

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.07.011

# pH 值及不同百分浓度 NaCl 溶液对 齐口裂腹鱼精子活力的影响<sup>①</sup>

顾正选, 丁诗华

西南大学 动物科技学院, 重庆 400715

**摘要:** 为研究齐口裂腹鱼的精子活力, 在显微镜下观察了不同 pH 值及不同浓度 NaCl 溶液中精子的运动时间和寿命. 结果表明: 齐口裂腹鱼精子对 pH 值的适应范围在 5~9 之间, pH 值为 7 时精子的活力较好, 快速运动时间为  $(42.56 \pm 1.81)$  s, 精子寿命为  $(84.33 \pm 4.77)$  s; 齐口裂腹鱼精子最适的 NaCl 溶液百分浓度为 0.5%, 其快速运动时间为  $(42.78 \pm 3.03)$  s, 寿命为  $(119.89 \pm 11.75)$  s. 在较低百分浓度的 NaCl 溶液中, 精子寿命较长, 但是快速运动时间较短, 当 NaCl 百分浓度大于 0.7% 时, 精子基本上会被抑制, 加水稀释后精子被激活且不影响其活力. pH 值过低或过高都会破坏精子的生理结构, 使其死亡, 0.8%~0.9% NaCl 溶液可用作齐口裂腹鱼精液稀释剂室温暂时保存, 且短时间内不会影响其活力.

**关键词:** 齐口裂腹鱼; pH 值; NaCl; 精子活力

**中图分类号:** Q959.46+8

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2017)07-0072-05

齐口裂腹鱼 *Schizothorax prenanit* 是我国特有的重要冷水性经济鱼类, 隶属鲤科 Cyprinidae 裂腹鱼亚科 Schizothoracinae 裂腹鱼属 *Schizothorax*, 主要分布于我国长江上游的金沙江、岷江、大渡河、青衣江及乌江下游等水域<sup>[1-2]</sup>. 齐口裂腹鱼俗称“雅鱼”、细鳞鱼等, 其肉质细嫩, 味道鲜美, 营养价值高, 且少肌刺, 深受广大消费者的喜爱, 是我国重要的优良养殖品种. 随着长江上游干支流梯级电站开发和大量水利工程修建, 齐口裂腹鱼野生种群数量急剧减少, 资源匮乏, 天然捕捞量下降<sup>[3]</sup>. 有必要进行人工繁殖、使养殖产业不断开拓发展. 目前对齐口裂腹鱼的研究, 涉及肌肉组成、生理生化、生物学特征和人工繁殖等<sup>[4-8]</sup>. 关于齐口裂腹鱼精子活力方面的研究至今未见报道. 为此, 笔者进行了 pH 值及不同百分浓度 NaCl 溶液对齐口裂腹鱼精子活力影响的初步研究, 力求找出齐口裂腹鱼精子的最适宜 pH 值及 NaCl 百分浓度, 为其在人工授精过程中激活精子时有较好活力, 保证受精率提供理论数据支持.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验鱼由重庆市巫溪县曙光农业科技开发有限公司提供, 在 4 月份左右随机选择体格健壮、健康、吻部珠星明显、生殖孔突出微红、体质量平均在 1.2 kg 左右的雄性亲鱼作为试验鱼, 然后进行人工注射催产素, 暂养于催产池中. 实验仪器及试剂有电子天平、酸度计、秒表、移液枪、光学显微镜等, 在实验中用去离子水配制了 34, 51, 68, 85, 102, 119, 136, 153, 170 mmol/L, 即 0.2%~1.0% 共 9 个梯度百分浓度的 NaCl 溶液, 用去离子水滴加盐酸和氢氧化钠(分析纯)调配了 pH=3~11 共 9 个梯度的 pH 值溶液.

① 收稿日期: 2016-05-18

基金项目: 重庆市科委科技计划项目(cstc2015shmszx1068).

作者简介: 顾正选(1990-), 男, 云南曲靖人, 硕士研究生, 主要从事水产动物资源保护与利用研究.

通信作者: 丁诗华, 教授.

## 1.2 精子的采集

齐口裂腹鱼雄鱼注射催产素后,观察亲鱼的发情状况,效应时间 65 h 左右,即可开始采精,试验水温为 $(14\pm 1)$  °C. 采用干法采精,即采精前用毛巾擦干鱼体,防治精液遇水被激活. 用亲鱼夹固定亲鱼,轻挤压雄鱼腹部,用干燥的离心管保存精液. 在采集精液的过程中,要尽量避免精液受粪便、血及尿液的污染,样品保存在冰块环境中以待观察.

