形成、保存和萌发^[1-6], 涉及其它种类和有关形态学方面的研究相对来说较少^[7-9]。轮虫形态学特别是超微结构的研究就更少。轮虫是由缺少体腔的后生动物过渡到具体腔的后生动物之间的一类假体腔动物, 在无脊椎动物的系统发展中占有重要地位。因此, 加强轮虫形态学的研究具有重要的理论意义。

作者在乳山海水养殖场采集到一种数量较多的轮虫休眠卵, 孵化后的轮虫经鉴定为壶状臂尾轮虫(*Brachionus urceus*)。壶状臂尾轮虫广泛分布于池塘、水库、湖沼和河口咸水区, 是养殖上良好的饵料生物。作者对该轮虫及其休眠卵的形态进行了光镜及电镜观察。

1 材料与方法

1.1 底泥的采集及轮虫休眠卵的分离

底泥采于山东省乳山海水对虾养殖场的 3 个养殖池塘, 采集养殖池底表面 1 cm 的底泥。底泥卵的分离

按照 Marcus^[10]从底泥中分离桡足类休眠卵的方法, 稍做修改: 取 1 匙底泥, 放于 250 mL 烧杯中, 加入 200 mL 经脱脂棉和 300 目筛绢网过滤并煮沸消毒的海水; 搅匀后用超声波细胞粉碎机 400W 粉碎 30 s; 300 目浮游生物网过滤; 网上物用糖浓缩液($w(\text{糖}): w(\text{蒸馏水}) = 1:1$)冲洗、悬浮离心 5 min (3 000 r/min); 悬浮液用 300 目网过滤, 用海水充分冲洗, 并转移至一盛海水的平皿中; 显微镜下观察、照相。

1.2 休眠卵的孵化

在显微镜下, 用毛细吸管挑取壶状臂尾轮虫休眠卵至盛消毒海水的小烧杯中, 置光照培养箱中孵化

收稿日期: 2005-01-06; 修回日期: 2005-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371111); 国家 973 计划项目(G1999012011); 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题; 烟台师范学院博士基金(043301)

作者简介: 闫冬春(1971-), 女, 山东菏泽人, 博士, 副教授, 主要从事水产养殖生态学的研究, 电话: 0535-6672152, E-mail: yandch@tom.com; 通讯作者, 董双林, E-mail: dongsl@ouc.edu.cn

培养, 温度为 25 °C, 光暗周期 L : D 为 12 h:12h。

1.3 轮虫休眠卵及孵出轮虫的光镜观察

用吸管将休眠卵及孵出轮虫挑至载玻片上, 置显微镜下观察、照相。

1.4 轮虫休眠卵扫描电镜观察

将轮虫休眠卵用 3% 的戊二醛固定液(磷酸缓冲液配制)固定于 1.5 mL 离心管中, 置 4 °C 冰箱暂时保存。制样时, 将离心管中的固定液小心地吸去, 用磷酸缓冲液清洗两遍后再用蒸馏水清洗两遍, 在解剖镜下用微吸管吸至裁成小片的盖玻片上, 再将盖玻片粘到样品台上, 待玻片上水迹稍干时, 用 1% 锇酸熏蒸固定 1 h, 然后离子溅射喷金, 在 S-450 型扫描电镜下观察。

1.5 轮虫透射电镜观察

用 300 目浮游生物网收集轮虫, 置于 1.5 mL 离心管中。经 3% 戊二醛前固定和 1% 锇酸后固定, 常规乙醇逐级脱水, Epon-812 渗透、包埋, LKB 超薄切片机切片后常规染色, 在 H-7000 型透射电镜下观察并摄影。

