

DOI: 10.12264/JFSC2023-0293

大鳍鲩精子生物学特性及几种环境因子对其活力的影响

陈思奇^{1,2}, 朱永久², 吴兴兵², 杨德国², 刘应保¹, 李晓莉²

1. 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434020;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223

摘要: 为探究大鳍鲩(*Mystus macropterus*)精子生物学特性及环境因子对其精子活力的影响, 提高精子活力, 本研究对其精液 pH、渗透压、精子密度、精子运动参数进行测定, 对精子的结构进行观察, 同时设定 pH、葡萄糖和离子(NaCl、KCl、CaCl₂)浓度梯度, 应用计算机辅助精子分析系统(CASA)观察其对精子活力的影响。结果表明, 大鳍鲩精子由头部、颈部和尾部组成, 无顶体, 有侧鳍。大鳍鲩平均精子密度为 2.50×10^9 个/mL, 精液 pH 为 7.0~7.2, 精浆渗透压为 (634.16 ± 6.66) kPa。精浆中离子成分以 Na⁺ 含量最高, 其次是 K⁺, 之后依次为 Mg²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺, 未检测出 Cu²⁺。精浆水解氨基酸总量为 $169239.21 \mu\text{mol/L}$, 其中以亮氨酸含量最高, 蛋氨酸含量最低。大鳍鲩精子经去离子水激活后, 运动率、快速运动时间和寿命分别为 $(48.61 \pm 14.85)\%$ 、 (34.00 ± 4.00) s、 (396.50 ± 9.50) s, 直线运动速率、曲线运动速率及平均路径运动速率分别为 $(11.50 \pm 6.26) \mu\text{m/s}$ 、 $(24.21 \pm 8.68) \mu\text{m/s}$ 、 $(14.00 \pm 5.99) \mu\text{m/s}$ 。精子在 pH 7.0~9.0 的偏碱性水中活力较强, 最适 pH 为 8.0; 精子在 NaCl、KCl、CaCl₂ 浓度为 1 g/L、5 g/L、6 g/L 时, 运动率达到峰值; 葡萄糖浓度为 7 g/L 时精子活力达到最高。研究表明, 大鳍鲩精子适宜 pH 为 7.0~9.0; 适宜浓度的 NaCl、KCl、CaCl₂ 和葡萄糖对大鳍鲩精子活力具有较好的促进作用。

关键词: 大鳍鲩; 精子结构; 精子活力; CASA; 精浆成分

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)01-0040-11

人工繁殖是鱼类孵化生产的一种常用技术, 主要用于某些因繁殖隔离机制或其他生理障碍而无法在养殖环境中同步产卵的鱼类^[1]。在鱼类人工繁殖过程中, 高质量的精子是成功受精的必要条件^[2]。精子生物学特性作为评估精子质量的关键参数, 是开展精子激活、精液保存、人工授精等相关研究的基础, 在淡水鱼类繁殖过程中已经有较广泛研究^[3-4]。Quagio-Grassiotto 等^[5]研究了鱼类精子的结构特征, 并将其与鱼类系统发育相联系; 鲁大椿等^[6-7]则对我国淡水鱼类精浆成分进行了研究, 揭示了精浆中离子成分和氨基酸成分的生理作用。此外 Alavi 等^[8-9]对鱼类精子活力展开了研究, 发现鱼类精子活力受多种环境因素

的影响。虽然大多数淡水鱼类都具有共同的受精策略, 但精子的大小、形状和活力等生物学特征仍存在很大差异^[10-11], 同时对于不同的鱼类, 环境因子对其精子活力的作用效果和作用机制也存在种的差异性^[12-13]。因此对鱼类精子生物学特性及精子活力开展研究, 不仅有利于丰富鱼类精子生物学资料, 也为提高精子质量, 成功进行鱼类人工繁殖奠定基础。

大鳍鲩(*Mystus macropterus*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲇形目(Siluriformes), 鲿科(Bagridae), 鲿属(*Mystus*), 是我国特有的经济鱼类, 其肉质细嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 蛋白质含量高, 市场需求旺盛^[14]。20 世纪 90 年代开始, 相关单位陆续

收稿日期: 2023-11-25; 修订日期: 2023-12-15.

基金项目: 湖北省长江野生鱼类繁育驯化科技攻关项目; 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-46); 中国水产科学研究院基本科研业务费院级湖库增殖渔业创新团队项目(2023TD61).

作者简介: 陈思奇(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生生物学. E-mail: csq170912040@163.com

通信作者: 李晓莉, 副研究员, 研究方向为鱼类驯养繁殖与池塘养殖. E-mail: lxl@yfi.ac.cn

开展了对大鳍鲩繁殖生物学、人工繁殖技术的研究,取得了人工繁殖技术的阶段性突破^[15-16],但在人工繁殖过程中,仍然存在着雄鱼性腺指数低、雌、雄亲鱼性腺成熟不同步且需杀雄取精的难题,从而导致精子使用率低、受精率低等问题^[17],极大限制了其繁育和生产。开展精子生物学特性及环境因子对精子活力影响的研究,不仅有助于精子保存液和人工繁殖时稀释液的配制,也有助于深入了解精子的生物学特性。本研究通过对大鳍鲩的精子结构进行观察分析,测定大鳍鲩精子密度、精浆 pH、渗透压和精浆成分,并探究几种离子、葡萄糖及 pH 对大鳍鲩精子活力的影响,以期为大鳍鲩精子稀释液和激活液的配置提供理论依据,同时进一步完善大鳍鲩繁殖生物学资料,最终提高人工繁殖的受精率。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

实验用大鳍鲩来源于中国水产科学研究院长江水产研究所长江特有鱼类驯养繁育基地,繁殖期间水温维持在 (25.20 ± 0.18) °C,溶解氧为 (9.20 ± 1.20) mg/L。实验鱼均为 4 龄以上亲鱼,体重为 (324.91 ± 76.31) g,体长为 (34.76 ± 3.19) cm。取精前暂养于直径 300 cm、高 110 cm、水深 100 cm 的实验桶中。

1.2 精液的收集及处理

大鳍鲩雄鱼精液收集采用杀鱼取精的方法,取精液前用干净毛巾擦干体表及生殖孔周围的水及脏物,取出精巢后用滤纸吸干精巢表面组织液和血液并称重,在干净的小烧杯中剪碎,80 目筛绢网布挤压,收集精液。精液收集在 1.5 mL 离心管中,立即置于 4 °C 环境中避光保存备用。各项指标共取 30 尾鱼。

