

周 西,季亚培,黄文婷,等. 环境激素睾丸酮、孕酮对萼花臂尾轮虫繁殖的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):286-289.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.083

# 环境激素睾丸酮、孕酮对萼花臂尾轮虫繁殖的影响

周 西,季亚培,黄文婷,郝晴雯,詹政军,郭 蕾,杨家新

(南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210023)

**摘要:**研究了在种群试验条件下,睾丸酮和孕酮对萼花臂尾轮虫生殖参数(受精率、混交雌体比率、休眠卵/雌体百分率)的影响。结果显示,睾丸酮的 48 h-EC<sub>50</sub>、NOEC、LOEC 分别为 511.0、0.1、1.0 μg/L。睾丸酮为 10 μg/L 时,可显著诱导萼花臂尾轮虫混交雌体和休眠卵的产生;100、1 000 μg/L 时,添加睾丸酮能使萼花臂尾轮虫的休眠卵孵化率分别显著提高 83.67%、85.71%;100 μg/L 时,可使轮虫交配率提高 87.5%。孕酮的 48 h-EC<sub>50</sub> 为 4.3 mg/L,2.0 mg/L 的孕酮可使萼花臂尾轮虫的种群增长率提高 20.89%;2.5 mg/L 时最适宜促进混交雌体和休眠卵的产生;2.5、3.0 mg/L 时可使萼花臂尾轮虫的孵化率分别提高 51.98%、1.47 倍;3.0、3.5 mg/L 时可显著提高轮虫受精率。

**关键词:**萼花臂尾轮虫;睾丸酮;孕酮;混交雌体;生殖参数

**中图分类号:** X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0286-04

萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)具有分布广、繁殖快、易培养等特点,是淡水生态系统的重要组成部分,其休眠卵可通过商业渠道获得。20 世纪 70 年代,轮虫被推荐作为生态毒理受试动物<sup>[1]</sup>;20 世纪 90 年代,萼花臂尾轮虫、褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)分别被美国试验材料协会(American Society for Testing and Materials, ASTM)采纳,正式成为淡水、海水生态毒理研究的标准受试动物<sup>[2]</sup>。甲基睾丸酮、孕酮是由脊椎动物分泌的类固醇激素,进入水体中会对生物内分泌产生干扰。轮虫受精和休眠卵产量等受内分泌机制的调控,因此其生殖指标可作为测定环境激素对水生无脊椎动物内分泌干扰的有效方法。已有研究证实,轮虫的生长生殖可受一些环境激素的影响<sup>[3-4]</sup>。一定浓度孕酮可增加臂尾轮虫(*Brachionus manjavacas*)产休眠卵的数量并明显降低其内禀增长率<sup>[5]</sup>。氰戊菊酯(fenvalerate)、三丁基氯化锡(TBTC)对萼花臂尾轮虫生命周期中各发育阶段历时和种群增长均有显著影响<sup>[6]</sup>。然而,已有研究多建立在环境效应药物上,即具有雌性或雄性效应的药物,而关于外源性哺乳动物分泌的性激素对萼花臂尾轮虫生长生殖的影响鲜有报道。研究在睾丸酮、孕酮等典型类固醇激素作用下萼花臂尾轮虫生殖情况的变化,并分析各种参数,寻找性激素对轮虫生殖干扰的参考指标,以期对轮虫繁殖生物学与生态毒理学的结合提供新的研究思路。寻求适当的激素刺激,以促进轮虫由无性生殖向有性生殖转化,从而提高其休眠卵产量,在生产中具有实践意义。

## 1 材料与方法

收稿日期:2016-03-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:31272388)。

作者简介:周 西(1989—),女,硕士研究生,主要从事生态毒理学研究。E-mail:1012630205@qq.com。

通信作者:杨家新,博士,教授,主要从事水产生物饵料科学研究。E-mail:yangjx@njnu.edu.cn。

### 1.1 轮虫的预培养

试验采用萼花臂尾轮虫(Florida, USA, 1983 品系)的冷冻休眠卵,于 24 孔塑料培养板中孵化,每孔加入 0.8 mL EPA 培养基<sup>[7]</sup>(蛋白核小球藻的浓度控制在  $3.0 \times 10^6 \sim 3.5 \times 10^6$  个/mL),进行单克隆培养。挑取龄期小于 4 h 且活泼健壮的新生幼体进行试验。轮虫的培养条件为光照度约 4 000 lx、光—暗周期 16 h—8 h、温度(25±1)℃。

