

不同浓度葡萄糖、NaCl 和 KCl 对蛇鮈精子活力的影响

丁淑荃¹, 李飞², 万全^{1*}, 许进进¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘要: 在光学显微镜下, 研究不同浓度的葡萄糖、NaCl 和 KCl 对蛇鮈精子活力的影响, 为蛇鮈精子保存液和人工授精时精卵结合液的组成提供科学依据, 为蛇鮈的人工繁育奠定基础。结果表明, 葡萄糖溶液浓度为 125 mmol·L⁻¹ 时, 精子快速运动时间最长, 为 37.87±0.99 s, 精子寿命亦最长, 为 186.78±32.65 s; NaCl 浓度为 68 mmol·L⁻¹ 时, 精子快速运动时间最长, 为 49.25±3.25 s, NaCl 浓度为 51 mmol·L⁻¹ 时, 精子的寿命最长为 153.41±30.84 s; KCl 溶液的最适浓度为 125 mmol·L⁻¹, 精子的快速运动时间为 36.49±4.18 s, 而 KCl 溶液的浓度为 75 mmol·L⁻¹ 时精子的寿命最长为 664.03±155.09 s。

关键词: 蛇鮈; 溶质; 浓度; 精子活力

中图分类号: S961.22

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)06-0881-04

Effects of different concentrations of glucose, NaCl and KCl on the sperm motility in *Saurogobio dabryi*

DING Shu-quan¹, LI Fei², WAN Quan¹, XU Jin-jin¹

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

Abstract: In this paper, the effects of different concentrations of glucose, NaCl and KCl on the sperm motility of *Saurogobio dabryi* were studied under light microscope to supply scientific evidence for the composition of sperm preservation solution and fertilization solution for sperm and eggs, and to set a foundation for the artificial propagation of *Saurogobio dabryi*. The results showed that when the concentration of glucose was 125 mmol/L, the sperm had the longest fast moving time as 37.87 ± 0.99 s, and the longest sperm lifetime as 186.78 ± 32.65 s; when the concentration of NaCl was 68 mmol·L⁻¹, the sperm had the longest fast moving time as 49.25±3.25 s; when the concentration of NaCl was 51 mmol·L⁻¹, the sperm had the longest sperm lifetime as 153.41±30.84 s; when the concentration of KCl was 125 mmol·L⁻¹, the sperm had the longest fast moving time, as 36.49±4.18 s; when the concentration of KCl was 75 mmol·L⁻¹, the sperm had the longest sperm lifetime as 664.03±155.09 s.

Key words: *Saurogobio dabryi*; solute; concentration; sperm motility

蛇鮈 *Saurogobio dabryi* (Bleeker) 属于鲤形目 Cypriniformes、鲤科 Cyprinidae、亚科 Gobioninae、蛇鮈属 *Saurogobio*^[1]。蛇鮈为栖息于江河、湖泊中的中下层小型鱼类, 一般多为十几厘米左右, 最大个体仅达 24 cm^[2-5], 含肉率高, 肌间刺小, 肉质肥嫩, 味较美, 具有较高的经济价值。

迄今为止, 对于蛇鮈属鱼类各方面的相关研究较少。已知材料主要有杨秀平等^[6]的形态度量学研

究, 谢恩义^[7]的生殖力研究, 何学福等^[8]的产卵习性及胚胎发育方面研究, 周春花等^[9]的繁殖季节蛇鮈性腺发育状况的研究。总体看来, 对于蛇鮈这种鱼类仍缺乏系统而深入的研究。

影响鱼类精子运动能力的因子有渗透压、金属离子、pH 值等^[10], 这些环境因子对不同鱼类的精子活力产生的影响不完全相同, 甚至是相反的结果^[11]。本试验旨在研究不同浓度的葡萄糖、NaCl

