

紫外线辐射对西伯利亚鲟精子活力和寿命的影响*

张涛¹ 颜世伟^{1,2} 章龙珍^{1,*} 庄平^{1,2} 田美平³ 闫文罡¹ 江淇⁴ 姚志峰³

(¹ 中国水产科学研究院东海水产研究所农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090; ² 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁大连 116023; ³ 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; ⁴ 杭州千岛湖鲟龙科技开发有限公司, 杭州 330127)

摘要 研究了不同剂量紫外线辐射(254 nm, UVC)对西伯利亚鲟精子活力和寿命的影响。结果表明:紫外线辐射对精子的活力、快速运动时间和寿命均具有显著性影响。其中,精子活力随辐射剂量的增加而呈先迅速下降,后迅速上升,再迅速下降的趋势;精子快速运动时间的变化趋势与活力相似;精子寿命随辐射剂量的增加呈缓慢下降的趋势。当辐射剂量达 288 mJ · cm⁻² 时,精子无快速运动,当辐射剂量达 324 mJ · cm⁻² 时,精子活力和寿命均降为 0。根据 Hertwig 效应判断,辐射剂量 216 mJ · cm⁻² 为西伯利亚鲟精子灭活的最适剂量。

关键词 西伯利亚鲟 精子 紫外线辐射 活力 寿命

文章编号 1001-9332(2011)08-2179-05 **中图分类号** S965.8 **文献标识码** A

Impacts of ultraviolet irradiation on the sperm motility and longevity of *Acipenser baerii*. ZHANG Tao¹, YAN Shi-wei^{1,2}, ZHANG Long-zhen¹, ZHUANG Ping^{1,2}, TIAN Mei-ping³, YAN Wen-gang¹, JIANG Qi⁴, YAO Zhi-feng³ (¹ Ministry of Agriculture Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China; ² College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, Liaoning, China; ³ College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; ⁴ Hangzhou Qiandaohu Xunlong Technology Development Co. Ltd., Hangzhou 330127, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2011, 22 (8): 2179-2183.

Abstract: This paper studied the impacts of different dose ultraviolet irradiation (254 nm, UVC) on the sperm motility and longevity of *Acipenser baerii*. Ultraviolet irradiation had significant impacts on the sperm motility, its fast motion time, and longevity. With the increasing dose of ultraviolet irradiation, the sperm motility decreased rapidly first, increased rapidly then, and decreased rapidly again. The sperm fast motion time had the similar variation trend as the sperm motility, but the sperm longevity kept decreasing with increasing dose of ultraviolet irradiation. When the ultraviolet irradiation dose increased to 288 mJ · cm⁻², the sperm fast motion disappeared; when the ultraviolet irradiation dose increased up to 324 mJ · cm⁻², the sperm had no motility and died. According to the "Hertwig effect", the optimum ultraviolet irradiation dose for inactivating *A. baerii* sperm was 216 mJ · cm⁻².

Key words: *Acipenser baerii*; sperm; ultraviolet irradiation; motility; longevity.

鲟形目(Acipenseriformes)鱼类属软骨硬鳞鱼类,其鱼卵制成的鱼籽酱是国际市场的高档食品,具有极高的经济价值。随着全球对鱼籽酱需求的不断增大,我国鲟鱼养殖规模也在不断扩大。西伯利亚鲟

(*Acipenser baerii*)是我国主要的鲟鱼养殖品种,具有生长快、鱼籽酱产量和品质高等优点,自1996年引进以来已在国内广泛养殖^[1-2]。西伯利亚鲟的性成熟时间较长,自然条件下雄鱼性成熟年龄为10~12年,雌鱼则需要17~18年;人工养殖条件下雄性初次性成熟年龄也需要3~4年,雌性需要4~6年^[3]。由于西伯利亚鲟第二性征不明显,很难从外观上区分雌雄^[4],因此在生产鱼籽酱的养殖群体中过多的

* 农业公益性行业科研专项(201003055-07)、农业科技成果转化资金项目(2008GB23260408)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2007M01)资助。

** 通讯作者。E-mail: longzhen2885@hotmail.com
2010-12-27 收稿,2011-04-22 接受。

雄鱼造成了养殖成本的升高. 提高雌性比例, 甚至全雌化是降低养殖成本、获得较高投资回报的有效途径之一.

