

四倍体与二倍体太平洋牡蛎离体精子的存活能力比较

施坤涛, 王昭萍, 于瑞海

(中国海洋大学 水产学院, 山东青岛, 266003)

摘要: 在不同海水温度和不同精子密度条件下对四倍体(4n)与二倍体(2n)太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)离体精子的存活能力进行了比较。结果表明, 四倍体与二倍体太平洋牡蛎精子的存活时间均随水温的升高和密度的降低而缩短, 四倍体牡蛎精子的存活能力低于二倍体。四倍体牡蛎精子在海水温度 10℃可存活 8 h, 在 28℃仅存活 2 h; 二倍体牡蛎精子在 10℃可存活 12 h, 在 28℃仅存活 4 h。四倍体牡蛎精子在较高密度(6.4×10^7 个/mL)下可存活 8 h, 较低密度(2.0×10^6 个/mL)下低于 1 h; 在与四倍体牡蛎精子相同的高、低密度下, 二倍体存活时间分别超过 10 h 和 1 h。

关键词: 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg); 四倍体; 二倍体; 精子; 存活

中图分类号: S968.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)04-0052-05

在贝类苗种生产及育种过程中, 高质量的精子是重要的一环。目前, 关于贝类精子对环境耐受性以及精子的保存研究已有一些报道。喻达辉等^[1]报道了激活合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)精子的一些因子, 李霞等^[2]报道了环境因子如 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} 以及蔗糖, pH, 氨海水对皱纹盘鲍(*Haliotis discus* Hannai) 和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg) 精子运动及受精率的影响。对贝类精子的保存目前主要进行了超低温保存研究, 开展了马氏珠母贝^[3], 虾夷扇贝^[4], 栉孔扇贝^[4-5], 杂交鲍^[6], 太平洋牡蛎^[7] 等精子的超低温保存工作, 并对抗冻液密度、降温速度、解冻速度、冻精样品体积等因素进行了研究。

关于温度和贝类精子密度变化对贝类精子的存活影响仅见于二倍体太平洋牡蛎^[8], 对多倍体贝类精子存活能力的研究还未见报道。作者以诱导产生的四倍体太平洋牡蛎为研究对象, 探讨了海水温度和精子密度两种因素的变化对精子存活能力的影响, 并与二倍体对照组进行了比较, 以期多倍体育种生物学提供基础资料, 为多倍体育种应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验用四倍体太平洋牡蛎是 2003 年通过三倍体牡蛎产生的卵子与二倍体牡蛎的精子受精后利用细胞松弛素 B(CB)抑制受精卵第一极体释放获得的 2 龄贝, 平均壳长 4.62 cm, 肥满度 20.2%; 对照组二倍体太平洋牡蛎精子是取自山东荣成桑沟湾的 2 龄贝, 平均壳长 10.57 cm, 肥满度 22.17%。四倍体与二倍体牡蛎的倍性均在实验前经过流式细胞仪检测确定(图 1)。

1.2 精液制备

将实验用的四倍体与二倍体牡蛎分别剖去右壳, 露出软体部。取少量性腺物质在显微镜下鉴别雌雄, 弃雌留雄。选取精子活力较好的雄贝, 先用过滤海水将性腺清洗干净, 通过滴管的吹打使精子脱落制成精液。然后通过血球计数板测量四倍体与二倍体对照组的精子浓度, 并将二者调至相同密度。

1.3 不同温度下精子的存活情况观察

实验共设 4 个温度梯度: 10, 16, 22, 28℃(温度浮动范围 $\pm 1^\circ C$)。将密度相同的四倍体与二倍体牡蛎的精液分盛于 10 mL 的玻璃瓶中, 在不同温度下存放, 每隔 0.5~2 h, 取样观察不同温度下精子的存活情况。每个梯度设 3 个重复。

