

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.0523

不同盐度激活液、 K^+ 浓度及保存时间对日本鳗鲡精子活力的影响

张涛^{1,2}, 柳凌¹, 郭峰¹, 张洁明¹

1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 中国水产科学研究院 淡水生态与健康养殖重点开放实验室,
湖北 荆州 434000

摘要: 在 6 种不同盐度(34、32、30、28、26 和 22)激活液、3 种不同 K^+ 浓度(25 mmol/L、30 mmol/L 和 35 mmol/L) 稀释液和不同保存时间(0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h)条件下, 对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)精子的活力进行观察和测定。结果表明, 激活液盐度为 30 时精子活率和运动精子百分比均最高, 对应平均曲线运动速度(VCL)、平均直线运动速度(VSL)和平均路径速度均最高, 由此推测自然界中日本鳗鲡产卵环境的盐度在 30 左右; 稀释液中 K^+ 浓度为 30 mmol/L 时精子活率和运动精子百分比均最高, 对应平均曲线运动速度(VCL)、平均直线运动速度(VSL)和平均路径速度(VAP)均显著高于 25 mmol/L 和 35 mmol/L ($P < 0.05$), 据此推算出精子稀释液的最佳渗透压为 796.68 kPa; 随低温保存时间的延长, 精子活率逐渐降低, 稀释液中 K^+ 浓度为 30 mmol/L 时保存时间可达到 96 h, 并且精子活率与 K^+ 浓度为 25 mmol/L、35 mmol/L 时相比较, 显著升高 ($P < 0.05$)。

关键词: 日本鳗鲡; 精子活力; 盐度; 钾离子浓度; 保存时间

中图分类号: Q959.499

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0523-08

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)是一种在淡水里生长、每年秋冬季节由江河降海洄游产卵的鱼类^[1]。人工条件下获得发育变态的柳叶鳗苗一直是一道世界难题, 日本的 Tanaka 等^[2]通过人工授精等一系列手段成功获得了发育变态的柳叶鳗, 目前国内尚未见在人工条件下获得发育变态柳叶鳗的报道。受精率是影响日本鳗鲡人工繁殖成功的关键因素之一。作者在开展日本鳗鲡人工育苗过程中发现, 雌雄亲鳗发情时机难以掌控, 从而影响了受精效果。

对雄鳗精液低温保存或者超低温冷冻保存后再进行人工授精, 是解决雌雄亲鳗发情不同步的有效手段之一^[3], 而精子稀释液和冻精激活液筛选是低温保存或超低温冷冻保存中一个重要的环

节^[4-5]。对于精子而言, 温度、pH、渗透压、各种离子浓度都能影响其活力^[6], 研究各种因子对精子活力的影响不仅有助于精子激活液的筛选和精子稀释液的配制, 而且有利于丰富精子生物学的相关内容^[7-8]。鉴于此, 作者借助鱼类精子彩色图文分析系统^[9]开展了不同盐度激活液、不同 K^+ 浓度稀释液及保存时间对日本鳗鲡精子活力影响的研究。

1 材料与方法

1.1 精液采集

实验所用的亲鳗取自广东省江门市, 全部为野生鳗鲡, 收集好亲鳗后运回长江水产研究所养殖实验室, 所有亲鳗均在直径 1 m 的圆柱形玻璃

收稿日期: 2010-07-17; 修订日期: 2010-09-06.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2008JBYWF-09); 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题(2010FEA03003).

作者简介: 张涛(1980-), 男, 助理研究员, 从事鱼类生殖生理及发育生物学研究. E-mail: zhangtao@yfi.ac.cn

通信作者: 柳凌(1959-), 男, 研究员. E-mail: liul@yfi.ac.cn

缸中养殖, 水体为天然海水。暂养 1 周后开始注射外源激素促使性腺发育直至性成熟, 催熟、催产方法参照柳凌等^[10]的方法进行。待雄鳎性成熟后选择健康亲鳎 10 尾(体质量 0.25~0.4 kg, 体长 41~53 cm), 用干毛巾擦干生殖孔周围, 挤压腹部, 收集无粪便污物的干净精液于 1.5 mL 离心管中, 立即放到 4℃ 冰箱中冷藏保存, 备用。

1.2 不同盐度激活液的配制

参照朱树屏 B 人工海水配方^[11]配制出盐度为 34 的人工海水, 过滤, 以此海水为母液, 通过加蒸馏水稀释至盐度分别为 32、30、28、26 和 22, 向 6 种不同盐度的海水中添加小牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司)和青-链霉素(吉诺生物医药公司), 使 BSA 和青-链霉素的终浓度分别为 0.025%、100 IU, 放置在 4℃ 冰箱中, 备用。

