

海水主要离子在合浦珠母贝 精子激活中的作用*

喻达辉 江世贵 苏天凤 陈竞春

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

关键词 合浦珠母贝 精子激活 离子选择

1 引言

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 是我国海产珍珠重要母贝, 其大批量种苗的人工繁殖于 70 年代获得成功. 合浦珠母贝的繁殖生物学有其特殊的地方, 即人工解剖获得的精子在自然海水中不运动, 没有受精能力, 需用一定的化学物质激活才能受精^[1-3]. 生产中常用一定浓度的氨海水来激活, 但有关合浦珠母贝精子激活过程和机理尚未见有文献报道, 为此我们在合浦珠母贝精子实验生物学研究^[4]的基础上, 对其精子的激活机制作了初步的探讨^[5], 在此对精子激活过程中海水主要离子的作用作一简要报道.

2 材料和方法

2.1 实验贝来源

实验用合浦珠母贝分别于 1996 年 8 月 12 日、10 月 29 日、12 月 23 日及 1997 年 4 月 14 日和 1998 年 2 月 16 日购自深圳大亚湾东山珍珠场, 运回后在水族箱内用篮子吊养, 充气. 人工海水盐度为 30~35, 水温为 16~29 °C, 定期虹吸排污, 并添加人工海水.

2.2 离子筛选

由于考虑到氨水在合浦珠母贝精子激活中的特殊作用^[4], 我们选用了氯化铵等几种铵盐. 另外根据海水的主要离子成分, 我们选用了 Na^+ 、 K^+ 的氯化物和硝酸盐, 以及 Mg^{++} 、 Ca^{++} 的氯化物, 以探讨它们在合浦珠母贝精子激活中的作用.

2.3 激活液的配制

NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 NaNO_3 、 KNO_3 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 溶

本文于 1998-05-16 收到, 修改稿于 1998-12-08 收到.

* 中国水产科学研究院基金资助项目 (编号: 96-02-05).

第一作者简介: 喻达辉, 男, 36 岁, 副研究员, 从事海洋生物技术研究.

液:用双蒸水分别配成浓度为1%、2%、3%、4%和5%的溶液储于滴瓶中备用。

2.4 激活试验

用解剖刀剖开亲贝,性腺为乳白色者一般为雄性,用注射针头或眼科镊取少许精液于载玻片上,然后加激活液混匀,立即在显微镜下观察精子的激活情况,一般观察5 min以上。精子出现运动即表示被激活,用激活率的高低表示激活效果的好坏,激活率用运动精子数与精子总数的百分比表示。

3 结果

3.1 几种主要阴离子在合浦珠母贝精子激活过程中的作用

由于 NH_4^+ 在合浦珠母贝精子激活过程中的肯定作用,因此分别选用 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 对合浦珠母贝精子进行激活试验,以探讨 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 和 CO_3^{2-} 的激活作用。结果如下:用蒸馏水配制的1%~5%的上述盐溶液的激活作用见表1。仅 NH_4Cl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 有一定的激活作用。由于 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 属于强酸弱碱盐,偏酸性,会影响其激活效果,故加入氨水调pH后会大大改善其激活效果。硫酸铵的激活也受pH的影响,而碳酸铵不论pH如何均不能激活。表1中 NH_4NO_3 虽然没有激活作用,但用氨水调pH后可激活,表明 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 在激活过程中有作用,而 CO_3^{2-} 则不起作用。

3.2 几种主要阳离子在合浦珠母贝精子激活过程中的作用

首先我们用1%~5%的 NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 NaNO_3 和 KNO_3 对合浦珠母贝精子进行激活试验,发现均不能激活。将上述3%的溶液用氨水调pH至10.5后再试验,仅 NaCl 、 KCl 、 NaNO_3 和 KNO_3 可以激活,但用 KOH 或 NaOH 调至相同pH却不能激活,表明 Na^+ 、 K^+ 在合浦珠母贝精子激活过程中有作用。然后又进行了不同浓度的激活试验,结果见表2。 NaCl 、 KCl 的激活效果最好,但 NaCl 的最适浓度范围不如 KCl 宽。 NaNO_3 和 KNO_3 的激活效果次之。另外, KCl 、 KNO_3 激活后精子的运动时间较短。表明在合浦珠母贝精子激活过程中 Na^+ 是最重要的阳离子, Cl^- 是最重要的阴离子,其次为 K^+ 和 NO_3^- 。

表1 几种主要阴离子激活合浦珠母贝精子的效果(pH 5.6~6.6)

铵盐	浓度/%				
	1	2	3	4	5
NH_4Cl	-	-	+	+	-
NH_4NO_3	-	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$	-	-	+	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	-	-	-	-	-

注: -表示不激活, +表示激活。

表2 不同浓度的 Na^+ 、 K^+ 对合浦珠母贝精子的激活效果(pH 10.5~10.7)

项目	浓度/%				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
NaCl	+	+++	+++	++	+
NaNO_3	+	++	++	++	+
KCl	+	+++	+++	+++	+++
KNO_3	-	+	+	+	+

