

菲牛蛭交配及卵茧人工孵化初步研究

张彬^① 于翔^② 汪波^{③*} 龚元^④ 吕军仪^⑤

① 广西水产研究所 南宁 530021; ② 辽宁省淡水水产科学研究院 辽阳 111000;

③ 北京师范大学珠海分校 珠海 519085; ④ 荆州市民康生物科技有限公司 荆州 434300;

⑤ 中山大学生命科学学院 广州 510275

摘要: 人工饲养条件下, 比较观察了不同养殖模式(水体、土壤)和不同温度(24℃、26℃、28℃、30℃、32℃和34℃)对菲牛蛭(*Hirudinaria manillensis*)交配率的影响, 并进行了不同卵茧质量(<0.6 g、0.6~1.0 g、1.0~1.5 g、1.5~2.0 g、>2.0 g)及不同温度(22℃、24℃、26℃、28℃、30℃和32℃)对亲蛭卵茧孵化数、孵化率和孵化时间影响的实验。结果表明, 菲牛蛭在相同温度下土壤环境中的交配率要明显高于水体环境, 其中土壤环境中28℃和30℃下亲蛭具有最高的交配率; 卵茧质量组中, 1.0~1.5 g和1.5~2.0 g组的孵化数及孵化率最高; 温度对卵茧孵化影响显著, 在26℃和28℃时出现最高的孵化数和孵化率。随着温度升高, 卵茧孵化时间呈逐渐下降趋势, 22℃下孵化时间最长, 达58 d, 而30℃和32℃高温下孵化时间明显缩短, 均不超过20 d。

关键词: 菲牛蛭; 温度; 交配率; 孵化率; 孵化时间

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2011)04-78-06

Mating Behavior and Artificial Incubation of Cocoon for *Hirudinaria manillensis*

ZHANG Bin^① YU Xiang^② WANG Bo^{③*} GONG Yuan^④ LÜ Jun-Yi^⑤

① Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021; ② Freshwater Fisheries Research Institute of Liaoning Province, Liaoyang 111000; ③ Beijing Normal University, Zhuhai Campus, Zhuhai 519085;

④ Jingzhou Minkang Biotechnology Co., Ltd, Jingzhou 434300;

⑤ School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: The mating behavior and mating rate of *Hirudinaria manillensis* were observed under temperature of 24℃, 26℃, 28℃, 30℃, 32℃ and 34℃, both in soil and in water. The hatching number, hatching rate and incubation period were compared among groups with different cocoon weight of <0.6 g, 0.6–1.0 g, 1.0–1.5 g, 1.5–2.0 g and >2.0 g, and under temperatures of 22℃, 24℃, 26℃, 28℃, 30℃ and 32℃, respectively. The results showed that the average mating rate of leeches in soil was significantly higher than that in water, and the highest mating rate occurred in the cases of 28℃ and 30℃ in soil. The cocoon with weights of 1.0–1.5 g and 1.5–2.0 g had the highest hatching number and hatching rate under artificial condition. In addition, temperature influenced hatching significantly, and among 6 temperature groups, the treatments of 26℃ and 28℃ yielded the highest hatching number and hatching rate. With increased temperature, the

基金项目 广州市海珠区科技计划项目(No. 2006AA10A402), 辽宁省海洋与渔业厅科技项目(No. 200903);

* 通讯作者, E-mail: wangbozai@163.com;

第一作者介绍 张彬, 男, 博士; 研究方向: 海水养殖病害及水蛭繁育; E-mail: zb-415@tom.com。

收稿日期: 2010-11-11, **修回日期:** 2011-04-29

incubating period of cocoon decreased gradually. The 22°C group had the longest incubation period of 58 d, while less than 20 d in groups of 30°C and 32°C.

