

胭脂鱼精子低温保存及其在人工授精中的应用

万全 李飞 (安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要 [目的] 研究胭脂鱼精子的低温保存方法, 为胭脂鱼的人工繁殖和人工授精提供基础依据。[方法] 试验配制了A、B、C、D 4种精子保存液, 以0.7%的NaCl溶液作为对照, 以精子被激活后的活率为指标, 对4种精子保存液保存成熟的胭脂鱼精子的效果进行评价。[结果] 在低温(0~4℃)条件下, 4种精子保存液之间及其与对照溶液之间的差异比较明显。其中保存效果最好的是B液, 能在120 h内使精子的活率保持为80%; D液次之, 能在84 h内使精子的活率保持为80%。胭脂鱼在淡水中快速运动时间为(24.0 ± 3.5) s, 寿命为(128.0 ± 9.5) s。2007~2008年精子保存B液在胭脂鱼的人工授精中进行应用, 受精率为53%~85%。[结论] 用精子保存液低温保存胭脂鱼精子的方法是切实可行的。

关键词 胭脂鱼; 精子; 低温保存; 人工授精

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)03-01122-02

Study on the Application of Spermatozoa Preservation at Low Temperature in Artificial Fecundation of *Myxocyprinus asiaticus* Spermatozoa

WAN Quan et al (College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] The study aimed to investigate the method of low temperature preservation for *Myxocyprinus asiaticus* spermatozoa and provide the foundation data for artificial reproduction and fecundation. [Method] In the test, 4 kinds of spermatozoa preservative fluids of A, B, C and D were prepared, with 0.7% NaCl solution as CK. The effects of four preservative fluids of nature spermatozoa from *M. asiaticus* were evaluated with the fast moving rate of spermatozoa after being motivated as an index. [Result] Under the low temperature of 0-4℃, the differences between 4 kinds of the preservative fluids and between the mand CK fluids were more obvious. Among them, B fluid was the best, which could keep 80% of spermatozoa having fast moving ability within 120 h and D fluid was second, which could keep 80% of spermatozoa having fast moving ability within 84 h. The moving time of *M. asiaticus* spermatozoa in fresh water was (24.0 ± 3.5) s, with the life time of (128.0 ± 9.5) s. From 2007 to 2008, when the spermatozoa preservative B fluid was used in the artificial insemination of *M. asiaticus*, the fecundation was 53% - 85%. [Conclusion] The method of keeping *M. asiaticus* spermatozoa at low temperature with spermatozoa preservative fluids was feasible.

Key words *Myxocyprinus asiaticus*; Spermatozoa; Low temperature preservation; Artificial fecundation

胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus* Bleeker)属鲤形目(Cypriniformes), 脂鱼科(Catostomidae)。现知全世界约有该科鱼类13属68种, 其中绝大多数种类分布于北美洲。胭脂鱼分布于我国的长江和闽江, 为我国也是亚洲特有种^[1-2]。该鱼幼鱼还具有体形奇特, 背鳍较高(寓意“一帆风顺”)、体色鲜艳的特点, 为我国重要的观赏鱼类之一, 有较重要的经济意义。近几十年来, 由于人类对自然环境的影响, 生物也受到很大的影响。葛洲坝水利枢纽工程和三峡水利枢纽工程的建成阻碍了胭脂鱼的洄游活动, 加之过度捕捞, 对胭脂鱼资源自然增殖产生了不利影响。由于其资源量的大大减少和其所具有的重要意义, 现胭脂鱼已经被列为国家二类水生野生保护动物。

为了保护这一物种, 现已经开展了胭脂鱼人工繁殖、生物学特征、胚胎发育、资源现状及资源恢复探讨等方面的研究^[1-8]。国内对淡水鱼类如虹鳟^[9]、大银鱼^[10]以及鲤、鲢、鳙^[11]的研究表明, 采用精子保存液在低温条件下可延长这些鱼类精子的活力和寿命, 保持受精能力, 达到短期保存的目的。由于胭脂鱼天然产卵场在长江上游水流湍急处, 因此胭脂鱼对产卵的生态条件要求较高, 人工繁殖技术难度较大。目前, 胭脂鱼的人工繁殖多采用人工授精, 而至今尚未见关于胭脂鱼精子活力、保存及应用研究的报道。胭脂鱼亲本量很少, 且胭脂鱼的雌雄发情的时间不易控制一致, 胭脂鱼在多次注射激素后的效应时间内也需要多次人工采卵、人工授精。因此, 笔者开展胭脂鱼精子低温保存方法研究, 旨在为胭脂鱼的人工繁殖、人工授精提供基础依据和指导。

