

九孔鲍精子短期保存技术研究

蔡明夷^{1,2}, 柯才焕¹, 王桂忠¹, 郭峰¹, 郑云¹, 游伟伟¹, 许贻斌¹

(1. 厦门大学海洋系, 福建 厦门 361005; 2. 集美大学水产生物技术研究, 福建 厦门 361021)

摘要: 应用单因素试验和三因素正交试验研究了温度、二甲基亚砜(DMSO)浓度及精子密度等因素对九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)精子短期保存的影响。单因素试验结果表明: DMSO、维生素C、甘油、葡萄糖等添加剂中仅5%和7.5% DMSO有利于精子活力的保持; 3个试验温度中28℃精子活力下降速度最快, 其次为1℃, 最慢是5℃; 稀释度越高精子活力下降速度越快。正交试验中, 九孔鲍精液分别在25个保存条件下保存96 h, 保存期间每隔一段时间取样观察精子活力。25个处理的活力变化数据用生长函数拟合, 根据拟合方程计算出精子活力半衰期, 并对结果进行直观分析及方差分析。结果表明, 较理想的精子保存条件是: 温度为7℃, DMSO质量分数为3%, 精子密度为 7.5×10^8 个/mL; 各因素对精子活力半衰期的影响按精子密度、温度、DMSO密度顺序递减; 精子密度对精子活力半衰期有显著影响($P < 0.05$), 温度及DMSO浓度的影响不显著($P > 0.05$)。

关键词: 九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*); 精子保存; 正交试验; 精子密度; 二甲基亚砜; 温度

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)01-0001-05

精子保存技术的研究对于海水养殖贝类苗种生产、种质资源的保存以及遗传育种操作均具有重要意义。目前贝类精子保存技术的研究相对较少, 涉及的种类主要有牡蛎^[1,2]、鲍^[3-5]及扇贝^[6,7]等。九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)是中国最重要的海水养殖种类之一。Matsunaga等^[3]最早研究鲍的精液超低温保存技术, 他们在-75℃保存*H. gigantean*和*H. discus*的精子, 室温融化后授精孵化出0~93%的幼体。Tsai等^[4]液氮保存九孔鲍精子1年, 授精后仍有89.1%的孵化率。Gwo等^[5]又针对九孔鲍精子超低温保存, 进一步筛选了抗冻剂并优化了精子超低温保存的降温速度。虽然九孔鲍精子超低温保存已取得突破, 但这项技术操作程序要求严格, 较难在苗种生产现场推广。精液的短期保存是指利用降温、添加保护剂等措施将精子寿命延长数小时至数十小时的技术。虽然精液短期保存的期限远不如超低温保存, 但是足以解决九孔鲍苗种生产过程中雌雄配子排放不同步的问题, 且具有操作简便易行的优点, 适合在养殖场现场中应用。作者研究了温度、二甲基亚砜(DMSO)浓度及精子密度3个因素对精子短期保存的影响, 并在单因素试验基础上应用正交设计研究温度、DMSO浓度及精子密度三因素对九孔鲍精液保存活力变化的影响, 以期得到一种简便的、适合在苗种生产现场使用的九孔鲍精液保存方法。

1 材料与方法

1.1 亲鲍和催产

实验用鲍采用雄性成熟个体。九孔鲍采自东山县海田公司亲营养殖场, 年龄1~2龄。采用阴干、紫外线照射海水、升温刺激催产。将正在排放精液的雄鲍取出, 贝壳朝下放置在盛有少许海水的培养皿上, 在几分钟内收集到高浓度的精液。收集好的精液用血球计数板计数。除特别说明外, 精液的保存密度均为 1.25×10^7 个/mL。

1.2 精液保存

1.2.1 单因素试验

添加剂试验: 在1.5 mL离心管中加入0.75 mL 2倍于设定浓度的DMSO、维生素C(Vc)、甘油、葡萄糖, 然后分别加入0.75 mL精液, 混匀, 4℃下保存。

