

大菱鲆不同繁殖期的精子质量分析

韩明明^{1,2} 丁福红² 孟振² 刘新富² 张和森² 雷霖霖^{2*}

(¹ 中国海洋大学, 青岛 266003)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 本研究运用计算机辅助精子分析(CASA)系统软件, 针对大菱鲆繁殖期不同阶段的精子质量进行了检测分析。结果表明, 在42d的实验过程中, 精子活动比例、密度、产精量、直线运动速度、曲线运动速度均呈现不同的变化规律。其中, 产精量由2.50ml降至2.23ml; 密度由 1.08×10^8 个/ml降至 0.46×10^8 个/ml; 精子活动比例变化范围为83.4%~36.9%; 直线运动速度和曲线运动速度比值由0.69降低到0.35。繁殖期间各质量指标变化规律及幅度大小为鱼类繁殖和精液采集等操作提供了参考依据。

关键词 大菱鲆 精子质量 精子密度 精子活化率 产精量

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)05-0031-05

The analysis of turbot *Scophthalmus maximus* semen quality during spawning season

HAN Ming-ming^{1,2} DING Fu-hong² MENG Zhen²
LIU Xin-fu² ZHANG He-sen² LEI Ji-lin^{2*}

(¹ Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,
Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT In this study, the CASA (Computer Assisted Semen Analysis) was employed to determine how sperm quality changes during the spawning season. The sperm quality parameters, including motility ratio, concentration, volume, VSL (Straightline velocity) and VCL (Curvilinear velocity), were examined at four phases during 7 weeks from the beginning of sperm production to the end, with 2 weeks as an interval time. The results indicated that all the indexes have different varying patterns during the spawning season. The motility ratio changed from 83.4% to 36.9%, the sperm volume varied from 2.50ml to 2.23ml, the concentration decreased from 1.08×10^8 ind/ml to 0.46×10^8 ind/ml and the value of VSL/VCL was reduced from 0.69 to 0.35. The findings on different changing patterns and the amount of variations could contribute to tur-

现代农业技术产业体系建设专项资金(CARS-50)、国家自然科学基金(3110188)和山东省自然科学基金(ZR2011CQ004)共同资助

* 通讯作者。E-mail: leijl@ysfri.ac.cn

收稿日期:2012-09-05;接受日期:2012-11-07

作者简介:韩明明(1984-),女,在读博士研究生,主要从事水产养殖育种繁育生物学研究。E-mail: sealion1984@126.com, Tel: 15954207057

bot aquaculture directly either in broodstock breeding and its sperm application.

KEY WORDS *Scophthalmus maximus* Sperm quality Sperm concentration
Sperm motility ratio Semen volume

精子是鱼类养殖生产的物质基础,精子质量分析对种质资源管理与苗种生产具有直接指导意义(Billard 1988)。评价鱼类精子质量的指标主要有精子活化率、运动时间、形态、密度、受精率等(季相山等 2007; 丁福红等 2009)。评价精子质量的方法有很多,有传统的感官检查、显微镜检查等,而作为 20 世纪 80 年代发展起来的一项新技术——计算机辅助精子分析(CASA, computer-assisted semen analysis)系统可对精子的动(静)态图象进行全面的量化分析(Boyer *et al.* 1989),不仅能较准确地测定精子活率(Percentage of motile sperm, MOT),而且由计算机软件对成像的精子运动轨迹进行分析,可得出直线运动速率(Straight line velocity, VSL)、曲线运动速率(Curvilinear velocity, VCL)、周长、角度、直线性、摆动性和向前性等参数(季相山等 2007)。其中,精子运动时的直线速度和曲线速度大小对精卵结合效率有很大的影响, $V_{\text{直线}}/V_{\text{曲线}}$ 的大小直接决定受精率的高低(Boyer *et al.* 1989)。

