

DOI: 10.12264/JFSC2022-0146

鸭绿沙塘鳢精子生理学特征

李文康, 骆小年, 邓鸿圣, 段友健, 李姣, 吴晨, 季辰跃

大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 为探究鸭绿沙塘鳢(*Odontobutis yaluensis*)精子生理学特征, 提高精子活力, 测定了其精液浓度、精子密度、pH 和精子活力, 以精子激活率(activation rate, AR)、快速运动时间(fast movement time, FT)以及精子寿命(life time, LT)作为评价精子活力的指标, 检测了水温、pH、离子(NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂)、非离子(葡萄糖、Tris、甘油)、碱度(NaHCO₃)共 10 种单因子条件下的精子活力, 并在此基础上进行 17 组复合因子精子激活液的筛选。结果表明, 鸭绿沙塘鳢精巢前段精子活力、精子密度、精液浓度均高于中后段, 精巢整体精子密度 $(1.83\pm 0.03)\times 10^9$ 个/mL, 精液浓度 23.10%, pH 6.9 \pm 0.1。单因子精子激活液中, 鸭绿沙塘鳢在水温 20 °C、pH 6.0、NaCl 68 mmol/L、KCl 54 mmol/L、CaCl₂ 27 mmol/L、葡萄糖 28 mmol/L、甘油 65 mmol/L 条件下精子 AR、FT 和 LT 均最高, 在 MgCl₂ 11 mmol/L、Tris 4 mmol/L 激活液中精子激活率最高。复合因子精子激活液中, 精子在 KCl 40 mmol/L、甘油 33 mmol/L、Tris 4 mmol/L 条件下 AR、FT 和 LT 均最高, 精子活力最高。综上所述, 在进行鸭绿沙塘鳢人工授精时, 可直接使用精巢前段(生精部), 同时应用复合因子精子激活液(KCl 40 mmol/L、甘油 33 mmol/L、Tris 4 mmol/L)提高精子活力。

关键词: 鸭绿沙塘鳢; 精子生理学; 精子活力; 精子激活液; 人工授精

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)11-1574-15

鸭绿沙塘鳢(*Odontobutis yaluensis*)属鲈形目(Perciformes), 虾虎鱼亚目(Gobioidei), 沙塘鳢科(Odontobutidae), 沙塘鳢属(*Odontobutis*)^[1-2], 仅分布于中国东北地区的辽河东部山区支流太子河、鸭绿江中下游及其支流、大洋河、辽东半岛碧流河, 为中国特产经济鱼类^[3-4]。然而, 近年来, 由于酷渔滥捕和环境改变, 其自然资源日趋枯竭, 2016 年被评估为《中国脊椎动物红色名录》易危(vulnerable, VU)鱼类^[5], 因此其规模化人工繁殖和苗种生产迫在眉睫。关于鸭绿沙塘鳢的研究目前主要集中在其人工繁殖试验^[6]、线粒体 DNA 基因组分析^[7]、系统发育和种群遗传结构分析^[8]、种群繁殖力和初次性成熟^[9]等方面, 其人工繁殖效

率依然很低。

精液浓度、pH 和精子密度是鱼类精子生理学特征的重要组成部分^[10], 鱼类精子成熟和精子形成受孕激素的调节^[11], 精子在精浆获能后具有运动和受精的能力, 被释放到外界环境中进而被激活^[12]。一般认为, 在外界环境中, 鱼类精子激活可通过两种不同的方式进行: 离子激活模式和渗透性休克激活模式, 离子模式存在于鲑和鲟中, 由于淡水中 K⁺的减少, 精子在释放到淡水时被细胞内的 K⁺外流激活; 渗透模式存在于其他淡水鱼类和海洋鱼类中, 精子释放到低渗透的淡水或高渗透的海水时被激活^[13-14]。渗透性激活模式下, 适当渗透水平的离子(Na⁺、K⁺等)和非离子(蔗糖、

收稿日期: 2022-05-05; 修订日期: 2022-06-26.

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校“揭榜挂帅”项目“北方淡水名优土著鱼类开发关键技术研究”; 辽宁省首批“揭榜挂帅”科技攻关项目(2021JH1/10400040); 辽宁省“百千万人才工程”项目(793018201); 大连市科技创新基金项目(2018J12SN068); 大连海洋大学第二届“湛蓝学者工程”项目(2021).

作者简介: 李文康(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖. E-mail: 13889442857@163.com

通信作者: 骆小年, 博士, 研究员, 从事鱼类增养殖及遗传育种研究. E-mail: luoxiaonian@dlou.edu.cn

甘露醇等)都可以提高鱼类的精子活力, 渗透性变化是渗透性激活模式的主要诱因^[15-16]。王新荣等^[6]发现鸭绿沙塘鳢精子密度低、活力差, 人工受精率低, 这严重制约了鸭绿沙塘鳢人工繁殖效率, 而在鱼类的人工授精中, 通过研究精子密度、精子激活液可控制精卵比和提高精子活力, 进而提高卵的受精率^[17-21]。本研究详细探讨了鸭绿沙塘鳢精子生理学特征并筛选出最适精子激活液, 以期为提高其人工繁殖效率提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验鱼来源及暂养

2020年10月, 于辽河水系新宾满族自治县太子河、碧流河水系碧流河水库上游、鸭绿江水系丹东凤城暖河流域采捕鸭绿沙塘鳢亲本, 挑选体质健壮、成熟度较好雄鱼 60 尾, 体长 (12.61 ± 0.15) cm, 体重 (43.65 ± 19.76) g, 3~4 龄(实验后通过耳石进行年龄鉴定), 暂养于大连海洋大学养殖基地水泥池(3 m×1.5 m×1 m), 水深 0.5 m, 水温 (14.7 ± 1.8) °C, 溶解氧 (8.3 ± 1.1) mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 人工催情 2020年10月20日进行雄鱼人工催情, 使用促黄体素释放素 2 号(LHRH-A₂) 2 μg/kg+地欧酮(DOM) 2 mg/kg, 背鳍基部肌肉一次注射, 每尾鱼注射量为 0.5 mL。催情后置暂养池暂养, 48 h 后, 解剖取出精巢于冰上培养皿中, 用于精子生理学指标的测定和精子活力实验。

1.2.2 精子生理学指标的测定 临近生殖季节时, 随着贮精囊的出现和逐渐膨大, 鸭绿沙塘鳢精巢明显分为两部分: 前部生精部和后部贮精囊, 完全成熟时生精部较细呈棒状, 贮精囊膨胀饱满圆厚(图 1)。本实验将精巢分为 3 个部分: 前段(图 1a), 中段(图 1b)和后段(图 1c), 并分别进行精液浓度、pH、精子活力、精子密度的测定。

精巢前中后段精子活力观察: 用解剖针分别挑取每段精巢中间部分的精液, 进行精子的活力观察。

精液的采集方法: (1) 精巢整体。分别取 3 尾鱼的精巢, 经 80 目筛绢挤压精液至培养皿中, 用移液枪吸取精液到离心管中。(2) 精巢分段。取 5 尾鱼的精巢, 按前、中、后分段, 用剪刀依次剪断,



图 1 鸭绿沙塘鳢雄鱼腹面观

a. 精巢前段; b. 精巢中段; c. 精巢后段.

Fig. 1 Ventral view of male *Odontobutis yaluensis*
a. Anterior testis; b. Middle testis; c. Posterior testis.

将所有精巢前、中、后段分开, 80 目筛绢网布挤压, 收集精液。

精液浓度、pH、精子密度的测定: 用 0.9% NaCl 溶液将精液稀释 200 倍, 用 XB-K-25 血细胞计数板在 Olympus CX21 显微镜下观察计数。精子密度测定: 精子密度(个/mL)=(80 个小格子内的精子数/80)×400×10⁴×稀释倍数。每个样重复测 3 次, 结果取平均值。精液浓度测定: 将精液装入离心管中, 常温下 4000 r/min 离心 30 min, 移液枪吸取精浆, 并计算精细胞与精液的体积比。精液 pH 采用精密 pH 试纸测定, 检测 3 尾鱼, 每尾重复测 3 次。

1.2.3 精子激活液制备 根据鸭绿沙塘鳢雌鱼最低产卵水温 8 °C^[6], 设计水温梯度 5~26 °C; 通过 0.1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 滴定配制, 设计 pH 梯度 4~10; 根据淡水鱼精子必须从高渗透精浆(渗透压摩尔浓度约 300 mOsm/kg)释放至低渗透水环境中才能激活^[15], 设计离子、非离子浓度梯度; 碱度实验参考徐敏等^[22]方法。本研究设计了不同梯度水温、pH、离子(NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂)、非离子(葡萄糖、Tris、甘油)、碱度(NaHCO₃ 浓度)共 10 种单因子精子激活液(表 1)。此外, 根据鸭绿沙塘鳢精子在不同梯度单因子溶液中的活力实验结果, 少量的葡萄糖、甘油和 Tris 可显著提升精子激活率, 而 30~70 mmol/L NaCl 和 KCl 可大幅度提高精子活力, 进行最适离子和非离子因子的组合, 通过逐渐降低整体渗透压, 摸索出最佳复合因子激活液组合, 期间共设计了 17 组复合因子组合激活液(G1~G17)(表 2)。实验试剂均为分

表 1 不同梯度单因子精子激活液设计
Tab. 1 Design of single factor sperm activation solution of different gradients

