

黑鲷和大弹涂鱼精液短期冷冻保存*

SHORT-TERM CRYOPRESERVATION OF SPERMATOZOA OF SPARUS MACROCEPHALUS AND BOLEOPHTHALMUS PECTINIROSTRIS

洪万树 张其永 周东晨

(厦门大学海洋学系 361005)

1 材料与方法

实验用鱼采用繁殖季节中的雄性成熟个体。黑鲷采自厦门火烧屿海水养殖网箱, 体长 19.5 mm ~ 36.0 mm, 体重 202.0 g ~ 825.0 g, 年龄 2~4 龄。大弹涂鱼捕自福建省九龙江口潮间带滩涂, 体长 8.0 mm ~ 16.0 mm, 体重 16.0 g ~ 35.0 g, 年龄 1~2 龄。黑鲷以轻压鱼腹法收集精液, 大弹涂鱼则采用剖腹取精巢捣碎法取精液。

稀释液由基础溶液和抗冻剂两部分组成, 前者以 NaCl, KCl 和柠檬酸钠为基本成分, 后者采用二甲亚砜(DMSO)和甘油两种, 单独或混合使用。实验前配好稀释液并置于冰箱中(2℃ ~ 4℃)冷藏备用。精液与稀释液的体积比为 1:3。

冷冻保存方法同文献[2]。样品移入液氮(-196℃)冷冻前经 30 min 降温平衡(0℃ ~ 2℃)。大弹涂鱼精液冷冻保存 9 d, 黑鲷精液冷冻保存 18 d 或 36 d。以水浴法(38℃ ~ 40℃)解冻精液, 用盐度为 27 的砂滤海水激活精子活率为被激活精子数量占全部精子数

量的百分比, 精子游动时间指精子被激活后开始游动到 90% 停止游动所经历的时间。

取解冻激活的黑鲷精子与黑鲷成熟卵受精, 待胚胎发育至原肠期计算受精率。挑选出原肠期胚胎, 置于水温 22℃ ~ 23℃ 和盐度为 27 的条件下孵化并计算孵化率。

2 结果

2.1 抗冻剂浓度和使用方法对黑鲷和大弹涂鱼精子活率和游动时间的影响

以 1% NaCl 和 0.05% KCl 为基础溶液, 添加不同浓度的甘油和 DMSO, 研究抗冻剂的适宜浓度和使用方法。结果表明, 甘油和 DMSO 在实验的浓度范围内, 对黑鲷和大弹涂鱼精子都有抗冻保护作用, 但其效果与两者的浓度和使用方法有关(图 1, 2)。

