

doi: 10.12131/20180193

## 葡萄糖、丙三醇和盐对厚唇裂腹鱼精子活力的调控研究

胡 琼<sup>1</sup>, 李胜忠<sup>1</sup>, 曹景成<sup>2</sup>, 初洪伟<sup>2</sup>

(1. 新疆农业大学动物科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;  
2. 塔什库尔干县冷水鱼养殖开发有限责任公司, 新疆 喀什 845250)

**摘要:** 为了探究厚唇裂腹鱼 (*Schizothorax irregularis*) 精子活力的调控规律, 提高受精率和苗种生产效率, 文章采用显著性检验和响应面法, 研究了葡萄糖、丙三醇和 3 种盐对厚唇裂腹鱼精子活力的单项调控和复合项调控作用。结果表明, 葡萄糖为 433.7 kPa 时厚唇裂腹鱼精子的快速运动时间 (FT) 最大 (37.00 s), 显著高于其他组 ( $P<0.05$ ); 丙三醇为 506.7 kPa 时厚唇裂腹鱼精子的 FT 最大 (32.33 s), 与 416.3 kPa 组无差异, 但显著高于其他组 ( $P<0.05$ ); 氯化钠为 431.4 kPa 时厚唇裂腹鱼精子的 FT 最大 (35.00 s), 与 348.8 kPa 组无差异, 但显著高于其他组 ( $P<0.05$ ); 氯化钾对精子的激活效果不明显, 氯化镁则有抑制效果; 建立了厚唇裂腹鱼精子 FT 与葡萄糖、丙三醇和氯化钠的拟合方程, 该方程的一次效应、二次效应均极显著 ( $P<0.01$ ), 交互效应显著 ( $P<0.05$ ); 模型优化配方为氯化钠 164.78 kPa、丙三醇 216.55 kPa、葡萄糖 208.43 kPa, 理论 FT 为 68.24 s。运用响应面法优化的激活液配方, 能有效提高该鱼的精子活力。

**关键词:** 厚唇裂腹鱼; 精子活力; 葡萄糖; 丙三醇; 响应面分析法

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2019)02-0038-09

## Effects of glucose, glycerol and salt on spermatozoa motility of *Schizothorax irregularis*

HU Qiong<sup>1</sup>, LI Shengzhong<sup>1</sup>, CAO Jingcheng<sup>2</sup>, CHU Hongwei<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;  
2. Tashkurgan County Development of Cold Water Fish Culture Co., Ltd., Kashgar 845250, China)

**Abstract:** In order to explore the regulation rule of spermatozoa motility of *Schizothorax irregularis*, and to improve its fertilization rate and fingerling production efficiency, we applied a significance test and response surface method to study the single regulation and compound regulation of glucose, glycerol and three salts on sperm motility of *S. irregularis*. The results show that the maximum fast movement time of *S. irregularis* spermatozoa was 37.00 s when glucose was 433.7 kPa, significantly higher than those in the other groups ( $P<0.05$ ). The maximum fast movement time of *S. irregularis* spermatozoa was 32.33 s when glycerol was 506.7 kPa, without difference with that in 416.3 kPa group, but was significantly higher than those in the other groups ( $P<0.05$ ). The maximum fast movement time of *S. irregularis* spermatozoa was 35.00 s when sodium chloride was 431.4 kPa, without difference with that in 348.8 kPa group, but was significantly higher than those in the other groups ( $P<0.05$ ). Potassium chloride had no obvious effect on activating spermatozoa, and magnesium chloride solution showed inhibition effect for spermatozoa. An equation about the relation of fast movement time and glucose, glycerol and sodium chloride was established. The linear and quadratic effects of the equation were

收稿日期: 2018-08-31; 修回日期: 2018-10-17

资助项目: 新疆维吾尔自治区重点研发项目 (2016B01004-2)

作者简介: 胡 琼 (1993—), 女, 硕士研究生, 从事水产养殖与繁殖生理学研究。E-mail: 17609055776@163.com

通信作者: 李胜忠 (1964—), 男, 硕士, 副教授, 从事水产动物增殖与繁殖生理学研究。E-mail: xndlishengzhong@sina.cn

very significant ( $P < 0.01$ ), and interaction effect was significant ( $P < 0.05$ ). The optimized formulation of model was sodium chloride of 164.78 kPa, glycerol of 216.55 kPa, glucose of 208.43 kPa, and the theoretical FT was 68.24 s. The results indicate that the optimized activator formula by response surface methodology can improve the motility of *S. irregularis* spermatozoa.

**Key words:** *schizothorax irregularis*; sperm motility; glucose; glycerol; response surface methodology

鱼类精子活力一般指精子的群体运动状态和寿命长短,以精子中运动精子占精子总数的比例、精子运动持续时间等参数作为评价指标<sup>[1-3]</sup>。鱼类精子活力是评价精液质量和预测受精能力的关键因素,也是人工授精和精液保存的基础<sup>[4-7]</sup>,因此研究鱼类精子活力是鱼类种群资源保护和苗种生产的首要技术环节之一。甘芳等<sup>[8]</sup>证实适当浓度的盐及葡萄糖均可显著提高中华鲟(*Acipenser sinensis*)精子受精能力;宋勇等<sup>[9]</sup>证实 $2.0 \sim 3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的钠离子( $\text{Na}^+$ )和钾离子( $\text{K}^+$ )可使塔里木河流域的叶尔羌高原鳅(*Triplophysa yarkandensis*)精子快速运动时间极显著高于对照组;阮国良等<sup>[10]</sup>报道 $150 \text{ mOsm}$ (渗透质量摩尔浓度)的 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 混合激活液可让泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的受精率提高至55%。激活精子的水体环境因素对精子活力有很大影响,国内外研究表明,无机离子、渗透压、温度、pH等因素都会对鱼类精子活力的调控带来影响<sup>[4,11-12]</sup>。齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)精子在0.5%浓度的 $\text{Na}^+$ 溶液中活力最强<sup>[13]</sup>;泥鳅精子在pH为7.6的环境中活力最强,在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 时精子激活率最高<sup>[10]</sup>;新疆额尔齐斯河冷水鱼江鳕(*Lota lota*)进行多因子调控可大大增加精子活力,比对照组人工授精率提高了20%<sup>[1]</sup>。因此,开展鱼类精子活力方面的相关研究,不仅可以完善鱼类繁殖生理学理论,而且在指导渔业苗种生产方面具有重要意义。

