

5 种配方和 5 种糖类对大鳞副泥鳅精子保存效果的研究

万全, 李飞, 王冰

(安徽农业大学水产系, 安徽合肥 230036)

摘要:选择大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)进行人工采精,对精子进行保存,比较5种精子保存液(配方A、B、C、D、E)、5种糖及室温(20~24℃)和4℃对精子活力的影响,研究其精子保存的最佳条件,为规模化苗种的人工繁殖和杂交育种提供理论依据。结果显示,精子保存液保存的时间:C>B>A>E>D;精子保存液C、B、A、E、D分别能使精子在132 h、132 h、72 h、22 h、6 h内使80%的精子保持快速运动的能力。在不同糖类进行比较的过程中,发现加入糖后的精子保存液比未加的保存效果要好,但不同糖类的效果又有差别,保存的时间为:葡萄糖>蔗糖>L-山梨糖>D-果糖>D-木糖。对20~24℃保存与低温4℃保存的效果研究表明,室温保存效果远不如冰箱低温保存效果。大鳞副泥鳅精子在淡水中快速运动时间能持续约31s,寿命约为130s。

关键词:大鳞副泥鳅;精子活力;保存液;糖类;影响

中图分类号:Q418 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2009)05-0085-05

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)属鲤形目(Cypriniformes)、鳅科(Cobitidae)、副泥鳅属(*Paramisgurnus*),体型酷似泥鳅,其鳞片较泥鳅的大,也因此称为大鳞副泥鳅。体色多为黄色或黄褐色,个体较泥鳅大,一般个体30~80 g,在安徽又俗称“大板鳅”;具有较高的营养价值,由于天然资源减少,市场价格已经上升到20~30元/kg(曹克驹,2004;朱盛林等,2007)。对泥鳅的养殖研究报道较多,但对大鳞副泥鳅的开发研究较少。在大鳞副泥鳅的人工繁殖中还发现雄鳅的数量明显少于雌鳅,这给批量人工繁殖大鳞副泥鳅苗带不便(朱盛林等,2007)。严安生等(1993;1995)对鲤和团头鲂精子生理生态特性进行了研究,分析了单糖和渗透压对精子活力的影响;连晋等(1999)对虹鳟精子液态低温保存方法进行了研究;沈建忠和江庆(2002)对南方鲇精子保存方法进行初步研究;赵会宏等(2003)、丁淑茎等(2007)分别研究了温度、盐度、pH对斜带石斑鱼和黄颡鱼精子活力及寿命的影响,而对大鳞副泥鳅的精子活力及寿命尚未见报道。因此,进行大鳞副泥鳅精子寿命及不同精子保存液、不同温度和不同糖类保存效果的研究,探索其精子保存的最佳条件,为规模化苗种的人工繁殖、人工授精及杂交育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料鱼来源

大鳞副泥鳅取自安庆石塘湖,尼龙袋充氧运回安徽农业大学。时间为2007年4月底至5月初,选择个体在15 g以上、体质健壮、体表光滑、无病无伤的雄鳅作材料鱼。

1.2 精子保存液的制备

配制了A、B、C、D、E共5种精子保存液(连晋和雷普勋,2001;沈建忠和江庆,2002),各种精子保存液的配方如表1~表4。

表1 精子保存液A配方

Tab. 1 Ingredients of spermatozoa preservative fluid A

I 液		II 液	
NaCl/g	9.600	NaHCO ₃ /g	0.420
KCl/g	0.480	Na ₂ HPO ₄ /g	0.186
CaCl ₂ /g	0.168	KH ₂ PO ₄ /g	0.072
MgCl ₂ ·6H ₂ O/g	0.235	C ₆ H ₁₂ O ₆ /g	1.091
蒸馏水/mL	60	蒸馏水/mL	60

注:用时取I液和II液各5 mL,然后加去离子水至100 mL,即制成精子保存液A。

Notes: when using, take I and II 5 mL respectively, then add de-ionized water to 100 mL.