保存温度试验: 分装在1.5 mL离心管的精液分别在1, 5, 28℃下保存。

稀释度试验: 解剖获得的精子, 密度为 2.0×10^{10} 个/mL, 用膜滤海水0倍、10倍、20倍、40倍稀释后, 4℃下保存。

收稿日期: 2005-07-06; 修回日期: 2005-11-01

基金项目: 国家863计划资助项目(2003AA603240)

作者简介: 蔡明夷(1973), 女, 福建泉州人, 博士生, 主要从事海洋生物技术研究, 电话: 0592-2187420, E-mail: mycai@yanan.xmu.edu.cn; 柯才焕, 通讯作者, E-mail: chke@xmu.edu.cn

1.2.2 三因素正交试验

温度、DMSO 浓度和精子密度等 3 个因素的 5 个水平设置如表 1 所示。试验水平设计参照正交设计表 $L_{25}(5^6)$ 。按正交设计表在 1.5 mL 离心管中加入 0.75 mL 2 倍于设定浓度的 DMSO 海水溶液。九孔鲍精液经梯度稀释, 调整到设定浓度的 2 倍, 并按每管 0.75 mL 分配到相应的离心管中, 分别放置在设定试验温度下保存。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels of treatment

水平	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	DMSO 质量分数 (%)	精子密度 (个/mL)
1	1	0	7.80×10^8
2	3	3	3.75×10^7
3	5	6	1.88×10^8
4	7	9	9.38×10^7
5	9	12	4.69×10^7

1.3 精子运动能力的观察与计算

每隔 1 段时间取样 1 次, 在显微镜下观察精子运动能力。按运动速度和方式将精子活力状况分为 5 级, 并分别记分。其中, 快速游动分值为 4; 缓慢游动分值为 3; 跳跃游动分值为 2; 原地颤动分值为 1; 静止不动分值为零。各精液样本的活力指数按下式计算:

$$I = \sum_{i=1}^4 (K_i \times P_i)$$

其中, I 为精子活力指数, K_i 为精子活力分值, P_i 为该分值精子的百分数。

1.4 精子半衰期的计算

各保存精液样本的活力变化数据以保存时间(x)、精子活力指数(y), 用 SPSS 11.0 软件中生长函数($y = ae^{kx} + k$) 拟合^[8]。根据拟合方程计算各精液样本活力半衰期, 即活力指数下降为起始活力 50% 的时间。

1.5 数据分析

正交试验数据用 SPSS 11.0 方差分析检验保存温度、DMSO 浓度及保存精液的密度不同水平间差异的显著性。

2 结果

2.1 添加剂对精子短期保存的影响

DMSO、Vc、甘油、葡萄糖等添加剂对 4°C 下保存 11 h 精子活力的影响如图 1 所示。与对照组相比, 仅 5% 及 7.5% 的 DMSO 有正向效果, Vc、甘油、葡萄糖均不利于精子活力的保持。

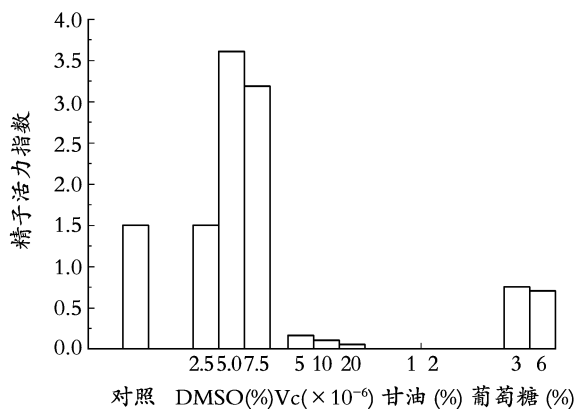


图 1 添加剂对 4°C 下保存 11 h 精子活力的影响
Fig. 1 The effect of extender on the viability of sperm stored at 4°C for 11 h

2.2 保存温度对精子短期保存的影响

1, 5, 28°C 下保存精子的活力变化如图 2 所示。精子活力下降速度的顺序是 28°C 最快, 其次是 1°C , 然后是 5°C 。在 28°C 下保存 7 h, 活力就下降为起始的 5%。