人工诱导雌核发育是研究鱼类性别决定机制和人工性别控制的重要途径之一. 自1956年 Neyfakh^[5]在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)上进行雌核发育获得成功以来, 至今已在鲤科、鲑科、鲈科、鳅科和鲷科中数十种重要经济鱼类, 以及鲮(*Mugil cephalus*)和斑马鱼(*Brachydanio rerio*)等鱼类上获得了成功^[6-7]. 进行人工诱导雌核发育, 不仅可以迅速获得基因纯合, 使优良性状以最快速度达到纯合固定, 还可以进行性别控制, 达到培育单性品种的目的^[8]. 有关鲟鱼雌核发育的研究较少, 仅小体鲟(*A. ruthenus*)^[9]和短吻鲟(*A. brevirostrum*)^[10]等有报道. 在人工雌核发育诱导过程中, 精子的遗传失活处理是很重要的一步, γ 射线、X射线、紫外线和化学药物均可诱发精子染色体的遗传失活, 其中使用紫外线辐射使精子遗传物质失活最为普遍, 国内外在诱导鱼类人工雌核发育中普遍使用此法^[6-8]. 本试验就紫外线辐射对西伯利亚鲟精子活力和寿命的影响进行了初步研究, 旨在为人工诱导西伯利亚鲟雌核发育提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料及精液采集

本试验所用6尾西伯利亚鲟雄性亲鱼均为2003年人工繁殖培育所得, 由杭州千岛湖鲟龙科技开发有限公司千岛湖养殖基地进行网箱养殖. 2009年3月采用鲤鱼脑垂体对雄亲鱼进行催产, 催产水温16℃. 到达效应时间后, 用干毛巾将生殖孔周围的水擦干, 将直径6 mm的塑料软管插入雄鱼生殖孔, 另一端放入干净的塑料袋中, 挤压腹部两侧采集精液. 精液在4℃下避光保存. 采集的精液要求无水、无血、无尿、乳白色, 遇水后即迅速散开.

1.2 稀释液制备及精子灭活

将西伯利亚鲟精液于4℃下8000 r·min⁻¹离心15 min, 取上清液精浆作为精子的稀释液. 精子灭活前, 用显微镜检查每尾雄鱼精子活力, 选取活力在90%以上的精液作为灭活材料. 将精液与精浆稀释液按1:4体积比混合, 均匀铺设于直径为9 cm预冷的培养皿底部, 将培养皿放在振荡器上(90 r·min⁻¹). 紫外线辐射源为2只平行的15 W UVC紫外灯管(254 nm), 紫外灯管固定在一个暗箱内顶部. 照射时将盛有精子的培养皿与灯管之间的距离

固定为15 cm, 用紫外辐照计(北京师范大学光电仪器厂)测得此处紫外线辐射强度为0.2 mJ·cm⁻²·s⁻¹, 通过调整辐射时间(用秒表计时)控制辐射剂量. 试验设0、36、72、108、144、180、216、252、288、324 mJ·cm⁻²等10个试验组. 精液照射完毕后于4℃下避光保存.

1.3 精子活力、快速运动时间及寿命观察

进行观察时, 用解剖针沾取少量经紫外线辐射的精子到载玻片上, 将精液涂匀, 放置显微镜下, 用滴管取适量清水滴加在精液上, 立即观察精子的激活及运动情况. 每个处理重复3次, 用秒表分别记录快速运动时间、寿命及相应的活力, 取平均值. 参照黄晓荣等^[11]方法, 精子活力指给定视野中被激活的精子数量占全部精子数量的百分比; 快速运动指精子运动很快, 但可以看清其运动的路线; 精子的寿命指精子自激活开始至停止运动所经历的时间.

