

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17082

延迟排卵对红鳍东方鲀卵子质量的影响

赵艳飞^{1,2}, 马爱军^{2,3}, 王新安^{2,3}, 孙建华^{2,3}, 崔文晓^{2,3}, 侯仕营⁴

1. 广西壮族自治区海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室, 广西 北海 536000;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 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, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071;
4. 乳山市水产技术推广站, 山东 乳山 264500

摘要: 为探究红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)延迟排卵对卵子生理生化变化及卵质的影响, 人为对性成熟亲鱼推迟 1~2 周挤卵, 并将未推迟挤卵组记为 A 组, 推迟 1 周挤卵组记为 B 组, 推迟 2 周挤卵组记为 C 组, 研究推迟排卵后卵子内磷酸酶、苹果酸脱氢酶、唾液酸、总氨基酸以及脂肪酸含量等生化参数变化规律及延迟排卵与受精率的相关性。结果显示, 推迟 1 周排卵后, B 组受精率显著下降($P<0.05$), 受精率由 A 组的 86.66% 降至 57.14%; 推迟 2 周后, C 组受精率降至 31.89%; 卵内酸性磷酸酶活力随产卵期推迟而显著下降($P<0.05$), 并与受精率存在显著正相关($P<0.05$, $R^2=0.705$); A 组苹果酸脱氢酶活力显著高于 B、C 两组($P<0.05$, $R^2=0.630$), 总氨基酸含量亦存在相似变化趋势, A、B 组显著高于 C 组($P<0.05$, $R^2=0.706$); 此外十四烷酸($C_{14:0}$)、十五烷酸($C_{15:0}$)、棕榈酸($C_{16:0}$)、棕榈油酸($C_{16:1n-7}$)、 α -亚麻酸($C_{18:3n-3}$)、二十碳五烯酸(EPA)在总脂中比例均在正常组中最高, 并与受精率存在显著正相关($P<0.05$), 二十二碳五烯酸($C_{22:5n-3}$)、二十二碳六烯酸(DHA): 二十碳五烯酸(EPA)均与受精率呈显著负相关($P<0.05$)。结果表明, 卵子中磷酸酶、苹果酸脱氢酶、总氨基酸、脂肪酸含量与卵子活力存在相关性, 在红鳍东方鲀人工授精时, 在亲鱼卵子成熟后 1 周内进行人工挤卵最为适宜。

关键词: 红鳍东方鲀; 卵子; 过熟; 受精率; 生化成分; 质量评估

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)01-0044-09

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)群体主要分布于北太平洋西部的日本、朝鲜半岛和中国沿海^[1], 因其具有很高的食用和经济价值, 在中国北方沿海地区及日本、韩国形成了一定养殖规模。野生红鳍东方鲀栖息在水深 5~100 m 之间海域, 底质为礁石或泥沙带, 昼沉夜浮。产卵场水深 20 m 左右^[2], 在产卵期有由深海向近海洄游的习性, 并有一定的趋低盐度特性。在全人工繁育红鳍东方鲀时, 因其栖息环境中压力、底质、光线等因素的变化, 往往需要采取激素催产及人工辅助才能顺利排出成熟卵子。故而在红鳍东方鲀人工繁育

中因不能及时人工挤卵, 常出现排卵延后、卵质下降现象, 导致受精率不足 50%, 称为卵子过熟现象。生产经验表明, 红鳍东方鲀卵子排卵延迟后, 其外观形态会发生变化(颜色发黄, 卵径变小, 有残卵), 但并不明显, 需要凭生产经验做主观性判断, 且尚缺乏判断红鳍东方鲀卵子是否过熟的评判标准, 这给红鳍东方鲀繁育标准化带来一定难度。

卵子过熟在多种鱼类繁育中均存在, 玻璃梭鲈(*Sander vitreus*)鱼卵过熟后, 在胚胎孵化中更易出现畸形现象, 孵化率也显著降低^[3]。卵子过熟

收稿日期: 2017-03-06; 修订日期: 2017-05-12.

基金项目: 国家现代农业产业技术资助项目(CARS-47-G01); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022012005); 鳌山人才计划项目(2017ASTCP-OS04).

作者简介: 赵艳飞(1988-), 男, 实习研究员, 硕士, 研究方向为海水经济动物遗传育种. E-mail: yfei.good@163.com. 马爱军, 共同第一作者.

通信作者: 马爱军, 研究员. E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

后常表现为卵膜弹性下降, 卵子变脆, 胚胎畸形率升高的现象^[4]。伴随着卵膜变薄甚至破损, 卵巢液与卵子内部也发生物质流动^[5], 使卵内 pH、氨基酸、蛋白水平及物质代谢受到重大影响^[6]。已有研究表明, 鱼类卵子延迟排出后, 卵内酯化、非酯化脂肪酸含量也显著降低, 卵巢液 pH 下降, 受精、孵化率显著降低^[5]。因磷酸酶定位于卵子内溶酶体和内膜系统^[7], 苹果酸脱氢酶为三羧酸循环关键酶, 二者在代谢调节、能量转化及信号转导上均起着重要作用^[8-9], 随着卵内环境波动, 二者亦不可避免受到影响。为此, 本研究从磷酸酶、苹果酸脱氢酶、脂肪酸组成等生化参数方面将红鳍东方鲀正常与过熟卵子进行对比, 并与其受精率统计数据进行回归分析, 以期对红鳍东方鲀过熟卵子鉴定及其苗种繁育规范化提供参数资料, 同时初步探究红鳍东方鲀延迟排卵对卵子内部生理生化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验亲鱼于 2014 年 1 月底选自山东乳山市水产育苗场, 共选出体格健壮、无外伤、色泽好、活力强、腹部性腺轮廓明显的 3 龄雌鱼 18 尾, 雌鱼大小无明显差异[体重: (2.17 ± 0.34) kg, 体长: (41.00 ± 2.67) cm], 3 龄雄鱼 5 尾, 置于催产池($6.0 \text{ m} \times 6.0 \text{ m} \times 0.9 \text{ m}$), 水温 $18 \sim 20^\circ\text{C}$, 盐度 $30 \sim 31$, 溶氧 7 mg/L 以上。

