



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103053476 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201210515194. X

(22) 申请日 2012. 12. 05

(71) 申请人 大连海洋大学

地址 116000 辽宁省大连市西岗区黄河路
219 号

(72) 发明人 殷旭旺 赵乃锡 谭冰冰 朱美桦
周艳春

(74) 专利代理机构 大连非凡专利事务所 21220
代理人 闪红霞

(51) Int. Cl.

A01K 67/033(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

专性孤雌繁殖的轮虫种群培育方法

(57) 摘要

本发明公开一种采用化学药物诱导、微波辐射诱变、紫外照射突变及人工选育专性孤雌繁殖的轮虫种群培育方法,所培育的轮虫种群在繁殖和传代过程中,即使在密度为 800~1000 只/毫升的培养液中,仍旧进行孤雌繁殖而不发生有性繁殖行为,可显著提高轮虫培养密度、提高轮虫生产效率、缩小养殖水体积、降低生产成本,可应用于室内进行轮虫高密度培养,同时也适合在室外进行轮虫敞池培育增殖,可为水产经济养殖动物的苗种和幼体培育,提供充足的活体饵料生物。

1. 一种专性孤雌繁殖的轮虫种群培育方法,其特征在于按如下步骤进行:
 - a. 取轮虫的休眠卵放置于 500 毫升的培养液中,置于温度 24 度,光照 3000lx,光周期 16 :8 的环境条件下孵化 3~5 天;
 - b. 将孵化出来的轮虫进行单个体扩大培养,投喂微绿球藻,投喂密度为 100 万细胞~200 万细胞 / 毫升培养液,温度 24 度,光照 3000lx,光周期 16 :8 ;
 - c. 挑取 100 只新孵化出的个体分别进行扩大培养,形成 100 个克隆种群,每个克隆种群培养液体积为 2000 毫升,每天更新一次培养液及饵料;
 - d. 当克隆种群的轮虫密度达到 1 只 / 毫升时,向各克隆种群培养液中加入 α -生育酚,加入量为 20 微克 / 毫升培养液,继续进行扩大培养,同时每天更新一次培养液及饵料,并维持培养液中 α -生育酚的浓度;当克隆种群的轮虫密度达到 3~10 只 / 毫升,将每个克隆种群的轮虫密度浓缩至 100 只 / 毫升,同时调整 α -生育酚的浓度为 100 微克 / 毫升培养液,培养 10~15 天;
 - e. 从 100 个克隆种群中,筛选出 25~35 个有性生殖比率小于 1% 的克隆种群,用脉冲频率 2450M 的微波辐射 10 秒;12 小时后再用强度为 $1480 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外线照射 60 秒;12 小时后,将克隆种群的轮虫群密度调整到 1 只 / 毫升,培养 7 天,此期间不添加 α -生育酚;
 - f. 重复 d 步骤的方法培育;
 - g. 从 25~35 个轮虫的克隆种群中,继续筛选出 10~15 个有性生殖比率小于 0.1% 的克隆种群,用脉冲频率 2450M 的微波辐射 10 秒;12 小时后再用强度为 $1480 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外线照射 60 秒;12 小时后,将克隆种群的轮虫群密度调整到 1 只 / 毫升,培养 7 天,此期间不添加 α -生育酚;
 - h. 重复 d 步骤的方法培育;
 - i. 从 10~15 个轮虫的克隆种群中,筛选出种群密度达到 800~1000 只 / 毫升仍进行孤雌繁殖的轮虫克隆种群。

专性孤雌繁殖的轮虫种群培育方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种轮虫种群的培育方法,尤其是一种可显著提高轮虫培养密度、提高轮虫生产效率、缩小养殖水体积、降低生产成本的专性孤雌繁殖的轮虫种群培育方法。

背景技术

[0002] 不论是海水鱼还是淡水鱼,在育苗及幼体培育期间,其开口活饵料主要选用轮虫。按照每尾育苗每天摄食 20~50 只轮虫来计算,1 个生产 5000 万尾鱼苗的中小型育苗企业,每天对轮虫的需求量就需要达到 15~25 亿只,按照 1:1 的比例采收轮虫来计算,育苗单位每天需要生产 25~50 亿只轮虫。轮虫包括海水的褶皱臂尾轮虫和淡水的蓴花臂尾轮虫,是一种周期性孤雌繁殖动物,生活史由孤雌繁殖和有性繁殖两部分构成。通常情况下,轮虫通过高效的孤雌繁殖过程增加种群数量,但是在特定环境(如水体中轮虫密度超过 10~20 只/毫升等不利环境)条件下,则启动有性繁殖,产生休眠卵来抵御不良环境条件。有性繁殖的产生大大限制了种群繁殖的效率,甚至有崩溃的危险,从而限制了轮虫的产量,所带来的是活饵料供应不足的问题。而为了避免轮虫有性繁殖,就必需将轮虫培育水体的培养密度限制为 20 只/毫升以下,随之就需要增加培养轮虫的水体,占用了大量养殖空间,使得育苗成本加大。

