

857
30

解剖母贝的企鹅珍珠贝精子活化条件

蔡云川

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州, 510300)

摘要: 解剖采集成熟的企鹅珍珠贝精子, 在不同 pH 值、盐度和温度条件下进行激活实验。结果表明, 解剖得到的企鹅珍珠贝精子激活的适宜 pH 值为 9.0-9.5, 适宜盐度为 25-35, 最适盐度为 30, 适宜温度为 25-30℃。

关键词: 企鹅珍珠贝; 精子; 激活; pH; 盐度; 温度

Activation conditions of spermatozoa from dissected parent *Petria penguin*

CAI Yun - chuan

(South Sea Fisheries Research Institute, Guangzhou, 510300)

ABSTRACT: The parents of *Petria penguin* were dissected for spermatozoa collection, and the experiments of activating spermatozoa were conducted under different pH, salinity and water temperature (Tw). The results showed that the activating conditions for the spermatozoa from dissected *Petria penguin* parents were below: suitable pH was 9.0-9.5; suitable salinity was 25-35‰, the optimum salinity was 30‰; suitable temperature was 25-30℃.

KEY WORDS: *Petria penguin*; spermatozoa; activation; pH; salinity; temperature

珍珠是名贵的装饰品、艺术品, 还具有重要的药用价值。珍珠贝主要是指珍珠贝科的几个种类, 包括: 合浦珠母贝、大珠母贝、珠母贝、企鹅珍珠贝等, 是海产养殖珍珠的主要母贝^[1]。近年来, 珍珠贝种质退化严重, 使珍珠养殖业的发展受到很大制约。探索珍珠贝类的种质改良技术是对珍珠养殖业甚至整个水产业的健康发展具有重要意义。转基因技术是一种快捷的种质改良的手段^[2]。

转基因的方法多种多样。电脉冲法一次可以处理大量样本, 重复性好, 操作简便, 是大规模制作转基因水生动物的理想方法^[3-7]。由于珍珠贝类是体外受精, 且其人工解剖精子在没有受到氨海水刺激之前是不活动的^[8-9], 这给电脉冲前的预处理和电脉冲处理后的授精带来了很大方便, 因此珍珠贝类是进行精子介导—电脉冲转基因水生动物研究的理想材料。在我们进行的珍珠贝类转基因技术研究中, 乃采用精子介导—电脉冲转移法。

采用精子介导—电脉冲转移法进行珍珠贝类转基因研究, 需要解剖采集在自然海水中不被激活的精子以便对精子进行预处理, 而前生产上采用的促精排放的方法是让精子排放在海水中, 容易激活且难以收集, 无法用于转基因实验; 还需要掌握解剖出的珍珠贝类精子的激活条件, 以鉴别精子质量优劣, 并使携带有外源基因的健康精子激活并使卵子受精。

珍珠贝类的人工育苗技术体系早已建立^[10-11], 但对其精子的激活条件还缺乏系统研究, 凭经验居多, 不能直接用在转基因实验中。为此, 笔者在研究了珠母贝精子激活条件的基础上^[10], 进一步研究企鹅珍珠贝精子的激活条件, 为转基因技术在珍珠贝种质改良中的应用作好准备。

企鹅珍珠贝于2000年11月采自海南三亚海湾,采集海区盐度为34,以自然海水(盐度34)吊养于水池内,水温24-26℃,定期排污换水。

取个体较大、体质健壮者,用解剖刀切断闭壳肌,观察性腺的成熟度,选择性腺丰满、成熟度高的亲贝。雄性轻挤精巢,能流出乳白色粘稠状精液。雌性卵巢为乳黄色。用针头轻轻刺破精巢,流出精液,用吸管吸取备用。

1.2 精子激活液的配制

1.2.1 pH 调节

企鹅珍珠贝的精子激活液的pH调节:用氨水调节天然海水(盐度34)的pH,用作精子激活液,储于滴瓶中备用。pH梯度设为8.0、8.5、9.0、9.5、10.0,共5个。

1.2.2 盐度调节

使用粗海盐或蒸馏水调节天然海水盐度,然后用氨水调节pH为9.5,用作精子激活液,储于滴瓶中备用。盐度梯度为5、10、15、20、25、30、35、40、45,共9个。

