

Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺和葡萄糖溶液作为授精-激活介质对中华鲟精子受精率的影响

甘芳 杜浩 危起伟* 陈细华 刘鉴毅 郑跃平

(农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室 华中农业大学水产学院 武汉 430070;
中国水产科学研究院长江水产研究所 荆州 434000; 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 无锡 214081)

摘要: 以不同浓度的 NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂ 溶液和葡萄糖溶液作为授精介质,研究了中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 的受精效果。结果显示,适量的阳离子和葡萄糖作为激活授精介质时中华鲟卵受精率都有所提高。在实验设置浓度范围内 25 mmol/L NaCl 溶液、0.1 mmol/L KCl 溶液、1 mmol/L MgCl₂ 溶液、1 mmol/L CaCl₂ 溶液和 50 mmol/L 葡萄糖溶液浓度下,受精率分别可达到最高值,依次为 87.72%、86.82%、82.24%、89.76%、80.92%。随着实验浓度继续增加,受精率反而呈下降趋势。结果显示,作为人工配制的中华鲟精子授精-激活介质,最适 NaCl 溶液浓度在 25 mmol/L 附近,最适葡萄糖溶液浓度在 25 mmol/L 附近,最适 KCl 溶液浓度 0.1 mmol/L,最适 MgCl₂ 溶液浓度 1 mmol/L,最适 CaCl₂ 溶液浓度 1 mmol/L。

关键词: 中华鲟; 精子活力; 受精率

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)01-106-06

Effect of Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ and Glucose Solutions as Insemination-activation Media on the Fertilization of *Acipenser sinensis* Milt

GAN Fang DU Hao WEI Qi-Wei* CHEN Xi-Hua
LIU Jian-Yi ZHENG Yue-Ping

(Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Ministry of Agriculture of China, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;
Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Jingzhou 434000;
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The fertilization of Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*) milt was assessed by using different concentrations of NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ or glucose solution as the insemination-activation medium. The results showed that the fertilization rates of Chinese Sturgeon were all improved when suitable concentrations of NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ and glucose solutions were used, and that the fertilization rates reached the highest when the following concentrations of solutions were used: 87.72% in 25 mmol/L NaCl, 86.82% in 0.1 mmol/L KCl, 82.24% in 1 mmol/L MgCl₂, 89.76% in 1 mmol/L CaCl₂, and 80.92% in 50 mmol/L glucose. Further increase in the salt or glucose concentration

基金项目 国务院三峡办重点项目 (No. SX97-25/HB), 国家自然科学基金重大项目专题 (No. 30490231), 湖北省科技攻关项目 (No. 2006AA203A02);

*通讯作者, E-mail: weiqw@yfi.ac.cn;

第一作者介绍 甘芳, 女, 硕士研究生; 研究方向: 濒危鱼类生理生态学; E-mail: ganfang@yfi.ac.cn。

收稿日期: 2008-06-27, **修回日期:** 2008-11-18

caused gradual decrease in fertilization rate. The results indicate that, as insemination-activation medium of Chinese Sturgeon milt, the most suitable concentration for NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ and glucose solution were 25 mmol/L, 0.1 mmol/L, 1 mmol/L, 1 mmol/L, and 50 mmol/L, respectively.

Key words: Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*); Sperm motility; Fertilization rate

