

家鱼冷冻精液激活、授精方法的研究^{*†}

陈松林 刘宪亭 鲁大椿 章龙珍 傅朝君^{*‡} 方建平

(长江水产研究所, 沙市 434000)

提 要 激活—授精溶液渗透压对家鱼冻精的能育性有明显影响。当用 1 毫升冻精与 4 毫升卵子授精时,冻精与鲜卵在水中与在 171 和 342 mOsm/l NaCl 溶液中的受精率均很高(91%左右),无明显差别;当精卵量比为 1:16 时,在水中的受精率明显低于在上述 NaCl 溶液中的受精率;当精卵量比升高到 1:32 以上时,冻精在 171mOsm/l 溶液中的受精率明显高于其它二组。鲢卵在 171 和 342 mOsm/l 溶液中维持受精能力的有效时间(6 分钟)明显长于在淡水中(2 分钟)。当精子稀释液的 pH 值偏碱(8.7)和冻精激活—授精溶液偏酸(pH6.3)时,冻精的受精率明显下降。解冻后精子在 4°C 存放 1.5 小时活力和受精率下降不多,少数冻精可存活长达 16 小时。冻精活力与受精率之间存在着明显正相关,相关系数为 0.97,回归方程为 $Y=3.68+1.23X$ 。

关键词 家鱼,冷冻精液,激活,授精,受精率

鱼类精液的冷冻保存,经过三十多年的努力已取得很大进展。在鲢鳙鱼类和某些海水鱼类,用冷冻精液曾获得过近似鲜精的受精率(Mounib, 1978; Stoss 等, 1983; Chao 等, 1986)。而在鲤科鱼类,迄今尚未见到如此理想的结果报道。Kurokura 等(1984)液氮保存鲤精 342 天,冻精受精率为 25.5~31.5%;王祖昆等(1984)用冷冻保存的草鱼、鲢和鳙鱼精液授精,分别获得 44.2%, 32.6% 和 13.6% 的平均受精率;张轩杰等(1987)短期液氮保存鲤精,最高冻精受精率达 66.5%。在限制鲤科鱼类精液冷冻技术发展的因子中,冻精解冻激活与授精方法是个很重要的环节。如果这一步掌握不好,即使前面各步都很成功,也很难获得理想的冻精受精率。由于激活—授精方法不当,有时尽管获得较高的冻精活力,但受精率仍然不高(Cognie 等, 1989)。已有研究表明,由于经过二甲亚砜的作用及冷冻过程的处理,鱼类冻精的生理特性(渗透压、活力及寿命)发生了变化(Stoss 等, 1983; 陈松林等, 1987),因而鲜精的激活授精方法对于冻精已不再合适。因此,根据冻精的生理特性,寻找有效的激活授精方法,乃是提高冻精受精率与完善冷冻保存技术的关键之一。

本文以草鱼、鲢和团头鲂精液为材料,研究了激活溶液渗透压、pH 值以及解冻后存放时间对冻精受精率的影响;比较了不同盐度溶液对家鱼卵能育性的影响。旨在摸索出一套适合鲤科鱼类冷冻精液的激活—授精方法。

材料与办法

草鱼、鲢和团头鲂精液采自本所窑湾试验场。精液收集、活力评价及冷冻保存等均按

*1 国家“七五”科技攻关课题。郭峰和邓文涛参加部分工作。

*2 现在青岛水科院渔业工程研究所。

收稿年月:1991 年 11 月;1992 年 6 月修改。

陈松林等(1992)报道的方法进行。稀释液为自制的 D-15 (成分为 0.8% NaCl, 0.05% KCl 和 1.5% 葡萄糖)和 D-17 (含 0.9% NaCl, 0.05% KCl 和 1.5% 葡萄糖)。抗冻剂为二甲亚砜(DMSO)。将精子用预冷的稀释液—DMSO 混合物按 1:1.5 稀释, DMSO 的终浓度为 10% 左右。将稀释好的精液分装入带盖塑料管中并在 4°C 平衡数分钟, 然后进行冷冻保存。冷冻时分二步将精样放入液氮中进行短期或长期保存。解冻采用温水浴(38°C 左右)快速摇动解冻法。解冻后, 用一定浓度 NaCl 溶液激活冻精, 在 Nikon 倒置显微镜下观察精子活力及寿命。