1.3 不同 K^+ 浓度精子稀释液的配制

以 Ohta 等^[12]的日本鳎精子稀释液配方为基础, 调制了 K^+ 浓度为 25 mmol/L、30 mmol/L 和 35 mmol/L, 其他离子浓度不变(即 NaCl: 134.5 mmol/L, $NaHCO_3$: 20 mmol/L, $CaCl_2$: 1.3 mmol/L, $MgCl_2$: 1.6 mmol/L)的 3 种精子稀释液, 分别用 K25、K30、K35 表示。

1.4 精子活力观察及测定

取鲜精 2 μ L 加入装有 400 μ L 精子稀释液的 1.5 mL 离心管中, 充分摇匀, 放置到 4℃ 冰箱中保存, 备用。

在载玻片上加入 25 μ L 激活液, 然后加入 2.5 μ L 稀释后的精液, 将两者迅速充分混匀, 立即在 10×10 倍显微镜(Leica DM 2500 德国)下镜检, 同时录像(JVC TK-U890EG, 日本), 检测最终稀释比 1:2000。精子活力观察和测定按照如下内容和顺序进行。

1.4.1 不同 K^+ 浓度稀释液及保存时间对精子活力的影响 将新鲜的精液与稀释液充分混匀, 于 4℃

冰箱冷藏保存后的 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 镜检并录像, 所有镜检采用的激活液盐度均为 28, 自 0 s 开始连续录像, 每间隔 30 s 进行 1 次序列图像采集, 录像时间依画面上观察到 95% 的精子停止运动为准, 每个测定重复 3 次。

1.4.2 不同盐度激活液对精子活力的影响 稀释鲜精的稀释液除 K^+ 外统一按照 Ohta^[12]的配方, 使 K^+ 浓度为 30 mmol/L, 分别用盐度为 34、32、30、28、26 和 22 的 6 种激活液激活精子, 立即镜检并自精子激活后 0 s 开始连续录像, 每间隔 60 s 进行 1 次序列图像采集, 录像时间依画面上观察到 95% 的精子停止运动为准, 每个测定重复 3 次。

精子激活后的录像采用鱼类彩色精子图文分析系统(FSQAS - 2000, 中国水产科学研究院长江水产研究所和武汉千屏影像技术有限公司联合研制)进行分析。每个序列图像为 3 s, 72 帧。系统检测参数设置为: 最小步距 25 像素; 当前阈值为 180; A 级精子最小直线速度 10 μ m/s; B 级精子最小直线速度 3 μ m/s; C 级精子最小直线速度 1 μ m/s。然后对每个序列图像分别进行检测和报告输出。

1.5 数据分析

数据采用 SPSS13.0 进行分析。结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。两组平均数间的比较用 Paired-sample *t* 检验, 多重比较采用 One-way ANOVA。 $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 不同 K^+ 浓度对精子活力的影响

从图 1 看出, K^+ 浓度分别为 25 mmol/L、30 mmol/L 和 35 mmol/L 的精子稀释液处理后的精子, 其激活后的运动时间即精子的寿命均在 300 s 以上。在精子激活后的各时间段, K^+ 浓度为 30 mmol/L 稀释液中的精子平均活率(活动精子的平均百分率)最高, K^+ 浓度为 35 mmol/L 时精子平均活率最低。随着激活后时间的延长, 3 个 K^+ 浓度水平(25 mmol/L、30 mmol/L 和 35 mmol/L)下, 精子平均活率出现不同程度的降低, 其中 K^+ 浓度为 35 mmol/L 时精子平均活率在 60 s 以后出现急剧下降。

表 1 表明, K^+ 浓度为 30 mmol/L 时呈快速直线运动精子的活率最高, 与 K^+ 浓度为 25 mmol/L 比较存在显著性差异($P < 0.05$), 而与 K^+ 浓度为 35 mmol/L 比较存在极显著差异($P < 0.01$)。对于平均曲线运动速度(精子在其实际运动轨迹上的速度^[9], VCL)、平均直线运动速度(精子开始运动的位

置与最后所处位置间的直线距离/所花的相应时间^[9], VSL)以及平均路径运动速度(精子沿其空间实际运动轨迹所做的平滑曲线的距离/所花的相应时间^[9], VAP)而言, K⁺浓度为 30 mmol/L 均最高, 与 K⁺浓度为 25 mmol/L 比较均存在显著性差异 ($P<0.05$), 而与 K⁺浓度为 35 mmol/L 比较均存在极显著差异($P<0.01$); 当 K⁺浓度为 25 mmol/L 时精子运动的直线性(精子运动曲线的直线分离^[13], LIN)和平均运动的摆动性(精子头沿其实际运动轨迹的空间平均路径摆动的尺度^[13], WOB)最高, 与 K⁺浓度分别为 30 mmol/L 和 35 mmol/L 比较存

