

温度和盐度对马氏珠母贝精子激活率及活力的影响

王 辉, 罗明明, 朱晓闻, 吕文刚, 李艳红, 王亚男, 刘志刚

(广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 采用中心组合试验设计(CCD)和响应曲面法, 在实验室条件下研究温度(T)、盐度(S)对马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)精子激活率及活力的影响并建立了模型。实验设置的温度范围为 15~45℃, 盐度范围为 12~48。结果表明, 马氏珠母贝精子激活率与活力随着温度、盐度的升高呈先升高后降低的趋势; 盐度的一次效应和二次效应以及温度的二次效应对精子激活及活力的影响极显著($P < 0.01$), 温度和温盐的互作效应对精子激活率及活力的影响不显著($P > 0.05$); 保持马氏珠母贝精子激活率较高时的温度为 26~31℃, 盐度为 25~30; 保持马氏珠母贝精子活力较大时的温度为 24~35℃, 盐度为 22~30; 实验建立了温度和盐度对马氏珠母贝精子激活率及活力影响的模型, 通过模型同时优化得出温度 30.04℃, 盐度为 26.86 时, 马氏珠母贝精子激活率最高、活力最大, 分别为 85.51% 和 57.82%。

关键词: 马氏珠母贝(*Pinctada martensii*); 精子激活; 活力; 响应曲面; 优化

中图分类号: Q28

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)10-0057-07

马氏珠母贝(*Pinctada martensii*), 又称合浦珠母贝, 系海产软体动物, 隶属瓣鳃纲, 异柱目, 珠母贝科, 是生产海水珍珠的主要贝类, 在我国主要分布在广西、广东和台湾海峡南部沿海一带。目前, 人工养殖的马氏珠母贝在育种和生产中多采用解剖法受精^[1]。

精子活力指精子群体的运动状况, 包括精子激活与抑制、运动精子占精子总数的比例(激活比例)、精子运动激烈程度及运动时间等^[2], 它是影响精子的质量和受精能力的主要因素之一, 通常活力高的精子其受精能力也强^[3]。人工解剖获得的马氏珠母贝精子在自然海水中是没有活性的, 需要一定浓度的氨海水来激活^[4]。精子激活过程中的精子激活率与活力除由亲本的年龄、大小、健康状况、性腺成熟程度等内因决定外, 精子所处水环境的理化因子如温度、盐度、pH、渗透压、离子等也均是影响精子激活率与活力的重要外界因素^[5]。因此, 精子在最适宜的环境条件下被激活将提高受精率和保证胚胎的质量, 研究环境因子对精子激活率与活力的影响具有重要意义。

目前国内外马氏珠母贝的人工授精和养殖技术已经有了很大的发展^[6], 日本学者 Ohta 等^[7]研究了不同氨浓度对于马氏珠母贝受精率的影响; Narita 等^[8-9]研究了冷冻精子和新鲜精子对受精率的

影响以及不同浓度精、卵数量对马氏珠母贝受精率的影响; 喻达辉等^[10-12]研究了海水中离子对马氏珠母贝精子激活机制和离子选择性并对马氏珠母贝精子的实验生物学进行研究; 沈亦平等^[13-14]对马氏珠母贝配子发生和受精进行了细胞学观察。虽然喻达辉^[11]在合浦珠母贝精子的实验生物学初步研究中, 分别观察了海水盐度、pH、温度和激素对合浦珠母贝精子的激活及运动情况的影响, 但其并未考察温度和盐度的联合效应, 没有建立模型。因此笔者运用中心组合实验设计并结合响应曲面分析的方法, 以精子的激活率和活力为目标考察了温度、盐度对它们的联合效应, 建立有效的数学模型, 并且优化了实验条件, 确定了最佳的精子活力温度、盐度条件, 进一步为马氏珠母贝人工受精提供理论指导。

收稿日期: 2011-06-25; 修回日期: 2011-07-23

基金项目: 广东省高校热带海产无脊椎动物养殖工程研究中心科研项目(GCZX-A0909); 国家科技支撑计划项目(2007BAD29B01); 农业部公益性行业(农业)科研专项子课题(nyhyzx07-047); 广东省重大科技兴海(兴渔)项目(A200708C01)