1.2 实验方法

本研究所用卵子是在人工培育条件下获得的, 具体方案: 红鳍东方鲀为一次性产卵鱼类, 经相同条件的人工培育和生殖调控, 使红鳍东方鲀亲鱼在同一时期发育成熟。采用注射 LRH-A₃250~300 $\mu\text{g/kg}$ +HCG500 IU/kg 对亲鱼统一催产, 24~48 h 后, 检查性腺成熟情况, 并选取一尾精子活力强、精液量大的雄鱼做父本。随机选取 6 尾性腺完全成熟亲鱼立即人工授精, 记为 A 组; 另取 6 尾完全成熟亲鱼于培育池内继续培育 1 周后人工授精, 记为 B 组; 6 尾完全成熟亲鱼于培育池内继续培育两周后人工授精, 记为 C 组。每尾雌鱼所产卵子均单独受精、孵化, 记为一个重复, 每组 6 个重

复。授精前每条雌鱼取未受精卵各 5 mL, 用蒸馏水冲洗干净, 滤纸吸干后于离心管内 -80°C 保存。精子源自同一雄鱼冷冻精液, 精子活力达 80% 以上。受精 10 min 后洗净卵子, 布卵于直径为 80 cm 的 60 目筛绢锥形孵化网, 所有锥形孵化网置于同一 40 m^3 大池中, 底部充气, 调节气流速度使受精卵在水中均匀分散涌起, 孵化温度 $18 \sim 19^\circ\text{C}$ 。

1.3 繁殖性状统计

因鱼类卵子存在假受精现象, 未受精卵亦可自行发育至囊胚中期, 待胚胎发育至原肠前期时, 在显微镜下观察胚胎发育情况, 每组受精率重复统计 3 次, 每次统计 200 粒:

受精率/% = 囊胚后期及原肠期胚胎数/总卵数 $\times 100\%$

1.4 样品制备及分析

1.4.1 匀浆液制备 取 1 g 左右卵子, 按照质量体积比 1 : 9 (g/mL) 加入预冷 0.9% 生理盐水, 冰水浴手工匀浆, 2500 r/min 离心 10 min, 制成 10% 匀浆上清液。

1.4.2 生化成分测定 蛋白定量按照 BCA 法测定(试剂盒购于赛默飞世尔科技有限公司), 通过换算可基于干重的卵子蛋白含量(mg/g); 总氨基酸(AA)定量测定采用铜离子络合比色法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司), 在一定波长下络合物颜色深浅与总氨基酸含量成正比, 通过换算得到 1 g 湿重卵内总氨基酸含量(mmol/g); 唾液酸(SA)定量测定采用 5-甲基苯二酚络合比色法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司), 通过测定络合物吸光度与标准即可计算出 1 g 湿重卵内唾液酸含量(mg/g); 酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活力测定采用铁氰化钾比色法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司), 定义在 37°C 每克组织蛋白与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个酶活力单位; 苹果酸脱氢酶(MDH)活力测定采用底物催化反应体系法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司), 定义 1 mg 组织蛋白在本反应体系中 1 min 内催化 1 μmol 底物转变成产物定义为 1 个酶活力单位。

1.4.3 样品甲酯化 取 0.1 g 冷冻干燥卵子, 加入 1 mol/L KOH-甲醇溶液 3 mL 于 80°C 水浴 20 min,

冷却后加入 2 mol/L HCL-甲醇溶液 3 mL, 80℃水浴 20 min; 冷却后加正己烷 1 mL, 振荡萃取, 静置分层, 取上清液样品于气相-质谱仪(GCMS-QP2010, 岛津, 日本)上机检测。

1.4.4 脂肪酸种类及含量分析 气相条件: 色谱柱: Rxi-1MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm)毛细管柱; 升温程序: 初始温度 150℃, 以 15℃/min 升至 200℃, 再以 2℃/min 升至 250℃; 进样口温度: 250℃; 载气(He)流量: 1 mL/min; 自动进样, 进样体积 1 μL, 分流比: 20:1; 溶剂切除时间: 2.5 min。质谱条件: 电子轰击离子源, 离子源温度 230℃, 接口温度 280℃, 电子能量 70 eV, 质量扫描范围 45~500 m/z。