### 1.2 试验药品的配制

采用丙酮溶液作为溶剂,分别将甲基睾丸酮、孕酮配制为 10 000 mg/L 的母液。将 EPA 培养基和浓缩离心后的蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)(HB4 培养基)配制为不同浓度梯度的试验溶液,小球藻浓度控制在约  $4 \times 10^6$  cells/mL,小球藻培养条件与杨家新等的培养条件<sup>[8]</sup>相同。

### 1.3 相关试验参数和计算方法

种群增长率: $r = (\ln N_t - \ln N_0) / T$ ( $N_t$  为种群在  $t$  d 时的种群数量, $N_0$  为起始数量, $T$  为试验时间)。混交雌体与非混交雌体比: $MF/AF$  = 混交雌体数/非混交雌体数。携卵与非携卵比: $OF/NOF$  = 携卵/非携卵(ovigerous female/non-ovigerous)。混交百分率: $MF = MF / (MF + MPF + AF) \times 100\%$ ( $MF$  为混交雌体, $AF$  为非混交雌体, $MPF$  为产雌体)。受精百分率:受精百分率 = 产休眠卵/总混交雌体。受精率:受精率 = 携休眠卵雌体数/总雌体数。交配率:交配率 = 雄体相遇次数/(雄体相遇次数 + 成功交配次数)<sup>[9]</sup>。

### 1.4 种群动态学试验

取龄期小于 4 h 的轮虫幼体置于试管(直径 1 cm、长度 10 cm)中,4 个/管,加入 8 mL 不同质量浓度的试验溶液(甲基睾丸酮质量浓度分别为 0.1、1、10、100、1 000 μg/L,孕酮质量浓度分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mg/L),每组设置 5 个平行组,另设 1 个空白组。每隔 24 h 振荡试管,使藻液分散均匀。于 48 h 时计数,并计算种群增长率和 EC<sub>50</sub> 值。于 96 h 时分别对非混交雌体、携雄卵雌体、携休眠卵雌体、非携卵雌体、休眠卵进行计数,类别鉴定方法与 Paloheimo 的方法<sup>[10]</sup>相同。7 d 后对各质量浓度组试管底部的休眠卵进行计数并收

集,风干后放入 1 mL EPA Eppendorf 离心管中,置于 4 ℃ 冰箱。30 d 后取出该休眠卵置于 6 孔塑料培养板中孵化,置入 30 个/孔,加入 5 mL EPA 培养基,每组设置 5 个平行组,连续观察并计算孵化率。试验过程中不更换培养溶液。

1.5 受精率试验

对轮虫进行单克隆培养,从中挑取出 8~9 个 2~4 h 龄的非混交雌体以及刚产出的雄体,分别按照雌雄性比 1:2 放入 0.5 mL 不同质量浓度的试验溶液中,于 24 孔板中培养。辜丸酮的质量浓度分别为 1、5、25、125、625 μg/L,孕酮的质量浓度分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mg/L。每组设 3 个平行组,另设 1 个空白对照组。试验开始 24 h 后移去雄体,之后每隔 8 h 移去携非混交卵的雌体、产雄卵的混交雌体,保留产休眠卵的雌体,并于试验进行 72 h 后统计携休眠卵的雌体数和总雌体数。试验过程中每隔 12 h 更换 1 次培养溶液。