作者简介: 王辉(1966-), 男, 教授, 从事水产动物遗传育种与养殖教学研究, 电话: 13828289001, E-mail: whh524@sina.com; 刘志刚, 通信作者, E-mail: liuzg@gdou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料来源

实验用贝取自于广东省湛江市银浪生物技术公司珍珠贝养殖场, 选择性腺饱满、无病害、无损伤, 同一批次养殖的雄贝, 运回后置于 135 L 塑料水箱中暂养, 恒温棒控制温度在 25 ± 0.5 , 盐度

28 ~ 30, 24 h 充气, 每天投喂适量的金藻、扁藻和小球藻, 每两天换水一次。

1.2 实验设计与数据分析

实验采用中心组合实验设计(CCD, 见表 1), 温度(T)、盐度(S)范围的确定是在参考有关研究和预实验的基础上确定的。其中温度范围为 15 ~ 45, 盐度范围为 12 ~ 48。实验设计因子数两个(温度、盐度),

表 1 试验设计和结果

Tab. 1 Experiment design and results

组合	编码		实际		激活率 (%)	运动能力 (%)
	T	S	T ()	S		
1	0	1.414	30.0	48.0	0.00	0.00
2	0	0	30.0	30.0	88.40	57.75
3	0	0	30.0	30.0	85.20	56.01
4	0	0	30.0	30.0	80.60	59.90
5	0	0	30.0	30.0	80.20	54.73
6	-1	-1	19.4	17.3	37.60	31.23
7	0	1.414	30.0	48.0	0.00	0.00
8	0	0	30.0	30.0	82.60	53.14
9	0	0	30.0	30.0	85.40	56.39
10	0	0	30.0	30.0	84.40	55.49
11	-1	-1	19.4	17.3	38.60	30.83
12	0	-1.414	30.0	12.0	33.00	30.82
13	-1.414	0	15.0	30.0	58.20	31.86
14	1	-1	40.6	17.3	38.90	30.62
15	1	1	40.6	42.7	0.20	0.00
16	1.414	0	45.0	30.0	49.80	41.41
17	-1	1	19.4	42.7	0.54	0.00
18	-1	1	19.4	42.7	0.46	0.00
19	1	-1	40.6	17.3	39.60	29.92
20	-1.414	0	15.0	30.0	54.60	36.89
21	0	-1.414	30.0	12.0	35.00	31.57
22	0	0	30.0	30.0	86.20	56.92
23	1.414	0	45.0	30.0	48.60	39.20
24	0	0	30.0	30.0	80.40	55.98
25	1	1	40.6	17.3	0.22	0.00
26	0	0	30.0	30.0	86.00	53.33

轴点 4 个, 中心点 5 个, 因子点 4 个, 星号臂 $\alpha=|1.414|$, 共 26 个实验点以供分析。

采用 SAS 8.2 软件进行统计分析, 以温度、盐度为自变量, 精子激活率和活力为应变量, 拟建立的回归方程通式为:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 S + \beta_{12} T \times S + \beta_{11} T^2 + \beta_{22} S^2 + \varepsilon$$

式中: Y 为精子激活率或精子活力; β_0 、 β_1 、 β_2 、 β_{11} 、

β_{22} 分别代表回归系数; T , T^2 分别代表温度的一次效应和二次效应; S , S^2 分别代表盐度的一次效应和二次效应; $T \times S$ 代表温度和盐度之间的交互作用; ε 为残差。通过方差分析确定回归方程模型及各个实验因素的显著性, 采用决定系数、校正系数、预测系数等检验模型的拟合度, 运用三维响应曲面图和相应的等高线图分析温度和盐度对精子激活率及活

力的影响效应。

1.3 实验步骤及方法

1.3.1 实验组合设置

本实验中,温度的最高值为 45 ,最低值为 15 ;盐度最高值为 48,最低值为 12。高温组合装置由 50 L 白塑料方桶、500 W 石英加热管、1000 W 电子继电器、0~50℃水银触点温度计($\pm 0.1^\circ\text{C}$)、气石等各一件组成,整套装置控温精度为 $\pm 0.1^\circ\text{C}$,所有温度计均经过严格校正。低温组合由人工加冰调控,使温度处于动态平衡,精度控制在 $\pm 0.2^\circ\text{C}$ 。盐度是由经处理后的天然海水、自来水和海水晶调配。实验过程中其他的可控条件如溶氧量、pH、光照等均按该贝正常生长环境设定,其中水中溶氧量控制在大于 3 mg/L, pH 为 7.9~8.4。