冻精在不同渗透压或不同 pH 值激活溶液中的授精实验, 是将冻精与鲜卵混匀后添加适量渗透压或 pH 值不同的 NaCl 溶液激活授精, 5 分钟后再用同样溶液清洗二次, 然后加水孵化。胚胎发育至原肠中期(草鱼和鲢)或眼点出现期(团头鲂)计算受精率。渗透压值是根据溶液的 NaCl 浓度计算而来。

盐度对家鱼卵能育性的影响实验, 是预先在培养皿中加入一定量水或 NaCl 溶液, 再将一定量未受精卵浸泡其内, 间隔一定时间后去掉部分溶液, 加入一定量经过 DMSO 处理过的精液, 摇匀受精后, 加水孵化。

解冻后存放时间对冻精受精率影响的实验, 是将解冻后精液置冰箱(4—8°C)中存放, 间隔一定时间后镜检精子活力并与鲜卵授精。在精子活力与受精率关系的实验中, 不同活力组冻精与鲜卵的授精量比均基本保持一致。

实验数据用 Student t-检验评价均值差异显著性程度。

结 果

(一) 激活溶液渗透压对冻精能育性的影响

激活—授精溶液的渗透压对团头鲂和鲢冻精受精能力的影响结果分别见图 1 和表 1。

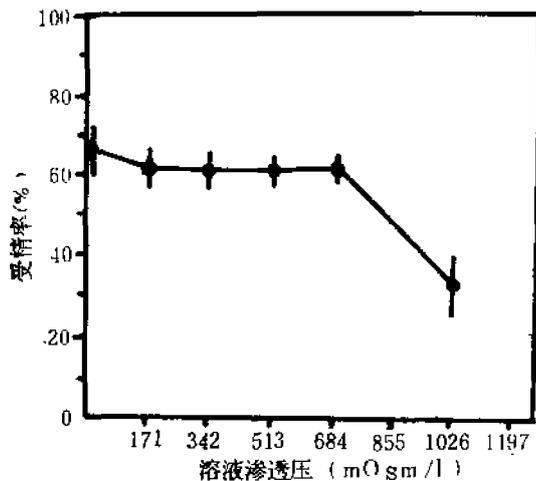


图 1 激活—授精溶液渗透压对团头鲂冻精受精率的影响(稀释液为 D-15, 精卵授精量比为 0.2ml 冻精:300—400 卵)

Fig. 1 Effect of osmolality of activating-inseminating solution on fertility of blunt snout bream frozen sperm (0.2ml frozen sperm:300—400 eggs. Diluent D-15 was used)

由图 1 可见,当冻精用量足够大时(0.2ml 冻精与 300~400 颗卵授精),团头鲂冻精与鲜卵在水中与在渗透压为 171~684mOsm/l(相当于 0.5~2.0%)NaCl 溶液中的受精率相差不多,前者甚至还稍高一些。而当激活溶液的渗透压由 684 升高到 1026mOsm/l (3.0%)时,冻精的受精率才明显下降。表 1 主要为不同精卵量比在不同渗透压溶液中的受精率比较,结果表明,当用 1ml 鲢冻精(内含 0.4ml 原精)与 4ml 卵子授精时,在水中与在 171~342mOsm/l NaCl 溶液中的受精率均很高,其间差异不大。而当卵子用量增大时,即精卵量比升高到 1:16 时,在水中的受精率则明显低于在上述 NaCl 溶液中的受精率。不过,当精卵量比过高时(1:32 以上),只有 171mOsm/l NaCl 溶液产生明显高的受精率。

表 1 激活溶液渗透压对鲢冻精受精率的影响(稀释液为 D-15,精液与稀释液之比为 1:1.5,冻精活力为 65%左右)。

Table 1 Effect of osmolality of activator solution on fertility of frozen-thawed silver carp sperm (Diluent D-15 was used, sperm-diluent ratio was 1:1.5; motility of frozen sperm was about 65%).