1 材料与方法

1.1 精子来源、采精及精子保存方法 试验所用的胭脂鱼为安徽省长江水生动物保护研究中心繁殖用的胭脂鱼亲本。在胭脂鱼的繁殖季节, 选择体质健壮的胭脂鱼进行人工催产, 在效应时间达到后, 2007年4月7日, 将胭脂鱼雄鱼拉起, 用毛巾将生殖孔附近的水分擦去, 然后轻压腹部, 挤出精液, 用预先准备好的干净的滴管吸取精液分别置于放有适量精子保存液的干净的小瓶中, 再将小瓶放进冰箱4℃低温保存。采精过程中要防止水进入精液, 尽量避免精液被污染。

1.2 精子保存液的制备 试验共配制了A、B、C、D 4种精子保存液, 并用0.7%的NaCl溶液(E)作为对照。各种精子保存液的配方如下:

(1) 精子保存液A(Hanks精子保存液)配方^[12]。甲液: NaCl 9.600 g, KCl 0.480 g, CaCl₂ 0.168 g, MgCl₂·6H₂O 0.235 g, 蒸馏水 60 ml; 乙液: NaHCO₃ 0.420 g, Na₂HPO₄ 0.186 g, KH₂PO₄ 0.072 g, C₆H₁₂O₆ 1.091 g, 蒸馏水 60 ml。用时取甲液和乙液各 5 ml, 然后加去离子水至 100 ml, 即制成精子保存液A。

(2) 精子保存液B(人工精浆A)配方^[10]。NaCl 127.0 mmol/L, KCl 37.3 mmol/L, CaCl₂ 2.6 mmol/L, MgCl₂·6H₂O 1.5 mmol/L, NaHCO₃ 5.0 mmol/L。

(3) 精子保存液C配方^[10]。NaCl 80 mmol/L, KCl 50 mmol/L, CaCl₂ 5 mmol/L, MgCl₂·6H₂O 2 mmol/L, NaHCO₃ 50 mmol/L, C₆H₁₂O₆ 10 mmol/L。该保存液中加入了链霉素, 浓度为 80 万 IU/L。

(4) 精子保存液D(Ringer氏液)配方。NaCl 7.526 g, KCl 0.417 g, CaCl₂ 0.322 g, MgCl₂·6H₂O 0.203 g, NaHCO₃ 0.193 g, KH₂PO₄ 0.122 g, C₆H₁₂O₆ 2.910 g, 配成 1 000 ml。

1.3 精子活力检测 精子活率(精子激活比例): 已激活的呈快速直线活动的精子占检测精子总数的百分比。精子寿

基金项目 三峡工程珍稀鱼类保护生态补偿增殖放流项目。

作者简介 万全(1957-), 男, 江苏金湖人, 副教授, 从事珍稀水生动物繁殖保护研究。

收稿日期 2008-11-10

命(精子运动时间):从精子激活开始至运动停止所经历的时间^[12]。该研究用精子活率为指标对精子活力进行评价,从而判断保存液对精子的保存效果。精子活力观察方法参照文献[13]并加以改进。观察时,先用胶头滴管吸1滴水于载玻片上,在10×10的倍数下对准视野,然后将保存有精子的保存液摇匀,用解剖针在其中蘸一下,取出后立即在载玻片上的液滴中搅匀并迅速观察其运动情况,每个样品每一循环观察3次,观察后综合评判并进行记录。记录的方法为^[4]:“+++”表示100%精子快速运动;“++”表示80%左右的精子在快速运动;“+”表示50%左右的精子在快速运动;“+-”表示10%~30%精子快速运动;“-”表示全都死亡或少量在原地振动。

1.4 在人工授精中的应用 2007年4月7日和2008年4月11日,使用精子保存液B进行人工授精应用,在人工注射激素的效应时间内,将胭脂鱼雄鱼拉起,用毛巾将生殖孔附近的水分擦去,然后轻压腹部挤出精液于培养皿中,加入5~7倍的精子保存液备用。然后拉起雌鱼挤出卵子实施干法人工授精,精卵混合后用羽毛搅拌后加入水刺激,再放入孵化设施孵化。胭脂鱼雌鱼需要3~5次采卵,时间需要7~10h,如长时间使用需要在4℃保存。待胚胎发育到原肠中期计算受精率。

