

龚进玲, 柴毅, 罗静波. 几种阳离子和葡萄糖对子一代达氏鲟精子活力的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 257–260.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.076

几种阳离子和葡萄糖对子一代达氏鲟精子活力的影响

龚进玲, 柴毅, 罗静波

(长江大学, 湖北荆州 434020)

摘要:研究了不同浓度 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和葡萄糖溶液对子一代达氏鲟 (*Acipenser dabryanus* Dumeril) 精子的影响。结果表明:在 Na^+ 浓度为 0.25% 时,精子寿命 (life time, LT) 最长,为 219.67 s,在浓度为 0.20% 时精子的快速运动时间 (fast movement time, FT) 最长,为 66.67 s;精子对 K^+ 浓度在 0.000 4% 时 LT 和 FT 最长,分别为 124.67 s、52.67 s。而后随着浓度升高活力明显受到抑制;与 Na^+ 、 K^+ 相反,随着 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 浓度升高,分别超过 0.30%、0.10% 浓度后精子产生聚集现象;随着葡萄糖浓度升高,精子 LT 和 FT 逐渐延长。研究表明 Na^+ 、 K^+ 溶液可以延长精子的 FT 和 LT,在 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 较低浓度下都表现出对精子产生较强的抑制作用,外源性葡萄糖可被精子利用,适量的浓度提高精子活力,延长精子 LT。

关键词:达氏鲟;子一代;精子活力;阳离子;葡萄糖

中图分类号: S965.215 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0257-03

达氏鲟 (*Acipenser dabryanus* Dumeril) 隶属鲟形目、鲟科、鲟属,为我国较大型淡水经济鱼类,现主要分布于金沙江下段和长江上游干流^[1]。由于过度捕捞、水体污染以及水利工程建设等诸多因素,导致生态环境遭到严重破坏,野生种群资源不断下降,达氏鲟的分布区逐渐缩小。于 1996 年被国际自然保护联盟 (IUCN) 列入红皮书中,并被评为国家一级野生保护动物^[2]。2007 年成功获得子二代达氏鲟鱼苗^[3]之后,达氏鲟规模化全人工繁殖也取得重大突破^[4]。目前达氏鲟的报道较少且不系统^[5-9],主要包括消化系统、池塘养殖、分子进化、形态结构等方面。

鱼类精子活力与水环境 (盐度、温度、pH 值、渗透压、离子)、亲鱼激素水平及繁殖季节等因素有关,这也是鱼类精子生理特性与环境相适应的结果^[10]。在鱼类繁育中,精子活力能反映精液质量并预测受精率,因此研究精子生物学是非常必要的,并且可为精子冷冻保存提供理论依据,进一步优化冷冻程序。本试验通过对子一代达氏鲟精子生物学的研究,探讨精子与阳离子及葡萄糖之间的关系,可对现行达氏鲟淡水人工养殖技术有积极指导作用,还可为提高全人工繁殖的受精率以及以后该鱼的精子稀释液和保存液的配制提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 人工蓄养子一代达氏鲟亲本 达氏鲟亲本是由四川宜宾珍稀水生动物研究所经野生中华鲟人工繁殖所获得的子

一代个体。2006 年运输至中国水产科学院长江水产研究所中华鲟繁育基地培育,于 2013 年 4 月 11—16 日实施人工繁育,共催产 2 尾雄鱼和 2 尾雌鱼。

1.1.2 精子获得 利用 B 超对达氏鲟性腺发育进行监测,并筛选成熟亲鲟开展人工繁殖催产。采用一针注射法对子一代达氏鲟催产,注射 LHRH-A₂ 催产剂 12 h 后分 6 批次采集精液,合计采集量 300 mL。所获得的精液装入干燥洁净的双层塑料保鲜袋中,充入纯氧气后放入 4℃ 冰箱中冷藏保存,每 4 h 换气 1 次。

1.1.3 试验溶液的配制 各试验溶液浓度梯度设置见表 1。

表 1 不同溶液浓度梯度配置

溶液	浓度梯度 (%)
NaCl	0.10、0.20、0.25、0.30、0.40、0.45、0.50、0.60
KCl	0.000 2、0.000 4、0.000 6、0.000 8、0.001 0、0.001 2、0.001 4、0.001 6
CaCl ₂	0.05、0.10、0.20、0.25、0.30、0.40、0.45
MgCl ₂	0.10、0.20、0.25、0.30、0.40、0.45、0.50
葡萄糖	0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8

