

# 中华乌塘鳢精子的生物学 特性及其超低温保存

江世贵 苏天凤 喻达辉 陈竞春 周立新  
(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

**摘要** 对中华乌塘鳢精子激活的生理生态学进行了研究, 探讨了中华乌塘鳢精子超低温保存方法。中华乌塘鳢精子激活的适宜盐度为 5~ 15; 其精子的激活不仅与激活溶液盐度有关, 而且与激活溶液的离子成份有关, 激活溶液中  $K^+$  的存在在一定程度上对精子的活动有抑制作用; 中华乌塘鳢精子对 pH 的适应性强, 在 pH 5.5~ 9.5 范围内, 激活率均在 70% 以上, 尤以中性及弱酸性条件下的激活率最高, 在 pH 6.0 时精子活力最好。使用筛选出的精子保存液, 以二甲亚砜(DMSO)为抗冻保护剂, 采用快速冷冻和解冻方法, 成功地进行了中华乌塘鳢精子超低温保存, 解冻后的中华乌塘鳢精子激活率达 90% 以上, 受精率达 80% 以上。

**关键词** 中华乌塘鳢, 精子, 激活, 超低温保存

## The biological characteristics of *Bostrichthys sinensis* spermatozoa and its cryopreservation

Jiang Shigui, Su Tianfeng, Yu Dahui, Chen Jingchun, Zhou Lixin  
(South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510300)

**ABSTRACT** Effect of environmental factors on the activation of spermatozoa of Chinese ocellated sleeper, *Bostrichthys sinensis* (Lac p de), was studied. The optimum activating salinity for the spermatozoa was 5– 15. The activation of the spermatozoa concerned with not only osmosis or salinity, but also with composition of solution. The function of  $K^+$  was represented as a restraining factor to activation and movement of the spermatozoa in the present condition. The spermatozoa had a strong adaptability to the variation of pH, and the activating rates were more than 70% while pH of the activating solution varied from 5.5 to 9.5. The optimum pH of the activating solution was neutral or weak acidity for the spermatozoa, the swimming time of the spermatozoa was the longest when pH was 6.0. The spermatozoa of Chinese ocellated sleeper were cryopreserved successfully by using a simple procedure. Sea water with salinity 40 or a solution containing 1.5% NaCl, 1.5% KCl, 0.25%  $CaCl_2$  and 0.25%  $MgCl_2$ , was practical extender for cryopreservation of Chinese ocellated sleeper spermatozoa. DMSO was an effective cryoprotectant, and its optimum concentration was 10% in this study. The activation rates of the post-thaw spermatozoa were almost as good as the control's, namely fresh spermatozoa, and their fertilization rates were over 80%, approaching the control's.

**KEYWORDS** *Bostrichthys sinensis*, spermatozoa, activation, cryopreservation

中华乌塘鳢 *Bostrichthys sinensis* (Lac p de) 属塘鳢科乌塘鳢属, 在我国广东台山及湛江沿海分布较

多,是华南地区推广养殖的优良品种。由于水环境的各种理化因子都可能不同程度地影响鱼类精子的激活率、活力<sup>[1-6]</sup>,进而影响到体外受精的效果及受精卵的质量,因此,研究环境因子与鱼类精子激活的关系,将有助于人工繁殖技术的发展及精子生物学的深入。鉴于在中华乌塘鳢精子生物学特性研究方面迄今未见报道,作者于1994~1997年开展了有关的研究,并在此基础上进行了中华乌塘鳢精子超低温保存。

## 1 材料与方法

### 1.1 配子获取

实验用鱼捕自广东澄海和台山,雄鱼体重120g以上,雌鱼体重100g以上。用绒毛膜促性腺激素(HCG)催产(雄鱼剂量1000 IU/kg体重,雌鱼剂量加倍)。48 h后取出精巢,置于干净的培养皿中剪碎后用于实验。在人工受精实验前,挤出成熟的卵子于烧杯中备用。