收稿日期: 2012-07-16

基金项目: 三峡工程珍稀鱼类增殖放流项目资金和安徽省科技厅项目 (07030503049) 共同资助。

作者简介: 丁淑荃, 女, 高级实验师。E-mail: shuquanding@ahau.edu.cn

* 通讯作者: 万全, 男, 副教授。

和 KCl 对蛇鮈精子活力的影响,以探讨蛇鮈精子保持最大活力的环境条件与保存时间,从而为以后的人工繁殖过程提高精子授精率和配制精子保存液提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 精子采集及处理

蛇鮈精子于蛇鮈的繁殖季节(2009年4月下旬)采集自安徽省寿县大井水库,选择体质好、成熟度高的雄鱼48尾(平均体长17.03 cm,体重53.58 g),擦干,轻压腹部,弃去刚挤出的精液(可能由于沾水而激活),然后用干燥的胶头滴管吸取精液,滴入干燥的小瓶中,4℃低温保存,以备进行活力试验。

1.2 不同浓度溶液的配制

本次试验主要研究了不同浓度葡萄糖、NaCl 和 KCl 对蛇鮈精子活力的影响。不同浓度葡萄糖溶液及 KCl 溶液的配制参照赵振山对乌鳢 *Channa argus* 精子的研究^[12],设计0~300 mmol·L⁻¹共10个梯度,均用分析纯 KCl 及葡萄糖和去离子水配制而成。不同浓度 NaCl 溶液的配制共设0~716 mmol·L⁻¹14个梯度(换算成百分数为0%~2.2%),均用分析纯 NaCl 和去离子水配制而成^[13]。

1.3 精子活力观察方法

将预先滴有1滴试验液的载玻片置于10×10倍显微镜下,对准视野,用解剖针挑取少许低温保存的蛇鮈精子原液与载玻片中液滴混合,计时从混合时开始,观察以1个视野为准,观察的同时,开始记录时间。若精子在试验液中不运动,则用胶头滴

管滴1滴去离子水,以检查添加去离子水后精子活力状况。精子活力评价等级参照吴景贵^[14]的区分标准,此次观测只计精子快速运动和寿命时间,每个样本观察3次,取其平均值。试验期间气温为17~24℃,水温基本恒定在19℃。

1.4 数据处理

试验所得数据均用(平均值±标准误差)表示,用 SAS8.0 软件进行方差分析并用 Duncan 法进行多重比较以检验其差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同葡萄糖溶液对蛇鮈精子活力的影响

10个不同浓度葡萄糖溶液对蛇鮈精子活力的影响见表1。从表1可以看出,蛇鮈精子在葡萄糖溶液浓度为200 mmol·L⁻¹以下时,活率均可达100%;浓度为250 mmol·L⁻¹时激活率下降为50%;300 mmol·L⁻¹时精子不运动,加水后运动。在葡萄糖浓度从0到125 mmol·L⁻¹变化时,精子快速运动时间基本上呈上升趋势;在浓度为125 mmol·L⁻¹时最长,为37.87±0.99 s。多重比较结果表明,与其他各浓度葡萄糖溶液中精子快速运动时间差异显著($P<0.05$)。随着浓度的增加,精子快速运动时间有缩短的趋势,在浓度为300 mmol·L⁻¹时,快速运动时间减为0。精子的寿命在葡萄糖浓度为125 mmol·L⁻¹时最长,为186.78±32.65 s。分析表明,该浓度时精子的寿命与其他浓度时精子的寿命差异显著($P<0.05$)。

表1 蛇鮈精子在不同浓度葡萄糖溶液中的活力

Table 1 Sperm motility of *Saurogobio dabryi* in different concentrations of glucose solutions

葡萄糖/mmol·L ⁻¹ Glucose	快速运动时间/s Fast moving time	寿命/s Lifetime	激活率(水温19℃) The rate of activation (water temperature, 19℃)
0	25.92±1.95 ^d	81.15±1.86 ^d	100%
25	27.54±2.21 ^{dc}	89.11±14.71 ^d	100%
50	32.20±4.30 ^{bc}	136.15±24.65 ^b	100%
75	33.55±1.83 ^{ab}	133.73±28.66 ^{bc}	100%
100	33.00±1.14 ^b	121.34±12.71 ^{bc}	100%
125	37.87±0.99 ^a	186.78±32.65 ^a	100%
150	31.21±2.95 ^{bc}	102.69±10.18 ^{cd}	100%
200	32.41±4.34 ^b	78.49±9.78 ^d	100%
250	27.61±2.32 ^{dc}	39.39±2.54 ^e	50%
300	0 ^e	0 ^f	不动,加水后运动

注:表格中同一列时间后面的字母不同代表差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different superscripts in the same column are significantly different ($P<0.05$). The same below.