表2 精子保存液B(人工精浆A)和

保存液C(人工精浆B)配方 mmol/L

Tab. 2 Ingredients of spermatozoa preservative fluid B and C

成分	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂ ·6H ₂ O	NaHCO ₃
保存液B	127.0	37.3	2.6	1.5	5.0
保存液C	80	50	5	2	50

收稿日期:2008-05-04

作者简介:万全,1957年生,男,江苏金湖人,副教授,主要从事淡水渔业研究。E-mail:ahwanquan@163.com

表 3 精子保存液 D 配方

Tab.3 Ingredients of spermatozoa preservative fluid D

成分	葡萄糖/	柠檬酸钠/	NaHCO ₃ /	KCl/	蒸馏水/
	g	g	g	g	mL
剂量	2.9	1.0	0.2	0.03	100

表4 精子保存液 E(Ringer 氏液)配方

Tab. 4 Ingredients of spermatozoa preservative fluid E(Ringer's)

成分	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	NaHCO ₃	KH ₂ PO ₄	C ₆ H ₁₂ O ₆
剂量	7.526	0.417	0.322	0.203	0.193	0.122	2.910

注:配成 1 000mL

Note: The total volume is 1 000 mL.

1.3 糖类精子保存液的配制

在精子保存液 C 配方的基础上,加入不同的糖类,加入的量均为 0.01 mol/L,然后进行编号,加入葡萄糖的编号为 C₁,加入蔗糖的编号为 C₂,加入 D-木糖的编号为 C₃,加入 L-果糖的编号为 C₄,加入 L-山梨糖的编号为 C₅。

1.4 人工催产和精子采集

采用每尾注射 500 ~ 1 000 IU 进行催产。催情后, 20℃ 时效应时间为 20 ~ 25 h 即可采精。剖腹取出乳白色的精巢, 剔除血污等, 放于吸水纸上吸去水分, 然后再进行其他处理。

1.5 精子的保存

将精巢分别放入盛有不同精子保存液的洁净小瓶中,然后用干净的解剖剪将其剪碎,精液的稀释比约为 1: 5,处理好后盖上瓶塞,然后根据要求放在不同的条件下进行保存。

首先观察比较 5 种精子保存液的效果,然后从中选出效果最好的进行低温和常温 2 种条件下保存效果的比较和不同单糖对精子保存效果的比较。第 1 组实验前 24 h,每 2 h 观察 1 次,24 h 后每 12 h 观

察1次;第2组实验每12 h观察1次。

1.6 精子活力检测

精子活率(精子激活比例)为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,精子寿命(精子运动时间)指从精子激活开始至运动停止所经历的时间(周定刚和温安祥,2003)。用精子活率为指标对其活力进行评价,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潘德博等(1999)方法并加以改进(赵会宏等,2003)。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精子保存液摇匀,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,每个样品每个循环观察3次,观察后取其平均值进行记录,记录的方法为:“卅”表示100%精子快速运动,“卅”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(丁淑荃等,2007)。

1.7 精子保存液在人工繁殖中的应用

2007年4月26日,在石塘湖水产养殖场人工催产大鳞副泥鳅,采用类似物和马来酸地欧酮混合注射,每尾剂量为 LRH-A_2 2~3 μg + DOM 0.5~1.0 mg,水温 18~21℃,效应时间 19~23 h,将雄鳅解剖取出精巢剪碎,用精子保存液 C 保存,置烧杯中,并遮阴放置在阴凉处备用。然后挤出卵子进行干法人工授精,粘附在鱼巢上,在水泥池中微流水充气孵化,溶氧量要求在 5 mg/L 以上。

2 结果与分析

2.1 5种精子保存液的保存效果比较

5 种精子保存液的保存效果比较结果见表 5。

表5 5种精子保存液的保存效果

Tab.5 The preservation effects of five preservative fluids

[illegible]