大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 自 20 世纪 90 年代引入中国以来,养殖规模迅猛发展,到 2010 年,年产量达 4.89 万 t(雷霖霖等 2010)。作为一种重要的经济鱼种,前人已经对大菱鲆的精子结构、组成、产精量、精子密度、运动特点进行过一定的研究(Suquet *et al.* 1994)。Devauchelle 等(1988)研究了人工养殖条件下,大菱鲆的排精周期可达 180 d。Suquet 等(1994)研究发现,产精量为 0.2~2.2 ml,精子密度为 $0.7\sim 11.0\times 10^9$,精子的运动时间 1~17 min。与大马哈鱼、鲤鱼及大比目鱼相比,大菱鲆产精量较少(Suquet *et al.* 1993),精子形态结构与其他硬骨鱼类相似(Suquet *et al.* 1993; Rana 1995),精子密度与鲟鱼及罗非鱼相比较偏低,且采集的精液量、密度、运动性以及总的精子数目之间没有必然的联系。尽管养殖的大菱鲆的产精周期可达 270 d(Devauchelle *et al.* 1988),但由于大菱鲆产卵和产精时期长短不一,时间不同步,而精子的老化现象显著影响精子的生理特征(Billard 1984)、细胞膜结构(Aas *et al.* 1991)、密度(Buyukhatipoglu *et al.* 1984; Zuromska 1981)、运动能力(Buyukhatipoglu *et al.* 1984; Billard 1977; Methven *et al.* 1991),使得精子受精能力降低,所以掌握不同时期精子的质量变化,取得优质精子对苗种生产中人工繁育环节具有重要指导意义。但目前针对繁殖期内精液质量变化规律的研究尚未见报道。

本研究选择大菱鲆繁殖周期的精子作为研究对象,应用计算机辅助系统(CASA)及显微镜计数法、比分光光度计法更精确的血细胞计数法(Buyukhatipoglu *et al.* 1984; Zuromska 1981),对大菱鲆精子在繁殖期内不同阶段精液量、密度、活化率、直线运动速度(VSL)、曲线运动速度(VCL)的变化情况进行了研究,以期探索大菱鲆在不同时期的精液质量变化规律,为大菱鲆的繁殖生产提供理论依据。考虑到大菱鲆卵子的生物学特征和生化组成随繁殖季节发生变化(马爱军等 2002),对研究繁殖期内不同阶段大菱鲆精子的受精能力造成一定困难,决定将该部分实验放在后续工作中完成。

1 材料与方 法

1.1 亲鱼培育及精液采集

本实验于 2011 年 11~12 月在山东青岛通用水产养殖有限公司进行,大菱鲆精子源自该公司培育的成熟亲鱼,采集时亲鱼培育条件:水温 $13.50\pm 0.50^\circ\text{C}$ 、光照周期 14L:10D。选择 4 龄大菱鲆雌亲鱼 5 尾,体重范围 2.10~2.80 kg,尾鳍以“T”型标标记(型号 T-tagfine,青岛科易仪器有限公司),每尾鱼间隔 15d 取精液 1 次,共采集 4 次。

采集精液时,用灭菌蒸馏水冲洗生殖孔附近体表,并用干净的毛巾擦拭干净,以防止精液被海水或尿液污染。轻轻挤压精巢,用无菌塑料吸管收集精液并转移至于 RNase-free EP 管中,将精液储存于冰盒中带回实验室分析(3h 内),记录每尾鱼采集的精液量。

1.2 精子的 CASA 检测

采用计算机辅助精子分析(CASA)系统进行精子的活化率分析。滴加 $1\mu\text{l}$ 精液在干净的载玻片上,用 $9\mu\text{l}$

海水稀释和激活,将稀释后的精液轻轻混匀并在干净的载玻片上涂成一薄层,于 $40\times$ 显微镜下观察,选取能反映整体精子运动情况的两个视野进行拍照,并由计算机系统获得各项参数,包括直线运动速度、曲线运动速度、活化率。

1.3 精子密度统计

采用血细胞计数法对精子密度进行统计。用带有无菌枪头的移液器吸取 $1\mu\text{l}$ 精液到1个无菌EP管中,用海水按照10:1的比例稀释大菱鲆精液,用移液枪吹打混匀后,于 10×40 显微镜下选取混合均匀视野进行观察,每个样品统计3次,根据公式换算出每尾大菱鲆各次的精子密度。

1.4 数据分析

用SPSS 13.0数据分析软件分析实验中所选取的5尾雄性亲鱼在繁殖季节的4个不同时期的精子密度、精液总量、活化率、运动速度等数据,并做统计分析。以 $P<0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 产精量变化

5尾雄性亲鱼在第7天和第21天平均产精量差异显著($P<0.05$),分别为2.50、2.02ml。第35、49天分别是2.07、2.23ml,且第21、35、49天之间没有显著差异(图1、表1)。