裂腹鱼类属于中亚高山复合体,多见于水质清澈、低水温、高溶氧、强紫外线的高山溪流中,其生存环境苛刻,经济价值高,保护地位重要<sup>[14]</sup>。分布于新疆塔里木河中游河段的新疆扁吻鱼(*Aspiorhynchus laticeps*)、塔里木裂腹鱼(*S. biddulphi*)因受过度捕捞、水利工程建设、截流灌溉等人类活动的影响,已分别成为国家Ⅰ级保护鱼类和自治区Ⅱ级保护鱼类<sup>[15-16]</sup>;分布于云南河漾濞江支流水系的大理裂腹鱼(*S. taliensis*)受外来鱼类入侵、生态环境破坏的影响,种群数量急剧减少,已经列为国家Ⅱ级保护鱼类<sup>[17]</sup>,可见开展裂腹鱼类的研究极其重要。厚唇裂腹鱼(*S. irregularis*)隶属于鲤形目、鲤科、裂腹鱼属,主要分布在中国新疆塔里木河水

系的和田河、渭干河、叶尔羌河(塔什库尔干河道)等海拔 $1\ 300 \sim 3\ 200 \text{ m}$ 一带的河流中,该鱼肉质鲜嫩、味道鲜美,但自然种群资源越来越贫乏,现市场价格已高达 $300 \sim 500 \text{ 元} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[18-20]</sup>。因此深入开展厚唇裂腹鱼的资源保护、养殖开发技术和增殖放流的研究具有重要意义。

目前国内外关于厚唇裂腹鱼的研究仅见于厚唇裂腹鱼的资源状况<sup>[21]</sup>、自然生长情况<sup>[22]</sup>、形态分类<sup>[23]</sup>等方面,在厚唇裂腹鱼精子活力调控方面尚未见报道。本文以厚唇裂腹鱼精子为研究对象,采用单因素方差及Duncan分析法对单因素进行筛选,通过曲面响应研究多因素对厚唇裂腹鱼精子活力的复合调控作用,旨在筛选出厚唇裂腹鱼精子的最佳激活液配方,为厚唇裂腹鱼养殖开发、人工繁殖及种群资源保护提供理论依据和数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验雄性厚唇裂腹鱼于2017年4—6月采于新疆喀什地区塔什库尔干河流中,使用地笼网采集3次,共16尾雄鱼暂养在池塘里。选择12尾身体健壮活泼、体色鲜亮、性成熟好的雄鱼[体长为 $(34.1 \pm 3.6) \text{ cm}$ ,体质量为 $(1.26 \pm 0.41) \text{ kg}$ ]进行精液采集。实验所用的溶质葡萄糖、丙三醇、氯化钠、氯化钾、氯化镁均为分析纯,溶剂为蒸馏水。

### 1.2 实验方法

1.2.1 精液采集 于2017年5月26日进行精液采集,采集时瞬时气温 $18 \text{ }^\circ\text{C}$ ,水温 $14 \text{ }^\circ\text{C}$ 。用干燥洁净的毛巾擦去鱼体表面及生殖孔附近的水分,轻压鱼腹部使精液流出,滴入干燥洁净的培养皿中待用。采集精液时要避免阳光和高温的影响,实验精液应为乳白色、黏稠状且无血无尿液等污染。

1.2.2 单因素调控实验设计 以葡萄糖、丙三醇、氯化钠、氯化钾、氯化镁为溶质,根据范特霍夫公式计算配制渗透压为 $150 \text{ kPa}$ 、 $250 \text{ kPa}$ 、 $350 \text{ kPa}$ 、 $450 \text{ kPa}$ 、 $550 \text{ kPa}$ 、 $650 \text{ kPa}$ 、 $750 \text{ kPa}$ 的7个梯度试剂备用,选用蒸馏水( $0 \text{ kPa}$ )为空白对照。由于试剂受配置时温度、实验操作等影响,调控试

剂以校准为准,其中氯化钠、氯化钾渗透压梯度为146.9 kPa、247.8 kPa、348.8 kPa、431.4 kPa、527.8 kPa、624.1 kPa、720.5 kPa;氯化镁渗透压梯度为151.4 kPa、247.8 kPa、347.6 kPa、433.7 kPa、537.0 kPa、626.4 kPa、722.8 kPa;葡萄糖渗透压梯度为149.2 kPa、247.8 kPa、346.5 kPa、433.7 kPa、527.8 kPa、624.1 kPa、720.5 kPa;丙三醇渗透压梯度为143.2 kPa、237.9 kPa、332.6 kPa、416.3 kPa、506.7 kPa、599.2 kPa、691.7 kPa。

1.2.3 多因素调控实验设计 根据单因素调控厚唇裂腹鱼精子活力的实验结果,选出精子活力好的3种物质,作为多因素调控的因子。采用三因素三水平的Box-Benhnken实验设计,因子水平分别编码为-1、0、1,实验点共有15个,零点重复3次,每个实验点重复做3次取平均值。

### 1.3 精子活力观察

本实验在10×40倍显微镜视野下观察精子活力,取一滴激活液于洁净干燥的载玻片上,用干净牙签蘸取少许精液,置于载玻片上的激活液中,迅速混合均匀(以1 μL精液混入100 μL蒸馏水中观察)。当精液与激活液接触时立即秒表计时并录制视频便于后续观察。每个渗透压梯度做3次,取其平均值。

精子活力观察标准参照苏德学等<sup>[24]</sup>的标准,视野中精子呈黑点状,精子在快速运动阶段速度非常快,看不清运动轨迹;精子在中速运动阶段可看清运动轨迹;精子在慢速运动阶段呈缓慢移动、停顿、原地颤动,直至死亡。以大约70%以上精子由快速运动转入中速运动所需时间记为快速运动时间(fast movement time, FT),大约95%以上精子从开始至停止颤动所需时间记为寿命时间(life time, LT)。精子激活率(activation rate, AR)是精子激活后视野中运动精子占所有精子的百分数。