注: -表示不激活, +表示20%激活, ++表示30%~60%激活, +++表示60%以上激活。

4 讨论

4.1 几种主要离子在合浦珠母贝精子激活中的作用

在合浦珠母贝精子生物学^[4]和激活机制^[5]研究中发现, NH_4^+ 可以对精子细胞产生某种影

响,对精子激活有作用,但用蒸馏水配制的氨水没有激活作用,表明只有 NH_4^+ 也不能激活,除 OH^- 以外必须要有其他阴离子的存在才能激活,通过几种铵盐试验比较, Cl^- 是最必须的,是合浦珠母贝精子激活最重要的阴离子。

自然海水、 KCl 、 NaCl 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaNO_3 和 KNO_3 等对合浦珠母贝精子均没有激活作用,表明海水的主要离子成分 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等不能改变精子细胞膜的离子通透性,对精子激活没有作用。

通过在 KCl 、 NaCl 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaNO_3 和 KNO_3 溶液中加入一定量的氨水后 KCl 、 NaCl 、 NaNO_3 和 KNO_3 能够激活合浦珠母贝精子这一现象说明,虽然 Na^+ 、 K^+ 不能激活精子,但在激活过程中起着不可缺的作用,是离子交换的具体对象,而 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 则没有作用。从精子的运动时间来看, Na^+ 的作用比 K^+ 强。

4.2 合浦珠母贝精子激活的离子选择性

实验表明 Na^+ 和 Cl^- 是参与合浦珠母贝精子激活的最主要离子,同时它们也是海水的主要离子成分,说明合浦珠母贝精子对离子的选择性是与海水的离子组成相适应的。在实验中我们发现,精子在 K^+ 溶液中的运动时间较在 Na^+ 溶液的短,这与 K^+ 能使淡水鲤科鱼类的鲤鱼等延长其精子寿命的情况相反^[6]。造成这种差别的主要原因可能是激活机制不同,淡水鲤科鱼类精子的激活主要是渗透压的变化引起精子细胞内外的离子交换而被激活, K^+ 与渗透压有密切关系,而合浦珠母贝等某些海产贝类的精子主要是由某些化学物质打开离子通道的闸门而发生离子交换而被激活^[5]。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 在精子激活过程中可有可无,而单独存在时即使加入氨水也不能激活,这与某些淡水鱼类中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对精子活力的抑制情况相似^[7]。

我们在合浦珠母贝的受精生物学实验中发现,只要有一定量的 NH_4^+ 存在,精子能够存活十几个小时,而在载玻片上的激活实验由于 NH_4^+ 变成氨挥发,精子停止运动,重新加入 NH_4^+ 精子又开始运动。说明精子的激活有赖于 NH_4^+ 的存在, NH_4^+ 能够维持其离子通道打开的持续状态。

4.3 合浦珠母贝精子实验的标准溶液

我们在实验中所用的海水溶液主要来自天然海水和人工海水。由于它们的组成成分不稳定和不完全清楚,含有很多未知物质,同时含有一定量的重金属,故对精子有一定的毒性,尤其是人工海水,在受精实验中发现畸形率特别高。另外,天然海水的来源也受到限制。这些因素将影响各个实验的可比性,严格地讲,也会影响实验结果的准确性,尤其在繁殖育种和基因工程实验方面,要求有可靠的实验条件,因此有必要选择一种成分完全清楚的标准溶液作为共同的实验基准溶液。根据我们的实验,在合浦珠母贝精子的实验中可用单一的 NaCl 或 NaCl 和 KCl 一定比例的混合溶液作为标准溶液。

参考文献

- 1 金启增,郭澄联,胡建兴等编著. 珍珠贝的种苗生物学. 北京:海洋出版社, 1992, 38~40
- 2 金启增,魏贻尧,姜卫国. 合浦珠母贝人工育苗的研究 I. 人工授精. 南海海洋科学集刊, 第二辑. 北京:科学出版社, 1981, 107~115
- 3 Wada K T. Breeding study of Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. National Research Institute of Aquaculture, 1984, (6):

79~115

- 4 喻达辉,陈竞春,苏天凤等.合浦珠母贝精子的实验生物学初步研究.热带海洋,1998,17(1):83~87
- 5 喻达辉,江世贵,陈竞春等.合浦珠母贝精子激活机制的初步研究.热带海洋,1999,18(2):5~11
- 6 严安生,王其和,李诗模.渗透压和钾对鲤、团头鲂精子活力的影响.淡水渔业,1993,23(3):19~21
- 7 严安生,宋贵文,闫拥军.鲤和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.淡水渔业,1993,23(5):5~7

Role of ions in the process of activation of Japanese pearl oyster's spermatozoa

Yu Dahui,¹ Jiang Shigui,¹ Su Tianfeng,¹ Chen Jingchun¹

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Guangzhou 510300

Key words Japanese pearl oyster, sperm activation, role of ions