单因子 single factor	梯度 gradient										
水温/°C temperature	5	8	11	14	17	20	23	26			
pH	4	5	6	7	8	9	10				
NaCl/(mmol/L)	17	34	51	68	86	103	120				
KCl/(mmol/L)	13	27	40	54	67	81	94	107	121		
CaCl ₂ /(mmol/L)	9	18	27	36	45	54	63	72	81	90	
MgCl ₂ /(mmol/L)	5	11	21	32	42	53	63	74	84	95	
葡萄糖/(mmol/L) glucose	14	28	56	83	111	139	167	194			
Tris/(mmol/L)	2	4	8	33	66	99	132	165	198		
甘油/(mmol/L) glycerol	11	33	65	98	130	163	195				
碱度/(mmol/L) NaHCO ₃ concentration	12	24	36	48	60	71	83	95	107	119	

表 2 复合因子精子激活液设计
Tab. 2 Design of compound factor sperm activator

分组 group	激活液浓度/(mmol/L) composition and concentration of activation solution					渗透压摩尔浓度 /(mOsm/kg) osmotic pressure molar concentration
	NaCl	KCl	葡萄糖 glucose	甘油 glycerol	Tris	
G1	68	54				244
G2	68	13				162
G3	17	54				142
G4	51	13				128
G5	17	40				114
G6	51		28			130
G7		40	28			108
G8	94			41	20	249
G9	51			33	4	139
G10		40		33	4	117
G11	17	40	28			142
G12		40		43		123
G13		40		65		145
G14		40	28		4	112
G15		54	28			136
G16	68		28			164
G17		40	28	33	4	145

析纯, 用纯水配制。

渗透压摩尔浓度的单位, 通常以每千克溶剂中溶质的毫渗透压摩尔来表示, 可按下列公式计算渗透压摩尔浓度(mOsm/kg)^[23]:

$$\text{渗透压摩尔浓度(mOsm/kg)} = \frac{\text{每千克溶剂中溶解的溶质克数}}{\text{分子量}} \times n \times 1000$$

式中, n 为一个溶质分子溶解或解离时形成的粒

子数。例如在理想溶液中, 葡萄糖 $n=1$, 氯化钠或硫酸镁 $n=2$, 氯化钙 $n=3$, 枸橼酸钠 $n=4$ 。

1.2.4 精子活力观察 实验顺序为, 先于载玻片上加一滴激活液, 后用解剖针挑取少量精液与其混匀, 并迅速盖上盖玻片置于 OlympusCX21 显微镜下观察, 同时用秒表计时, 每个梯度做 3 次重复实验。不同水温梯度参考赵会宏等^[24]斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)精子活力实验方法, 将纯水和精液混匀后, 盖上盖玻片, 放在不同温度的恒温箱中, 每隔 10~30 s 取出置于显微镜下观察完毕后迅速放回原处。根据鲁大椿等^[25]的方法, 以精子激活率(activation rate, AR)、快速运动时间(fast movement time, FT)以及精子寿命(life time, LT)作为评价精子活力的指标, 其中精子激活率是指随机视野中运动精子占该视野全部精子的百分数, 快速运动时间是指从精子激活到 70%精子转入慢速运动的时间, 精子寿命是指从精子激活开始运动到 90%精子停止运动的全部时间。

1.3 数据处理

所有实验数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)形式表示。统计分析 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 用 S-N-K (Student-Newman-Keuls)法进行多重比较方法和显著性差异分析, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 鸭绿沙塘鳢精子生物学

2.1.1 鸭绿沙塘鳢精液浓度、pH 和精子密度 表

3 可见, 鸭绿沙塘鳢精巢前段精子密度显著高于中、后段($P<0.05$), 精巢中、后段精子密度无显著差异($P>0.05$); 精巢前段精液浓度远高于中、后段。整体精巢精子密度为 $(1.83\pm 0.03)\times 10^9$ 个/mL, 精液浓度为 23.10%, 精液 pH 为 6.9 ± 0.1 。

表 3 鸭绿沙塘鳢精子生理特性
Tab. 3 Physiological properties of *Odontobutis yaluensis* sperm

$n=3; \bar{x} \pm SD$			
精巢部位 testis site	取精方式 sperm collection method	精子密度 /($\times 10^9$ 个/mL) sperm density	精液浓度/% sperm concentration
整体 whole part		1.83 ± 0.03^b	23.10
前段 anterior	80 目筛绢	2.20 ± 0.10^a	42.50
中段 middle	网布挤压	0.69 ± 0.04^c	15.14
后段 posterior		0.57 ± 0.01^c	9.09

注: 同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。
Note: The means with different letters within the same column are significant differences at 0.05 probability level.

2.1.2 鸭绿沙塘鳢精巢分段的精子活力 从表 4 可见, 鸭绿沙塘鳢精子在用纯水激活时, 精巢前段精子激活率 $[(69.67\pm 1.53)\%]$ 、快速运动时间 $[(90.00\pm 6.56) s]$ 和寿命 $[(206.33\pm 4.04) s]$ 均显著高于中、后段($P<0.05$)。

表 4 鸭绿沙塘鳢精巢前、中、后段精子在纯水中的活力
Tab. 4 Sperm motility in the anterior, middle and posterior segments of *Odontobutis yaluensis* testis in pure water

精巢部位 testis site	精子活力 sperm motility		
	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
前段 anterior	69.67 ± 1.53^a	90.00 ± 6.56^a	206.33 ± 4.04^a
中段 middle	45.00 ± 5.00^b	69.33 ± 2.08^b	184.67 ± 4.62^b
后段 posterior	26.67 ± 2.89^c	62.33 ± 4.16^b	161.67 ± 7.64^c

注: 同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。
Note: The means with different letters within the same column are significant differences at 0.05 probability level.

2.2 水温、pH 对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响

2.2.1 水温对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 由于鸭绿沙塘鳢精巢前段精子密度大、活力好, 后续

精子活力实验均使用前段精巢。表 5 可见, 精子活力随着水温的上升呈现出先上升后下降的趋势, 20 °C 时精子活力最高, AR、FT、LT 分别为 $(82.33\pm 3.06)\%$ 、 $(121.67\pm 10.97) s$ 、 $(206.67\pm 16.26) s$, 且 AR、FT 显著高于其他组($P<0.05$)。

表 5 鸭绿沙塘鳢精子在不同水温中的活力情况
Tab. 5 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different water temperatures

$n=3; \bar{x} \pm SD$			
水温/°C temperature	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
5	48.33 ± 2.89^e	69.33 ± 6.66^c	116.67 ± 7.09^f
8	59.33 ± 4.04^d	76.33 ± 1.53^c	137.33 ± 8.50^e
11	63.00 ± 2.65^{cd}	77.33 ± 2.52^c	160.00 ± 11.79^b
14	68.33 ± 3.06^c	85.00 ± 4.00^c	164.67 ± 9.61^b
17	74.00 ± 3.00^b	97.67 ± 10.79^b	194.00 ± 19.97^a
20	82.33 ± 3.06^a	121.67 ± 10.97^a	206.67 ± 16.26^a
23	59.00 ± 3.46^d	77.67 ± 6.11^c	131.67 ± 9.02^e
26	45.67 ± 3.21^e	69.33 ± 6.03^c	117.33 ± 8.50^e

注: 同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。
Note: The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

2.2.2 pH 对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 表 6 可见, 随着 pH 的上升, 鸭绿沙塘鳢精子活力先上升后下降, 在 pH 6.0 时, 活力最强, AR、FT 和 LT 分别为 $(74.00\pm 4.58)\%$ 、 $(160.67\pm 10.02) s$ 、 $(246.00\pm 14.18) s$, pH 6.0~10.0, 精子活力随着 pH 上升而下降。

表 6 鸭绿沙塘鳢精子在不同 pH 中的活力情况
Tab. 6 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different pH

$n=3; \bar{x} \pm SD$			
pH	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
4.0	8.00 ± 1.73^d	43.00 ± 7.00^d	101.67 ± 12.50^{de}
5.0	52.00 ± 4.36^b	63.00 ± 3.46^c	182.33 ± 9.02^e
6.0	74.00 ± 4.58^a	160.67 ± 10.02^a	246.00 ± 14.18^a
7.0	70.67 ± 0.58^a	92.67 ± 6.66^b	217.67 ± 9.45^b
8.0	49.33 ± 2.08^b	64.33 ± 1.53^c	126.67 ± 4.93^d
9.0	15.33 ± 2.52^c	55.00 ± 5.57^c	119.67 ± 3.06^d
10.0	4.00 ± 1.00^d	37.33 ± 7.02^d	90.00 ± 24.56^e

注: 同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。
Note: The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

2.3 离子溶液对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响

2.3.1 NaCl 对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 从表 7 可见, 在 NaCl 17~120 mmol/L 时, 鸭绿沙塘鳢精子活力随着溶液浓度的升高呈现出先上升后下降的趋势, 在 NaCl 68 mmol/L 时, 精子活力达最高值, 其 AR、FT 和 LT 分别为(85.00±5.00)%、(322.67±19.14) s、(1839.67±215.28) s。在 NaCl 17 mmol/L 时, FT 显著高于纯水($P<0.05$)。在 NaCl 120 mmol/L 时精子不激活。

表 7 鸭绿沙塘鳢精子在不同浓度 NaCl 中的活力情况

Tab. 7 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different concentrations of NaCl