2 结果与讨论

2.1 壶状臂尾轮虫及其休眠卵的光镜观察

作者从乳山对虾养殖池塘底泥中分离出的一种数量较多的轮虫休眠卵见图 1。该休眠卵棕黄色, 长径 90 ~ 110 μm , 短径 70 ~ 90 μm 。该卵在 2002 年 6 月份的底泥中几乎找不到, 而在 2002 年 10 月和 2003 年 1 月的底泥中数量较多。从该休眠卵孵出的轮虫见图 2, 身体前端具 3 对棘刺, 中间 1 对最大, 其余 2 对略小; 足不分节, 具环纹, 并能伸缩摆动, 在光镜下观察时游动迅速。经鉴定该轮虫为壶状臂尾轮虫 (*Brachionus urceus*)。

2.2 壶状臂尾轮虫休眠卵的扫描电镜观察

壶状臂尾轮虫休眠卵表面具有明显的、不规则的褶皱突起(图 3)。张东升等^[11]报道的壶状臂尾轮虫休眠卵表面花纹大部分为“V”字形, 本文与之略有差异。许多研究者对轮虫休眠卵的表面壳饰进行了研究, 但壳饰的生物学作用目前仍不十分清楚。Gilbert^[12]报道轮虫的形态及壳饰具种的特异性, 可作为系统分类的依据。但多数研究者认为同种轮虫休眠卵的外壳花纹存在很大差异, 不宜做为分类的依据。如林里等^[13]发现同是取自东湖的两枚萼花臂尾轮虫休眠卵的壳饰不同, 且与 Wurdak 等^[9]展示的 2 枚该种轮虫休眠

卵的壳饰亦不相同。李永函等^[7]研究发现完成休眠后的隔年休眠卵壳纹不如刚形成时那样清楚。另外, 水体渗透压的不同也会影响轮虫休眠卵的外壳结构^[11], 因此不同水体中的同种轮虫休眠卵壳饰也很可能存在较大差异。Wurdak^[9]、Gilbert^[12]、翟宝香等^[8]、林里等^[13]、张东升等^[11]介绍了近 20 种轮虫休眠卵的形态, 但基本上限于淡水水体, 本实验中的壶状臂尾轮虫休眠卵采于海水养殖池塘, 表面壳饰与同种淡水轮虫休眠卵有差异也在情理之中。



图 1 乳山池塘底泥中分离出的轮虫休眠卵

Fig.1 Rotifer resting eggs separated from Rushan sediment

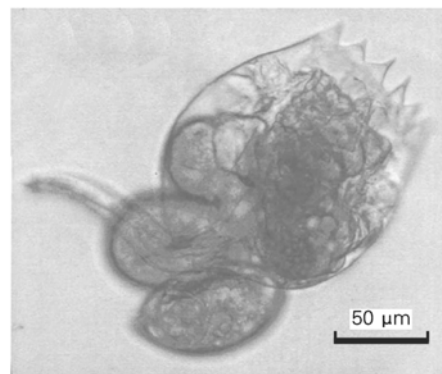


图 2 从休眠卵孵出的轮虫

Fig. 2 Rotifer hatched from the resting egg

壶状臂尾轮虫休眠卵表面附着一些污染物(图 3b)。席貽龙等^[5]、Balompapung 等^[14]报道轮虫休眠卵表面往往被细菌或其它粘液块状附着物所污染, 粘液块状附着物的成分目前仍不十分清楚。这些有害细

菌污染不但会降低休眠卵的萌发率,还会导致养殖经济水生动物的次级感染。轮虫休眠卵表面除携带细菌外,是否会有病毒的污染?如果有,那么这些病毒是否也会引起养殖经济水生动物的次级感染?这一问题应当引起人们足够的重视。

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是目前危害对虾养殖业最为严重的一种病毒。

Yan 等^[15]采用 PCR-核酸探针斑点杂交法从壶状臂尾轮虫休眠卵中测得 WSSV 阳性,推测轮虫休眠卵可能隔冬传播 WSSV。壶状臂尾轮虫以休眠卵的形式在池塘越冬,第二年春天孵化,成为对虾食物链中的一个重要环节。如果壶状臂尾轮虫休眠卵隔冬传播 WSSV 得到进一步证实,对 WSSV 的传播途径及养殖生产上现行的海水消毒方式必将产生深远的影响。