在显著性差异($P<0.05$), 至于平均运动的向前性(精子运动平均路径的直线分离度^[13], STR), 各 K⁺浓度组间没有显著差异($P>0.05$)。

从图 2 可以看出, 在精子激活后的各时间段, 随着激活后时间的延长, K⁺浓度的 3 个水平(25 mmol/L、30 mmol/L 和 35 mmol/L)对应的运动精子百分比, 即(A+B)级精子的百分比逐渐减小, K⁺浓度为 30 mmol/L 时运动精子的百分比最高, K⁺浓度为 35 mmol/L 时运动精子的百分比最低, 其中 K⁺浓度为 35 mmol/L 时运动精子百分比在 30 s 以后出现急剧下降。

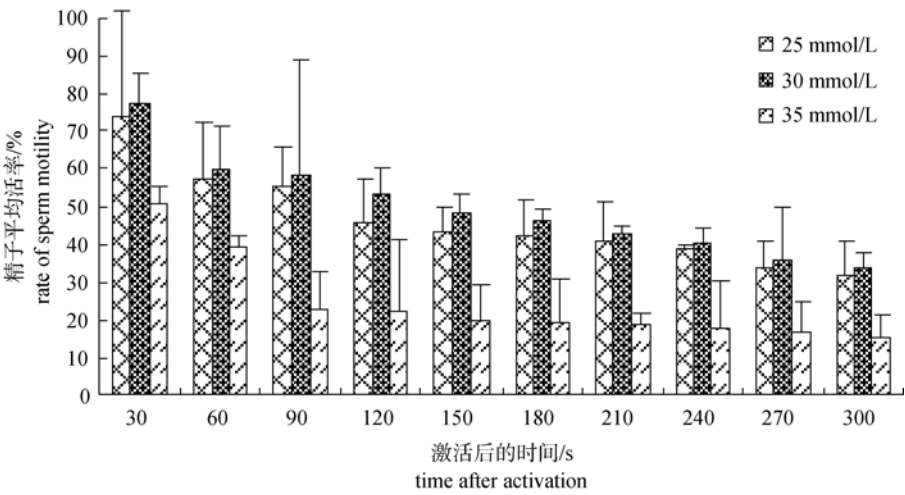


图 1 不同 K⁺浓度稀释液中日本鳗鲡精子平均活率的变化
Fig. 1 Variation of Japanese eel sperm motility rates in diluent with different potassium ion concentration

表 1 精子激活后第 60 s 不同 K⁺浓度稀释液对日本鳗鲡精子活力参数的影响
Tab. 1 Motility of Japanese eel sperm after stimulated by activation medium with different potassium ion concentration at the 60th second

参数 parameter	K ⁺ 浓度/(mmol·L ⁻¹) potassium ion concentration		
	25	30	35
密度 (×10 ⁹ ·mL ⁻¹) concentration	82.58±5.06	84.73±32.40	87.06±33.68
呈快速直线运动精子活率/% fast linear moving sperm motility	25.82±11.50 ^b	37.11±26.89 ^a	3.58±3.20 ^c
平均曲线运动速度/(μm·s ⁻¹) curvilinear velocity(VCL)	36.47±11.68 ^b	46.90±12.71 ^a	13.64±7.69 ^c
平均直线运动速度/(μm·s ⁻¹) straight line velocity(VSL)	12.20±4.15 ^b	23.9±5.26 ^a	5.43±4.28 ^c
平均路径运动速度/(μm·s ⁻¹) angular path velocity(VAP)	19.68±6.03 ^b	30.3±6.88 ^a	8.44±4.80 ^c
精子运动的直线性/% linearity(LIN)	50.92±5.02 ^a	43.44±3.42 ^b	41.81±11.81 ^b
平均运动的摆动性/% wobble of motion(WOB)	69.94±3.57 ^a	59.24±2.75 ^b	57.94±10.76 ^b
平均运动的向前性/% straightness(STR)	78.78±3.79	80.55±2.46	84.41±3.92

注: 表中同一行内, 相邻上角标字母间的比较表示具有显著差异($P<0.05$), 间隔字母间的比较具有极显著差异($P<0.01$).
Note: Adjacent letters in the same line show significant difference($P<0.05$), and the nonadjacent letters show highly significant difference($P<0.01$).