$n=3; \bar{x} \pm SD$

氯化钠 (mmol/L) NaCl	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
0	69.67±1.53 ^b	90.00±6.56 ^c	206.33±4.04 ^c
17	72.00±2.00 ^b	146.00±21.07 ^d	285.00±16.00 ^{de}
34	81.33±1.53 ^a	143.67±9.87 ^d	621.67±53.53 ^c
51	84.67±3.51 ^a	254.00±12.53 ^b	939.00±40.73 ^b
68	85.00±5.00 ^a	322.67±19.14 ^a	1839.67±215.28 ^a
86	48.33±2.89 ^c	307.67±13.32 ^a	425.00±18.33 ^d
103	22.33±2.08 ^d	185.33±7.09 ^c	304.33±7.09 ^{de}
120	0 ^e	0 ^f	0 ^f

注: 溶液浓度 0 为纯水组, 其激活率、快速运动时间和寿命为精巢前段精子在纯水中的活力情况。同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。

Note: The solution concentration of 0 is the pure water group, and its activation rate, fast movement time and life time are the vitality of the spermatozoa in the anterior testis in pure water. The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

2.3.2 KCl 对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 从表 8 可见, 在 KCl 13~121 mmol/L 时, 鸭绿沙塘鳢精子活力随着溶液浓度升高呈现先上升后下降的趋势, 在 KCl 54 mmol/L 时, 精子活力最强, 其 AR、FT 和 LT 分别为(92.67±3.79)%、(237.33±15.57) s、(1194.00±118.88) s。在 KCl 13 mmol/L 时, AR 显著高于纯水($P<0.05$)。在 KCl 121 mmol/L 时精子不激活。

2.3.3 CaCl₂ 对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 从表 9 可见, 在 CaCl₂ 9~90 mmol/L 时, 鸭绿沙塘鳢精子活力随着溶液浓度的升高呈现出先上升后下降的趋势, 在 CaCl₂ 27 mmol/L 时, 精子活力最高,

表 8 鸭绿沙塘鳢精子在不同浓度 KCl 中的活力情况

Tab. 8 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different concentrations of KCl

$n=3; \bar{x} \pm SD$

氯化钾 (mmol/L) KCl	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
0	69.67±1.53 ^c	90.00±6.56 ^c	206.33±4.04 ^{ef}
13	78.00±1.73 ^b	95.67±4.04 ^c	222.00±12.12 ^{ef}
27	86.67±2.89 ^a	104.33±5.51 ^c	256.67±28.88 ^{ef}
40	89.00±3.61 ^a	205.67±14.05 ^b	1083.33±60.58 ^b
54	92.67±3.79 ^a	237.33±15.57 ^a	1194.00±118.88 ^a
67	54.67±7.23 ^d	182.00±8.5 ^{cd}	885.67±66.49 ^c
81	35.33±4.62 ^c	143.00±23.64 ^d	439.33±47.04 ^d
94	11.67±2.08 ^f	129.33±5.69 ^d	306.33±32.33 ^c
107	3.00±2.00 ^g	81.00±9.54 ^c	148.00±10.15 ^f
121	0 ^g	0 ^f	0 ^g

注: 溶液浓度 0 为纯水组, 其激活率、快速运动时间和寿命为精巢前段精子在纯水中的活力情况。同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。

Note: The solution concentration of 0 is the pure water group, and its activation rate, fast movement time and life time are the vitality of the spermatozoa in the anterior testis in pure water. The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

表 9 鸭绿沙塘鳢精子在不同浓度 CaCl₂ 中的活力情况

Tab. 9 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different concentrations of CaCl₂

$n=3; \bar{x} \pm SD$

氯化钙 (mmol/L) CaCl ₂	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
0	69.67±1.53 ^{bc}	90.00±6.56 ^{ef}	206.33±4.04 ^d
9	61.67±2.89 ^{de}	142.00±8.19 ^c	221.33±14.01 ^d
18	66.00±6.00 ^{cd}	187.33±15.18 ^b	261.00±15.10 ^c
27	82.33±4.04 ^a	233.33±8.50 ^a	376.33±26.73 ^a
36	74.67±5.13 ^b	189.67±16.56 ^b	319.67±21.08 ^b
45	71.33±1.53 ^{bc}	151.33±11.68 ^c	220.33±16.26 ^d
54	58.67±3.51 ^c	119.00±7.55 ^d	180.00±10.15 ^e
63	31.33±1.53 ^f	106.33±10.69 ^{de}	166.00±18.52 ^{ef}
72	17.33±3.21 ^g	80.00±6.00 ^{fg}	155.00±8.89 ^{ef}
81	8.33±2.89 ^h	66.00±4.58 ^g	151.00±12.49 ^{ef}
90	1.33±0.58 ⁱ	63.33±5.86 ^g	136.00±5.00 ^f

注: 溶液浓度 0 为纯水组, 其激活率、快速运动时间和寿命为精巢前段精子在纯水中的活力情况。同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。

Note: The solution concentration of 0 is the pure water group, and its activation rate, fast movement time and life time are the vitality of the spermatozoa in the anterior testis in pure water. The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

其 AR、FT 和 LT 为(82.33±4.04)%、(233.33±8.50) s、(376.33±26.73) s。在 CaCl₂ 90 mmol/L 时, 仍有少许精子被激活, 未出现精子聚集情况。

2.3.4 MgCl₂ 对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 由表 10 可见, 在 MgCl₂ 11 mmol/L 时, 鸭绿沙塘鳢精子 AR 达到最高值, 为(86.67±5.77)%, 在 MgCl₂ 53 mmol/L 时, FT 和 LT 达到最高值, 分别为(178.67±11.24) s、(474.67±14.15) s。在 MgCl₂ 95 mmol/L 时, 精子不激活。

表 10 鸭绿沙塘鳢精子在不同浓度 MgCl₂ 中的活力情况
Tab. 10 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different concentrations of MgCl₂

n=3; $\bar{x} \pm SD$

氯化镁 (mmol/L) MgCl ₂	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
0	69.67±1.53 ^c	90.00±6.56 ^{de}	206.33±4.04 ^f
5	82.33±2.52 ^{ab}	100.33±5.51 ^{cde}	272.33±15.70 ^e
11	86.67±5.77 ^a	114.00±5.00 ^c	368.00±9.54 ^b
21	77.67±3.79 ^b	103.33±12.10 ^{cde}	338.67±9.61 ^c
32	70.67±1.15 ^c	106.33±8.02 ^{cd}	304.67±10.97 ^d
42	62.33±5.86 ^d	135.33±13.05 ^b	360.67±5.69 ^b
53	51.00±1.00 ^e	178.67±11.24 ^a	474.67±14.15 ^a
63	34.33±1.54 ^f	117.33±8.62 ^c	262.00±14.18 ^e
74	8.00±2.00 ^g	83.67±14.57 ^e	167.67±18.15 ^g
84	2.00±1.00 ^h	56.67±7.51 ^f	76.67±16.17 ^h
95	0 ^h	0 ^g	0 ⁱ

注: 溶液浓度 0 为纯水组, 其激活率、快速运动时间和寿命为精巢前段精子在纯水中的活力情况。同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著(*P*<0.05)。

Note: The solution concentration of 0 is the pure water group, and its activation rate, fast movement time and life time are the vitality of the spermatozoa in the anterior testis in pure water. The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

2.4 非离子溶液对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响

2.4.1 葡萄糖对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 由表 11 可见, 在葡萄糖 14~194 mmol/L 时, 鸭绿沙塘鳢精子活力随着溶液浓度升高呈现出先上升后下降的趋势, 在葡萄糖 28 mmol/L 时, 精子活力最高, 其 AR、FT 和 LT 分别为(92.33±2.31)%、(157.67±9.50) s、(567.00±71.11) s。在葡萄糖 194 mmol/L 时, 精子不激活。

2.4.2 Tris 对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 由表 12 可见, 在 Tris 4 mmol/L 时, 鸭绿沙塘鳢精子

表 11 鸭绿沙塘鳢精子在不同浓度葡萄糖中的活力情况
Tab. 11 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different concentrations of glucose

n=3; $\bar{x} \pm SD$

葡萄糖 (mmol/L) glucose	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
0	69.67±1.53 ^{cd}	90.00±6.56 ^c	206.33±4.04 ^c
14	71.67±2.89 ^c	119.33±3.79 ^b	512.33±29.28 ^a
28	92.33±2.31 ^a	157.67±9.50 ^a	567.00±71.11 ^a
56	78.33±2.89 ^b	150.33±14.74 ^a	564.67±53.26 ^a
83	66.67±3.79 ^d	146.67±12.50 ^a	503.33±37.02 ^a
111	48.33±2.08 ^e	143.00±3.61 ^a	366.33±20.53 ^b
139	30.67±2.08 ^f	141.67±6.81 ^a	252.33±21.39 ^c
167	7.33±2.31 ^g	117.00±22.34 ^b	248.00±15.72 ^c
194	0 ^h	0 ^d	0 ^d

注: 溶液浓度 0 为纯水组, 其激活率、快速运动时间和寿命为精巢前段精子在纯水中的活力情况。同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著(*P*<0.05)。

Note: The solution concentration of 0 is the pure water group, and its activation rate, fast movement time and life time are the vitality of the spermatozoa in the anterior testis in pure water. The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