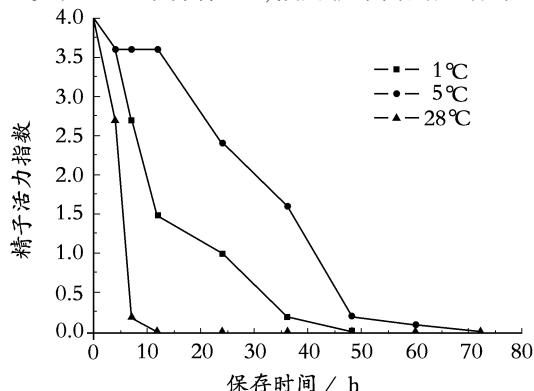


图 2 保存温度对精子活力下降速度的影响
Fig. 2 The effect of storage temperature on the speed of decay of sperm viability

2.3 精子稀释度对精子短期保存的影响

0 倍、10 倍、20 倍和 40 倍稀释的精子, 其活力变化如图 3 所示。精子活力下降的速度随着稀释度的提高而加快。

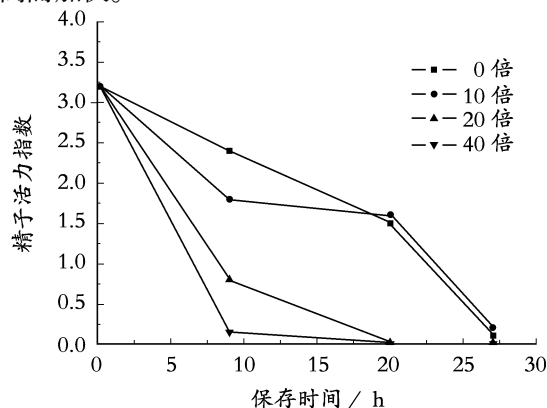


图 3 精子稀释度对精子活力下降速度的影响
Fig. 3 The effect of dilution of sperm on the speed of decay of sperm viability

2.4 温度、DMSO 和精子密度 3 因素正交试验

3 因素 5 水平试验中,精子活力均随保存时间的延长而下降,但是下降的速度各不同。各处理水平试验结果用一阶生长函数拟合,得到 25 个回归方程,回归系数及 R^2 值如表 2 所示。

根据回归方程计算出各处理水平精子活力下降至起始时的 50% 的时间(半衰期),结果如表 2 所示。

表 2 正交试验九孔鲍精子活力回归方程参数及半衰期

Tab. 2 The parameters of the fit equations and the half life of small abalone sperm in the orthogonal experiment

处理 编号	温度 (℃)	DMSO (%)	精子密度 (个/ mL)	$y= ae^b + k$				半衰期 (h)
				a	b	k	R^2	
1	1	1	1	- 0. 04	3. 72	6. 94	0. 99	4. 87
2	1	2	2	- 0. 02	3. 64	5. 43	1. 00	3. 76
3	1	3	3	- 0. 06	3. 80	8. 46	0. 98	6. 05
4	1	4	4	- 0. 07	3. 88	9. 18	0. 97	6. 71
5	1	5	5	0. 01	3. 58	3. 95	1. 00	2. 75
6	2	1	2	- 0. 19	3. 73	28. 88	0. 99	18. 11
7	2	2	3	0. 00	3. 16	22. 40	0. 92	12. 62
8	2	3	4	- 0. 05	3. 62	14. 37	0. 98	9. 68
9	2	4	5	0. 09	3. 49	4. 03	0. 98	2. 87
10	2	5	1	- 0. 35	4. 34	32. 19	0. 93	22. 64
11	3	1	3	- 0. 15	4. 07	22. 35	0. 98	16. 40
12	3	2	4	0. 10	3. 83	15. 85	0. 94	12. 87
13	3	3	5	0. 05	3. 54	3. 99	0. 99	2. 81
14	3	4	1	- 1. 01	4. 89	57. 70	0. 97	31. 85
15	3	5	2	- 0. 44	4. 36	31. 73	0. 97	21. 20
16	4	1	4	- 0. 12	4. 02	14. 93	0. 95	11. 02
17	4	2	5	0. 01	3. 42	9. 75	0. 96	6. 28
18	4	3	1	- 34. 20	38. 09	822. 21	0. 96	46. 45
19	4	4	2	- 0. 17	3. 54	32. 04	0. 98	18. 81
20	4	5	3	- 0. 02	3. 66	10. 81	0. 99	7. 56
21	5	1	5	0. 02	3. 58	2. 22	1. 00	1. 56
22	5	2	1	- 5. 28	9. 25	153. 37	0. 95	41. 09
23	5	3	2	0. 24	3. 39	12. 86	0. 95	9. 96
24	5	4	3	- 0. 15	3. 70	19. 63	0. 95	12. 51
25	5	5	4	0. 00	3. 70	12. 53	0. 99	8. 99
I	24. 15	51. 95	146. 91					
II	65. 92	76. 61	71. 83					
III	85. 13	74. 95	55. 14					
IV	90. 12	72. 75	49. 28					
V	74. 11	63. 15	16. 26					
极差	65. 99	24. 67	130. 65					