通过 NIST08.LIB 谱库进行检索, 确定脂肪酸组成(匹配度高于 80%), 根据目标脂肪酸与内标峰面积比得出其在总脂中的相对含量。

1.5 数据处理

用 SPSS 17.0 对所得数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)并进行 Duncan 多重比较、Pearson 相关系数及简单回归方程分析, 以找到卵质生化参数与其质量相关性, 并确定几种可判定卵子受精率不低于 50%的生化指标(为保证苗种繁育生产中的经济效益, 本研究将每尾亲鱼所产卵子受精率不低于 50%作为衡量其有利用价值的标准, 即卵子未过熟)。数据以平均数±标准误差($\bar{x} \pm SE$)表示, $P < 0.05$ 为差异显著性水平, $R^2 > 0.400$ 可判定为存在相关性。

2 结果与分析

2.1 不同组卵子受精率变化

对 18 条亲鱼所产卵子受精率进行数据处理, A 组卵子平均受精率为(86.66±1.82)%; 推迟 1 周产卵, 其受精率显著下降, 平均为(57.14±7.18)%; 推迟两周后, 其受精率降至(31.89±3.18)%。A、B、C3 组间受精率差异显著($P < 0.05$), 并呈下降趋势。

2.2 不同组卵内几种酶活力的变化

由表 1 可知, A、B、C 这 3 组间 ACP、MDH 差异显著($P < 0.05$); AKP 在各处理间无显著性差异($P > 0.05$); ACP 在 A 组活力最高, 推迟 1 周后, 卵内 ACP 活力显著下降($P < 0.05$), 2 周后, ACP

活力降至最低; MDH 在 A 组活力显著高于 B、C 两组($P < 0.05$), B、C 两组间未出现明显差异($P > 0.05$); AKP 活力在不同组间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 不同组卵内 SA、AA 含量的变化

由表 1 可知, SA 在各组间无显著性差异($P > 0.05$)。AA 含量在 A 组最高; 推迟 1 周后, AA 含量无显著性变化($P > 0.05$); 推迟 2 周后, AA 含量显著下降, 与 A、B 组相比表现出显著性变化($P < 0.05$)。

表 1 不同处理组卵内酶活力及代谢物质的含量变化
Tab. 1 The changes of enzyme activity and metabolites in eggs of *Takifugu rubripes* under different treatments

指标 item	处理组 group		
	A	B	C
酸性磷酸酶活性 /[U/g(prot)] ACP activity	146.03±8.89 ^a	114.00±2.73 ^b	94.29±3.44 ^c
碱性磷酸酶活性 /[U/g(prot)] AKP activity	4.55±1.59	3.39±0.32	1.99±0.64
苹果酸脱氢酶活性 /[U/mg(prot)] MDH activity	1.50±0.08 ^a	0.98±0.08 ^b	0.83±0.07 ^b
唾液酸含量/(mg/g) SA	23.59±7.89	10.99±3.36	24.62±5.62
总氨基酸/(mmol/g) AA	4.65±0.40 ^a	3.74±0.20 ^a	1.07±0.37 ^b

注: 同一行数值中上标英文字母不同表示不同组间差异显著($P < 0.05$)。依推迟产卵时间 0 周、1 周、2 周将卵子分为 3 组, 依次分别记作 A、B、C。

Note: Values in the same row with different superscripts show significant difference ($P < 0.05$). According to the time of delayed spawning for 0 week, 1 week and 2 weeks, eggs were divided into three groups and were recorded as A, B and C, respectively.

2.4 不同组卵子脂肪酸种类及比例变化

由表 2 可知, A 组中卵内十四烷酸($C_{14:0}$)含量显著高于 B、C 两组($P < 0.05$), 而 B、C 两组间无显著性变化($P > 0.05$); 十五烷酸($C_{15:0}$)含量在 A 组含量最高, C 组含量最低, 呈显著性下降趋势($P < 0.05$); 棕榈酸($C_{16:0}$)表现出与 $C_{14:0}$ 相似的变化趋势; 棕榈油酸($C_{16:1n-7}$)在 A、B 两组含量相近, 无显著差异($P > 0.05$), 而其在 C 组显著下降($P < 0.05$); 油酸($C_{18:1}$)含量在 A、C 组间差异显著($P < 0.05$), B 组与 A、C 处理组均无显著差异($P > 0.05$); α -亚麻酸($C_{18:3n-3}$)与 $C_{16:1n-7}$ 变化趋势相

表 2 不同处理组卵子脂肪酸组成变化
Tab. 2 The content changes of fatty acids in eggs of *Takifugu rubripes* under different treatments