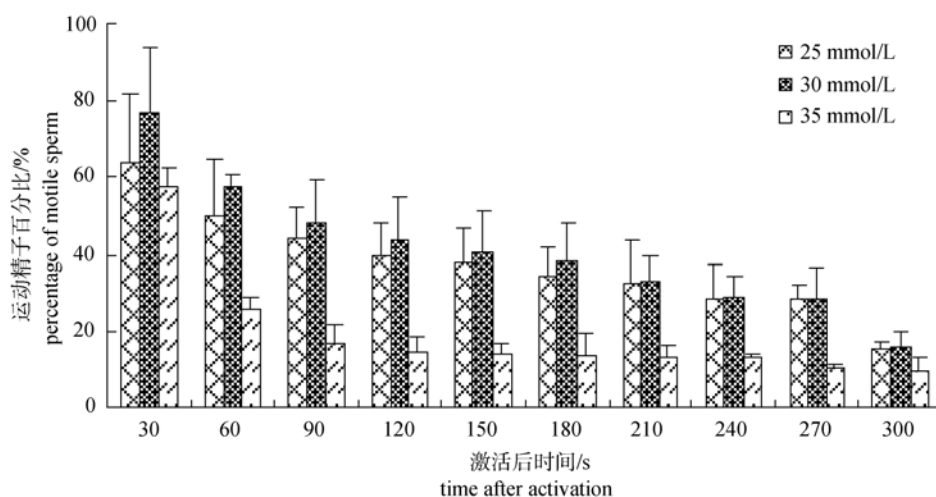


图 2 不同 K^+ 浓度稀释液中日本鳗鲡运动精子(A+B)百分比的变化

Fig. 2 Percentage of motile Japanese eel sperms in diluent with different potassium ion concentration

2.2 不同保存时间对精子活力的影响

不同保存时间(0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h)的精子被激活后,精子平均活率均随激活时间的延长逐渐降低。以精子激活后 60 s 为例(图 3),在 K^+ 浓度为 25 mmol/L、30 mmol/L 和 35 mmol/L 的稀释液中,精子平均活率均随保存时间的延长而出现不同程度的降低,稀释液中 K^+ 浓度为 25 mmol/L 和 30 mmol/L 时,对应精子的平均活率均在 48 h 以后出现急剧下降。稀释液中 K^+ 浓度为 35 mmol/L 时精子最长可保存 48 h; 而 K^+ 浓度分别为 25 mmol/L、30 mmol/L 时精子最长保存时间可达到 96 h。

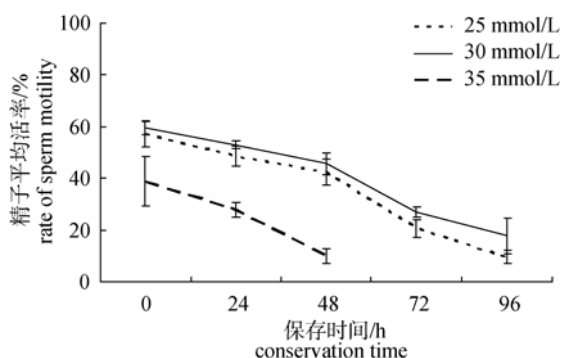


图 3 不同保存时间的精子在激活后第 60 s 的平均活率的变化

Fig. 3 Motility rate of Japanese eel sperm at the 60th second after activation under different conservation time

2.3 不同盐度激活液对精子活力的影响

图 4 表明,被不同盐度(34、32、30、28、26 和 22)的激活液激活后,精子运动时间都在 510 s 以上,激活后的各个时间段盐度为 30 时精子平均活率最高,盐度 28 次之,盐度为 22 时精子平均活率最低。随着精子激活时间的延长,不同盐度激活液中的精子平均活率均出现不同程度的降低,其中盐度为 22 对应的精子平均活率在 30 s 后出现大幅度降低。

从图 5 可以看出,精子激活后的各时间段,6 个盐度水平(34、32、30、28、26 和 22)下运动精子百分比随盐度降低逐渐减小,盐度为 30 时运动精子的百分比最高,盐度 28 次之,盐度为 22 时运动精子的百分比最低。随着激活后时间的延长,6 个盐度水平下的运动精子百分比均出现不同程度的降低,其中盐度为 22 时运动精子百分比在 30 s 以后出现急剧下降。

从表 2 可以看出:

平均曲线运动速度(VCL): 盐度分别为 34、32、30 和 28 的 4 个水平之间两两比较没有显著性差异($P>0.05$),但它们与盐度 26 比较均存在显著性差异($P<0.05$),而与盐度 22 比较均存在极显著差异($P<0.01$)。