## 1.3 精子活力观察和测定

采精前准备好试验用的试剂和器材,调节好显微镜,方便能快速观察精子形态. 在显微镜下,用解剖针挑起少量精液于载玻片中央的稀释液中搅匀,同时按下秒表开始计时,在显微镜视野中观察精子的运动状态. 据文献报道<sup>[9]</sup>,精子活动分为 3 个阶段:① 快速运动期,其特征是精子的运动状态呈旋涡状,而且快速运动看不清其形态;② 慢速运动期,其特征是精子运动速度明显比快速运动期减慢,且其形态、运动路线都能看清;③ 摇摆运动期,精子只能在原地颤动,不能曲线运动,直至 90% 以上死亡. 精子寿命是指精子被激活起至绝大部分停止摇摆不运动所经历的时间. 各阶段之间的界限,以一个视野中 70% 左右的精子由前一运动状态转为后一运动状态划分,精子的死亡则是以视野中 95% 左右的精子停止运动为标准. 各项试验均重复 3 次,本次试验只记录精子快速运动时间和寿命.

## 1.4 数据处理

试验所得数据均采用 Excel 和 spss 20.0 软件分析,所有数据均以平均值±标准差表示,采用 S-N-K 法进行多重比较以检验其差异是否具有统计学意义, $p < 0.05$  表示差异具有统计学意义, $p > 0.05$  表示差异不具有统计学意义.

# 2 结果与分析

## 2.1 pH 值对齐口裂腹鱼精子活力的影响

不同 pH 值对齐口裂腹鱼精子活力影响结果见表 1. 由表 1 可以看出,齐口裂腹鱼精子对 pH 值的适应范围较广,当在  $pH \leq 4$  范围的稀释液中精子便不能存活,精液聚集成块凝固,加水稀释也没有活动迹象,当 pH 值超过 9 时,精子也不活动. 其余 pH 值范围水中精子均能活动,特别对弱碱性水有较强的适应力,在  $pH=7$  的稀释液中精子激活后,强烈运动时间和寿命都较长, $pH=7$  组的精子活力与  $pH=3\sim 5$  和  $pH=8\sim 11$  这几组相比,其快速运动时间和寿命的差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ),与  $pH=6$  和  $pH=8$  组差异不具有统计学意义( $p > 0.05$ ). pH 值较低或较高的稀释剂中,精子的强烈运动时间缩短,活力相应减小,受精率都受到较大影响. 因此,齐口裂腹鱼精子较适宜 pH 值为 7 左右,故建议在人工繁殖时,最好在  $pH=7$  左右的水体中进行. 若酸性水体,使用前最好用生石灰调节水体 pH 值的至中性,人工授精时精液稀释剂的 pH 值也应以中性为宜,这样有利于增强精子活力,提高受精率.

表 1 不同 pH 值对齐口裂腹鱼精子活力的影响

pH 值	快速运动时间/s	精子寿命/s	备 注
pH=3	0	0	精子聚集不动
pH=4	0	0	精子聚集不动
pH=5	35.89±2.67	72.11±5.30	50%被激活
pH=6	48.22±1.79	79.78±3.35	80%被激活
pH=7	42.56±1.81	84.33±4.77	活动正常
pH=8	35.67±3.39	63.00±4.12	80%被激活
pH=9	26.56±5.88	55.22±9.65	60%被激活
pH=10	0	0	精子聚集不动
pH=11	0	0	精子聚集不动

## 2.2 不同百分浓度 NaCl 溶液对齐口裂腹鱼精子活力的影响

不同百分浓度 NaCl 溶液(溶液 pH 值约为 7)对齐口裂腹鱼精子活力的影响见表 2. 从表 2 中可以看出,NaCl 百分浓度在 0.2%~0.5% 时,随着 NaCl 百分浓度增大,齐口裂腹鱼精子的快速运动时间呈上升趋势,并且在 0.5% 处达最大,为 $(42.78\pm 3.03)$  s,与其他组相比差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ),在 0.2%~0.4%