从表 5 可以得出,用精子保存液 A(Hanks 保存液)低温保存大鳞副泥鳅精子,2~8 h 时观察,精子几乎 100% 是快速活动的,其运动很明显;至 14 h 时,快速运动的精子还有约 80%;14~72 h 基本上都能保持 80% 的精子快速运动;84 h 观察时,发现精子几乎全部死亡。

B 液低温保存时,观察发现在 2~4 h 精子几乎是 100% 快速活动的,6 h 时精子活率有所下降,为 80% 左右;6~120 h 这段时间,快速运动的精子均能保持在 80% 左右;132 h 时精子活率明显下降,仅有 10%~30%,这一情况维持到 168 h,180 h 时观察发现精子几乎全部死亡。

C 液低温保存时,经观察发现在 2~18 h,精子几乎 100% 在快速运动;20 h 时活率缓慢下降,约有 80% 的精子快速运动,这种情况维持到 120 h,以后精子活率下降很明显;132 h 观察,只有 50% 的精子在快速运动;144 h 时下降为 10%~30%,这种情况维持到 180 h;192 h 再观察时,精子几乎全部死亡。

D 液低温保存时,2 h 时的第 1 次观察精子的活率就已经是 80% 左右,2~6 h 精子活率基本都能维持这一情况;8 h 精子活率明显下降,仅为 50% 左右;10 h 时又下降至 10%~30%,这种情况维持到 18 h;20 h 时,精子几乎全部死亡。

E 液低温保存时,2~4 h 精子几乎 100% 是快速活动的,然后精子活率开始缓慢下降;6 h 时,精

子活率下降为 80% 左右,这种情况维持到 24 h,然后精子活率明显下降;36 h 时,只有 10%~30% 的精子在快速运动;在 48 h 时,精子几乎全部死亡。

2.2 4℃ 和 20~24℃ 避光保存效果的比较

比较发现 C 液在 4℃ 的保存效果最好,120 h 时仍能使精子活率保持在 80%,因而选择 C 液进行比较。结果显示,在 20~24℃ 条件下,12 h 时的观察中几乎仍有 100% 的精子在快速运动,但 24 h 时,精子几乎全部死亡。

2.3 5 种糖类对精子保存效果的比较

加入葡萄糖的 C 液进行精子保存的结果显示,12~108 h 能使几乎 100% 的精子保持快速运动的能力;到 120 h 观察时,精子活率开始有所下降,约有 80% 的精子保持快速运动的能力,一直到 216 h,该保存液都能使 80% 的精子保持快速运动的能力;228 h 时,精子活率下降为 50% 左右;240 h 时,下降为 10%~30%;252 h 时,精子几乎全部死亡。比较结果如表 6。

加入蔗糖的 C 液进行精子保存的结果显示,12~72 h 该精子保存液能使几乎 100% 的精子保持快速运动的能力;84 h 观察时,精子活率下降为 80% 左右;直到 216 h,加入蔗糖的精子保存液 C 都能使有约 80% 的精子保持快速运动的能力;228 h 时,精子活率下降为 50%;252 h 时,下降为 10%~30%;264 h 时,精子几乎全部死亡。

表 6 5 种糖类对精子的保存效果

Tab. 6 The preservation effects of five carbohydrates

糖 类	观察时间/h																					
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192	204	216	228	240	252	264
C ₁	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-
C ₂	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-
C ₃	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₄	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₅	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

加入 D-木糖的 C 液进行精子保存的结果显示,12~96 h 都约有 100% 的精子保持快速运动的能力;108 h 时,精子活率开始明显下降,为 80%;120 h 时下降为 50%;132 h 时下降至 10%~30%;144 h 时精子几乎全部死亡。

加入 D-果糖的 C 液进行精子保存的结果显示,12~96 h 都约有 100% 的精子保持快速运动的能力,然后精子活率开始明显下降;108 h 时下降为 80% 左右;120 h 时下降为 50%;156 h 时下降为 10%~30%;180 h 时所有的精子都已死亡。