脂肪酸/[g/100 g(fat)] fatty acid	处理组 group		
	A	B	C
十四烷酸 C _{14:0}	1.77±0.01 ^a	1.55±0.02 ^b	1.51±0.01 ^b
十五烷酸 C _{15:0}	0.45±0.01 ^a	0.41±0.01 ^b	0.37±0.01 ^c
棕榈酸 C _{16:0}	21.86±0.10 ^a	20.95±0.08 ^b	20.73±0.14 ^b
棕榈油酸 C _{16:1n-7}	7.77±0.04 ^a	7.69±0.02 ^a	7.07±0.07 ^b
硬脂酸 C _{18:0}	5.51±0.04	5.55±0.04	5.53±0.03
油酸 C _{18:1}	19.16±0.18 ^b	19.43±0.24 ^{a,b}	19.81±0.11 ^a
亚麻酸 C _{18:2n-6}	1.62±0.01	1.62±0.01	1, 63±0.01
α-亚麻酸 C _{18:3n-3}	0.91±0.01 ^a	0.89±0.00 ^a	0.82±0.00 ^b
顺-11-二十烯酸 C _{20:1n-9}	1.80±0.01	1.76±0.02	1.80±0.02
花生四烯酸 ARA	1.35±0.02	1.42±0.03	1.38±0.03
二十碳四烯酸 C _{20:4n-3}	0.62±0.01	0.62±0.01	0.61±0.02
二十碳五烯酸 EPA	6.57±0.08 ^a	6.42±0.06 ^a	5.96±0.05 ^b
二十二碳五烯酸 C _{22:5n-3}	3.52±0.05 ^b	4.02±0.03 ^a	4.00±0.04 ^a
顺式-4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸 DHA	22.93±0.19	22.92±0.15	22.93±0.22
总饱和脂肪酸 SFA	29.59±0.11 ^a	28.46±0.07 ^b	28.15±0.12 ^b
多不饱和脂肪酸 PUFA	37.51±0.17	37.90±0.13	37.32±0.18
单不饱和脂肪酸 MUFA	28.72±0.18	28.89±0.24	28.68±0.14
二十二碳六烯酸(DHA):二十碳五烯酸(EPA)	3.49±0.05 ^b	3.57±0.05 ^b	3.85±0.06 ^a
二十碳五烯酸(EPA):花生四烯酸(ARA)	4.88±0.12 ^a	4.54±0.11 ^b	4.32±0.09 ^b

注: 同一行数值中上标英文字母不同表示不同组间差异显著($P<0.05$)。依推迟排卵时间 0 周、1 周、2 周将卵子分为 3 组, 依次分别记作 A、B、C。
Note: Values in the same row with different superscripts show significant difference ($P<0.05$). According to the time of delayed spawning for 0 week, 1 week and 2 weeks, eggs were divided into three groups which were recorded as A, B and C, respectively.

似, 而二十二碳五烯酸(C_{22:5n-3})、总饱和脂肪酸(SFA)、二十碳五烯酸(EPA):花生四烯酸(ARA)均与 C_{14:0} 变化趋势一致, 二十二碳六烯酸(DHA):二十碳五烯酸(EPA)在 A、B 两组间无显著差异($P>0.05$), 而其在 C 组含量却显著高于 A、B 两组($P<0.05$)。

2.5 不同处理组受精率与卵内各生化参数相关性

由表 3 可知, 红鳍东方鲀卵子内 ACP 等多种生化参数与其受精率显著相关($P<0.05$), 其中 ACP、MDH 两种酶活力与其受精率均表现出显著线性正相关($P<0.05$, $R_1^2=0.705$, $R_2^2=0.630$), 却未发现 AKP 活力与受精率间存在相关性($P>0.05$, $R^2=0.214$); 卵子内 AA 含量与受精率呈显著正相关($P<0.05$, $R^2=0.706$), 卵内 SA 含量与受精率间未发现明显相关性($P>0.05$, $R^2=0.010$); 对红鳍东方鲀卵子各脂肪酸含量与其受精率相关性分析显示, 饱和脂肪酸 C_{14:0}、C_{15:0}、C_{16:0} 均与受精率呈

显著线性相关($P<0.05$), 在高受精率卵子组内, 3 种脂肪酸含量均呈现递增趋势; C_{16:1n-7}、C_{18:3n-3}、EPA 这 3 种脂肪酸与受精率亦表现出线性正相关($P<0.05$), C_{22:5n-3} 与受精率呈显著负相关($P<0.05$); 另统计可知, 红鳍东方鲀卵子内 SFA 含量也与受精率表现出显著正相关($P<0.05$, $R^2=0.725$), DHA : EPA 与受精率呈显著负相关($P<0.05$, $R^2=0.604$), 其比值随受精率的降低呈升高趋势, 但比值始终在 3~4; EPA : ARA 与受精率呈正相关, 但相关程度不高($P<0.05$, $R^2=0.390$), 其比值范围在 4~5 波动。其余脂肪酸如硬脂酸(C_{18:0})、亚麻酸(C_{18:2n-6})、顺-11-二十烯酸(C_{20:1n-9})、ARA、二十碳四烯酸(C_{20:4n-3})、DHA 等并未表现出与受精率存在相关性。

2.6 几种重要的可作为卵质评估依据的生化指标

由表 4 可知, 红鳍东方鲀卵子内 ACP、MDH、AA 及 C_{14:0}、C_{15:0}、C_{16:0} 等 7 种脂肪酸等生化指

表 3 各生化参数(x)与红鳍东方鲀卵子受精率(y)相关性
Tab. 3 The correlation of biochemical parameters (x) and fertilization rates (y) of *Takifugu rubripes* eggs