### 1.4 数据处理及分析

使用SPSS 19.0统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),并使用Duncan法进行多重比较分析。复合因素用Design Expert 8.0.6软件对Box-Benhnken设计中的各实验点数据进行方差分析及多元回归分析。

## 2 结果

### 2.1 对厚唇裂腹鱼精子活力的单独调控结果

在149.2~433.7 kPa葡萄糖溶液渗透压区段间,

厚唇裂腹鱼精子的FT和LT随着渗透压数值的上升而增大;在433.7 kPa时厚唇裂腹鱼精子的FT和LT有最大值,分别是(37.00±1.00) s和(103.67±3.05) s,其中FT显著高于527.8 kPa的FT( $P<0.05$ ),极显著高于其他葡萄糖组和对照组( $P<0.01$ ),LT与527.8 kPa时无显著差异( $P>0.05$ ),但极显著高于其他葡萄糖组和对照组( $P<0.01$ );在624.1~720.5 kPa葡萄糖溶液渗透压区段间,厚唇裂腹鱼精子的FT和LT迅速降低,表现出凝结成块无运动情况(图1-a)。AR的变化趋势与FT和LT类似,在渗透压433.7 kPa时有最大值(95%)。

在143.2~506.7 kPa丙三醇溶液渗透压区段间,厚唇裂腹鱼精子的FT随着渗透压数值的上升而缓慢增大,在506.7 kPa时出现最大值(32.33±1.53) s,与416.3 kPa的FT无显著差异( $P>0.05$ ),极显著高于其他丙三醇组和对照组( $P<0.01$ ),在506.7 kPa后厚唇裂腹鱼精子的FT迅速降低;而厚唇裂腹鱼精子的LT随着渗透压的上升,在332.6 kPa有最大值为(118.33±2.52) s,极显著高于其他丙三醇组和对照组( $P<0.01$ );416.3~691.7 kPa丙三醇溶液渗透压区段间LT降低,在691.1 kPa时精子出现凝结不动现象( $P<0.01$ ,图1-b),AR则在416.3 kPa时最大(95%)。

氯化钠、氯化钾、氯化镁3种盐对厚唇裂腹鱼精子活力的调控结果见图1-c、1-d、1-e,厚唇裂腹鱼精子的FT、LT和AR3个活力指标在氯化钠溶液中的调控结果均极显著好于氯化钾溶液、氯化镁溶液( $P<0.01$ ),其中在氯化钠溶液为431.4 kPa时精子的FT、LT有最大值,分别为(35.00±2.00) s和(104.67±4.16) s,与348.8 kPa的精子运动情况无显著差异( $P>0.05$ ),但极显著高于其他氯化钠组和对照组( $P<0.01$ )。

### 2.2 对厚唇裂腹鱼精子活力的共同调控结果

#### 2.2.1 响应面实验设计结果及FT评价模型的建立

根据单因素调控厚唇裂腹鱼精子活力的实验结果,选择葡萄糖、丙三醇和氯化钠为复合调控因素进行响应面实验分析,设计将渗透压水平降低一半,设计方案及结果见表1。由于鱼类精卵结合率主要受精子快速运动时间影响,因此通过实验结果分析建立了厚唇裂腹鱼快速运动时间FT(Y)与氯化钠(A)、丙三醇(B)和葡萄糖(C)因素间的多元线性回归方程: $Y=-5.0417\times 10^{-3}A^2-2.1907\times 10^{-3}B^2-3.1067\times 10^{-3}C^2-7.0900\times 10^{-4}AB-1.0230\times 10^{-3}AC-8.8600\times$