1.2 试验方法

精子的活力测定方法参照严安生等的分级标准^[11-12]。本次试验测量快速运动时间和寿命,即激液与启动液混合开始,视野中 70% 以上的精子转入慢速运动为止,为快速运动时间 (fast movement time, 以下简称 FT)。精子激活开始到 95% 以上的精子停止颤动所经历的时间,为寿命时间 (life time, 以下简称 LF)。每个浓度的溶液中同一样本精子活动情况的观测重复 3 次,最后结果取平均值。

1.3 统计分析

试验数据用 SAS V8.02 统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 NaCl 溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响

NaCl 溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响见图 1。随着

收稿日期:2015-01-13

基金项目:湖北省教育厅科研项目 (编号:Q20141311)。

作者简介:龚进玲 (1990—),女,湖北枝江人,硕士,研究方向为鱼类生理学。E-mail: gongjil23@yeah.net。

通信作者:柴毅,博士,副教授,从事珍稀水生动物保护生态生理研究。E-mail: chaiyi123456@126.com。

NaCl 溶液浓度升高,LT 不断上升。在 NaCl 浓度为 0.25% 时 LT 最长,为 219.67 s。而后随着浓度升高急速下降。精子 FT 呈上升趋势,其峰值(66.67 s)出现在浓度为 0.20% 时,当浓度大于 0.20% 后 FT 逐渐下降。

方差分析结果表明,NaCl 浓度为 0.20% 时的 FT 与其他浓度之间差异显著($P < 0.05$)。NaCl 浓度为 0.25% 时 LT 与其他浓度之间差异显著($P < 0.05$)。

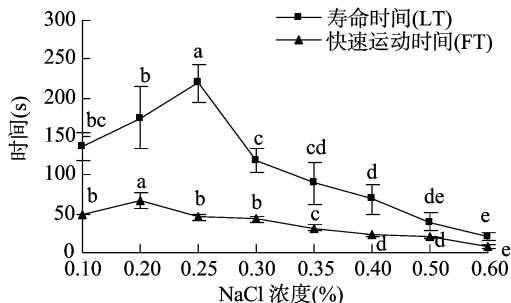


图1 不同浓度的 NaCl 溶液中子一代达氏鲟精子的活力

2.2 KCl 溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响

不同浓度 KCl 溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响见图 2。子一代达氏鲟精子对 K^+ 含量变化非常敏感。LT 与 FT 变化规律相似,随着 KCl 溶液浓度升高,LT 和 FT 呈逐渐上升的状态,在其浓度为 0.000 4% 时,LT、FT 分别达到 124.67、52.67 s。当 KCl 溶液浓度超过 0.000 4% 后子一代达氏鲟精子 LT 和 FT 急速下降。

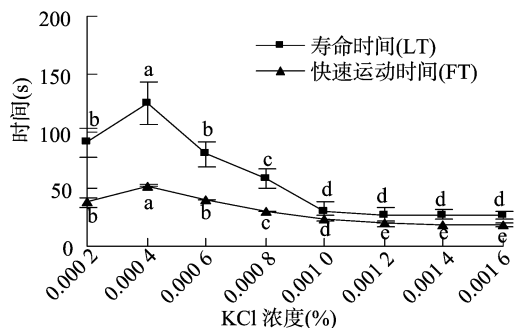


图2 不同浓度的 KCl 溶液中子一代达氏鲟精子的活力

方差分析结果表明,KCl 浓度为 0.000 4% 时的 FT、LT 与其他各浓度组之间差异显著($P < 0.05$)。0.010 0%、0.001 2%、0.001 4%、0.001 6% KCl 溶液浓度组所对应的 LT 之间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 $CaCl_2$ 溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响

不同浓度 $CaCl_2$ 溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响见图 3。随着 $CaCl_2$ 浓度逐渐增加,LT 和 FT 呈上升趋势,至浓度为 0.10% 时均达到最高值,分别为 113.67、28.67 s。当 $CaCl_2$ 溶液浓度达到 0.30% 时,精子活力明显受到抑制,大多数只是微微颤动,极少数缓慢游动。