加入 D-山梨糖的 C 液,12~24 h,100% 的精

子保持快速运动的能力;36 h 时精子活率下降为 80%,直到 144 h 精子活率都能保持为约 80%;156 h 时精子活率下降为 50%;168 h 时下降为 10%~30%;180 h 时,精子几乎全部死亡。

2.4 精子保存液在生产中的应用

共催产大鳞副泥鳅 40 组,保存精子人工授精的操作时间 2~3 h,受精率 78%~89%。孵化时间约 50~54 h,出苗约 7 万尾。

2.5 精子在淡水中的运动时间

大鳞副泥鳅精子在淡水快速运动时间能持续约 31 s,寿命约为 2 min 10 s。

3 讨论

3.1 不同配方对精子保存的效果

通过比较结果来看,5种配方保存大鳞副泥鳅精子时,精子保存液C的效果最好,B液仅次之,与之非常相似,其次是A液,再其次是E液,效果最差的是D液。

精子保存液配方设计的最终目的是抑制精子的活动,使精子在保存液中尽量少运动,另外有的配方在其中加入葡萄糖、牛血清蛋白、氨基酸等营养物质,以提供精子少量运动的能量,还有些配方中会加入防腐剂、青霉素、链霉素,这样可以抑制细菌代谢(邬勇杰,2003)。本文仅选择了5种具有代表性的精子保存液配方,有的在其他鱼类精子保存的过程中效果是非常好的。本次结果显示,精子保存液B和精子保存液C的效果最好。据研究, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 有抑制精子活动的作用(严安生等,1993)。通过比较发现,B、C配方中的 CaCl_2 和 MgCl_2 的摩尔浓度较其他3个配方的浓度高,而且C配方中的 CaCl_2 和 MgCl_2 的摩尔浓度又比B配方中的高。这足以充分证明适量 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 有抑制精子活动的作用,可以很好的抑制大鳞副泥鳅精子的活动。通过A、D和E配方和保存效果的比较发现, NaHCO_3 、 Na_2HPO_4 等缓冲物质对精子保存也有良好的效果,而D配方含有的葡萄糖最多,但从结果可以看出其效果并不是最好的,这也说明了精子保存液中葡萄糖并不是越多越好,而是要与其他物质合理搭配才能达到很好的效果。

3.2 室温避光和冰箱低温对精子保存的影响

在生产实际中,并不是所有渔场都具有低温保存的条件,所以此次也对室温避光和冰箱低温的保存进行了比较。从试验结果可以看出,冰箱低温保存的效果绝对优于室温避光保存,所以室温避光保存在生产实际中只能用于短时间内保存的大鳞副泥鳅精子。

3.3 不同糖类对精子保存的比较

表6的结果显示,加入糖的精子保存液C普遍比未加糖的效果要好,如葡萄糖可以将精子活率为80%的时间延长84h,而且不同糖类对精子保存效果又有差别。本文中 choice 糖类的保存效果由高到低依次是:葡萄糖>蔗糖>L-山梨糖>D-果糖>D-木糖;加入葡萄糖、蔗糖的效果最好,它们的差异不大,但前期(84~108h)葡萄糖的效果好于蔗糖。另外,通过比较也发现,96h以前,加入葡萄糖、D-

木糖、D-果糖的C液能使100%的精子保持快速运动的能力,所以生产实际中,如果在96h以内进行大鳞副泥鳅的人工授精,可以将葡萄糖、D-木糖、D-果糖作为首选加入C配方配制精子保存液。综合比较,葡萄糖对大鳞副泥鳅精子的保存效果最好。

