

文章编号:1001-5132 (2010) 03-0011-05

几种环境因子对大弹涂鱼精子活力的影响

魏 平, 闫家强, 竺俊全*

(宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 通过测定精子的激活率、运动时间及寿命研究了盐度、pH、离子及葡萄糖等因子对大弹涂鱼精子活力的影响. 结果表明: 大弹涂鱼精子在盐度 10~25 范围内, 精子激活率 (81.67±5.69)%, 其中盐度为 20 时精子活力最好, 精子激活率、运动时间和寿命分别达(94.33±4.04)%、(87.67±8.02) min 及(115.33±9.24) min; 在 pH 6.0~9.0 范围内精子激活率 (80.33±4.51)%, 运动时间 (63±4) min, 寿命 (80±4.36) min, 其中 pH 为 8 时, 精子活力最好. NaCl 浓度在 150 mmol·L⁻¹、KCl 及 MgCl₂ 浓度在 300 mmol·L⁻¹、CaCl₂ 及 NaH₂PO₄ 浓度在 100 mmol·L⁻¹ 及葡萄糖浓度在 400 mmol·L⁻¹ 时, 精子激活率较高.

关键词: 大弹涂鱼; 精子; 活力; 环境因子

中图分类号: S965

文献标识码: A

鱼类精子质量评价的重要指标之一是精子的活力. 常用的精子活力测定方法为显微观察法, 即将待检精液与激活溶液混均, 在显微镜下观察精子的活力(激活率、运动时间及寿命等). 体外受精鱼类精子在精巢中是不活动的, 只有排出到水环境中才被激活. 精子的活力取决于自身质量, 也受到水环境中各种因子的调节和影响^[1]. 近年来, 因经济鱼类育种及精液冷冻保存技术研究的需要, 精子活力或生理特性的研究已愈来愈受到重视^[2-4].

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)属鲈鱼目、弹涂鱼科, 生活于沿海河口潮间带滩涂, 具有广温、广盐、食物链短、养殖成本低、病害少及耐长途运输等特点, 已成为我国东南沿海广泛养殖的名特优经济鱼类之一^[5-6]. 目前, 有关大弹涂鱼精子活力的研究仅见盐度和 pH 对精子活力影响

的简单报道^[7], 而有关离子、单糖对大弹涂鱼精子活力的影响研究未见报道. 笔者研究了盐度、pH、离子及葡萄糖等因子对大弹涂鱼精子活力的影响, 旨在补充大弹涂鱼精子的生理特性资料, 也为大弹涂鱼育种和精子超低温冻存研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼于 2008 年 6 月购自宁波市水产大世界市场(系刚从象山养殖场运抵到市场不久), 选取健康、活泼的雄鱼 50 尾(每尾重 25~50 g), 带回实验室暂养, 供采精用.

1.2 实验溶液配制

盐度梯度溶液的配制: 在过滤海水(盐度 25)中

收稿日期: 2009-07-03.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 宁波市科技计划项目(2006C100044, 2007A31004); 浙江省科技计划项目(2005C32020).

第一作者: 魏 平(1985-), 男, 湖南怀化人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物遗传育种. E-mail: yincong250@163.com

*通讯作者: 竺俊全(1964-), 男, 浙江嵊州人, 教授, 主要研究方向: 水产动物遗传育种. E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn

加入蒸馏水或海水晶配制成盐度为 5、10、15、20、25、30、35、40 的溶液。

pH 梯度海水的配制: 用 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 或 HCl 溶液调节过滤海水(盐度 20)的 pH, 配制 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10 的溶液。

不同浓度葡萄糖及盐溶液的配制: 用去离子水配制浓度为 100、150、300、500、600、800、1 000 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖、NaCl、KCl、 MgCl_2 、 CaCl_2 及 NaH_2PO_4 溶液。

人工海水的配制: 参照 Morisawa 等^[8]的配方配制人工海水(ASW), 每 1 000 mL 人工海水中含 30 g NaCl、0.8 g KCl、1.3 g CaCl_2 、13.5 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.18 g NaHCO_3 。

无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 HCO_3^- 的人工海水的配制: 用相同摩尔数的 MgCl_2 代替 ASW 中 CaCl_2 , 相同摩尔数的 CaCl_2 代替 ASW 中的 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 相同摩尔数的 NaCl 代替 ASW 中的 HCO_3^- 配制而成。