自变量 x independent variable	回归模型(y =受精率×100) regression model	R ²	F	P
酸性磷酸酶活性/[U/g(prot)] ACP activity	y=0.791x-34.867	0.705	41.56	0.00
碱性磷酸酶活性/[U/g(prot)] AKP activity	y=4.321x+44.263	0.214	4.366	0.06
苹果酸脱氢酶活性/[U/mg(prot)] MDH activity	y=56.111 x-3.252	0.630	29.92	0.00
唾液酸含量/(mg/g) SA	y=0.155 x+55.508	0.010	0.154	0.70
总氨基酸/(mmol/g) AA	y=11.647 x+21.816	0.706	46.92	0.00
脂肪酸/[g/100 g(fat)] fatty acids				
十四烷酸 C _{14:0}	y=171.146 x-217.077	0.740	49.45	0.00
十五烷酸 C _{15:0}	y=411.613 x-111.570	0.531	20.23	0.00
棕榈酸 C _{16:0}	y=34.682 x-676.018	0.643	31.63	0.00
棕榈油酸 C _{16:1n-7}	y=57.509 x-373.332	0.646	32.01	0.00
油酸 C _{18:1}	y=-22.220 x+491.093	0.176	4.63	0.05
α-亚麻酸 C _{18:3n-3}	y=374.538 x-267.071	0.490	17.34	0.00
二十碳五烯酸 EPA	y=64.551 x-349.079	0.660	34.05	0.00
二十二碳五烯酸 C _{22:5n-3}	y=-70.773 x+330.724	0.556	22.30	0.00
总饱和脂肪酸 SFA	y=30.074 x-805.605	0.725	45.77	0.00
二十二碳六烯酸(DHA):二十碳五烯酸(EPA)	y=-95.341 x+405.468	0.604	26.91	0.00
二十碳五烯酸(EPA):花生四烯酸(ARA)	y=45.297 x-148.875	0.390	11.87	0.00

注: $P<0.05$, $R^2>0.400$ 表示该模型有意义, R^2 越大, 模型吻合性越大.
Note: $P<0.05$, $R^2>0.400$ indicate that the model has significance, and greater R^2 indicates more significance of the model.

表 4 卵内酶活力、总氨基酸及脂肪酸等生化指标与受精率相关性
Tab. 4 The correlation of enzyme activity, contents of amino acid and fatty acids in eggs of *Takifugu rubripes* with fertilization rates

自变量 x independent variable	x 取值范围(50≤y≤100) the value range of x	r ²	变化趋势 variation trend
酸性磷酸酶活性/[U/g(prot)] ACP activity	107.29≤x≤170.50	0.705	递增 increase progressively
苹果酸脱氢酶活性/[U/mg(prot)] MDH activity	0.95≤x≤1.84	0.630	递增 increase progressively
总氨基酸/(mmol/g) AA	2.42≤x≤6.71	0.706	递增 increase progressively
脂肪酸/[g/100 g(fat)] fatty acids			
十四烷酸 C _{14:0}	0.98≤x≤1.85	0.740	递增 increase progressively
十五烷酸 C _{15:0}	0.39≤x≤0.52	0.531	递增 increase progressively
棕榈酸 C _{16:0}	20.93≤x≤22.38	0.643	递增 increase progressively
棕榈油酸 C _{16:1n-7}	7.36≤x≤8.23	0.646	递增 increase progressively
α-亚麻酸 C _{18:3n-3}	0.85≤x≤0.98	0.490	递增 increase progressively
二十碳五烯酸 EPA	6.18≤x≤6.96	0.660	递增 increase progressively
二十二碳五烯酸 C _{22:5n-3}	3.26≤x≤3.97	0.556	递减 decrease progressively
总饱和脂肪酸 SFA	28.45≤x≤30.11	0.725	递增 increase progressively
二十二碳六烯酸(DHA):二十碳五烯酸(EPA)	3.20≤x≤3.73	0.604	递减 decrease progressively

注: 各生化参数值所用单位均与表 1、表 2 一致. $P<0.05$, $R^2>0.400$ 表示该模型有意义, R^2 越大, 模型吻合性越大.
Note: The units of biochemical parameter values used are the same with table 1 and table 2. $P<0.05$, $R^2>0.400$ indicate that the model has significance, and greater R^2 indicates more significance of the model.

标以及 SFA、DHA:EPA 脂肪酸统计参数均与各组的受精率表现出较好相关性($R^2>0.400$), 且在 ACP 活力范围不低于 107.29 U/g(prot)时, 卵子受精率将可以在 50%以上, 且随 ACP 活力的升高而升高, 相关系数 $R^2=0.705$; MDH 活力范围在 0.95~1.84 U/mg(prot)间时, 卵子受精率也可保持

在 50%以上, 受精率亦随着 MDH 活力的升高呈现升高趋势, 相关系数 $R^2=0.630$; AA 在卵中含量在 2.42~6.71 mmol/g 间时, 受精率亦随之呈现递增趋势, 相关系数 $R^2=0.706$; 受精率在 50%以上时, 除 $C_{22:5n-3}$ 外, 脂肪酸中的 $C_{14:0}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{16:0}$ 等 6 种脂肪酸含量随受精率的增加而增加, 具体可见表 4; 另外 SFA、DHA:EPA 这两种脂肪酸统计参数在受精率不低于 50%时也均有一定的取值范围, 具体范围及其增减性亦在表 5 中列出。

3 讨论

卵子过熟是影响鱼类卵子质量的重要因素之一^[10-11], 卵子严重过熟后, 其会在外观形态方面发生变化, 比如卵黄呈半透明、胞浆及油球聚集于动物极、卵子吸水等现象^[12-14]。研究表明, 卵子过熟后, 卵子内部生化成分亦会发生一定波动^[5], 卵巢液中谷草转氨酶水平也出现明显升高^[6]。虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)卵子过熟后, 卵子内部组织结构、水分、绒毛膜重量、钙离子水平、脂类以及蛋白水平均出现明显变化^[15]; 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)卵子过熟后, 卵子及卵巢液内蛋白水平、酶活力及 pH 均发生明显变化, 并与卵子活力存在相关性^[16-17]; 多个研究表明, 虹鳉鱼卵巢液内蛋白水平的升高可作为判断其卵子过熟的指标^[18-19], 其卵巢液内蛋白来源虽尚未有确切判断, 其很可能源自卵巢内卵子内部, 因卵子过熟后外膜出现破损, 卵内蛋白、氨基酸流入卵巢导致, 故此亦可佐证卵子内部生化成分可因卵子过熟而发生变化。