1.4 不同密度下精子的存活情况观察

取部分按 1.2 方法制成的四倍体与二倍体对照组的精液, 加入过滤海水等比例分别稀释至原密度的 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 后, 在 16℃条件下存放, 每隔 0.5~2 h, 取样观察不同密度下精子的存活情况。每个梯度设 3 个重复。

1.5 精子存活的确 定标准

实验中, 以精子是否活动作为精子存活的判断标准。若显微镜下观察精子停止活动则认为精子死亡。

收稿日期: 2005-11-08; 修回日期: 2006-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771662); 国家 863 计划项目(2006AA10A401); 国家科技基础条件平台项目(2005DKA30470)

作者简介: 施坤涛(1978-), 男, 山东莱州人, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖。E-mail: shikuntao@sohu.com; 王昭萍, 通讯作者, E-mail: zpwang@ouc.edu.cn

1.6 数据分析

采用 SPSS 统计分析软件中的独立样本 *T* 检验

(Independent Samples T-test) 对二倍体与四倍体的存活能力进行差异显著性分析。

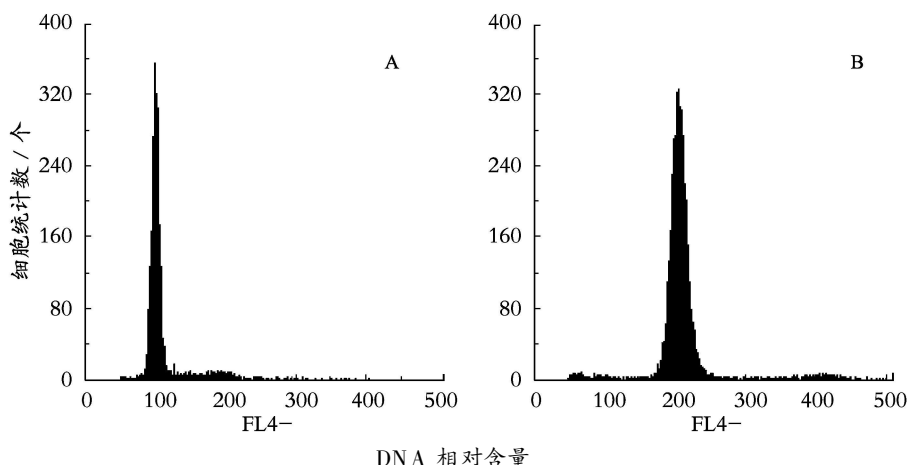


图 1 流式细胞术对太平洋牡蛎倍性的检测结果

Fig. 1 Ploidy verification of *C. gigas* samples by flow cytometry

A. 二倍体 B. 四倍体

A. diploids B. tetraploids

2 结果

2.1 不同海水温度条件下四倍体与二倍体太平洋牡蛎精子的存活情况

表 1 中列出了不同海水温度下二倍体与四倍体牡蛎精子的存活时间和存活率。结果表明, 四倍体太平洋牡蛎的精子与二倍体对照组精子一样, 存活率均随海水温度的增加而降低。10℃条件下, 四倍体牡蛎的精子能存活 8 h, 二倍体可存活 12 h; 随着海水温度的增高, 精子的存活时间明显缩短, 四倍体牡蛎的精子在 28℃条件下仅能存活 2 h, 而对照组可存活至 4 h。但四倍体的精子存活时间低于二倍体对照组精子的存活时间, 一般比对照组精子的存活时间短 2 h 左右。

各海水温度条件下, 在短时间内(0.5 h)二倍体与四倍体精子的存活率差异不明显, 四倍体牡蛎的精子在 10℃条件下离体 0.5 h 时的存活率高达 95.2%, 而在 28℃条件下存活率仅 65.3%; 二倍体太平洋牡蛎精子在 0.5 h 时 10℃存活率为 94.6%, 在 28℃状态下是 70.5%。但随着时间的延长及温度的升高二者存活率出现显著差异, 四倍体的精子存活能力明显低于二倍体对照组($P < 0.05$)。10℃条件下, 离体 6 h 后, 四倍体的精子存活率降低为 27.5%, 明显低于二倍体对照组的 50.4% ($P <$