1.3 精液采集

先用毛巾擦净鱼体表, 然后解剖取得丰满, 呈乳白色处在第 5 期精巢, 将精巢捣碎、提取精液在显微镜下观察精子激活率在 85%以上者用于实验。

1.4 精子活力观察

用解剖针蘸取少许精液于载玻片上, 滴加事先配制好的实验溶液, 迅速用针头将其搅匀后在光镜下观测精子的激活率、运动时间和寿命。精子的激活率以激活起始时给定视野内被激活精子的数量占全部精子数量的百分比计算; 精子的运动时间指精子自激活开始至 90%的精子原地颤动为止的时间; 精子的寿命指精子自激活开始至 90%的精子停止运动所经历的时间。实验重复 3 次。

1.5 数据处理

采用 SPSS 11.5 软件对实验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 盐度及 pH 对精子活力的影响

在温度为 $25\sim 27^\circ\text{C}$ 、pH 为 8.1~8.3 条件下, 盐

度对大弹涂鱼精子活力的影响见图 1。盐度 5~35 范围内均有一定比例的精子被激活, 盐度 40 时精子未能被激活; 盐度 10~25 范围内精子激活率 ($81.67\pm 5.69\%$), 其中盐度为 20 时精子活力最好, 激活率、运动时间与寿命分别达 ($94.33\pm 4.04\%$)、(87.67 ± 8.02) min 及 (115.33 ± 9.24) min。

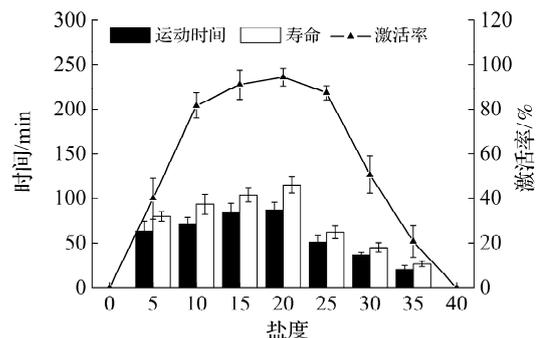


图 1 盐度对大弹涂鱼精子活力的影响

在温度为 $25\sim 27^\circ\text{C}$ 、盐度 20 条件下, pH 对精子活力的影响见图 2。在 pH 3~10 范围内均有一定比例的精子被激活, pH 6.0~9.0 范围内精子的激活率 ($80.33\pm 4.51\%$), 运动时间 (63.00 ± 4.00) min, 寿命 (80.00 ± 4.36) min, 其中 pH 为 8 时, 精子活力最好, 激活率、运动时间及寿命为 ($93.67\pm 3.21\%$)、(89.67 ± 9.02) min 及 (116.67 ± 11.93) min。

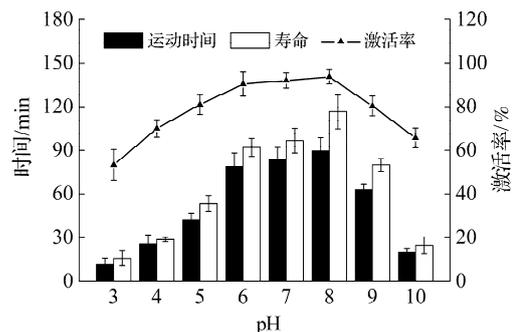


图 2 pH 对大弹涂鱼精子活力的影响

据研究^[9], 与大弹涂鱼生态栖息习性相似的中华乌塘鳢精子激活与运动的适宜盐度为 2.5~25, 在此条件下精子激活率 80%, 寿命 70 min。在适宜 pH 6.2~8.2 范围内, 寿命 65 min。大弹涂鱼与中华乌塘鳢均生活于河口及沿岸浅海滩涂, 喜穴居, 繁殖时在相对静水的洞穴中产卵受精, 其精子的适盐和适宜的 pH 范围较广是与其栖息环境的

盐度与 pH 变化较大相关的。

据洪万树等^[7]研究,大弹涂鱼精子的适盐范围为 15~20, 适宜 pH 范围为 6.02~8.01, 其精子的游动时间达 80~90 min, 与我们的试验结果相比有所不同, 可能是因为实验鱼来源不同或性成熟度差异造成的。

2.2 NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、NaH₂PO₄ 溶液对精子活力的影响

在温度为 25~27 条件下, NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂ 及 NaH₂PO₄ 溶液对大弹涂鱼精子激活率、运动时间及寿命的影响见表 1~表 3。

NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂ 溶液浓度在 100~600 mmol·L⁻¹ 范围内及 NaH₂PO₄ 溶液浓度在 100~500 mmol·L⁻¹ 范围内, 均有不同比例的精子被激活。在 NaCl 浓度为 150 mmol·L⁻¹、KCl 以及 MgCl₂ 浓度为 300 mmol·L⁻¹、CaCl₂ 以及 NaH₂PO₄ 浓度为 100 mmol·L⁻¹ 时, 精子激活率相对较高, 运动时间及寿