1.3 扫描电子显微镜样品制备

以 1 : 10 的体积比加入精液样本及戊二醛(2.5%),固定后用磷酸盐缓冲液(pH7.4)漂洗,1% 锇酸溶液再次固定,磷酸盐缓冲液(pH7.4)再次漂洗,最后依次放入梯度浓度乙醇中脱水,乙酸异戊酯置换。干燥后的样品在离子溅射仪样品台上喷金制成成片。在扫描电子显微镜(HITACHI

Regulus 8100)下观察、拍照。

1.4 透射电子显微镜样品制备

以 1 : 10 的体积比加入精液样本及戊二醛(2.5%),固定后用磷酸盐缓冲液(pH7.4)漂洗,1% 锇酸溶液再次固定,磷酸盐缓冲液(pH7.4)再次漂洗,最后依次放入梯度浓度酒精中脱水,Epon-812 包埋,包埋后的样本通过超薄切片机(Leica EM UC7)切片,最后经醋酸铀和柠檬酸铅避光双重染色后制片。在透射电子显微镜(HITACHI HT7700)下观察、拍照。

1.5 精子密度、精液 pH 和精浆渗透压的测定

取少量新鲜精液进行稀释,滴入血球计数板中央,在显微镜下计数。精子密度计算公式为:精子密度(个/mL)=(80 小格内精子数/80)×400×10⁴×稀释倍数。精液 pH 采用 pH 试纸测定。精液渗透压用渗透压仪(Vapro 5600)进行测定。

1.6 精浆主要离子成分测定

采集的精液在 4 °C、3000 r/min 条件下离心 10 min,离心结束后取上部精浆,通过 Optima 8000 电感耦合等离子体发射光谱仪(FX-001)、氨基酸自动分析仪(日立-LA8080)进行离子成分和氨基酸成分的测定分析。

1.7 pH 和不同浓度溶液对精子活力的影响

参照李文康等^[18]关于鸭绿沙塘鳢(*Odontobutis yaluensis*)精子活力实验方法并加以改进,设计 pH 梯度为 5~10,离子(NaCl、KCl、CaCl₂)、非离子(葡萄糖)梯度为 1~12 g/L 的激活液,以去离子水作为对照组,采用 CASA 精子分析系统进行精子活力相关参数测定,分析 pH 和不同浓度溶液激活液对大鳍鲩精子活力的影响。实验试剂均为国产分析纯,用去离子水配制。

1.8 精子活力观察

将精液与激活液快速混匀加至载玻片上,立即盖上盖玻片计时,并用计算机辅助精子分析系统 CASA(FSQAS-2000)测定激活后的精子运动参数,并人工记录精子的快速运动时间(fast movement time, FT)和寿命(life time, LT)。

1.9 数据处理

实验结果运用 Excel 2016 进行处理,以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。采用 SPSS13.0 对实验数

据进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较, 检验各处理组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 大鳍鲩精子结构

大鳍鲩精子由头部、颈部和尾部组成(图 1a~1b)。精子头部长 $1.82 \sim 2.56 \mu\text{m}$, 直径约为 $(1.79 \pm 0.11) \mu\text{m}$, 近似圆形, 无顶体结构。由图 1c~1d 可以看出, 精子头部主要由细胞核组成, 细胞核包裹在波浪形的细胞质膜内, 膜内细胞质少, 细胞

核前端与质膜紧密相连, 细胞核的后端核膜向内凹陷约 $1/4$, 形成一较浅的核凹窝。颈部长为 $(1.66 \pm 0.03) \mu\text{m}$, 宽 $(0.61 \pm 0.07) \mu\text{m}$, 颈部主要由中心粒复合体和袖套构成(图 1d), 袖套两边分布着数量不一的线粒体和囊泡, 袖套中央的空隙分布并不对称。中心粒复合体结构包裹在核凹窝内, 由远端中心粒和近端中心粒组成。精子尾部自袖套腔中伸出(图 1a, 1b), 起点为袖套腔与远端中心粒的连接处, 长约 $(21.17 \pm 0.35) \mu\text{m}$, 可见明显的侧鳍结构(图 1c, 1d)。

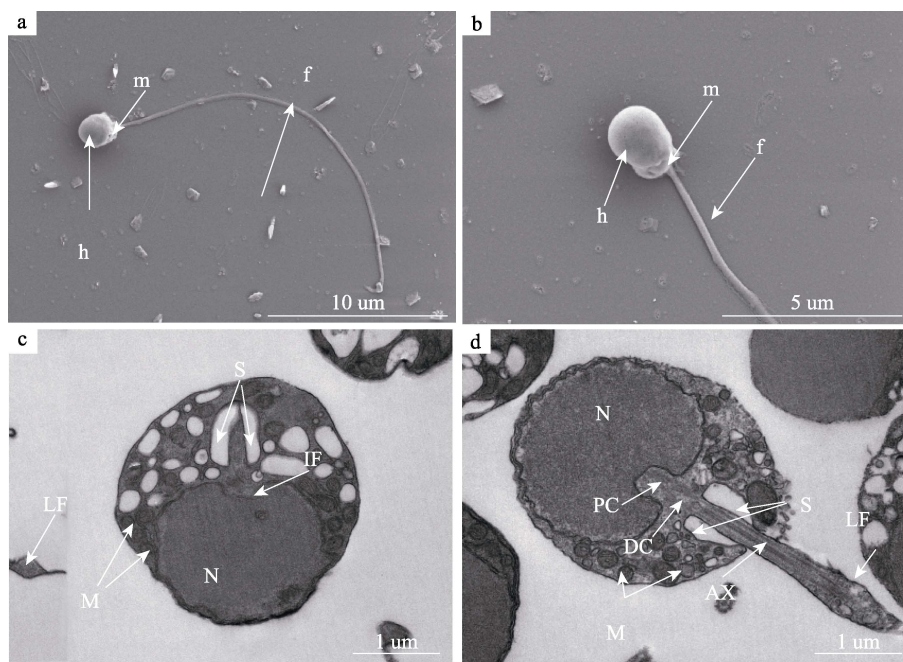


图 1 大鳍鲩精子的超微结构

a-b. 扫描电镜下大鳍鲩精子结构; c-d. 透射电镜下部分精子结构. h: 头部; m: 中段; f: 尾部; S: 袖套腔; IF: 核凹窝; N: 细胞核; M: 线粒体; V: 囊泡; AX: 轴丝; PC: 近端中心粒; DC: 远端中心粒; LF: 侧鳍。

Fig. 1 The ultrastructure images of *Mystus macropterus* spermatozoon

a-b. Morphology of the scanning electron microscopy; c-d. Partial sperm structure under transmission electron microscope. h: head; m: sleevelet part of middle; f: tail flagellum; S: central space of the sleeve; IF: implantation; N: nucleus; M: mitochondrion; V: vesicle; AX: axoneme; PC: proximal centriole; DC: distal centriole; LF: lateral fin.