2.2 不同浓度 NaCl 溶液对蛇鮈精子活力的影响

不同浓度 NaCl 溶液对蛇鮈精子活力影响的结果见表2。从表2可知,NaCl 浓度在0~68 mmol·L⁻¹

时,精子快速运动时间呈逐渐上升趋势,在浓度为68 mmol·L⁻¹时最长,为49.25±3.25 s,之后呈下降趋势,到153 mmol·L⁻¹时精子开始无快速运动。蛇

鮈精子的寿命在 NaCl 浓度 0~51 mmol·L⁻¹ 时呈上升趋势, 在 51 mmol·L⁻¹ 时达到最大, 为 153.41±30.84 s, 在 51 mmol·L⁻¹ 以后呈下降趋势。精子激活率在 NaCl 浓度为 0~102 mmol·L⁻¹ 时均约为 95%, 随着浓度的增加, 激活率逐渐下降, 在 153 mmol·L⁻¹ 时 95% 的精子开始不运动, 但是加水又均可快速运动; 当浓度达到 170 mmol·L⁻¹ 时精子基本不动, 但加水

后精子也可快速运动; 而在 307 mmol·L⁻¹ 时, 加水后精子只能缓慢运动, 376 mmol·L⁻¹ 时加水后不运动。多重比较结果表明, 68 mmol·L⁻¹ 时的快速运动时间最长, 且与其他各组的快速运动时间差异显著 ($P<0.05$), 51 mmol·L⁻¹ 时的寿命最长, 但与 34 mmol·L⁻¹ 时的寿命差异不显著, 与 68 mmol·L⁻¹ 等浓度时的寿命差异显著 ($P<0.05$)。

表 2 蛇鮈精子在不同浓度 NaCl 溶液中的活力

Table 2 Sperm motility of *Saurogobio dabryi* in different concentrations of NaCl solutions

NaCl/mmol·L ⁻¹	快速运动时间/s Fast moving time	寿命/s Lifetime	激活率(水温 19℃) The rate of activation
0	22.81±6.09 ^d	70.65±8.73 ^d	95%
17(0.1%)	27.25±6.59 ^d	122.58±5.00 ^{bc}	95%
34(0.2%)	33.85±5.68 ^c	142.45±34.02 ^{ab}	95%
51(0.3%)	42.41±3.34 ^b	153.41±30.84 ^a	95%
68(0.4%)	49.25±3.25 ^a	114.43±21.22 ^c	95%
85(0.5%)	41.74±4.11 ^b	118.83±3.98 ^{bc}	95%
102(0.6%)	23.75±1.46 ^d	51.20±2.45 ^{de}	95%
119(0.7%)	16.34±1.20 ^e	31.57±6.47 ^{ef}	70%
136(0.8%)	14.63±1.59 ^e	20.60±2.28 ^{fg}	40%
153(0.9%)	0 ^f	0 ^g	95% 不运动, 加水后快速运动
170(1.0%)	0 ^f	0 ^g	不动, 加水后快速运动
239(1.4%)	0 ^f	0 ^g	不动, 加水后运动
307(1.8%)	0 ^f	0 ^g	不动, 加水后运动, 但恢复运动的精子数减少
376(2.2%)	0 ^f	0 ^g	不动, 加水后仍不运动

表 3 蛇鮈精子在不同浓度 KCl 溶液中的活力

Table 3 Sperm motility of *Saurogobio dabryi* in different concentrations of KCl solutions