2 结果与分析

2.1 精子保存结果 表1显示,用A液保存胭脂鱼精子,保存时间为20~31h,精子的活率保持在80%左右;48h检测,精子活率下降为50%左右,这种情况维持到84h;在96h时下降为10%~30%;到108h时精子几乎全部死亡。

用B液保存胭脂鱼精子,保存时间为20~120h,精子的活率保持在80%左右;在132h时,精子活率下降为50%左右,这种情况维持到156h;在168h时下降为10%~30%;到216h时检测精子几乎全部死亡。

用C液保存胭脂鱼精子,首次检测(20h)时活率即为50%左右,在22h时下降为10%~30%;在24h检测时,精子几乎全部死亡。

用D液保存,保存时间为20~84h,精子的活率保持在80%左右;在96h时,精子活率下降为50%左右;在108h时,精子活率下降为10%~30%,这种情况一直维持到216h;到228h检测时,精子几乎全部死亡。

用E液保存,在20h时精子的活率为50%左右;在22h时下降为10%~30%,这种情况维持到29h;在31h观测时,精子几乎全部死亡。

2.2 胭脂鱼精子在淡水中的快速运动时间和寿命 胭脂鱼精子在水温为18℃淡水中的快速运动时间为 (24.0 ± 3.5) s,

表1 精子保存结果

Table 1 Result of spermatozoa preservation

观察时间 h Observation time	保存液 Preservation solution					观察时间 h Observation time	保存液 Preservation solution				
	A	B	C	D	E		A	B	C	D	E
20	++	++	+	++	+	108	-	++	-	+-	-
22	++	++	+-	++	+-	120	-	++	-	+-	-
24	++	++	-	++	+-	132	-	+	-	+-	-
27	++	++	-	++	+-	144	-	+	-	+-	-
29	++	++	-	++	+-	156	-	+	-	+-	-
31	++	++	-	++	-	168	-	+-	-	+-	-
48	+	++	-	++	-	180	-	+-	-	+-	-
60	+	++	-	++	-	192	-	+-	-	+-	-
72	+	++	-	++	-	204	-	+-	-	+-	-
84	+	++	-	++	-	216	-	-	-	+-	-
96	+-	++	-	+-	-	228	-	-	-	-	-

寿命为 (128.0 ± 9.5) s。

2.3 人工授精的应用结果 2007~2008年,精子保存液B在胭脂鱼的人工授精中进行应用,由于卵子分批采出,成熟度有所差别,第1批采出的卵和最后一批卵的受精情况不同,受精率在53%~85%波动。

3 讨论

对胭脂鱼精子保存结果分析表明,精子保存液B和D的保存效果较好,虽然D液中精子保存时间比B液中的长,但综合评价还是B液的保存效果最好。从其二者成分可知,B液含有NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂·6H₂O、NaHCO₃,D液除了含有B液中的物质外还含有KH₂PO₄、C₆H₁₂O₆。其中NaHCO₃、KH₂PO₄为缓冲物质用于调节精子保存液pH值,以使精子保存液的pH达到有利于精子保存的目的。据严安生等鲤鱼和团头鲂精子影响的研究表明,添加钙、镁离子能对精子的活动起到一定的抑制作用^[14],所以在精子保存液中常加入

CaCl₂和MgCl₂这两种物质。

该试验的对照组用0.7% NaCl溶液对胭脂鱼精子进行保存的效果不佳。据赵亚龙等的研究,大口胭脂鱼精子在NaCl浓度达1.0%时,精子出现不活动状态,但滴加1滴去离子水后,精子可被激活,出现运动现象^[8]。但是,当NaCl浓度达4.0%时,滴加去离子水不能激活大口胭脂鱼精子,认为这可能是由于高渗环境,精子自身能量全部用于调节渗透压,从而导致死亡。而用1.0% NaCl溶液对胭脂鱼精子进行短期保存是否可达到较好的结果尚待进一步研究。

该研究中的保存液C是在人工精浆B的基础上添加了葡萄糖和链霉素。葡萄糖的添加量为0.1 mol/L,链霉素的添加量为80万IU/L。连晋等用人工精浆B添加抗生素在大银鱼精子保存的研究中曾有较好的效果^[10]。另外,严安生等对钙、镁离子对对鲤、团头鲂的研究表明,单糖对精子的活力