红鳍东方鲀卵子外观不透明, 卵膜较厚, 其发育过熟后从外观较难做出准确判断。本研究发现, 随亲鱼排卵期的人为推迟, 卵子内部多个生化参数出现明显变化。ACP 定位于卵子内溶酶体和内膜系统^[7], 在代谢调节、能量转化及信号转导上起重要作用, 同时作为溶酶体标志酶, 为卵子提供非特异性免疫保护^[8], 红鳍东方鲀卵子在刚成熟时卵内 ACP 活力最高, 随着产卵期推迟, ACP 活力呈现显著性下降。这表明在卵子成熟时, 卵膜处于完好状态, 卵内代谢处于健康水平, 膜系统的 ACP 活力最高; 排卵推迟后, 因卵子膜系

统受损, 导致 ACP 活力下降, 此时卵内非特异性免疫作用显然也随之降低, 也给精子入卵后卵子正常分裂带来风险, 因而在刚成熟卵子处于最佳状态, ACP 活力最高, 受精率也最好。MDH 为三羧酸循环关键酶, 在卵子内部物质代谢、能量转化过程起着重要作用^[9]。红鳍东方鲀卵子过熟后, 卵内 MDH 活力显著下降, 并与受精率呈现显著正相关, 无疑是和 MDH 在卵子代谢中的重要作用有关, 且因卵子外膜受损后卵巢液中偏碱性物质的进入, 卵内 pH 等内环境指标发生变化, 致使 MDH 活力降低。卵子内部氨基酸从卵膜外泄, 导致卵子氨基酸总量降低, 具体表现为随排卵期推迟, 卵内 AA 含量呈递减趋势。同时, AA 作为卵内氨基酸代谢水平参考指标^[9], 亦可知随排卵期推迟, 卵内氨基酸代谢水平下降, 进而影响卵子受精率, 具体表现为 AA 与受精率呈线性正相关。故而在红鳍东方鲀卵子过熟鉴定中, 卵子内 ACP、MDH、AA 生化参数具有一定的参考价值。

脂质为鱼类卵子内重要的储能物质, 徐善良等^[20]研究结果表明, $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 等饱和脂肪酸在鱼类胚胎发育中作为重要能源首先被利用, 在鱼类胚胎发育中起着重要作用。红鳍东方鲀卵子过熟后, 或因卵膜破损、绒毛膜变薄, 使卵子内多种脂肪酸含量下降。本研究结果表明, $C_{14:0}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{16:0}$ 三种饱和脂肪酸含量随产卵期推迟而显著下降, 使卵子内部重要的能源物质储量锐减, 显然这与受精率的降低不无关系。已有研究表明, $C_{20:5n-3}$ 即 EPA 为类二十烷酸前体, 而类二十烷酸为具抗炎作用的物质^[21], 在本研究结果中, $C_{20:5n-3}$ 含量与卵子受精率成反比, 这可能因其含量的降低, 导致卵子内部抗炎作用的降低, 故而间接导致了卵子受精率的下降。Shearer 等^[22]研究结果表明, ARA 为具促炎作用的类二十烷酸前体, 其与 EPA 代谢过程中所需酶相同, 二者代谢过程将不可避免发生竞争, 并决定着卵子的抗感染能力, 故而本研究结果中也出现 EPA 与 ARA 比值与卵子受精率呈现正相关的现象, 这与其在大菱鲆^[23]和暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)^[24]中的表现相一致。本研究结果发现, DHA 与 EPA 比值与卵子受精率呈负相关, 但在大西洋鲷(*Sparus aurata*)^[25]中, 却

发现 DHA 与 EPA 比值与其卵子活力呈正相关, 因此卵子内部脂肪酸在不同鱼类胚胎发育中所起作用的差异及其在胚胎发育中是否具有不同的参与机制, 还需进一步研究。

在红鳍东方鲀工厂化育苗中, 常因人为因素而出现雌性亲鱼产卵期延迟现象, 这导致卵子的受精率波动很大, 生产经验表明, 亲鱼产卵期延迟两周以上时, 排出卵子因夹杂较多已碎卵壳而较容易区分, 但当产卵期延迟时间较短时, 卵子外观并无明显特征, 但所得卵子受精率往往不足 50%, 这给红鳍东方鲀育苗行业规范化及卵子质量标准化带来一定难度。