1.2.3 温度调节

将激活液(盐度34,pH分别为9.5、10.0)以及玻片等实验器具(用塑料袋密封)一起放在冰水浴和热水浴中调节温度,温度梯度为5、10、15、20、25、30、35、40、45±1℃,共9个,调节完毕及时进行精子的激活实验,观察其瞬时激活率。选择20、25℃两种温度条件,使用空调器控制室温,并使激活液以及实验器具的温度均达到相应的温度,以观察pH、盐度对精子激活的影响。

1.3 精子活力观察

实验时先滴一滴激活液于载玻片上,用注射针头挑取少许精液,与激活液混匀,立即在光镜下观察。精子激活率、活力的估算方法参照喻达辉等^[11]、江世贵和李加儿^[12]的方法。激活率以显微镜下同一视野中的活动精子的百分比表示,观察3-5个视野,取其平均值。活力以激烈运动时间与总运动时间表示,激烈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%的精子停止活动为止的时间。

1.4 结果与分析

1.4.1 不同pH条件下精子的激活率

当温度为26℃、激活液盐度为34时,解剖获得的企鹅珍珠贝精子在不同pH的氨海水中的激活率与活力见图1。在自然海水(pH8.0)时,只有约5%的精子激活,不活跃,只能原地颤动;在氨海水pH8.5时,约有40%的精子被激活,但仍然只能原地颤动;当氨海水pH达9.0以上时激活率与活力均达到很高的水平。在pH9.5时,激活率最高,达到90%以上;在pH9.0时,总运动时间最长;在pH9.0或pH10.0时,激烈运动时间最长。从图1及图3相同温度下pH9.5与pH10.0时激活率的比较可以看出解剖获得的企鹅珍珠贝精子激活的适宜pH范围是9.0-9.5。

1.4.2 不同盐度条件下精子的激活率

在温度为 26℃、激活液的 pH 为 9.5 的条件下,解剖获得的企鹅珍珠贝精子在不同盐度的氨海水中的激活率与活力见图 2。当激活液盐度为 5 时,约有 20% 的精子激活,但只能原地颤动;在盐度 10-45 范围内,精子均能激活,且有一定活力;盐度达到 10% 后,激活率显著增加,超过 60% 以上,盐度从 35 增加到 40,激活率显著下降,在盐度为 40 时,激活率降到 40%;在盐度 25-35 范围内,激活率很高,达 90% 以上;在盐度 30-35 范围内活力很强,在盐度 30 总运动时间与激烈运动时间均为最长。从图 2 可见企鹅珍珠贝解剖精子激活的适宜盐度范围为 25-35。最适盐度为 30。

3.2.2 盐度对企鹅珍珠贝精子激活的影响

在盐度 34 的氨海水中,温度对企鹅珍珠贝精子激活的影响缺乏规律性的变化(见图 3)。

当 pH 为 9.5 时,在 5-35℃ 范围内,精子的激活率均达到 70% 以上;在 5-15℃ 范围内,精子的激活率呈现上升的趋势,在 15℃ 处激活率达到 90% 以上;在 20℃ 处的激活率又下降为 80%;当温度在 25-30℃ 时,激活率又达到 90% 以上,超过 30℃,又迅速下降。

当 pH 为 10.0 时,在温度 5-25℃ 范围内,精子的激活率的变化趋势与 pH9.5 时一致,在 5-20℃ 时的激活率比相同温度下 pH 为 9.5 时的低,在温度为 25℃ 时两者的激活率相当;当温度为 30℃,pH10.0 的激活率比 pH9.5 的激活率低,当温度达到 35℃ 后,相同温度下 pH10.0 时的激活率比 pH9.5 时的激活率高。

根据图 3 所显示的结果,并考虑到企鹅珍珠贝生活在热带、亚热带海区,其生活环境水温不会低于 20℃,也少有高于 35℃,可以大致确定企鹅珍珠贝解剖精子激活的适宜温度范围为 25-30℃。

3.2.3

对鱼类精子激活而言,渗透压是最主要的影响因素^[13],淡水鱼类精子的激活是由低渗透压水环境所致^[14,16],海水鱼精子则是由高渗透压水环境激活^[12,15]。

贝类精子的激活有两种情况:部分贝类象鱼类一样,无论是自然排放的精子还是人工解剖所采集到的成熟精子,在其所生活的自然水环境中均能立即被激活;但也有部分海产贝类,如珍珠贝类,解剖采集的成熟精子在自然海水中不能被激活,必须在一定的理化条件下,如 pH、盐度、温度、化学药物等才能被激活^[8-9,11]。本实验的结果表明,含一定浓度的 NH_4^+ ,且能调节 pH 到合适数值的化学药物如氨水的存在至关重要。这表明,对珍珠贝类的精子激活而言,渗透压(盐度)虽然是重要的影响因素,但不是最主要的影响