表 12 鸭绿沙塘鳢精子在不同浓度 Tris 中的活力情况
Tab. 12 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different concentrations of Tris

n=3; $\bar{x} \pm SD$

三羟甲基氨基甲烷 (mmol/L) Tris	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
0	69.67±1.53 ^c	90.00±6.56 ^{cf}	206.33±4.04 ^{de}
2	83.33±2.89 ^b	67.67±2.08 ^g	215.67±4.04 ^{de}
4	93.67±1.15 ^a	70.67±2.08 ^{fg}	225.33±4.51 ^{de}
8	82.67±3.06 ^b	76.00±5.57 ^{fg}	234.33±24.11 ^{de}
33	69.00±2.65 ^c	104.33±12.74 ^{de}	306.33±42.25 ^d
66	53.33±3.51 ^d	134.67±14.01 ^{bc}	805.67±68.13 ^b
99	43.67±3.21 ^e	215.00±21.28 ^a	1484.67±121.01 ^a
132	21.67±2.89 ^f	148.33±14.47 ^b	457.67±20.82 ^c
165	1.67±0.58 ^g	120.00±11.53 ^{cd}	194.00±25.63 ^c
198	0 ^g	0 ^h	0 ^f

注: 溶液浓度 0 为纯水组, 其激活率、快速运动时间和寿命为精巢前段精子在纯水中的活力情况。同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著(*P*<0.05)。

Note: The solution concentration of 0 is the pure water group, and its activation rate, fast movement time and life time are the vitality of the spermatozoa in the anterior testis in pure water. The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

AR 达到最高值(93.67±1.15)%, 在 Tris 99 mmol/L 时, FT 和 LT 达到最高值, 分别为(215.00±21.28) s、(1484.67±121.01) s。在 Tris 198 mmol/L 时, 精子不激活。

2.4.3 甘油对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响 由表 13 可见, 在甘油浓度 11~195 mmol/L 时, 鸭绿沙塘鳢精子活力随着溶液浓度升高呈现出先上升后下降的趋势, 在甘油 65 mmol/L 时, 精子活力达到最高值, 其 AR、FT 和 LT 分别分别为(94.67±0.58)%、(146.67±9.61) s、(341.33±37.10) s。在 195 mmol/L 时, 精子不激活。

表 13 鸭绿沙塘鳢精子在不同浓度甘油中的活力情况
Tab. 13 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different concentrations of glycerol

甘油 /(mmol/L) glycerol	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
0	69.67±1.53 ^c	90.00±6.56 ^c	206.33±4.04 ^{bc}
11	83.00±2.65 ^b	99.33±4.04 ^{de}	176.67±9.61 ^d
33	91.67±2.89 ^a	106.67±7.64 ^{cd}	188.00±17.52 ^{cd}
65	94.67±0.58 ^a	146.67±9.61 ^a	341.33±37.10 ^a
98	66.67±5.77 ^c	135.00±9.17 ^b	231.00±13.11 ^b
130	30.00±4.36 ^d	112.33±11.50 ^c	217.00±9.17 ^b
163	1.67±0.58 ^e	79.00±3.61 ^f	117.33±7.51 ^e
195	0 ^e	0 ^e	0 ^f

注: 溶液浓度 0 为纯水组, 其激活率、快速运动时间和寿命为精巢前段精子在纯水中的活力情况。同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。

Note: The solution concentration of 0 is the pure water group, and its activation rate, fast movement time and life time are the vitality of the spermatozoa in the anterior testis in pure water. The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

2.5 碱度对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响

从表 14 可见, 在碱度 12~119 mmol/L 时, 鸭绿沙塘鳢精子活力随着溶液浓度的升高呈现出先上升后下降的趋势, 在碱度 60 mmol/L 时, 精子活力达到最高值, 其 AR、FT 和 LT 分别为(85.00±1.00)%、(284.33±41.10) s、(1692.00±61.39) s。在碱度 119 mmol/L 时, 少许精子被激活。

2.6 复合因子对鸭绿沙塘鳢精子活力的影响

从表 15 可见, 精子在 G10 组混合溶液中活力最强, 其 AR、FT 和 LT 分别为(97.00±1.73)%、

表 14 鸭绿沙塘鳢精子在不同浓度碱度中的活力情况
Tab. 14 Activity of *Odontobutis yaluensis* sperm in different concentrations of alkalinity

碱度 /(mmol/L) NaHCO ₃	激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
0	69.67±1.53 ^c	90.00±6.56 ^d	206.33±4.04 ^{fe}
12	76.00±5.57 ^b	80.67±10.02 ^d	139.33±12.50 ^{bh}
24	82.33±2.52 ^{ab}	135.67±22.50 ^c	240.00±19.52 ^f
36	83.00±2.00 ^{ab}	219.33±16.62 ^b	633.67±32.08 ^d
48	83.67±2.31 ^{ab}	249.33±18.56 ^{ab}	1471.33±65.23 ^c
60	85.00±1.00 ^a	284.33±41.10 ^a	1692.00±61.39 ^a
71	78.67±3.21 ^{ab}	251.67±22.48 ^{ab}	1554.33±48.60 ^b
83	57.67±6.81 ^d	210.33±30.02 ^b	643.00±33.78 ^d
95	34.33±3.79 ^e	174.00±14.73 ^c	335.67±25.77 ^e
107	19.00±3.61 ^f	131.67±11.37 ^c	190.00±13.75 ^{fe}
119	6.00±1.00 ^e	38.33±9.07 ^c	97.00±13.89 ^h

注: 溶液浓度 0 为纯水组, 其激活率、快速运动时间和寿命为精巢前段精子在纯水中的活力情况。同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。

Note: The solution concentration of 0 is the pure water group, and its activation rate, fast movement time and life time are the vitality of the spermatozoa in the anterior testis in pure water. The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

(558.67±44.41) s、(2359.00±81.30) s。G1 组渗透压偏高, 精子不激活。以 NaCl 主导下的 G2、G4 组, G2 组渗透压较 G4 组大, AR 无显著差异($P>0.05$), 而 FT 和 LT 存在明显差异($P<0.05$), 这跟以 KCl 主导下的 G3、G5 组情况相似。而以 NaCl 为主导的 G2、G4 组, AR 显著低于以 KCl 为主导的 G3、G5 组($P<0.05$)。加入葡萄糖的 G6、G7 组, 对比单因子 51、68 mmol/L 的 NaCl, 40、54 mmol/L 的 KCl, 只延长了 FT 和 LT。G8 组虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)精子激活液^[26]并不适用于鸭绿沙塘鳢精子, 精子在 G9、G10、G17 组活力显著高于 G8 组($P<0.05$), G17 组在 G10 组基础上加入葡萄糖, 导致整体渗透压偏大, 根据单因子及复合因子精子活力情况, 精子最适渗透压为 110~130 mOsm。G14 组较 G7 组添加 4 mmol/L 的 Tris, 精子在 G14 组 AR 显著高于 G7 组, G10 较 G12、G13 组添加 4 mmol/L 的 Tris, G10 精子活力显著高于 G12、G13 组, 说明组合中加入 4 mmol/L 的 Tris 对精子的 AR 有提升。

表 15 鸭绿沙塘鳢精子在不同复合因子溶液中的活力情况

Tab. 15 Motility of *Odontobutis yaluensis* sperm in different compound factor combination solution

$n=3; \bar{x} \pm SD$

分组 group	渗透压 摩尔浓度 (mOsm/kg) osmotic pressure molar concentration	精子活力 sperm motility		
		激活率/% activation rate	快速运动时间/s fast movement time	寿命/s life time
G1	244	0 ^e	0 ^e	0 ^e
G2	162	64.67±4.16 ^c	148.00±9.54 ^{ef}	429.67±46.76 ^f
G3	142	90.67±4.04 ^a	152.33±19.35 ^{ef}	746.33±31.56 ^f
G4	128	65.00±4.08 ^c	325.00±28.89 ^c	1702.50±263.29 ^{cdc}
G5	114	91.00±3.61 ^a	421.67±47.17 ^b	1430.33±107.72 ^c
G6	130	64.00±5.29 ^c	370.67±39.50 ^{bc}	1851.00±314.69 ^{bcd}
G7	108	81.00±2.00 ^b	410.50±50.40 ^b	2113.50±187.67 ^{ab}
G8	249	13.33±2.89 ^f	97.33±5.69 ^f	815.67±58.71 ^f
G9	139	82.33±2.52 ^b	332.33±24.44 ^c	1726.33±120.90 ^{cdc}
G10	117	97.00±1.73 ^a	558.67±44.41 ^a	2359.00±81.30 ^a
G11	142	76.67±2.08 ^b	208.33±21.94 ^{dc}	2220.67±113.81 ^a
G12	123	80.00±5.00 ^b	155.67±8.50 ^{ef}	688.67±25.93 ^f
G13	145	82.33±2.52 ^b	331.67±29.14 ^c	443.00±40.60 ^f
G14	112	91.25±2.50 ^a	434.50±38.96 ^b	2042.25±329.02 ^{abc}
G15	136	76.00±1.73 ^b	219.00±28.00 ^{dc}	1502.00±215.26 ^{dc}
G16	164	45.00±5.00 ^c	151.67±18.01 ^{ef}	725.00±58.10 ^f
G17	145	55.00±5.00 ^d	246.00±30.51 ^d	1557.33±80.14 ^{dc}

注: 同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$).

