

文章编号:1005-8737(2001)04-0009-04

解剖采集的珠母贝精子的激活条件

蔡云川,林黑着,吴开畅,李有宁,苏天凤,江世贵*

(中国水产科学研究院南海水产研究所,广东广州510300)

摘要:解剖成熟珠母贝(*Pinctada margaritifera*)并采集其精子,在不同pH、盐度和温度条件下进行激活实验。结果显示,水温25℃、盐度34、pH 8.5以下时,珠母贝精子的激活率与活力均很低,pH 9.0~10时激活率与活力均较高,pH 9.5时的激活率最高;在水温20℃,盐度34时珠母贝精子只能在pH 9.5~10激活,且激活率与活力均比25℃时低。在水温25℃,pH 9.5时,精子在盐度10~45能激活,盐度25~35时激活率和活力很高;在水温20℃,pH 9.5时,精子只能在盐度20~40时激活。当盐度相同,20℃时的激活率与活力比25℃时低。在pH 9.5或10的氨海水中,珠母贝精子在水温5~45℃时能激活,在25~30℃时激活率较高。当温度相同,pH 9.5时的激活率比pH 10.0时高。解剖得到的珠母贝精子的适宜激活pH为9.5、适宜盐度为25~35、适宜温度为25~30℃。

关键词:珠母贝;精子;激活;pH;盐度;温度

中图分类号:Q959.215

文献标识码:A

珠母贝(*Pinctada margaritifera*),又称黑蝶贝,是插核养殖黑珍珠的主要贝类^[1,2]。近年来,由于珠母贝种质退化,使黑珍珠养殖业的发展受到很大制约。因此,需要对珠母贝种质进行改良。转基因是一种快捷而有效的改良种质的手段,但这项技术应用到珠母贝目前尚未见报道。基因转移的方法很多,作者采用精子携带一电脉冲基因转移法进行珠母贝转基因研究。要进行这一试验必须具备2个条件:(1)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,而目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;(2)需掌握解剖出的珠母贝精子的激活条件,才能使携带有外源基因的精子激活并使卵子受精。目前虽然珠母贝人工育苗

已取得成功,但对精子激活条件尚无系统研究,凭经验居多,不能直接用在转基因实验中。使用人工解剖采集的精子,使其携带外源基因与卵子受精,需要有确切的参数。为此,需要首先研究解剖获得的珠母贝精子激活所需要的pH、盐度、温度条件,以便为转基因技术在珠母贝的应用做准备。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用珠母贝于2000年11月采自海南三亚海湾,以自然海水(盐度34)吊养于水泥池内,水温24~26℃,定期排污换水。用解剖刀切断闭壳肌,观察珠母贝亲贝的成熟度,选择性腺丰满、成熟度高的雄性亲贝(轻挤精巢,能流出乳白色粘稠状精液)的精子用于实验。

1.2 激活液的配制

1.2.1 pH 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 使用粗海盐或蒸馏水调节天然海水

收稿日期:2001-02-20

基金项目:广东省自然科学基金(991044);中国水产科学研究院基金(99-02-04)

作者简介:蔡云川(1977-),男,硕士研究生,从事海洋生物学研究.E-mail:caiyunchuan@21cn.com

* 通讯作者

的盐度,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 10、15、20、25、30、35、40、45,共 8 个。

1.3 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。

1.4 精子活力观察

实验时先滴 1 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、活力的估算方法与喻达辉等^[3]、江世贵等^[4]的方法相同。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。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。

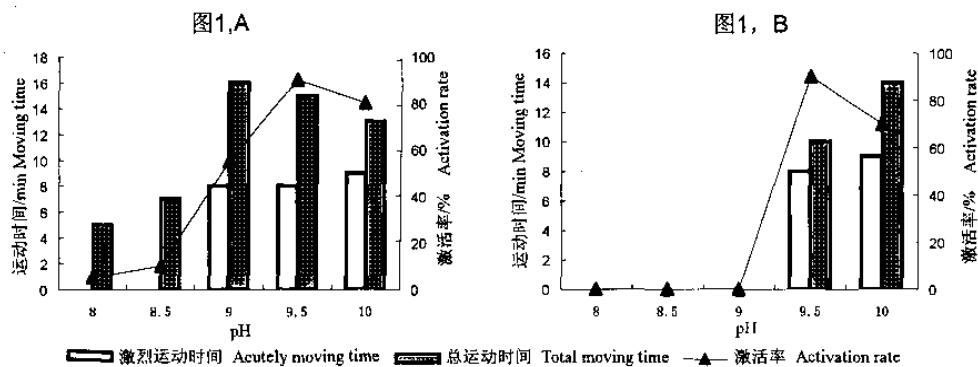
2 结果

2.1 珠母贝精子激活所需的最适 pH

当温度为 25℃、激活液盐度为 34 时,解剖获得的珠母贝精子在不同 pH 的海水中的激活率与活力见图 1A。在自然海水(pH 8.0)时,只有约 5% 的精子激活,但只在原地颤动;在氨海水 pH 8.5 时,约有 10% 的精子被激活,仍然只能原地颤动;当氨海水 pH 达到 9.0 以上时,精子的激活率与活力显著升高,当 pH 9.5 时激活率最高,达 90% 以上。