### 1.2 精子激活与活力

将海水、NaCl、KCl分别与蒸馏水混合,配制成不同盐度的激活溶液。取盐度为10的海水,加入氢氧化钠溶液或乙酸来调节pH,配制成不同pH的激活溶液。精子激活及活力观测参考文献[2]的方法,本文中的激活率指激活起始时的活动精子的百分比,精子活动时间是指从激活开始到90%的精子原地颤动止的时间。实验皆重复三次以上。精子激活的温度在25~28℃。

### 1.3 精子超低温保存

将精液样品与稀释液、抗冻剂按一定比例混匀,使精液样品稀释达5~10倍。通过观测精子在不同溶液中的激活与抑制反应,筛选出适宜的保存稀释液。抗冻剂选用二甲亚砜(DMSO),使用的终浓度为10%。样品进入液氮前不经过降温平衡。样品的冷冻与冻精解冻方法参考文献[3]的方法。测定精液样品在保存前后的激活率和受精率(受精率在胚胎发育至原肠期时计算)。

## 2 结果

### 2.1 盐度对中华乌塘鳢精子激活的影响

在盐度为0(淡水)时,中华乌塘鳢精子虽然也能被激活,但激活率低于30%,精子活动时间相对较短;精子激活的适宜盐度为5~15;当激活盐度达40时,精子完全不能被激活(图1)。使用不同盐度的人工海水(含NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、NaHCO<sub>3</sub>等成份)激活中华乌塘鳢精子时,其结果与使用自然海水激活的结果基本一致。

使用同批精子样品,分别在不同盐度的海水、NaCl、KCl溶液中激活,其结果见图2、图3。结果表明,使用NaCl、KCl溶液激活时,其盐度对中华乌塘鳢精子激活的影响的变化规律与用海水激活时的变化规律一致,即适宜盐度为5~15;当激活盐度达35时,中华乌塘鳢精子在海水中还有较高的激活率,但在NaCl、KCl溶液中已不能激活。

在各种相同的盐度条件下,中华乌塘鳢精子在NaCl、KCl溶液中的激活率和活力均低于在海水中的激活率和活力,同时,在KCl溶液中的激活率、活力又低于在NaCl溶液中的结果。

### 2.2 激活溶液的K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>浓度比的变化对中华乌塘鳢精子激活的影响

配制盐度为10的NaCl和KCl溶液,将二者按一定比例(体积比)混合后作为激活溶液,观察激活溶液中K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>浓度比的变化对中华乌塘鳢精子激活的影响,结果表明,当激活溶液中只含有NaCl和KCl两种成分时,精子的激活率、活力低于在海水中的结果,也低于在NaCl溶液中的结果,但略高于在

KCl 溶液中的结果, 只有当 KCl 溶液: NaCl 溶液( 体积比) 高达 4: 1 以上时, 精子的激活率、活力才不再高于在 KCl 溶液中的结果。

### 2.3 pH 对中华乌塘鳢精子激活的影响

当激活溶液盐度在 5~ 15, pH 5. 5~ 9. 5 范围内其精子激活率均在 70% 以上, 在 pH6. 0~ 7. 5 范围, 精子激活率在 90% 以上, 但在 pH 6. 0 时的激活率最高。从精子活力来说, 以 pH 6. 0 时的活力最好; 当 pH 高于 6. 0 时, 随着 pH 的升高, 精子活力逐渐下降; 而当 pH 低于 6. 0 时, 随着 pH 的降低, 精子活力则迅速降低, 到 pH 为 4. 5 时, 精子不能被激活( 图 4)。

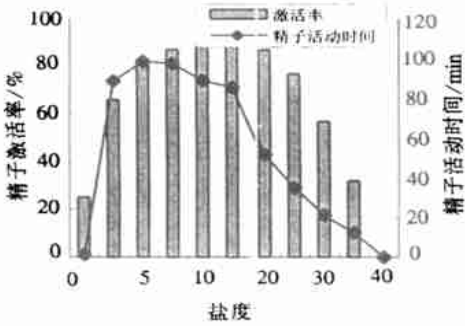


图1 盐度对中华乌塘鳢精子激活的影响

Fig. 1 Effect of salinity of sea water on the activation of spermatozoa of *B. sinensis*