平均直线运动速度(VSL): 盐度分别为 34、32、30 和 28 这 4 个水平之间两两比较没有显著

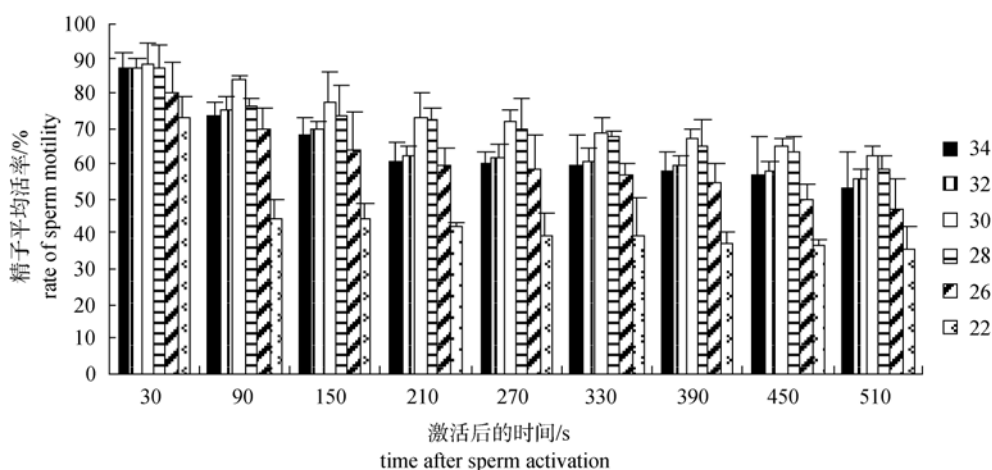


图4 不同盐度激活液激活后日本鳗鲡精子平均活率的变化

Fig. 4 Motility rate of Japanese eel sperm after activated with medium of different salinity

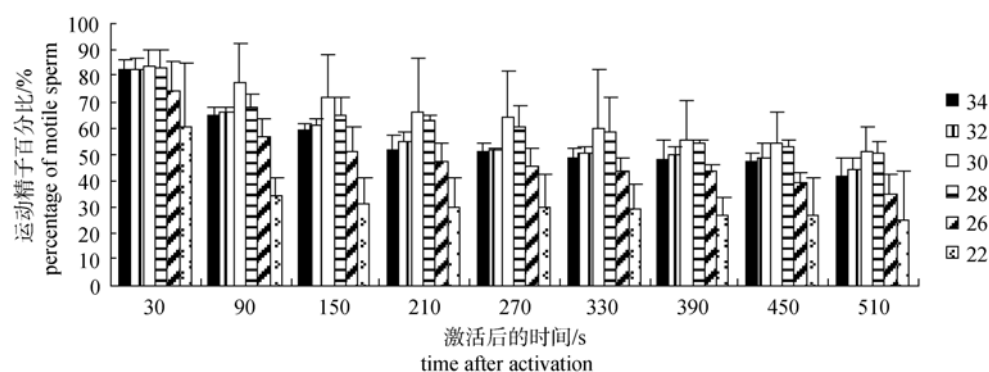


图5 不同盐度激活液激活后日本鳗鲡运动精子(A+B)百分比的变化

Fig. 5 Percentage variation of motile Japanese eel sperm activated with medium of different salinity

性差异($P>0.05$), 但与盐度 26 和 22 比较存在显著性差异($P<0.05$)。

平均路径运动速度(VAP): 盐度分别为 34、32、30 和 28 这 4 个水平之间两两比较没有显著性差异($P>0.05$), 但与盐度 26 和 22 比较存在显著性差异($P<0.05$), 盐度 26 和 22 比较没有显著性差异($P>0.05$)。

呈快速直线运动精子活率: 盐度分别为 34、32、30 和 28 这 4 个水平之间两两比较没有显著性差异($P>0.05$), 但与盐度 26 比较均存在显著性差异($P<0.05$), 而与盐度 22 比较均存在极显著差异($P<0.01$)。

精子运动的直线性(LIN): 盐度的 6 个水平(34、30、28、26 和 22)之间两两比较没有显著性差异($P>0.05$)。

平均运动的摆动性(WOB): 盐度分别为 22、30、32 和 34 这 4 个水平之间两两比较没有显著性差异($P>0.05$), 但与盐度 26 和 28 比较存在显著性差异($P<0.05$), 盐度 26 和 28 比较没有显著性差异($P>0.05$)。