Note: The means with different letters within the same column are significant differences at the 0.05 probability level.

3 讨论

3.1 鸭绿沙塘鳢精子的生物学特性

3.1.1 精液浓度和精子密度 精液浓度和精子密度是精子生物学重要组成部分^[10], 为保证卵受精率和后代存活率, 鱼类在长期的进化过程中形成了不同的繁殖策略^[18,27]。通常, 不筑巢繁殖的鱼类, 精液浓度和精子密度较高, 如鲤(*Cyprinus carpio*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)等的精液浓度为 57.90%~69.10%, 精子密度为(29.4~35.6)×10⁹ 个/mL^[25]。此外, 同为不筑巢繁殖的中华鲟(*Acipenser sinensis*)、达氏鲟(*A. dabryanus*)、俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedtii*), 精液浓度为 7.67%~

17.37%, 精子密度为 1.52×10⁹~3.26×10⁹ 个/mL^[28-30]。为弥补精子密度较低的缺陷, 雄鱼常具较大的排精量, 如 1 尾中华鲟雄鱼精液量可达 1000~5952 mL^[30]。筑巢繁殖的鱼类, 精液浓度和精子密度较低, 如纹缟虾虎鱼(*Tridentiger trigonocephalus*)精子密度为(1.73±0.08)×10⁹ 个/mL^[31], 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)精子密度为 0.01×10⁹~0.1×10⁹ 个/mL^[32], 通过在狭小的鱼巢内受精, 增加精卵结合机会, 保证卵受精率, 产卵受精后, 雄鱼护卵孵化保证后代存活率(表 16)。

本研究发现, 鸭绿沙塘鳢作为筑巢繁殖的鱼类, 精液浓度、精液量和精子密度较低, 分别为 23.10%、0.7 mL、1.83×10⁹ 个/mL, 在繁殖期, 为保证卵受精率, 鸭绿沙塘鳢雄鱼寻找巢穴, 引诱雌鱼入巢, 一系列发情动作后, 雌鱼产卵, 雄鱼立即将精液排到鱼巢上部内表面, 鸭绿沙塘鳢精液为白色, 粘稠状, 遇水缓慢散开, 这进一步保证卵受精率, 此外, 雄鱼腹部朝上护卵孵化进一步保证后代存活率^[33]。

研究精子密度可为人工授精提供参考, 使用适宜的精卵比可节省精液并提高卵受精率、孵化率, 但不同鱼类人工授精最适精卵比在 10³~10⁶:1, 之间存在较大差异^[18]。已有研究表明, 虹鳟精卵比 20×10⁴:1 时, 卵受精率最高, 为 80.42%^[34]; 大西洋鲑(*Salmo salar*)精卵比 50×10⁴:1 时, 卵受精率和孵化率最高, 分别为 71.29%、68.18%^[21]; 大西洋鳕(*Gadus morhua*)精卵比 10×10⁴:1 时, 卵受精率可达 60%以上^[35]; 黄颡鱼精卵比 10×10⁴:1 时, 卵受精率和孵化率最高, 分别为 97.55%、92.00%^[36]; 草鱼和鲢精卵比(30~40)×10⁴:1 时, 卵受精率 85.0%以上^[25]; 翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)精卵比 10×10⁴:1 时, 卵受精率和孵化率最高, 分别为 69.42%、59.82%^[36]; 西伯利亚鲟(*A. baerii*)精卵比 100×10⁴:1 时, 卵受精率和孵化率最高, 分别为 81.50%、68.2%^[37]。参考同为鲈形目的翘嘴鲌精卵比 10×10⁴:1 的标准, 鸭绿沙塘鳢 1 尾成熟雄鱼平均精液量为 0.7 mL, 平均精子密度为 1.83×10⁹ 个/mL, 1 尾雄鱼可供 12810 粒卵完成受精, 鸭绿沙塘鳢个体绝对繁殖力为 1200 粒^[9], 雌雄比经计算为 10.7:1, 但这与自然条件下, 1 个

鱼巢雌雄比 1~4 : 1 有较大出入, 鸭绿沙塘鳢人工授精适宜的精卵比(雌雄比)还有待进一步研究。

表 16 几种鱼类精液浓度、精子密度比较
Tab. 16 Comparison of sperm concentration and sperm density of several fishes

种 species	精液浓度/% sperm concentration	精子密度 /(10 ⁹ 个/mL) sperm density	文献来源 reference
鸭绿沙塘鳢 <i>Odontobutis yaluensis</i>	23.10	1.83±0.03	本研究
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	59.10	29.4	鲁大椿等 ^[25]
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	57.90	33.2	鲁大椿等 ^[25]
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	-	26.6	鲁大椿等 ^[25]
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	69.10	35.6	鲁大椿等 ^[25]
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	63.80	34.4	鲁大椿等 ^[25]
鳙 <i>Aristichthys nobilis</i>	58.30	33.9	鲁大椿等 ^[25]
高白鲑 <i>Coregonus peled</i>	-	28.7	谷巍 ^[38]
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	-	14.5	林丹军等 ^[39]
圆口铜鱼 <i>Coreius guichenoti</i>	39.67	5.3	王昌霖等 ^[40]
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	17.37	3.26	郑跃平 ^[30]
达氏鲟 <i>A. dabryanus</i>	7.67	1.52	陈春娜等 ^[28]
俄罗斯鲟 <i>A. gueldenstaedtii</i>	-	2.12±0.89	黄晓荣等 ^[29]
纹缟虾虎鱼 <i>Tridentiger trignocephalus</i>	-	1.73±0.08	黄晓荣等 ^[31]
中华倒刺鲃 <i>Spinibarbus sinensis</i>	71.10	15.27	谭娟等 ^[41]
白甲鱼 <i>Onychostoma simus</i>	76.10	13.36	谭娟等 ^[41]
岩原鲤 <i>Procypris rabaudi</i>	71.00	13.62	谭娟等 ^[41]
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	-	0.01-0.1	胡伟华等 ^[32]

注: 表中“-”表示未见相关研究报道。

Note: “-” in the table indicates that there is no relevant research report.

3.1.2 鸭绿沙塘鳢精巢结构和功能 研究表明, 胡鲇科(Clariidae)、沙塘鳢科(Odontobutidae)、虾虎鱼科(Gobiidae)、鲈科(Bleniidae)、鲢科(Bagridae)、三鳍鲈科(Tripeterygiidae)和蟾鱼科(Batrachoididae)等鱼类具贮精囊, 贮精囊除贮存精子外, 也可能包括激素合成、物质分泌及储存等几个方面^[42]。虾虎鱼类因其贮精囊结构致使精

液难以挤出^[43-44], 江寰新等^[45]发现中华乌塘鳢(*Bostrychus sinensis*)精巢生精部为小叶型结构, 不具辐射状, 精原细胞存在于精小叶四周, 且在原位发育成熟后, 精小囊破裂, 精子汇集进入许多小叶腔相互连通的精子通道中, 最后精子由靠近输出管的小叶腔进入输出管; 贮精囊为网状管状结构, 长度约是生精部的 1/3, 贮精囊旁具膜状突起, 其组织学结构与贮精囊一样, 在生殖季节, 贮精囊内管状囊腔存在大量分泌物, 只贮存少量精子, 贮精囊一侧具输精管。同样, 赵晓勤^[46]发现河川沙塘鳢(*O. potamophila*)精子在生精部成熟后, 精囊腔隔膜破裂, 成熟精子流向贮精囊, 虽然贮精囊和生精部基本组成单位都是小室腔, 但贮精囊腔截面积约为生精囊腔的 8~13 倍, 且内含分泌物较多, 包括黏多糖、单糖、黏蛋白等, 同时精子密度也低于生精囊腔部位。贮精囊功能具种的差异, 如异囊鲈(*Heteropneustes fossilis*)贮精囊不作为精子贮存用, 只有少量精子存在于贮精囊与精巢连接处, 但贮精囊是最佳的受精条件所必不可少的^[47-48]。棕鲌(*Ictalurus nebulosus*)和长吻鲌(*Leiocassis longirostris*)贮精囊无贮存精子作用, 但其上皮细胞分泌物可供精子在输精管中的运动能量及具有稀释精子作用^[49-50]。黄颡鱼贮精囊主要分泌各种物质调节精子活力, 同时也作为精子贮存用^[51]。绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*)生殖前期贮精囊囊腔内贮存大量精子, 后期囊腔结缔组织更薄, 囊腔体积不断扩大, 大量精子呈漩涡状, 贮精囊精子蓄积期较长, 当蓄积到一定量的时候, 轻压鱼体腹部即有乳白色精液流出^[42]。大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)、中华乌塘鳢、河川沙塘鳢在繁殖期时贮精囊的近端、中央或远端均先后贮存大量精子, 并混合在分泌物中^[45-46, 52]。

表 4 可见, 本研究人为将鸭绿沙塘鳢精巢分为前段、中段、后段, 发现鸭绿沙塘鳢精子密度前段显著高于中后段, 这在很多鱼类精巢中很少见, 如绿鳍马面鲈贮精囊可蓄积大量精子, 轻压鱼体腹部即可流出^[42]。一般情况下, 越靠近生殖突精子量应该越高, 但本研究与同属河川沙塘鳢、中华乌塘鳢研究结果一致^[45-46], 推测鸭绿沙