发明内容

[0003] 本发明是为了解决现有技术存在的上述技术问题,提供一种可显著提高轮虫培养密度、提高轮虫生产效率、缩小养殖水体积、降低生产成本的专性孤雌繁殖的轮虫种群培育方法。

[0004] 本发明的技术解决方案是:一种专性孤雌繁殖的轮虫种群培育方法,其特征在于按如下步骤进行:

a. 取轮虫的休眠卵放置于 500 毫升的培养液中,置于温度 24 度,光照 3000lx,光周期 16:8 的环境条件下孵化 3~5 天;

b. 将孵化出来的轮虫进行单个体扩大培养,投喂微绿球藻密度为 100 万细胞~200 万细胞/毫升培养液,温度 24 度,光照 3000lx,光周期 16:8;

c. 挑取 100 只新孵化出的个体分别进行扩大培养,形成 100 个克隆种群,每个克隆种群培养液体积为 2000 毫升,每天更新一次培养液和饵料;

d. 当克隆种群的轮虫密度达到 1 只/毫升时,向各克隆种群培养液中加入 α -生育酚,加入量为 20 微克/毫升培养液,继续进行扩大培养,同时每天更新一次培养液和饵料,并维持培养液中 α -生育酚的浓度;当克隆种群的轮虫密度达到 3~10 只/毫升,将每个克隆种群的轮虫密度浓缩至 100 只/毫升,同时调整 α -生育酚的浓度为 100 微克/毫升培养液,培养 10~15 天;

e. 从 100 个克隆种群中,筛选出 25~35 个有性生殖比率小于 1% 的克隆种群,用脉冲频率 2450M 的微波辐射 10 秒;12 小时后再用强度为 $1480 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外线,照射 60 秒;12

小时后,将克隆种群的轮虫群密度调整到 1 只 / 毫升,培养 7 天,此期间不添加 α -生育酚;

f. 重复 d 步骤的方法培育;

g. 从 25~35 个轮虫的克隆种群中,继续筛选出 10~15 个有性生殖比率小于 0.1% 的克隆种群,用脉冲频率 2450M 的微波辐射 10 秒;12 小时后再用强度为 $1480 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外线,照射 60 秒;12 小时后,将克隆种群的轮虫群密度调整到 1 只 / 毫升,培养 7 天,此期间不添加 α -生育酚;

h. 重复 d 步骤的方法培育;

i. 从 10~15 个轮虫的克隆种群中,可筛选出种群密度达到 800~1000 只 / 毫升仍进行孤雌繁殖的轮虫克隆种群。

[0005] 本发明所培育的轮虫种群在繁殖和传代过程中,即使在密度为 800~1000 只 / 毫升的培养液中,仍旧进行孤雌繁殖而不发生有性繁殖行为,可显著提高轮虫培养密度、提高轮虫生产效率、缩小养殖水体积、降低生产成本,可应用于室内进行轮虫高密度培养,同时也适合在室外进行轮虫敞池培育增殖,可为水产经济养殖动物的苗种和幼体培育,提供充足的活体饵料生物。

具体实施方式

[0006] 实施例 1:

a. 取 1~2 公斤淡水养鱼池塘底泥,加入 1000 毫升高渗溶液(饱和食盐水和饱和蔗糖水混合液),搅拌均匀后静置 10~15 分钟,用塑料板轻轻蘸取表面上浮的萼花臂尾轮虫休眠卵若干,放置于 500 毫升经 0.45 微米滤膜过滤的 0.1pp 湖水(培养液)中,置于温度 24 度,光照 3000lx,光周期 16:8 的环境条件下孵化 3~5 天;

b. 将孵化出来的轮虫进行单个体扩大培养,投喂微绿球藻密度为 100 万细胞 / 毫升培养液,温度 24 度,光照 3000lx,光周期 16:8;

c. 挑取 100 只新孵化出的个体分别进行扩大培养,形成 100 个克隆种群,每个克隆种群培养液体积为 2000 毫升,每天更新一次培养液和饵料;

d. 当克隆种群的轮虫密度达到 1 只 / 毫升时,向各克隆种群培养液中加入 α -生育酚,加入量为 20 微克 / 毫升培养液,继续进行扩大培养,同时每天更新一次培养液和饵料,并维持培养液中 α -生育酚的浓度;当克隆种群的轮虫密度达到 3~5 只 / 毫升,用孔径为 120 微米的筛绢网,将每个克隆种群的轮虫密度浓缩至 100 只 / 毫升,同时调整 α -生育酚的浓度为 100 微克 / 毫升培养液,培养 10~15 天,即诱导轮虫进行大规模有性繁殖;