Key words: *Hirudinaria manillensis*; Temperature; Mating rate; Hatching rate; Incubation period

菲牛蛭 (*Hirudinaria manillensis*) 是环节动物门蛭纲真蛭亚纲牛蛭属的一个种, 主要分布亚洲东南部, 在我国分布颇广, 福建、台湾、广东、广西和海南等省区的水田、水沟或池塘均可发现^[1]。该种的鉴定特征为, 背中有一条不显著的兰灰色纵纹, 两生殖孔被 5 环隔开, 雄生殖孔在节 XI 的 b_5/b_6 , 雌生殖孔在节 XII 的 b_5/b_6 上^[1]。由于其唾液腺分泌物含有菲牛蛭素、纤溶酶、透明质酸酶和血管扩张剂等多种活性物质^[2-3], 具有抗凝、抗血栓、纤溶、降血脂和抗炎等功能, 主治女子月闭、跌打损伤、产后血晕及与血栓形成有关的心脑血管疾病^[4]。目前国内外对其研究的文献报告主要集中在菲牛蛭活性成分的提取、氨基酸成分分析以及临床应用等方面^[5-8]。

随着对其药用价值的开发, 水蛭的人工养殖作为一个新兴的产业受到世界各国的重视, 中国、俄罗斯、英国、法国和土耳其等少数国家已经有相当规模的水蛭养殖业, 并取得了较好的经济和社会效益^[9]。水蛭是雌雄同体动物, 行异体受精并通过对前端滑出头部的卵茧繁殖后代。一旦受精完成, 卵就通过雌孔迅速地产到由身体前部少数生殖体节腺体或称环带腺分泌的茧内。通常从交配到产茧要经过几天或数月, 因种而异^[10-12]。不同种类的茧在形状、大小、结构以及附着地位等方面均不相同^[13-14]。因此, 研究菲牛蛭交配和受精卵孵化及生长发育所需的最适环境因子, 对其人工育苗及养殖产业的发展具有重要的意义。本实验比较观察不同养殖模式和温度下菲牛蛭的交配行为及交配率, 并探讨不同卵茧重量和温度下亲蛭卵茧的孵化性能, 为其大规模人工养殖中提高繁殖效率和苗种培育提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 实验用健康菲牛蛭亲本(2 ~

3 a) 由广州市安圣药源生物开发有限公司提供, 原种为华南热带山区野生种。

1.2 养殖管理 实验在广州安圣药源生物开发有限公司水蛭养殖场进行。亲蛭暂养于育苗池(2.0 m × 1.0 m × 0.8 m), 水体深度为 0.4 m, 池底层平铺一层光滑的河卵石, 养殖用水为充分曝气的去氯自来水, 暂养 20 d 后开始实验, 期间投喂两次, 每次间隔时间为 10 d。

1.3 方 法

1.3.1 不同养殖模式和温度下菲牛蛭交配率比较实验 设置 2 种养殖模式(水体环境和土壤环境)和 7 个温度梯度[24°C、26°C、28°C、30°C、32°C、34°C、RT(室内自然变温 room temperature)], 3 次重复。养殖容器采用食品级白色泡沫箱(0.5 m × 0.5 m × 0.4 m), 水养模式中水体 10 L, 为充分曝气的自来水, pH 为 7.6 ~ 7.8, 采用水族箱专用加热棒控制水温; 土养模式采用相同容器, 基质取自广州郊区经检测无农药污染的农家菜地壤土, 颗粒均匀、疏松、透气性好、具一定黏性, pH 为 7.5 ~ 7.7, 湿度为 80%。每箱精心挑选 20 尾健康亲蛭, 平均体重(饥饿状态)为(8.26 ± 2.05) g, 观察体前端生殖环带区明显变宽, 生殖孔附近出现米黄色颗粒, 已达性成熟个体^[15]作为实验对象。实验时间为 2007 年 1 月 27 日 ~ 2 月 27 日。实验期间平均气温为(18.22 ± 4.21) °C。实验期间, 每天观察水体箱内菲牛蛭的交配行为, 隔 5 d 检查土箱内交配情况, 记下各个处理组交配的起始时间及结束时间。实验结束后, 清箱逐个检查种蛭的生殖环带, 交配过的个体有明显特征, 出现卵黄色生殖环带, 隆起, 且腹部环带区有明显的突起^[15], 统计交配数和交配时间。