塘鳢贮精囊其功能也只是贮存少量精子, 贮精囊分泌和贮存的物质随着精液排出体外后, 对精子起到保护作用。鸭绿沙塘鳢精巢结构和功能与其繁殖行为紧密相关, 在繁殖期, 1 个鱼巢内往往存有 1 尾雄鱼和 1~4 尾雌鱼, 雌鱼产卵后, 雄鱼立即将精液排到鱼巢上部内表面, 为了完成受精, 雌雄鱼需多次排卵、排精。鸭绿沙塘鳢精巢前段精液浓度、精子密度和活力均高于中、后段, 鉴于此, 生产上可通过剖开鱼腹取出精巢, 剪取前段精巢进行人工授精。

3.1.3 精浆 pH 精浆 pH 的变化是影响精子能否获能的因素之一, 如自然条件下, 日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 精巢精子被精浆中的低 pH (pH 7.5) 和高 K^+ 包围, 但当它移动到精子导管时, 它会经历 pH 升高 (高达 8.0), 同时精浆中 K^+ 的浓度也会降低, 进而能被激活。从日本鳗鲡、虹鳟、大马哈鱼 (*O. keta*) 精巢中收集的未经精子导管的精子不能激活, 而将收集的精子在含有高 pH 溶液中培养后可被激活^[53-56]。不同个体、种类的精浆 pH 会有不同, 鸭绿沙塘鳢精液 pH 6.7~7.0, 呈弱酸性, 这与洛氏鳢 (*Rhynchocypris lagowskii* Dybowski) 6.67 接近, 与精浆呈弱碱性的鱼有差异, 如圆口铜鱼、鲢、拟赤梢鱼 (*Pseudaspius leptocephalus*)、松浦镜鲤 (*C. carpio* Songpu)、方正鲫 (*C. auratus*) 7.0~7.5, 大口鲶 (*Silurus meridionalis*) 7.3~7.5, 团头鲂、鲤、青鱼、鳊 6.5~7.5, 大黄鱼 6.72~7.25, 草鱼 6.5~8.0^[40,57-58]。

3.2 水温、pH 对精子活力的影响

水温是影响精子活力的关键因素之一, 一般认为水温与精子活力之间的关系是一条呈下降趋势的二次曲线^[24]。本研究得到类似的结果, 表 5 可见, 在 5~20 °C 时, 随着水温的上升, 精子活力增强, 在 20 °C 达到最高值, 在 20~26 °C 时, 随着水温的继续上升, 精子活力减弱。

研究表明, 大多数鱼类精子在弱碱性溶液中活力最强, 过碱或过酸都会降低其活力^[24,59]。表 6 可见, 本研究中, pH 在 5.0~8.0 时, 存在 50% 以上的精子被激活。在弱碱性的 $NaHCO_3$ 中 (pH 8.2~8.4) 鸭绿沙塘鳢精子仍然可保持较高的活力, 精子活力最适 pH 为 6.0, 这与马口鱼 (*Opsarii-*

chthys bidens)、中华乌塘鳢最适 pH 相同^[44,60], 与其他淡水鱼有一定差异。

3.3 离子浓度对精子活力的影响

表 7~10 可见, 低渗溶液会激发淡水鱼的精子活力, 受离子组成的影响。在本研究中, 所有的激活液, 无论是否存在离子, 都能够激活鸭绿沙塘鳢精子活力, 这一点在拉氏鳢 (*Phoxinus lagowskii*)^[61]、北方须鳢 (*Barbatula barbatula nuda*)^[62] 中也可观察到, 这证明鸭绿沙塘鳢精子是被低渗透性休克激活。本研究表明, 当 $NaCl$ 、 KCl 、 $CaCl_2$ 浓度分别为 68、54、27 mmol/L 时鸭绿沙塘鳢精子活力较强; 当 $MgCl_2$ 浓度为 11 mmol/L 时, 激活率较高, 在 53 mmol/L 时, 快速运动时间和寿命较高。

3.4 葡萄糖、甘油、Tris 对精子活力的影响

表 11~13 可见, 低浓度的葡萄糖、甘油、Tris 均可显著提高鸭绿沙塘鳢精子激活率。现有观点普遍认为, 外源葡萄糖可为精子运动供能, 白斑狗鱼 (*Esox Lucius*)、高白鲑、乌原鲤 (*Procypris merus*) 鱼类的精子处于一定浓度的葡萄糖溶液中, 可有效提高其精子活力^[38,63-64]。本研究中, 精子在葡萄糖 28 mmol/L 时活力最高。

Tris 常作为精液冷冻保存稀释液中的缓冲物质, 可以缓冲精液的酸碱度、调节渗透压以及为精子提供适宜的环境以暂时存活, 这有助于解冻后精子运动^[65]。本研究中, 4 mmol/L 的 Tris 可显著提高鸭绿沙塘鳢精子激活率, 99 mmol/L 的 Tris 可显著延长精子快速运动时间和寿命 ($P < 0.05$), 这与少量的 Tris 就使拉氏鳢^[61]、北方须鳢^[62] 精子活力降低不同。

甘油常作为渗透性保护剂, 可提高精子质膜的通透性, 引起水流入, 同时水流入导致的细胞膨胀可能继而打开膜张力依赖的离子通道, 精子被激活^[66]。在精子激活液方面, 使用适宜浓度的甘油可增强许多鱼类精子活力, 如高白鲑和高体雅罗鱼 (*Leuciscus idus*) 精子最适甘油浓度分别为 219 mmol/L 和 180 mmol/L^[67-68], 本研究中, 鸭绿沙塘鳢精子在 65 mmol/L 的甘油中, 精子可保持较高活力。

3.5 碱度对精子活力的影响

表 14 可见, $NaHCO_3$ 在水溶液电离、水解成

Na^+ 、 HCO_3^- 、 OH^- 、 CO_3^{2-} 、 H^+ ，在 20 °C 下， NaHCO_3 溶液浓度 10~120 mmol/L 时，pH 呈 8.2~8.4，水溶液中的 Na^+ 、高 pH 环境及游离的 CO_2 都会影响精子活力。已有研究表明，日本鳗鲡、虹鳟、大马哈鱼精巢中的精子在高 pH 溶液中可被激活^[53-56]。本研究下，碱度在 60 mmol/L 时，鸭绿沙塘鳢精子活力最强，随着碱度浓度升高，精子活力降低，渗透压增大是影响精子活力的主要原因。

3.6 复合因子对精子活力的影响

表 15 可见，在复合因子激活液中，精子活力与渗透压、离子(Na^+ 、 K^+)和非离子(甘油、Tris)相关。本研究中，组成成分具差异的 G1、G8 组，其渗透压基本相同，但激活率却相差 10%。此外，葡萄糖在组合 (G6、G7、G14、G15、G16、G17) 中无法提高精子激活率，而甘油、Tris 在组合(G9、G10、G12、G13、G14、G17)中，对提升精子激活率效果明显。其中精子在 KCl 40 mmol/L、甘油 33 mmol/L、Tris 4 mmol/L 组合成的激活液中精子活力最高。

研究表明，多数淡水鱼类精浆渗透压为 286~334 mOsm/kg，鲟类精浆渗透压较鲤科、鲑科鱼类低，通常精子需释放到低渗透的外界环境中才能运动，精浆与激活液渗透压相等或接近时，精子活动将受到抑制，如鲤、鲫和团头鲂精子活动最适渗透压为 150~200 mOsm/kg；中华鲟为 50 mOsm/kg^[30]。不同鱼类精子对渗透压的适应性不同，部分淡水鱼类精子可在较高渗透压激活液中快速运动，如乌鳢精子在激活液渗透压达到 300 mOsm/kg 时，仍可快速运动，北方须鳅、拉氏鳊精子分别在激活液渗透压 626、350 mOsm/kg 时，精子活力最高，这可能是由于鱼类精浆渗透压较高所导致^[61-62]。与北方须鳅、拉氏鳊精子在单因子激活液中活力较好，通过单因子的累加即可得到最适复合精子激活液不同，鸭绿沙塘鳢精子在单因子累加的复合激活液中不激活，需通过降低复合溶液渗透压，再进行多种组合，进而筛选出最佳复合因子激活液。

4 结论

鸭绿沙塘鳢精液浓度 23.10%，精子密度

(1.83 ± 0.03) $\times 10^9$ 个/mL，pH 为 6.9 \pm 0.1，精巢前段精液浓度、精子密度和活力高于中、后段，生产上可通过剖开鱼腹取出精巢，剪取前段精巢进行人工授精。单因子下，适当浓度的 NaCl、KCl、碱度、 CaCl_2 溶液可增强鸭绿沙塘鳢精子活力，低浓度的 MgCl_2 、葡萄糖、甘油、Tris 对鸭绿沙塘鳢精子激活率有较大提升。多因子下，鸭绿沙塘鳢精子在由 KCl 40 mmol/L、甘油 33 mmol/L、Tris 4 mmol/L 组合成的激活液中活力最好，生产上可使用此复合激活液，有效解决鸭绿沙塘鳢人工授精中精子活力低的问题，同时，本研究内容也可为其他珍稀鱼类精子激活液的筛选提供参考。

参考文献:

- [1] Wu H L, Zhong J S. Fauna of China, Osteichthyes, Gobioidae, Perciformes(V)[M]. Beijing: China Science Press, 2008: 158-159. [伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志, 硬骨鱼纲, 虾虎鱼亚目, 鲈形目(五)[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 158-159.]
- [2] Zhao Y H, Wu H L, Zhang C G. Threatened fishes of the world: *Odontobutis yaluensis* Wu, Wu & Xie, 1993 (Odontobutidae)[J]. Environmental Biology of Fishes, 2010, 88(3): 261-262.
- [3] Xie Y H, Li W K, Xie H. Freshwater Fishes in Northeast Region of China[M]. Shenyang: China Liaoning Science and Technology Press, 2007: 399-401. [解玉浩, 李文宽, 解涵. 东北地区淡水鱼类[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2007: 399-401.]
- [4] Luo X N, Zhao X W, Duan Y J. Exploitation and utilization of freshwater indigenous fishes in Liaoning Province: A review[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(2): 155-160. [骆小年, 赵兴文, 段友健. 辽宁省淡水土著鱼类开发利用研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(2): 155-160.]
- [5] Jiang Z G, Jiang J P, Wang H W, et al. Red list of China's vertebrates[J]. Biodiversity Science, 2016, 24(5): 501-551, 615. [蒋志刚, 江建平, 王跃招, 等. 中国脊椎动物红色名录[J]. 生物多样性, 2016, 24(5): 501-551, 615.]
- [6] Wang X R, Xu Z Y, Luo X N, et al. Artificial propagation and fry rearing of sleeper *Odontobutis yaluensis*[J]. Fisheries Science, 2013, 32(11): 662-667. [王新荣, 徐忠源, 骆小年, 等. 鸭绿沙塘鳢人工繁殖和苗种培育试验[J]. 水产科学, 2013, 32(11): 662-667.]
- [7] Zang X, Wang X J, Zhang G S, et al. Complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of *Odontobutis ya-*

- luensis*, Perciformes, Odontobutidae[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2016, 27(3): 1965-1967.
- [8] Li H J, He Y, Jiang J M, et al. Molecular systematics and phylogenetic analysis of the Asian endemic freshwater sleepers (Gobiiformes: Odontobutidae)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2018, 121: 1-11.
- [9] Duan Y J, Luo X N, Li W K, et al. Population fecundity and first maturity of Yalu River sleeper *Odontobutis yaluensis*[J]. Fisheries Science, 2022, 41(4): 652-657. [段友健, 骆小年, 李文康, 等. 鸭绿沙塘鳢种群繁殖力和初次性成熟研究[J]. 水产科学, 2022, 41(4): 652-657.]
- [10] Kowalski R K, Cejko B I. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors[J]. Theriogenology, 2019, 135: 94-108.
- [11] Knight O M, van der Kraak G. The role of eicosanoids in 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one-induced ovulation and spawning in *Danio rerio*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 213: 50-58.
- [12] Bondarenko V, Blecha M, Policar T. Changes of sperm morphology, volume, density, and motility parameters in northern pike during the spawning period[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(6): 1591-1597.
- [13] Bondarenko O, Dzyuba B, Cosson J, et al. Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: interspecies differences[J]. Theriogenology, 2013, 79(5): 872-881.
- [14] Dzyuba B, Bondarenko O, Fedorov P, et al. Energetics of fish spermatozoa: The proven and the possible[J]. Aquaculture, 2017, 472: 60-72.
- [15] Pérez L M. Chapter 4 fish sperm maturation, capacitation, and motility activation[M]//Reproduction in Aquatic Animals. Singapore: Springer Singapore, 2020: 47-67.
- [16] 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.
- [17] Gallego V, Pérez L, Asturiano J F, et al. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*)[J]. Aquaculture, 2013, 416-417: 238-243.
- [18] Beirão J, Boulais M, Gallego V, et al. Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction[J]. Theriogenology, 2019, 133: 161-178.
- [19] Ramos-Júdez S, González-López W Á, Huayanay Ostos J, et al. Low sperm to egg ratio required for successful *in vitro* fertilization in a pair-spawning teleost, Senegalese sole (*Solea senegalensis*)[J]. Royal Society Open Science, 2021, 8(3): 201718.
- [20] França T S, Motta N C, Egger R C, et al. Impact of activation solutions on fresh and frozen-thawed sperm motility and fertilization success for two species of migratory freshwater fishes[J]. Theriogenology, 2020, 149: 6-15.
- [21] Erraud A, Cornet V, Baekelandt S, et al. Optimal sperm-egg ratios for successful fertilization using fresh and cryopreserved sperm in wild anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar* L. 1758)[J]. Aquaculture, 2022, 549: 737758.
- [22] Xu M, Yang J, Jiang H F, et al. Effects of NaCl salinity and NaHCO_3 alkalinity on the sperm motility and fertilization rate of *Cynipus carpio*, *Carassius auratus gibelio* and *Barbus capito*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 720-728. [徐敏, 杨建, 姜海峰, 等. NaCl 盐度和 NaHCO_3 碱度对鲤、鲫和大鳞鲃的精子活力及其受精率的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 720-728.]
- [23] State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part III[M]. 2015 edition. China Medical Science and Technology Press, 2015: General Principles 36-37. [国家药典委员会. 中华人民共和国药典第三部[M]. 2015 年版. 中国医药科技出版社, 2015: 通则 36-37.]
- [24] Zhao H H, Liu X C, Lin H R, et al. Ultrastructure of spermatozoa and effects of salinity, temperature and pH on spermatozoa motility in *Epiniphelus coioides*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(4): 286-292. [赵会宏, 刘晓春, 林浩然, 刘付永忠, 王云新. 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): 286-292.]
- [25] 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.]
- [26] Billard R. A new technique of artificial insemination of salmonids using a sperm diluent[J]. Fisheries, 1977, 2(1): 27-28.
- [27] Chen X J, Liu B L, Lin D M. Sexual maturation, reproductive habits, and fecundity of fish[M]//Biology of Fishery Resources. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022: 113-142.
- [28] Chen C N, Huang Y Y, Chen X J, et al. Biological characteristics of *Acipenser dabryanus* sperm[J]. Chinese Journal of Zoology, 2015, 50(1): 75-87. [陈春娜, 黄颖颖, 陈先均, 等. 达氏鲟精子的主要生物学特性[J]. 动物学杂志, 2015, 50(1): 75-87.]
- [29] 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.]
- [30] Zheng Y P. Studies on physio-ecological characteristic of sperm of Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* gray[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007. [郑跃平. 中华鲟精子生理生态特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.]
- [31] Huang X R, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Studies on main biological characteristics of *Tridentiger trignocephalus* sperm[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(3): 275-281. [黄晓荣, 庄平, 章龙珍, 等. 纹缟虾虎鱼精子的主要生物学特性[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(3): 275-281.]
- [32] Hu W H, Dan C, Guo W J, et al. The morphology and gonad development of *Pelteobagrus fulvidraco* and its interspecific hybrid "Huangyou no.1" with *pelteobagrus vachelli*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(6): 1231-1238. [胡伟华, 丹成, 郭稳杰, 等. 黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优1号”形态及性腺发育的比较[J]. 水生生物学报, 2019, 43(6): 1231-1238.]
- [33] Wang J Q, Shi J G, Jiang Y S, et al. Ultrastructure of embryonic chorion surface in dark sleeper *Odontobutis yaluensis*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2009, 22(2): 1-5. [王吉桥, 史建国, 姜玉声, 等. 鸭绿沙塘鳢胚胎壳膜结构的电镜观察[J]. 水产学杂志, 2009, 22(2): 1-5.]
- [34] Billard R, Petit J, Jalabert B, et al. Artificial insemination in trout using a sperm diluant[M]//The Early Life History of Fish. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1974: 715-723.
- [35] Butts I A E, Trippel E A, Litvak M K. The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L.[J]. Aquaculture, 2009, 286(1-2): 89-94.
- [36] Hao C. Study on sperm cryopreservation technology of two important fresh water fish[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009. [郝忱. 两种淡水经济鱼类精子超低温冷冻保存技术的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.]
- [37] Liu P, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Study on cryopreservation of spermatozoa in cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baerii baerii*)[J]. Marine Fisheries, 2007, 29(2): 120-127. [刘鹏, 庄平, 章龙珍, 等. 人工养殖西伯利亚鲟精子超低温冷冻保存研究[J]. 海洋渔业, 2007, 29(2): 120-127.]
- [38] Gu W. Studies on the effects of Na⁺, K⁺, glucose and fructose on sperm motility in *Coregous peled*[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2005. [谷巍. Na⁺、K⁺、葡萄糖和果糖对高白鲑精子活力影响的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2005.]
- [39] Lin D J, You Y L. Physiological characteristics and cryopreservation of *Pseudosiaena crocea* (Richardson) sperms[J]. Tropic Oceanology, 2002, 21(4): 69-75. [林丹军, 尤永隆. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 69-75.]
- [40] Wang C L, Wu X B, Zhu Y J, et al. Analysis of physical and chemical properties of seminal plasma of *Coreius guichenoti*[J]. Freshwater Fisheries, 2017, 47(3): 41-44. [王昌霖, 吴兴兵, 朱永久, 等. 圆口铜鱼精浆的理化性质分析[J]. 淡水渔业, 2017, 47(3): 41-44.]
- [41] Tan J, Zhang Y G, Liu B X, et al. Comparison on the physiological characteristics of the sperm of the *Spinibarbus sinensis*, *Onychostoma simus* and *Procypris rabaudi*[J]. Freshwater Fisheries, 2006, 36(6): 3-7. [谭娟, 张耀光, 刘本祥, 等. 中华倒刺鲃、白甲鱼和岩原鲤精子的生理特性比较[J]. 淡水渔业, 2006, 36(6): 3-7.]
- [42] Wen H S, Yang Y P, Chen C F, et al. Histological observation of gonad structure and its repeated development in male *Navodon septentrionalis*[J]. Advances in Marine Science, 2010, 28(2): 209-215. [温海深, 杨艳平, 陈彩芳, 等. 绿鳍马面鲀重复发育雄性生殖腺结构与发育组织学观察[J]. 海洋科学进展, 2010, 28(2): 209-215.]
- [43] Cheng S, Chi M L, Gu Z M, et al. Influencing factors of sperm quality and cryopreservation of sperm of *Ophiopogon japonicus*[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2018, 54(6): 69-74. [程顺, 迟美丽, 顾志敏, 等. 河川沙塘鳢精子质量的影响因素及其精子超低温冷冻[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(6): 69-74.]
- [44] Jiang S G, Su T F, Yu D H, et al. The biological characteristics of *Bostrichthys sinensis* spermatozoa and its cryopreservation[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(2): 119-122. [江世贵, 苏天凤, 喻达辉, 陈竞春, 周立新. 中华乌塘鳢精子的生物学特性及其超低温保存[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 119-122.]
- [45] Jiang H X, You Y L, Lin D J, et al. Observation on the testicular morpha and structure of Chinese ocellated gudgeon, *Bostrichthys sinensis*[J]. Journal of Fujian Agricultural University (Natural Science), 2004, 33(1): 89-93. [江寰新, 尤永隆, 林丹军, 苏敏. 中华乌塘鳢鱼精巢的形态结构观察[J]. 福建农业大学学报, 2004, 33(1): 89-93.]
- [46] Zhao X Q. Reproductive system development and reproduction behavior in *Odontobutis potamophila* (Günther)[D]. Shanghai: East China Normal University, 2006. [赵晓勤. 河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)的生殖系统发育及其繁殖行为研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2006.]
- [47] Sundararaj B I. The seminal vesicles and their seasonal