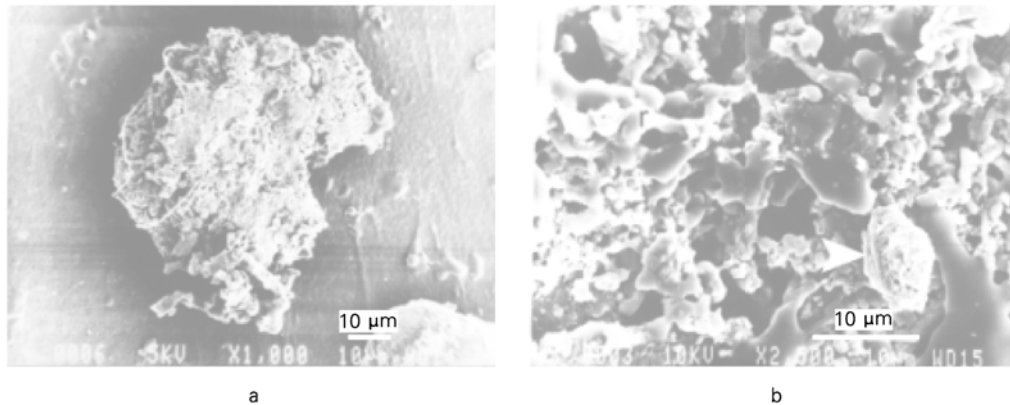


图3 壶状臂尾轮虫休眠卵扫描电镜观察

Fig. 3 Scanning electronic micrograph of *Brachionus urceus* resting egg

b 为 a 的局部放大, b 中箭头示休眠卵表面被污染的附着物, r 示休眠卵表面的峭突

b is the magnification of a. The arrow in b shows contaminant mucous lump and the r shows the ridges on the surface of resting egg

2.3 壶状臂尾轮虫的透射电镜观察

壶状臂尾轮虫的头冠周围密集纤毛,纤毛的横切面呈现出由微管束形成的典型的 9+2 结构(图 4a)。纤毛的基部有许多线粒体,为纤毛的摆动提供动力(图 4b)。壶状臂尾轮虫细胞内线粒体密集(图 4c)。线粒体是细胞内的“动力站”,它通过氧化磷酸化作用进行能量转换,为细胞进行各种生命活动提供能量。壶状臂尾轮虫代谢旺盛、繁殖力强(24 h 即可繁殖一代)、运动活跃,细胞内密集的线粒体是与这些机能相适应的。壶状臂尾轮虫的细胞内有散在的内质网(图 4d),在细胞内执行物质合成功能,它是轮虫旺盛代谢功能的物质基础。壶状臂尾轮虫体表的角质膜较薄,透明而光滑(图 4e)。而这层膜在有些种类(如龟甲轮虫属 *Keratella*)加厚并硬化成被甲,表面还具有刻纹、隆起或棘状突起。图 4f 示壶状臂尾轮虫的分泌细胞。该

分泌细胞单个地夹于其它上皮细胞之间,具有面向管腔的游离面,其最显著的形态特点是底部胞质中含大量分泌颗粒(箭头所示),这些分泌颗粒在银盐浸染时表现出嗜银性。消化腺内的分泌颗粒能分泌消化酶,这也是与轮虫旺盛的代谢机能相适应的。