1.3.2 不同茧质量下受精卵茧人工孵化实验

卵茧人工孵化采用保鲜盒(规格: 40 cm × 40 cm × 20 cm), 注入一层 30 mm 厚的水层, 水体中错落放置表面光滑的河卵石数枚, 水层上放

置一块食品级泡沫片,其上平铺润湿的医用级纱布,然后上面放置一定数量的卵茧,保鲜盒的顶盖要钻数个小孔,以便透气。实验设计为5个处理,根据卵茧质量将其分为<0.6 g、0.6~1.0 g、1.0~1.5 g、1.5~2.0 g、>2.0 g 5个组别,3次重复,每个重复放置30枚同批次卵茧。实验时间为2007年3月9日~4月9日,共30 d。实验用卵茧为2007年2月28日~3月6日同步产出的一批卵茧,外层的白色泡沫层已风干,茧两端无开孔。在(28±0.3)℃鼓风透气保湿避光的生化培养箱(LRH-250A,广东省医疗器械厂)内进行孵化,每天查箱1次,出现幼蛭立即移出喂养,底部水层及时补充以防挥发。

1.3.3 不同温度下受精卵茧人工孵化实验

设置6个温度梯度,分别为22℃、24℃、26℃、28℃、30℃、32℃,每个处理3次重复,每个重复放置30枚同批次卵茧,选取外层白色泡沫层已经风干,茧两端没有开孔,质量为1.0~2.0 g的健康卵茧进行孵化实验。实验时间为2007年3月20日~5月20日,共60 d。按实验设计于控温避光透气的生化培养箱(LRH-250A,广东省医疗器械厂)内进行孵化实验。

1.4 数据处理 实验参数包括亲蛭的成功交配受精率,受精卵茧孵化率、孵化数和孵化时间。孵化时间为从产茧到孵化结束的时间。

受精率(%)=(成功受精的亲蛭数/总亲蛭数)×100%;孵化数(尾)=幼蛭数/卵茧数;

孵化率(%)=[(总茧数-死茧数)/总茧数]×100%;数据由平均数±标准差(Mean±SD)表示,采用单因子方差分析(One-Way ANOVA)。如果差异显著($P < 0.05$),再进一步以Duncan's法进行多重比较。所有数据均采用SPSS 11.5(Statistical Program for Social Sciences. 11.5)统计软件进行分析。

2 结果

2.1 温度和养殖模式对菲牛蛭交配率的影响

在水体和土壤两种环境条件下温度对菲牛蛭交配均存在显著影响($F_{6,20} = 75.532, n = 3, P < 0.01$; $F_{6,20} = 35.030, n = 3, P < 0.01$) (图1),其中,水体环境中28℃和30℃下菲牛蛭具有最高的交配率,分别为60.000%和71.667%,自然变温(RT)和34℃高温下菲牛蛭无交配行为,24℃、26℃和32℃温度下其交配率也处于低水平,平均不超过25%。土壤环境中28℃和30℃下菲牛蛭具有最高的交配率,分别为96.333%和94.667%,34℃高温下交配率最低,为46.667%,其他温度下菲牛蛭交配率处于中间水平,平均交配率也超过70%。土壤中菲牛蛭的交配行为非常活跃,交配率最高达96.333%,而水体控温条件下,交配率较低,即使在其最佳水体交配温度30℃下,交配率也仅为71.667%,而在自然变温和34℃两个温度下甚至不发生交配行为。

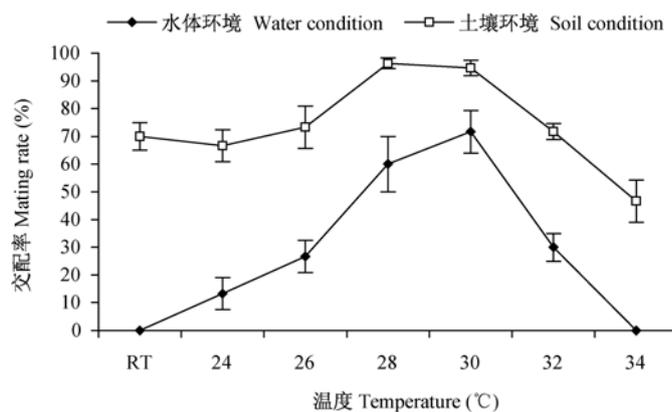


图1 水体和土壤环境中温度对菲牛蛭交配率的影响

Fig. 1 Effects of temperature on mating rate of leech *Hirudinaria manillensis* in water and soil conditions