2.2 精子密度变化

实验选取的5尾雄鱼,在4个时期所采集的精液密度均具有显著差异($P<0.05$),精子密度在第7天时最大,为 $1.08\times 10^8\text{ cell/ml}$,随时间推移,密度逐渐降低,在第35天时,精子密度为 $0.46\times 10^8\text{ cell/ml}$,降低42.5%,达最低值(图2)。

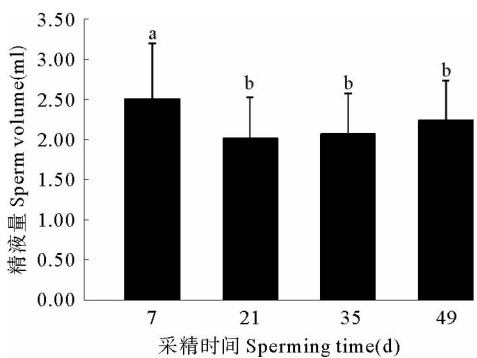


图1 大菱鲆不同时间的产精量

Fig.1 The turbot semen production at different phases

2.3 精子活化率变化

研究发现,总的精子活化率变化范围为36.9%~83.4%,第49天与其他组相比均有显著差异性($P<0.05$),而第7、21、35天之间差异不显著。精子活化率在第21天时呈最高值,为83.4%,在第49天时最低,仅为36.9%(图3)。

表1 不同个体亲鱼在不同时间的产精量

Table 1 The individual difference in semen volume at respective phases

亲鱼序号 NO.	第7天 7 d(ml)	第21天 21 d(ml)	第35天 35 d(ml)	第49天 49 d(ml)
1	1.70	1.30	1.30	2.40
2	3.05	1.00	1.40	1.20
3	3.30	2.05	1.00	1.95
4	1.90	1.90	2.70	2.60
5	2.55	1.85	1.90	3.00

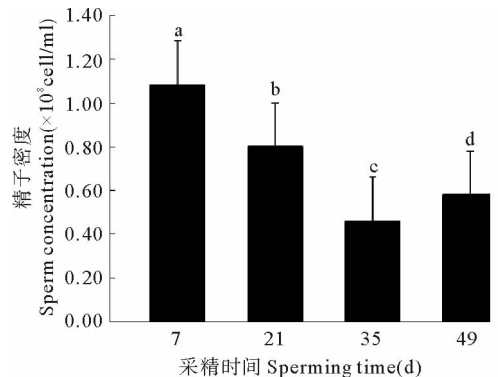


图2 大菱鲆不同时期的精液密度($\times 10^8\text{ cell/ml}$)

Fig.2 The turbot sperm concentration at different phases($\times 10^8\text{ cell/ml}$)

2.4 精子运动特征的变化

曲线运动速度表示精子通过从起始点到终点实际距离的速度,直线运动速度表示精子通过起始点到终止点的直线距离的速度,VSL/VCL是精子运动轨迹弯曲程度的最好体现,与精子受精率呈正相关(Rurangwa *et al.* 2001)。从第7~35天精子的直线运动速度和曲线运动速度逐渐增大。第35天后 $V_{\text{直线}}/V_{\text{曲线}}$ 值急剧降低,且第49天的 $V_{\text{直线}}/V_{\text{曲线}}$ 与前3个组别相比均差异显著($P < 0.05$),而之前的3个组别差异不显著(表2)。

3 讨论

作者对5尾4龄大菱鲆雄性亲鱼处于繁殖期7~49 d的精液质量进行了研究。发现总体上5尾大菱鲆雄鱼的产精量、精子密度、活化率及VSL/VCL前期呈现多或高而后期呈现少或低的规律,但以上指标在某一具体的时间段内的变化量并不同步。

研究发现,大菱鲆产精量变化范围约为2.50~2.02 ml,总体变化趋势平缓。相关研究表明,采样操作方法、体重、两次采样间隔长短和环境等因素都会影响到大菱鲆雄鱼的产精量(Suquet *et al.* 1994)。当体重处于1.4~3.2 kg范围时,体重对大菱鲆产精量的影响变得不明显(Suquet 1992)。另外对虹鳟的研究发现,3龄比2龄的虹鳟产精量更多(Buyukhatipoglu *et al.* 1984)。在大西洋鳊鲷中有产精量随体重增加而增多的现象(Kazakov 1981)。