受精率 渗透压 mOsm/l	精卵比例 (%)	1:4	1:16	1:32	1:50	1:64
0		92.5 (66.7)	55.6 (95.3)	46.2 (93.0)	41.0 (90.8)	34.7 (85.9)
171		90.5 (72.4)	81.5 (93.9)	80.1 (94.2)	76.8 (90.8)	64.6 (85.9)
342		91.7 (73)	71.6 (85.1)	55.4 (94.6)	47.1 (96.6)	37 (85.5)

注:括号内为孵化率(%)。

(二) 渗透压对家鱼卵能育性的影响

家鱼卵在不同渗透压溶液中浸泡后其能育性的变化结果见图 2。当未受精卵在水中(渗透压为 0)浸泡时间超过 2 分钟时,受精能力明显下降,至 4 分钟时,受精率降为约 25%。而当卵子浸泡在渗透压为 171 或 342 mOsm/l 的 NaCl 溶液中长达 6 分钟时,受精率没有明显下降,在后者溶液中至 15 分钟时,受精率才大幅度下降为 20% 左右。

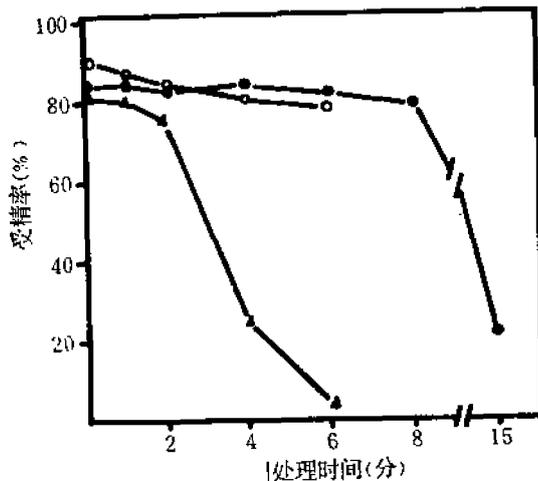


图2 鲢卵在不同渗透压溶液中浸泡时间与受精率的关系(鲜精预先经8% DMSO处理30分钟)

Fig. 2 Effect of osmolality and treatment time on fertility of silver carp egg.

(Sperm used was treated with 8% DMSO for 30 min before insemination)

▲—▲ 0, ●—● 171mOsm/l, ○—○ 942mOsm/l

(三) 溶液 pH 值对冻精能育性的影响

精子冷冻保存稀释液和冻精激活溶液的 pH 值对冻精受精能力均有一定影响。现将
在团头鲂上获得的结果列于表 2。由表 2 可见,当稀释液(D-15) pH 在 5.2—7.8 之间

表 2 稀释液和激活溶液 pH 对团头鲂冻精受精率的影响。

(结果为 3 次试验的平均值。每次授精用卵 250—300 粒)

Table 2 Effect of solution pH on fertility of blunt snout bream frozen thawed sperm
(Data are means of three replicate. Each replicate was carried out with 250—300 eggs)

受精率(孵化率)% 稀 释 液	激 活 液				X ± S. D. (%)	P ^(a)
	pH6.3	pH7.9	pH8.5	pH10.8		
pH5.2	74.2 (82.5)	79.3 (84.5)	83.2 (83.3)	85.2 (75.9)	81.9 ± 5.3 (81.5 ± 3.3)	
pH6.5	75.1 (80.6)	79.3 (79.2)	83.4 (82.2)	81.2 (81.3)	79 ± 3.1 (82.9 ± 3.5)	P > 0.05
pH7.8	81.5 (76.2)	77.3 (77.7)	82.7 (80.6)	82.2 (75.1)	80.9 ± 2.1 (77.4 ± 2.1)	P > 0.05
pH7.8	75.0 (82.6)	81.6 (68.4)	79.4 (74.1)	82 (85.5)	79.5 ± 2.8 (77.7 ± 6.8)	P > 0.05
pH8.7	68.4 (65.9)	66.1 (84.3)	72.0 (72.1)	74.1 (79.7)	70.2 ± 3.1 (75.5 ± 7.1)	P < 0.01
X ± S. D. (%)	71.0 ± 4.1 (79.2 ± 7.7)	79.5 ± 1.5 (78.8 ± 5.9)	81.1 ± 5.3 (78.4 ± 4.5)	80 ± 3.7 (79.5 ± 3.8)		
P ^(b)	P < 0.05	P > 0.05		P > 0.05		