温度为 20℃、激活液盐度为 34 时,解剖获得的珠母贝精子只在 pH 9.5~10.0 范围内能激活且具有活力(图 1B)。当 pH 9.5 时激活率最高,达 90%。

由图 1 可见,不论是在 20℃ 还是 25℃,珠母贝精子均在 pH 9.5 时激活率达最高且精子活力较好。另外,从图 3 还可以看到,在各种温度条件下, pH 为 9.5 时的精子激活率均比在 pH 为 10.0 时各相应温度条件下的精子激活率高。因此,解剖获得的珠母贝精子激活的适宜 pH 为 9.5。



A: 盐度 34 Salinity 34; 温度 25℃ Temperature 25℃; B: 盐度 34 Salinity 34; 温度 20℃ Temperature 20℃

图 1 pH 对解剖获得的珠母贝精子激活的影响

Fig.1 Effect of pH on activation of spermatozoa from dissected parent *P. margaritifera*

2.2 珠母贝精子激活所需的适宜盐度

在温度为 25℃、激活液 pH 为 9.5 的条件下,当激活液盐度为 10 时,激活率达 20%,精子的运动方式为缓慢跳跃或蠕动;激活液盐度为 15 时,精子激活率与活力显著上升;盐度在 25~35 范围内,精子激活率均很高,达 90% 以上,且具有相当高的活力。其中,盐度为 30 时精子激活率最高(95%),盐度为

25 时的激烈运动时间最长,盐度为 35 时的总运动时间最长;当激活液盐度超过 35 以后,精子激活率与活力均显著下降(图 2A)。

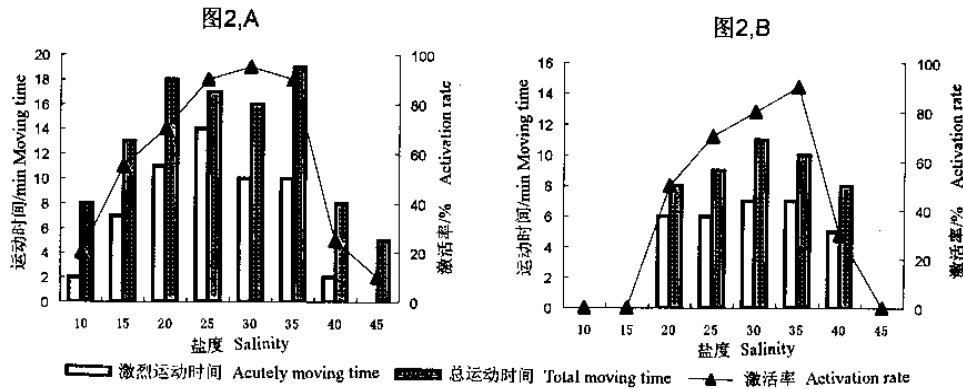
当室温与激活液的温度均为 20℃(激活液的 pH 9.5)时,解剖获得的珠母贝精子只在盐度 20~40 范围内能被激活且有活力(图 2B)。其中盐度为 30~35 时,精子的激活率及运动时间较长。

实验结果显示,解剖获得的珠母贝精子的激活所需的适宜盐度范围为 25~35。在该盐度范围内,激活所需的最适盐度与激活温度有关,当激活温度较高时,最适盐度略有降低。

2.3 珠母贝精子激活所需的适宜温度

在 pH 9.5、盐度 34 的氨海水中,温度对珠母贝

精子激活的影响见图 3。在 15~40℃ 范围内,精子激活率相当高,达 80% 以上;其中在 20~30℃ 范围内激活率超过 90%,30℃ 时的激活率最高,达 95%。在 pH 10.0、盐度 34 的氨海水中激活时,水温 10~40℃ 范围内,精子激活率达 50% 以上,其中在 25~30℃ 范围内激活率达到 80%。



A: pH 9.5, 温度 Temperature 25℃; B: pH 9.5, 温度 Temperature 20℃

图 2 盐度对解剖获得的珠母贝精子激活的影响

Fig.2 Effect of salinity on activation of spermatozoa from dissected parent *P. margaritifera*