0.05); 而在 28℃较高海水温度条件下, 仅 1 h 后, 四倍体的精子存活率降低为 25.5%, 明显低于对照组的 50.1% ($P < 0.05$)。

表 1 不同海水温度下四倍体与二倍体太平洋牡蛎精子的存活情况

Tab. 1 Survival rate of tetraploid and diploid sperms at different temperatures

存活时间(h)	精子存活率(%)							
	10℃		16℃		22℃		28℃	
	2n	4n	2n	4n	2n	4n	2n	4n
0.5	94.6	95.2	91.7	90.4	82.4	80.1	70.5	65.3
1	87.7	84.3	80.4	78.4	67.6	56.2	50.1	25.5
2	75.8	66.7	71.6	54.8	41.5	33.7	35.4	6.4
4	63.3	49.4	59.2	32.9	20.5	13.9	5.4	0
6	50.4	27.5	43.3	12.7	7.6	0	0	
8	42.1	10.1	33.3	3.4	0			
10	25.2	0	11.2	0				
12	7.5		0					
13	0							

注: 精子密度 $V_0 = 2.5 \times 10^7$ 个/mL

2.2 不同密度条件下四倍体与二倍体太平洋牡蛎精子的存活情况

海水温度($T = 16^\circ\text{C}$)一定时, 不同密度条件下四倍体与二倍体太平洋牡蛎精子的存活情况见表 2。

四倍体牡蛎精子存活时间与二倍体对照组一样,均随着精液密度的增高而延长;较高密度状态下精子最长可维持 8~10 h 的生命力,较低密度状态下仅为 1~2 h。

在初始密度 $V_0 = 6.4 \times 10^7$ 个/mL 时,四倍体牡蛎的精子离体 0.5 h 后的存活率为 91.2%,稀释 32 倍即 2.0×10^6 个/mL 时四倍体的 0.5 h 存活率仅为 25.5%,二倍体对照组的存活率则分别为 94.5% 和

26.7%,二倍体与四倍体间差异不明显 ($P > 0.05$)。

随着精子密度的降低,四倍体与二倍体精子存活能力的差异也越来越明显。在较高密度状态下 ($V_0 = 6.4 \times 10^7$ 个/mL) 4 h 后才出现明显差异,但在密度稀释至 $1/8 V_0$ 时,仅 1 h 后四倍体的精子存活率就降低为 25.3%,明显低于对照组的 55.6% ($P < 0.05$)。

表 2 不同密度下四倍体与二倍体太平洋牡蛎精子的存活情况

Tab. 2 Survival rate of tetraploid and diploid sperms in different densities

存活时间(h)	精子存活率(%)											
	V_0		$1/2 V_0$		$1/4 V_0$		$1/8 V_0$		$1/16 V_0$		$1/32 V_0$	
	2n	4n	2n	4n	2n	4n	2n	4n	2n	4n	2n	4n
0.5	94.5	91.2	85.6	85.4	77.8	67.3	70.1	50.1	56.4	32.3	26.7	25.5
1	86.6	79.3	71.4	70.6	60.7	47.7	55.6	25.3	23.5	9.5	4.6	0
2	70.8	68.7	50.5	54.5	44.5	26.8	30.4	3.6	5.1	0	0	
4	56.4	47.8	24.6	25.7	21.8	7.2	9.5	0	0			
6	42.3	31.8	9.9	8.6	7.4	0	0					
8	32.5	11.2	0	0	0							
10	12.4	0										
11	0											

