

华中农业大学

---

硕士学位论文

---

中华鲟精子生理生态特性研究

---

姓名：郑跃平

---

申请学位级别：硕士

---

专业：湿地资源与环境

---

指导教师：谢从新;刘鉴毅

---

20070601

## 摘 要

中华鲟 (*Acipenser sinensis* Gray) 主要生活在我国东海和黄海大陆架, 具有溯河洄游产卵的习性, 随着葛洲坝水利枢纽于 1981 年 1 月截流, 长江中华鲟繁殖群体被阻隔在长江中、下游江段, 尽管 1983 年以来国家完全禁止对中华鲟繁殖群体的商业捕捞, 并实施了人工增殖放流等保护措施, 但其自然产卵群体资源仍然不断下降。1988 年中华鲟被列为国家一级重点保护动物。目前, 关于中华鲟产卵群体种群结构和繁殖生物学学习性等方面的研究, 尤其是在葛洲坝下中华鲟产卵繁殖群体生态学和资源评估等方面的研究, 取得了明显的进步。但有关中华鲟精子生理生态特性的研究方面, 仅有零星报道。作者于 2005-2006 年从中华鲟精液基本特征、精液离体短期保存、精浆元素组成和理化因子对精子活力的影响等方面入手, 对中华鲟精子的生理生态特性进行研究, 获得如下研究结果:

1. 中华鲟精子密度在  $1.48-5.04 \times 10^9$  ind./mL, 平均为  $3.26 \times 10^9$  ind./mL, 精液浓度在 9.4%-25.12%, 平均为 17.37%, 精子密度和精液浓度存在明显的个体差异; 中华鲟精液的 pH 值为 7.5-8.5, 呈弱碱性; 新鲜精子经淡水激活后其快速运动时间、总运动时间和寿命分别为 76s、114s 和 162s; 中华鲟精液颜色为乳白色和白色, 其中乳白色精液较浓, 似浓牛奶但不粘稠, 白色精液则显得稀薄。中华鲟精子在精原液中有微弱的颤动, 精液越稀其中精子的颤动越明显。

2. 中华鲟精子在保存过程中, 随保存时间的延长, 其活力逐渐下降。保存温度越高, 活力下降越快, 越早出现死亡精子。在 20℃ 下精子保存时间低于 3 天, 2℃ 下可以保存 10 天以上, 1 周内精子可以保持较高的活力。但是精液离体短期保存时间有限, 长期保存则需要采取超低温冷冻保存的方法。

3. 中华鲟精浆的元素组成中以  $\text{Na}^+$  含量最高, 其次是  $\text{K}^+$ , 之后分别是  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 。 $\text{Na}^+$  含量为  $\text{K}^+$  的 2-4 倍, 为  $\text{Cl}^-$  的 5-10 倍。中华鲟精浆的离子组成存在个体差异, 两尾雄鱼间  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  含量有极显著差异 ( $p < 0.01$ ), 而  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  的含量无明显差异 ( $p > 0.05$ )。

4. 中华鲟精子适宜在弱碱性 (pH 7-9) 溶液中运动, pH 8 时精子活力最高。0-50 mmol/L 的  $\text{Na}^+$  溶液可以提高中华鲟精子活力, 最适浓度为 25 mmol/L, 高浓度  $\text{Na}^+$  会抑制精子活力。中华鲟精子对  $\text{K}^+$  浓度变化较为敏感, 低于 0.5 mmol/L 的  $\text{K}^+$  可以延长精子的运动时间, 当浓度增加至 1 mmol/L 时就可完全抑制精子活动。0-5 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  可以略微提高精子活力, 超过 10 mmol/L 则会显著降低中华鲟精子活力, 产生精子凝集现象,  $\text{Ca}^{2+}$  的作用比  $\text{Mg}^{2+}$  更为明显。中华鲟精子可在 0-100 mmol/L 的葡萄糖溶液中活动, 低浓度的葡萄糖可以显著提高精子活力, 在 50 mmol/L 时精

子活力最高。低渗溶液可以显著提高中华鲟精子活力, 最适渗透压为 50mOsm/L, 渗透压大于 125 mOsm/L 时完全抑制精子活力。

5.  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 可以解除  $\text{K}^+$ 对中华鲟精子活力的抑制作用, 这一解除作用具有浓度依赖性, 而且二价离子的效果优于一价离子,  $\text{Ca}^{2+}$ 作用效果比  $\text{Mg}^{2+}$ 更明显。

6. 中华鲟精浆中高浓度的  $\text{K}^+$ 是抑制精子在精原液中活动的主要抑制因子,  $\text{Na}^+$ 主要起稳定精浆渗透压的作用, 和精浆中的其他成分共同维护精子正常的形态和功能。

7. 综上所述, 作者建议人工繁殖授精稀释液的 pH 应在 8 左右, 渗透压应在 50mOsm/L 左右, 授精液中  $\text{K}^+$ 含量应低于 0.5mmol/L,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 含量不超过 5mmol/L, 可采用 NaCl 和葡萄糖调节溶液渗透压。