3.4 生产应用

大鳞副泥鳅精子在淡水中快速运动的时间约为31s,而用人工保存液可以达到保存精子的目的,能解决实际中大鳞副泥鳅雄性个体少和精子、卵子适时受精的问题。生产中,可先将雄鱼催熟,取出精液再加入精子保存液,几种保存液都可使用,但加入葡萄糖或蔗糖的精子保存液C或B配置较为简便。结果表明,用精子保存液在常温下保存大鳞副泥鳅精子用于繁殖是切实可行的,然后只需对雌鱼进行分批催产,无须考虑同步问题,如果配以保温冰桶或置于冰箱4℃条件下则更好,为规模化的大鳞副泥鳅的苗种生产提供帮助,也方便用于杂交试验。

参考文献:

- 曹克驹,等.2004.名特水产动物养殖学[M].北京:中国农业出版社.
- 丁淑荃,万全,刘磊,等.2007.不同温度下精子保存液对黄颡鱼精子活力的影响[J].水利渔业,27(1):10-12.
- 连晋,雷普勋,刘忠松.2001.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,(1):34.
- 连晋,雷普勋,王拴文.1999.虹鳟精子液态低温保存方法的研究[J].淡水渔业,(12):16-17.
- 潘德博,许淑英,叶星,等.1999.广东鲂精子生物学特性的研究[J].中国水产科学,6(4):111-113.
- 沈建忠,江庆.2002.南方鲇精子保存方法的初步研究[J].水利渔业,22(5):13-18.
- 邬勇杰.2003.鱼类精子简易保存方法的研究[J].内陆水产,(6):31-31.
- 严安生,李诗模,王其和.1993.鲤鱼与团头鲂精子生理生态特性的研究Ⅱ.钙、镁对精子活力的影响[J].淡水渔业,23(5):5-7.
- 严安生,宋贵文,闫拥军.1995.鲤鱼与团头鲂精子生理生态特性的研究Ⅲ.单糖和渗透压对精子活力的影响[J].淡水渔业,25(2):3-5.
- 赵会宏,刘晓春,林浩然,等.2003.斜带石斑鱼精子超微结构及温度、盐度、pH对精子活力及寿命的影响[J].中国水产科学,10(4):286-292.
- 周定刚,温安祥.2003.黄鳝精子活力检测和精子入卵早期过程观察[J].水产学报,27(5):398-401.
- 朱盛林,万全,李飞,等.2007.大鳞副泥鳅的繁殖力测定及人工繁殖[J].现代农业科技,(13):171-172,174.

(责任编辑 万月华)

Study on Effects of Five Preservative Fluids and Five Carbohydrates on the Preservation of *Paramisgurnus dabryanus* Spermatozoa

WAN Quan, LI Fei, WANG Bing

(Department of Aquaculture, Anhui Agricultural University 230036, China)

Abstract: Chose big, healthy male *Paramisgurnus dabryanus* and collected spermatozoa artificially from the fish, preserved them according to demands, to find out the effects of five preservative fluids, five carbohydrates and different temperatures, thus, to get more information about the preservation of *Paramisgurnus dabryanus* spermatozoa, and provide basic knowledge for the artificial propagation of fingerlings and *Paramisgurnus dabryanus* cross breeding. The results showed that effects of five preservative fluids were different, the order of preservation time length was $C > B > A > E > D$. The preservative fluid C, B, A, E, D can keep 80% of spermatozoa having fast motility within 132h, 132h, 72h, 22h, 6h respectively. The results of comparison among different carbohydrates showed that the preservative fluid C which had been added carbohydrate was generally better than the former C. In the experiments of preservation, the best carbohydrate for spermatozoa preservation was Glucose, then was Saccharose, but the difference between them was not obvious, next was L - Sorbose, next was D - Fructose, the last one was D - Xylose. And the results of different temperature preservation experiment showed that the low temperature preservation (4°C) was much better than room temperature ($20 \sim 24^{\circ}\text{C}$) preservation. The fast moving time in fresh water of *Paramisgurnus dabryanus* spermatozoa was 31s. The life span in fresh water of *Paramisgurnus dabryanus* spermatozoa is 130 s.

Key words: *Paramisgurnus dabryanus*; Spermatozoa motility; Preservative fluids; Carbohydrates; Effects