* 福建省自然科学基金资助项目 C93048 号。
收稿日期: 1996 年 6 月 17 日

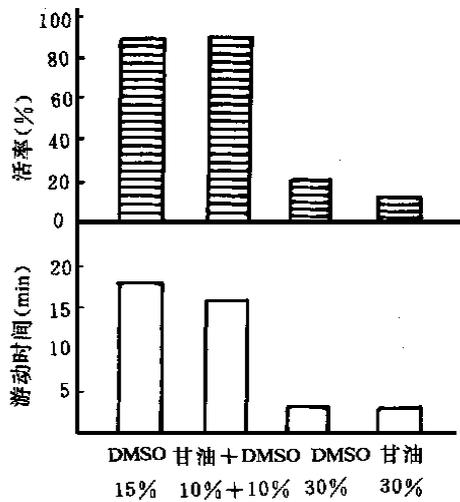


图1 抗冻剂浓度和使用方法对黑鲟精子活率和游动时间的影响

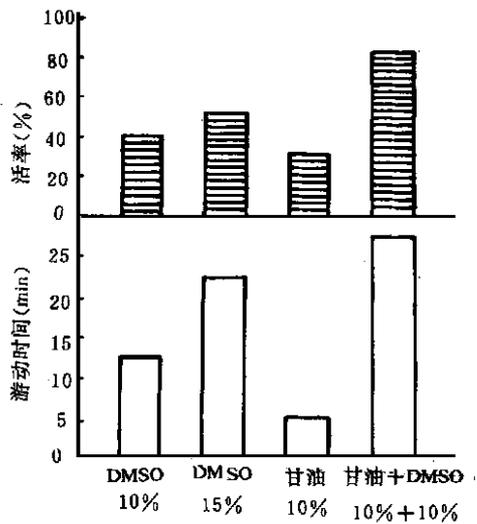


图2 抗冻剂浓度和使用方法对大弹涂鱼精子活率和游动时间的影响

2.2 不同基础溶液成分的稀释液对黑鲟精液冷冻保存效果

以相同浓度的甘油(15%)作抗冻剂,比较不同基础溶液成分的稀释液对黑鲟精液冷冻保存效果。结果见表1。

2.3 黑鲟冻精受精率和孵化率测定

经18d冷冻保存的黑鲟精子解冻后与成熟卵授

精,结果见图3。受精率和孵化率的高低和精子解冻后的活率呈正相关关系,随着精子活率的上升,受精率和孵化率也随之提高。

表1 不同基础溶液成分的稀释液对黑鲟精液的冷冻保存效果

组别	基础溶液成分					活率 (%)	游动时间 (min)
	甘油 (%)	NaCl (%)	KCl (%)	柠檬酸钠 (%)	蔗糖 (%)		
1	15	1	0.05	0	3	65	14
2	15	1	0.05	0	0	40	11
3	15	0	0.05	2	0	25	8

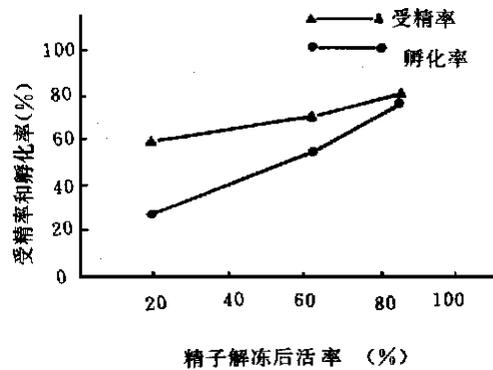


图3 黑鲟冻精解冻后活率与受精率和孵化率的关系

3 讨论

鱼类精液冷冻保存多数采用甘油和DMSO作抗冻剂,但浓度和效果在不同鱼类中有差异。冷冻太平洋鲱和鳕鱼精液时,甘油的浓度分别为12.5%和23.8%^[3],条纹狼鲈以5%DMSO作抗冻剂^[3],而锦鲤DMSO的使用浓度高达65%(岩桥正雄,1981)。Horton等^[5]和陈松林等^[4]分别认为DMSO的有效浓度为10%和8%~12%。本实验结果表明,以10%的甘油加10%DMSO冷冻保存黑鲟和大弹涂鱼精液,取得了较好的效果,这与花鲈精液冷冻保存的研究结果相似^[2]。单独使用浓度为15%DMSO冷冻黑鲟精液时,也获得较高的精子活率和较长的游动时间,说明该浓度的DMSO也适合于黑鲟精液的冷冻保存,这一结果与江世贵等^[1]的研究报道一致。

基础溶液中添加3%的蔗糖,有助于提高黑鲟冻精的活率和延长冻精的游动时间。糖类主要是一种能源物质,但精子进入超低温状态时,运动和代谢活动

均已停止,不能利用外界能源物质,蔗糖是如何起作用,有待进一步探讨。糖类常被用作一种稀释液的成分,但效果在不同鱼类中存在差别。Hisashi^[6]以葡萄糖和柠檬酸钠组成的稀释液冷冻保存鲑鱼精液,取得了良好的效果。江世贵等^[1]认为5%葡萄糖溶液是黑鲟精液冷冻保存的适宜基础溶液。但据洪万树等^[2]报道,基础溶液中含4%葡萄糖或不含葡萄糖对花鲈精液冷冻保存没有明显的差别。

冻精受精率的高低,一方面与解冻后精子的活率有关,活率高,受精率也高,本实验结果证实了这一点;另一方面也与精子的数量有关,在精子活率相似条件下,适当增加冻精量,受精率会随之提高,但当冻精的用量达到一定的限度时,如再增加冻精量,受精率将不再提高,而只保持在一定的水平(岩桥正雄,1981)。在授精过程中,如何确定最适的精子数量和卵子数量的比例,以达到既不浪费冻精,又能获得较高

的受精率,是一个值得探讨的问题。据陈松林等^[4]报道,淡水鱼类(鲢、鲤、圆头鲂和草鱼)要获得80%的受精率,所需的最低冻精密度为500 000精子/卵。海水鱼类这方面的研究尚有待于加强。

参考文献

- [1] 江世贵等,1994. 南海水产研究 9:18~23.
- [2] 洪万树等,1996. 海洋学报 18(2):97~104.
- [3] 张轩杰,1987. 水产学报 9(3):259~267.
- [4] 陈松林等,1992. 动物学报 38(4):413~424.
- [5] Horton H. F. *et al.*, 1976. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33: 995-1 000.
- [6] Hisashi K. *et al.*, 1980. *Bull. Jan. Soci. Fish.* 46: 1 493-1 495.