

盐度及保存时间对牙鲆精子活力的影响*

EFFECTS OF SALINITY AND STORING PERIODS ON SPERM MOTILITY OF FLOUNDER, *Paralichthys olivaceus*

王宏田 张培军 徐永立

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

人工授精是鱼类养殖过程中的一项重要技术,获取具有受精能力的精子是这一活动中的重要步骤。环境因子对于海产鱼类精子生理状态的影响国内已有初步研究^[1,2],但环境因子对牙鲆精子的作用还需进一步研究。本实验着重研究了牙鲆精子于室温条件下贮存不同时间后,这些精子在不同盐度条件下的活力,以及室温条件下,于精液中保存了不同时期后的精子在天然海水中(盐度为32)使卵子受精的能力。

1 材料与方法

1.1 精、卵的获取

实验中所用的牙鲆亲鱼取自山东荣成市寻山养鱼场的亲鱼池。卵子和精子系采用人工挤压的方法获得。挤压过程中防止尿液与体表水分对精液的污染。精液贮存于干燥的小烧杯中,上覆滤纸,于室温条件下(17~20℃)保存。

1.2 不同盐度海水的配制

天然海水的盐度为32。实验过程中不同溶液的盐度分别为5,10,15,20,32,40。盐度较天然海水低时,通过向天然海水中添加蒸馏水配制溶液。盐度较天然海水高时,向天然海水中添加粗制海盐配制溶液。使用前不同盐度的溶液皆经滤纸过滤。

1.3 精子活力的观察

参照Morisawa等人1983年描述的方法,略作改动:吸取5μl的精液分别和5ml不同盐度的溶液混合,轻轻摇匀,经过不同时间之后分别吸取1μl的混合液,涂抹于干燥、洁净的载玻片上,在放大100倍的显微镜下观察。能够自由游动的精子占全部精子的百分数即代表精子的活力。

1.4 精子使卵子受精的能力

取150~200个刚从亲鱼生殖腺中挤出的发育良好的卵子,放入500ml的天然海水中,然后吸入1.5ml的精液,轻轻搅匀。在室温中放置15min以后,将

卵子用海水清洗3~5遍,转移到盛有500ml天然海水的烧杯中,于室温条件下培育观察,以细胞卵裂作为受精的标志。受精的卵细胞占全部卵细胞的百分数即代表精子使卵子受精的能力。实验中所用的海水都经过滤纸过滤。

2 结果

2.1 于室温条件下保存1h的精子在不同盐度溶液中的活力

按照“材料与方法”中的描述,将保存了1h的精液与不同盐度的溶液混合,每隔一定的时间观测精子的活力,结果见表1。

表1 在室温条件下保存1h的精子与不同盐度溶液混合一定时间后的活力

盐度	精子活力(%)							
	不同保存时间(min)							
	2	5	10	20	30	40	50	60
5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	1	0	0	0	0	0	0
15	50	90	90	70	40	30	10	4
20	90	95	95	60	40	20	5	1
30	90	99	99	50	30	10	5	1
40	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 于室温条件下保存24h后的精子在不同盐度溶液中的活力

将保存了24h的精子与不同盐度的溶液混匀,每隔一定的时间观测精子的活力。其结果见表2。

* 国家攀登计划B资助项目PDB-6号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第3519号;中国科学院海洋研究所开放研究实验室调查研究报告第229号。
收稿日期:1998-07-06;修回日期:1998-08-28

表 2 在室温下保存了 24 h 后的精子与不同盐度溶液混合一定时间后的活力

盐度	精子活力(%)							
	不同的保存时间(min)							
	2	5	10	20	30	40	50	60
5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	30	40	30	20	15	5	<1	0
20	50	50	40	15	10	<1	0	0
30	50	60	50	20	10	<1	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0

2.3 于室温条件下保存 48 h 后的精子在不同盐度溶液中的活力

将保存了 48 h 的精子与不同盐度的溶液混合,每隔一定的时间观测精子的活力。其结果见表 3。

表 3 在室温中保存 48 h 后的精子与不同盐度溶液混合一定时间后的活力

盐度	精子活力(%)							
	不同的保存时间(min)							
	2	5	10	20	30	40	50	60
5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	30	30	20	15	10	5	<1	0
20	40	50	20	5	2	<1	0	0
30	40	40	30	3	<1	<1	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0

2.4 精子在不同保存时期后使卵子受精的能力

于室温环境中保存了 1, 24, 48 h 后的精液, 分别与一定量的卵子混合, 都能够使部分卵子受精并正常发育。

3 讨论

由实验可知, 牙鲆精子在 15~30 的盐度范围内具有较强的活力。盐度过高或过低, 其活力相对减弱或丧失。由电镜观察可知, 当环境溶液中渗透压剧烈变动时, 精子的细胞膜会发生破裂, 细胞质扩散到周围的溶液中(实验记录)。这可能是精子活力丧失的

重要原因。

进行体外受精的水产动物, 其精子在生殖腺中保持静止状态。据 Morisawa 1980 年报道, 当这些精子与外界环境溶液接触后, 在适宜的外界条件的作用下, 能够在环境溶液中自由游动。这一过程称之为精子的激活。虽然其中的分子机制尚未完全搞清^[3], 但从实验观察得知, 这一激活过程需要一定的时间, 这可能与不同的精子处于不同的生理状态有关。精子游动的过程是一个消耗能量的过程。随着能量的消耗, 精子的活力也逐渐丧失。因此, 在同一种溶液中贮存了不同时间的精子, 其活力逐渐减弱。实验过程中发现, 不同盐度条件下精子的游动速度不同, 这意味着其能量的消耗速率并不完全相同, 因而其游动的持续时间也不同。显微镜下可以观察到, 在与外界环境溶液相混合之前, 精液中的精子虽然不能够自由游动, 但有些精子保持一种剧烈的振动状态。这种形式的运动, 同样需要消耗能量。这可能是精子在精液中经过不同的贮存期之后, 其活力逐渐减弱的原因之一。

实验过程中观察到, 在某些盐度条件下, 贮存了 60 min 后, 仍有精子能够自由游动, 但其游动速度明显减慢。这一观测结果难以表明牙鲆精子能够持续游动 1 h, 因为尚没有确切的实验证明所有的牙鲆精子都是在同一时刻被激活的。

实验表明, 牙鲆精子在室温条件下保存 24, 48 h 以后, 仍然具有使卵子受精的能力。大部分受精卵能够正常发育和孵化, 孵化的仔鱼能够正常生长, 直至卵黄被完全吸收(实验记录)。受精过程是一个复杂的过程, 对于大多数进行单精受精的动物而言, 虽然最终只有一个精子与卵子相融合, 但是仍然需要有足够多的具有活力的精子与卵子相接触。实验过程中, 经过不同贮存期以后的精子使卵子受精的效率不同, 这一方面由卵子的生理状态所决定, 另一方面受精子的活力不同所影响。这一实验结果无疑对生产实践具有指导意义, 但精液的贮存时间与受精率之间的定量关系, 还需进一步实验阐明。

参考文献

- 1 洪万树等. 海洋科学, 1997, 3: 64~65
- 2 王宏田、张培军. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 233~237
- 3 Shaoji Oda, et al. . *Develop. Growth Differ.*, 1995, 37: 257~261