另外,在上文所述的图 1A 与图 1B 的比较也可以看出,在 pH 9.5~10.0 范围内,20℃ 与 25℃ 时的精子激活率、精子运动时间的结果接近;但在 pH 低于 9.5 时,20℃ 时激活率明显比 25℃ 时低,20℃ 时的

精子运动时间明显比 25℃ 时短。从图 2A 与图 2B 的比较还可以看出,25℃ 时的精子激活效果比在 20℃ 时好。说明珠母贝精子温度激活的适宜温度为 25~30℃。

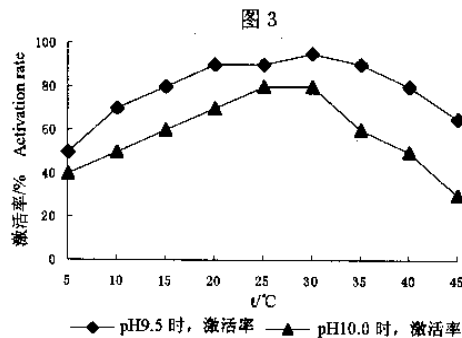


图 3 温度对解剖获得的珠母贝精子激活率的影响

Fig.3 Effect of temperature on activation rate of spermatozoa from dissected parent *P. margaritifera*

3 讨论

贝类精子的激活有 2 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,且有受精能力;但也有部分海产贝类,如珠母贝、合浦珠母贝等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才能被激活^[2,3]。本实验在对解剖获得的珠母贝精子激活条件的研究中发现,解剖获得的珠母贝精子需要

在 pH 9.5, 盐度 25~35, 水温 25~30℃ 条件下才有较高的激活率与活力(图 1~3)。这一结果与喻达辉等^[3]在合浦珠母贝中的研究结果大致相似。同时, 这一结果也是对珠母贝人工育苗技术体系的补充和完善, 并为转基因技术应用于珠母贝种质改良提供了前提条件。

从实验结果还可以看出, 解剖获得的珠母贝激活所需的盐度、温度条件与自然条件下排放的精子激活所需的条件是一致的。解剖获得的珠母贝成熟精子与自然排放出来的精子在激活条件上的区别主要是 pH, 自然排放的珠母贝精子在 pH 8.0 的天然海水中能被激活, 但要使解剖获得的珠母贝成熟精子激活, 必须提高授精水环境的 pH(图 1)。所以珠

母贝人工育苗生产中, 解剖采集的精子即使是成熟的, 也需要提高海水的 pH 后才能授精。

致谢: 本文经蒙刘美研究员审阅修改, 谨致谢意。

参考文献:

- [1] 蒙刘美, 李有宁, 邢孔武. 珍珠养殖理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 金启增, 郭澄联, 胡建兴, 等. 珍珠贝的种苗生物学[M]. 北京: 海洋出版社, 1992.
- [3] 喻达辉, 陈克春, 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(3): 83~87.
- [4] 江世贵, 李加儿, 区又君, 等. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系[J]. 生态学报, 2000, 20(3): 468~473.

Activation conditions of spermatozoa from dissected parent *Pinctada margaritifera*

CAI Yun-chuan, LIN Hei-zhao, WU Kai-chang, LI You-ning, SU Tian-feng, JIANG Shi-gui*
(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The parent *Pinctada margaritifera* were dissected for spermatozoa collection, and under different pH, salinity and water temperature(T_w), the activating experiment was conducted. The results show that at T_w 25℃, $pH \leq 8.5$ and salinity 34, the activation rate of the spermatozoa is very low and they are not vigorous, and at the same T_w and salinity with pH ranging from 9.5 to 10, the activation rate is fairly high and the individuals are very vigorous. The sperm can be activated in ammonia seawater at 20℃ only while pH ranging from 9.5 to 10. At the same pH above, the activation rate and vitality of the sperm are lower at 20℃ than those at 25℃. At 25℃, the sperm can be activated by ammonia seawater with pH 9.5 and salinity 10~45, and at the same pH the activation rate and vitality are fairly high when salinity ranges from 25 to 35. At 20℃, the sperm can be activated by ammonia seawater at pH 9.5 only with salinity 20~40, and at the same salinity, the activation rate and vitality of the sperm are lower at 20℃ than those at 25℃. In ammonia seawater of pH 9.5 or 10, the sperm can be activated at 15~40℃; the activation rate is fairly high at 25~30℃. At the same T_w , the activation rate is higher at pH 9.5 than that at pH 10. The optimum activating condition for the spermatozoa from dissected parent is: pH 9.5, salinity 25~35, and seawater temperature 25~30℃.

Key words: *Pinctada margaritifera*; spermatozoa; activation; pH; salinity; temperature

* Corresponding author