1.6 受精行为观察

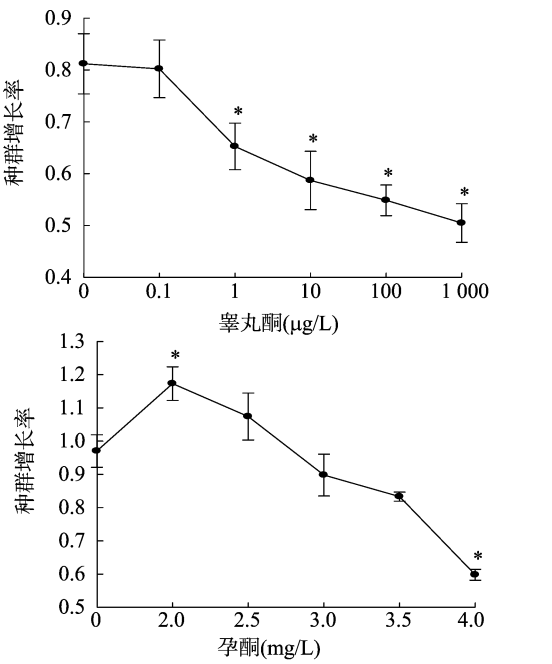
随机挑取龄期小于 4 h 的非混交雌体和刚产出的雄体,分别放入不同质量浓度的药物(辜丸酮、孕酮质量浓度同“1.5”节)中,不添加任何藻液。每组设 5 个平行组及 1 个对照组,置于 96 孔板中培养,反应体系控制在 100 μL 以内。在室温(23~25 ℃)下通过解剖镜连续观察 20 min,根据 Snell 等的试验方法<sup>[5]</sup>记录雌体和雄体相遇次数及成功交配次数。

2 结果与分析

2.1 辜丸酮、孕酮对蓼花臂尾轮虫 2 d 种群增长率的影响

由图 1 可知,辜丸酮、孕酮均对蓼花臂尾轮虫的增长率具有显著影响( $LSD, F=24.877, df_{\text{组间}}=5, df_{\text{组内}}=24, P<0.01$ )。随着辜丸酮质量浓度的升高,轮虫种群增长率基本呈下降趋势。辜丸酮质量浓度为 1~1 000 μg/L 时,与对照组相比  $r$  值均显著降低(Dunnett 检验,  $P<0.01$ )。回归分析表明,辜丸酮质量浓度对数与轮虫种群增长率呈负相关( $y=0.68-0.06x, r^2=0.65, P<0.01$ )。Prohit 分析得到辜丸酮对蓼花臂尾轮虫的  $EC_{50}$ 、 $NOEC$ 、 $LOEC$  分别为 511.0、0.1、1.0 μg/L。

与对照组相比,3~4 mg/L 孕酮组的种群增长率降低,4 mg/L 孕酮组的种群增长率下降了 38.40%,差异显著(Dunnett 检验,  $P<0.05$ )。孕酮质量浓度为 2.0、2.5 mg/L 时,种群增长率比对照组上升,其中 2.0 mg/L 孕酮组的  $r$  值比对照组上升了 20.89%,差异显著(Dunnett 检验,  $P<0.05$ )。可见,低质量浓度孕酮可提高轮虫的增长率,但高质量浓度孕酮会对种群增长率产生抑制。回归分析表明,孕酮质量浓度与蓼花臂尾轮虫的种群增长率  $r$  呈负相关( $y=1.69-0.26x, r^2=0.85, P<0.01$ )。Prohit 分析得到孕酮的



“\*”表示与对照组差异显著。下图同  
图1 不同辜丸酮、孕酮质量浓度对蓼花臂尾轮虫增长率的影响

$EC_{50}$  为 4.3 mg/L。

2.2 辜丸酮、孕酮对蓼花臂尾轮虫 4 d 种群动态学的影响

统计结果(表 1、表 2)表明,辜丸酮对蓼花臂尾轮虫的 MF/AF、混交率、7 d 休眠卵产量、休眠卵/雌体比均具有极显著影响( $LSD, F$  值分别为 4.285、4.379、4.493、4.165,  $df_{\text{组间}}$  均为 5,  $df_{\text{组内}}$  均为 24,  $P$  均小于 0.01),对受精率也具有显著影响( $LSD, F=2.749, df_{\text{组间}}=5, df_{\text{组内}}=24, P<0.05$ );孕酮对 MF/AF、携混交百分率、7 d 休眠卵产量、休眠卵/雌体比均具有极显著影响( $LSD, F$  分别为 5.808、5.599、17.301、5.253,  $df_{\text{组间}}$  均为 5,  $df_{\text{组内}}$  均为 24,  $P$  均小于 0.01),除 7 d 产休眠卵量总体随着辜丸酮质量浓度的增加呈上升趋势外,其他指标均呈先升高后下降的趋势。休眠卵/雌体比在孕酮质量浓度 2.0、2.5 mg/L 下比对照组有显著提升(Duncan,  $P<0.05$ ),也呈先升高后下降的趋势。辜丸酮、孕酮对 OF/NOF 均无显著影响( $LSD, F$  分别为 0.572、1.460,  $df_{\text{组间}}=5, df_{\text{组内}}=24, P>0.05$ ),孕酮对受精率的影响也不显著( $F=0.177, df_{\text{组间}}=5, df_{\text{组内}}=24, P>0.05$ )。