注:(a)与 81.9 ± 5.3 相比;(b)与 81.1 ± 5.3 相比。

时,对冻精受精率影响不大,而当稀释液 pH 达 8.7 时,则明显降低冻精受精率。当冻精激活—授精溶液 pH 在 7.9—10.8 之间时,冻精受精率差异不大,而当其 pH 偏酸性(6.3)时,对冻精受精率有明显影响。不过,无论是稀释液还是激活溶液的 pH 值对冻精授精胚胎的孵化率均无明显影响。

(四) 激活—授精溶液的添加量对冻精受精率的影响

用鲢冻精 0.2ml 与 2ml 鲜卵授精,授精时添加不同量的 0.5% NaCl 溶液激活精子。结果表明激活溶液的添加量不同对冻精受精率有一定影响(图 3)。当卵子用量为 2 ml 时,添加 1ml 激活溶液所获得的受精率最高,而激活溶液的添加量过多(4ml)或过少(0.5ml)都会降低冻精的受精率。

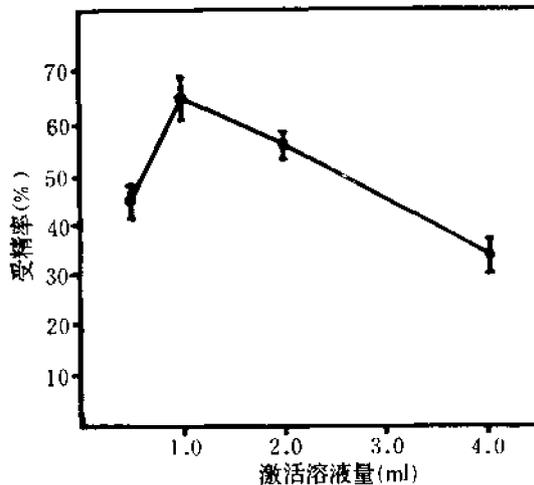


图 3 鲢冻精授精时激活溶液的添加量对受精率的影响(每次授精时冻精用量为 0.2ml, 卵子用量为 2ml)

Fig.3 Effect of activating solution quantity on fertility of silver carp frozen sperm (0.2ml frozen sperm and 2 ml eggs were used in each experiment)

(五) 解冻—授精间隔时间对冻精活力及受精率的影响

鲢冷冻精液解冻后在低温下(4°C)存放时间对活力的影响示于图 4。由图 4 可见,解冻后 1.5 小时内精子活力下降不多,有大约 30% 的冻精可以存活约 6 小时,还有少数精子可存活 16 小时之久。表 3 结果表明解冻后存放时间对草鱼和团头鲂冻精受精率的影响。由表可见,草鱼冻精存放 2 小时再授精,其受精率下降不大。而团头鲂冻精存活时间更长,在 4°C 存放 16 小时,其受精率仍高达 81.7%。

(六) 冻精活力与受精率的关系

一般来说,精子的受精能力是受其活力所决定的。精子的活力越高,受精率也就越高。这从图 5 即可清楚看出。当冻精活力低于 20% 时,其受精率也很低(<20%),随着冻精活力的升高,其受精率也明显升高。二者之间存在着明显的正相关。相关系数为

0.97, 线性回归方程为 $Y = 3.68 + 1.23X$ 。

表3 解冻后存放时间对草鱼和团头鲂冻精受精率的影响

Table 3 Effect of storage time (at 4°C) after thawing on fertility of cryopreserved sperm from grass carp and blunt snout bream.