本研究结果表明, 在红鳍东方鲀人工授精时, 在亲鱼卵子成熟后 1 周内进行人工挤卵尤为重要; 在本次红鳍东方鲀卵子过熟性评价中, 当卵子中酸性磷酸酶活力在 107.29~170.50 U/g(prot)范围, 苹果酸脱氢酶活力在 0.95~1.84 U/mg(prot)范围, 总氨基酸在卵中含量在 2.42~6.71 mmol/g 范围时, 及 C_{14:0} 在 100 g 总脂中的含量在 0.98~1.85 g 范围, C_{15:0} 在 0.39~0.52 g 范围, C_{16:0} 在 20.93~22.38 g 范围, C_{16:1n-7} 在 7.36~8.63 g 范围, EPA 在 6.18~6.96 g 范围, C_{22:5n-3} 在 3.26~3.97 g 范围, 总饱和脂肪酸(SFA)在 28.45~30.11 g 范围, DHA:EPA 比值在 3.20~3.73 范围内时, 均可作为红鳍东方鲀卵子可受精率高于 50% 的参考指标, 据此可在一定程度反映红鳍东方鲀繁育过程中卵子的可利用价值, 以及生产上可对过熟卵子进行剔除, 以提高苗企生产效率。不同龄或不同群体或不同批次成熟的亲鱼所产的正常卵子内的生化参数是否均在相同的范围内波动, 卵子延迟排出时, 卵子内 AKP、SA 的生理作用有无重大变化, 同样作为膜结合蛋白^[26], AKP 却为何未能呈现与 ACP 类似的变化趋势, 现在尚不得知, 因此为建立红鳍东方鲀的卵质生化参数标准, 目前还有很多工作要做, 且在卵子过熟期间卵子内部发生变化的机制尚未清晰, 未来还需深入研究。

参考文献:

[1] Wang K Q, Chen M, Gao T X. Study on taxonomy and fauna of *Takifugu*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao:

Natural Science, 2001, 31(6): 855-860. [王奎旗, 陈梅, 高天翔. 东方鲀属鱼类的分类与区系分布研究[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 2001, 31(6): 855-860.]

- [2] Ma A J, Li W Y, Wang X A, et al. Research progress and outlook of *Takifugu rubripes* culture techniques[J]. Marine Sciences, 2014, 38(2): 116-121. [马爱军, 李伟业, 王新安, 等. 红鳍东方鲀养殖技术研究现状及展望[J]. 海洋科学, 2014, 38(2): 116-121.]
- [3] Dietrich M A, Dabrowski K, Arslan M, et al. Quantifying quality attributes of walleye eggs prior to fertilization – Impact of time of ovulation and gametes storage[J]. Journal of Great Lakes Research, 2012, 38(3): 445-450.
- [4] Tang W L. The abnormal phenomenon of hatching eggs and its treatment[J]. Inland Fisheries, 1993, 19(3): 18. [唐文联. 鱼卵孵化中异常现象及其处理[J]. 内陆水产, 1993, 19(3): 18.]
- [5] Lahnsteiner F. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs[J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2000, 23(2): 107-118.
- [6] Lahnsteiner F, Urbanyi B, Horvath A, et al. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish[J]. Aquaculture, 2001, 195(3): 331-352.
- [7] Kong X, Wang S, Jiang H, et al. Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus*[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 120-121: 119-125.
- [8] Liu Z H, Mou H J, Wang Q Y. Research progress of immune related enzymes in mollusca[J]. Marine Fisheries Research, 2003, 24(3): 86-90. [刘志鸿, 牟海津, 王清印. 软体动物免疫相关酶研究进展[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(3): 86-90.]
- [9] Lahnsteiner F, Patarnello P. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters[J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4): 443-459.
- [10] Kjorsvik E, Mangor J A, Holmefjord I. Egg quality in fishes[J]. Advances in Marine Biology, 1990, 26: 71-112.
- [11] Salze G, Tocher D R, Roy W J, et al. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock[J]. Aquaculture Research, 2005, 36(15): 1488-1499.
- [12] Hirose K, Ishida R, Sakai K. Induced ovulation of ayu using human chorionic gonadotropin (HCG), with special reference to changes in several characteristics of eggs retained in the body cavity after ovulation[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1977, 43(4): 409-416.
- [13] Lam T J, Nagahama Y, Chan K, et al. Overripe eggs and

- postovulatory corpora lutea in the threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., form trachurus[J]. Canadian Journal of Zoology, 1978, 56(9): 2029-2036.
- [14] Nomura M, Sakai K, Takashima F. The over-ripening phenomenon of rainbow trout I Temporal morphological changes of eggs retained in the body cavity after ovulation[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1974, 40(10): 977-984.
- [15] Craik J C A, Harvey S M. Egg quality in rainbow trout: the relation between egg viability, selected aspects of egg composition, and time of stripping[J]. Aquaculture, 1984, 40(2): 115-134.
- [16] Jia Y D, Meng Z, Liu X F, et al. Activities of phosphatase in eggs and ovarian fluids and its correlation with the fertilization rate during the reproductive cycle of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(6): 1530-1535. [贾玉东, 孟振, 刘新富, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)繁殖期卵子和卵巢液中磷酸酶活性变化及其与受精率相关性[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(6): 1530-1535.]
- [17] Fauvel C, Omnès M H, Suquet M, et al. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement[J]. Aquaculture, 1993, 117(1-2): 107-113.
- [18] Aegerter S, Jalabert B. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2004, 231(1): 59-71.
- [19] Rime H, Guitton N, Pineau C, et al. Post-ovulatory ageing and egg quality: A proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid[J]. Reproductive Biology & Endocrinology Rb & E, 2004, 2(1): 1-10.
- [20] Xu S L, Wang Y J, Wang D L, et al. The study of fatty acid components in early developmental stage of *Oplegnathus fasciatus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 438-444. [徐善良, 王亚军, 王丹丽, 等. 条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*)发育早期的脂肪酸组成变化研究[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 438-444.]
- [21] Chiolero R L, Berger M M. Omega-3 fatty acids in acutely ill patients[J]. Clinical Nutrition Supplements, 2007, 2(3): 9-10.
- [22] Shearer G C, Harris W S, Pedersen T L, et al. Detection of omega-3 oxylipins in human plasma and response to treatment with omega-3 acid ethyl esters[J]. Journal of Lipid Research, 2010, 51(8): 2074-2081.
- [23] Jia Y D, Meng Z, Liu X F, et al. Biochemical composition and quality of turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs throughout the reproductive season[J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2014, 40(4): 1093-1104.
- [24] Zhao Y F, Ma A J, He W G, et al. Analysis of phosphatase and other biochemical parameters of egg and its quality determination in *Takifugu obscurus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1622-1630. [赵艳飞, 马爱军, 何伟国, 等. 暗纹东方鲀卵子磷酸酶等生化指标分析与卵质评估[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1622-1630.]
- [25] Jerez S, Rodríguez C, Cejas J R, et al. Influence of age of female gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstock on spawning quality throughout the reproductive season[J]. Aquaculture, 2012, 350(1): 54-62.
- [26] Low M G, Saltiel A R. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes[J]. Science, 1988, 239(4837): 268-275.