2.2 茧质量对卵茧孵化的影响 茧质量对卵茧孵化数和孵化率具有显著影响 ($F_{4,14} = 82.886, n = 3, P < 0.01$; $F_{4,14} = 47.781, n = 3, P < 0.01$)。图 2 所示,在相同温度条件下,卵茧质量 1.0 ~ 1.5 g 组和 1.5 ~ 2.0 g 组卵茧孵化数和孵化率最高,其中 1.0 ~ 1.5 g 组分别为 9.673 尾和 95.557%, 1.5 ~ 2.0 g 组分别为

10.053 尾和 95.557%,均显著高于其他处理组 ($P < 0.01$)。而 ≤ 0.6 g 组最低,分别为 4.250 尾和 45.557%。结果同时表明卵茧质量在 0.6 ~ 2.0 g 时孵化数和孵化率均与卵茧质量成正比,当卵茧质量大于 2.0 g 时孵化数和孵化率反而明显下降,且与 1.5 ~ 2.0 g 组呈显著性差异 ($P < 0.01$)。

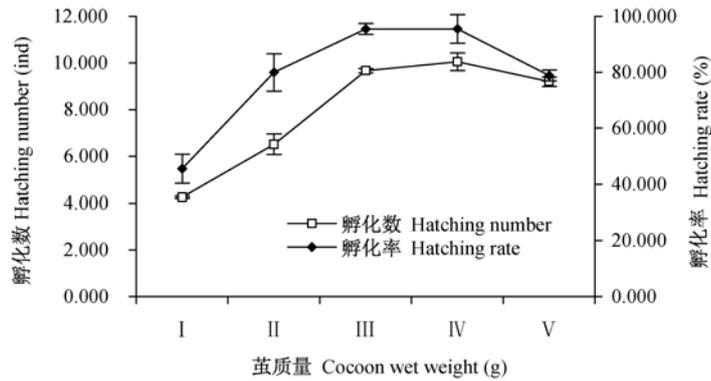


图 2 茧质量对卵茧孵化数和孵化率的影响

Fig. 2 Effects of cocoon wet weight on hatching number and hatching rate of cocoon deposited by the leech *Hirudinaria manillensis*

I: ≤ 0.6 g; II: 0.6 ~ 1.0 g; III: 1.0 ~ 1.5 g; IV: 1.5 ~ 2.0 g; V: ≥ 2.0 g

2.3 温度对相同质量级卵茧孵化的影响 相同质量级卵茧在不同温度下的孵化时间、孵化数和孵化率差异显著 ($F_{5,17} = 76.404, n = 3, P < 0.01$; $F_{5,17} = 37.521, n = 3, P < 0.01$; $F_{5,17} = 29.531, n = 3, P < 0.01$)。图 3 所示,26℃及 28℃下具有最高的孵化数和孵化率,其中 26℃下分别为 9.100 尾和 96.667%, 28℃下分

别为 9.110 尾和 97.780%; 32℃ 高温下最低,分别为 7.977 尾和 64.443%,显著低于其他温度组 ($P < 0.01$);同时结果表明,在 22 ~ 28℃ 范围内,卵茧孵化数和孵化率均随着温度的升高而增高,当温度超过 30℃ 时其孵化数和孵化率反而明显下降,与其他温度组均存在显著差异 ($P < 0.01$)。图 4 所示,随着温度升高,孵化

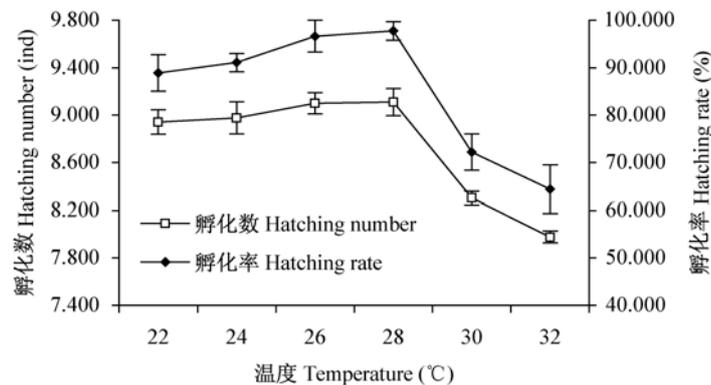


图 3 温度对相同质量级卵茧孵化数和孵化率的影响

Fig. 3 Effects of temperature on hatching number and rate of cocoon at the same weight level