方差分析结果表明, $CaCl_2$ 浓度为 0.30%、0.40% 和 0.45% 时,所对应的 FT 无显著性差异($P < 0.05$)。0.10% $CaCl_2$ 浓度组所对应的 FT、LT 与其他各浓度组之间存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.4 $MgCl_2$ 溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响

不同浓度 $MgCl_2$ 溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响见

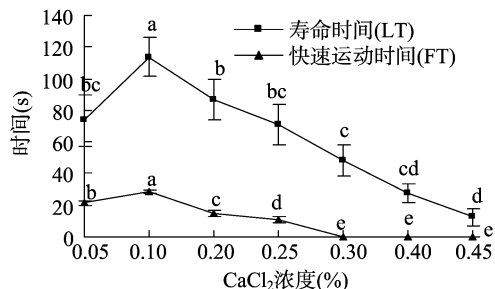


图3 不同浓度的 $CaCl_2$ 溶液中子一代达氏鲟精子的活力

图 4。随着 $MgCl_2$ 浓度不断上升,精子 LT、FT 开始不断上升。浓度为 0.30% 时精子 LT 最长,为 102 s;FT 也最长,为 25 s。而后随着 $MgCl_2$ 溶液浓度的上升呈明显下降趋势。

方差分析结果表明, $CaCl_2$ 浓度为 0.30% 时 FT 与其他浓度组之间差异显著($P < 0.05$)。0.25% 和 0.40% $MgCl_2$ 浓度组所对应的 LT 无显著性差异($P > 0.05$)。浓度为 0.30% 时所对应的 LT 与其他各浓度组之间存在显著性差异($P < 0.05$)。

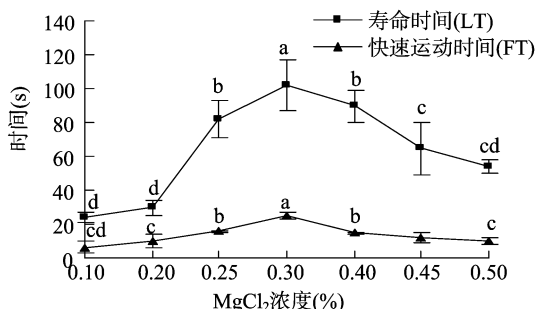


图4 不同浓度的 $MgCl_2$ 溶液中子一代达氏鲟精子的活力

2.5 葡萄糖溶液对子一代达氏鲟精子活力的影响

由图 5 可知,子一代达氏鲟精子在不同浓度葡萄糖溶液中活力存在明显差异。随着葡萄糖溶液浓度逐渐增加,LT 和 FT 呈缓慢趋势延长,在浓度为 0.60% 时活力明显增加,当葡萄糖浓度达到 0.70% 时 LT、FT 最长,分别为 259、74.67 s。而后随着浓度升高其活力呈下降趋势。

方差分析结果表明,0.70% 葡萄糖浓度组所对应的 FT 与其他各组之间存在显著性差异($P < 0.05$)。0.20%、0.60%、0.70% 葡萄糖浓度组所对应的 LT 之间无显著性差异($P > 0.05$),其中,0.70% 浓度组所对应的 LT 达到峰值。

