

环境因子对圆斑星鲈精子活力的影响

徐永江¹ 王妍妍¹ 陈学周² 柳学周^{1*}

⁽¹⁾ 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与
生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

⁽²⁾ 全国水产技术推广总站, 北京 100125)

摘要 研究了温度、盐度和 pH 对圆斑星鲈精子活力的影响。结果表明, 圆斑星鲈精子活力最适宜温度范围为 8~12℃, 最适宜盐度范围为 25~35, 最适宜 pH 范围为 7~8。由实验结果可知, 20℃ 以上高温和盐度 15 以下的低盐度海水对圆斑星鲈精子活力有抑制作用, 在适宜环境条件下精子快速活动时间最长为 7~8min, 精子寿命最长为 12~17min。生产操作中, 圆斑星鲈人工受精应在适宜的环境条件下、精子活力高的时间内进行, 以获取高质量的受精卵。

关键词 圆斑星鲈 精子活力 温度 盐度 pH

中图分类号 S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)04-0021-06

Influence of environmental factors on sperm activity of *Verasper variegatus*

XU Yong-jiang¹ WANG Yan-yan¹ CHEN Xue-zhou²
LIU Xue-zhou^{1*}

⁽¹⁾ Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology,
Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

⁽²⁾ National Fisheries Technology Extension Station, Beijing 100125)

ABSTRACT The effects of temperature, salinity and pH on the sperm activity of *Verasper variegatus* were investigated. The results showed that the optimized water temperature for sperm activity ranged from 8 °C to 12°C, salinity ranged from 25 to 35, and the most suitable pH range for sperm activity was 7~8. The present results revealed that the activity of sperm was inhibited by high temperature(above 20°C) and low-salinity (<15). Under appropriate environmental conditions the longest eddy time for the spermatozoa was 7~8min and the longest life span was 12~17min. Artificial fertilization should be done under most optimized environmental conditions in order to obtain high quality fertilized eggs. These findings would serve

国家鲆鲽类产业技术体系建设项目(CARS-50)和国家 863 计划项目(2012AA10A413)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuzz@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830506

收稿日期: 2012-07-14; 接受日期: 2012-12-24

作者简介: 徐永江(1981-), 男, 博士, 主要从事鱼类繁殖生理和内分泌研究。E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

as a reference for the artificial fertilization of *V. variegatus*.

KEY WORDS *Verasper variegatus* Sperm activity Temperature
Salinity pH

圆斑星鲈 *Verasper variegatus* T. & S. 属鲈形目 Pleuronectiformes、鲈科 Pleuronectidae、星鲈属 *Verasper*，主要分布于我国的黄渤海及日本九州、朝鲜海域，为冷温性大型底栖鲈类和传统名贵鱼类，多生活在近岸水域或海湾内，不做远距离洄游，是资源增殖的优良品种。近几年，随着自然资源的衰竭和捕捞量的降低，圆斑星鲈的市场价格不停上升，逐渐成为中、日、韩三国的增殖对象。目前，已开展的与圆斑星鲈人工繁育相关的研究主要包括亲鱼培育促熟(Yamaguchi *et al.* 2001)、血浆性类固醇激素表达(徐永江等 2011)、精子超微结构及冷冻保存技术(张永忠等 2004; Liu *et al.* 2006)等。在人工养殖条件下，圆斑星鲈的雌性亲鱼尚不能自然产卵，受精卵尚依赖于人工采集卵子和精液进行授精而获得。在人工受精操作过程中，常常因不注意一些环境因素如温度、盐度、pH 等而造成精子的活力受到抑制，造成优质卵子的受精率低，影响了批量优质受精卵的获取和苗种生产的顺利进行。硬骨鱼类的精子活力不仅是评价精液质量的重要指标，也是精液低温保存、人工授精技术等相关研究的基础。已有研究表明，硬骨鱼类精子活动的抑制与激活和盐度、pH、温度、渗透压、离子、激素及季节变化等因素有关，这是鱼类精子生理特性与环境相适应的结果(Morisawam *et al.* 1990; Billard *et al.* 1993)，研究其环境适应能力对人工繁育技术的发展具有重要的现实意义。因此，研究圆斑星鲈精子活力与环境因子的关系对圆斑星鲈精子的短暂保存和人工受精技术有重要的指导意义。目前，尚未见环境因子对圆斑星鲈精子活力影响的报道。本研究探讨了温度、盐度、pH 等环境因子对圆斑星鲈精子活力的影响，旨在为其繁殖生物学及规模化人工繁育研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