2.2 大鳍鲩精子运动特征

大鳍鲩精子经去离子水激活后各运动参数见表 1, 平均路径运动速率和直线运动速率较低且较为接近, 曲线运动速率较高。

2.3 大鳍鲩精液生理特性

性成熟大鳍鲩精液呈乳白色, 不黏稠, pH 为 $7.0 \sim 7.2$, 呈弱碱性; 经测定大鳍鲩平均精子密度为 2.50×10^9 个/mL, 渗透压为 $(634.16 \pm$

$6.66)$ kPa。

2.3.1 精浆主要离子成分 大鳍鲩精浆中主要离子成分及其含量见表 2。精浆中离子成分以 Na^+ 含量最高, Zn^{2+} 含量最低; 未检测出 Cu^{2+} 。

2.3.2 精浆中游离氨基酸成分 大鳍鲩精浆中的水解氨基酸成分及其含量见表 3。大鳍鲩精浆中水解氨基酸总量达 $169239.21 \mu\text{mol/L}$, 其中亮氨酸含量最高, 蛋氨酸含量最低。

表 1 大鳍鲩精子的运动参数
Tab. 1 The parameters of sperm movement of *Mystus macropterus*
n=10; $\bar{x} \pm SE$

运动参数 movement parameter	数值 magnitude
运动率/% percentage of motile	48.61±14.85
平均路径运动速率/(μm/s) average path velocity	14.00±5.99
直线运动速率/(μm/s) average straight-line velocity	11.50±6.26
曲线运动速率/(μm/s) average curvilinear velocity	24.21±8.68
前向性/% straightness	41.57±16.11
直线性/% linearity	25.77±11.75
头部侧向运动平均振幅/μm amplitude of lateral head displacement	1.26±0.29
头部鞭打频率/Hz beat-cross frequency	26.99±5.54
快速运动时间/s fast movement time	34.00±4.00
寿命/s life time, LT	396.50±9.50

表 2 大鳍鲩精浆主要离子成分
Tab. 2 Composition of main ions in *Mystus macropterus* semen
n=10; $\bar{x} \pm SE$

离子组成 ion composition	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Fe ³⁺
含量/(mmol/L) content	25.87±1.43	105.73±4.91	1.19±0.08	1.41±0.20	未检出	0.10±0.01	0.33±0.01

表 3 大鳍鲩精浆中水解氨基酸成分
Tab. 3 Composition of hydrolyzed amino acids in *Mystus macropterus* semen
n=10; $\bar{x} \pm SE$

氨基酸 amino acid	氨基酸含量/(μmol/L) amino acid content
天冬氨酸 aspartic acid	17988.79±54.85
苏氨酸 threonine	8707.98±79.09
丝氨酸 serine	8147.69±10.05
谷氨酸 glutamic acid	19656.03±9.57
甘氨酸 glycine	10860.82±36.33
丙氨酸 alanine	9970.16±79.99
半胱氨酸 cysteine	14406.78±47.61
缬氨酸 valine	8467.72±45.23
蛋氨酸 methionine	1955.13±20.62
异亮氨酸 isoleucine	3909.14±44.62
亮氨酸 leucine	22139.76±122.91
酪氨酸 tyrosine	4971.22±38.79
苯丙氨酸 phenylalanine	9818.71±32.86
赖氨酸 lysine	12902.28±22.80
组氨酸 histidine	2234.91±13.29
精氨酸 arginine	4685.06±2.90
脯氨酸 proline	8417.03±108.96
氨基酸总量 amino acid total	169239.21±613.41

2.4 pH 对大鳍鲩精子活力的影响

由图 2 可见, 在 pH5.0~10.0 的溶液中, 大鳍鲩精子运动率随着 pH 的升高呈现出先上升后下降的趋势, 在 pH8.0 时, 精子运动率达到最大值, 为(53.40±3.98) %。精子的快速运动时间和寿命在 pH6.0 时达到峰值, 分别为(209.50±41.23) s、(290.00±8.16) s, pH6.0 时的快速运动时间和 pH 7.0~8.0 无显著差异($P<0.05$), pH6.0 时的寿命和 pH 8.0 无显著差异($P<0.05$), 精子活力在 pH8.0 时最大。

2.5 离子溶液对大鳍鲩精子活力的影响

由图 3 可见, 在 1~12 g/L 的 NaCl 溶液中, 大鳍鲩精子运动率随着 NaCl 浓度的升高呈现出逐渐下降的趋势, 在 1 g/L NaCl 溶液中, 精子运动率相对较高, 但显著低于对照组($P<0.05$), 运动率

为(41.20±5.67)%, 之后随着离子浓度的升高精子运动率逐渐下降。精子的快速运动时间和寿命呈现出先升高后下降的趋势, 在 NaCl 浓度为 4 g/L 时达到峰值, 此时快速运动时间为(945.33±21.65) s, 寿命为(1299.50±16.74) s。

由图 4 可见, 在 1~12 g/L 的 KCl 溶液中, 大鳍鲩精子运动率随着 KCl 浓度的升高呈现出先上升后下降的趋势, 在 5 g/L KCl 溶液中, 精子运动率达到最大值, 为(44.20±1.71)%, 精子的快速运动时间和寿命在 7 g/L 的 KCl 溶液中达到最大值, 为(1092.00±33.95) s、(1552.44±135.28) s。

由图 5 可见, 在 1~12 g/L 的 CaCl₂ 溶液中, 大鳍鲩精子运动率随着 CaCl₂ 浓度的升高呈现出先上升后下降的趋势, 在 6 g/L CaCl₂ 溶液中, 精子运动率达到峰值, 为(50.26±3.55)%。精子快速运动时间及寿命在 5 g/L 时达到最大值, 为(1096.67±36.82) s、(1506.67±89.94) s, 寿命与 4 g/L 时无显著差异。