1.4 数据处理

试验结果采用SPSS 11.5统计软件进行处理分析, 利用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验组间差异的显著性, 用Duncan法进行多重比较($P < 0.05$).

2 结果与分析

2.1 不同剂量紫外线辐射下西伯利亚鲟精子活力

从图1可以看出, 对照(紫外线辐射剂量为0)的精子活力最高(90%), 精子活力随辐射剂量的增加而显著下降, 当辐射剂量增加到72 mJ·cm⁻²时精子活力降至45%, 随着辐射剂量的继续增加精子活力呈上升趋势, 辐射剂量为144 mJ·cm⁻²时精子活力达到80%, 辐射剂量继续增加, 精子活力缓慢下降至0.

2.2 不同剂量紫外线辐射下西伯利亚鲟精子快速运动时间

紫外线辐射剂量对西伯利亚鲟精子快速运动时间也有较大的影响. 在不同剂量紫外线辐射下, 西伯利亚鲟精子快速运动时间的变化趋势与精子活力相似(图1), 表现为随辐射剂量的增加精子的快速运动时间先快速减少, 后快速增加, 最后缓慢减少至0. 辐射剂量为144 mJ·cm⁻²时精子的快速运动时间最长(40 s), 而辐射剂量增加到288 mJ·cm⁻²时精子无快速运动, 仅有慢速运动或摆动.

2.3 不同剂量紫外线辐射下西伯利亚鲟精子寿命

不同剂量紫外线辐射下西伯利亚鲟精子寿命的变化趋势与精子活力及快速运动时间的变化趋势不同(图1). 未受紫外线辐射的情况下精子寿命最长

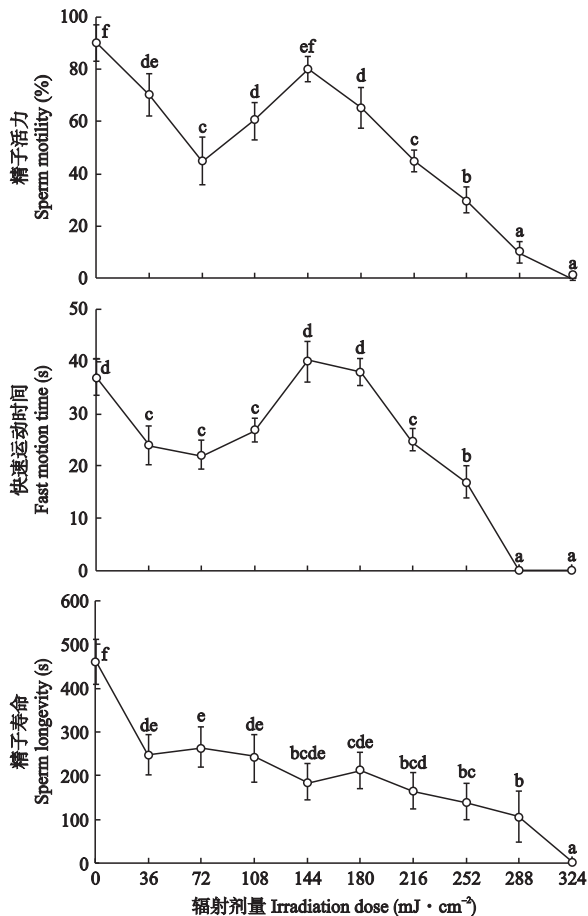


图 1 不同剂量紫外线辐射下西伯利亚鲟精子活力、快速运动时间和寿命

Fig. 1 Sperm motility, fast motion time, and longevity of *Acipenser baerii* with different ultraviolet irradiation dose.

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters meant significant difference at 0.05 level.