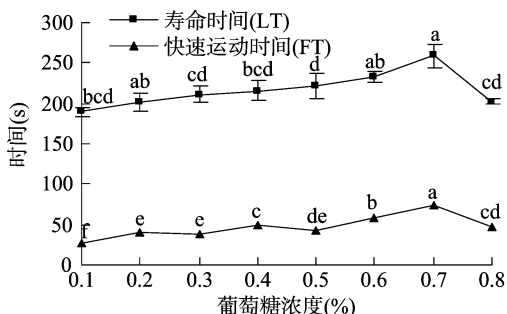


图5 不同浓度的葡萄糖溶液中子一代达氏鲟精子的活力

3 讨论

3.1 NaCl、KCl 溶液对精子活力的影响

鱼类精子在精巢和等渗溶液中是不运动的,但是却存在

着极强的潜在活动能力。排出体外的精子一旦与水或非等渗溶液相结合便会激烈运动,即激活^[13]。精浆与外部介质具有差异性,体现在离子组成成分和渗透压上^[14]。鱼类精子的抑制与激活机制与种类有关,其活力与精子对离子和渗透压的敏感程度有关^[13]。Morisawa等表明鲑科(Salmonidae)鱼类精浆中高出血浆数倍的 K^+ 是抑制精子运动的因素,而精浆中 K^+ 含量是血浆的18~29倍的鲤科(Cyprinidae)鱼类,其 K^+ 含量不阻止精子运动,反而能提高精子运动速度^[15]。鲟鱼类精子的敏感性由精浆的成分和 Na^+ 含量决定。离子对不同鱼类精子的影响效果具有很大差异,研究理化因子对子一代达氏鲟精子活力的影响对现行人工繁殖技术的指导十分必要。

Na^+ 是鱼类精浆重要组成成分和构成渗透压的主要离子。胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)精子在0.60% NaCl浓度时快速运动时间最长^[16];0.30% NaCl能延长翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaefor*)精子快速运动时间^[17];刘鉴毅等发现中华鲟(*Acipenser sinensis* Gray)精子在0.10% NaCl溶液中快速运动最长^[18]。本试验中测得子一代达氏鲟精子在NaCl溶液浓度为0.25%时寿命时间最长,在0.20%时快速运动时间最强,两者变化规律相似。

鲟鱼类精子对 K^+ 浓度的变化最为敏感。从西伯利亚鲟(*Acipenser baerii* Brandt)^[19]、湖鲟(*Acipenser fulvescens*)^[20]和中华鲟^[18]精子在 K^+ 浓度变化中发现鲟鱼类精子对低浓度 K^+ 的敏感性极强,但活力可受低浓度 K^+ 调控。Alavi等研究表明 K^+ 是抑制鲟鱼类精子在精浆中活动的主要因子^[21]。本试验发现当 K^+ 浓度大于0.0004%时精子寿命时间和快速运动时间逐渐缩短,说明高浓度的 K^+ 对精子有明显的抑制作用,而 K^+ 含量只有低于精浆浓度时才能增强精子活力,延长寿命时间。

NaCl、KCl对精子活力的影响都表现在渗透压方面。当精子在水中活动时,内外渗透压的差距促使精子调节平衡,从而消耗大量的自身能量。若将精子处于等渗溶液中,必然会使存活时间明显延长,原因在于调节渗透压时所用的能量转用于维持其生命活动。因此,在人工繁殖过程中配制与亲本渗透压相当的稀释液,对提高精子受精率、增加渔业产量有重要意义。

3.2 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 对精子活力的影响

Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 也是鱼类精浆中的重要组成成分,同时是形成精浆渗透压的主要离子。 Ca^{2+} 是调节精子活力的重要因子。Alavi等报道,鱼类精子激活时,外部溶液中的 Ca^{2+} 通过专属通道进入精细胞使胞内的 Ca^{2+} 浓度增加,这是鲤科鱼类、鲢鳙鱼类和鲟类精子激活所必需的^[14]。虽然 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 是多数鱼类精子激活所必需,但还是会表现出抑制精子活力的作用^[11]。刘鉴毅等研究表明, Ca^{2+} 浓度大于0.22%时中华鲟精子的活力明显受到抑制,在0.44%时完全被抑制^[18]。实际上浓度在0.05%时约15%精子已在短时间内停止运动。白斑狗鱼精子随着溶液浓度的增加聚集现象趋于强烈,这是 Ca^{2+} 作用的结果,与渗透压无关^[22-23]。可见,虽然 Ca^{2+} 是鱼类精子激活中的重要因子,但其浓度不是越高越好。本试验也表明,子一代达氏鲟精子活力在 Ca^{2+} 0.10%~0.45%浓度范围依次降低,与上述研究结果一致。

Mg^{2+} 对中华鲟精子活力影响效果与 Ca^{2+} 的作用相

似^[14]。在本次试验中发现子一代达氏鲟精子活力在 $CaCl_2$ 、 $MaCl_2$ 溶液中影响效果不一。当 Mg^{2+} 浓度高于0.30%时精子活力表现出抑制现象。说明不同离子对精子的作用不同,同种离子对不同鱼类精子的作用也有差异,其机理有待进一步研究。