2.3 辜丸酮和孕酮对蓼花臂尾轮虫休眠卵孵化率的影响

由图 2 可知,辜丸酮和孕酮对蓼花臂尾轮虫休眠卵的孵化率均具有极显著影响( $F$  分别为 7.28、31.28,  $df_{\text{组间}}=5$ ,

表 1 辜丸酮对蓼花臂尾轮虫 4 d 种群动态学参数的影响

质量浓度 (μg/L)	4 d 种群动态学参数					
	MF/AF	OF/NOF	混交百分率(%)	7 d 休眠卵产量(粒)	受精百分率(%)	休眠卵/雌体比
对照	0.53 ± 0.04ab	0.69 ± 0.07	36.74 ± 2.05ab	23.8 ± 4.02b	22.07 ± 6.78a	0.03 ± 0.02a
0.1	0.43 ± 0.06a	0.71 ± 0.06	29.61 ± 3.37a	17.8 ± 2.26ab	36.31 ± 5.47ab	0.05 ± 0.01ab
1	0.54 ± 0.04ab	0.68 ± 0.03	34.78 ± 1.71ab	12.6 ± 1.89a	36.48 ± 6.74ab	0.05 ± 0.01ab
10	0.79 ± 0.11c	0.81 ± 0.05	43.37 ± 3.40c	21.2 ± 1.43ab	66.67 ± 14.70b	0.13 ± 0.03b
100	0.75 ± 0.08bc	0.71 ± 0.09	42.30 ± 2.45bc	23.2 ± 3.80ab	57.03 ± 14.40b	0.11 ± 0.02c
1 000	0.45 ± 0.07a	0.56 ± 0.06	30.50 ± 3.24a	35.6 ± 5.11c	55.18 ± 8.30b	0.06 ± 0.01ab

注:表中数据为“平均值 ± 标准误”。下表同。

表 2 孕酮对萼花臂尾轮虫 4 d 种群动态学参数的影响

质量浓度 (mg/L)	4 d 种群动态学参数					
	MF/AF	OF/NOF	混交百分率(%)	7 d 休眠卵产量(粒)	受精百分率(%)	休眠卵/雌体比
对照	0.36 ± 0.11a	0.48 ± 0.07	23.36 ± 5.67a	28.6 ± 4.46a	74.26 ± 11.00	0.07 ± 0.02a
2.0	0.87 ± 0.14d	0.65 ± 0.09	46.90 ± 3.30c	87.6 ± 7.99c	86.25 ± 7.24	0.17 ± 0.03bc
2.5	1.11 ± 0.16d	0.85 ± 0.10	51.58 ± 3.64c	61.8 ± 7.91b	93.55 ± 1.88	0.22 ± 0.03c
3.0	0.70 ± 0.10abc	0.71 ± 0.05	40.71 ± 4.24bc	59.8 ± 3.43b	85.13 ± 8.47	0.14 ± 0.02ab
3.5	0.72 ± 0.10bc	0.70 ± 0.13	40.99 ± 3.72bc	73.0 ± 6.91bc	82.28 ± 10.00	0.14 ± 0.03ab
4.0	0.40 ± 0.10ab	0.71 ± 0.08	27.44 ± 6.43ab	24.2 ± 3.02a	92.74 ± 37.10	0.07 ± 0.02b