(467 s), 当辐射剂量为 $36 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时精子寿命迅速减少至 248 s, 随后精子寿命随辐射剂量的增加缓慢下降。

3 讨 论

3.1 精子灭活方法探讨

精子灭活是人工诱导雌核发育的关键步骤之一, 用各种辐射和化学方法处理鱼类精子, 都可以有效地破坏染色体上的遗传物质, 但这种遗传上失去活性的精子仍具有进入卵子的能力^[6-8]. 辐射处理精子常用的有 γ 射线、X 射线和紫外射线等, 其中 γ 射线和 X 射线具有较好的穿透力, 可同时处理大量精子, 它们主要起诱发染色体断裂的作用, 但经 γ 射线、X 射线处理过的精子生存力和受精力都较差, 在雌核发育的胚胎中可能存在大量的精子染色体碎片^[6-8], 此外, γ 射线和 X 射线需要有特定的射线发

射装置和特别的安全防护措施, 而且费用昂贵且操作不便^[6-8]. 紫外线虽然穿透力较弱, 一次处理精子的量也比较少, 但具有经济、方便、安全的优点, 因此紫外线照射法逐渐取代了 γ 射线和 X 射线照射法而被广泛采用^[6-8]. 紫外线辐射使染色体失活的机理为紫外线与 DNA 作用, 在同一条多核苷酸链 (single polynucleotide chain) 内使相邻的胸腺嘧啶相互联结, 形成了胸腺嘧啶二聚体 (thymine dimers), 此种胸腺嘧啶二聚体阻止了 DNA 的转录和复制, 使精子的遗传物质失活. 虽然精子的染色体被紫外线破坏, 但并不减低它进入卵子的能力^[12]. 紫外线辐射的一个特殊现象就是光复活反应, 即紫外线的辐射效应可被强烈的可见光减弱, 因此照射应在黑暗环境中进行^[13].

3.2 紫外线辐射对精子活力和寿命的影响

根据生物效应的不同, 将紫外线按照波长划分为 4 个波段, 即 UVA 波段 (320 ~ 400 nm)、UVB 波段 (275 ~ 320 nm)、UVC 波段 (200 ~ 275 nm)、UVD 波段 (100 ~ 200 nm). 本试验选取紫外线波长为 254 nm, 属 UVC 波段. UVC 虽然不直接诱发 DNA 单链断裂, 但能产生环丁烷嘧啶二聚体 (CPD) 和 6-4 光产物 (6-4PP), UVC 所产生的 DNA 损伤可通过核苷酸切除修复机制 (nucleotide excision repair, NER) 进行修复^[14-15]. 本试验中紫外线辐射剂量在 $72 \sim 144 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 之间精子活力和快速运动时间呈明显的上升趋势, 其原因可能是此阶段紫外线辐射精子造成的 DNA 损伤正通过 NER 机制进行修复. Xu 等^[16] 对大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 精子的紫外线辐射及诱导雌核发育的研究表明, 大黄鱼精子活力随紫外线辐射剂量的增加呈“先迅速下降, 后快速上升, 最后缓慢下降”的 Hertwig 效应. 国外的一些学者在大西洋漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*)^[17] 和条纹锯鲈 (*Centropristis striata*)^[18] 的研究中也发现了该现象的存在. 我们对西伯利亚鲟精子进行紫外线辐射时也发现了类似的 Hertwig 效应. 这可能是由于在 $0 \sim 70 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 内, 紫外线辐射剂量较低, 对精子 DNA 的破坏不完全, 只造成精核遗传物质的部分失活, 辐射剂量为 $72 \sim 144 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时, 紫外线使精子遗传物质完全破坏, 当辐射剂量超过 $144 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 后, 紫外线辐射剂量过高, 不仅破坏了遗传物质, 同时还可能造成精子鞭毛微管纤维的解聚, 从而对精子活动能力造成影响, 甚至出现精子死亡现象^[19]. 另外, Xu 等^[16] 研究显示大黄鱼精子寿命随紫外线辐射剂量的变化趋势与活力的变化趋势相同, 同样

表现出 Hertwig 效应. 在舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[20]、大西洋漠斑牙鲆^[17]和条纹锯鲷^[18]的研究中也发现了相似的结果. 而在本研究中, 西伯利亚鲟精子寿命随紫外线辐射剂量的变化趋势与活力的变化趋势有很大不同, 未表现出 Hertwig 效应. Xu 等^[16]认为, 并不是所有鱼的精子寿命与活力随辐射剂量的变化趋势都相同, 本文的研究结果证实了这一结论.