1.3.2 精子激活率与活力的测定

将贝洗净,用干毛巾擦干外表,沿上下壳之间的缝隙解剖开,取下生殖腺,用虹吸管吸取精液置于盛有 20 mL 人工海水的烧杯中稀释待用,用 0.5 mL 的移液管吸取稀释精液 0.5 mL 置于已调配好温盐组合的 1 000 mL 烧杯中,计数后,用浓度 $40 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的氨水激活^[15],激活后立即取样在显微镜下观察并记录激活的精子数量,精子快速运动时间,精子运动总时间。精子快速运动时间是指从精液与激活液相混合开始,到约 70%运动精子转入缓慢运动为止的时间;总运动时间是指从精液与激活液相混合开始,到视野中约 90%的精子停止运动为止的时间。为减少实验误差,精子取自 5 个不同雄贝混合,实验数据观察 3 次求平均值。精子激活率以显微镜下同一视野中的活动精子百分比表示,观测 3~5 个视野取其平均值,计算公式为:精子激活率(%)=激活的精子数量/总精子数量 $\times 100$ 。精子活力以激烈运动时间及总活动时间表示,计算公式为:精子活力(%)=精子快速运动时间/精子运动总时间 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 模型方程建立及分析

根据系数估计表(表 3 和表 5),采用非编码处理后的精子激活率回归方程(Eq.1)和精子活力回归方程(Eq.2)分别为:

$$\text{激活率} = -241.06 + 10.33T + 12.68S - 0.003T \times S -$$

$$0.17T^2 - 0.23S^2$$

$$\text{精子活力} = -138.79 + 6.50T + 7.43S + 0.0014T \times S - 0.11T^2 - 0.14S^2$$

(模型方程 Eq.1 和 Eq.2 中, T 代表温度, S 代表盐度)

对模型方程 Eq.1 和 Eq.2 进行方差分析所得 F 值和 P 值列于表 2 和表 4。从表中可以看出两个模型方程均是显著的($P < 0.01$),模型方程 Eq.1 和 Eq.2 中自变量 S 、 T^2 、 S^2 项系数均在 0.01 水平上极显著($P < 0.01$), T 、 $T \times S$ 项的系数不显著($P > 0.05$)。这些条件充分说明温度和盐度对精子的激活都有一定的影响,但盐度的影响效应较温度明显,温度对精子激活的影响成平方的关系,这说明两个因子在以平方水平上变化时对实验结果的影响会越发的显著。

虽然表 2 和表 4 显示出精子激活率和活力模型方程失拟检验均是显著的($P < 0.01$),但两个模型方程的平方和纯误差的均方较小,表明失拟平方和中除试验误差较小之外,其他条件因素及其交互作用的影响也较小,所以模型拟合度较高。又因模型方程 Eq.1 和 Eq.2 的决定系数较高,分别是 0.949 和 0.978,同时两个模型方程的校正系数较高,分别是 0.932 和 0.970,所以模型方程的拟合度较高,模型选择较为恰当。

2.2 响应曲面分析与优化

依据回归方程(Eq₁ 和 Eq₂)所作的响应曲面及等高线图(图 1(a-b) 和图 2(a-b))可以评价实验因素对精子激活率的影响效应。通过动态的图形可以确定个因素的最优水平范围,及最优组合点。

2.2.1 精子激活率响应曲面分析及优化

由图 1 可见,等高线图(a)显示当温度在 26~31℃,盐度在 25~30 时,精子激活率最高为 84.2%;

表 2 精子激活率模型方差分析

Tab. 2 Variance analysis for the predicted model of activation rate

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	26281.64	5	5256.33	83.19	< 0.0001
残差	1263.74	20	63.19	—	—
失拟	1181.15	3	393.72	81.04	< 0.0001
纯误差	82.59	17	4.86	—	—

注: 复相关系数 $R^2=0.95$, 校正复相关系数 $Adj. R^2=0.94$, 预测复相关系数 $Pred. R^2=0.91$

表 3 精子激活率回归方程系数的 95%置信区间估计

Tab. 3 The 95% confidence interval of coefficient estimate for the predicted model of Activation rate