注: $V_0 = 6.4 \times 10^7$ 个/mL

3 讨论

3.1 海水温度对精子存活的影响

贝类的精卵排出体外接触海水后,在相当一段时间内能够存活并具有受精能力,其存活时间与受精能力的高低受环境因子的影响较大,海水环境中的 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} 以及蔗糖、pH、氨海水、温度等因子对皱纹盘鲍^[2]和太平洋牡蛎^[2,8]精子活力及受精能力都有一定的影响,而海水温度是影响精卵存活能力的主要环境因子。海水温度低时,精卵存活时间较长,海水温度高时,则存活时间较短^[3]。当海水温度低于 $16^\circ C$ 时,紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 的卵子排入海水后,经 16 h 仍有受精能力,在 $4^\circ C$ 以下受精能力可延长至 30 h^[8];在超低温状态下,贝类的精子可长期保存并保持一定的活力^[3~6]。

王昭萍等^[9]研究认为,海水温度的变化能影响

太平洋牡蛎精子的存活时间与受精能力,精子的存活能力与受精能力随海水温度的增高而降低。本研究中,对四倍体与二倍体太平洋牡蛎的精子存活能力的研究都得到了相同的结果。在较低海水温度 ($10^\circ C$) 条件下,精子离体后较长时间(3 h)内都很活跃,并能维持生命力 10~12 h;但在较高温 ($28^\circ C$) 条件下,精子仅在 0.5 h 内保持活跃,并在 4~6 h 内全部死亡。

海水温度对精子活力的影响可能是通过海水温度变化对精子动力酶的影响而实现的。太平洋牡蛎的精子是由头部、颈部与尾部三部分组成^[10],精子运动所需能量主要由颈部的线粒体提供,四倍体与二倍体的线粒体一般为 4 个,少数四倍体为 5 个。精子运动时,通过鞭毛中的 9 个二联管上的动力蛋白臂上的 ATP 酶的不断水解使鞭毛产生运动^[11]。而酶的活性与海水温度有关,在低温环境中,酶的活性受到抑制,代谢速度较慢,能量消耗少,从而延长了它们的生命。相反在较高海水温度的环境中,酶的

活性强,代谢旺盛,消耗能量较多,可能导致存活时间缩短^[12]。

3.2 密度对精子存活的影响

海水温度一定时,精子密度高低对精子存活能力的影响也很明显,精子的存活能力随着精子密度的降低而降低^[7]。本研究结果也支持了前面的结论。在16℃条件下,精子密度为 6.4×10^7 个/mL时,在2h内精子保持活跃状态,并能维持8~10h的生命力;将精液密度稀释32倍,精子密度降低为 2.0×10^6 个/mL时,精子仅在0.5h内保持较活跃状态,0.5h后大部分死亡。

精子密度对精子的存活能力可能存在两方面的影响:其一,精子在较高密度条件下,由于活动空间狭小,限制了精子的活动范围和幅度,从而降低了能量消耗,使其生命得以延长。其二,可能是由于高密度精子的呼吸作用产生的CO₂使得精液呈现弱酸性,在酸性环境中,精子受到麻醉,降低了代谢率和活动力,能量消耗减弱,相对延长了精子的寿命^[13]。反之弱碱性环境能够提高精子的活力,使精子在短时间内盲目地消耗了大量能量,导致精子的寿命相对缩短,而在此状态下的精子即便再接触卵表面,也会因为过早地消耗能量而无法穿越卵膜入卵,最终则会导致受精的失败^[10]。

3.3 引起四倍体与二倍体精子活力差异的可能原因

本研究中,在不同海水温度与密度条件下,四倍体与二倍体太平洋牡蛎精子的存活能力都存在着明显的差异,且海水温度越高、密度越低,二者之间的差异出现的越早,差异越明显。一般来说,四倍体的存活时间比二倍体缩短2h左右。

四倍体牡蛎的精子存活能力明显低于二倍体对照组,这可能是由于四倍体精子的巨态现象造成的。四倍体牡蛎由于染色体组的加倍而产生了细胞的巨态现象,其产生的成熟精子体积明显增大,顶体长 $1.02 \mu\text{m} \pm 0.06 \mu\text{m}$,核径 $1.93 \mu\text{m} \pm 0.08 \mu\text{m}$,明显大于二倍体的顶体长 $0.88 \mu\text{m} \pm 0.08 \mu\text{m}$ 和核径 $1.67 \mu\text{m} \pm 0.11 \mu\text{m}$,但四倍体的线粒体直径为 $0.76 \mu\text{m} \pm 0.12 \mu\text{m}$,与二倍体线粒体(直径 $0.73 \mu\text{m} \pm 0.17 \mu\text{m}$)差异不显著^[11]。四倍体牡蛎体积明显增大的精子在活动时要比体积较小的二倍体的精子