3.3 最适精子灭活剂量的影响因素及标准选择

适当的辐射剂量对雌核发育的成功非常重要. 本研究结果显示, 216 mJ · cm⁻² 的紫外线辐射剂量可作为西伯利亚鲟精子灭活的最佳剂量. 但现有的研究报道中最适紫外线辐射剂量差异较大(表 1), 其原因可能是由于不同种鱼的精子对紫外线辐射的抵抗力不同, 也可能与精子的稀释倍数有关. 因此, 在确定最适灭活剂量时应考虑精子密度和稀释比例等因素. 大部分研究中选择精子最适灭活剂量时通常采用活力下降至最高活力的 50% 的剂量作为标准^[7,21-22]. 但本研究中, 辐射剂量为 72 和 216 mJ · cm⁻² 的精子活力均为最高活力的 50% (图 1). Xu 等^[16]对大黄鱼精子灭活时也出现了类似的情况. 根据 Hertwig 效应原理, 应选择活力第二次下降至最高活力的 50% 的剂量作为标准. 但有些种类未表现出 Hertwig 效应, 如 Komen 等^[23]在人工诱导鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 雌核发育的过程中就出现过不符合 Hertwig 效应的情况, 这给精子最适灭活剂量的选择带来了困难. 已有研究表明, 精子密度与吸光度呈一定的函数关系^[24], 如 Mims 等^[25-26]分别利用函数公式 $Y = 3590.88 - 575.00X$ 和 $Y = 52405.27 - 352.80X + 19.78X^2$ (X 为透射率, Y 为紫外辐射剂量) 来确定匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 和密西西比铲鲟 (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) 雌核发育中精子最适灭活剂量, 并取得较好效果. 尽管该方法较传统方法复杂、费时, 但能获得较为精确的灭活剂量, 建议在以后的相关研究中采用此方法确定精子

的最适灭活剂量.

在雌核发育试验中, 精子最适灭活剂量的确定结果直接影响到后续试验的成败, 因此, 在确定最适精子灭活剂量时, 应结合灭活精子的受精试验, 通过单倍体率来确定.

参考文献

- [1] Zhang T (张涛), Zhuang P (庄平), Zhang L-Z (章龙珍), et al. Effects of initial feeding on the growth, survival, and body biochemical composition of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2009, **20**(2): 358-362 (in Chinese)
- [2] Zhang T (张涛), Yan S-W (颜世伟), Zhuang P (庄平), et al. Effects of storage medium and temperature on short-term storage of *Acipenser baerii* eggs. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2010, **21**(1): 227-231 (in Chinese)
- [3] Feng G-P (冯广朋), Zhuang P (庄平), Zhang L-Z (章龙珍), et al. Status quo and prospects of sturgeon aquaculture in China. *Marine Fisheries (海洋渔业)*, 2004, **26**(4): 317-320 (in Chinese)
- [4] Zhao F (赵峰), Zhang L-Z (章龙珍), Zhuang P (庄平), et al. Research progress and application of sex identification techniques in sturgeons. *Marine Fisheries (海洋渔业)*, 2009, **31**(2): 215-220 (in Chinese)
- [5] Neyfakh AA. The effect of ionizing radiation on gametes of the loach (*Misgurnus fossilis* L.). *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 1956, **111**: 585-588 (in Russian)
- [6] Komen H, Thorgaard GH. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture*, 2007, **269**: 150-173
- [7] Pandian TJ, Koteeswaran R. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiology*, 1998, **384**: 167-243
- [8] Lou Y-D (楼允东). Fish Breeding. Revised Ed. Beijing: China Agriculture Press, 2001 (in Chinese)
- [9] Fopp-Bayat D, Kolman R, Woznicki P. Induction of meiotic gynogenesis in starlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated baster sperm. *Aquaculture*, 2007, **264**: 54-58
- [10] Flynn SR, Matsuoka M, Reith M, et al. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesueur. *Aquaculture*, 2006, **253**: 721-727
- [11] Huang X-R (黄晓荣), Zhang L-Z (章龙珍), Qiao Z-G (乔振国), et al. The effects of different cryoprotectants on the sperm motility and the movement time of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Marine Fisheries (海洋渔业)*, 2007, **29**(3): 193-199 (in Chinese)
- [12] Gao Y-M (高悦勉), Sun X-S (孙祥山), Liu X-Z (刘馨紫). Effect of ultraviolet on genetic inactivity and fertilization of sea urchin (*Stroglyocentrotus nudus* A.) sperm. *Fisheries Science (水产科学)*, 2003, **22**(6): 1-4 (in Chinese)