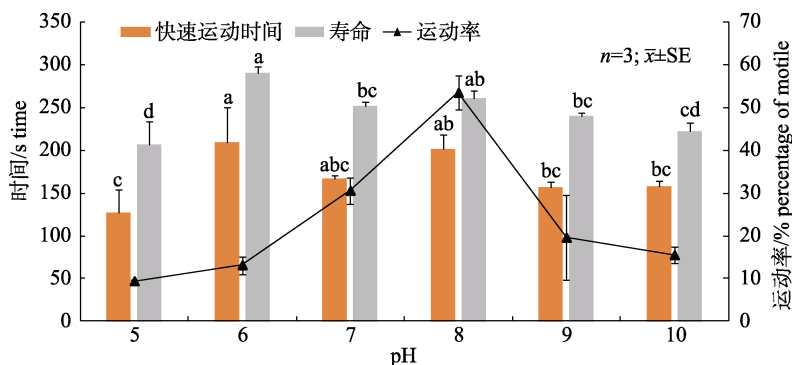


图 2 大鳍鲩精子在不同 pH 溶液中的活力情况

同系列数值标注字母不相同表示两者间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 2 Activity of *Mystus macropterus* sperm in different pH

Different letters for the same series indicate significant difference between the two values ($P < 0.05$).

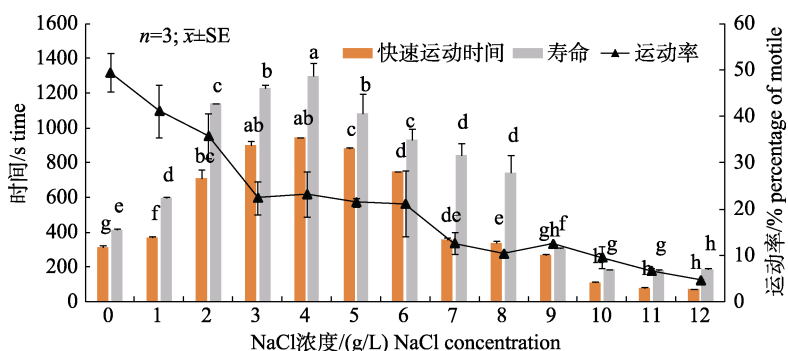


图 3 大鳍鲩精子在不同浓度 NaCl 溶液中的活力情况

同系列数值标注字母不相同表示两者间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 3 Activity of *Mystus macropterus* sperm in different concentrations of NaCl

Different letters for the same series indicate significant difference between the two values ($P < 0.05$).

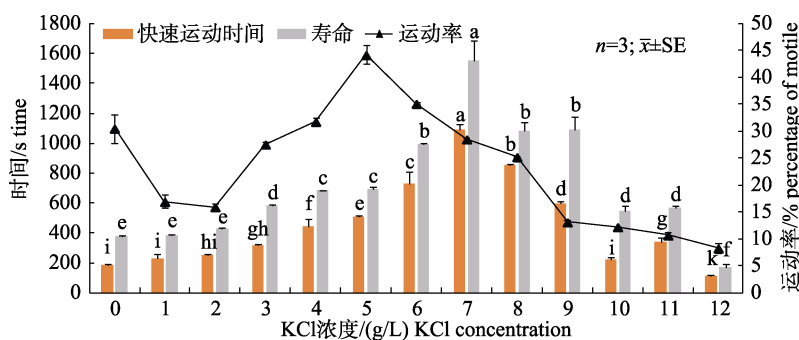


图 4 大鳍鲩精子在不同浓度 KCl 溶液中的活力情况

同系列数值标注字母不相同表示两者间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 4 Activity of *Mystus macropterus* sperm in different concentrations of KCl

Different letters for the same series indicate significant difference between the two values ($P < 0.05$).

2.6 葡萄糖对大鳍鲩精子活力的影响

由图 6 可见, 在葡萄糖浓度为 1~12 g/L 溶液中, 大鳍鲩精子运动率随着葡萄糖浓度的升高呈现出先上升后下降的趋势, 在 7 g/L 葡萄糖溶液

中, 大鳍鲩精子运动率达到最大值, 为 $(97.30 \pm 0.70)\%$, 此时精子快速运动时间及寿命也达到最大值, 精子活力达到最高, 精子快速运动时间和寿命分别为 (419.56 ± 25.79) s、 (727.60 ± 5.40) s。

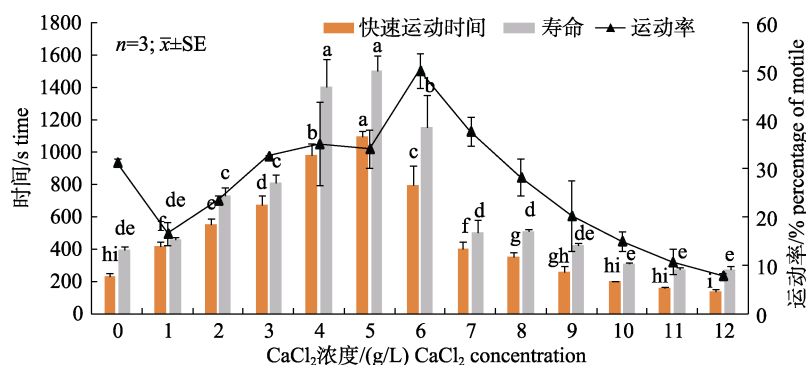
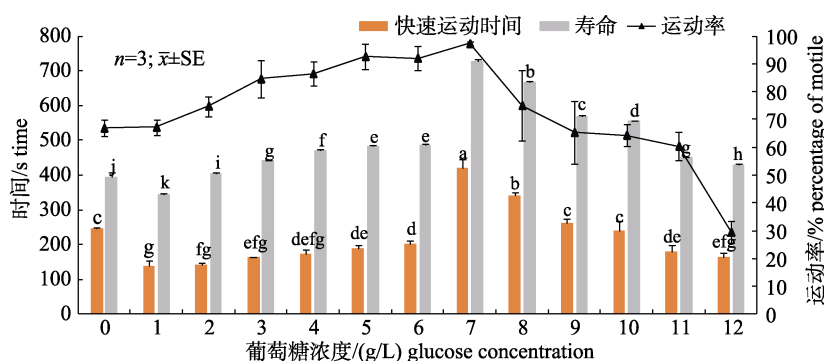
图 5 大鳍鲩精子在不同浓度 CaCl_2 溶液中的活力情况同系列数值标注字母不相同表示两者间差异显著 ($P < 0.05$).Fig. 5 Activity of *Mystus macropterus* sperm in different concentrations of CaCl_2 . Different letters for the same series indicate significant difference between the two values ($P < 0.05$).