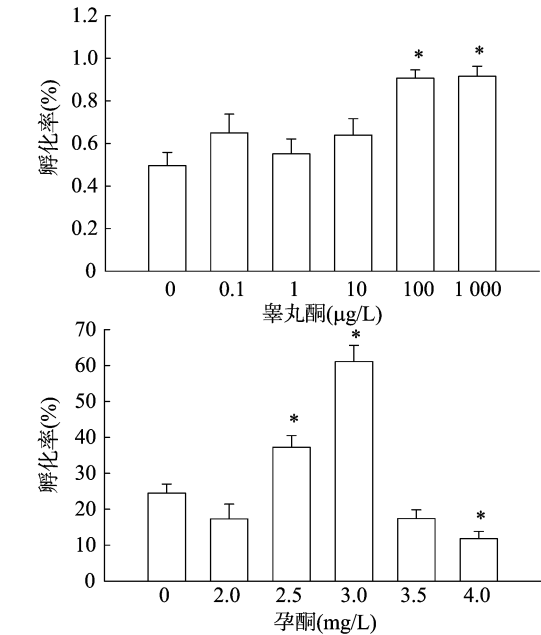


图2 睾酮、孕酮对萼花臂尾轮虫休眠卵孵化率的影响

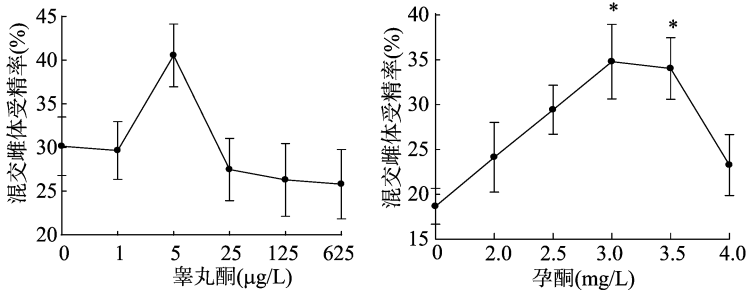


图3 睾酮、孕酮对萼花臂尾轮虫混交雌体受精率的影响

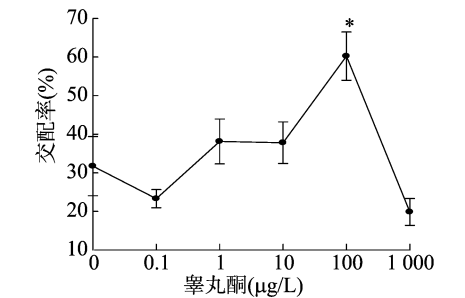


图4 睾酮对萼花臂尾轮虫雄体交配行为的影响

3 结论与讨论

3.1 睾酮、孕酮对萼花臂尾轮虫种群增长的影响

目前,关于外源雄性激素对萼花臂尾轮虫生殖影响的报道较少,多数集中于环境雌激素对轮虫生殖生理的影响。Radix 等研究发现,萼花臂尾轮虫的睾酮 72 h - EC<sub>50</sub> 为 26.3 μmol/L<sup>[11]</sup>,而本试验中得出的睾酮 48 h - EC<sub>50</sub> 约为 511 μg/L,可能是由于不同品系的萼花臂尾轮虫存在一定差异。本试验中睾酮质量浓度为 1 ~ 1 000 μg/L 时,内禀增长率 *r* 大幅下降,与 Radix 等发现的 *r* 值在 0.58 μmol/L 睾酮刺激下发生下降<sup>[11]</sup> 相似。Snell 等研究表明,孕酮质量浓度低于 10 mg/L 时对臂尾轮虫 *Brachionus manjavacas* 种群增长无显著影响,高于 14 mg/L 时可对其产生抑制,而 12 mg/L

*df*<sub>组内</sub> = 24, *P* < 0.01)。质量浓度为 100、1 000 μg/L 的睾酮处理组与对照组相比分别升高了 83.67%、85.71%,差异显著 (Dunnett, *P* < 0.05),总体呈升高趋势。质量浓度为 2.5、3.0 mg/L 的孕酮处理组分别比对照组提高了 51.98%、1.47 倍 (*P* < 0.05),4 mg/L 处理组则显著降低 (*P* < 0.05),呈先升高后降低的趋势。

2.4 睾酮、孕酮对萼花臂尾轮虫受精作用的影响

试验结果 (图 3) 表明,睾酮对萼花臂尾轮虫混交雌体的受精率没有显著影响 (*LSD*, *F* = 2.21, *df*<sub>组间</sub> = 5, *df*<sub>组内</sub> = 138, *P* > 0.05),而孕酮对轮虫受精率的影响极显著 (*LSD*, *F* = 3.79, *df*<sub>组间</sub> = 5, *df*<sub>组内</sub> = 90, *P* < 0.01)。孕酮质量浓度为 3.0、3.5 mg/L 时,与对照组相比受精率极显著提高 (*P* < 0.01),大致呈抛物线形。