时间呈逐渐缩短趋势,22℃下孵化时间最长,为 58.333 d,而 30℃和 32℃高温下分别为 19.667 d 和 19.000 d,明显缩短孵化周期,在最佳孵化效果的 26℃和 28℃下孵化时间分别为 29.333 d 和 26.333 d。

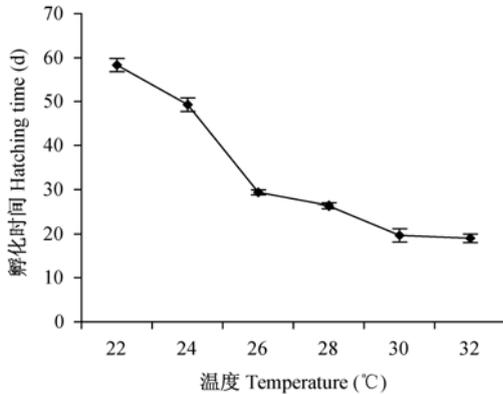


图4 温度对相同质量级卵茧孵化时间的影响
Fig. 4 Effects of temperature on hatching time of cocoon at the same weight level

3 讨论

3.1 养殖模式和温度对菲牛蛭交配率的影响

本研究旨在探讨菲牛蛭最佳交配条件,挑选种蛭是关键,其标准为,个体大,已性成熟,但未交配的个体,从背腹部的生殖环带观察,体色为灰色,未出现卵黄色的生殖环带,且环带区无明显隆起^[11, 15]。水体和土壤环境下温度对菲牛蛭交配实验结果表明,温度对菲牛蛭的交配具有显著作用,适宜的温度能大大提高其交配率;同时也证明在同样温度下土壤环境中交配率要明显高于水体环境,土壤环境下即使在较低的温度也具有较高的交配率,平均超过 75%,而水体环境中即使温度适应其交配率也不高,不超过 70%。分析产生这种实验现象的原因是在水体环境中生活的种蛭易受养殖场人为操作的惊扰,频繁的游动消耗体能,且无安静的栖息场所,因而未能创造其适宜的交配环境;而在土壤中,种蛭具有穴居的生活习性,自身建造的洞穴通道四通发达,观察发现,在土壤洞穴中种蛭营群居生活,由于土壤环境相对稳定、安静,不易受外界刺激惊扰,另外在洞穴中种蛭处于低

消耗状态,体能充沛,故交配效果显著优于水体各个控温环境。

3.2 茧质量对卵茧孵化的影响 相同且适宜温度下,茧质量对其孵化效果的结果表明,1.0~1.5 g 组与 1.5~2.0 g 组卵茧孵化数和孵化率最高,当卵茧质量大于 2.0 g 时反而明显下降。可见在人工孵化过程中,菲牛蛭卵茧大小与其孵化能力有密切关系。观察发现,大个体茧(1.5~2.0 g)的幼蛭数多,而且稳定,一般为 10~12 尾幼蛭,且幼蛭出茧时个体均匀,健康状况佳,平均体质量可达 0.12 g,平均自然伸展体长为 20~30 mm,体宽为 2~3 mm。中等个体的茧(0.6~1.0 g),一般为 6~8 条幼蛭;而小茧的孵化状态很不稳定,出现死茧、坏茧的几率达 40% 以上,小茧(≤ 0.6 g)内的幼蛭数明显减少,为 1~5 条,而且茧内幼蛭发育不同步,各项形态指标相差悬殊,出茧时最大的幼蛭体质量达 0.35 g,自然伸展体长为 40~45 mm,体宽为 4~5 mm;最小的幼蛭体质量仅 0.045 g,自然伸展体长为 7~9 mm,体宽为 1~2 mm。产生这种现象的原因可能是茧内存在受精卵的竞争发育机制^[16],在小个体卵茧本身营养液不足的情况下,绝大多数受精卵被淘汰,少量存活的受精卵发育成幼蛭,同样存在着营养竞争关系,生命力强、吸食茧内营养液多的幼蛭发育迅速、生长迅速,而未及时吸食或少量吸食的幼蛭发育受阻、个体小、生命力差、存活率低,而且易导致发育不全、身体残缺^[13]。另外,试验证明,刚出茧的幼蛭即能吸食活体牛蛙的血液或咬破肠衣吸食人工饲料,而且幼蛭健康状况好,存活率高,因此,推测菲牛蛭幼蛭出茧之前,已在茧内完成了开口期,并且开口期的食物就是茧内的蛋白营养液^[11-12]。

