

自由生活海洋线虫 *Chromadorina* sp. 的生活史研究

王 摆 汝少国 于子山 房 燕

(中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

LIFECYCLE OF FREE-LIVING MARINE NEMATODE *CHROMADORINA* SP.

WANG Bai, RU Shao-Guo, YU Zi-Shan and FANG Yan

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

关键词: *Chromadorina* sp.; 胚胎发育; 生殖行为; 生活史

Key words: *Chromadorina* sp.; Embryonic development; Reproduction; Lifecycle

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)05-0751-04

线虫种类繁多、分布广泛、数量极丰富,已鉴定的种类有 2 万多种,据估计其种类约在 4 万至 1 千万种之间^[1]。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)因易于培养、生活周期短、细胞结构简单等,被广泛地用作生物学和毒理学研究的模式生物^[2-3]。1990 年,Williams 等将 *C. elegans* 应用于水域、土壤环境的毒理学研究中^[4],Tominaga 等提出了以 *C. elegans* 为模式生物筛选苯酚类和合成激素毒性和激素活性大小的简便实验系统^[5-7]。但是,应用海洋线虫进行毒理学的研究报道还很少,海洋线虫个体小,世代时间短,易于实验室培养,是海洋生态毒理学研究的理想实验材料。因此,本文选择青岛栈桥附近分离出来的自由生活海洋线虫 *Chromadorina* sp. 为研究对象,研究了其生活史,为今后生态毒理学实验研究提供基本参数。

1 材料和方法

1.1 取样及培养 自由生活海洋线虫 *Chromadorina* sp., 2005 年 5 月 1 日取自青岛栈桥附近潮间带的底泥,用自制的玉米琼脂培养基^[8]培养线虫,待线虫钻入培养基后挑取小块培养基进行单种培养^[9],连续培养 2 个月后用于实验。

1.2 胚胎发育实验 在灭菌的载玻片上,滴一滴培养基,制成大小厚度适宜的微培养基,便于显微观察。取怀卵成虫数条,用无菌海水洗两次,再用无菌蒸馏水麻醉剖腹取卵^[10]。将获得的虫卵接到微培养基上,在 $(23 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 下,连续观察并记录胚胎发育直至卵孵化。

1.3 胚后发育实验 取刚孵化出的幼虫,接到微培养基上,在 $(23 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 下培养,每隔 12h 观察并显微照相一次,直至成虫,并开始产卵。

2 结果与分析

2.1 胚胎发育

卵的形态 共观察了 10 个卵,均为椭圆形(图 1-a),最外层为几丁质卵壳,无蛋白外衣,中间是卵黄膜包被的原生质,其中黄色的颗粒是卵黄体,卵的长轴 $(33.9 \pm 2.2)\mu\text{m}$,短轴 $(28.6 \pm 1.0)\mu\text{m}$ 。

胚胎发育特征 在 $(23 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,盐度为 26.7 条件下,10 个卵均发育正常,整个胚胎从 1 细胞期(图 1-a)开始,约经 80min 进行第一次卵裂形成大小平均的 2 细胞期(图 1-b);约 120min 进行第二次卵裂分成大体均等的 4 细胞期(图 1-c),4 细胞期开始 4 个卵裂球在同一平面上,呈菱形,随后卵裂球移动,最终呈四面体形,其中一个为生殖系细胞 P₄;约 190min 胚胎开始不均等分裂进入多细胞期(图 1-d);约 380min 胚胎进入囊胚期(图 1-e);约 800min 后囊胚表面细胞内陷形成凹痕,胚胎进入原肠胚期(图 1-f);到原肠胚后期约 1140min,因细胞的不断分裂,胚胎伸长在卵壳内弯曲成蝌蚪状,成为蝌蚪形胚期(图 1-g);大约 1410min 后胚胎进入蠕虫形胚期(图 1-h),此时由于肌肉细胞的形成并开始收缩,蠕虫形胚在卵壳内来回扭动,直到孵化。