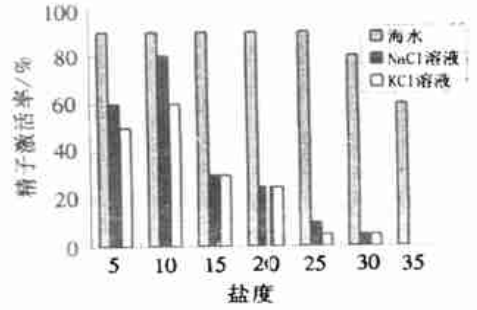


图2 不同盐度的 NaCl、KCl 溶液对中华乌塘鳢精子激活率的影响

Fig. 2 Effect of different salinity of NaCl and KCl solution on the activation rate of spermatozoa of *B. sinensis*

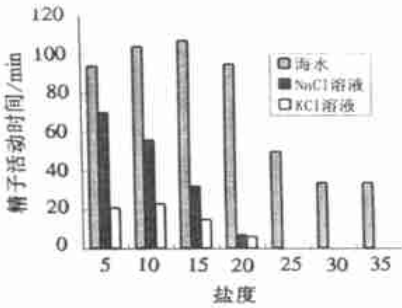


图3 不同盐度的 NaCl、KCl 溶液对中华乌塘鳢精子活力的影响

Fig. 3 Effect of different salinity of NaCl and KCl solution on the motility of spermatozoa of *B. sinensis*

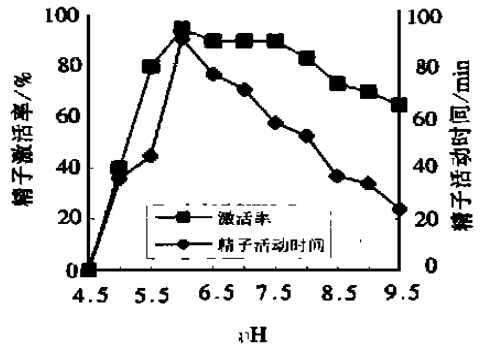


图4 pH 对中华乌塘鳢精子激活的影响

Fig. 4 Effect of pH on the activation of spermatozoa of *B. sinensis*

### 2.4 中华乌塘鳢精子超低温保存

因淡水以及盐度 35 以下的海水( 或人工海水) 能激活或部分激活中华乌塘鳢精子, 因此它们不能作为精子保存稀释液; 当海水盐度为 40 时, 中华乌塘鳢精子完全不被激活, 因而盐度 40 的海水可考虑用作中华乌塘鳢精子保存稀释液。单独使用 NaCl 溶液来保存中华乌塘鳢精子, 其盐度达 35 以上时, 精子活动可以完全被抑制; 分别用 KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub> 三种溶液保存中华乌塘鳢精子的结果与之相似。根据以上的结果, 分别用 4% 的 NaCl 或 KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub> 溶液作稀释液, 与中华乌塘鳢精子混合后, 在室温条件下保存 1~ 5h, 然后用盐度为 5 的人工海水刺激, 观察精子能否被激活, 结果表明, 在 3h 内所有保存样品均能复活。随着时间的延长, 在 NaCl、KCl 溶液中保存的样品能激活,

在 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 溶液中保存的样品的激活受到一定影响。

在常温保存研究的基础上,分别使用 $NaCl$ 、 $KCl$ 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 四种无机盐溶液作稀释液,加入DMSO,进行中华乌塘鳢精子超低温保存,结果发现经超低温保存后的精子激活率较低。之后,将这几种溶液按不同的比例混合,配制成多种保存稀释液,用于精子超低温保存,从中筛选出了一种较适宜的保存液配方(含 $NaCl$  1.5%、 $KCl$  1.5%、 $CaCl_2$  0.25%、 $MgCl_2$  0.25%)。用这一溶液进行中华乌塘鳢精子超低温保存,其精子解冻后的激活率可达90%,精子活力也与鲜精的相似,受精率可达80%以上,接近鲜精的受精率。另外,直接用盐度为40的海水(用天然海水加 $NaCl$ 配制而成)作为中华乌塘鳢精子超低温保存的稀释液,保存效果也较好,保存后的精子激活率可达80%以上,受精率也可达80%。