因子	系数检验 (Mean±S.D.)	F 值	95% 置信区间		方差膨胀因子
			下限	上限	
Intercept	83.94 (±2.51)	—	78.70	89.18	—
T	-1.165 (±1.99)	0.5642	-5.31	2.98	1
S	-15.59 (±1.99)	< 0.0001	-19.74	-11.45	1
T×S	-0.36 (±2.81)	0.8994	-6.22	5.50	1
T ²	-19.42 (±2.13)	< 0.0001	-23.86	-14.97	1.02
S ²	-37.32 (±2.13)	< 0.0001	-41.76	-32.87	1.02

注: 表中系数估计的值为编码值

表 4 精子活力方差分析表

Tab. 4 Variance analysis for for the predicted model of sperm motility

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	11305.78	5	2261.16	70.24	< 0.0001
残差	643.82	20	32.19		
失拟	591.66	3	197.22	64.27	< 0.0001
纯误差	52.16	17	3.07		

注: 复相关系数 $R^2=0.95$, 校正复相关系数 $Adj. R^2=0.93$, 预测复相关系数 $Pred. R^2=0.89$

表 5 精子活力回归方程系数的 95%置信区间估计

Tab. 5 The 95% confidence interval of coefficient estimate for the predicted model of sperm motility

因子	系数检验 (Mean±S.D.)	F 值	95% 置信区间		方差膨胀因子
			下限	上限	
Intercept	55.96 (±1.79)	—	52.22	59.71	—
T	0.95 (±1.42)	0.5094	-2.01	3.91	1
S	-13.18 (±1.42)	< 0.0001	-16.14	-10.22	1
T×S	0.19 (±2.01)	0.9254	-3.99	4.37	1
T ²	-12.10 (±1.52)	< 0.0001	-15.27	-8.92	1.02
S ²	-22.97 (±1.52)	< 0.0001	-26.14	-19.80	1.02

注: 表中系数估计的值为编码值

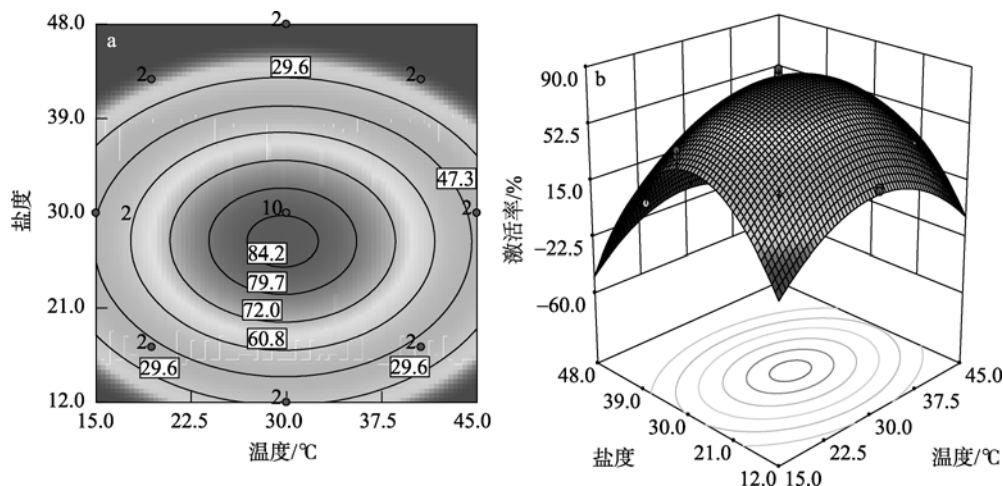


图 1 温度和盐度对马氏珠母贝精子激活率影响的等高线图(a)和响应曲面图(b)

Fig. 1 The effects of temperature and salinity on Activation rate

在温度为 15 ~ 45℃, 盐度为 12 ~ 45 时, 精子都能被激活。响应曲面图(b)可以看出, 图形近似山形, 有最高点, 且通过模型优化, 表明温度为 29.70℃ 盐度为 27.34 时, 为最高点的坐标, 处于此条件下的精子激活率为 85.58%, 其结果的满意度为 97%。

2.2.2 精子活力响应曲面分析及优化

图 2 所示, 等高线图(图 a)显示当温度在 24 ~ 35℃, 盐度在 22 ~ 30 时, 精子活力最大为 56.1%。响应曲面

图(图 b)近似山形, 表明存在最优组合, 对精子活力的单独优化显示, 最优点的温度盐度组合为 30.39℃ 和 26.35, 精子活力为 57.87%, 满意度为 97%。