3 结论

(1) 从乳山对虾养殖场池塘底泥中分离出数量较多的一种轮虫休眠卵,经孵化鉴定为壶状臂尾轮虫。

(2) 壶状臂尾轮虫休眠卵表面有明显的、不规则的褶皱突起,且表面附着一些污染物。

(3) 壶状臂尾轮虫细胞内线粒体密集、分泌颗粒较多。

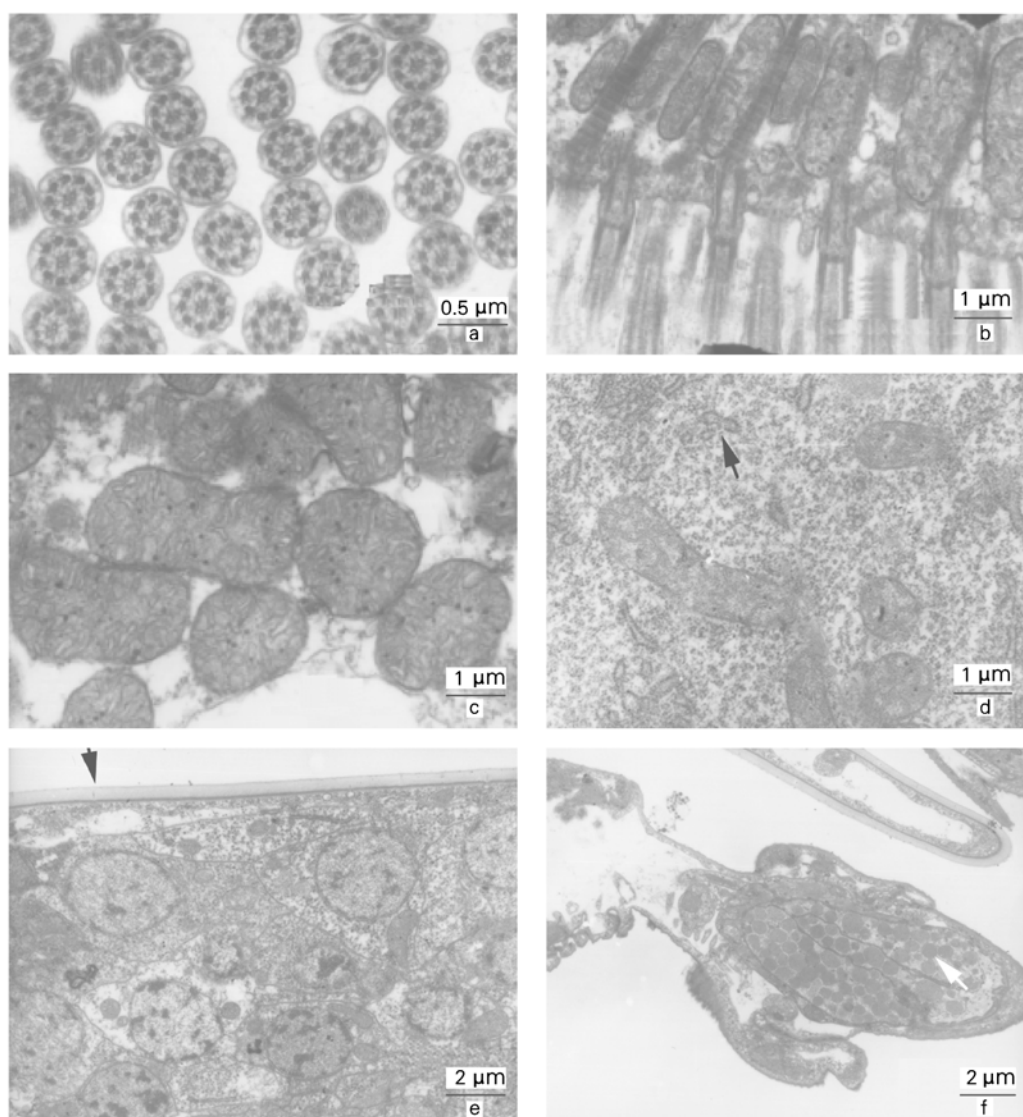


图 4 壶状臂尾轮虫的透射电镜观察

Fig. 4 Transmitting electronic micrograph of *Brachionus urceus*

a.纤毛横切，示其轴心的“9+2”微管结构；b.纤毛纵切，示纤毛基部的线粒体；c.细胞内密集的线粒体；d.细胞内的内质网，箭头示内质网；e.角质膜及下面紧密排列的上皮细胞，箭头示角质膜；f.消化腺内的分泌细胞，箭头示分泌颗粒

a. transverse section of cilia, “9+2” microtubules were shown; b. longitudinal sections of cilia and basifixed mitochondrions were shown; c. dense mitochondrions in the cell; d. endoplasmic reticulum in the cell, the arrow shows endoplasmic reticulum; e. keratode epiderm and compact arranged epidermic cell under it, the arrow shows keratode epiderm; f. secrete cells in the digestive gland, the arrow shows secrete granules