种类	稀释液	冻精活力	解冻后存放时间与受精率				
			5分	30分	2小时	12小时	16小时
草鱼	D-15	50%	70.4%	67.2%	65.3%	18.6%	
团头鲂	D-17	65%	98.9 ± 5.4% (n = 11)				81.7 ± 9.4% (n = 11)

注:受精率为对照组的百分率。

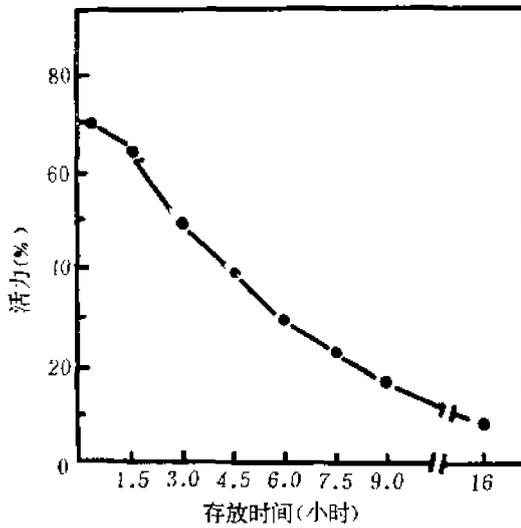


图4 鲢冷冻精液解冻后存放时间(4°C)与活力的关系

Fig. 4 Motility of cryopreserved silver carp sperm in relation to the storage time at 4°C after thawing.

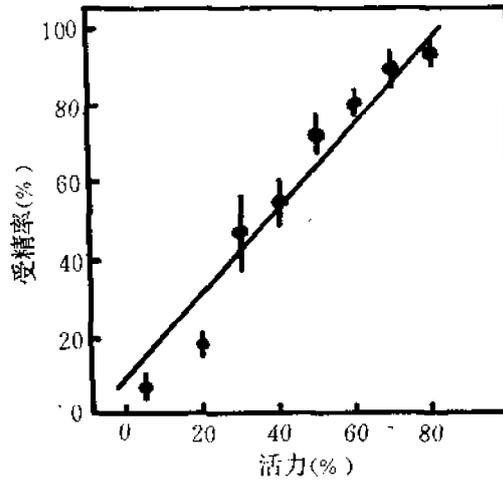


图5 家鱼冷冻精子活力与受精率的关系。结果为对照组的百分率

Fig. 5 Effect of motility of frozen sperm on fertility (Fertility was shown as the percentage of control)

讨 论

1. 从本实验结果来看,在一般情况下,家鱼冷冻精子在具一定渗透压的溶液中的激活授精效果优于直接在淡水中授精的效果。激活授精溶液的适宜渗透压一般为171~342 mOsm/l左右。这与以前我们观察到的家鱼冻精在具一定渗透压的溶液中的活力和运动时间高(长)于在淡水中的结果相一致(陈松林等,1987;1992)。究其原因,笔者认为由于抗冻剂DMSO的作用,以及冷冻解冻的处理,精子本身的渗透压大为升高,对低渗环境变得异常敏感。如用淡水直接激活,会因为冻精内外渗透压差过大,而导致部分精子吸水膨胀,降低活力,缩短精子运动时间,因而受精能力也随之下落。Stoss和Holtz(1983)表明

当冻精激活溶液的渗透压为 249mOsm/l 时, 虹鳟冻精的受精率达最高。而 Wheeler (1991) 则报道, 当虹鳟冻精在 308mOsm/l 溶液中的激活授精效果最好, 基本上与本文结果相似。

2. 有关溶液的渗透压对鲤科鱼类卵子能育性的影响目前报道甚少。既然冻精在具有一定渗透压的溶液中激活—授精的效果优于在淡水中的效果, 那么弄清鱼卵对渗透压的耐受性则很有必要。本文结果表明家鱼卵在 171 和 342mOsm/l NaCl 溶液中维持受精能力的时间至少为 6 分钟, 而在淡水中仅为 2 分钟左右。这为家鱼冷冻精子和卵子在具有一定渗透压溶液中完成正常受精过程提供了依据。Saad 等(1989)也发现鲤鱼卵在 0.4% NaCl 溶液中接受精子的有效时间为 6 分钟, 而在水中仅为 1.5 分钟左右。