3.3 葡萄糖对精子活力的影响

葡萄糖、半乳糖、果糖是精浆的重要成分碳水化合物中主要成分。Gardiner认为体外受精的鱼类精子可利用细胞外源性营养物质为精子运动提供能量^[24]。已有研究表明,适宜的葡萄糖浓度可明显延长白斑狗鱼(*Esox lucius*)^[22]、高白鲑(*Coregouns peled*)^[25]及中华鲟^[18]精子的活动时间。在本次试验中,可以看出葡萄糖在适宜浓度时有延长子一代达氏鲟精子寿命的作用,这与上述研究观点一致。表明子一代达氏鲟精子可以利用外源性葡萄糖补充在整个运动活动中所消耗的能量,从而提高精子寿命时间。

3.4 本研究的局限性

精子活力能较准确地预测受精率,而精子受精率的大小直接影响人工繁殖效果,但会受到水环境的影响。本试验对子一代达氏鲟精子在几种离子和葡萄糖下活力影响进行初步试验,未对其授精效果进行研究,其合适的人工授精激活液浓度未知,可在以后的研究中进行探讨。

参考文献:

- [1] 丁瑞华. 四川鱼类志[M]. 成都:四川科学技术出版社,1994:29-30.
- [2] 汪松. 中国濒危动物红皮书(鱼类)[M]. 北京:科学出版社,1998:9-10.
- [3] 刘涛. 达氏鲟子二代全人工繁殖首获成功[J]. 水产科技情报,2007,4(3):139-139.
- [4] 长江所达氏鲟规模化全人工繁殖获得成功[J]. 水产养殖,2013(6):54.
- [5] 黄德祥. 达氏鲟仔鱼消化系统的发育及摄食初期食性的初步观察[J]. 水产学报,1980,4(3):285-293.
- [6] 杜军,赵刚,龚全,等. 达氏鲟亲鱼池塘人工培育试验[J]. 西南农业学报,2009,22(3):824-827.
- [7] 汪登强. 白鲟、达氏鲟线粒体DNA全序列及鲟形目分子进化研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005.
- [8] 史玲玲,危起伟,柴毅,等. 达氏鲟视网膜早期发育及其相关机能[J]. 中国水产科学,2013(5):958-967.
- [9] 何斌,陈先均,杜军,等. 人工养殖条件下达氏鲟生长特性的研究[J]. 西南农业学报,2011,24(1):335-339.
- [10] 舒琥,黄燕,张海发,等. 盐度及温度对红鳍笛鲷精子活力的影响[J]. 广州大学学报:自然科学版,2005,4(1):29-32.
- [11] 严安生,李诗模,王其和. 鲤鱼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[J]. 淡水渔业,1993,23(5):5-7.
- [12] 严安生,宋贵文,闫拥军. 鲤、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,1995,25(2):3-5.
- [13] Cosson J, Billard R, Gibert C, et al. In the male gamete: from basic to clinical applications[M]. Illinois: Cache River Press, 1999:161-186.
- [14] Alavi S M H, Cosson J, Karami M, et al. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality[J]. Reproduction, 2004, 128(6):819-828.

杜雪燕,王 迅,柴沙驼,等. 应用康奈尔净碳水化合物-蛋白质体系(CNCPS)评定不同物候期天然牧草营养价值[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):260-263.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.077

应用康奈尔净碳水化合物-蛋白质体系(CNCPS) 评定不同物候期天然牧草营养价值

杜雪燕,王 迅,柴沙驼,刘书杰

(省部共建青海省高原放牧家畜营养与生态重点实验室培育基地/

青海省高原放牧家畜营养与饲料科学重点实验室/青海大学,青海西宁 810016)