- changes in the Indian catfish, *Heteropneustes*[J]. *Copeia*, 1958, 1958(4): 289.
- [48] Sundararaj B I, Nayyar S K. Effect of extirpation of “seminal vesicles” on the reproductive performance of the male catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch)[J]. *Physiological Zoology*, 1969, 42(4): 429-437.
- [49] Zhang Y G, Luo Q S, Zhong M C, et al. Studies on the developmental stages of testis, spermatogenesis and spermatoleosis in *Leiocassis longirostris*[J]. *Zoological Research*, 1992, 13(3): 281-287. [张耀光, 罗泉笙, 钟明超. 长吻鮠精巢发育的分期及精子的发生和形成[J]. *动物学研究*, 1992, 13(3): 281-287.]
- [50] Rosenblum P M, Pudney J, Callard I P. Gonadal morphology, enzyme histochemistry and plasma steroid levels during the annual reproductive cycle of male and female brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur[J]. *Journal of Fish Biology*, 1987, 31(3): 325-341.
- [51] Zheng X Z. Annual cycle change of testis of *Pelteobagrus fulvidraco* and the position of seminal vesicle in reproduction[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 1999. [郑小真. 黄颡鱼精巢的年周期变化及贮精囊在生殖中的地位[D]. 福州: 福建师范大学, 1999.]
- [52] Chen S X, Hong W S, Zhang Q Y, et al. Morphology and structure of the seminal vesicle in male *Boleophthalmus pectinirostris*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(5): 396-403. [陈仕玺, 洪万树, 张其永, 等. 雄性大弹涂鱼贮精囊的形态结构[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(5): 396-403.]
- [53] Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 17(1-6): 163-169.
- [54] Miura T, Kasugai T, Nagahama Y, et al. Acquisition of potential for sperm motility in vitro in Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. *Fisheries Science*, 1995, 61(3): 533-534.
- [55] Morisawa S, Morisawa M. Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1988, 136: 13-22.
- [56] Morisawa S, Morisawa M. Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1986, 126: 89-96.
- [57] Wang Y, Yang J, Geng L W, et al. Sperm characteristics of four cyprinid fishes and the effect of pH on their motility[J]. *Freshwater Fisheries*, 2020, 50(5): 94-98. [王雨, 杨建, 耿龙武, 等. 4 种鲤科鱼类精子特性及不同 pH 对其活力的影响[J]. *淡水渔业*, 2020, 50(5): 94-98.]
- [58] Luo X Z, Zou G W, Pan G B. Study on physiological characteristics of sperm of *Silurus meridionalis*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, 32(2): 51-53. [罗相忠, 邹桂伟, 潘光碧. 大口鲮精子生理特性的研究[J]. *淡水渔业*, 2002, 32(2): 51-53.]
- [59] Zhou L, Chen Y, Wang Y M. Main biological characteristics and influences of different aqueous solution, and pH on *Sinibotia reevesae* sperm[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2015, 28(5): 8-11. [周露, 陈瑜, 王永明. 宽体沙鳅精子生物学特性及水体和 pH 对其活力的影响[J]. *水产学杂志*, 2015, 28(5): 8-11.]
- [60] 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.]
- [61] Wu C, Luo X N, Duan Y J, et al. Effects of different metal concentration, temperature and pH on sperm motility of *Phoxinus lagowski*[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.]
- [62] 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、温度对北方须鲈精子活力的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(3): 462-469.]
- [63] Wu Q Y, Sun H C, Li Y Y. Effects of different K^+ , Ca^{2+} and glucose concentrations on sperm motility in Chinese ink carp *Procypris merus*[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(4): 202-205. [吴清毅, 孙翰昌, 李云瑶. 不同浓度的 K^+ 、 Ca^{2+} 和葡萄糖对乌原鲤精子活力的影响[J]. *水产科学*, 2011, 30(4): 202-205.]
- [64] Su D X, Yan A S, Tian Y S, et al. Effects of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and glucose on sperm mobility in northern pike, *Esox lucius*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2004, 39(1): 16-20. [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[J]. *动物学杂志*, 2004, 39(1): 16-20.]
- [65] Song G X, Zhang J X, Wang R J, et al. Trehalose and glycerol synergistically improve the cryopreservation of cashmere goat semen[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2021, 57(1): 114-119, 191. [宋国欣, 张家新, 王瑞军, 等. 海藻糖和甘油相互协同提高绒山羊精液冷冻保存品质[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(1): 114-119, 191.]
- [66] Takei G L, Mukai C, Okuno M. Regulation of salmonid fish

- sperm motility by osmotic shock-induced water influx across the plasma membrane[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015, 182: 84-92.
- [67] Lin M Y. The studies on controlling of sperm motility and artificial fertilization about *Coregonus peled* in sayram lake[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2017.
- [68] Zhang T, Li S Z, Niu J G, et al. Effects of Na⁺, K⁺, glucose and glycerinon on sperm motility of *Leuciscus idus*[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(4): 734-738. [张涛, 李胜忠, 牛建功, 等. Na⁺、K⁺、葡萄糖及甘油对高体雅罗鱼精子活力的影响[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(4): 734-738.]

Physiological characteristics of *Odontobutis yaluensis* sperm

LI Wenkang, LUO Xiaonian, DENG Hongsheng, DUAN Youjian, LI Jiao, WU Chen, JI Chenyue

College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: To explore the sperm physiology of *Odontobutis yaluensis* and improve sperm motility, the sperm concentration, sperm density, pH, and sperm motility of *O. yaluensis* were measured. Using sperm activation rate (AR), fast movement time (FT), and lifetime (LT) as indicators to evaluate sperm motility, the sperm motility under different water temperature, pH, ionic (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂), non-ionic (glucose, trisamine, glycerol), and alkalinity (NaHCO₃) conditions were studied. Seventeen groups of compound factor sperm activation solution were designed and screened. The results showed that the sperm motility, sperm density, and sperm concentration in the anterior segment of *O. yaluensis* testis were higher than those in the middle and posterior segment. The overall sperm density of the testis was $(1.83 \pm 0.03) \times 10^9/\text{mL}$, sperm concentration was 23.10%, and pH was 6.9 ± 0.1 . Under the single factor sperm activation solution, the sperm motility of *O. yaluensis* sperm was the highest under conditions of 20 °C water temperature, pH 6.0, NaCl 68 mmol/L, KCl 54 mmol/L, CaCl₂ 27 mmol/L, glucose 28 mmol/L, and glycerol 65 mmol/L, respectively. The activation rate was the highest in the activation solution with the concentration of MgCl₂ 11 mmol/L and Tris 4 mmol/L. Under the compound factor sperm activation solution, the sperm motility of sperm was the highest when the solution contained KCl 40 mmol/L, glycerol 33 mmol/L, and trisamine 4 mmol/L. In summary, in the artificial insemination of *O. yaluensis*, the spermatogenic part (front part) of the testis can be used directly, and the sperm motility can be improved by using the compound factor sperm activation solution (KCl 40 mmol/L, glycerol 33 mmol/L, and trisamine 4 mmol/L).

Key words: *Odontobutis yaluensis*; sperm physiology; sperm motility; sperm activation solution; artificial insemination

Corresponding author: LUO Xiaonian. E-mail: luoxiaonian@dlou.edu.cn