直观上,精液越接近繁殖末期越接近透明。经血细胞计数法统计,精子密度在第7天最高为 1.08×10^8 cell/ml,随后精子的密度逐渐降低,但在第49天时有小幅的升高现象。当体重处于1.4~3.2 kg范围时,体重对大菱鲆精子密度的影响也不明显(Suquet 1992),在虹鳟中,年龄对精子没有重大影响(Buyukhatipoglu *et al.* 1984;Billard 1974)。Suquet(1992)发现,经过一段有规律的采样后,改变精液采集频率会使精子密度大幅度降低。但本研究中,采样频率没有变化,加之采样时有部分死精,分析第49天精液密度升高原因很可能是精液老化,粘稠度增加的体现。大西洋庸鲷等鱼类的精液均存在繁殖末期精液变粘稠的现象(Tvedt *et al.* 2001)。

精子的运动呈现出与产精量和精子密度不同的变化趋势,直线运动与曲线运动都随实验的进行而增大,在第35天时各自达最大值,两者比值在前35 d变化不大,而在第49天急剧降低。Suquet(1992)研究表明,采样次数不会影响激活后的大菱鲆精子的运动时长,精子运动时间的长短受储存的ATP多少及能量传递链的完整程度影响。推测本实验第49天时,由于接近繁殖末期,在精子老化作用下,精子的膜系统不完整程度加剧(Suquet *et al.* 1998),该种情况下,即使内部储存的ATP含量不变,也将因为膜结构的不完整而降低精子的运动能力。

精子活化率在4次采样实验中呈现随时间而降低的趋势,第49天时,活化率较前35 d有大幅度下降。等压的蔗糖溶液也可以激活大菱鲆精子运动,这一点与其他鱼类需要离子渗透压不同(Suquet *et al.* 1994)。用海水激活大菱鲆精子时,稀释倍数可能会对精子活化率产生影响。在本研究中,采用 $10 \times$ 海水稀释激活大菱鲆精子,对于不同渗透压对精子活化率的影响没有进行研究。

综合分析本研究的结果可见,精子的产精量、密度、活化率、VSL/VCL等各质量指标在繁殖期间呈现不同变化规律,单一指标不能全面反映精子质量,只有综合考虑才能客观准确地进行精液质量评估。通过对各指标综合分析发现,以上指标在7~35d时均高于第49天,推测这一段时间精液质量较好,适用于生产,而第49天时精子质量退化明显。

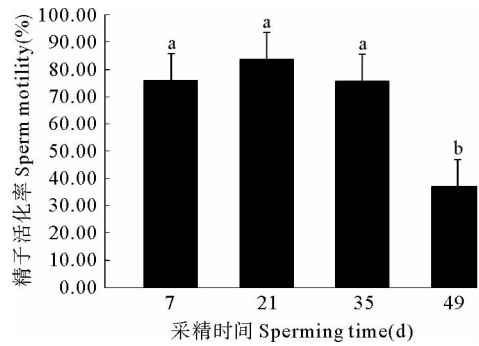


图3 不同时间下大菱鲆精子活化率

Fig. 3 The turbot sperm motility at different phases

表2 精子 $V_{\text{直线}}$ 、 $V_{\text{曲线}}$ 在不同阶段的变化

Table 2 The variance of $V_{\text{straight-line}}$ and $V_{\text{curvilinear}}$ of semen at different phases

试验天数	VSL($\mu\text{m/s}$)	VCL($\mu\text{m/s}$)	VSL/VCL
第7天	37.24±16.05	53.50±14.95	0.69±0.13
第21天	37.20±14.68	58.94±18.19	0.66±0.08
第35天	46.83±32.99	80.69±65.61	0.63±0.08
第49天	8.36±11.34	14.19±15.06	0.35±0.29

精子的质量会受到一些生物和非生物因素的影响,例如基因、环境、养殖密度过大、抗生素、光周期(Nash 1999)、渗透压、离子类型、pH 值、激素(Alavi *et al.* 2005; Sansone *et al.* 2002)等,这些因素或许会在繁殖期出现时间、周期长短及繁殖期内不同阶段精子质量方面起作用,以上因素对大菱鲆精子在繁殖期的生理生化层面的内在变化规律的具体影响将是进一步研究的内容。