3. 从本文可知, 除了渗透压外, 激活溶液的 pH 对冻精受精率也有一定影响。当激活溶液的 pH 为 7.8—10.8 时, 冻精受精率较高, 其间差异不显著; 而当 pH 低于 7 时, 则冻精受精率明显下降。这与 Billard (1980, 1981) 观察到的碱性溶液(pH 9 左右)明显提高鲑鳟鱼类和海鲈精子的受精率的结果相似。综合我们另文(陈松林等, 1992)和本文结果, 可以得出结论: 中性或弱酸性环境有利家鱼精子的保存, 不利精子的激活, 而弱碱性环境则有利于精子的激活运动, 不利于精子的保存。同时暗示, 理想的精子保存稀释液是不宜用作冻精激活—授精溶液的。

4. 冷冻精液解冻后的存活时间是评价冻精质量的重要指标之一。解冻后精子的存活时间越长, 维持受精能力的时间也就越长。目前不少学者报道鱼类冻精在解冻后的很短时间内(几分钟)就失去活力和受精能力。Stoss 等(1981)报道虹鳟颗粒冻精在解冻后 5 分钟内就失去受精能力。Kurokura 等(1984)报道鲤冻精解冻和授精间隔时间达 10 分钟时, 受精率明显下降。而本文结果表明家鱼冻精在解冻后 2 小时内活力及受精能力均下降不多, 且少数精子可存活长达 16 小时。究其与其它报道存在较大差异的原因, 笔者认为可能有二: (1) 以前许多学者采用颗粒冻精法, 解冻时常用解冻液进行湿法解冻, 因而解冻和精子的激活是同步进行的。精子一旦激活, 其运动时间很短, 当然维持受精能力的时间就很短了; (2) 解冻后精子存活时间的长短与刚解冻时的精子活力有关。虽然有些学者采用毛细管冷冻法, 排除了用颗粒冻精法时存在的解冻和激活同步进行的问题, 但如果解冻时精子的复活率本来就不高(许多学者未报道冻精活力), 那么其存活时间也就很短了。关于此问题还须作进一步的研讨。

5. 关于鱼类冻精活力与受精率的关系是精子低温保存研究中的一个较复杂的问题。目前这方面的报道不多, 且观点不一致。有人认为, 冻精活力与受精率关系不很密切, 如 Ferner 和 Korsch 报道, 无运动能力的虹鳟冻精能保持受精能力, 而有运动能力的鲤冻精却不能使卵子受精。Kebby 等(1983)发现, 条纹狼鲈冻精活力极低, 但受精率却高达 88%, 而 Cognie 和 Billard (1989)用活力高达 60%的鲤冻精只获得了 40%的受精率。本文研究表明家鱼冻精活力与其受精率之间存在明显的相关性, 相关系数为 0.97。Harvey (1984)也观察到斑马鱼和罗非鱼冻精活力与受精率之间呈粗的正相关性, 相关系数分别为 0.6 和 0.65。笔者认为上述结果的差异可能主要由于冻精激活与授精方法不一致所造成。例如用大量的活力不高的冻精去与少量卵子授精, 当然也可以获得较高的受精率。而通过控制授精操作和进行大量的重复实验, 冻精活力与受精率之间的正相关性便