本研究于 2011 年 3 月在山东青岛忠海水产有限公司开展。实验用雄性圆斑星鲈亲鱼由青岛忠海水产有限公司提供。亲鱼为 3 龄野生亲鱼，繁殖期(1~4 月)投喂活沙蚕和冰鲜杂鱼，在繁殖季节中期，选取健康且有乳白色精液的雄性亲鱼 10 尾(体重 850~1 400 g，体长 34~48 cm)用于试验研究。

1.2 精液采集方法

采集精液时，将浸过海水的厚毛巾铺在干净的白色泡沫板上，将实验鱼置于毛巾上，并用毛巾将鱼头部遮盖。用干毛巾擦干鱼体生殖孔周围的水分，然后轻压腹部生殖腺部位，挤出精液，用干净且干燥的吸管吸取精液置于冰浴的 1.5 ml 离心管中，立即取样进行活力观察。采精过程中应防止海水溅入精液，并避免粪、尿的污染。

每尾鱼取精液量约为 0.5 ml，经镜检后筛选精子活力 90% 以上，快速活动时间 5min 以上的精液用于实验。共使用 7 尾实验鱼的精液，所有样品混合后用于实验。

1.3 精子活力观察方法

精子活力观察参考区又君等(1991)的方法，在洁净的载玻片上加一滴海水，再用一次性注射针头挑取少许精液于海水中，迅速搅匀激活精子，在显微镜下观察精子的涡动时间、慢速运动时间和颤动时间，三者之和即为精子的总活动时间(即精子寿命)。涡动时间是指精子被激活后快速运动，不能明显看清其运动轨迹的运动时间；慢速运动时间是从快速运动结束到颤动开始的时间，精子运动较慢，能看出精子的运动轨迹；颤动时间是精子原地颤动至 95% 完全不动(即精子死亡)的时间。精子的活动率指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。温度梯度的做法是将滴加不同温度海水和精液的载玻片放在对应温度的恒温箱中，每隔 30~60 s 取出置于显微镜下观察，观察完毕后迅速放回原处。至少重复 3 次实验，并取平均值。

1.4 实验设计

实验共设计3个组别,分别为温度组、盐度组和pH组,各实验组的梯度设置如下。

1.4.1 温度梯度设置

实验设置6个温度梯度,分别为8、12、16、20、24、28℃,将小烧杯中的过滤海水置于不同温度的恒温箱中恒温获得;实验用海水为经砂滤的自然海水,盐度为30,pH为8.1。每个梯度设置两个重复。

1.4.2 盐度梯度设置

实验设置6个盐度梯度,分别为15、20、25、30、35、40,高盐度海水以砂滤海水添加人工海水配制而成;低盐度海水以砂滤海水加淡水(充分曝气除氯)配制。海水比重计标定盐度(± 1)。在温度为12℃的环境下,用所配制的不同盐度海水激活精子,在显微镜下观察精子的活力。每个梯度设置两个重复。

1.4.3 pH梯度设置

实验设置7个pH梯度,分别为6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5,pH以0.1 mol/L的NaOH和HCl溶液调节过滤海水的pH获得,pH计测定。实验用海水为经砂滤的自然海水,盐度为30,环境温度为12℃。每个梯度设置两个重复。

1.4.4 数据处理与分析

精子涡动时间、精子寿命和精子活动率均为平均值,数据表达为Mean \pm S. D.,数据处理和图表制作在Microsoft Excel 2007中进行。利用单因素方差分析(ANOVA)统计分析不同温度、盐度和pH条件下精子涡动时间、精子活动率和精子寿命的差异显著性,当 $P < 0.05$ 视为差异显著,反之不显著。统计分析使用SPSS(16.0版本)软件进行。

2 结果

2.1 圆斑星鲈精子特性

本研究使用的圆斑星鲈雄鱼每尾鱼可采集精液1~2ml,精子密度为 $(7.45 \pm 1.23) \times 10^9$ 个/cm³($n=9$)。室温下精子运动率为 $92.0\% \pm 2.45\%$ ($n=7$),经人工海水激活后可以存活11~13 min($n=16$)。圆斑星鲈精子全长为 $41.47 \pm 3.5 \mu\text{m}$ ($n=9$),主要包括头部、中段和鞭毛3部分。头部圆形,长 $1.542 \pm 0.029 \mu\text{m}$ ($n=12$)、宽 $1.43 \pm 0.038 \mu\text{m}$ ($n=12$)。