2.5 睾酮对萼花臂尾轮虫雄体交配行为的影响

由图 4 可知,在睾酮的影响下,雄体的交配行为差异极显著 (*LSD*, *F* = 6.93, *df* = 24, *P* < 0.01),100 μg/L 质量浓度组比对照组提高了 87.5%,差异显著 (Dunnett 检验, *P* < 0.05)。随着质量浓度的增加交配率明显降低,表明雄性激素可提高雄体交配率。

孕酮对海水种褶皱臂尾轮虫 (*B. plicatilis*) 无显著影响,表明高浓度环境激素对轮虫产生一定毒性效应<sup>[5]</sup>。本试验得到了相似结果,在 2.0 ~ 2.5 mg/L 时 *r* 值下降,可能是由于投喂食物的浓度和种类不同,对轮虫种群数量具有不同程度的影响。

3.2 睾酮和孕酮对萼花臂尾轮虫混交雌体的促进作用  
本试验中,睾酮在 EC<sub>50</sub> 值附近对 MF/AF 和 MF% 值均具有显著影响,在 0.1 ~ 100 μg/L 范围内混交雌体比率上升,以 *r* 值为指标得出的 EC<sub>50</sub> 值与群体条件下得出的 MF%、MF/AF 值具有一定的剂量 - 效应关系,呈抛物线形;但对于 OF/NOF 值没有显著影响。可见, *r* 值并不是判断睾酮对萼花臂尾轮虫生殖影响的理想指标,但该值仍是敏感的检测指标<sup>[12-14]</sup>。孕酮对混交雌体也有类似的促进作用,表明类固醇

激素对轮虫内分泌产生干扰,刺激无性生殖向有性生殖转变,从而促发大量混交雌体的产生。

### 3.3 类固醇激素对萼花臂尾轮虫休眠卵生成和孵化的影响

Gallardo等在萼花臂尾轮虫的群体培养中发现,0.05、0.50 mg/L保幼激素(JH)刺激可将混交雌体发生率提高30%<sup>[15]</sup>。本研究表明,10、100  $\mu\text{g/L}$  睾丸酮和2.0、2.5 mg/L孕酮可促进萼花臂尾轮虫休眠卵的产生。可能是由于在类固醇激素的作用下混交雌体大量出现,产雄雌体相对增加,药物对雄体、产雄雌体内分泌产生干扰,使雄体活力增强、受精率提高,进而影响卵雌比。

Snell发现孕酮对*B. manjavacas*休眠卵的孵化率具有明显影响,而对萼花臂尾轮虫无影响,本试验结果与之不一致,可能是由于休眠卵萌发也受到母体摄食类型的影响。在萼花臂尾轮虫对淡水水体中内分泌干扰物和重金属的研究中发现,轮虫在有性生殖阶段对环境刺激的反应比无性生殖阶段更敏感<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,对于环境激素中的雌性激素(孕酮)和外源性的雄性激素(睾丸酮),休眠卵的孵化率是评价水体中内分泌干扰物的良好指标;加入此类性激素可在不破坏生态环境的基础上对萼花臂尾轮虫休眠卵的产生、孵化率的提升具有促进作用,在实际生产中具有一定利用价值。

### 3.4 环境激素对萼花臂尾轮虫有性生殖阶段中受精率和受精行为的影响

目前对轮虫交配行为的研究主要集中于萼花臂尾轮虫属<sup>[17-18]</sup>,而对于不同环境激素作用下轮虫受精作用的研究较少。本试验结果表明,在雌雄性比相同时,睾丸酮对轮虫混交雌体的受精率无显著影响,而一定质量浓度范围内的孕酮可显著提高受精率,促进轮虫交配行为的发生。Snell等研究发现,桡足类个体交配行为的发生依赖于水体中物种特异性接触的信息素类物质<sup>[19]</sup>,轮虫交配行为的发生与其类似。雄体通过头冠上的受体来获取雌体表面糖蛋白的化学信息,交配行为受到信号质量和强度的影响。本研究发现,睾丸酮在100  $\mu\text{g/L}$ 时显著提高轮虫的交配率,因此认为水体中性激素的存在干扰了自然的信息素,使雄体表现出不同程度的交配行为。雄体交配率的高低与最终混交雌体产生休眠卵的高低之间没有数量级关系,表明休眠卵的产生与交配次数无关,而可能与性激素对雌体内分泌系统的干扰有关。关于这种信息素类物质的结构、是否真实存在或被提取并无定论<sup>[20-22]</sup>,性激素的存在是否真正影响到此类物质,或直接对雄体的生理生化反应产生影响,有待借助分子生物学手段进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Snell T W, Joaquim J C. Workshop on rotifers in ecotoxicology[J]. Hydrobiologia, 2007, 593(1): 227-232.
- [2] ASTM. Standard guide for acute toxicity tests with the rotifer *Brachionus*[M]//Annual book of ASTM standards, water and environmental technology Vol 1105: biological effects and environmental fates. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2001.
- [3] Preston B L, Snell T W, Robertson T L, et al. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors[J]. Environ Toxicol Chem, 2000, 19(12): 2923-2928.