NaCl 溶液之间, 精子活力差异不具有统计学意义 ( $p > 0.05$ ). 0.5% NaCl 溶液的精子激活率达 90% 以上, 寿命相对较长, 快速运动时间长, 是人工授精稀释剂的理想 NaCl 百分浓度. NaCl 百分浓度超过 0.5% 后, 精子快速运动时间逐渐减小, 超过 0.7% 后, 精子被抑制, 基本上没有被激活, 加水稀释后精子被激活. 经试验, 齐口裂腹鱼精子在 0.75% NaCl 溶液中处于抑制状态, 加水稀释后被激活, 其快速运动时间平均为 43 s, 寿命平均为 94 s. 精液加在 0.75% NaCl 溶液, 18 °C 下保存 2 h 后, 在显微镜下观察精子处于抑制状态, 加水稀释后精子被激活, 激活率在 80% 以上, 其快速运动时间为 35 s, 寿命为 90 s, 说明较高百分浓度的 NaCl 溶液可以作为齐口裂腹鱼精液的稀释剂, 并可短时间保存精液且不影响其活力.

表 2 不同百分浓度 NaCl 溶液对齐口裂腹鱼精子活力的影响

NaCl 浓度/(mmol · L <sup>-1</sup> )	强烈运动时间/s	精子寿命/s	备 注
34(0.2%)	29.11 ± 1.97	143.22 ± 8.47	90% 激活
51(0.3%)	32.89 ± 2.03	127.56 ± 17.31	90% 激活
68(0.4%)	35.56 ± 1.88	132.22 ± 16.33	90% 以上激活
85(0.5%)	42.78 ± 3.03	119.89 ± 11.75	90% 以上激活
102(0.6%)	35.56 ± 0.91	107.00 ± 8.31	60% 以上激活
119(0.7%)	28.89 ± 0.75	98.78 ± 8.42	30% 以上激活
136(0.8%)	/	/	聚集不动, 加水稀释后 90% 被激活
153(0.9%)	/	/	聚集不动, 加水稀释后 90% 被激活
170(1.0%)	/	/	聚集不动, 加水稀释后 90% 被激活

## 3 讨 论

### 3.1 鱼类精子活力的激活机制

精子活力是评价精液质量的重要指标, 是精液保存和人工授精等研究的基础. 由于精子运动是细胞的一种运动方式, 其运动机理的研究有较高的理论价值<sup>[10]</sup>. 鱼类精液中由于精子过稠, 缺乏氧气与水分, 而二氧化碳浓度过高, 因此精子在精液中是不活动的, 但却有着极强的潜在活动能力. 由于精巢中诸多因素的抑制作用, 使得鱼类精子的成熟和储存得到很好的保障, 这也正是很多雄性鱼在整个繁殖期内可以一直产出活力良好精子的主要原因<sup>[11]</sup>. 低渗液和等渗液可以激活鱼类的精子. 由于鱼类精子的能量储存极为有限, 一旦被激活能量即被迅速消耗, 因而相对于体内受精的哺乳动物来说, 体外受精鱼类的精子寿命短暂, 一般只有几十秒至几分钟, 而哺乳动物可长达几个小时<sup>[12]</sup>. 因此, 在齐口裂腹鱼的人工繁殖过程中, 要研究了解其雄鱼的精子活力, 使得人工授精在精子活力最好时进行, 有利于提高受精率, 从而提高人工繁殖效果.

### 3.2 NaCl 对精子活力的影响

钠离子的主要生理功能是维持细胞内外渗透压平衡. 很多鱼类精浆中含有较高百分浓度的 Na<sup>+</sup>, 该离子是造成鱼类精巢内环境高渗透压的主要离子之一<sup>[11]</sup>. 从表 3 可以看出, 淡水鱼类精子被激活的最适 NaCl 百分浓度一般在 0.3%~0.7% 之间<sup>[13-16]</sup>, 范围较广, 激活齐口裂腹鱼精子的最适 NaCl 百分浓度为 0.5%, 即在此浓度范围内. 其中, 激活鲟鱼精子的最适 NaCl 百分浓度与齐口裂腹鱼一样都为 0.5%, 但是快速运动时间和精子寿命都比齐口裂腹鱼长<sup>[15]</sup>. 激活胭脂鱼精子的最适 NaCl 百分浓度为 0.6%, 其精子快速运动时间和寿命与齐口裂腹鱼相近<sup>[16]</sup>.