中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 为鲟形目鲟科鲟属鱼, 是典型的江海洄游性鱼类, 主要分布于我国东海、黄渤海大陆架水域及汇入其中的大型河流中^[1]。在长江中, 性成熟后的中华鲟要上溯三千多公里到达金沙江下游及长江上游产卵。葛洲坝水利工程修建后阻隔了中华鲟产卵洄游的通道, 中华鲟在葛洲坝下游形成了新的产卵场^[2]。由于大坝阻隔及过度捕捞和环境退化等因素, 中华鲟自然繁殖群体资源大幅下降^[2]。1988 年国家颁布《野生动物保护法》, 将中华鲟列为国家一级重点保护野生动物, 经国家渔政行政主管部门审批每年有少量的科研捕捞指标。葛洲坝下游中华鲟人工繁殖自 1983 年首次获得成功^[3], 以后每年即采取人工放流的方法对中华鲟种群进行增殖, 放流工作主要由葛洲坝集团中华鲟研究所和长江水产研究所实施, 至 2006 年长江水产研究所共向长江中投放各种规格中华鲟苗约 191 万尾。伴随着中华鲟目前的生存压力逐渐增加, 中华鲟自然繁殖种群的性腺发育质量有明显下降的趋势^[4], 雌雄性比失调及种群结构的变化和产卵场环境的改变对中华鲟自然繁殖将有重要的影响^[5], 因此人工增殖放流显得很重要。受精率大小是影响中华鲟人工繁殖效果的重要因素。研究表明, 阳离子、渗透压、温度、pH、单糖等都可能对精子活力和受精率产生影响^[6-8], 合适的人工激活液作为授精介质能够极大地提高精子的受精率。作者曾对阳离子和单糖对中华鲟精子活力的影响进行了初步实验^[9], 本实验在原有基础上, 对阳离子和单糖对受精效果的影响进行单因子系统实验和分析。旨在找出中华鲟人工授精激活液中各组分的最佳配制浓度, 提高中华鲟人工繁殖效果, 为同类研究提供借鉴以及参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 中华鲟亲本是由国家渔政主管部门审批后, 由渔政部门组织本地专业渔民于 2006 年 10、11 月份从宜昌葛洲坝下游捕获。雌鲟由中华鲟专用运输车运到荆州中华鲟增殖放流基地, 并进行人工催产获得卵子。雄鲟在宜昌葛洲坝集团中华鲟研究所进行人工催产并获得精液, 低温保存运输至荆州中华鲟增殖放流基地, 放入 2 °C 冰箱充氧保存, 每 4 h 换气一次。实验所用卵子、精液分别采自同一亲本, 选择已成熟的卵子和活力强的精液进行授精实验。

1.2 实验方法 选择性腺发育良好、人工催产顺利的同尾雌鱼的卵, 每个浓度实验设 3 个平行组, 每个平行组取 100 颗卵放入培养皿内。用注射器滴入 2 μl 的精子, 混匀后添加适量的不同化学激活液授精, 5 min 后再加入同种溶液清洗 2 次。清洗后放入装有循环水装置的白桶内孵化, 每隔 4 h 观察一次, 挑出坏(死)卵, 胚胎发育至原肠中期时计算受精率(图 1)。同时各实验共同设置一个对照组, 采用蒸馏水作为激活液授精, 然后在循环水装置内孵化。人工控制及观察方法与实验组相同。配制精卵激活-授精介质所用药品均为分析纯, 用蒸馏水稀释。NaCl 配制 10、25、50、75 和 100 mmol/L 5 个浓度梯度; KCl 配制 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 和 1.0 mmol/L 6 个浓度梯度; MgCl₂ 配制 1、3、5、10、15 和 20 mmol/L 6 个浓度梯度; CaCl₂ 配制 1、3、5、10、15 和 20 mmol/L 6 个浓度梯度; 葡萄糖配制 25、50、100、125 和 150 mmol/L 5 个浓度梯度。以空白蒸馏水作为对照组。

1.3 数据分析 采用 SPSS 13.0 单因素方差分析 Duncan 多重检验比较各浓度组及对照组之间的差异。



图1 中华鲟的中期原肠胚
Fig. 1 Chinese Sturgeon embryo at mid gastrula stage

2 结果与分析

2.1 不同阳离子溶液对中华鲟精子受精率的影响 实验结果显示,适量的阳离子溶液作为激活授精介质时的受精率比蒸馏水直接作为授精介质都有一定程度增加,有利于中华鲟卵受精率的提高(图2)。实验范围内 NaCl 溶液在低于 25 mmol/L 时,随浓度的增加受精率有所增加,NaCl 溶液浓度在 25 mmol/L 时,中华鲟精子受精率达到最高,为 87.72%。而高于 25 mmol/L 时随浓度增加受精率呈不明显的下降趋势 ($P > 0.05$),至 NaCl 溶液为 100 mmol/L 时,受精率显著降低 ($P < 0.05$)。结果表明,NaCl 溶液作为中华鲟精子授精介质,其最佳浓度在 25 mmol/L 附近,这一浓度虽与对照组无显著差异,但明显比对照组中华鲟精子受精率高,说明