表 1 不同鲟鱼类精子最适辐射剂量

Table 1 Optimum irradiation dose for sperm among several *Acipenser* species

种类 Species	最适辐射剂量 Optimum irradiation dose (mJ · cm ⁻²)	文献 Reference
西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	216	本研究 This study
高首鲟 <i>A. transmontanus</i>	234	[20]
短吻鲟 <i>A. brevirostrum</i>	120 ~ 300	[9]
小体鲟 <i>A. ruthenus</i>	40 ~ 70	[10]

- [13] Ankley GT, Tietge JE, Holcombe GW, *et al.* Effects of laboratory ultraviolet radiation and natural sunlight on survival and development of *Rana pipiens*. *Canadian Journal of Zoology*, 2000, **78**: 1092–1100
- [14] Dahms HU, Lee JS. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology*, 2010, **97**: 3–14
- [15] Tuck A, Smith S, Larcom L. Chronic lymphocytic leukemia lymphocytes lack the capacity to repair UVC-induced lesions. *Mutation Research/DNA Repair*, 2000, **459**: 73–80
- [16] Xu JH, You F, Yan BL, *et al.* Effects of ultra-violet irradiation on sperm motility and diploid gynogenesis induction in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) undergoing cold shock. *Aquaculture International*, 2007, **15**: 371–382
- [17] Luckenbach JA, Godwin J, Daniels HV, *et al.* Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm. *Aquaculture*, 2004, **237**: 499–516
- [18] Morgan AJ, Murashige R, Woolridge CA, *et al.* Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass (*Centropristis striata*) sperm. *Aquaculture*, 2006, **259**: 290–299
- [19] Don J, Avtalion RR. Ultraviolet irradiation of tilapia spermatozoa and the Hertwig effect: Electronmicroscopic analysis. *Journal of Fish Biology*, 1993, **42**: 1–14
- [20] Van Eenennaam AL. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture*, 1996, **147**: 177–189
- [21] Felip A, Zanuy S, Carrillo M, *et al.* Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica*, 2001, **111**: 175–195
- [22] Purdom CE. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 1983, **33**: 287–300
- [23] Komen J, Duynhouwer J, Richter CJJ, *et al.* Effects of genetic manipulation of sexual products and incubation conditions of eggs. *Aquaculture*, 1988, **69**: 227–239
- [24] Zhang T (张 涛), Zhang L-Z (章龙珍), Zhuang P (庄 平), *et al.* Determination on the sperm concentration standard of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) by means of spectrophotometric method. *Marine Fisheries* (海洋渔业), 2009, **31**(1): 87–91 (in Chinese)
- [25] Mims SD, Shelton WL. Induced meiotic gynogenesis in shovelnose sturgeon. *Aquaculture International*, 1998, **6**: 323–329
- [26] Mims SD, Shelton W, Linhart O, *et al.* Induced meiotic gynogenesis of paddlefish *Polyodon spathula*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1997, **28**: 334–343

作者简介 张 涛,男,1976年生,副研究员. 主要从事鱼类生态学与繁育生物学研究. E-mail: zhangtaoyfi@163.com

责任编辑 肖 红