因素。

精子的活力是精子受激活后运动的能力,是影响精子授精能力的主要因素,是反映精子质量的重要指标之一。水生动物精子的活力种间差别很大,同一种类的精子活力也受多种内外因素的影响而变化。亲本的年龄、大小、健康状况、性腺发育成熟度决定着精子的质量,是影响精子活力的内因。精子所处水环境的理化因子如水温、pH、盐度等均是影响精子活力的重要因素,是外因。

在所有影响精子活力的外因中,盐度(渗透压)是关键的因素,精子处在一个最适盐度时,寿命最长^[16-17];海产动物的精子,活力受盐度影响更显著,在淡水中不能激活,只有在一定盐度的激活液中才能显示活力,在盐度从低到高的一系列的激活液中,精子的活力从弱到强,直到最强,又逐渐减弱直至死亡^[12,18],本实验的结果也体现了这一规律。

pH对精子活力也有明显的影响。唐天德等^[18]认为,鱼类精子均适于在中性和偏碱性环境中活动,酸性环境会破坏精子细胞,抑制精子活力。本实验的结果表明,珍珠贝的解剖精子也是适于在偏碱性或弱碱性环境中活动,在适宜的pH环境中活力强。

需要指出的是,精子激烈运动时间的延长有时比单纯的延长总运动时间更具有实践意义,因为激烈运动时精子的授精能力最强。

本实验的研究结果是对珍珠贝人工育苗技术体系的补充和完善,为鉴别其精子质量提供了依据,并为转基因技术应用于珍珠贝种质改良提供了前提条件。

参考文献:

- [1] 蔡钊黄,李有宁,邢孔武. 珍珠养殖理论与技术. 北京,科学出版社,1996.
- [2] Hew CL, Davies PL, Shears M, Fletcher GL. Transgenic salmon: tailoring the genome for good production. *J Fish Biol*, 1995, 47(Supply A): 1-19.
- [3] Buono R J, Linser P J. Gene transfer in zebrafish. *Mol Mar Biol Biotech*. 1992, 1: 271-275.
- [4] Xie Y. Gene transfer via electroporation in fish. *Aquaculture*, 1993, 111: 207-213.
- [5] Symonds J F, Walker S P, Sin F Y T. Development of a mass gene transfer method in chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3: 104-111.
- [6] Powers D A, Kirby, Cole T. Electroporation as an effective means of introducing DNA into red abalone (*Haliotis rufescens*) embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995, 4: 369-375.
- [7] Tsai H J, Tseng F S, Liao I C. Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into the genome of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Cara J Fish Aquat Sci*, 1995, 52: 776-787.
- [8] 金启增,魏贻尧,姜卫国. 合浦珠母贝人工育苗的研究 I 人工受精. *南海海洋科学集刊*, 1981, 2: 107-115.
- [9] 金启增,郭澄联,胡建兴. 珍珠贝的种苗生物学. 北京,海洋出版社,1992, 36-40, 144.
- [10] 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. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 9-12.
- [11] 喻达辉,陈竟春,苏天凤,等. 合浦珠母贝精子的实验生物学初步研究. *热带海洋*, 1998, 17(3): 83-87.
- [12] 江世贵,李加儿. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系. *生态学报*, 2000, 20(3): 468-473.
- [13] Mark C, Bates K, William R. Effect of Osmotic Pressure on the Activation and Storage of Channel Catfish Sperm. *American Fisheries Society*. 1996, 125: 798-802.
- [14] 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.
- [15] Chauvaud L, Cosson J, Suquet M. Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*: Initiation of movement and changes with time of swimming characteristics. *Environ. Biol. Fish.* 1995, 43 (4): 341-349.
- [16] 王祖昆,邱麟翔,陈魁候,欧阳国辉,梁耀,何荫. 我国南方主要淡水养殖鱼类精子特性研究. *淡水渔业*, 1985, 15(1): 18-21.
- [17] 魏开金,王汉平,林加敬,麦加柏. 氯化钠浓度对鲢鱼精子活力影响的初步观察. *淡水渔业*, 1996, 26(4): 9-10.
- [18] 唐天德,许兴基,李文杰,李贵君,雷铁军. 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.