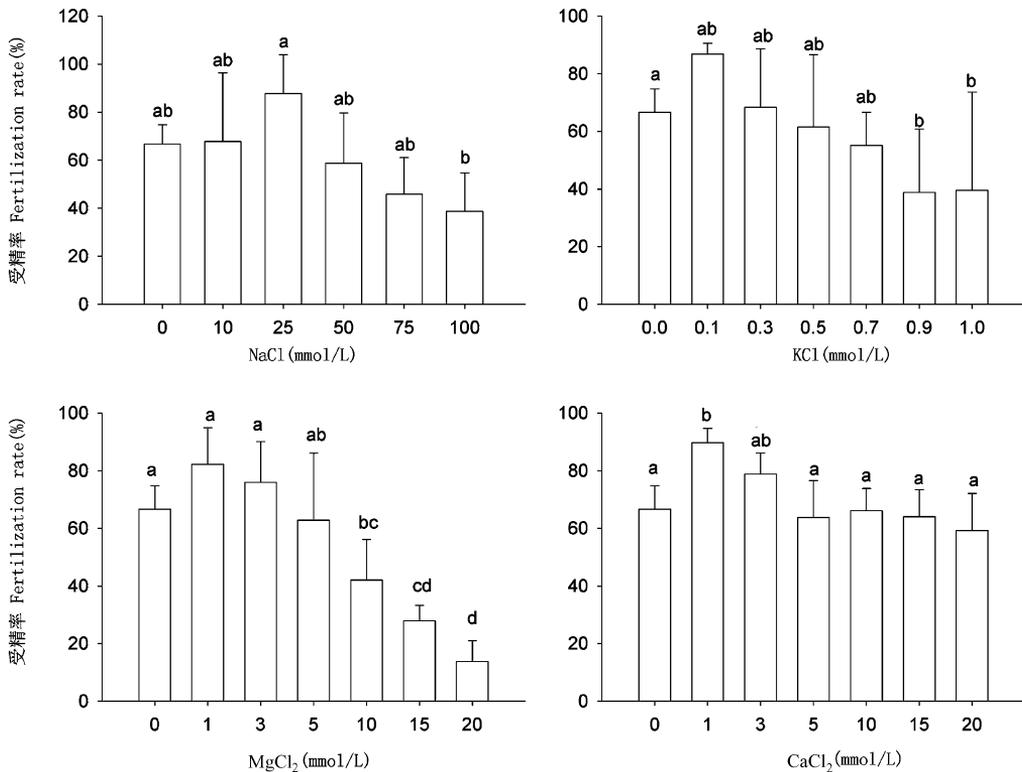


图2 不同浓度的 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 溶液对中华鲟精子受精率的影响 (Mean \pm SD)

Fig. 2 The effect of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , or Ca^{2+} solution as insemination-activation medium on the fertilization rate of Chinese Sturgeon milt

不含有相同字母的各浓度组的受精率有显著差异 ($P < 0.05$, Duncan 多重比较)。

Columns without same small letters were significantly different from each other by Duncan's in Spss ($P < 0.05$).

在精子授精液中适当加入 NaCl 溶液有利于提高受精率,然而高于或低于一定浓度都会降低受精率,高浓度甚至明显抑制精子的激活。

与 NaCl 溶液相同,KCl 溶液浓度低于 0.3 mmol/L 时受精率随浓度的提高呈不明显增高 ($P > 0.05$),在 KCl 溶液浓度为 0.1 mmol/L 时,中华鲟精子受精率最大,为 86.82%。随着 KCl 溶液浓度的升高,中华鲟精子受精率逐渐下降,至 KCl 溶液浓度达 0.9 mmol/L 时,受精率显著低于对照组,说明在人工激活授精液中配制低浓度的 KCl 溶液可激发中华鲟精子活力,提高受精率。高浓度的 KCl 溶液影响中华鲟精子活力,从而导致受精率下降。

MgCl₂ 溶液与 CaCl₂ 溶液浓度对中华鲟精子受精率作用较相似。当 MgCl₂、CaCl₂ 溶液浓度为 1 mmol/L 时,中华鲟精子受精率最高,为 82.24%和 89.76%。但随着 MgCl₂、CaCl₂ 溶液浓度升高,中华鲟精子受精率呈下降趋势。MgCl₂ 溶液浓度为 1 mmol/L 时中华鲟精子受精率与对照组之间虽无显著差异,但明显高于对照组,在达到 10 mmol/L 高浓度以后的 MgCl₂ 溶液对精子的激活作用受到明显抑制 ($P < 0.05$)。而 CaCl₂ 溶液为 1 mmol/L 时中华鲟精子受精率与对照组之间存在显著差异 ($P < 0.05$),高于 3 mmol/L CaCl₂ 溶液作为授精激活介质时中华鲟卵的受精率呈不显著下降的趋势。实验结果说明,在中华鲟授精液中加入低浓度的 MgCl₂、CaCl₂ 溶液有利于激活中华鲟精子活力,提高精子受精率,高浓度 MgCl₂、CaCl₂ 溶液不利于精子受精,对精子受精率有一定抑制作用,比对照组(蒸馏水)的受精率还要低。