平均运动前向性(STR): 盐度分别为 34、32、30、28 和 26 这 5 个水平之间两两比较没有显著性差异($P>0.05$), 但与盐度 22 比较存在显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 激活液盐度对精子活力的影响

鱼类的精子在精巢中是不运动的, 但具有很强的运动潜能^[14], 由于精巢中具有诸多抑制精子活动的因素, 精子的运动被抑制^[6]。当精子排出体

表 2 精子激活后第 90 s 不同盐度激活液对日本鳗鲡精子活力参数的影响
Tab. 2 Motility of Japanese eel sperm after stimulated by activating medium with different potassium ion concentration at the 60 second

参数 parameter	盐度 salinity					
	34	32	30	28	26	22
密度/($\times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$) concentration	185.17 $\pm$ 48.48	183.62 $\pm$ 52.23	189.8 $\pm$ 69.06	180.97 $\pm$ 11.40	185.68 $\pm$ 18.08	182.67 $\pm$ 13.19
呈快速直线运动精子活率/% fast linear moving sperm motility	47.11 $\pm$ 5.36 ^a	48.03 $\pm$ 8.31 ^a	50.55 $\pm$ 8.89 ^a	42.12 $\pm$ 2.14 ^a	29.23 $\pm$ 10.65 ^b	10.31 $\pm$ 8.80 ^c
平均曲线运动速度/($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) curvilinear velocity(VCL)	49.06 $\pm$ 8.02 ^a	49.86 $\pm$ 7.57 ^a	66.33 $\pm$ 5.1 ^a	40.11 $\pm$ 5.88 ^a	33.54 $\pm$ 9.06 ^b	19.37 $\pm$ 8.6 ^c
平均直线运动速度/($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) straight line velocity(VSL)	23.86 $\pm$ 3.73 ^a	25.24 $\pm$ 5.36 ^a	32.33 $\pm$ 7.45 ^a	19.57 $\pm$ 1.35 ^a	12.61 $\pm$ 6.57 ^b	10.24 $\pm$ 4.60 ^b
平均路径运动速度/($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) angular path velocity(VAP)	32.45 $\pm$ 6.36 ^a	34.26 $\pm$ 5.39 ^a	45.14 $\pm$ 9.02 ^a	25.50 $\pm$ 3.34 ^a	21.52 $\pm$ 8.38 ^b	12.30 $\pm$ 5.45 ^b
精子运动的直线性/% linearity(LIN)	48.99 $\pm$ 3.56	49.37 $\pm$ 8.52	48.55 $\pm$ 8.76	49.25 $\pm$ 4.77	48.51 $\pm$ 5.67	52.79 $\pm$ 0.30
平均运动的摆动性/% wobble of motion(WOB)	65.96 $\pm$ 3.61 ^a	66.03 $\pm$ 2.59 ^a	67.74 $\pm$ 9.28 ^a	63.71 $\pm$ 2.06 ^b	62.93 $\pm$ 6.99 ^b	63.56 $\pm$ 0.28 ^a
平均运动的向前性/% straightness(STR)	74.28 $\pm$ 3.24 ^a	74.33 $\pm$ 5.36 ^a	71.43 $\pm$ 4.71 ^a	77.23 $\pm$ 5.67 ^a	77.06 $\pm$ 0.57 ^a	83.05 $\pm$ 0.53 ^b

注: 表中同一行内, 相邻上角标字母间的比较表示具有显著差异($P<0.05$), 间隔字母间的比较具有极显著差异($P<0.01$).
Note: Adjacent letters in the same line show significant difference($P<0.05$), and the nonadjacent letters show highly significant difference($P<0.01$).

外, 在适当的条件下, 精子便开始运动, 这一过程称之为激活^[15]。本研究中激活液盐度无论是较低的 22 还是较高的 34, 均能激活日本鳗鲡的精子。谢刚等^[16]在研究盐度对鳗鲡精子活动和寿命影响时发现, 当盐度从 10 到 40 变化时, 均有精子运动, 这与本研究结果是一致的。日本鳗鲡的精子具有较广的适盐性, 可能与其作为降海洄游性鱼类有关。谢刚等^[16]认为, 在盐度 20~35 范围内, 鳗鲡精子可产生较强活力。本研究借助计算机精子质量分析软件发现, 盐度分别在 28、30、32、34 时, 精子活率和运动精子百分比均比在盐度 26 高, 此外, 在呈快速直线运动精子活率、平均曲线运动速度(VCL)、平均直线运动速度(VSL)、平均路径运动速度(VAP)等指标上, 盐度 28、30、32、34 与盐度 26 相比均具有显著性差异($P<0.05$), 由此认为, 当盐度范围在 28~34 时, 日本鳗鲡精子具有较强活力, 当盐度为 30 时精子活力最强。日本鳗鲡精子具有较强活力对应的盐度范围可能与其繁殖适应的盐度有关, 对其他鱼类的研究也证明了这一观点。斜带石斑鱼精子保持活力所需的最适盐度范围在 27~35, 与产卵期间的海水盐度(28~34.8)相一致^[17]; 鞍带石斑鱼精子所需的适宜