2.2.3 优化结果

对实验条件的单独优化和同时优化结果列于表 6, 同时优化结果最佳的温度和盐度组合为 30.04℃ 和 26.86, 此条件下, 精子的激活率为 85.51%, 精子的活力为 57.82%。满意度为 97%。

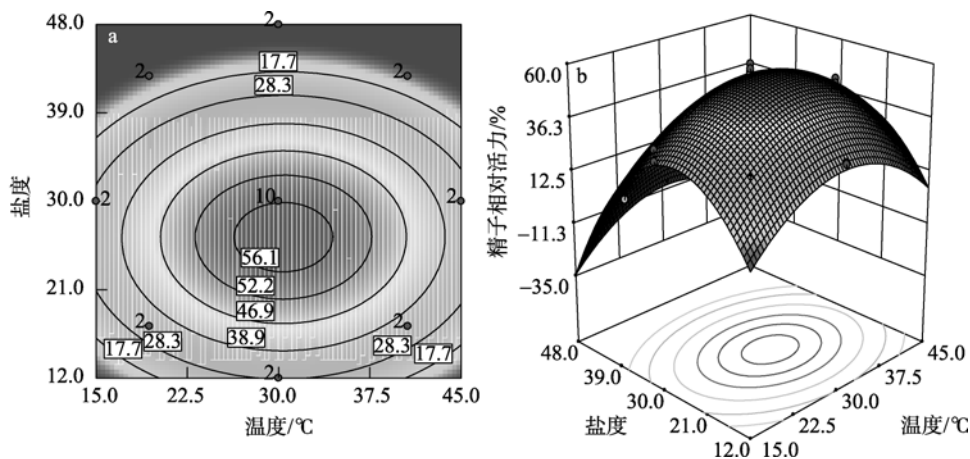


图 2 温度和盐度对马氏珠母贝精子激活率影响的等高线图(a)和响应曲面图(b)

Fig. 2 The effects of temperature and salinity on sperm motility

表 6 模型同时优化和单独优化

Tab. 6 Simultaneous and individual optimization for the two responses

优化类型	响应(%)	最优值(%)	最优组合		95%置信区间		满意度(%)
			温度(°C)	盐度	下限	上限	
单独优化	AR	85.58	29.70	27.34	80.38	90.79	97
	SRM	57.87	30.39	26.35	54.18	61.56	97

同时优化	AR	85.51	30.04	26.86	80.33	90.72	97
	SRM	57.82			54.11	61.52	

3 讨论

3.1 温度盐度和精子激活及活力

精子活力的高低直接关系着马氏珠母贝受精率的高低,进而影响着马氏珠母贝育苗产量的高低。高活力的精子运动能力强,与卵子结合迅速,与卵子融为一体的时间短,所以受精率较高。经过实验发现,在不同温度、盐度下,以精子的激活率和活力为目标考察精子受精能力时,盐度的一次效应和二次效应对马氏珠母贝精子激活率和活力的影响极显著($P<0.01$),这表明盐度增加时,激活率和活力也增加,但当盐度增加超过一定值时,激活率和活力反而下降,盐度存在最适盐度,这与王如才等^[16],喻达辉等^[11]对马氏珠母贝的研究结果一致。他们的研究指出合浦珠母贝精子在盐度为 10 的条件下几乎不能被激活,盐度 15 时激活率仅为 5%,盐度在 25~45 范围内时激活率达到 80%以上,盐度为 30 时激活率最高。本实验根据模型优化结果,盐度在 27.34 时,精子的激活率最高,比喻达辉等^[11]研究的结果(30)要低,这可能是实验研究因子数量不同,亲贝性腺发育时所在海区不同^[17-18]引起的。本实验中盐度在 12~45 的范围内变动时,马氏珠母贝的精子均能被激活,但高盐端比低盐端的激活率要高些,这可能是因为海水经济动物类的精子是通常在高渗透压溶液中运动,活动能力最强时的环境渗透压高于精子本身的渗透压^[19-20], Na^+ 和 Cl^- 是精子激活中最重要的离子^[12],而海水的主要成分是氯化钠(NaCl),高盐端 Na^+ 和 Cl^- 充足,精子激活率就高。不同贝类精子激活的盐度也有差异,泥蚶精子激活的最适盐度为 25^[21],比马氏珠母贝最适盐度要低,这是因为泥蚶属于滩涂养殖,环境使其适应低盐,而马氏珠母贝是一种外海性贝类,适宜范围要相对偏高^[16]。