KCl/mmol·L ⁻¹	快速运动时间/s Fast moving time	寿命/s Lifetime	激活率(水温 19℃) The rate of activation
0	19.79±1.34 ^d	73.09±3.83 ^{de}	100%
25	26.21±2.45 ^c	175.19±4.20 ^c	100%
50	35.53±2.39 ^{ab}	436.22±21.58 ^b	100%
75	35.83±3.32 ^a	664.03±155.09 ^a	80%
100	31.18±4.76 ^b	470.70±58.88 ^b	70%
125	36.49±4.18 ^a	117.19±11.34 ^{cd}	60%
150	30.94±1.22 ^b	85.64±11.45 ^{cd}	60%
200	0 ^e	0 ^e	少量运动, 加水快速运动
250	0 ^e	0 ^e	不动, 加水后 80% 运动
300	0 ^e	0 ^e	同上

2.3 不同浓度 KCl 溶液对蛇鮈精子活力影响

10 个不同浓度 KCl 溶液对蛇鮈精子活力影响的结果见表 3。从表 3 中可以看出: KCl 浓度在从 0 到 125 mmol·L⁻¹ 变化时, 精子快速运动时间基本呈上升趋势, 在浓度为 125 mmol·L⁻¹ 时达到峰值, 为 36.49±4.18 s, 之后呈下降趋势, 从浓度为 200 mmol·L⁻¹ 开始无快速运动。多重比较结果表明, KCl 溶液浓度为 50 mmol·L⁻¹ 时, 精子快速运动时间与浓度为 75、100、125 及 150 mmol·L⁻¹ 时的快速运动时

间差异不显著; 浓度为 75 和 125 mmol·L⁻¹ 时的快速运动时间与浓度为 100 和 150 mmol·L⁻¹ 的快速运动时间差异显著 ($P<0.05$)。在精子寿命观察中, 浓度从 0~75 mmol·L⁻¹ 变化时, 寿命时间呈上升趋势, 在 75 mmol·L⁻¹ 时达到最大, 为 664.03±155.09 s, 与其他浓度时精子寿命差异显著 ($P<0.05$), 浓度为 50、100 mmol·L⁻¹ 时的寿命仅次于浓度为 75 mmol·L⁻¹ 时的寿命。浓度为 0~50 mmol·L⁻¹ 时, 精子激活率均可达 100%, 而随着浓度的上升, 激活率逐渐下降,

在浓度达到 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 只有少部分精子在原地颤动, 但加水后快速运动; 浓度为 $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时精子开始不运动, 加水后约有 80% 精子运动。

3 讨论

鱼类精子在天然环境中运动的持续时间随种类不同有所不同, 精子运动的持续时间与精子的有效授精时间基本一致。精子运动的持续时间主要决定于精子所处溶液的化学特性^[15]。

3.1 葡萄糖对蛇鮈精子活力的影响

在鱼类精浆中还没有多聚糖的报道, 而单糖主要是己糖, 如果糖、半乳糖和葡萄糖在精液中已有报道, 并且葡萄糖浓度比其他 2 种己糖浓度要高。这些糖类在鱼类精子中的重要作用还不清楚, 可能是为了满足精巢产生精子和精子脂质的合成高能需求^[15]。Gardiner 认为体外受精鱼类精子具有三羧酸循环代谢的能力, 因此可以通过氧化作用利用细胞外源性碳水化合物^[16]。在不同浓度葡萄糖溶液下, 蛇鮈精子的快速运动时间差异不显著, 但是寿命时间有较大的变化, 在浓度为 $125 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 寿命为 186.78 s , 与其他各浓度时的寿命差异显著。另外, 在该浓度时, 精子快速运动时间最长, 由此可以确定蛇鮈人工授精时精卵结合液中葡萄糖的浓度为 $125 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。蛇鮈精子在葡萄糖浓度为 $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的激活率为 0, 由此可以判定, 在配制蛇鮈精子保存时葡萄糖的浓度可为 $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.2 Na^+ 、 K^+ 对蛇鮈精子活力的影响