2.2 葡萄糖溶液对中华鲟精子受精率的影响

以葡萄糖作为授精介质时中华鲟卵的受精率随着葡萄糖溶液浓度的增加呈先上升后下降趋势(图 3),在葡萄糖溶液为 50 mmol/L 时,中华鲟精子受精率最大,为 80.92%。100 mmol/L 以上的葡萄糖溶液使中华鲟受精率随浓度增加呈不明显下降趋势 ($P > 0.05$),至 125 mmol/L 时相对于对照组有显著下降 ($P < 0.05$)。结果表

明,中华鲟精子授精激活液中加入低浓度的葡萄糖溶液,有利于提高精子受精率,高浓度的葡萄糖溶液对中华鲟精子受精的激发作用均受到不同程度的抑制。

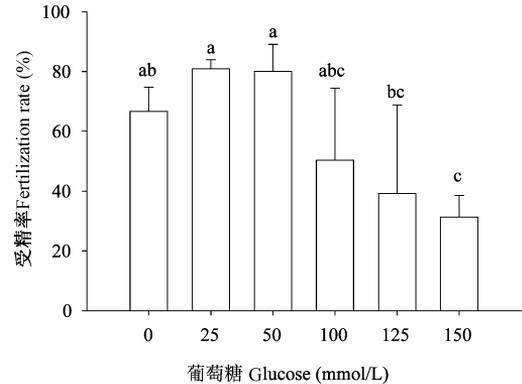


图 3 不同浓度的葡萄糖溶液作授精介质对中华鲟精子受精率的影响(Mean ±SD)

Fig. 3 The effect of glucose solution as the insemination-activation medium on the fertilization rate of Chinese Sturgeon milt
不含有相同字母的各浓度组的受精率有显著差异 ($P < 0.05$, Duncan 多重比较)。

Columns without same small letters were significantly different from each other by Duncan's in Spss ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 NaCl、KCl 溶液对中华鲟精子受精率的影响

精子活力与受精率有着密切的联系,为了得到高的受精率,精子必须具有较强的活力^[6]。鱼类精子在精巢和精浆中是不活动的,进入低渗透压水环境中则被激活,其重要的抑制因素就是渗透压。构成鱼类渗透压的主要离子是鱼类血浆、精浆中的 Na⁺、K⁺ 等组分。Alavi 和 Cosson 的研究表明,鲟鱼精子对 Na⁺ 和其他离子的生物敏感性主要由精浆的成分和 Na⁺ 含量决定^[10]。本实验表明,适宜浓度的 Na⁺ 可以增强中华鲟精子活力,从而提高精子受精率,且精子活力激发的最适宜 Na⁺ 浓度为 25 mmol/L,明显高于精浆中的 Na⁺ 浓度(10~20 mmol/L)。

K⁺ 离子对鲟鱼精子的影响却与 Na⁺ 离子的作用有很大差别。K⁺ 主要起抑制鲟鱼精子活力的作用^[11]。本实验表明,随着 K⁺ 浓度的

逐渐升高,中华鲟精子的活力降低,从而受精率也依次递减,这与其他人的研究得出的结论一致^{[10]*}。根据郑跃平的试验检测,中华鲟精浆中的 K^+ 浓度为 (7.18 ± 0.47) 和 (4.46 ± 0.02) mmol/L^{**},远高于实验中精子活力受到抑制时的浓度,所以, K^+ 是抑制中华鲟精子在精浆中活动的主要因子。在预实验中也发现, KCl 溶液浓度低于 0.1 mmol/L 时,其受精率变化幅度很小, Na^+ 、 K^+ 离子在精浆中形成高于外界水体的渗透压,当精液排入水体,其浓度稀释即对精子有激活作用,提高精子受精率。在体外环境下,精子活力是随 K^+ 浓度升高而下降,体外环境中 K^+ 浓度较高时就会导致其精子受精率的降低。