收稿日期: 2005-12-07; 修订日期: 2006-06-30

基金项目: 国家自然科学基金(30671618); 教育部留学回国人员科研启动基金; 山东省优秀中青年科学家奖励基金联合资助

作者简介: 王摆(1981—),男,安徽明光人;博士研究生;主要从事海洋生态学研究。E-mail: william_tumur@hotmail.com

通讯作者: 汝少国(1967—),教授,博士生导师;主要从事海洋生态学研究。E-mail: rusg@ouc.edu.cn

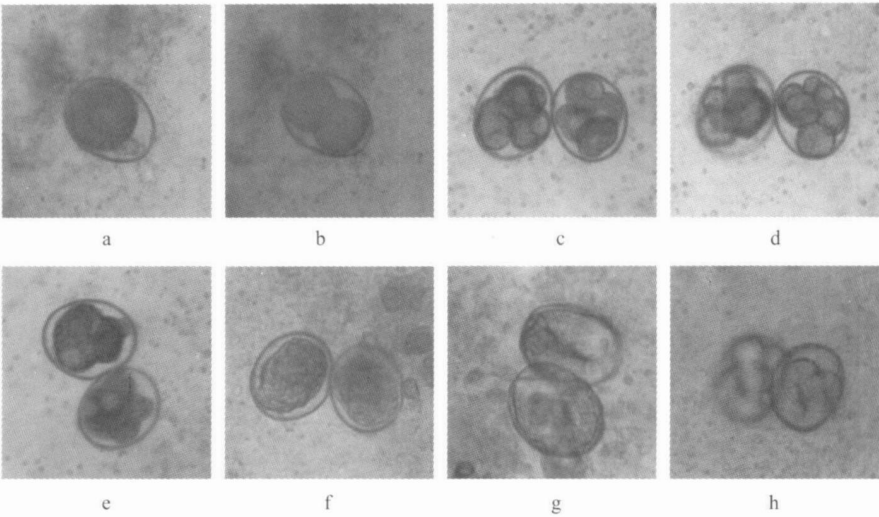


图1 *Chromadorina* sp. 胚胎发育各期照片 (×330)

Fig 1 The embryonic development stages of *Chromadorina* sp. (×330)

a. 1 细胞期 (A single cell stage); b. 2 细胞期 (Two cells stage); c. 4 细胞期 (Four cells stage); d. 多细胞期 (Multicellular stage); e. 囊胚期 (Blastula stage); f. 原肠胚期 (Gastrula stage); g. 蝌蚪形胚期 (Tadpole-shaped stage); h. 蠕虫形胚期 (Worm-shaped stage)

整个胚胎发育的时间范围为 46.3—57.1h, 平均为 (49.69±2.90)h。胚胎发育各期持续时间见图 2, 由图 2 可见, 胚胎各期发育时间如下: 1 细胞期 (80.40±1.34) min; 2 细胞期 (40.70±0.70) min; 4 细胞期 (68.10±1.14) min; 多细胞期 (192.80±3.21) min; 囊胚期 (425.90±7.10) min; 原肠胚期 (333.00±5.55) min; 蝌蚪形胚期 (269.00±4.48) min; 蠕虫形胚期 (1570.60±26.18) min。

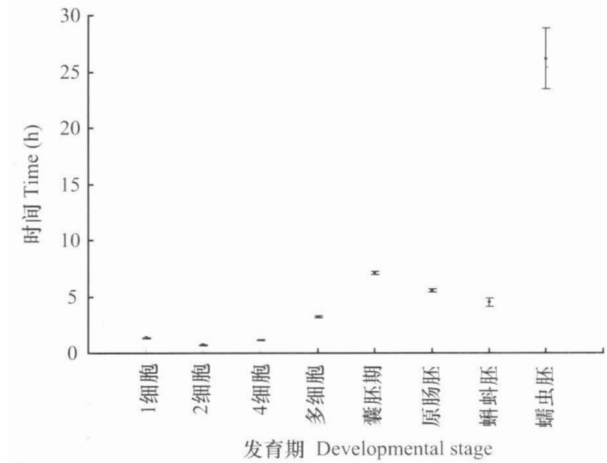


图2 *Chromadorina* sp. 胚胎发育各期平均持续时间

Fig 2 Mean duration of embryonic development stages of *Chromadorina* sp.

2.2 胚后发育

幼虫 *Chromadorina* sp. 在 (23±0.5) °C, 盐度为 26.7 条件下, 从孵化到产卵需要的最短时间为 12d, 生长曲线有 4 个生长峰和 4 个低谷 (图 3), 4 次蜕皮依次发生在第 3 天、第 5

天、第 7 天和第 9 天。刚孵化的线虫 L₁ 幼虫长约 165μm, 平均体长为 227μm; L₂、L₃、L₄ 幼虫的平均体长分别为 335μm、437μm、528μm。根据 Byerly *et al.* [11] 报道 *C. elegans* 在每个幼虫期蜕皮后体长比原来增加 1/3, 而该种线虫只有 L₂ 幼虫与 L₃ 幼虫的体长符合这一规律。