命相对较长。

K⁺、Na⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 是影响鱼类精子活力的主要离子。Na⁺ 对激活或抑制精子运动有直接、间接作用^[10]。Detweiler 和 Thomas 认为 Ca²⁺ 是调节鱼类精子活力的重要因子, 外界环境的 Ca²⁺ 经 Ca²⁺ 通道进入精子细胞内, Ca²⁺ 的增加为精子激活所必需^[11]。Morisawa 等^[12]研究表明, 1 mmol·L⁻¹ 的 KCl 就能抑制虹鳟精子的激活, 并在后面的报道中推断这种抑制作用普遍存在于鲑科鱼类中, 但苏德学等^[13-14]研究发现, K⁺ 能增强白斑狗鱼、花鱼骨等鱼类精子的活力。周立新等^[9]研究表明, K⁺ 浓度在 0.6%~0.9% 范围内, 中华乌塘鳢精子有较弱的激活反应, K⁺ 浓度增大到 1% 时, 精子不被激活, K⁺ 也对中华乌塘鳢精子的激活有抑制作用^[9]。我们的试验结果表明, 大弹涂鱼精子在浓度为 100~500 mmol·L⁻¹ 的 KCl 溶液中有不同比例的精子被激活, 但运动时间及寿命大幅度下降, K⁺ 浓度增大到 600 mmol·L⁻¹ 时,

表 1 不同浓度的几种溶液对大弹涂鱼精子活率的影响

浓度/(mmol·L ⁻¹)	激活率/%				
	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	NaH ₂ PO ₄
100	89.0±2.082	60.3±3.528	81.3±3.480	79.0±3.215	76.0±3.606
150	96.3±1.202	83.3±3.283	90.3±1.763	73.0±1.155	30.6±5.044
300	81.0±1.528	93.3±0.667	95.7±1.201	59.0±4.726	26.6±1.453
500	55.7±4.631	31.3±4.631	79.3±3.283	37.3±2.404	0
600	17.3±3.180	0	58.0±2.081	19.6±2.330	0
800	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0

表 2 不同浓度的几种溶液对大弹涂鱼精子运动时间的影响

浓度/(mmol·L ⁻¹)	运动时间/min				
	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	NaH ₂ PO ₄
100	84.30±3.84	11.00±1.16	57.30±2.03	59.00±4.73	15.60±1.67
150	93.30±2.60	16.00±1.00	76.33±4.06	39.30±1.45	5.00±0.58
300	61.60±3.76	26.30±2.73	87.00±5.51	12.00±1.16	2.66±0.88
500	38.60±1.76	2.66±0.33	23.67±1.45	3.66±0.33	0
600	6.00±0.58	0	14.67±1.45	1.66±0.33	0
800	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0

表3 不同浓度的几种溶液对大弹涂鱼精子寿命的影响

浓度/(mmol·L ⁻¹)	寿命/min				
	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	NaH ₂ PO ₄
100	101.33±4.98	14.00±1.00	72.30±2.85	67.00±2.91	19.00±1.76
150	111.60±9.82	23.00±1.73	92.00±7.21	44.00±2.08	7.00±1.00
300	71.00±4.36	34.66±2.33	101.60±6.98	19.66±1.20	3.66±0.33
500	46.30±2.40	5.33±0.33	27.67±2.40	7.00±0.58	0
600	8.66±0.67	0	20.00±0.88	4.00±0.00	0
800	0	0	0	0	0
1 000	0	0	0	0	0

表4 不同浓度的葡萄糖溶液对大弹涂鱼精子活力的影响

浓度/(mmol·L ⁻¹)	激活率/%	运动时间/min	寿命/min
100	21.33±2.03	30.67±4.06	38.67±2.60
200	59.00±4.36	47.33±4.33	67.00±3.79
300	75.33±4.26	77.33±1.86	98.33±3.60
400	97.00±1.16	108.33±2.40	131.00±5.13
500	98.00±1.00	61.00±2.89	76.67±5.78
600	85.00±2.52	30.33±1.45	40.33±2.60
800	69.00±4.36	69.00±4.36	27.33±1.45
900	0	0	0
1 000	0	0	0

精子不被激活。可见, K⁺对栖息环境相似的中华乌塘鳢与大弹涂鱼精子的影响作用存在差异。

2.3 葡萄糖溶液对精子活力的影响

温度为25~27℃条件下, 葡萄糖溶液对精子活力的影响见表4。葡萄糖浓度在100~900 mmol·L⁻¹范围内均有不同比例的精子被激活, 葡萄糖浓度为400 mmol·L⁻¹时, 激活率最高、运动时间与寿命最长, 分别为(97.00±1.16)%、(108.33±2.40) min、(131.00±5.13) min。