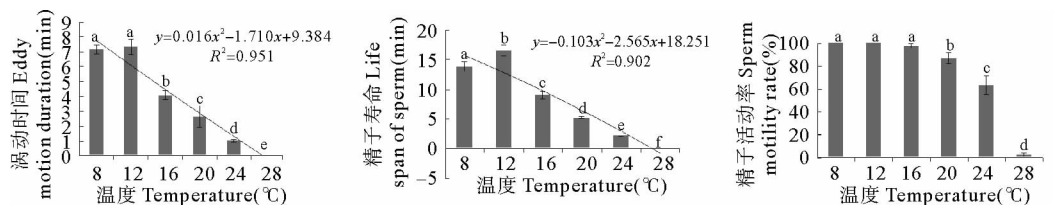
2.2 温度对精子活力的影响

由图1可见,在盐度为30时,圆斑星鲈精子在温度为8~12℃时,精子活动率接近100%($P < 0.05$),随着温度的升高精子活动率逐渐下降,至28℃时精子活动率下降为10%以下($P < 0.05$),且仅为缓慢蠕动;精子涡动时间和精子寿命均在8~12℃范围内保持较高的水平,水温为12℃时,精子活力和精子寿命最高,涡动时间为 $7.27 \pm 0.53 \text{min}$ ($P < 0.05$),精子寿命为 $16.4 \pm 0.9 \text{min}$ ($P < 0.05$)。当温度大于12℃时,精子活力明显下降,至24℃以上时,精子涡动时间下降为1.5min以下($P < 0.05$),至28℃时,未见精子快速活动;28℃时,精子仅存活数秒就停止运动。圆斑星鲈精子涡动时间(y)和寿命与温度(x)之间均呈二次曲线函数关系: $y = 0.016x^2 - 1.710x + 9.384$ ($R^2 = 0.951$)和 $y = -0.103x^2 - 2.565x + 18.251$ ($R^2 = 0.902$),表明快速运动时间与温度具有显著的相关性,推得圆斑星鲈精子活动的适宜温度为8~12℃(图1)。

2.3 盐度对精子活力的影响

由图2可知,当环境温度为12℃时,盐度15时,圆斑星鲈精子不能被激活,盐度20~25范围内,精子活力随盐度升高而升高,在盐度25~35范围内精子活动率较高达到80%以上($P < 0.05$)。在盐度为40时仍有较强活力,表明圆斑星鲈精子的活力在较高盐度时比在低盐度海水中强。精子快速活动时间在盐度25~40之间差异不大($P > 0.05$),都可达6min以上,在盐度25条件下最高为 $7.7 \pm 0.53 \text{min}$ ($P < 0.05$)。精子寿命在25~

40 盐度范围内亦无较大差异($P>0.05$),在盐度 30 时寿命最长,为 $12.9\pm 2.18\text{min}$ ($P<0.05$)。圆斑星鲽精子涡动时间和寿命与盐度的关系均为二次函数关系,分别为 $y=-0.616x^2+5.489x-5.071$ ($R^2=0.865$) 和 $y=-1.222x^2+10.07x-7.948$ ($R^2=0.941$),表明盐度与精子活力显著相关,可推知精子活力最适盐度范围为 25~35。



不同字母表示差异显著。下同

Different letters indicate significant difference. Same in the following figures

图 1 温度对圆斑星鲽精子涡动时间、精子寿命和精子活动率的影响

Fig. 1 Effect of water temperature on eddy motion duration, life span and motility rate of *V. variegatus* sperm

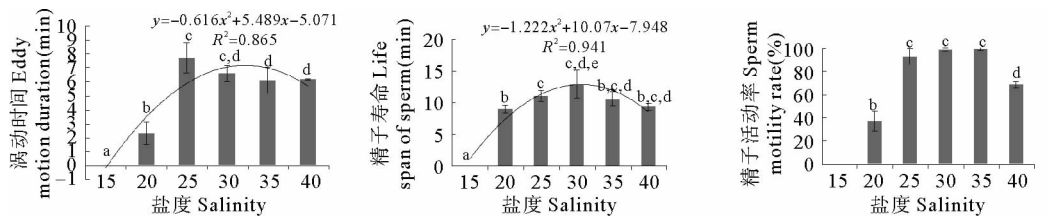


图 2 盐度对圆斑星鲽精子涡动时间、精子寿命和精子活动率的影响

Fig. 2 Effect of salinity on eddy motion duration, life span and motility rate of *V. variegatus* sperm