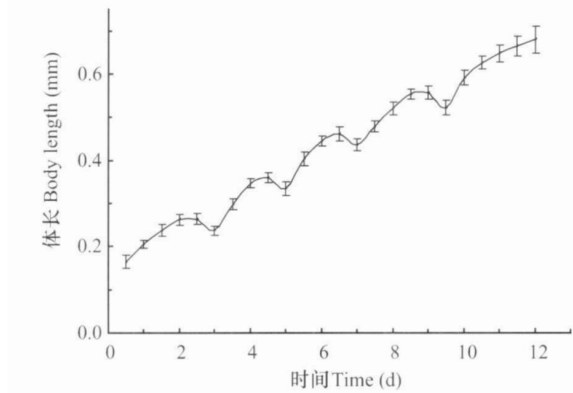


图3 (23±0.5) °C, 26.7S 条件下 *Chromadorina* sp. 的生长曲线

Fig 3 Growth curve of marine nematode *Chromadorina* sp. at (23±0.5) °C, 26.7S

成虫和生殖方式 图 4a 是一条雌性成虫, 可观察到虫卵和生殖孔; 图 4b 是一条雄性成虫, 交接刺明显。成虫体长为 (638.9±64.8) μm, 雌雄体长没有明显差异。图 5 为两条交配中的线虫, 缠绕在另一条线虫上的为雄性。雌虫第一次产卵, 多为两个并附着在一起, 大约 1—2d 后, 开始第二次产卵, 多为单个卵。

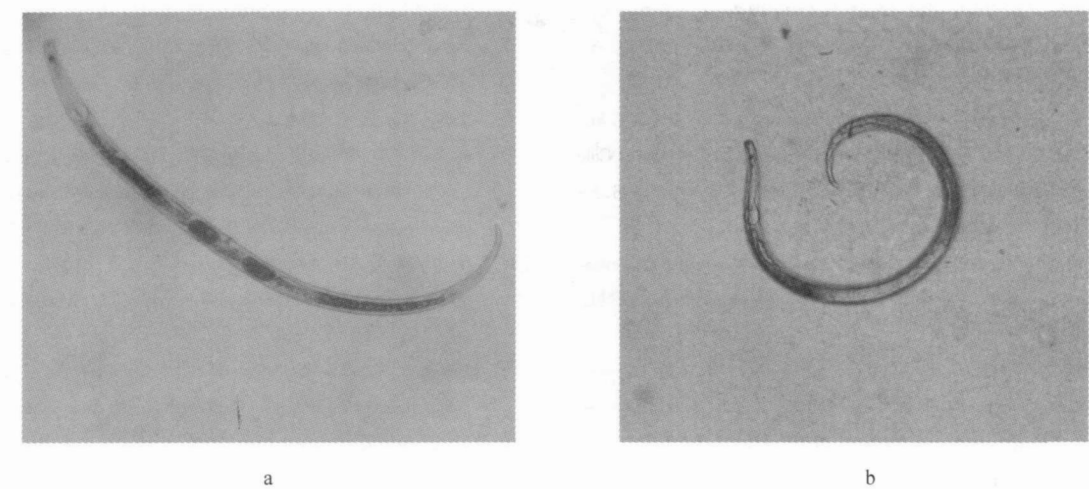


图 4 *Chromadorina* sp. 的雌性(a)和雄性成虫(b) (× 130)
Fig. 4 Adult of *Chromadorina* sp. male (a) and female(b) (× 130)

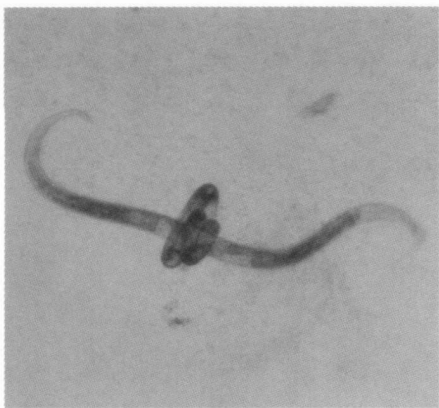


图 5 交配中的 *Chromadorina* sp. (缠绕成圈的是雄性个体,另一条为雌性个体) (× 130)
Fig 5 The copulating *Chromadorina* sp. (the cuerly one is male, another one is female) (× 130)

3 讨 论

有关自由生活海洋线虫生活史的研究,国外报道较多,而国内报道很少,王诗红等首次报道了 *Diplolaimdla* sp. 在实验室内培养成功,但是经过连续培养的三代中没有发现雄性个体,生殖方式为孤雌生殖^[8]。本文的研究结果表明,在实验室内能够成功地人工培养、传代 *Chromadorina* sp.,并发现了交配中的 *Chromadorina* sp.,推测其生殖方式为两性生殖。*Chromadorina* sp. 个体较小,成虫体长不超过 0.7mm;易于实验室内培养,生活史相对较短,在(23±0.5)℃,盐度为 26.7 条件下,最短世代时间为 14d。根据国外研究文献的报道,温度和盐度等生态因子能够影响海洋线虫的世代时间,1973 年 Hopper 等^[9]报道了在适宜温度范围内,随着温度的升高红树林中 6 种海洋线虫世代时间缩短。Moens 等报道了温度、盐度以及食物丰度对两种半咸水线虫 *Displolaimeloides meyli* 和 *Pellioiditis marina* 生活史和生理的影响^[12,13],在 3 个因子中,