实验结果显示温度的一次效应对马氏珠母贝精子激活率和活力影响不显著,但二次效应极显著($P<0.01$),这表明温度在一定范围内对精子激活率和活力影响很小,但是存在最佳温度使得激活率和活力最大。潘德博等^[22],谢刚等^[23]认为,温度与精子快速运动时间的关系是一个开口向下的二次曲线函数关系。在鱼类相关研究中 Schlenk 等^[24], Sayyed 等^[25],

Billard 等^[26]指出温度主要影响精子激活时的能量分配,高温激活时精子消耗高过的能量,出现瞬时激活即死亡,低温精子激活率相对较低但运动时间和存活时间较长因其消耗能量较少。马氏珠母贝属于广温性海洋贝类,在本实验设置的温度范围内均能被激活,但在高温和低温极限时激活率和活力都很小,这与以上结论一致。合浦珠母贝繁殖盛期的自然水温为 25~29℃,受精和胚胎发育的最适水温为 27~29℃^[16],与精子激活的最适温度(25~30℃)相一致^[27];这与本实验得出的温度 30℃左右时精子的激活率和活力达到最大值的结果相吻合,说明精子激活和活力与亲贝的自然生长环境有密切关系。

本实验显示温度和盐度的互作效应对马氏珠母贝精子激活率和活力的影响不显著,这表明温度盐度在一定范围内互作效应极小或不存在互作关系。笔者推论在一定范围内,温度和盐度同时增减对马氏珠母贝受精率和孵化率的影响并不显著,只有在温度和盐度或其中一个接近极限范围时,温、盐的复合影响才显示出明显的关联,当两者之一处在安全范围内,则不存在明显的互作关系。马氏珠母贝属于广温广盐性海洋贝类,其适应的温盐度范围较广,因此在适宜的温度范围内,对盐度的耐受范围大,在适宜的盐度范围内,对温度的耐受性也大。这与本实验结果是相吻合的。

3.2 模型的建立

通过响应曲面法和等高线图分析,以及对模型的显著性检验,证明本实验以温度盐度为因变量建立的二次方程模型是有效的,温度和盐度的二次方都呈显著影响水平,表明它们存在峰值,有最适温盐度组合。在实际生产中将温度盐度控制在其适宜范围,能够较大提高受精率,反之,在已知温度盐度的情况下,亦可根据模型推算其受精率,这对指导实际生产有重要意义。