温度、DMSO 浓度、精子密度 3 个因素精子活力半衰期的最大值分别在第Ⅱ、第Ⅳ和第Ⅰ 水平。可见,精子保存的适宜条件是 7℃、DMSO 质量分数为 3%、精子密度为 7.5×10^8 个/ mL。根据极差可以看出各因素对精子活力半衰期的影响大小按精子浓度、温度、DMSO 浓度顺序递减。

正交试验的方差分析结果如表 3 所示, 3 个试验因素中仅精子密度对精子活力半衰期有显著影响 ($P < 0.05$), 温度及 DMSO 浓度的影响无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Results from ANOVA

来源	离差平方和	自由度	方差	F	显著性
温度	551.7	4	137.9	2.2	0.133
DMSO 浓度	85.5	4	21.4	0.3	0.847
精子密度	1 889.0	4	472.3	7.5	0.003
误差	760.2	12	63.4		

3 讨论

精子排放到海水中, 随着时间的延长活动能力及受精能力逐渐下降。精子的寿命受盐度、温度、含氧量、有机物和 pH 等因素的影响。在本研究优化的保存条件下, 精子活力半衰期可达 46.5 h, 比 28℃ 下保存延长了 43 h, 基本解决了九孔鲍种苗生产及遗传操作中精卵排放不同步的问题。

DMSO 及甘油是鱼类及贝类精子冷冻保存常用的 2 种抗冻剂。不同种类水生无脊椎动物精子的适宜抗冻剂种类及浓度不同^[9]。本研究单因素试验结果表明, 5%~7.5% 的 DMSO 有利于低温条件下精子活力的保持, 而精子在添加 1%~2% 甘油的海水中保存 11 h 后就完全丧失活力; 正交试验结果也表明 3%~9% 的 DMSO 可以延长九孔鲍精子寿命。这个结果与 Tsai 等^[4] 和 Gwo 等^[5] 的研究结果相似。

鱼类或贝类精子冻存的基础液中有时会添加葡萄糖、蔗糖、柠檬酸钠、海藻糖等添加剂。Tsai 和 Chao^[4] 研究表明, 在海水中添加 8% DMSO+50 g/L 葡萄糖及 8% DMSO+50 g/L 蔗糖处理组的保存效果均优于 8% 的 DMSO 处理组。但是作者研究结果表明, 单纯添加 30~60 g/L 葡萄糖反而缩短九孔鲍精子寿命。无脊椎动物利用外源能源物质的能力较差^[10], 葡萄糖对精子保存的作用原理可能是调节渗透压。

降低温度可以降低新陈代谢率, 抑制微生物的增殖, 有利于精子活力的保持。本研究单因素和正交试验结果均表明, 一定范围内降低保存温度有利于精子活力保持, 但温度太低反而不利于精子活力保存。这可能是温度在冰点附近, 细胞内会局部形成冰晶, 损伤细胞内部结构。