消耗更多的能量才能维持正常的活动,但提供能量的线粒体在四倍体中却没有任何优势,其大小与二倍体的没有明显的差异($P > 0.05$)^[11,14]其提供的能量可能与二倍体也无明显差异。在能量供应相似条件下,四倍体的精子进行同样的活动量却要消耗更多的能量,从而可能导致其维持生命力的时间大大缩短。有关四倍体贝类生理生化方面的研究还是一片空白,今后还需要做进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 喻达辉,江世贵,陈竟春,等.合浦珠母贝精子激活的离子选择性[J].中国水产科学,1999,6(3):10F-103.
- [2] 李霞,刘淑范,康蕾,等.环境因子对鲍和牡蛎精子运动能力及受精率的影响[J].大连水产学院学报,2002,17(1):27-30.
- [3] 余祥勇,王梅芳,陈钢荣,等.马氏珠母贝精子低温保存主要影响因素的研究[J].华南农业大学学报,2005,26(3):96-99.
- [4] 杨爱国,王清印,孔杰,等.扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究[J].海洋与湖沼,1999,30(6):623-628.
- [5] 李纯,李军,薛钦昭,等.栉孔扇贝精子的超低温保存研究[J].海洋水产研究,2000,21(1):57-62.
- [6] Kurokura N K, Ishikawa T. Lesions of spermatozoa by cryopreservation in oyster[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56: 1 803-1 806.
- [7] 李云,王品虹,贺贵珍,等.太平洋牡蛎精液的超低温保存[J].青岛海洋大学学报,2002,32(2):207-211.
- [8] 王昭萍,王如才,郑小东,等.长牡蛎剥离精卵的存活时间及受精能力[J].海洋科学,1997,1:5-6.
- [9] 王如才,王昭萍,张建中.海水贝类养殖学[M].青岛:青岛海洋大学出版社,2000.1-8.
- [10] 陈大元.受精生物学[M].北京:科学出版社,2000.1-8.
- [11] 孔令锋.多倍体太平洋牡蛎组织学与生化研究[D].中国海洋大学博士研究生学位论文,2004.36-37.
- [12] 赵守城.鱼类精子运动机制剖析[J].河北渔业,1996,91(6):9-10.
- [13] 陈松林,刘贤亭,鲁大椿,等.家鱼精液的激活、受精方法的研究[J].水产学报,1992,16(4):337-345.
- [14] Akira K K, Wada K T. Ultrastructure of spermatozoa from induced triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Aquaculture*, 1994, 123: 217-222.

Comparison on survival time of spermatozoon between diploid and tetraploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg

SHI Kun tao, WANG Zhao-ping, YU Rui-hai

(Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Nov., 8, 2005

Key words: *Crassostrea gigas*; tetraploid; diploid; sperm; survival

Abstract: The survival capacity of sperm from diploid (2n) and tetraploid (4n) Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* in different temperatures and densities was compared in this study. The results showed that survival time of sperm from both 2n and 4n shortened with the increased temperatures and reduced densities. The survival capacity of sperm from 4n was lower than that from 2n. Sperm from 4n could survive 8 h at 10 °C and 2 h at 28 °C, respectively, but the sperm from 2n can survive 12 h at 10 °C and 4 h at 28 °C, respectively, but only 8 h and 2 h could the sperm from 4n survive at both temperatures. For the sperm from 4n, the survival time was about 8h in high density(6.4×10^7 cells/mL) and less than 1h in low density(2.0×10^6 cells/mL). However the sperm from 2n could survive more than 10h in high density and more than 1h in low density.