Na^+ 、 K^+ 离子是我国淡水养殖鱼类精浆的主要离子组成。研究表明, 在鲢、鳙、草鱼、鲤鱼和团头鲂的精浆中钾离子浓度很高, 均在 $1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上; 钠离子浓度次之, 在 $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上。通常情况下, 淡水鱼类精浆中钾离子的浓度高于血浆中的浓度。精浆中高浓度的钾离子可能是由存在于血液和精巢之间的血睾屏障以及输精管上皮细胞的吸钠、排钾作用造成的。 Na^+ 、 K^+ 离子通过参与调节精液渗透压或者通过调节精子激活而调控精子的运动^[15]。在不同浓度的 NaCl 溶液中, 蛇鮈精子在浓度为 $68 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.4%) 时快速运动时间最长, 为 $49.25\pm 3.25 \text{ s}$, 当浓度达到 $153 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.9%) 时, 激活率为 0, 加水后便可快速运动。由此可知, 用 NaCl 配制精卵结合液和精子保存液时的浓度可分别为 0.4% 和 0.9%。在浓度为 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 K^+ 离子条件下, 精子寿命竟达到 664 s , 为所测最高值, 可以推测在蛇鮈精子中, 较高浓度 K^+ 离子可以起到一

定的延长精子寿命的作用, 然而更高浓度的 K^+ 离子则破坏了精子的渗透压平衡, 从而使其寿命急剧缩短。通过比较 2 种离子对蛇鮈精子活力影响的规律发现, 在同等或相似浓度 (即渗透压相同或相似) 的条件下, 蛇鮈精子的快速运动时间、寿命及激活率均存在着显著差异。由此可以判定, 不同离子对蛇鮈精子的影响效果和规律是不同的。同样, 离子与糖类对蛇鮈精子的影响也是不同的。这一结果验证了鱼类精子活力是由渗透压、离子等多种机制共同影响的。由此, 在配制精卵结合液和精子保存液的时候需要综合考虑这些因素的影响, 从而制定出最佳的解决方案。

参考文献:

- [1] 杨秀平, 张敏莹, 刘焕章. 蛇鮈属鱼类的形态度量学研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(2): 164-169.
- [2] 唐家汉. 中国鮈亚科两新种[J]. 动物分类学报, 1980, 5(4): 436-439.
- [3] 陈宜瑜. 中国动物志(硬骨鱼纲鲤形目中卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] 湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 长江鱼类[M]. 北京: 科学出版社, 1976: 69-70.
- [5] 丁瑞华. 四川鱼类志[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994: 303.
- [6] 伍献文. 中国鲤科鱼类志(下卷)[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [7] 谢恩义. 蛇鮈个体生殖力的研究[J]. 怀化师专学报, 1997, 16(5): 58-60.
- [8] 何学福, 宋昭彬, 谢恩义. 蛇鮈的产卵习性及胚胎发育[J]. 西南师范大学学报, 1996, 21(3): 276-281.
- [9] 周春花, 欧阳珊, 郭治之, 等. 繁殖季节蛇鮈性腺发育的研究[J]. 水利渔业, 2004, 24(5): 24-25.
- [10] Morisawa M, Uzuki K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts[J]. Science, 1980, 210: 1145-1146.
- [11] 沈建忠, 江庆. 南方鲂精子保存方法的初步研究[J]. 水利渔业, 2002, 22(5): 13-15.
- [12] 赵振山, 曹克驹, 杨立军. 乌鳢精子生理生态特性的研究 II 钠、钾及渗透压对精子活力的影响[J]. 水利渔业, 1995(3): 13-15.
- [13] 魏开金, 王汉平, 林加敬, 等. 氯化钠浓度对鲌鱼精子活力影响的初步观察[J]. 淡水渔业, 1996, 26(4): 9-10.
- [14] 蒲德永. 南方鲢精子活力的观察[J]. 水产科学, 1991, 15(6): 11-12.
- [15] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [16] Gardiner D M. Utilisation of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1978, 59A: 165-168.