本研究中单因素和正交试验结果均表明, 精子

密度越高, 活力保持越长。这种现象同样见于其他无脊椎动物, 如牡蛎^[11]、海胆^[12]。Chia 等^[12] 将精子寿命与浓度的关系称作“呼吸稀释作用”。他们认为, 由于精子存活期间消耗的氧是固定的, 浓度高的精液会降低体系溶解氧, 有利于保存精子的能量物质。Paniagua Chavez 等^[11] 则认为高浓度的精子减少了精子运动的空间, 降低了精子能量物质的消耗。这些理论都可以用来解释本实验结果。

参考文献:

- [1] Lannan J E. Experimental self fertilization of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, utilizing cryopreserved sperm[J]. **Genetics**, 1971, 68: 599-601.
- [2] Yankson K, Moyse J. Cryopreservation of the spermatzoa of *Crassostrea tulipa* and three other oysters[J]. **Aquaculture**, 1991, 97: 259-267.
- [3] Matsunaga H, Iwata N, Kurokura H, et al. A preliminary study about cryopreservation of abalone sperm[J]. **J Fac Appl Biol Sci Hiroshima Univ**, 1983, 22: 135-139.
- [4] Tsai H P, Chao N H. Cryopreservation of small abalone sperm—technique and its significance[J]. **J Fish Soc Taiwan**, 1994, 21(4): 347-360.
- [5] Gwo J C, Chen C W, Cheng H Y. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor super-texa*) [J]. **Theriogenology**, 2002, 58 (8): 1563-1578.
- [6] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究[J]. **海洋与湖沼**, 1999, 30: 624-628.
- [7] 李纯, 李军, 薛钦昭. 栉孔扇贝精子的超低温保存研究[J]. **海洋水产研究**, 2000, 21: 57-62.
- [8] Jensen J O T, Alderdice D F. Effect of temperature on short term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) [J]. **Aquaculture**, 1984, 37: 251-265.
- [9] Gwo J C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review[J]. **Aquaculture Res**, 2003, 31: 259-271.
- [10] Morisawa M. Cell signaling mechanisms for sperm motility[J]. **Zool Sci**, 1994, 11: 647-662.
- [11] Paniagua Chavez C G, Buchanan J T, Tiersch T R. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm[J]. **J Shellfish Res**, 1998, 17 (1): 231-237.
- [12] Chia F S, Bickell L R. Echinodermata[A]. Adiyodi K G. Reproductive biology of invertebrates. Volume II: Spermatogenesis and sperm function[C]. New York: John Wiley and Sons Ltd, 1983. 545-620.

Semen short-term storage of the small abalone

CAI Ming-yi^{1,2}, KE Cai-huan¹, WANG Gui-zhong¹, GUO Feng¹, ZHENG Yun¹, YOU Wei-wei¹, XU Yi-bin¹

(1. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Received: Jul., 6, 2005

Key word: *Haliotis diversicolor supertexta*; sperm storage; orthogonal experiment; sperm concentration; DMSO; temperature

Abstract: The effects of sperm concentration, temperature and DMSO concentration on the decay of sperm viability of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* were determined. The results of one-factor experiment showed: All the test extenders had negative effects on the life of small abalone sperm, except for 5% DMSO and 7.5% DMSO; Among the three test temperatures, the rank of decay speed of sperm motility score was 28, 1, 5 °C; The decay speed increased with the dilution increase. A 3-factor and 5-level orthogonal experiment was designed based on the results of one-factor experiment. 25 aliquots of small abalone semen were stored separately for intervals up to 96 h. The data of sperm viability score in 25 given conditions were fit into 25 equations with a growth model. The half-lives of sperm in the 25 kinds of storage conditions were estimated with the equations. The results show that the optimal store condition was at sperm concentration of 7.5×10^8 sperm/mL in seawater with 3% DMSO at the temperature of 7 °C. Among the three factors, the most important one was sperm concentration, and then storage temperature, the last one was DMSO concentration. The results of ANOVA showed that the effect of sperm concentration on half life of sperm was significant ($P < 0.05$), while the effects of temperature and DMSO concentration were not significant.

(本文编辑: 张培新)