2.4 pH 对精子活力的影响

pH 对圆斑星鲽精子的活力有较为明显的影响(图 3)。在盐度 30、温度 12°C 条件下,pH 7~8 范围内,精子活动率接近 100%,精子涡动时间都可达 8min 以上,最高为 $8.7\pm 0.35\text{min}$ ($P<0.05$)(pH 7.5);精子寿命可达 12min 以上,最高为 $17.2\pm 1.0\text{min}$ ($P<0.05$)(pH 7.5)。在本研究试验条件下,当 pH 小于 7.5 时,精子涡动时间和精子寿命均随着 pH 升高而升高,而当 pH 大于 7.5 时,精子涡动时间和精子寿命均随着 pH 升高而下降,圆斑星鲽精子涡动时间和寿命与 pH 均呈二次函数关系,分别为 $y=-0.352x^2+2.232x+4.471$ ($R^2=0.742$) 和 $y=-0.738x^2+4.798x+5.770$ ($R^2=0.667$)。综上,可推知圆斑星鲽精子活力的适宜 pH 范围为 7~8。

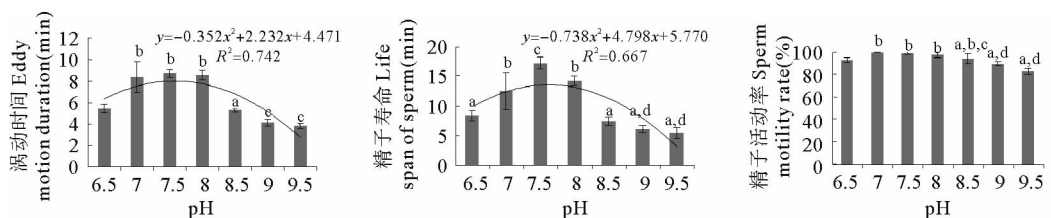


图 3 pH 对圆斑星鲽精子涡动时间、精子寿命和精子活动率的影响

Fig. 3 Effect of pH on eddy motion duration, life span and motility rate of *V. variegatus* sperm

3 讨论

精子活力(活动率、活动时间和寿命等)是精子质量评价的重要指标。通常,活力高的精子受精能力也强,获得受精卵的几率就会高(Ohta *et al.* 1998)。环境因子变化是影响精子活力的重要方面,最适宜的环境条件是精子保持最高活力、提高受精率和保证胚胎质量的重要保障。精子活力的评价,尚无统一标准,一般通过检查精子激活比例、精子运动时间和精子运动激烈程度等指标来确定。目前,多数人工受精技术都是在生产一线开展,尽管现代计算机辅助精液分析(CASA; computer-assisted semen analysis)系统已建立(Toth *et al.* 1995),但由于造价和操作复杂等原因,在普通实验室和生产第一线还很难推广应用。因此,最为直接的方法仍然是在简易实验结果的基础上,尽量减少人为因素和环境因素等造成的不当操作。

温度对精子活力的影响较为复杂。有学者认为,温度与精子快速运动时间的关系是一个开口向下的二次曲线函数关系,随着温度趋向于适宜温度,精子快速活动时间延长,达到临界温度后,再随着温度的升高而降低,目前在一些硬骨鱼类中观察到类似的现象(潘德博等 1999;谢刚等 1999)。这种温度与快速运动时间的关系,可能与精子内部 ATP 水解有关,如高温条件下 ATP 水解速度加快,精子运动加速,代谢水平升高,消耗 ATP 加快,相对快速活动时间减少,而低温条件下精子消耗的 ATP 减少,抑制精子的代谢,减少其能量消耗,因此精子的运动时间延长(Billard *et al.* 1992)。本研究结果表明,圆斑星鲈精子的活力在 8~12℃最高,其后随温度升高又下降,同时精子快速活动时间、精子活动率和精子寿命都降低,这与上述的理论基本一致。同时,精子活力的最适温度是 8~12℃,与亲鱼产卵期的水温(10~12℃)符合。

以往研究表明,鱼类精子激活所需的最低盐度与其所需的最低栖息盐度相关,二者呈现相似的变化规律。而精子活动所需的最适盐度则与该种类的繁殖期环境盐度密切相关(江世贵等 2000)。以往资源调查资料显示(邓景耀等 1988),圆斑星鲈繁殖场的盐度范围为 23~31,而本研究得出圆斑星鲈精子活力的最适宜盐度范围为 25~35,这与其繁殖栖息地的环境条件相一致。