- [4] Radix P, Severin G, Schramm K W, et al. Reproduction disturbances of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disruptors[J]. Chemosphere, 2002, 47(10): 1097-1101.
- [5] Snell T W, des Rosiers N J D. Effect of progesterone on sexual reproduction of *Brachionus manjavacas* (rotifera)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2008, 363(1/2): 104-109.
- [6] 朱玮阁, 李孙根, 吕林兰, 等. 环境激素戊菊酯和有机锡对轮虫生活史特征的影响[J]. 湖泊科学, 2009, 21(5): 687-692.
- [7] Ortells R A, Gómez M S. Coexistence of cryptic rotifer species: ecological and genetic characterisation of *Brachionus plicatilis*[J]. Freshwater Biology, 2003, 48(12): 2194-2202.
- [8] 杨家新, 黄祥飞. 密度和温度对萼花臂尾轮虫产卵量和混交雌体的影响[J]. 湖泊科学, 1996, 8(4): 367-372.
- [9] 席贻龙, 黄祥飞. 萼花臂尾轮虫交配行为和受精作用研究[J]. 生态学报, 2000, 20(4): 541-544.
- [10] Paloheimo J E. Calculation on instantaneous birth rates[J]. Limnology and Oceanography, 1974, 19: 692-694.
- [11] Radix P, Severin G, Schramm K W, et al. Reproduction disturbances of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disruptors[J]. Chemosphere, 2002, 47(10): 1097-1101.
- [12] 杨家新, 黄祥飞. 藻类食物对萼花臂尾轮虫繁殖的影响[J]. 湖泊科学, 1998, 10(1): 42-48.
- [13] Gentile J H, Gentile S M, Hairston N, et al. The use of life-tables for evaluating the chronic toxicity of pollutants to *Mysidopsis bahia*[J]. Hydrobiologia, 1982, 93(1/2): 179-187.
- [14] Boyum K W, Brooks A S. The effect of selenium in water and food on *Daphnia* populations[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1988, 17(5): 555-560.
- [15] Gallardo W G, Hagiwara A, Tomita Y, et al. Effect of some vertebrate and invertebrate hormones on the population growth, mictic female production, and body size of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* Müller[J]. Hydrobiologia, 1997, 358(1/2/3): 113-120.
- [16] Preston B L, Snell T W. Full life-cycle toxicity assessment using rotifer resting egg production: implications for ecological risk assessment[J]. Environmental Pollution, 2001, 114(3): 399-406.
- [17] Ruttner K A. The significance of mating processes for the genetics and for the formation of resting eggs in monogonont rotifers[J]. Hydrobiologia, 1983, 104(1): 181-190.
- [18] Gómez Á, Serra M. Behavioral reproductive isolation among sympatric strains of *Brachionus plicatilis* Müller 1786: insights into the status of this taxonomic species[J]. Hydrobiologia, 1995(1): 111-119.
- [19] Snell T W, Morris P D. Sexual communication in copepods and rotifers[J]. Hydrobiologia, 1993, 255-256(1): 109-116.
- [20] Snell T W, Nacionales M A. Sex pheromone communication in *Brachionus plicatilis* (rotifera)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1990, 97(2): 211-216.
- [21] Larsson P, Dodson S. Chemical communication in planktonic animals[J]. Archiv Fur Hydrobiologie, 1993, 129(2): 129-155.
- [22] Dunham P J. Sex pheromones in crustacean[J]. Biological Reviews, 1978, 53(4): 555-583.