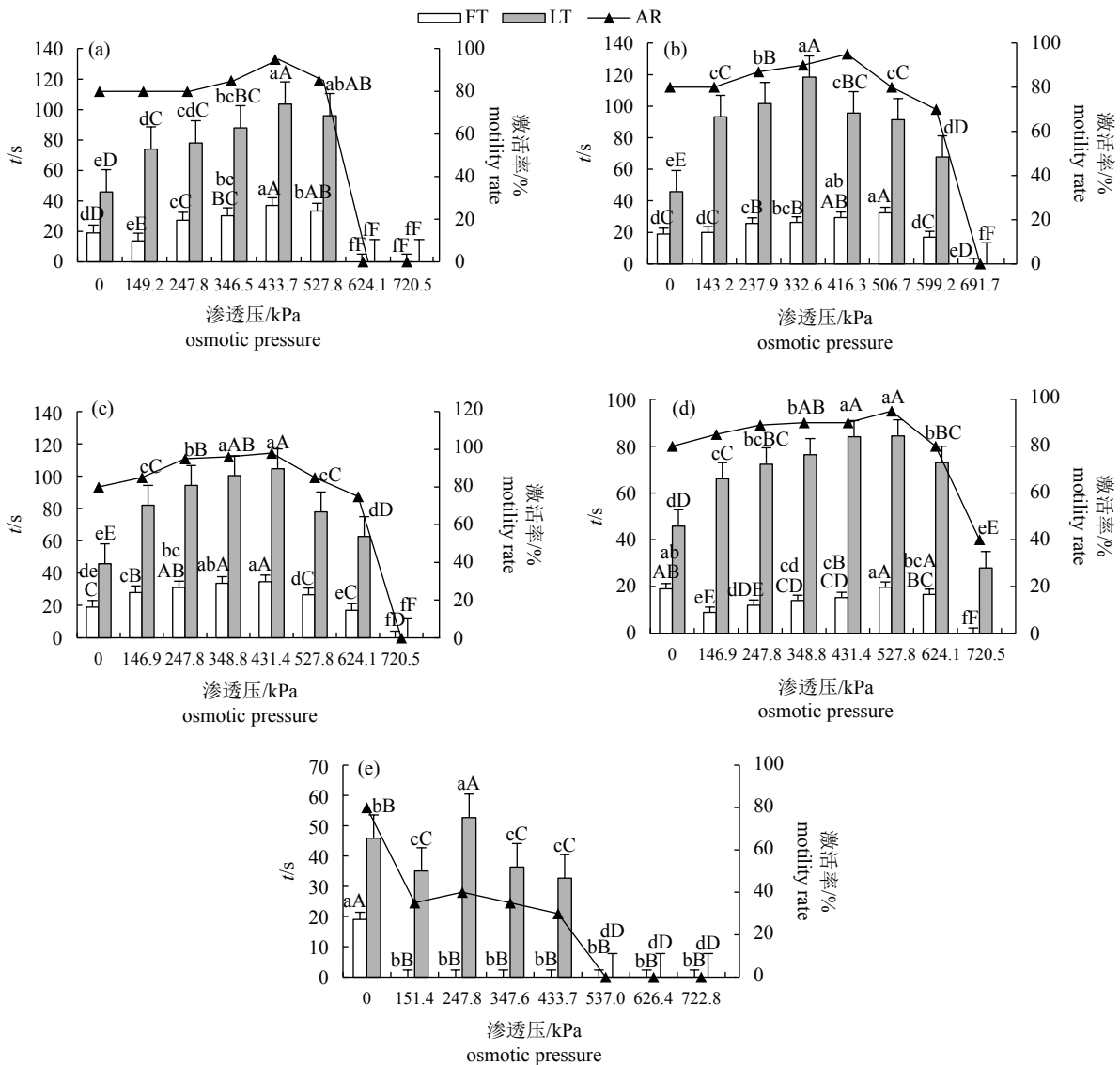


图1 厚唇裂腹鱼精子在不同渗透压溶液中的活力情况

a. 葡萄糖溶液; b. 丙三醇溶液; c. 氯化钠溶液; d. 氯化钾溶液; e. 氯化镁溶液; 小写字母表示显著水平为 0.05, 大写字母表示显著水平为 0.01

Fig.1 Spermatozoa motility of *S. irregularis* at different osmotic pressures

a. glucose solution; b. glycerol solution; c. sodium chloride solution; d. potassium chloride solution; e. magnesium chloride solution; lowercase letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ), while capital letters indicate very significant difference ( $P<0.01$ ).

$10^{-4}BC+2.0787A+1.2503B+1.6557C-406.8765$ 。

2.2.2 模型的方差分析及响应曲面的分析 本研究建立的厚唇裂腹鱼精子快速运动时间 ( $Y$ ) 模型可行 ( $P<0.01$ , 表 2); 回归模型的决定系数  $R^2$  为 0.994 0, 校正系数  $R^2_{Adj}$  为 0.983 2, 表明实验误差小; 模型失拟项  $P$  为 0.978 4 ( $P>0.05$ ), 说明模型有效, 拟合度好, 可以很好地分析和预测复合激活液对厚唇裂腹鱼精子的激活效果。模型中各项系数的显著性检验结果显示, 一次项氯化钠 ( $A$ )、丙三醇 ( $B$ ) 和葡萄糖 ( $C$ ) 对 FT 影响均极显著 ( $P<0.01$ ); 交互项

$AB$ 、 $AC$  和  $BC$  对 FT 影响显著 ( $P<0.05$ ); 二次项  $A^2$ 、 $B^2$  和  $C^2$  对 FT 影响均极显著 ( $P<0.01$ ), 综合分析得到 NaCl、丙三醇和葡萄糖 3 种因素对厚唇裂腹鱼精子 FT 的调控力度排序为葡萄糖 ( $C$ )>氯化钠 ( $A$ )>丙三醇 ( $B$ )。氯化钠、丙三醇和葡萄糖对厚唇裂腹鱼精子调控的响应面分析结果显示, 氯化钠和丙三醇、氯化钠和葡萄糖、葡萄糖和丙三醇对响应值 ( $Y$ ) 的交互作用均呈开口向下的山丘状, 二维等高线呈近椭圆形, 因此它们之间的交互作用均对厚唇裂腹鱼精子 FT 影响显著 (图 2、图 3 和图 4)。



表1 响应面实验方案及结果

Tab.1 Response surface design and results

实验组 group	编码值/kPa coded value			快速运动时间/s fast movement time
	A-氯化钠 A-NaCl	B-丙三醇 B-glycerol	C-葡萄糖 C-glucose	
1	0 (175)	0 (225)	0 (225)	66.74±0.61
2	0 (175)	1 (275)	1 (275)	41.66±0.39
3	0 (175)	0 (225)	0 (225)	64.12±0.38
4	-1 (125)	0 (225)	-1 (175)	55.54±0.05
5	-1 (125)	-1 (175)	0 (225)	55.68±0.11
6	1 (225)	-1 (175)	0 (225)	46.30±0.10
7	-1 (125)	1 (275)	0 (225)	53.81±0.80
8	0 (175)	1 (275)	-1 (175)	58.21±0.45
9	0 (175)	-1 (175)	1 (275)	52.46±1.25
10	1 (225)	1 (275)	0 (225)	37.34±0.61
11	-1 (125)	0 (225)	1 (275)	48.64±1.55
12	0 (175)	-1 (175)	-1 (175)	60.15±0.42
13	1 (225)	0 (225)	-1 (175)	48.46±0.35
14	0 (175)	0 (225)	0 (225)	68.23±0.61
15	1 (225)	0 (225)	1 (275)	31.33±0.24

注：快速运动时间的数值为均值±标准差，零点重复3次

Note: FT value is  $\bar{X} \pm SD$ , and zero point is repeated 3 times.