摘要:利用康奈尔净碳水化合物-蛋白质体系(CNCPS),测定不同物候期天然牧草 CNCPS 营养成分,计算蛋白质组分和碳水化合物组分,并估测瘤胃可降解蛋白和瘤胃可降解碳水化合物的吸收率,综合评价天然牧草营养价值。结果显示:(1)返青期 CP 含量最高(14.88%, $P < 0.01$);枯草期 NDF(65.36%, $P < 0.05$)、ADF(45.28%, $P < 0.01$)含量均最高。(2)不同物候期,PA、PB₁、SP 含量差异不显著($P > 0.05$);PB₂ 含量,青草期显著高于枯草期($P < 0.05$);PB₃ 和 NDFIP(% CP)含量枯草期均极显著高于返青期、青草期($P < 0.01$);返青期 RDP(10.01%, $P < 0.01$)、RUP(4.88%, $P < 0.01$)含量最高,可消化的瘤胃非降解蛋白(DRUP)含量最高(2.86%, $P < 0.01$);枯草期 PC(% CP)含量最高(18.98%, $P > 0.05$)。(3)CA 和 CB₁ 变化趋势相似,从牧草返青到干枯,先升高,后线性降低,枯草期时均最低,分别为 26.02%(% CHO)、0.92%(% CHO);缓慢降解碳水化合物中,枯草期 CB₂、n NDF、n ADF 含量均达到全年最高,前两者全年差异不显著($P > 0.05$),后者则极显著高于返青期(42.35% CHO, $P < 0.01$)和青草期(43.53% CHO, $P < 0.01$);枯黄期 CC 含量最高;不同物候期 DRUC 和 ADL 含量差异不显著($P > 0.05$)。研究表明:不同物候期,牧草中 CP 与 CHO 组成和含量相差较大,营养价值不尽相同;自牧草返青,随生育期的延续,牧草营养价值降低,枯草期达到最低。

关键词:康奈尔净碳水化合物-蛋白质体系(CNCPS);物候期;天然牧草;营养价值

中图分类号:S812 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)01-0260-04

天然牧草营养直接影响反刍家畜的营养状况、生命活动和生产性能。准确评价放牧家畜四季采食牧草营养价值变化,是评估天然草地营养供给的基础,也是合理开发利用草地生态资源的重要依据。如何评价评定牧草的营养价值一方面

需要测定营养物质含量,另一方面需要了解营养物质在家畜体内的消化利用状况^[1]。同时,研究表明,同种植物在不同生育期,营养物质在全株各部位的转移和分配均不断发生变化,使得不同物候期,植株饲用价值和利用率不尽相同^[2]。可见,准确估测不同物候期天然草地的牧草营养状况,对于草地畜牧业发展尤为重要。近年来,笔者所在课题组成员用传统的概略养分分析法结合体外产气法对三江源区玉树州、果洛州、玛多县等地天然牧草营养价值进行了大量研究^[3-5]。

与 Weende 体系和 Van Soest 体系的静态评价体系相比,美国动物营养科学家提出的康奈尔净碳水化合物-蛋白质体

收稿日期:2015-01-24

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201303062-1);国家自然科学基金(地方科学基金)(编号:41461081)。

作者简介:杜雪燕(1988—),硕士研究生,研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail:duxueyan2012@126.com。

通信作者:柴沙驼,副研究员。E-mail:chaishatuo@163.com。

[15] Morisawa M, Suzuki K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts [J]. Science, 1980, 210 (4474): 1145-1147.

[16] 李 飞, 万 全. 环境因子对胭脂鱼精子活力影响的研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(4): 22-28.

[17] 王 芳, 岳兴建, 谢碧文, 等. pH、葡萄糖以及金属离子对翘嘴红鲌精子活力的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16812-16814, 16884.

[18] 刘鉴毅, 甘 芳, 危起伟, 等. 几种不同浓度的离子及单糖对中华鲟精子活力的影响[J]. 水生生物学报, 2007, 31(6): 849-854.

[19] Gallis J L, Fedrigo E, Jatteau P. Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, spermatozoa: Effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility [M]. *Acipenser*: Cemagref Publ, 1991.

[20] Toth G P, Ciereszko A, Christ S A, et al. Objective analysis of sperm

motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions [J]. *Aquaculture*, 1997, 154(3/4): 337-348.

[21] Alavi S H, Cosson J. Sperm motility in fishes (II): effects of ions and osmolality: a review [J]. *Cell Biology International*, 2006, 30 (1): 1-14.

[22] 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.

[23] 江世贵, 苏天凤, 喻达辉, 等. 中华乌塘鳢精子的生物学特性及其超低温保存[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 119-122.

[24] Gardiner D M. Utilisation of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1978, 59(2): 165-168.

[25] 古 巍. Na、K、葡萄糖和果糖对高白鲢精子活力影响的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2005.