可显现出来。这同时也表明了,要想获得理想的冻精受精率,首先得将冻精活力提高到一个适当水平。

参 考 文 献

- [1] 王祖昆等, 1984. 草鱼、鲢、鳙和鲮鱼冷冻精液授精试验。水产学报, 8(3):255—257。
- [2] 陈松林等, 1987. 抗冻剂二甲亚砜对家鱼精子生理特性影响的初步研究。淡水渔业(5):17—21。
- [3] 张轩杰等, 1987. 鲤鱼精液超低温保存及冻精的杂交授精试验研究。湖南师大学报 10:59—64。
- [4] Chao, N. H. et al., 1986. The biological properties of black porgy sperm and its cryopreservation. *Proc. Natl. Sci. Coun. B. Res.* 10: 145—149.
- [5] Cognie, F. et al., 1989. La cryoconservation de la laitance de la carpe, *Cyprinus carpio*. *J. Appl. Ichthyol.* 5: 165—176.
- [6] Harvey B. et al., 1984. Chilled storage of *sarotherodon mossambicus* milt. *Aquaculture*, 36: 85—95.
- [7] Kebby J. H., 1983. Cryogenic preservation of sperm from stripped Bass. *Trans. Amer. Fish. Soci.*, 112: 86—94.
- [8] Kurokura, H. et al., 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37: 267—273.
- [9] Mounib, M. S., 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 53: 13—18.
- [10] Saad, A et al., 1987. Composition et emploi d'un diluer d'insemination chez la carpe, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 66: 329—345.
- [11] Stoss, J. and W. Holtz., 1981. Cryopreservation of rainbow trout sperm I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*. 22: 97—104.
- [12] ———, 1983. Cryopreservation of rainbow trout sperm IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*. 32: 321—330.
- [13] Wheeler, P. A. and G.H. Thorgaard, 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture* 93: 95—100.

THE ACTIVATION AND INSEMINATION METHODS OF CRYOPRESERVED SPERM IN CHINESE CARPS

Chen Songlin, Liu Xiangting, Lu Dachun, Zhang Longzhen,
Fu Chaojun and Fang Jianpin

(Changjiang Fisheries Research Institute, CAFS, Shashi 434000)

ABSTRACT The activation and insemination methods of cryopreserved sperm from three species of chinese carps (*Otenopharyngodon idella*, *Hypophthalmichthys molitrix* and *Megalobrama amblycephala*) have been studied. The effect of the osmolality of activating solution on fertility of cryopreserved sperm was examined. When sperm-ova insemination ratio was 1:4(V/V), there was no significant difference in fertility of frozen sperm between in fresh water and in 171—342mOsm/l solution. When sperm-ova ratio was 1:16, fertility of frozen sperm in NaCl solution with osmolality of 171—342mOsm/l was significantly higher than that in fresh water. Ova could be fertilized for 6 min in above medium, but 2 min in fresh water.

Basic extender (pH>8.7) was unsuitable for sperm storage, and the slightly acidic activating solution (pH6.3) was unfavourable for the activation and insemination of cryopreserved sperm. The thawing sperm stored at 4°C for 1.5 hour and did not significantly influence motility and fertility. A significant positive correlation ($r = 0.97$) between the activity of cryopreserved sperm and fertility was shown. The regression equation was $Y = 3.68 \pm 1.23x$.

KEYWORDS chinese carps, cryopreserved sperm, activation, insemination, fertility

1993年度《中国水产文摘》征订启事

本刊系我国水产系统唯一的一本全面报道国内水产科技文献的综合性检索期刊,由中国水产科学研究院情报所主办。其宗旨是全面、及时地报道全国各地以各种形式出版的水产科技文献,为读者快速、方便地检索国内水产科技文献服务。

本刊所收录的文献类型有期刊、专著、汇编、会议录、科技报告、技术标准等。按以下主要类目编排:(1)水产总论;(2)水产基础科学;(3)水产资源和环境保护;(4)水产捕捞;(5)海水养殖;(6)淡水养殖;(7)水产生物病害及防治;(8)饲料和肥料;(9)水产品保鲜及加工;(10)渔业机械仪器和渔船;(11)渔业经济。年报道量约3000条。每年第一期刊登本刊引用主要期刊一览表,年终编辑出版本年度主题索引、著者索引。

本刊为双月刊,逢双月底出版,国内外公开发行。国内统一刊号CN11-2813/S。每期定价4.00元,全年六期共24.00元(含邮资)。邮发代号18-126,请广大老订户和新读者及时到当地邮局办理订阅手续。

编辑部地址:北京市永定路南青塔村150号

邮政编码:100039