Effect of delayed spawning on *Takifugu rubripes* egg quality

ZHAO Yanfei^{1,2}, MA Aijun^{2,3}, WANG Xin'an^{2,3}, SUN Jianhua^{2,3}, CUI Wenxiao^{2,3}, HOU Shiyong⁴

1. Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology; Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
4. Rushan Fisheries Technical Extension Station, Rushan 264500, China

Abstract: Egg quality is essential for fish breeding and the healthy development of aquaculture. In the artificial breeding of *Takifugu rubripes*, in which ovulation cannot occur spontaneously, it is difficult to determine a suitable time for collecting eggs artificially from mature broodstocks, and artificial egg collection is frequently delayed in the breeding of *T. rubripes*. Aging of ovulated eggs in the ovary or in the coelomic cavity is defined as over-ripening of eggs and is always associated with a decrease in egg viability. It would thus be useful to investigate variations in physiological and biochemical parameters and their effects on the quality of *T. rubripes* eggs during egg over-ripening, and to define those parameters that are correlated with egg vitality and could be used as quality markers. In this study, we examined the effects of delaying artificial spawning of mature broodstocks for 1 and 2 weeks. In group A, artificial spawning was not delayed, whereas in groups B and C, artificial spawning was delayed for 1 and 2 weeks, respectively. Variations in the phosphatases, malate dehydrogenase (MDH), sialic acid, total amino acids (AAs), and fatty acids of eggs were analyzed by means of biochemical analysis and GC-MS. We also examined the correlations between these biochemical parameters and fertilization rates. The results showed that after delaying spawning for 1 week, the fertilization rates in group B decreased significantly ($P < 0.05$), and that after a delay of 2 weeks, the fertilization rates of group C decreased to 31.89%. With the delay in spawning, the activities of acid phosphatase (ACP) decreased significantly ($P < 0.05$) and was significantly correlated with fertilization rates ($P < 0.05$, $R^2 = 0.705$). In group A, the activity of MDH was significantly higher than that in group B and group C ($P < 0.05$, $R^2 = 0.630$). AA contents showed the same variation tendency, with the AA contents in group A and group B being higher than those in group C ($P < 0.05$, $R^2 = 0.706$). The contents of myristic acid ($C_{14:0}$), pentadecanoic acid ($C_{15:0}$), palmitic acid ($C_{16:0}$), palmitoleic acid ($C_{16:1n-7}$), α -linolenic acid ($C_{18:3n-3}$), and eicosapentaenoic acid (EPA) in 100 g fat were highest in group A and were significantly positively correlated with fertilization rates ($P < 0.05$). Docosapentaenoic acid ($C_{22:5n-3}$) and the ratio of docosahexaenoic acid (DHA) to EPA were significantly negatively correlated with fertilization rates. These results demonstrate that the egg vitality of *T. rubripes* was significantly reduced during over-ripening in the coelomic cavity. The changes in egg vitality were associated with several alterations in egg physiology and biochemical compositions. Some of the parameters of the eggs that changed during over-ripening were also suitable for the determination of egg quality. These phenomena suggest that during the over-ripening of eggs, the egg membrane becomes damaged, and that there is a mixing of the contents of eggs and ovarian fluid, which leads to a decrease in the compositions of AAs, types of fatty acids, and other biochemical substances. $C_{14:0}$, $C_{15:0}$, and $C_{16:0}$ are important energy storage materials, whereas $C_{20:5n-3}$ is the precursor of EPA, which confers anti-inflammatory properties to eggs. AA content is an important index of AA metabolism. Clearly, as indicated by the results of this study, decreases in these biomolecules could lead to decreases in the fertilization rates of *T. rubripes* eggs. ACP is an enzyme that is indicative of lytic processes and is involved in the degeneration of phospholipids, whereas MDH is a key-enzyme in the tricarboxylic acid cycle, which is consistent with our results showing that decreases in the activities of ACP and MDH can impair egg viability. In conclusion, changes in phosphatase, malate dehydrogenase, total amino acids and fatty acids are correlated with egg viability, and it is thus essential to collect eggs artificially within 1 week when the ovaria of broodstocks are maturing.

Key words: *Takifugu rubripes*; egg; overripe; fertilization rates; biochemical composition; quality evaluation

Corresponding author: MA Aijun. E-mail: maaj@ysfri.ac.cn