### 3 讨论

家鱼的精子在等渗或高渗溶液中是不会被激活的,只有在低渗溶液中才会被激活<sup>[4]</sup>。相反,海水鱼类的精子是在高渗透压溶液中运动<sup>[2~4]</sup>。中华乌塘鳢是一种典型的咸淡水鱼,通常栖息于低盐度水域,在淡水也能生活。因此其精子对于盐度的激活反应既不同于淡水鱼,也不同于海水鱼,其精子在高渗、等渗和低渗条件下均能被激活。本实验的结果表明,中华乌塘鳢精子对盐度有广泛的适应性,但更倾向于较低盐度的水环境,表现为种类的特异性,体现出与该种类栖息环境的相关性。

本实验的结果表明,中华乌塘鳢精子的激活不仅仅与激活溶液的盐度有关,也与激活溶液的离子成份有关,中华乌塘鳢精子的激活仅有 $Na^+$ 、 $K^+$ 的参与是不够的,还需要有其它离子(如 $Ca^{++}$ 、 $Mg^{++}$ 等)的参与;激活溶液中 $K^+$ 、 $Na^+$ 浓度比的变化影响到对中华乌塘鳢精子运动的抑制程度,当 $K:Na$ 超过4:1时,抑制作用明显增强,激活溶液中 $K^+$ 的存在在一定程度上对精子的活动有抑制作用。

鱼类精子能适应较广的pH值范围,无论是在中性水环境还是碱性或弱酸性条件下,其精子通常都有一定的激活率和活力,但其最适pH多在7.0以上<sup>[1~4]</sup>。中华乌塘鳢精子不仅对酸性和碱性环境的适应性特别强,在pH 5.5~9.5的范围,精子激活率皆在70%以上;且其精子激活的最适pH为6.0,是现有报道中耐酸性最强的种类。

鱼类精子超低温保存(液氮保存)的基本方法已经建立<sup>[3,7~10]</sup>。在进行不同的精子保存时,技术关键是在精子激活研究的基础上进行保存液的配制。由于中华乌塘鳢精子适盐范围广,因此增加了精子保存稀释液筛选的难度。本实验筛选出的保存稀释液配方虽然能达到较好的保存效果,但仍只是一个初步结果,其保存液配方还有待于进一步优化。

### 参 考 文 献

- 1 区又君,李加儿. 黑鲷 *Sparus macrocephalus* (Basilewsky) 精子在不同环境中的活力. 中国水产科学研究院学报, 1991, 4(1): 18~26
- 2 李加儿,区又君,江世贵. 环境因子变化对平鲷精子活力的影响. 动物学杂志, 1996, 31(3): 6~9
- 3 江世贵,李加儿,区又君等. 平鲷与真鲷的杂交研究. 海洋科学, 1997, (5): 33~38
- 4 唐天德,许兴基,李文杰等. 几个环境因子对梭鱼精子活力影响的初步研究. 热带海洋, 1985, 4(2): 91~97
- 5 陈松林,章龙珍,鲁大椿等. 抗冻剂二甲亚砜对家鱼精子生理特性影响的初步研究. 淡水渔业, 1987, 17(5): 17~20
- 6 严安生,王其和,李诗模. 渗透压和钾对鲤、团头鲂精子活力的影响. 淡水渔业, 1993, 23(3): 19~21
- 7 张轩杰. 鱼类精液超低温冷冻保存研究进展. 水产学报, 1987, 11(3): 259~267
- 8 陈松林,刘宪亭,鲁大椿等. 鲤、鲢、鳙精子低温短期保存研究. 淡水渔业, 1992, 22(3): 3~6
- 9 Gwo J C, Strawn K, Longnecker M T, et al. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. Aquac, 1991, 94: 355~375
- 10 Horton H F, Ott A G. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. J Fish Res Bd Can, 1976, 33: 995~1000