e. 从 100 个克隆种群中,筛选出 25~35 个有性生殖比率小于 1% 的克隆种群,用脉冲频率 2450M 的微波辐射 10 秒;12 小时后再用强度为 $1480 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外线,照射 60 秒;12 小时后,加培养液将克隆种群的轮虫群密度调整到 1 只 / 毫升,培养 7 天,此期间不添加 α -生育酚;

f. 重复 d 步骤的方法培育;

g. 从 25~35 个轮虫的克隆种群中,继续筛选出 10~15 个有性生殖比率小于 0.1% 的克隆种群,用脉冲频率 2450M 的微波辐射 10 秒;12 小时后再用强度为 $1480 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外线,照射 60 秒;12 小时后,加培养液将克隆种群的轮虫群密度调整到 1 只 / 毫升,培养 7 天,此期间不添加 α -生育酚;

h. 重复 d 步骤的方法培育；

i. 从 10~15 个轮虫的克隆种群中，筛选出了 3 个种群密度达到 800~1000 只 / 毫升仍旧进行孤雌繁殖的轮虫克隆种群。

[0007] 所述 c~h 步骤中的培养液均为经 0.45 微米滤膜过滤的 0.1pp 湖水；所述培养条件均为温度 24 度，光照 3000lx，光周期 16 :8；所述饵料为微绿球藻，投喂密度为 100 万细胞 / 毫升。

[0008] 本发明实施例 1 所筛选出的专性孤雌萼花臂尾轮虫克隆种群，在步骤 b 的条件下稳定培养、接种传代即可，可连续专性孤雌培养传代 1.0~1.5 年。

实施例 2：

a. 取 1~2 公斤海水河蟹育苗池塘底泥，加入 1000 毫升高渗溶液（饱和食盐水和饱和蔗糖水混合液），搅拌均匀后静置 10~15 分钟，用塑料板轻轻蘸取表面上浮的褶皱臂尾轮虫休眠卵若干，放置于 500 毫升经 0.45 微米滤膜过滤的 15ppt 的海水（培养液）中，置于温度 24 度，光照 3000lx，光周期 16 :8 的环境条件下孵化 3~5 天；

b. 将孵化出来的轮虫进行单个体扩大培养，投喂微绿球藻密度为 200 万细胞 / 毫升培养液，温度 24 度，光照 3000lx，光周期 16 :8；

c. 挑取 100 只新孵化出的个体分别进行扩大培养，形成 100 个克隆种群，每个克隆种群培养液体积为 2000 毫升，每天更新一次培养液和饵料；

d. 当克隆种群的轮虫密度达到 1 只 / 毫升时，向各克隆种群培养液中加入 α -生育酚，加入量为 20 微克 / 毫升培养液，继续进行扩大培养，同时每天更新一次培养液和饵料，并维持培养液中 α -生育酚的浓度；当克隆种群的轮虫密度达到 5~10 只 / 毫升，用孔径为 120 微米的筛绢网，将每个克隆种群的轮虫密度浓缩至 100 只 / 毫升，同时调整 α -生育酚的浓度为 100 微克 / 毫升培养液，培养 10~15 天，即诱导轮虫进行大规模有性繁殖；

e. 从 100 个克隆种群中，筛选出 25~35 个有性生殖比率小于 1% 的克隆种群，用脉冲频率 2450M 的微波辐射 10 秒；12 小时后再用强度为 $1480 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外线，照射 60 秒；12 小时后，加培养液将克隆种群的轮虫群密度调整到 1 只 / 毫升，培养 7 天，此期间不添加 α -生育酚；

f. 重复 d 步骤的方法培育；

g. 从 25~35 个轮虫的克隆种群中，继续筛选出 10~15 个有性生殖比率小于 0.1% 的克隆种群，用脉冲频率 2450M 的微波辐射 10 秒；12 小时后再用强度为 $1480 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的紫外线，照射 60 秒；12 小时后，加培养液将克隆种群的轮虫群密度调整到 1 只 / 毫升，培养 7 天，此期间不添加 α -生育酚；

h. 重复 d 步骤的方法培育；

i. 从 10~15 个轮虫的克隆种群中，筛选出了 5 个种群密度达到 800~1000 只 / 毫升仍旧进行孤雌繁殖的轮虫克隆种群。

[0009] 所述 c~h 步骤中的培养液均为经 0.45 微米滤膜过滤的 15ppt 的海水；所述培养条件均为温度 24 度，光照 3000lx，光周期 16 :8；所述饵料为微绿球藻，投喂密度为 200 万细胞 / 毫升。

[0010] 本发明实施例 1 所筛选出的专性孤雌褶皱臂尾轮虫克隆种群，在步骤 b 的条件下稳定培养、接种传代即可，可连续专性孤雌培养传代 4 年。