3.3 温度对相同质量级卵茧孵化的影响 温度对相同质量级卵茧孵化影响的结果表明,26℃和 28℃具有最高孵化数和孵化率,且在 22~28℃范围内,随着温度的升高而增大;当温度超过 30℃时其孵化数和孵化率反而明显下降。随着温度升高,孵化时间呈下降趋势,22℃孵化时间最长,而 30℃和 32℃高温下孵化时间明显

缩短。环境温度影响变温动物的所有代谢过程,涉及其整个生命过程,是最重要的外界因素之一^[17]。30℃和32℃温度下,破茧幼蛭健康状况明显逊于其他孵化温度处理组,行动迟缓,多数幼蛭通体透明,前后吸盘未发育完全,吸附力差,试验结束后剪破卵茧发现存在较多死亡幼蛭个体,可能是高温下窒息而死。可见,高温对水蛭卵茧的孵化和幼蛭存活率影响显著,这与史红专等对宽体金线蛭(*Whitmania pigra*)的卵茧孵化研究结果一致^[18]。

参 考 文 献

- [1] 杨 潼. 中国动物志: 环节动物门 蛭纲. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 谭恩光. 中国医蛭科动物地理研究. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1): 100 - 104.
- [3] Borda E, Siddall M E. Arhynchobdellida (Annelida: Oligochaeta: Hirudinida); phylogenetic relationships and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 30(1): 213 - 225.
- [4] 谭恩光. 蛭类动物的药理作用. *自然杂志*, 1990, 13(4): 223 - 225.
- [5] Vindigni A, De Filippis V, Zanotti G, et al. Probing the structure of hirudin from *Hirudinaria manillensis* by limited proteolysis. Isolation, characterization and thrombin-inhibitory properties of N-terminal fragments. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 226(2): 323 - 333.
- [6] 苗艳丽, 方永富, 宋文东. 中药菲牛蛭化学成分的分析. *中成药*, 2007, 29(8): 1248 - 1250.
- [7] 苗艳丽, 宋文东. 菲牛蛭中脂肪酸和氨基酸的分析. *福建分析测试*, 2007, 16(2): 49 - 51.
- [8] 杨晓楠, 殷国前, 杨健祥, 等. 活体水蛭吸血疗法临床应用 8 例. *中国美容整形外科杂志*, 2007, 18(4): 284 - 285.
- [9] 安瑞水, 康辰香. 水蛭僵蚕. 北京: 中国中医药出版社, 2000.
- [10] 马建创. 水蛭的人工饲养. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [11] Kutschera U. Reproductive behaviour and parental care of the leech *Helobdella triserialis* (Hirudinea: Glossiphoniidae). *Zoologischer Anzeiger*, 1992, 228: 74 - 81.
- [12] Kutschera U. The feeding strategies of the leech *Erpobdella octoculata* (L.): a laboratory study. *International Review of Hydrobiology*, 2003, 88(1): 94 - 101.
- [13] 宋大祥, 冯钟琪. 蚂蟥. 北京: 科学出版社, 1978.
- [14] 李庆乐. 水蛭人工养殖技术. 南宁: 广西科学技术出版社, 2002.
- [15] 谭恩光, 黄立英, 关莹, 等. 广东菲牛蛭生长和生殖的研究. *中草药*, 2002, 33(9): 837 - 840.
- [16] Bower S M, Thompson A B. Hatching of the Pacific salmon leech (*Piscicola salmositica*) from cocoons exposed to various treatments. *Aquaculture*, 1987, 66(1): 1 - 8.
- [17] 史红专, 刘飞, 郭巧生. 温度对蚂蟥生长及摄食规律影响的初步研究. *中国中药杂志*, 2006, 31(23): 1944 - 1946.
- [18] 史红专, 刘飞, 郭巧生. 温度和体重对蚂蟥人工繁殖影响的研究. *中国中药杂志*, 2006, 31(24): 2030 - 2032.