图 6 大鳍鲩精子在不同浓度葡萄糖溶液中活力情况

同系列数值标注字母不相同表示两者间差异显著 ($P < 0.05$).Fig. 6 Activity of *Mystus macropterus* sperm in different concentrations of glucose. Different letters for the same series indicate significant difference between the two values ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 大鳍鲩精子结构

据研究,硬骨鱼类精子可分为非顶体类型和顶体类型^[19],本研究中的大鳍鲩精子为非顶体结构,这与前人关于鲇形目鱼类中的黄颡鱼(*Pseudobagrus fluvidraco*)^[20]、兰州鲇(*Silurus lanzhouensis* Chen)^[21]等的报道一致。研究表明,顶体的消失可能与硬骨鱼类卵膜表面的受精孔结构相适应^[19],大鳍鲩具有受精孔^[22],精子可直接通过受精孔进入卵子完成受精。这与乔志刚等^[23]关于鲇(*Silurus asotus*)的研究一致。据报道,精子鞭毛对精子受精能力具有决定性作用,在精子竞争强度增加的条件下,较长的精子鞭毛有利于优化能量需求^[24]。本研究发现大鳍鲩的尾部鞭毛约为 $(21.17 \pm 0.35) \mu\text{m}$,显著短于兰州鲇^[21]、鲇^[23]和

长吻鲇(*Leiocassis longirostris* Gunther)^[25]等鲇形目鱼类,这可能是大鳍鲩受精率低的重要原因。Stoss^[26]的研究表明,精子尾部侧鳍结构有利于增大精子与水的接触面,提高精子的游泳效率,从而提高受精率。本研究发现大鳍鲩精子尾部具有侧鳍结构,对于精子的运动具有促进作用,这在鲇科其他鱼类中也有发现^[20-21]。

3.2 大鳍鲩精子的运动特征

不同鱼类的精子运动具有特定的特征,对个体环境因素敏感程度也不一致^[27]。有研究表明,鱼类精子的运动速率一般介于几十至几百微米每秒^[28],如非洲鲇(*Clarias gariepinus*)^[29]精子的运动速率在 $120 \sim 140 \mu\text{m/s}$,高体雅罗鱼(*Leuciscus idus*)^[30]精子的运动速率约为 $30 \mu\text{m/s}$ 。本研究中,大鳍鲩精子的 VAP、VSL、VCL 分别为 $(14.00 \pm$

5.99)、 (11.50 ± 6.26) 、 (24.21 ± 8.68) $\mu\text{m/s}$, 低于非洲鲷^[29]和高体雅罗鱼^[30]。与一般鱼类作曲线运动时 VAP 接近 VCL 不同^[31], 本研究中, 大鳍鲩精子 VAP 和 VSL 之间较为接近, 且均低于 VCL (表 1), 在中华鲟(*Acipenser sinensis*)、史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)中也有类似现象^[32], 这种现象可能与精子的体积和形状、精子运动速度、精子运动方式等有关^[32]。

3.3 大鳍鲩精子理化特征

精子密度一般被用来评估精液质量, 它是影响受精成功的一个重要参数, 也是鱼类物种的一个重要特征^[33]。不同鱼类其精子密度存在着较大的差异, 这一差异可能与精子的大小和物种特异性有关^[34]。大鳍鲩精子的平均密度为 2.5×10^9 个/mL, 低于其他淡水鱼类如四大家鱼^[35], 也低于鲮科鱼类的瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)^[36], 与大口鲶(*Silurus meridionalis* Chen)^[37]较为接近, 较低的精子密度可能也是大鳍鲩人工繁殖时受精率较低的原因之一。

淡水鱼类的精浆通过特定的渗透压和离子环境使精子保持在静止状态, 渗透压的改变是导致精子激活的最重要的因素^[9]。研究表明, 拥有较低精浆渗透压的物种, 其精子排入水中时将消耗较少的能量去调节渗透压, 而将更多的能量用于维持寿命^[38], 本研究中大鳍鲩精子的寿命较长, 可能与精浆渗透压较低(634.16 kPa)存在一定的联系。

鱼类精浆的生化组成在种内和种间存在着广泛的差异^[35]。有研究表明硬骨鱼类 Na^+ 含量在 50~150 mmol/L 之间, K^+ 含量在 25~90 mmol/L 之间, 且在动物组织中细胞外的 K^+ 含量应该低于 Na^+ ^[6], 与本实验的结果较为一致。在本研究中 Na^+ 、 K^+ 是大鳍鲩精浆主要离子成分, 在大鳍鲩精浆中占比 90% 以上, 对于维持大鳍鲩精浆中渗透压起到主要作用。 Ca^{2+} 也是鱼类精浆的重要组成部分, 是多数鱼类精子激活所必需的, 对于精子运动的调节起着重要的作用^[33]。本研究中大鳍鲩精浆中 Ca^{2+} 含量与部分淡水鱼类如鲤科的草鱼^[39]、鲇形目的亚洲鲶^[40]等相比处于较低水平, 可能与

其物种特异性有关。对于大部分硬骨鱼类而言, 渗透压是抑制精子活力的主要因素, 在较低的渗透压环境下刺激 Ca^{2+} 通道打开, Ca^{2+} 内流, 精子被激活^[41], Ca^{2+} 在大鳍鲩精子激活中的作用还有待研究。研究表明鱼类精浆中的锌、镁、铜、铁等元素与精液质量、精子的运动与寿命之间存在一定的联系^[6], 这些元素与大鳍鲩精液的关系尚有待进一步研究。

本研究中大鳍鲩精浆中的多种水解氨基酸含量和氨基酸总量均高于前人报道的四大家鱼, 且大鳍鲩精子寿命也要长于四大家鱼^[6], 这可能是因为氨基酸能够为精子的运动供能, 从而对精子活力和寿命产生影响^[42]。本研究中氨基酸组成与四大家鱼^[6]间也有一定的相似之处: 精液中的氨基酸成分均是以赖氨酸, 天冬氨酸、谷氨酸和亮氨酸的含量较高, 蛋氨酸、组氨酸含量相对较低, 除精氨酸、蛋氨酸和亮氨酸是硬骨鱼类的必需氨基酸外, 其他氨基酸的含量及组成因物种不同而有所差异。

3.4 环境因子对精子活力的影响

在本研究中, 大鳍鲩精液 pH 为 7.0~7.2, 在 pH 7.0~9.0 的偏碱性水中精子活力较强, 快速运动较为激烈, 且存活时间较长, 说明大鳍鲩精子对于中性偏碱性水有较强的适应能力。

Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 是精浆中的主要离子成分, 对精子的激活和抑制起着非常重要的作用^[43]。据研究, 北方须鳅(*Barbatula barbatula nuda*)^[44]精子激活效果较好的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度分别为 68、80、50 mmol/L、而拟赤梢鱼(*Pseudaspius leptcephalus*)^[45]、鸭绿沙塘鳢^[18]对上述 3 种离子的需求则分别为 80、80、3 mmol/L, 68、54、27 mmol/L。本研究中大鳍鲩精子激活效果较好的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度分别为 1、5、6 g/L (即 17、67、54 mmol/L), 与上述几种鱼类有所不同, 这可能与物种特异性有关^[9]。本研究发现, KCl、 CaCl_2 溶液在一定浓度的范围内对大鳍鲩的精子活力具有一定的促进作用, 随着离子浓度的升高, 大鳍鲩精子活力逐渐受到抑制, 这一结果与赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[46]、鸭绿沙塘鳢^[18]等鱼类

精子活力的研究结果一致。且在本研究中所有的激活液都能够激活大鳍鲩精子, 这一现象在拉氏鲮(*Phoxinus lagowskii*)^[47]、鸭绿沙塘鳢^[18]中也可观察到, 这是由于鱼类精子释放到低渗透压的淡水中时, 破坏了由精浆中 Na^+ 、 K^+ 等离子维持的高渗环境, 渗透压发生改变精子被激活^[44]。本研究中 K^+ 提升大鳍鲩精子运动时间、延长寿命的作用要优于 Na^+ , 这一现象与长吻鮠^[48]、马口鱼(*Opsariichthys bidens*)^[49]的研究结果较为一致, 而胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*) 在 KCl 溶液中的快速运动时间及寿命较 NaCl 更短^[50]。以上现象说明, 不同的离子溶液对鱼类精子激活的作用效果不同, 具体的激活机制也可能存在种的差异性^[51]。

糖类物质, 如葡萄糖、半乳糖、果糖等, 在提高精子活力方面具有重要作用^[44]。本研究发现, 在一定浓度范围内, 葡萄糖可显著延长大鳍鲩精子的运动时间及寿命, 这是因为葡萄糖作为能源物质能够直接被精子利用^[52], 这一现象在其他淡水鱼类中也有报道^[44]。

参考文献:

- [1] Chereguini O, de la Banda I G, Rasines I, et al. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio[J]. Aquaculture Research, 1999, 30(5): 319-324.
- [2] Kowalski R K, Cejko B I. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors[J]. Theriogenology, 2019, 135: 94-108.
- [3] Ji X S, Chen S L, Zhao Y, et al. Review of assessing sperm quality in fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(6): 1048-1054. [季相山, 陈松林, 赵燕, 等. 鱼类精子质量评价研究进展[J]. 中国水产科学, 2007, 14(6): 1048-1054.]
- [4] Madhavi M, Kailasam M, Subburaj R, et al. Seasonal changes in the milt quality of spotted scat, *Scatophagus argus*: Implications for artificial propagation[J]. Theriogenology, 2022, 177: 42-49.
- [5] Quagio-Grassiotto I, Baicere-Silva C M, de Oliveira Santana J C, et al. Spermiogenesis and sperm ultrastructure as sources of phylogenetic characters. The example of characid fishes (Teleostei: Characiformes)[J]. Zoologischer Anzeiger, 2020, 289: 77-86.
- [6] Lu D C, Liu X T, Fang J P, et al. Element compoition in seminal plasma of principally cultured freshwater fish in China[J]. Freshwater Fisheries, 1992(2): 10-12. [鲁大椿, 刘宪亭, 方建萍, 等. 我国主要淡水养殖鱼类精浆的元素组成[J]. 淡水渔业, 1992(2): 10-12.]
- [7] Lu D C, You W Z, Fang J P, et al. Amino acid composition in seminal plasma of principally cultured freshwa fish in China[J]. Freshwater Fisheries, 1987(3): 14-16. [鲁大椿, 游文章, 方建萍, 等. 我国主要淡水养殖鱼类精浆的氨基酸成分[J]. 淡水渔业, 1987(3): 14-16.]
- [8] Alavi S M H, Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: A review[J]. Cell Biology International, 2005, 29(2): 101-110.
- [9] Alavi S M H, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review[J]. Cell Biology International, 2006, 30(1): 1-14.
- [10] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, et al. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch[J]. Journal of Fish Biology, 1995, 47(3): 492-508.
- [11] Dziewulska K, Pilarska M. Spermatozoa motility traits of chub (*Squalius cephalus* L.) under the influence of various water factors[J]. The European Zoological Journal, 2023, 90(1): 60-72.
- [12] Myers J N, Bradford A J, Hallas V S, et al. Channel catfish ovarian fluid differentially enhances blue catfish sperm performance[J]. Theriogenology, 2020, 149: 62-71.
- [13] Morita M, Okuno M, Susilo E S, et al. Changes in sperm motility in response to osmolality/ Ca^{2+} in three Indonesian fresh water teleosts: Goby (*Oxyeleotris marmorata*), Java carp (*Puntius javanicus*), and catfish (*Clarias batrachus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2006, 143(3): 361-367.
- [14] Xu Q, Liu L G, Huang W X, et al. Genetic diversity analysis of *Mystus macropterus* from Wuqiangxi Reservoir in Yuanshui River by ISSR makers[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2019, 37(2): 253-258. [许倩, 刘良国, 黄文轩, 等. 沅水五强溪水库大鳍鲩的遗传多样性分析[J]. 四川农业大学学报, 2019, 37(2): 253-258.]
- [15] Wang D S, Luo Q S. Aspects of the reproductive biology of the Bagridae catfish *Mystus macropterus* in the Jia Ling River[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(1): 50-59. [王德寿, 罗泉笙. 大鳍鲩的繁殖生物学研究[J]. 水产学报, 1992, 16(1): 50-59.]
- [16] Ma Y G, Zhu J, Chen Y K, et al. Artificial breeding and seedling cultivation of *Mystus macropterus*[J]. Chongqing Aquaculture, 2012(2): 20-22. [马跃岗, 朱杰, 陈元坤, 等. 大鳍鲩的人工繁殖与苗种培育研究[J]. 重庆水产, 2012(2): 20-22.]
- [17] Li X L, Zhu Y J, Yang D G, et al. Research progress and prospect of artificial propagation of *Mystus macropterus*[J].