表 3 几种鱼类在最适浓度 NaCl 溶液中的精子活力

种 类	最适 NaCl 溶液/%	快速运动时间/s	精子寿命/s	参考文献
齐口裂腹鱼	0.5	42.78 ± 3.03	119.89 ± 11.75	
黄颡鱼	0.3	35	1098	[14]
禾花鱼	0.4	61.09 ± 3.12	196.56 ± 10.39	[13]
高白鲢	0.6	87.42 ± 5.20	182.58 ± 22.28	[12]
胭脂鱼	0.6	44.55 ± 4.83	153.96 ± 8.79	[16]
鲟鱼	0.5	74	247	[15]
大口鲶	0.4	30.5	212.5	[9]

根据本实验结果,结合其他相关资料,作者认为  $\text{Na}^+$  对鱼类精子活力的影响无论鲤科鱼类或是其他鱼类,都表现在其渗透压方面.精浆中通过  $\text{Na}^+$  及其他离子形成高于外界的高渗环境,当精液排入水中后,精浆中  $\text{Na}^+$  被稀释,精浆的高渗环境被破坏,使得精子激活.由于外界水体渗透压低于精子本身原生质,故该过程同时也是大量消耗精子自身能量的过程.所以,在鱼类人工授精过程中配制渗透压相近的  $\text{NaCl}$  稀释液,减少精子能量损失,延长精子持续活力时间,这对于提高受精率十分必要.本实验得到齐口裂腹鱼精子的等渗  $\text{NaCl}$  溶液在 0.75% 左右,故可以用 0.8%~0.9% 百分浓度的  $\text{NaCl}$  溶液做齐口裂腹鱼精液稀释剂室温暂时保存,且短时间内不会影响其活力.

### 3.3 pH 值对精子活力的影响

pH 值也是影响鱼类精子活力与寿命的重要因素.鱼类精子均适于在中性或偏碱性环境中活动,酸性环境会破坏精子细胞结构,使精子失活.从表 4 可以看出,黄颡鱼、大黄鱼、石斑鱼等多种鱼类精子活力最强时的 pH 值均在 7.5~9.0 之间,即在弱碱性范围内.但像禾花鱼、大口鲶等鱼类精子活力最强时的 pH 值在 6.5~7.0 左右,即中性附近.本次实验中,齐口裂腹鱼精子活力在  $\text{pH}=7$  左右,快速运动时间较长,这一结果与一般淡水鱼类相一致.在人工授精的过程中,如若要添加精液稀释剂,稀释剂的 pH 值也应该在 7 左右,以保证精子被激活且有较强的活力,保证人工授精的成功,提高人工授精率.

表 4 几种鱼类在最适 pH 值条件下的精子活力

种 类	最适 pH 值	快速运动时间/s	精子寿命/s	参考文献
齐口裂腹鱼	7.0	42.56±1.81	84.33±4.77	
黄颡鱼	8.0	29	90	[14]
禾花鱼	7.0	58.32±10.53	285.82±6.71	[13]
宽口光唇鱼	8.6	72.65±6.08	525.44±41.85	[17]
胭脂鱼	8.0	40.17±7.22	1148.55±26.13	[16]
大黄鱼	7.5	640.2	1074	[18]
斜带石斑鱼	8.4	780	1200	[19]
大口鲶	6.5	39.8	137.4	[9]

渗透压是调节鱼类精子活力的主要因子.近年来的研究表明<sup>[10]</sup>,鱼类精子激活比例随外界溶液渗透压的变化而变化,在一定范围内淡水鱼精子激活比例随外界溶液渗透压的降低而上升.  $\text{Na}^+$  只是影响精子活力的其中一种离子,有研究报道  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  是精浆的重要组成成分及形成精浆渗透压的主要离子,  $\text{Ca}^{2+}$  是调节鱼类精子活力的重要因子,外界环境的  $\text{Ca}^{2+}$  通过  $\text{Ca}^{2+}$  通道进入精子细胞使精子细胞的  $\text{Ca}^{2+}$  增加,是精子激活所必需的<sup>[20]</sup>. Morisawa 等<sup>[21]</sup>发现鲑科鱼类抑制精子活动的主要因素不是高渗透压,而是浓度高出血浆很多倍的  $\text{K}^+$ ,当精液排入淡水使  $\text{K}^+$  浓度降低,精子便被激活<sup>[22]</sup>.齐口裂腹鱼精子活力的影响因素,比如  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  等离子的影响有待于今后研究.