2.2.3 响应模型的优化和验证 本实验响应模型的优化结果显示，氯化钠在 164.78 kPa、丙三醇在 216.55 kPa、葡萄糖在 208.43 kPa 时有最优复合激活液，此时厚唇裂腹鱼精子 FT 理论值最高，为 68.24 s。经过验证，最优复合激活液下的厚唇裂腹鱼精子 FT 为  $(67.61 \pm 0.25) s$  ( $P > 0.05$ )，结果与理论预测时间基本相符，说明响应模型方程可以预测厚唇裂腹

鱼精子的 FT。

### 3 讨论

#### 3.1 葡萄糖对厚唇裂腹鱼精子活力的影响

适宜的葡萄糖可很好地提高鱼类精子活动，这一结论已被许多研究报道。研究表明在 203.7 kPa 的葡萄糖溶液中泥鳅精子的 FT 为 81.57 s，LT 为

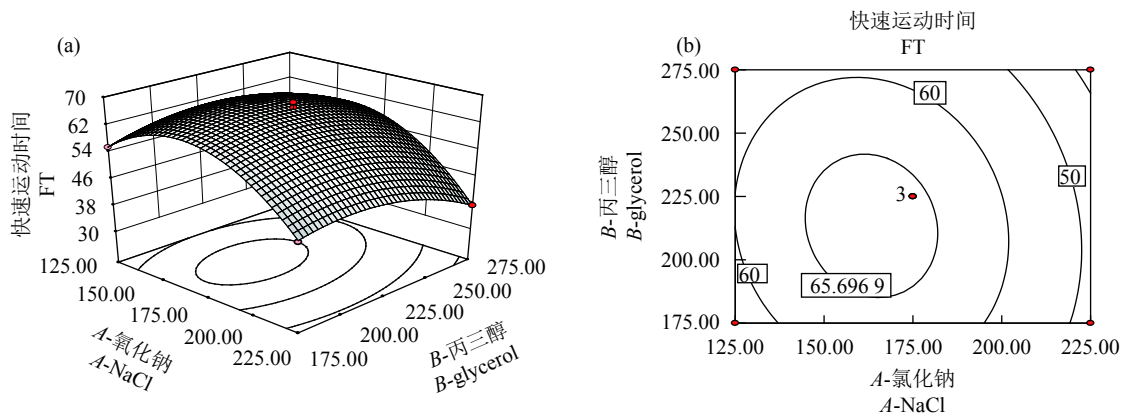


图2 氯化钠和丙三醇对厚唇裂腹鱼精子快速运动时间的响应面 (a) 及等高线 (b)

Fig.2 Response surface (a) and contour plot (b) of effects of NaCl and glycerol on *S. irregularis* spermatozoa

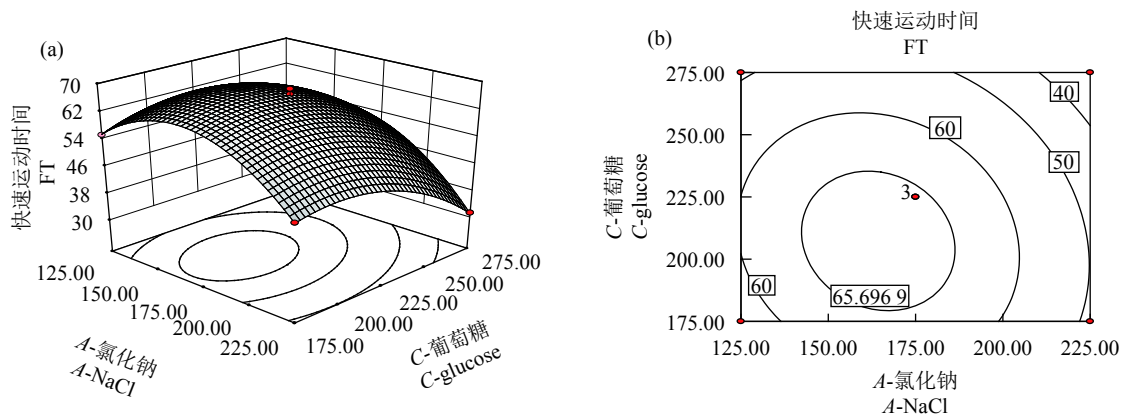


图3 氯化钠和葡萄糖对厚唇裂腹鱼精子快速运动时间的响应面 (a) 及等高线 (b)

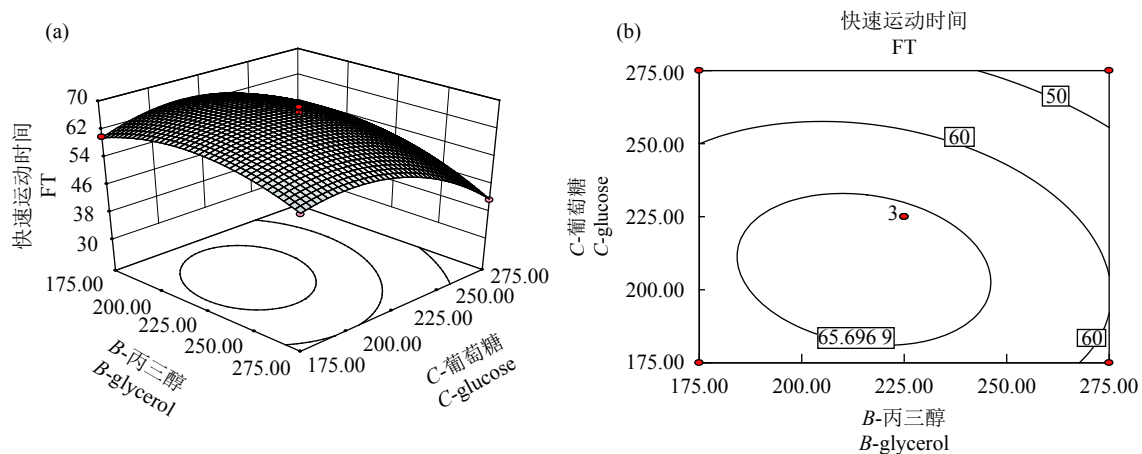
Fig.3 Response surface (a) and contour plot (b) of effects of NaCl and glucose on *S. irregularis* spermatozoa

图4 葡萄糖和丙三醇对厚唇裂腹鱼精子快速运动时间的响应面 (a) 及等高线 (b)

Fig.4 Response surface (a) and contour plot (b) of effects of glucose and glycerol on *S. irregularis* spermatozoa