Gardiner^[15]认为体外受精鱼类的精子具有三羧酸循环代谢的能力, 精子可以通过氧化作用利用细胞外源性碳水化合物, 尤其是葡萄糖、半乳糖和果糖^[16]。本试验结果表明, 适当浓度的葡萄糖对大弹涂鱼精子运动可能起促进作用。

参考文献:

[1] 邓岳松, 林浩然. 鱼类精子活力研究进展[J]. 生命科学研究, 1999, 3(4):271-278.

- [2] 林丹军, 尤永隆. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4):69-75.
- [3] 洪万树, 张其永, 许胜发, 等. 花鲈精子生理特性及其精液超低温冷冻保存[J]. 海洋学报, 1996, 18(2):97-104.
- [4] 闫文罡, 章龙珍, 庄平, 等. 日本黄姑鱼精子生理特性及超低温冷冻保存研究[J]. 海洋渔业, 2008, 30(2):145-151.
- [5] 许星鸿. 大弹涂鱼的人工育苗技术[J]. 北京水产, 2006, 25(6):17-18.
- [6] 张其永, 洪万树. 大弹涂鱼养殖技术和人工育苗研究进展[J]. 齐鲁渔业, 2003, 20(4):1-5.
- [7] 洪万树, 张其永, 周东晨. 四种海产经济鱼类精子的生理特性和环境因子的关系[J]. 海洋科学, 1997, 21(3):64-66.
- [8] Morisawa M, Morisawa S, Santis R D. Initiation of sperm motility in *Ciona intestinalis* by calcium and cyclic AMP[J]. Zool Sci, 1984(1):237-244.
- [9] 周立新, 苏天凤, 江世贵. 中华乌塘鳢精子的生物学特性的研究[J]. 水产科技, 1995, 22(4):18-20.
- [10] 李萍, 张耀光, 殷江霞, 等. 华鲮精子活力的观察[J].

- 西南师范大学学报: 自然科学版, 2005, 30(6):1100-1104.
- [11] Detweiler C, Thomas P. Role of ions and ion channels in the regulation of Atlantic croaker sperm motility[J]. *Exp Zool*, 1998, 281:139-148.
- [12] Mosrisawa M, Suzuki K, Shimizu H, et al. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes[J]. *Exp Biol*, 1983, 107: 95-103.
- [13] 苏德学, 严安生, 田永胜, 等. 钠、钾、钙和葡萄糖对白斑狗鱼精子活力的影响[J]. *动物学杂志*, 2004, 39(1): 16-20.
- [14] 严安生, 彭安成, 姚杏珍. 不同浓度的电解质和非电解质溶液对花鱼骨精子活力的影响[J]. *华中农业大学学报*, 1988, 7(4):375-378.
- [15] Gardiner D M. Utilisation of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1978, 59A:165-168.
- [16] Gergory R W. Occurrence of fructose in trout seminal plasma[J]. *TransAm Fish Soc*, 1968, 97:203-204.

Effects of Environmental Factors on Vitality of Sperm in *Boleophthalmus pectinirostris*

WEI Ping, YAN Jia-qiang, ZHU Jun-quan *

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The effects of pH value, salinity, ions and glucose solutions on the sperm vitality of *Boleophthalmus pectinirostris* are investigated through determination of activation ratio, moving duration and life-span of sperm. The results indicate that the activation ratio of sperm exceeds $(81.67 \pm 7.21)\%$ in the solutions with salinity ranging from 10 to 25. The highest activation ratio, the longest moving duration and life-span of sperm are found to be $(94.33 \pm 4.04)\%$, (87.67 ± 8.02) min and (115.33 ± 9.24) min, respectively, in the case that the sperm is activated in the suitable solutions with salinity 20. Also, in the solutions of pH value 6.0~9.0, the activation ratio, the longest moving duration and life-span of sperm are all greater than $(80.33 \pm 4.51)\%$, (63 ± 4) min and (80 ± 4.36) min respectively. The vitality reaches its maximum in the solutions of pH 8. The sperm has a greater activation ratio in the solutions with ions concentrations of NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NaH₂PO being 150, 300, 300, 100, 100 mmol·L⁻¹, respectively.

Key words: *Boleophthalmus pectinirostris*; sperm; vitality; environmental factors

CLC number: S965

Document code: A

(责任编辑 史小丽)