温度和盐度为影响贝类胚胎发育、幼虫生长及成贝生长最为重要的环境因子,但是海洋环境变化中还有许多其他的生态因子会对贝类生长产生重要影响,许多因子在一定的范围内相互之间可能存在互作关系,所以有关生态因子对贝类精子活力和胚胎、幼虫和成贝生长发育的影响有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 梁飞龙, 马氏珠母贝人工育苗水质控制技术的探讨[J]. 湛江海洋大学学报. 1998, 2(18): 81-83
- [2] 钟爱华. 几种理化因子对厚壳贻贝精子活力的影响[J]. 海洋学研究, 2010, 4(28): 89-94.
- [3] Ohta H, Shinriki Y. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in river sculpin in *Cottus hangiongensis*[J]. *Fish Physiol Biochem*, 1998, 18: 29-35.
- [4] Wada K T. Breeding study of Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. National Research Institute of Aquaculture, 1984, 6: 79-115.
- [5] 阮国良, 冯家斌, 杨代勤. 渗透压、pH 和温度对泥鳅精子活力及受精率的影响[J]. 湖北农学院学报, 2004, 1(24): 22-25.
- [6] Hayashi M, Seko K. Practical technique for artificial propagation of Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. *Bull Fish Res Inst Mie Pref*, 1986, 1: 39-68.
- [7] Hiromi Ohta, Takayuki Kawamoto, Kiyoshi Isowa et al. Motility of spermatozoa obtained from testes of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Fisheries Science*, 2007, 73: 107-111.
- [8] Takayuki K, Teruyoshi N, Kiyoshi I, et al. Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*[J]. *Cryobiology*, 2007, 54: 19-26.
- [9] Teruyoshi N, Takayuki K, Kiyoshi I, et al. Fertility of cryopreserved spermatozoa of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*[J]. *Aquaculture*, 2008, 275: 178-181.
- [10] 喻达辉, 江世贵, 苏天凤, 等. 海水主要离子在合浦珠母贝精子激活中的作用[J]. 海洋学报, 1999, 21(6): 134-137.
- [11] 喻达辉, 陈竞春, 苏天凤, 等. 合浦珠母贝精子的实验生物学初步研究[J]. 热带海洋, 1998, 17(1): 83-87
- [12] 喻达辉, 江世贵, 陈竞春, 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): 101-103.
- [13] 沈亦平, 刘汀, 姜海波, 等. 合浦珠母贝受精细胞学观察[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1993, (5): 115-120.
- [14] 沈亦平, 马丽君, 张锡元, 等. 合浦珠母贝的配子发生[J]. 动物学报, 1992, 38(2): 113-116.
- [15] 金启增. 珍珠贝的种苗生物学[M]. 北京: 海洋出版社, 1992.
- [16] 王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 海洋大学出版社, 1998: 212-223.
- [17] Loosanoff V. Reproductive cycle in *Cyprina islandica*[J]. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, 1953, 104, 146-155.
- [18] 林笔水, 吴天明. 温度、盐度对缢蛏浮游幼虫发育的影响[J]. 生态学报, 1984, 4(4): 385-392.
- [19] Morisawa M, Suzuki K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts[J]. *Science*, 1980, 210: 1145-1146.
- [20] 苏锦祥. 鱼类学与海水养殖[M]. 北京: 中国农业出版社, 1979: 307-323.
- [21] 竺俊全, 丁理法, 焦海峰, 王跃斌. 环境因子变化对泥蚶精子活力的影响[J]. 海洋科学, 2006, 30(2): 65-68.
- [22] 潘德博, 许淑英, 叶星, 等. 广东鲂精子主要生物学特性的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 111-113.
- [23] 谢刚, 叶星, 苏植蓬, 等. 鳊鱼精子的主要生物学特性[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 81-84.
- [24] Schlenk W, Kahmann H. The chemical composition of seminal fluids and their physiological importance study with trout sperm[J]. *Biochem Zool*, 1938, 295: 283-301.
- [25] Sayyed Mohammad Hadi Alavi, Jacky Cosson. Sperm motility in fishes. Effects of temperature and pH: a review[J]. *Cell Biology International*, 2005, 29: 101-110.
- [26] Billard R, Cosson M P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish[J]. *J Exp Biol*, 1992, 261: 122-131.
- [27] 蔡云川, 林黑着, 吴开畅, 等. 解剖采集的珠母贝精子的激活条件[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 9-12.

Effect of temperature and salinity on the sperm activation and motility in *Pinctada fucata martensii* (Dunker)

WANG Hui, LUO Ming-ming, ZHU Xiao-wen, LÜ Wen-gang, LI Yan-hong, WANG Ya-nan, LIU Zhi-gang

(Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received: Jun., 25, 2011

Key words: *Pinctada fucata martensii*; sperm activation; sperm motility; response surface; optimization

Abstract: Central composite circumscribed experimental design and response surface analysis method was employed to study effects of different combinations of temperature and salinity on the sperm activation and relative motility of *Pinctada fucata martensii* (Dunker), and the equation of temperature, salinity and sperm activation rate and motility was established. The temperature was ranging from 15 to 45°C, and the salinity 12 to 48. The sperm activation rate and motility were first increased and then decreased as temperature and salinity increased; The sperm activation rate and motility were significantly affected by the linear and quadratic effects of salinity and quadratic effects of temperature ($P < 0.01$), but The synergistic effect between salinity and temperature was not significant ($P > 0.05$); the suitable temperature and salinity of sperm activation rate were 26~31°C and 25~30, respectively, and of sperm motility were 24~35°C and 22~30, respectively. By means of optimization technique, the optimal point was found at temperature 30.04°C and salinity 26.86. At this optimum point, maximum sperm activation rate and sperm motility were 85.51% and 57.82%, respectively, with the desirability as high as 97%.

(本文编辑: 梁德海)