盐度范围为 27.5~35.0, 与产卵期间的海水盐度 30 相一致^[18]; 江世贵等^[19]在研究 4 种鲷科鱼类精子激活条件与其生态习性的关系时也观察到类似的现象。由此推测自然界中日本鳗鲡的产卵盐度在 30 左右。

3.2 K⁺浓度及保存时间对精子活力的影响

K⁺是精浆的重要组成部分之一, 也是形成精浆渗透压的主要离子之一。鲁大椿等^[20]在研究淡水鱼类精浆元素组成时发现, 多种鱼类精浆中含有浓度较高的 Na⁺、K⁺, 它们是造成鱼类精巢内环境高渗透压的主要离子。Baynes 等^[21]发现抑制鲑科鱼类精子活化的雄配素就是 K⁺, 而且 1 mmol/L KCl 就能阻止虹鳟精子的激活。Morisawa 等^[22]发现鲑科鱼类抑制精子活动的主要因素不是高渗透压, 而是浓度高出血浆中多倍的 K⁺, 当精液排入淡水使 K⁺浓度降低, 精子便被激活^[15]。邓岳松等^[23]在研究渗透压和 pH 对日本鳗鲡精子活力影响时发现, 影响日本鳗鲡精子活力的主要因素是渗透压, 并且精浆渗透压和血浆渗透压比较接近。影响日本鳗鲡和鲑科鱼类精子活力的不同主要因素是否与精浆、血浆中 K⁺浓度高低有关尚需考证, 日本鳗鲡精浆中 K⁺浓度水平和血浆中 K⁺

浓度水平比较有待进一步研究。

本研究稀释液中 K^+ 浓度为 30 mmol/L 时精子的活力、运动精子百分比均高于 25 mmol/L、35 mmol/L, 同时从 3 个不同层面反映精子运动速度的活力参数来看, K^+ 浓度为 30 mmol/L 下的活力参数均显著高于 K^+ 浓度 25 mmol/L 和 35 mmol/L 下, 而且以 35 mmol/L 最低。通过溶液渗透压计算公式, 计算出 K^+ 浓度分别为 25 mmol/L、30 mmol/L 和 35 mmol/L 时的 3 种稀释液渗透压分别为 786.13 kPa、796.68 kPa 和 807.19 kPa。据邓岳松等^[23]的研究, 日本鳗鲡精浆的渗透压为 766.1 kPa, 稀释液的渗透压宜在 766.1 kPa 左右, 激活液的渗透压宜在 2 298.2 kPa 左右。本研究与邓岳松的研究结果基本吻合。分析认为, 本研究中之所以随着 K^+ 浓度的增大, 精子活力呈现先升高后降低的趋势, 主要原因可能是 K^+ 浓度为 30 mmol/L 时对应渗透压即日本鳗鲡精子稀释液的最适渗透压, 而低于或者超过此渗透压精子活力开始降低。

精子的运动是一个耗能的过程, 不同 K^+ 浓度水平的 3 种稀释液中, 精子活力随保存时间的延长出现不同程度的下降, 可能是由于不同 K^+ 浓度水平的 3 种稀释液中精子的耗能速度不一样所致, 稀释液中 K^+ 浓度为 35 mmol/L 时精子活力水平在 24 h 时开始出现拐点, 而 K^+ 浓度为 25 mmol/L 和 30 mmol/L 时, 精子活力在 48 h 后才开始出现急剧下降, 说明 K^+ 浓度为 35 mmol/L 的稀释液中精子运动强度最大, 耗能最快, 反之, 30 mmol/L 运动强度最小, 耗能最慢。

参考文献:

- [1] Schmidt J. The breeding place of the eel [J]. *Philosoph Trans Roy Soc B*, 1922, 211: 178–208.
- [2] Tanaka H, Kagawa H, Ohta H. Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity [J]. *Aquaculture*, 2001, 201: 51–60.
- [3] 陈大元. 受精生物学 - 受精机制与生殖工程[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 14–42.
- [4] 陈东华, 周忠良, 范丽君, 等. 保存液及保存条件对中华绒螯蟹精子存活率的影响[J]. *华东师范大学学报*, 2007(4): 86–94.
- [5] 万全, 沈保平, 孙文贤, 等. 长吻鮠精子保存液在人工授精中的应用试验[J]. *水产养殖*, 2006, 27(3): 4–6.
- [6] 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[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(6): 849–854.
- [7] 严安生, 李诗模, 王其和. 鲤、团头鲂精子生理生态特性的研究 III. 单糖和渗透压对精子活力的影响[J]. *淡水渔业*, 1995(2): 3–5.
- [8] 赵振山, 曹克驹. 乌鳢精子生理生态特性研究 II. 钠、钾及渗透压对精子活力的影响[J]. *水利渔业*, 1995(3): 13–15.
- [9] 柳凌, Otomar Linhart, 危起伟, 等. 计算机辅助几种鲟鱼冻精激活液比较[J]. *水产学报*, 2007, 31(6): 711–720.
- [10] 柳凌, 郭峰, 张洁明, 等. 日本鳗鲡排卵的人工诱导[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(1): 49–55.
- [11] 朱树屏. 朱树屏文集[C]. 北京: 海洋出版社, 2007: 330.
- [12] Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Control by the environmental concentration of ions of the potential for motility in Japanese eel spermatozoa[J]. *Aquaculture*, 1998, 198: 339–351.
- [13] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 第1版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 224–227.
- [14] 严安生, 王其和, 李诗模. 渗透压和钾对鲤、团头鲂精子活力的影响[J]. *淡水渔业*, 1993, 23(3): 19–21.
- [15] M Morisawa, K Suzuki. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleost[J]. *Science*, 1980, 210: 1145–1147.
- [16] 谢刚, 叶星, 苏植蓬, 等. 鳗鲡精子的主要生物学特性[J]. *上海水产大学学报*, 1999, 8(1): 81–84.
- [17] 赵会宏, 刘晓春, 林浩然, 等. 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[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(4): 286–290.
- [18] 梁伟峰, 张海发, 王云新, 等. 几种因子对鞍带石斑鱼精子活力的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2009, 29(3): 29–32.
- [19] 江世贵, 李加儿, 区又君, 等. 四种鲷科鱼类精子激活条件与其生态习性的关系[J]. *生态学报*, 2000, 20(3): 468–473.
- [20] 鲁大椿, 刘宪亭, 方建萍, 等. 我国主要淡水鱼类精浆的元素组成[J]. *淡水渔业*, 1992, 22(2): 10–12.
- [21] Baynes S M, Scott A P, Dawson A P. Rainbow trout, *Salmon gairdnerii* Richardson, spermatozoa: effect of cations and pH

- on motility[J]. J Fish Biol, 1981, 19: 259–267.
- [22] Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, et al. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes[J]. J Exp Biol, 1983, 107: 95.
- [23] 邓岳松, 林浩然. 渗透压和 pH 对日本鳗鲡精子活力的影响[J]. 中山大学学报, 2000, 39.(4): 85–89.

Effects of activating mediums with different salinity, potassium ion and conservation time on sperm motility of *Anguilla japonica*

ZHANG Tao^{1,2}, LIU Ling¹, GUO Feng¹, ZHANG Jieming¹

1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Ecology and Aquaculture; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China

Abstract: Sperm motility of *Anguilla japonica* treated with six activation mediums with different salinities(34, 32, 30, 28, 26 and 22), three extender solution with different potassium ion concentration(25 mmol/L, 30 mmol/L, 35 mmol/L) and different conservation time(0 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h) was observed and measured. The results showed that: when activation medium salinity was 30, both sperm motility and percentage of motile sperms were the highest, meanwhile the curvilinear velocity(VCL), the straight line velocity(VSL) and the angular path velocity(VAP) were the highest. It could be concluded that the spawning salinity of *Anguilla japonica* may be 30 in natural environment. When potassium ion concentration in extender solution was 30 mmol/L, both sperm motility and percentage of motile sperms were the highest, meanwhile the curvilinear velocity(VCL), the straight line velocity(VSL) and the angular path velocity(VAP) were markedly higher than those under other concentration levels($P < 0.05$). So the best osmotic pressure of extender solution may be 796.68 kPa. As the conservation time extended, sperm motility reduced gradually. When potassium ion concentration in extender solution was 30 mmol/L, conservation time of sperm could reach 96 h and sperm survival rate was higher than in 25 mmol/L and 35 mmol/L potassium ion.

Key words: *Anguilla japonica*; sperm motility; salinity; potassium ion concentration; conservation time

Corresponding author: LIU Ling. E-mail: liul@yfi.ac.cn