159.57 s, 均极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于对照组蒸馏水<sup>[25]</sup>; 葡萄糖在  $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时萨罗罗非鱼 (*Sarotherodon melanotheron*) 精子的 FT 为 58.67 s, 极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于蒸馏水组, 在  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  中精子的 LT 为 281.33 s, 极显著高于蒸馏水组<sup>[26]</sup>; 同样丁鲶鱼 (*Tinca tinca*) 精子在 226.5 kPa 中 FT 为 46 s、LT 为 325 s, 均极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于对照组蒸馏水<sup>[24]</sup>。本研究证实适宜的葡萄糖溶液同样也可提高厚唇裂腹鱼精子运动时间, 在渗透压 433.7 kPa 时厚唇裂腹鱼精子的 FT 和 LT 达最大, 分别为  $(37.00 \pm 1.00) \text{ s}$  和  $(103.67 \pm 3.05) \text{ s}$ , 均极显著高于对照组; 但在 624.1~720.5 kPa 葡萄糖溶液渗透压区段间, 厚唇裂腹鱼精子则表现为无运动状态。因此笔者认为葡萄糖对鱼类精子活力的影响机制有 2 种情况: 1) 葡萄糖作为精浆中重要的碳水化合物之一, 与激活液中的葡萄糖存在着渗透压差的平衡关

系, 适宜的渗透压差可以降低精子运动时的能量消耗, 从而延长鱼类精子的运动时间<sup>[27]</sup>; 2) 葡萄糖可作为细胞外源性能源提高精子活力。研究发现体外受精的鱼类精子具有三羧酸循环代谢的能力, 当能量被消耗时可利用细胞外源碳水化合物 (葡萄糖、果糖等), 通过氧化作用参与能量补偿<sup>[25-27]</sup>。

### 3.2 丙三醇对厚唇裂腹鱼精子活力的影响

丙三醇作为动物精液冷冻保存抗冻剂一直备受关注, 近几年才被作为动物精子的激活剂进行研究, 例如丙三醇对公牛精液的激活可引起精子渗透压升高<sup>[28]</sup>。在鱼类精子中丙三醇具有渗透质膜作用, 丙三醇处理鲑科鱼类精子后, 可以渗透精子质膜, 引起渗透休克诱导胞内钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 短暂动员, 从而提高精子活动<sup>[29-30]</sup>。本研究表明适宜的丙三醇对厚唇裂腹鱼精子活力同样有较好的提高作用, 这一结果与高体雅罗鱼 (*Leuciscus baicalensis*)

表2 响应面模型方差分析

Tab.2 Variance analysis of response surface model

方差来源 source	平方和 sum of squares	自由度 df	均方 $R^2$	$F$	$P$	显著性 significance
模式 model	1 553.12	9	172.57	91.92	<0.000 1	**
A-氯化钠 A-NaCl	315.51	1	315.51	168.06	<0.000 1	**
B-丙三醇 B-glycerol	69.44	1	69.44	36.99	0.001 7	**
C-葡萄糖 C-glucose	291.25	1	291.25	155.14	<0.000 1	**
AB	15.57	1	12.57	6.69	0.049 0	*
AC	26.16	1	26.16	13.94	0.013 5	*
BC	19.62	1	19.62	10.45	0.023 1	*
$A^2$	586.58	1	586.58	312.45	<0.000 1	**
$B^2$	110.75	1	110.75	58.99	0.000 6	**
$C^2$	222.72	1	222.72	118.64	0.000 1	**
剩余 residual	9.39	5	1.88	—	—	—
失拟项 lack of fit	0.73	3	0.24	0.056	0.978 4	—
误差 pure error	8.66	2	4.33	—	—	—
总和 cor total	1 562.50	14	—	—	—	—

注: \*\*. 差异极显著 ( $P<0.01$ ); \*. 差异显著 ( $P<0.05$ ); -. 无此项内容或差异不显著 ( $P>0.05$ );  $R^2=0.994\ 0$ ,  $R_{Adj}^2=0.983\ 2$ ,  $R_{Pred}^2=0.980\ 1$

Note: \*\*. very significant difference ( $P<0.01$ ); \*. significant difference ( $P<0.05$ ); -. no such content or insignificant difference ( $P>0.05$ );  $R^2=0.994\ 0$ ,  $R_{Adj}^2=0.983\ 2$ ,  $R_{Pred}^2=0.980\ 1$

和白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 精子基本一致<sup>[31-32]</sup>。丙三醇在渗透压 506.7 kPa 时 FT 有最高值 [(32.33±1.53) s], 极显著高于对照组 ( $P<0.01$ )。

### 3.3 盐类对厚唇裂腹鱼精子活力的影响

盐类物质溶解到水体后, 阳离子多数以金属离子形式存在于水体中, 阴离子则以酸根离子形式存在于水体中。本实验所用的氯化钠、氯化钾、氯化镁 3 种盐类物质溶于水后, 阴离子均相同, 阳离子分别为  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、镁离子 ( $\text{Mg}^{2+}$ ), 但是氯化钠、氯化钾、氯化镁 3 种盐类溶液调控厚唇裂腹鱼精子活力的结果完全不同, 在调控作用大小上表现出氯化钠>氯化钾>氯化镁。因此, 笔者认为实际调控精子活力的作用在于盐类中的阳离子, 即  $\text{Na}^+>\text{K}^+>\text{Mg}^{2+}$ 。

盐类中的阳离子及渗透压对鱼类精子活力可能存在着双向调控作用, 这又可能与阳离子浓度及渗透压的高低差异有关, 而出现促进或抑制鱼类精子活力的情况。例如国外研究表明鲑鱼、鲟鱼的精子活力受到  $\text{K}^+$  浓度和渗透压的共同控制, 在适宜渗透压下细胞外部  $\text{K}^+$  浓度下降触发启动精子活动的信号, 引起质膜的超级化及  $\text{K}^+$  外流, 腺苷酸环化酶

的激活诱导 cAMP 的合成, 使精子启动运动<sup>[30,33]</sup>。我国对金属离子及渗透压调控鱼类精子活力的研究有很多, 例如顾正选和丁诗华<sup>[13]</sup> 证实 34~119  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}^+$  溶液中均可以提高齐口裂腹鱼精子活力, 在 85  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}^+$  溶液中 FT 有最大值 (42.78 s); 苏德学等<sup>[34]</sup> 研究表明白斑狗鱼精子在 453.0 kPa 的  $\text{K}^+$  溶液中活力最好, FT 为 48.45 s, 极显著高于蒸馏水组, 453.0 kPa 之后精子活力立即下降; 吴清毅等<sup>[35]</sup> 证实乌原鲤 (*Procypris mera*) 精子在 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}^+$  溶液中 FT 有最高值 (83.76 s), 显著高于对照组, 150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  后精子的 FT 迅速下降至零。王芳等<sup>[36]</sup> 证实 1~20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$  溶液对翘嘴红鲌 (*Erythroculter ilishaeformis*) 精子活力调控作用弱于蒸馏水空白组, 表现出明显抑制作用。