### 参考文献:

- [1] 陈毅峰,曹文宣.裂腹鱼亚科 [M] // 乐佩琦.中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目(下).北京:科学出版社,2000.
- [2] 丁瑞华.四川鱼类志 [M].成都:四川科学技术出版社,1994.
- [3] 李山友,周小宁,段玉磊.齐口裂腹鱼的生物学特性与资源保护 [J].内陆水产,2002(10):15.
- [4] 周波,龙治海,何斌.齐口裂腹鱼繁殖生物学研究 [J].西南农业学报,2013,26(2):811-813.
- [5] 张金平,姚楚成.齐口裂腹鱼的人工繁殖方法:中国,201010581349.0 [P].2012-06-06.
- [6] 严太明,唐仁军,刘小帅,等.齐口裂腹鱼鳞片发生及覆盖过程研究 [J].水生生物学报,2014,38(2):298-303.
- [7] 张金平,刘远高,冯德品,等.神农架齐口裂腹鱼繁殖生物学特征与人工繁殖技术 [J].淡水渔业,2015,45(3):52-56.
- [8] 周兴华,郑曙明,吴青,等.齐口裂腹鱼肌肉营养成分的分析 [J].大连水产学院学报,2005,20(1):20-24.
- [9] 罗相忠,邹桂伟,潘光碧.大口鲶精子生理特征的研究 [J].淡水渔业,2002,32(2):51-53.
- [10] 邓岳松,林浩然.鱼类精子活力研究进展 [J].生命科学研究,1999,3(4):271-278.
- [11] 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,1992,22(2):10-12.
- [12] 谷巍,李胜忠,蔡林钢,等.  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  对高白鲑精子活力影响的初步研究 [J].水利渔业,2005,25(2):8-10.

- [13] 孙翰昌, 李云瑶, 吴清毅. 不同浓度 NaCl 溶液及 pH 值对禾花鱼精子活力的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(3): 140-142.
- [14] 杨彩根, 宋学宏, 王永玲. pH 及不同浓度 NaCl 溶液对黄颡鱼精子活力的影响 [J]. 水利渔业, 2003, 23(3): 10-11.
- [15] 魏开金, 王汉平, 林加敬, 等. 氯化钠浓度对鲌鱼精子活力影响的初步观察 [J]. 淡水渔业, 1996, 27(4): 9-10.
- [16] 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.
- [17] 陈晓耘. 不同 pH 值下宽口光唇鱼精子活力的变化 [J]. 西南民族学院学报(自然科学版), 2000, 26(1): 72-75.
- [18] 朱冬发, 成永旭, 王春琳, 等. 环境因子对大黄鱼精子活力的影响 [J]. 水产科学, 2005, 24(12): 4-6.
- [19] 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): 28.
- [20] DETWEILER C, THOMAS P. Role of Ions and Ion Channels in the Regulation of Atlantic Croaker Sperm Motility [J]. J Exp Zool, 1998, 281(2): 139-148.
- [21] MORISAWA M, SUZUKI K, SCHIMIZU H, et al. Effects of Osmolality and Potassium on Motility of Spermatozoa from Freshwater Cyprinid Fishes [J]. J Exp Biol, 1983, 107(11): 95.
- [22] MORISAWA M, SUZUKI K. Osmolality and Potassium Ion: Their Roles in Initiation of Sperm Motility in Teleost [J]. Science, 1980, 210(4474): 1145-1147.

## Influence of pH and Different Concentrations of NaCl Solution on *Schizothorax prenani* Sperm Vitality

GU Zheng-xuan, DING Shi-hua

Animal Science and Technology Faculty, Southwest university, Chongqing 400715, China

**Abstract:** In order to study the sperm vitality of *Schizothorax*, microscopic examination was made of the movement time and life duration of the sperms of this fish species under different pH values and different NaCl concentrations. The results showed that *Schizothorax* sperm performed well in a pH range of 5~9, pH 7 being optimum for its vitality; its fast moving time was  $(42.56 \pm 1.81)$  s, and its life duration lasted  $(84.33 \pm 4.77)$  s, and that the optimal NaCl concentration in the solution for *Schizothorax* sperm was 0.5%, its fast moving time was  $(42.78 \pm 3.03)$  s, and its life duration was  $(119.89 \pm 11.75)$  s. In lower concentration of NaCl solution, the sperm lived longer, but its fast moving time was shorter. When NaCl concentration was greater than 0.7%, the sperm was largely contained. When the solution was diluted by water addition, the sperm would be re-activated and its vitality was not affected. In conclusion, pH, if too low or too high, would disrupt the physiological structure of the sperm, leading to its death; *Schizothorax* semen can be temporarily stored at room temperature with a 0.8%~0.9% NaCl solution as the diluent, and it will not die in a short period of time.

**Key words:** *Schizothorax prenani*; pH; NaCl; sperm motility

责任编辑 夏娟