- Fisheries Science & Technology Information, 2023, 50(2): 128-132. [李晓莉, 朱永久, 杨德国, 等. 大鳍鲩人工繁殖研究进展及前景展望[J]. 水产科技情报, 2023, 50(2): 128-132.]
- [18] Li W K, Luo X N, Deng H S, et al. Physiological characteristics of *Odontobutis yaluensis* sperm[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(11): 1574-1588. [李文康, 骆小年, 邓鸿圣, 等. 鸭绿沙塘鳢精子生理学特征[J]. 中国水产科学, 2022, 29(11): 1574-1588.]
- [19] Liu Y. Propagation physiology of main cultivated fish in China[M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1993: 31-32. [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 31-32.]
- [20] Long Y L, Lin D J. The ultrastructure of spermatozoon of the teleost *Pseudobagrus fulvidraco*[J]. Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 1996, 29(3): 235-245. [龙永隆, 林丹军. 黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)精子的超微结构[J]. 实验生物学报, 1996, 29(3): 235-245.]
- [21] Xing L M, Xiao W, Li L L, et al. Study of sperm cryopreservation in *Silurus lanzhouensis* and detection of cell damages after cryopreservation[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(3): 547-556. [邢露梅, 肖伟, 李兰兰, 等. 兰州鲇精液超低温冷冻保存技术研究及细胞损伤检测[J]. 水生生物学报, 2021, 45(3): 547-556.]
- [22] Xu J S. Studies on the oogenesis of *Mystus macropterus* (Bleeker)[D]. Chongqing: Southwest China Normal University, 2002: 20-21. [徐吉山. 大鳍鲩卵子发生的研究[D]. 重庆: 西南师范大学, 2002: 20-21.]
- [23] Qiao Z G, Liu S Y, Shen F F. Ultrastructure of spermatozoon and effects of pH and temperature on spermatozoon motility in oriental sheatfish *Silurus asotus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(6): 602-606. [乔志刚, 刘淑琰, 沈方方. 鲇精子超微结构及 pH、温度对其精子活力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(6): 602-606.]
- [24] Vlačić T V, Afzelius B A, Bronnikov G E. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories[J]. Biology of Reproduction, 2002, 66(1): 98-105.
- [25] Zhang Y G, Luo Q S, Zhong M C. Studies on the structure of testis and spermatozoon in *Leiocassis longirostris*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1993, 17(3): 246-251, 293-294. [张耀光, 罗泉笙, 钟明超. 长吻鮠精巢及精子结构的研究[J]. 水生生物学报, 1993, 17(3): 246-251, 293-294.]
- [26] Stoss J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology[J]. Fish Physiology, 1983, 9: 305-350.
- [27] Dziewulska K. Effect of pH, osmolality and ion concentration on spermatozoa motility and composition parameters of sperm and seminal plasma in pikeperch (*Sander lucioperca* L.)[J]. Aquaculture, 2020, 520: 735004.
- [28] Zheng X B, Du C, Wang J Q, et al. Physiological characteristics and cryopreservation effect of *Larimichthys polyactis* sperm[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(1): 193-205. [郑学斌, 杜晨, 王景倩, 等. 小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)精子的生理特性及超低温冷冻保存研究[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(1): 193-205.]
- [29] Mansour N, Lahnsteiner F, Patzner R A. The spermatozoon of the African catfish: Fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion[J]. Journal of Fish Biology, 2002, 60(3): 545-560.
- [30] Siddique M A M, Linhart O, Krejszeff S, et al. Effects of preincubation of eggs and activation medium on the percentage of eyed embryos in ide (*Leuciscus idus*), an externally fertilizing fish[J]. Theriogenology, 2016, 85(5): 849-855.
- [31] Rurangwa E, Kime D E, Ollevier F, et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish[J]. Aquaculture, 2004, 234(1-4): 1-28.
- [32] Liu L, Linhart O, Wei Q W, et al. Comparative study of activating mediums for the cryopreserved sperm of several sturgeons using CASA[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(6): 711-720. [柳凌, Otomar Linhart, 危起伟, 等. 计算机辅助对几种鲟鱼冻精激活液的比较[J]. 水产学报, 2007, 31(6): 711-720.]
- [33] Bozkurt Y, Ögretmen F, Kökcü Ö, et al. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: With emphasis on sperm motility[J]. Czech Journal of Animal Science, 2011, 56(8): 355-364.
- [34] Charak S R, Chaudhary D K, Agarwal N K. A study on the physical and biochemical characteristics of semen of *Tor putitora*- an endangered fish species in Himalayan water[J]. Indian Journal of Animal Research, 2020, 55(7): 744-750.
- [35] Lu D C, Fu C J, Liu X T, et al. Biological characteristics of semen of main freshwater fishes in China[J]. Freshwater Fisheries, 1989, 19(2): 34-37. [鲁大椿, 傅朝君, 刘宪亭, 等. 我国主要淡水养殖鱼类精液的生物学特性[J]. 淡水渔业, 1989, 19(2): 34-37.]
- [36] Wang Y Y, Zhang G S, Li L, et al. On physiological characteristics and cryopreservation of spermatozoa in *Pelteobagrus vachelli*[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(1): 29-34. [汪亚媛, 张国松, 李丽, 等. 瓦氏黄颡鱼精子的生理特性及其超低温冷冻保存的初步研究[J]. 海洋渔业, 2014, 36(1): 29-34.]
- [37] Luo X Z, Zou G W, Pan G B. Study on the physiologic property of the sperm of *Silurus meridionalis*[J]. Freshwater Fisheries, 2002, 32(2): 51-53. [罗相忠, 邹桂伟, 潘光碧.