本研究发现厚唇裂腹鱼精子同样也受离子和渗透压的共同调控, 在渗透压 146.9~431.4 kPa 的  $\text{Na}^+$  溶液中可显著提高 FT、LT 和 AR, 这种促进鱼类精子活力的作用与上述研究一致<sup>[13]</sup>; 在  $\text{K}^+$  溶液中 FT 最高的渗透压组 (527.8 kPa) 的 FT 与对照组无显著差异, 而 LT 和 AR 则显著高于对照组, 表示  $\text{K}^+$

并未对厚唇裂腹鱼精子的快速运动有促进作用,这与上述研究略有不同<sup>[34-35]</sup>;在151.4~722.8 kPa的 $Mg^{2+}$ 溶液中厚唇裂腹鱼精子活力表现出抑制状态,精子没有快速运动,这种抑制厚唇裂腹鱼精子活力的作用与王芳等<sup>[36]</sup>的报道基本相同。之所以各种金属离子在调控不同鱼类精子活力时,会表现出不同的调控作用,笔者认为可能存在以下几种原因:1)由于各种鱼类的生物属性不同,精子活力也会呈现出不同的规律;2)各金属离子在鱼类精浆中的含量不同,导致激活液与精浆中的渗透压差不同,例如 $K^+$ 在鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)精浆中的浓度分别是血浆的29倍和18倍<sup>[34]</sup>;3)各鱼类所在水体环境不同,鱼类在适应水体环境中会发生一些生理性状的变化,水体环境条件与鱼类精子活力激活条件存在一定相似性。

### 3.4 氯化钠、丙三醇和葡萄糖复合液对厚唇裂腹鱼精子活力的交互影响

淡水鱼类精子进入水环境后其活力受到渗透压、各种无机离子、有机物质及pH的影响<sup>[6,12]</sup>,这些环境因子对鱼类精子活力的复杂影响越来越受到国内外的关注。我国在鱼类黄鳝(*Monopterus albus*)<sup>[37]</sup>、江鳕<sup>[1]</sup>中有环境因子对精子互作效应的研究,而国外有关互作效应的研究多在鱼类的食品加工<sup>[38]</sup>、环境生活<sup>[39]</sup>及免疫等<sup>[40]</sup>方面。本研究采用Box-Behnken (BBD)设计,优点在于能够建立各因素和响应值的关系函数模型,在很大程度上减少了实验次数,运用灵活且方便,能够全面考察这3种因素的交互作用并能够找到影响精子活力的最优因子组合<sup>[41-44]</sup>。研究建立了拟合度较好的精子快速运动时间( $Y$ )的二次多项回归方程,方程的显著性检验说明了一次效应、二次效应和交互项都是极显著或显著的;复合激活液对精子FT调控力度为葡萄糖>氯化钠>丙三醇;得到最优复合液配置法(氯化钠164.78 kPa、丙三醇216.55 kPa、葡萄糖208.43 kPa)时FT为68.24 s,其中复合激活液渗透压的和为589.76 kPa,高于单因素最优渗透压,原因可能是多因素对精子细胞内外渗透压的共同调节作用使复合激活液有最佳精子活力。

## 4 结论

本研究得到适宜浓度和渗透压的葡萄糖、丙三醇、氯化钠对厚唇裂腹鱼精子活力有较好的促进作

用,氯化钾对精子寿命有促进作用,氯化镁对精子活力有抑制作用。通过曲面响应优化多因子对厚唇裂腹鱼精子快速运动时间的影响,得到氯化钠在164.78 kPa、丙三醇在216.55 kPa、葡萄糖在208.43 kPa时精子有最大FT(68.24 s),极显著高于单因素激活效果,调控力度葡萄糖最高,丙三醇最差。因此多因素复合液能更好地调控厚唇裂腹鱼的精子活力,提高受精率和人工繁殖效率,为该鱼增养殖技术及精子激活和抑制机制的研究提供理论基础与实践价值。但事实上影响鱼类精子活力的因素较多,对于优化激活厚唇裂腹鱼精子活力的配方仍有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 王位莹. 额尔齐斯河江鳕(*Lota lota*)精子活力综合调控及人工授精应用研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015: 7-8.
- [2] 韩英, 张澜澜, 徐革峰, 等. 黑龙江茴鱼(*Thymallus arcticus grubei* Dybowski)精子活力的观察[J]. 水产学杂志, 2008, 21(1): 9-14.
- [3] 王贵英, 李清, 祝东梅, 等. 黑尾近红鲌精子活力研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(8): 2062-2065.
- [4] DUMORNE K, FIGUEROA E, COSSON J, et al. Protein phosphorylation and ions effects on salmonid sperm motility activation[J]. Rev Aquacult, 2018, 10(3): 727-737.
- [5] LE HOANG M, PHAM H Q. Sperm motilities in Waigieu seaperch, *Psammoperca waigiensis*: effects of various dilutions, pH, temperature, osmolality, and cations[J]. J World Aquacult Soc, 2017, 48(3): 435-443.
- [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(6): 849-854.
- [7] 周定刚, 温安祥. 黄鳝精子活力检测和精子入卵早期过程观察[J]. 水产学报, 2003, 27(5): 398-402.
- [8] 甘芳, 杜浩, 危起伟, 等.  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和葡萄糖溶液作为授精-激活介质对中华鲟精子受精率的影响[J]. 动物学杂志, 2009, 44(1): 106-111.
- [9] 宋勇, 陈生熬, 梁海波, 等. NaCl、KCl和葡萄糖对叶尔羌高原鳅精子活力的影响[J]. 科学养鱼, 2018(2): 54-56.
- [10] 阮国良, 冯家斌, 杨代勤. 渗透压、pH和温度对泥鳅精子活力及受精率的影响[J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(1): 22-25.
- [11] 区又君, 廖光勇, 陈超, 等. 七带石斑鱼精子活力及其与环境的关系[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(4): 516-519.
- [12] 魏平, 叶霆, 吴向丹, 等. 环境因子对眼斑拟石首鱼精子活力的影响[J]. 生态科学, 2009, 28(5): 438-442.
- [13] 顾正选, 丁诗华. 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[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(7): 72-76.
- [14] 郭焱, 张人铭, 蔡林钢. 新疆鱼类志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技