研究表明,大多数鱼类精浆 pH 偏碱性,精子在中性或偏碱性的溶液中活力及受精率均较高。酸性溶液会降低或抑制精子活力和受精率(邓岳松等 1999)。如斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* (赵会宏等 2003)的精子在 pH 8~9 时达到最高,而虹鳟鱼 *Oncorhynchus mykiss* (Billard 1986)的精子活力和受精率在 pH 9 时达到最高。大西洋庸鲈 *Hippoglossus hippoglossus* (Billard *et al.* 1995)和海鲈 *Dicentrarchus labrax* (Stoss 1983)的精子分别在 pH 7.5~8.5 和 pH 9 时表现出最高的活力。对雀杜父鱼 *Alcichthys alcicornis* (Koya *et al.* 1993)精子活力的研究表明,在 pH 7.5 时,精子活力最高,本研究结果表明,圆斑星鲈精子活力的适宜 pH 范围为 7~8,今后人工授精操作中应采用适宜 pH 的受精介质提高受精率。

参 考 文 献

- 区又君,李加儿. 1991. 黑鲷 *Sparus macrocephalus* (Basilewsky) 精子在不同环境中的活力. 中国水产科学研究院学报, 4(1): 18-27
- 邓景耀,孟田湘,任胜民,邱宜寅,朱建元. 1988. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 9:11-46
- 邓岳松,林浩然. 1999. 鱼类精子活力研究进展. 生命科学研究, 3(4):271-278
- 江世贵,李加儿,区又君,郑运通. 2000. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系. 生态学报, 20(3):468-473
- 张永忠,徐永江,柳学周. 2004. 圆斑星鲈精子的超微结构及核前区特殊结构. 动物学报, 50(4): 630-637
- 赵会宏,刘晓春,林浩然,刘付永忠,王云新. 2003. 斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、温度、pH 对精子活力及寿命的影响. 中国水产科学, 10(4): 286-293
- 徐永江,柳学周,王清印,赵明,王妍妍,曲建忠. 2011. 养殖圆斑星鲈血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系. 中国水产科学, 18(4):836-846
- 谢刚,叶星,苏植蓬,余德光,潘德博. 1999. 鳊鲈精子的主要生物学特性. 上海水产大学学报, 8(1):81-84
- 堀田又治,有瀧真人,太田健吾,田川正朋,田中克. 2001. ホシガレイの仔稚魚期における消化系の発達と変態関連ホルモンの動態. 日本誌, 67(1): 40-48
- Billard R, Cosson J, Crim LW. 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. Aquat Living Resour 6:67-75
- Billard R, Cosson MP. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J Exp Biol 261:122-131

- Billard R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Develop* 26: 877-920
- Billard R, Cosson J, Perchec G, Linhartc O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129: 95-112
- Koya Y, Munehara H, Takano K. 1993. Effects of extracellular environments on the motility of spermatozoa in several marine sculpins with inter-nal gametic association. *Comp Biochem Physiol* 106A: 25-29
- Liu XZ, Zhang SC, Zhang YZ, Xu YJ. 2006. Cryopreservation of the spotted halibut (*Verasper variegates*) sperm. *IJMS* 35(1): 24-28
- Morisawam, Morisawa S. 1990. Acquisition and initiation of sperm motility. Control of sperm motility: Biological and clinical aspects. Boca Ra-
ton: CRC Press 137-151
- Ohta H, Shinriki Y. 1998. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in river sculp in *Cottus hangiongensis*. *Fish
Physiol Biochem* 18: 29-35
- Stoss J. 1983. Fish Gamete preservation and spermatozoon physiology. *Fish Physiology*. Vol. IX B, New York: Academic Press 305-350
- Toth GP, Christ SA, McCarthy HW. 1995. Computer-assisted motion analysis of semen from the common carp. *J Fish Biol* 47: 986-1003
- Yamaguchi Sonoko, *et al.* 2001. Reproductive biology of spotted halibut, *Verasper variegutus*, in Tachibana Bay, Nagasaki Prefecture. *Science
Bulletin of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 55(2): 179-184

《渔业科学进展》编辑部网上投稿启事

为充分利用网络资源,提高编辑办公和期刊出版效率,《渔业科学进展》编辑部已采用期刊网络化办公系统。该系统使投稿、审稿和编辑工作都在同一个网络平台上完成,可大大节省通讯时间,并规范编辑工作流程。同时,网络投稿将以更加友好的界面服务于广大作者,方便作者与编审之间的沟通,为您提供易查、易用、更加方便快捷的服务。

敬请作者访问黄海水产研究所网站(<http://www.ysfri.ac.cn>)的“《渔业科学进展》期刊网上投稿系统”。投稿程序请参看《渔业科学进展》网络化稿件处理系统投稿指南。

如有疑问,请致电 0532-85833580 陈严老师或 0532-85800117 王建坤老师咨询。也可发邮件到《渔业科学进展》编辑部咨询,E-mail: chenyan@ysfri.ac.cn。

《渔业科学进展》编辑部

2013年8月20日