(下转第1133页)

在解剖镜下呈分枝絮状结构,大颚器呈淡土黄色。

表5 处理组和对照组的精母细胞直径比较

Table 5 Comparison of the maximal spermatocyte diameters between the treated and control groups

组别 Group	精母细胞最大直径 μm Maximal spermatocyte diameter
对照组1 Control group 1	10.29 \pm 1.00
处理组1 Treated group 1	13.09 \pm 0.75
对照组2 Control group 2	10.02 \pm 0.68
处理组2 Treated group 2	12.93 \pm 0.98

由于发育较好的大颚器细胞能够在体外合成与分泌出浓度相对较高的激素——MF^[8],因此该研究采用发育相对成熟(发育中后期)的克氏原螯虾大颚器去刺激发育相对不成熟(发育早期或中期)的性腺,以到达促进性腺发育的目的。通过石蜡切片观察可知:卵巢处理组的最大卵径为(0.32 \pm 0.05) mm和(0.27 \pm 0.06) mm,对照组的最大卵径为(0.24 \pm 0.05) mm和(0.20 \pm 0.05) mm;精巢处理组的精母细胞直径为(13.09 \pm 0.75) μm 和(12.93 \pm 0.98) μm ,对照组的精母细胞直径为(10.29 \pm 1.00) μm 和(10.02 \pm 0.68) μm 。试验数据显示克氏原螯虾大颚器能够在离体的情况下刺激未发育成熟或还处于发育早期的性腺。经大颚器处理过的性腺组织,其性腺细胞的体积显著增大,且大颚器使性腺细胞朝着更为成熟的生长阶段发育,再一次验证了克氏原螯虾大颚器在卵巢发育中的促性腺作用^[5]。同时该研究还进一步证实了大颚器对精巢发育的刺激作用。锯缘青蟹大颚器在离体条件下对卵巢和精巢的发育也具有同样的调节作用^[9-10]。

对雌性克氏原螯虾大颚器合成激素 MF 的研究表明:MF 与促进卵黄发生密切相关^[8]。通过全年跟踪测定雌性和雄性中华绒螯蟹大颚器激素 MF 的分泌量,发现 MF 在早期发育阶段的过量分泌是导致中华绒螯蟹性早熟的内分泌因素,表明蟹类的大颚器功能性物质具有促进性腺成熟的作用^[11]。国外大量研究认为甲壳动物 MF 的功能与昆虫的 JH

(上接第1123页)

有影响,能为保存液中的精子提供营养物质^[15]。可是,笔者试验中在人工精浆 B 的基础上所配制的 C 液却没有达到较好的结果,甚至产生了反作用,其原因尚待进一步研究。

综上所述,采用精子保存液低温保存胭脂鱼精子的方法是切实可行的。在低温(0~4℃)条件下,用保存效果较好的 B 液可以使精子活率 80% 左右持续至 120 h, D 液亦能使精子活率 80% 左右持续至 84 h,基本可满足胭脂鱼人工繁殖的需求,可以在胭脂鱼繁殖时人工授精使用。鉴于胭脂鱼卵的成熟度不同,多次采卵的时间可长达 10 h,精子保存液的使用方便了操作,建议在人工繁殖时,用保存液 B 对胭脂鱼的精子进行保存,且在 40 h 内使用。

参考文献

- [1] 张春光,赵亚辉,康景贵.我国胭脂鱼资源现状和其资源恢复途径的探讨[J].自然资源学报,2000,15(2):155-159.
- [2] 张春光,赵亚辉.胭脂鱼的早期发育[J].动物学报,2000,46(4):438-447.

相似,同样具有调控生殖和变态的作用^[12-15],因此, MF 被认为是甲壳动物的 JH。该研究对克氏原螯虾大颚器与性腺(精巢与卵巢)的离体培养试验充分表明克氏原螯虾大颚器激素具有刺激性腺细胞生长发育的作用,支持甲壳动物大颚器作为促性腺生长发育腺体的观点,研究结果还为在生产上应用激素调控克氏原螯虾的性腺发育或人工诱导同步产卵技术提供了强有力的理论依据。