- 术出版社, 2012: 106-118.
- [15] 任慕莲, 任波, 杨植林, 等. 濒危物种——新疆大头鱼的生态和资源调查与保护对策的研究 [J]. 水产学杂志, 1996, 9(2): 1-19.
- [16] 张人铭, 郭焱, 马燕武, 等. 塔里木裂腹鱼资源与分布的调查研究 [J]. 淡水渔业, 2007, 37(6): 76-78.
- [17] 费骥慧, 汪兴中, 邵晓阳. 洱海鱼类群落的空间分布格局 [J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1225-1233.
- [18] 海萨·艾也力汗, 郭焱, 孟玮, 等. 新疆裂腹鱼类的系统发生关系及物种分化时间 [J]. 遗传, 2014, 36(10): 1013-1020.
- [19] 代应贵, 肖海. 裂腹鱼类种质多样性研究综述 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(32): 38-46.
- [20] 马燕武, 郭焱, 张人铭, 等. 新疆塔里木河水系土著鱼类区系组成与分布 [J]. 水产学报, 2009, 33(6): 949-956.
- [21] 叶尚明, 李兴玖, 李晓春, 等. 新疆塔什库尔干水库建设对鱼类资源的影响 [J]. 水利渔业, 2004, 24(4): 63-65.
- [22] CHEN S A, GONG Y R, WANG M, et al. Length-weight relationship of two fish species in Weigan River [J]. Anim Husb Feed Sci, 2015, 36(8): 5-10.
- [23] 杨天燕, 孟玮, 郭焱, 等. 新疆两种裂腹鱼形态学和 COI 基因的比较分析 [J]. 水产学杂志, 2013, 26(1): 10-14.
- [24] 苏德学, 严安生, 田永胜, 等. 阳离子、葡萄糖及渗透压对丁鲷精子活力的影响 [J]. 水利渔业, 2004, 24(1): 7-8.
- [25] 胡一中.  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、葡萄糖及渗透压对泥鳅精子活力的影响 [J]. 金华职业技术学院学报, 2010, 10(3): 69-72.
- [26] 罗明坤, 赵岩, JEERAWAT T, 等. pH、盐度及  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和葡萄糖对萨罗罗非鱼精子活力的影响 [J]. 南方农业学报, 2014, 45(11): 2076-2080.
- [27] 丁淑荃, 李飞, 万全, 等. 不同浓度葡萄糖、NaCl 和 KCl 对蛇鲷精子活力的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(6): 881-884.
- [28] 金德华, 王鹏武, 马国辉, 等. 稀释液不同甘油浓度对公牛精子活力及相关酶渗出量的影响 [J]. 中国奶牛, 2016(11): 17-21.
- [29] TAKEI G L, MUKAI C, OKUNO M. Regulation of salmonid fish sperm motility by osmotic shock-induced water influx across the plasma membrane [J]. Comp Biochem Physiol A, 2015, 182: 84-92.
- [30] TAKEI G L, MUKAI C, OKUNO M. Transient  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization caused by osmotic shock initiates salmonid fish sperm motility [J]. J Exp Biol, 2012, 215(Pt 4): 630-641.
- [31] 张涛, 李胜忠, 牛建功, 等.  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、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.
- [32] 李胜忠, 张健, 成沛, 等. 甘露醇和甘油对白斑狗鱼精子活力的影响 [J]. 水产养殖, 2013, 34(1): 18-20.
- [33] PROKOPCHUK G, DZYUBA B, RODINA M, et al. Control of sturgeon sperm motility: antagonism between  $\text{K}^+$  ions concentration and osmolality [J]. Anim Reprod Sci, 2016, 164: 82-89.
- [34] 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.
- [35] 吴清毅, 孙翰昌, 李云瑶. 不同浓度的  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  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.
- [36] 王芳, 岳兴建, 谢碧文, 等. pH、葡萄糖以及金属离子对翘嘴红鲌精子活力的影响 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16812-16884.
- [37] 闫秀明, 张小雪. 响应面分析法优化黄鳝精子激活条件 [J]. 水产科技情报, 2010, 37(6): 269-273.
- [38] ARPI N, FAHRIZAL, NOVITA M. Isolation of fish skin and bone gelatin from tilapia (*Oreochromis niloticus*): response surface approach [J]. IOP Conf Ser, 2018, 334(1): 12-61.
- [39] ALI J M, D'SOUZA D L, SCHWARZ K, et al. Response and recovery of fathead minnows (*Pimephales promelas*) following early life exposure to water and sediment found within agricultural runoff from the Elkhorn River, Nebraska, USA [J]. Sci Total Environ, 2018, 618: 1371-1381.
- [40] ADAMEK M, HAZERLI D, MATRAS M, et al. Viral infections in common carp lead to a disturbance of mucin expression in mucosal tissues [J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 71: 353-358.
- [41] 黄建盛, 陈刚, 张健东, 等. 基于响应面法分析温度和盐度对虎斑乌贼受精卵孵化的联合影响 [J]. 生态学杂志, 2016, 35(2): 446-452.
- [42] 赵强, 余四九, 王廷璞, 等. 响应面法优化秃疮花中生物碱提取工艺及抑菌活性研究 [J]. 草业学报, 2012, 21(4): 206-214.
- [43] 钱佳慧, 栗志民, 申玉春, 等. 温度和盐度对华贵栉孔扇贝抗氧化酶活性的联合效应研究 [J]. 南方水产科学, 2015, 11(6): 49-57.
- [44] 黄建盛, 陈刚, 张健东, 等. 响应曲面法分析低盐条件下温度与 pH 对斜带石斑鱼幼鱼能量代谢的联合效应 [J]. 海洋渔业, 2017, 39(1): 41-50.