参考文献：

- [1] Hagiwara A, Hino A. Feeding history and hatching of resting eggs in the marine rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1990, 56: 1 965-1 971.
- [2] Hagiwara A, Hino H, Hirano R. Combined effects of

environmental conditions on the hatching of fertilized eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis* collected from an outdoor pond [J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1985, 51(5):755-758.

- [3] Hino A, Hirano R. Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis* - II.

- Effects of cumulative parthenogenetic generation [J]. **Bull Jap Soc Scient Fish.** 1977, 43: 1 147-1 155.
- [4] Lubrens E, Fishler R, Berdugo-White V. Inductionh of sexual reproduction and resting egg production in *Brachionus plicatilis* reared in sea water [J]. **Hydrobiologia**, 1980, 73: 55-58.
- [5] 席貽龙, 黄祥飞. 两种消毒剂处理对萼花臂尾轮虫休眠卵萌发的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 7(4): 122-124.
- [6] 刘青, 金送笛, 刚健, 等. 冷冻对轮虫休眠卵萌发率的影响[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 39-42.
- [7] 李永函, 张东升, 赵志壮, 等. 池塘习见轮虫休眠卵的形态和鉴定[J]. 大连水产学院学报, 1991, 6: 1-11.
- [8] 翟宝香, 李永函. 用电镜对两种轮虫休眠卵卵膜的初步观察[J]. 大连水产学院学报, 1987, 1: 19-21.
- [9] Wurdak E S, Gilbert J J, Jagels R. Fine structure of the resting eggs of the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna sieboldi* [J]. **Trans Am Microsc Soc.** 1978, 97: 49-72.
- [10] Marcus N H. Abundance in bottom sediments and hatching requirements of eggs of *Centropages hamatus* (Copepoda: Calanoida) from the Alligator Harbor region, Florida [J]. **Biol Bull**, 1989, 176: 142-146.
- [11] 张东升, 宋国良, 姜静颖. 轮虫休眠卵用不同浓度盐溶液处理后卵壳的扫描电镜观察[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(2): 106-111.
- [12] Gilbert J J. Species-specific morphology of resting eggs in the rotifer *Asplanchna* [J]. **Transactions of the American Microscopical Society**, 1978, 97(3): 330-339.
- [13] 林里, 周洁, 黄祥飞. 武汉东湖若干种轮虫休眠卵的形态观察[J]. 水生生物学报, 1997, 21(3): 234-240.
- [14] Balompapueng M D, Munuswamy N, Hagiwara A, *et al.* Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs *Brachionus plicatilis* Muller [J]. **Aquaculture Research**, 1997, 28: 559-565.
- [15] Yan D C, Dong S L, Huang J, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments [J]. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2004, 59(1): 69-73.

Morphology study of *Brachionus urceus* and its resting egg

YAN Dong-chun^{1,3}, DONG Shuang-lin¹, HUANG Jie²

(1. Aquaculture Research Laboratory, Department of Aquaculture, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Department of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

Received: Jan., 6, 2005

Key words: *Brachionus urceus*; resting egg; morphology

Abstract: One type of rotifer resting egg was separated from Rushan shrimp pond sediments in large quantities. Rotifers hatched from these resting eggs were identified as *Brachionus urceus*. The morphology of this rotifer resting egg and hatched rotifer were studied. Under scanning electron microscope observation, there was distinct, irregular pleat prominency on the surface of the *B. urceus* resting egg, which was a little different from that described in the past references. This probably is due to different salinities of water in which resting egg lives. In addition, some contaminations were also found on the surface of the *B. urceus* resting egg. Under transmission electron microscope observation, there were dense mitochondrions and secrete granules in *B. urceus* cells. These adapt to its active metabolism and movement.

(本文编辑:张培新)