参考文献

- [1] NAGARAJU G P C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone[J]. Aquacul., 2007, 272: 39-54.
- [2] LAUFER H, BORST D W, BAKER F C, et al. Identification of juvenile hormone like compound in a crustacean[J]. Science, 1987, 235: 202-205.
- [3] HOMOLA E, CHANG E S. Methyl farnesoate: Crustacean juvenile hormone in search of function[J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 117(3): 347-356.
- [4] 陆剑锋, 赵维信. 十足目甲壳动物生殖激素对卵巢的作用及其调控[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(2): 166-171.
- [5] 赵维信, 李胜. 克氏原螯虾大颚器对卵巢发育的影响[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 229-233.
- [6] 赵维信, 李胜. 克氏原螯虾大颚器的超微结构研究[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 303-308.
- [7] 赵维信, 陆剑锋. 早熟和正常中华绒螯蟹大颚器官发育及超微结构[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(1): 5-9.
- [8] 赵维信, 白桦. 克氏原螯虾大颚器合成甲基法尼酯的研究[J]. 水产学报, 2001, 25(3): 193-196.
- [9] 陈锦民, 叶海辉, 黄辉洋, 等. 锯缘青蟹大颚器对精巢发育的调节作用: 离体研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(SI): 139-141.
- [10] 黄辉洋, 叶海辉, 李少菁, 等. 锯缘青蟹大颚器对卵巢发育的调节作用: 离体研究[J]. 台湾海峡, 2003, 22(3): 295-298.
- [11] 赵维信, 陆剑锋. 中华绒螯蟹大颚器激素生物合成与性早熟的关系[J]. 水产学报, 2003, 27(4): 289-295.
- [12] WYATT G R, DAVEY K G. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. : Roles of juvenile hormone in adult insect[J]. Adv Insect Physiol, 1996, 26: 1-56.
- [13] REDDIFORD L M. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. : General consideration prenatantropic actions[J]. Adv Insect Physiol, 1994, 24: 213-273.
- [14] NAGARAJU G P C, SURAJ N J, REDDY P S. Methyl farnesoate stimulates gonad development in Microbrachium nelsonii Milne Edwards[J]. Crustaceana, 2003, 76(10): 1171-1178.
- [15] KWOK R, ZHANG J R, TOBE S S. Regulation of methyl farnesoate production by mandibular organs in the crayfish, Procambarus darwini: a possible role for allatostatins[J]. J Insect Physiol, 2005, 51(4): 367-378.

- [3] 周亮. 胭脂鱼人工繁殖技术研究[J]. 淡水渔业, 1995(1): 31-32.
- [4] 万松良, 裴家田, 刘兴国. 胭脂鱼人工繁殖和鱼苗培育的初步研究[J]. 水利渔业, 2002(2): 1-2.
- [5] 刘乐和. 胭脂鱼生物学特征的研究[J]. 水利渔业, 1996(3): 3-6.
- [6] 胡隐昌. 胭脂鱼的主要生物学[J]. 珠江水产, 2001(2): 33-35.
- [7] 余志堂, 陈金生, 刘家寿. 胭脂鱼人工繁殖和资源增殖的研究[J]. 水利渔业, 1993(2): 5-9.
- [8] 赵亚龙, 赵守城, 李冀. 大口胭脂鱼精子在不同浓度氯化钠溶液中活力的观察[J]. 河北渔业, 2000(3): 15-17.
- [9] 连晋, 王栓文. 虹鳟精子液态低温保存方法的研究[J]. 淡水渔业, 1999(12): 16-17.
- [10] 连晋, 雷普勋. 精子保存方法在大银鱼人工繁殖中的应用研究[J]. 科学养鱼, 2001(1): 34.
- [11] 陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鲤、鲢、鳙精子低温短期保存研究[J]. 淡水渔业, 1992(3): 3-7.
- [12] 沈建忠, 江庆. 南方鲇精子保存方法的初步研究[J]. 水利渔业, 2002, 22(5): 13-15.
- [13] 潘德博, 许淑英, 叶星, 等. 广东鲂精子生物学特性的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 111-113.
- [14] 严安生, 李诗模, 王其和. 鲤鱼与团头鲂精子生理生态特性的研究. 钙、镁对精子活力的影响[J]. 淡水渔业, 1993(5): 5-7.
- [15] 严安生, 宋贵文, 闫拥军. 鲤、团头鲂精子生理生态特性的研究. 单糖和渗透压对精子活力的影响[J]. 淡水渔业, 1995(2): 3-5.