致谢:实验材料来自青岛通用水产养殖有限公司,尤其是张志宁技术员给予大力帮助,青岛科易仪器有限公司的张跃峰经理在此项工作中也给予了很多帮助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 丁福红, 雷霖霖, 刘新富, 孟 振, 刘 滨. 2009. 鱼类配子质量研究进展与展望. 海洋科学, 33(12):129-132
- 季相山, 陈松林, 赵 燕, 田永胜. 2007. 鱼类精子质量评价研究进展. 中国水产科学, 14(6):1048-1054
- 雷霖霖. 2011. 国家鲆鲽类产业技术体系 2010 年度报告. 青岛:中国海洋大学出版社
- 马爱军, 雷霖霖, 陈四清, 张秀梅, 陈大刚. 2002. 大菱鲆产卵季节对卵子的生物学和生化特征的影响. 海洋与湖沼, 33(1):75-82
- Alavi SMH, Cosson J. 2005. Sperm motility in fishes. Effects of temperature and pH: A review. Cell Biol Int 29(2): 101-110
- Aas GH, Refstie G, Gjerde B. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture 95(1-2): 125-132
- Boyer SP, Davis RO, Katz DF. 1989. Automated semen analysis—Current problems in obstetrics. Gynecol Fertil 12: 165-200
- Billard R. 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. Mar Behav Physiol 14(1):3-21
- Billard R, Dupont J, Barnabé G. 1977. Diminution de la motilité' et de la durée' de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L. (Poisson, teleosté'en) pendant la période de spermiation. Aquaculture 11(4): 363-367
- Billard R, Ginsburg AS. 1973. La spermiogenèse et le spermatozoïde de *Anguilla anguilla* L. Etude ultrastructurale. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique 13: 523-534
- Billard R. 1974. La production spermatogénétique de la truite arc-en-ciel au cours du premier cycle reproducteur. Bull Fr Piscic 253: 139-149
- Billard R. 1984. La conservation des gamètes et l'insemination artificielle chez le bar et des Sparides (Barnabé, G. & Billard, R, eds), 95-116. Paris: INRA
- Buyukhatipoglu S, Holtz W. 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)—Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. Aquaculture 37(1):63-71
- Devauchelle N, Alexandre JC, Le Corre N, Letty Y. 1988. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. Aquaculture 69(1-2): 159-184
- Kazakov RV. 1981. Peculiarities of sperm production by anadromous and parr Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and fish cultural characteristics of such sperm. J Fish Biol 18(1): 1-8
- Methven DA, Crim LW. 1991. Seasonal changes in sperm atocrit, plasma sex steroids, and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). In Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS, eds), 170. Sheffield: Fish Symp 91
- Nash JP. 1999. Seasonal reproduction in fish. In: Knobil E, Neill JD. (Eds.), Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, New York 4:329-340
- Rana K. 1995. Preservation of gametes. In Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Oxford Blackwell Science 53-76
- Rurangwa E, Volckaert FAM, Huyskens G and 2 others. 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African cat fish (*Clarias gariepinus*). Theriogenology 55(3): 751-769
- Sansone G, Fabbrocini A, Leropoli S and 3 others. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa after thawing. Cryobiology 44(3): 229-239
- Suquet M, Dreanno C, Dorange G and 4 others. 1998. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. Journal of Fish Biology 52(1):31-41
- Suquet M, Billard R, Cosson J and 4 others. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. Aquatic Living Resources 7(4): 283-294
- Suquet M. 1992. La production de sperme chez le turbot (*Scophthalmus maximus*): Aspects descriptifs et expérimentaux. Diplôme de l'école Pratique des Hautes études, Paris, 96
- Suquet M, Omnes MH, Normant Y, Fauvel C. 1992. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Aquaculture Research 23(2):217-225
- Suquet M, Dorange G, Omnes MH and 3 others. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). J Fish Biol 42(4): 509-516
- Tvedt HB, Benfey TJ, Martin-Robichaud DJ, Power J. 2001. The relationship between sperm density, sperm atocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture 194(1-2): 191-200
- Zuromska H. 1981. Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench, *Tinca tinca* (L.). Part VI. Estimation of milt quality. Polish Archives of Hydrobiology 28(2):229-241