- 大口鲶精子生理特性的研究[J]. 淡水渔业, 2002, 32(2): 51-53.]
- [38] Huang X R, Zhang T, Feng G P, et al. Main biological characteristics of sperm in *Acipenser gueldenstaedti* under artificial cultivation[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(4): 357-363. [黄晓荣, 张涛, 冯广朋, 等. 人工养殖条件下俄罗斯鲟精子主要生物学特性[J]. 海洋渔业, 2015, 37(4): 357-363.]
- [39] Bozkurt Y, Ögretmen F, Erçin U, et al. Seminal plasma composition and its relationship with physical spermatological parameters of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) semen: With emphasis on sperm motility[J]. Aquaculture Research, 2008, 39(15): 1666-1672.
- [40] Tan-Fermin J D, Miura T, Adachi S, et al. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther)[J]. Aquaculture, 1999, 171(3-4): 323-338.
- [41] Alavi S M H, Cosson J, Bondarenko O, et al. Sperm motility in fishes: (III) diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme[J]. Theriogenology, 2019, 136: 143-165.
- [42] Cheng L, Xu G F, Huang T Q, et al. Effect of free amino acids on sperm motility of Brown trout (*Salmo trutta*) and Golden trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2019, 50(10): 47-53, 62. [程琳, 徐革锋, 黄天晴, 等. 游离氨基酸对褐鳟和金鳟精子活力的影响[J]. 东北农业大学学报, 2019, 50(10): 47-53, 62.]
- [43] Figueroa E, Valdebenito I, Farias J G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa [J]. Aquaculture Research, 2016, 47(6): 1691-1705.
- [44] Han F, Luo X N, Duan Y J, et al. Influence of levels of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and glucose, pH and temperature on sperm vitality of loach *Barbatula barbatula nuda*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2021, 36(3): 462-469. [韩峰, 骆小年, 段友健, 等. Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、葡萄糖、pH、温度对北方须鳅精子活力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(3): 462-469.]
- [45] Wang Y, Yang J, Geng L W, et al. Effects of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , glucose and glycerol concentrations on sperm motility of flathead asp *Pseudaspius leptocephalus*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2022, 35(4): 53-59. [王雨, 杨建, 耿龙武, 等. Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、葡萄糖和甘油浓度对拟赤梢鱼精子活力的影响[J]. 水产学杂志, 2022, 35(4): 53-59.]
- [46] Zhu Y T, Zhang M Q, Wu Y X, et al. Ultrastructure of spermatozoa and effects of environmental factors on spermatozoa motility of grouper *Epinephelus akaara*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2022, 53(6): 1523-1530. [朱雅婷, 张明清, 吴好莘, 等. 赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)精子超微结构及环境因子对精子活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2022, 53(6): 1523-1530.]
- [47] Wu C, Luo X N, Duan Y J, et al. Effects of different metal concentrations, temperature and pH on sperm motility of fat minnow *Phoxinus lagowskii*[J]. Fisheries Science, 2022, 41(2): 210-217. [吴晨, 骆小年, 段友健, 等. 不同离子浓度、温度、pH 对拉氏鲮精子活力的影响[J]. 水产科学, 2022, 41(2): 210-217.]
- [48] Wang C H. Effect of different osmotic pressure on sperm motility of *Leiocassis longirostris*[J]. Science & Technology Information, 2011(1): 433, 448. [王春花. 不同渗透压对长吻鮠精子活力的影响[J]. 科技信息, 2011(1): 433, 448.]
- [49] Zheng X B, Zhang Q K, Zhu Y M, et al. Effects of several environmental factors on the motility of sperm in *Opsariichthys bidens*[J]. Journal of Biology, 2018, 35(6): 74-78. [郑学斌, 张清科, 朱咏梅, 等. 几种环境因子对马口鱼精子活力的影响[J]. 生物学杂志, 2018, 35(6): 74-78.]
- [50] Li F, Wan Q. Study on the effects of environmental factors on sperm motility of *Myxocyprinus asiaticus* (Bleeker)[J]. Freshwater Fisheries, 2009, 39(4): 22-28. [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.]
- [51] Wang X Y, Xu S H, Liu Q H, et al. Effects of osmolality, pH, glucose, and ion solutions on sperm motility of the summer flounder *Paralichthys dentatus*[J]. Marine Sciences, 2016, 40(3): 40-46. [王学颖, 徐世宏, 刘清华, 等. 渗透压、pH、葡萄糖及离子溶液对夏牙鲆精子激活及运动特征的影响[J]. 海洋科学, 2016, 40(3): 40-46.]
- [52] Gardiner D M. Utilization of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1978, 59(2): 165-168.

Biological characteristics of the spermatozoa of *Mystus macropterus* and the effect of several environmental factors on their motility

CHEN Siqi^{1,2}, ZHU Yongjiu², WU Xingbing², YANG Deguo², LIU Yingbao¹, LI Xiaoli²

1. Collage of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434020, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: *Mystus macropterus* has delicious taste, rich nutrients and fast growth rate. It is a high-quality breed requiring further development. To investigate the biological characteristics of *M. macropterus* sperm and its adaptability to the external environment, the pH, osmotic pressure, sperm density, and sperm motility parameters of semen were determined, and the structure of the sperm was observed. The effects of environmental factors, such as pH, glucose, and ions (including NaCl, KCl, and CaCl₂), on sperm motility were also investigated. Based on the experimental data, the sperm of *M. macropterus* possessed a head, neck, and tail, and lacked acrosomes and had lateral fins. The mean sperm density of *M. macropterus* was 2.50×10^9 , the pH of semen was stable between 7.0 and 7.2, and the osmotic pressure was stable at (634.16 ± 6.66) kPa. Na⁺ content was the highest in the seminal plasma, followed by K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, and Zn²⁺ and no Cu²⁺ was detected. The total amount of hydrolyzed amino acids in seminal plasma was approximately 169239.21 μmol/L. The largest proportion was composed of leucine, whereas the methionine content was relatively low. When sperm was activated by deionized water, the percentage of motile sperm, fast movement time, and life time were $(48.61 \pm 14.85)\%$, (34.00 ± 4.00) s, and (396.50 ± 9.50) s, respectively. The straight line velocity, curvilinear velocity, and average path velocity were (11.50 ± 6.26) , (24.21 ± 8.68) , and (14.00 ± 5.99) μm/s, respectively. Sperm activity was most powerful in a slightly alkaline water environment with a pH of 7.0 to 9.0, with the optimal pH being 8.0. Simultaneously, when the concentrations of NaCl, KCl, and CaCl₂ were 1, 5, and 6 g/L, respectively, the percentage of motile sperm reached a maximum. Sperm motility was the greatest when glucose levels were maintained at 7 g/L. In conclusion, the sperm of *M. macropterus* had the best living environment in a pH range of 7.0 to 9.0. At the same time, appropriate concentrations of NaCl, KCl, CaCl₂, and glucose could also effectively improve the sperm motility of *M. macropterus*. In this study, we discuss the biological characteristics of spermatozoa and changes in their motility under the influence of different environmental factors. However, further research is required to establish a more effective breeding strategy and improve the artificial breeding efficiency of *M. macropterus*.

Key words: *Mystus macropterus*; sperm structure; sperm motility; CASA; seminal plasma composition

Corresponding author: LI Xiaoli. E-mail: lxl@yfi.ac.cn