3.2 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 溶液对中华鲟精子受精率的影响 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 作为鱼类精浆主要离子,其含量较 Na^+ 、 K^+ 低得多,鲟鱼精浆中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量通常都低于 1 mmol/L,但是在精子活力的调节中具有重要作用。 Ca^{2+} 是调节鱼类精子活力的重要因子,外界环境的 Ca^{2+} 通过 Ca^{2+} 通道进入精子细胞,使精子细胞内的 Ca^{2+} 增加,这是精子激活所必需的^[10]。 Ca^{2+} 还可解除 K^+ 对鲟鱼精子的抑制作用,0.1 mmol/L Ca^{2+} 即可部分解除 1 mmol/L K^+ 对中华鲟精子的抑制, Ca^{2+} 0.25 mmol/L 时即可完全解除 K^+ 的抑制作用^[11]。刘鉴毅的研究表明, Ca^{2+} 浓度高于 20 mmol/L 可明显抑制中华鲟精子的活力,在 40 mmol/L 时精子活力完全被抑制^[9]。本实验也表明, Ca^{2+} 浓度范围从 1~20 mmol/L,中华鲟精子受精率依次降低。因此,虽然 Ca^{2+} 是精子激活所必需的,但浓度并不是越高越好,在中华鲟中以 1 mmol/L 为适宜。另外,中华鲟在 Ca^{2+} 浓度为 5 mmol/L 时受精率出现巨降,较 15 mmol/L 的受精率还低,可能是由于实验过程中的误差造成。受精率大小是评价人工繁殖效果的重要指标,但实际操作可能带入误差。因此,在实际鱼类人工繁殖过程中需要参照精子活力合理配制激活授精液。

有关 Mg^{2+} 对鲟鱼精子活力影响的报道很少。Alavi 等研究显示, Mg^{2+} 对中华鲟精子受精

率的影响效果与 Ca^{2+} 的效果相似^[12]。本实验印证了这一观点,与 Ca^{2+} 作用相似,中华鲟精子受精率在 Mg^{2+} 浓度 1 mmol/L 为宜,随着 Mg^{2+} 浓度升高,中华鲟精子受精率下降,精子活力应是逐渐受到了抑制。

3.3 葡萄糖溶液对中华鲟精子受精率的影响

葡萄糖是精浆中主要碳水化合物的重要组分,它的作用主要是参与精子代谢,维持精子活力^[8]。白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 的精子在葡萄糖溶液中的活动规律与在 NaCl、KCl 溶液中基本一致,但在葡萄糖中的活力较二者高^[7]。而本实验表明,中华鲟精子在葡萄糖溶液中活力与 KCl 溶液不同,与 NaCl 溶液类似,精子受精率先升高后呈下降趋势,且在浓度 50 mmol/L 时受精率最高。可见,葡萄糖作为细胞能源物质对精子激活有一个最适浓度,在这个浓度下可达到中华鲟精子的最高受精率。

致谢 本实验过程中得到长江大学刘劲松同学的协助;论文撰写中得到胡佳、石莹等人的帮助,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 四川省长江水产资源调查组. 长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究. 成都:四川省科学技术出版社,1988,284.
- [2] Wei Q, Ke F, Zhang J, et al. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48:241~255.
- [3] 傅朝军,刘宪亭,鲁大椿等. 葛洲坝下中华鲟人工繁殖. 淡水渔业,1985,(1):1~5.
- [4] 刘鉴毅,危起伟,陈细华等. 葛洲坝下中华鲟繁殖生物学特性及其人工繁殖效果. 应用生态学报,2007,18(6):1397~1402.
- [5] 危起伟,陈细华,杨德国等. 葛洲坝截流 24 年来中华鲟产卵群体结构的变化. 中国水产科学,2005,12(4):452~457.
- [6] 阮国良,冯家斌,杨代勤. 渗透压、pH 和温度对泥鳅精子活力及受精率的影响. 湖北农学院学报,2004,24(1):22

* 谷魏. Na^+ 、 K^+ 、葡萄糖和果糖对高白鲑精子活力影响的研究. 乌鲁木齐:新疆农业大学硕士学位论文,2005,30~32.

** 郑跃平. 中华鲟精子生理生态特性研究. 武汉:华中农业大学硕士学位论文,2007,26~28.

- ~ 25.
- [7] 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. 动物学杂志, 2004, **39**(1) :16 ~ 20.
- [8] 严安生,宋贵文,闫拥军. 鲤、团头鲂精子生理特性的研究. 单糖和渗透压对精子活力的影响. 淡水渔业, 1995, **25**(2) :3 ~ 5.
- [9] 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. 水生生物学报, 2007, **31**(6) : 95 ~ 100.
- [10] Alavi S M H, Cosson J, Karami M, *et al.* Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus* their physiological relationship with sperm motility. *Aquaculture Research*, 2004, **35**(13) :1 238 ~ 1 243.
- [11] Alavi S M H, Cosson J. Sperm motility in fishes () effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 2006, **30**(1) :1 ~ 14.
- [12] 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. *Reproduction*, 2004, **128**(6) : 819 ~ 828.