盐度对两种线虫发育时间、生殖力、性比、呼吸速率和同化速率的影响最小,而温度的影响最大,食物丰度影响两种线虫的呼吸速率和同化速率。本文研究表明,在(23±0.5)℃,盐度为 26.7 条件下,玉米琼脂培养基为 *Chromadorina* sp. 提供了良好的生活环境,在直径 12cm 的玉米琼脂培养基平板中 *Chromadorina* sp. 的数量可以达到几百条以上。

Chromadorina sp. 的卵呈椭圆形,在体视镜下为白色颗粒,第一、二卵裂为均等分裂,在(23±0.5)℃,盐度为 26.7 条件下胚胎发育特征为:从 1 细胞期到多细胞期发育较快,到囊胚期后发育速度开始减慢;发育过程中,随着卵裂次数的增加,虽然细胞数量增加了,但体积却变小;原肠胚后期,随着胚胎表面的凹陷,胚胎开始增长,虫体外形逐渐明显;蝌蚪形胚后期,肌肉细胞开始收缩,虫体在卵壳内来回蠕动,虫体逐渐增长,并以头部破壳方式出壳;在(23±0.5)℃,盐度为 26.7 条件下,约需 50h 进入孵化阶段。*Chromadorina* sp. 的胚后发育和王诗红等^[8]报道的 *Diplolaimella* sp. 的发育特征基本相似,都经过 4 次蜕皮,才能发育成熟。

在实验培养条件下, *Chromadorina* sp. 雌虫每次怀两个成熟卵,均为椭圆形。Tominaga 等报道未受精的 *C. elegans* 卵因细胞极性而呈圆形,受精的卵呈椭圆形^[6]。根据 Tominaga 的判断标准,作者认为 *Chromadorina* sp. 的卵是受精的,另外,实验中观察到了 *Chromadorina* sp. 的生殖方式为两性生殖的直接证据,即交配中的 *Chromadorina* sp. 雌雄个体。*C. elegans* 多为雌雄同体,主要行孤雌生殖^[11]; *Diplolaimella* sp. 的生殖方式是孤雌生殖^[8];两种半咸水线虫 *Displolaimeloides meyli* 和 *Pellioiditis marina* 的生殖方式主要为两性生殖^[12]。但关于线虫两性生殖的直接证据-观察到交配中的线虫,在国内外尚未见报道。

参考文献:

[1] Blaxter M. *Caenorhabditis elegans* is a nematode [J]. *Science*, 1998, **282**: 2041—2046

- [2] Sulston J, Hodgkin L. The nematode *Caenorhabditis elegans* [A]. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor [M]. NY, U.S.A. 1998, 587—602
- [3] Wood W B. Introduction to *Caenorhabditis elegans* biology [A]. In: Wood W B (Eds.), The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor [M]. NY, U.S.A. 1998, 603—604
- [4] Williams P L, Dusebery D B. Aquatic toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, **9**: 1285—1290
- [5] Tominaga N, Kunimoto M, Kai T, *et al.* A convenient assay for evaluating chemical toxicity using *Caenorhabditis elegans* as a model organism [J]. *Environmental Sciences*, 2003, **10**(6): 215—221
- [6] Tominaga N, Kohra S, Iguchi T, *et al.* A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Health Science*, 2003, **49**(6): 459—463
- [7] Tominaga N, Ura K, Kavakami M, K, *et al.* *Caenorhabditis elegans* responses to specific steroid hormones [J]. *Journal of Health Science*, 2003, **49**(1): 28—33
- [8] Wang S H, Zhang Z N. Experimental culture and life cycle of marine nematodes from prawn cultivation pond [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1994, **12**: 206—213 [王诗红, 张志南. 养虾池海洋线虫的实验室培养及生活史研究. 青岛海洋大学学报, 1994, **12**: 206—213]
- [9] Hopper B E, Fell J W, Cefalu R C. Effect of temperature on life cycles of nematodes associated with the mangrove (*Rhizophora mangle*) detrital system [J]. *Marine Biology*, 1973, **23**: 293—296
- [10] Houthoofd W, Jacobsen K, Mertens C, *et al.* Embryonic cell lineage of the marine nematode *Pelioditis marina* [J]. *Developmental Biology*, 2003, **258**: 57—69
- [11] Byerly L, Cassada R C, Russell R L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction [J]. *Developmental Biology*, 1976, **51**: 23—33
- [12] Moens T, Vincx M. Temperature and salinity constraints on the life cycle of two brackish-water nematode species [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, **243**: 115—135
- [13] Moens T, Vincx M. Temperature salinity and food thresholds in two bacterivorous nematode species: assessing niches from food absorption and respiriments [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, **243**: 137—154