**关键词:** 中华鲟; 精子; 精浆; 离子成分; 精子活力

## Abstract

The Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* Gray, a typical anadromous fish, mainly lives in the continent shelf of the East sea, Yellow sea in China, and spawns in the Yangtze and the Pearl Rivers. However, with the construction of Gezhouba Dam in 1981, the spawning colonies were obstructed at the middle and lower reaches of Yangtze River. Even though commercial fishing of Chinese sturgeon has been prohibited and artificial propagation has been carried out since 1983, the natural spawning colony resource has been declining. In 1988, the fish was put in the list as a state protected animal in class I. At present, great progress has been made in the fields of morphology, reproductive biology and, especially, reproductive ecology and stock assessment of the spawning population. Yet, there was little knowledge of physio-ecological characteristic of sperm. The basic characteristic of milt, the short-term storage of milt in vitro, the ions composition of seminal plasma, and the effects of some environment factors on sperm motility were studied from 2005 to 2006. The main results are as follows:

1. The sperm density of Chinese sturgeon was from  $1.48 \times 10^9$  to  $5.04 \times 10^9$  ind./mL, with the average of  $3.26 \times 10^9$  ind./mL, the concentration of sperm was from 9.4% to 25.12%, with the average of 17.37%, the milt are alkalescence, and the pH value was between 7.5 and 8.5; the fast-movement time, total-movement time and lifetime of sperm after being diluted with freshwater were 76s, 114s and 162s, respectively; the milt had 2 kinds of colors, ivory-white and white, the ivory-white one was thicker than the white one.

2. Sperm motility declined with time extending during short-term storage in vitro. High temperature had negative effect on milt storage, only 3 days under 20°C, but over 10 days under 2°C. However, the time for short-term storage of milt is so short, long-term storage needs cryopreservation in liquid nitrogen.

3. The ions composition of seminal plasma of Chinese sturgeon include  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  was the main ions, then was  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ; there were significant difference in the concentration of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  between 2 male Chinese sturgeon ( $p < 0.01$ ), but no significant difference in  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ( $p > 0.05$ ).

4. The effects of environmental factors on sperm motility parameters in Chinese sturgeon including pH, cations, monosaccharide as well as osmolality were studied. The best pH value for activation of spermatozoa was pH 8.0. The highest sperm motility was observed in solutions containing 25mmol/L  $\text{Na}^+$ , 0.3mmol/L  $\text{K}^+$ , 5mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ , 5mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ , 50mmol/L glucose, and with an osmolality of 50 mOsm/L, respectively. The present study provides us with some basic knowledge about biosensitivity of Chinese sturgeon spermatozoa to ionic and osmolality. A sensitivity of sperm was observed after induction of activation of sperm motility in solution containing cations, glucose or sucrose with high osmolality. Concentrations more than 50mmol/L  $\text{Na}^+$ , more than 0.5 mmol/L  $\text{K}^+$ , more than 10mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ , more than 10mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  and osmolality more than 75 mOsm/L had negative effects on sperm motility. Also, more than 1 mmol/L  $\text{K}^+$

and osmolality more than 125 mOsm/L had an inhibitory effect. More than 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  could induce congregating reaction.

5.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  were antagonistic with the inhibitory effect of  $\text{K}^+$  on sperm motility. This reversed effect varied with the concentration. And divalent ions were more effectively. And the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  was better than that of  $\text{Mg}^{2+}$ .

6. The inhibitory role of high osmolality of the swimming medium (more than 100 mOsm/L) and insufficient osmolality of the seminal plasma to inhibit semen motility suggested that osmolality is not the principal factor preventing sperm motility in seminal fluid, but  $\text{K}^+$  is a major inhibitory factor effecting sperm motility in seminal plasma.

In conclusion, we suggested that the artificial propagation fertilization diluent should be at pH 8.0, osmolality at about 50 mOsm/L, the concentration of  $\text{K}^+$  should be less than 0.5 mmol/L  $\text{K}^+$ , and that of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  should be less than 5mmol/L.

**Key words:** *Asipenser sinensis*; sperm; seminal plasma; ions composition; sperm motility

## 缩略语表

<b>d</b>	<b>day</b>	<b>天</b>
<b>h</b>	<b>hour</b>	<b>小时</b>
<b>min</b>	<b>minute</b>	<b>分</b>
<b>s</b>	<b>second</b>	<b>秒</b>
<b>kg</b>	<b>kilogram</b>	<b>千克</b>
<b>g</b>	<b>gram</b>	<b>克</b>
<b>L</b>	<b>liter</b>	<b>升</b>
<b>mL</b>	<b>milliliter</b>	<b>毫升</b>
<b>ind</b>	<b>individual</b>	<b>个</b>
<b>cm</b>	<b>centimeter</b>	<b>厘米</b>
<b>mm</b>	<b>millimeter</b>	<b>毫米</b>
<b>μm</b>	<b>micron</b>	<b>微米</b>
<b>FT</b>	<b>Fast-movement time</b>	<b>快速运动时间</b>
<b>TT</b>	<b>Total-movement time</b>	<b>总运动时间</b>
<b>LT</b>	<b>Lifetime</b>	<b>寿命</b>
<b>MP</b>	<b>Motile sperm percentage</b>	<b>精子活率</b>

# 华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密，解密时间	年 月 日
--------------	---	-----------	-------

## 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明，并表示了谢意。

研究生签名：

郑路平

时间：2007年6月16日

## 学位论文使用授权书

本人完全了解“华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定”，即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版；学校有权保留提交论文的印刷版和电子版，并提供目录检索和阅览服务，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

注：保密学位论文在解密后适用于本授权书。

学位论文作者签名：

郑路平

导师签名：

汪文江

签名日期：2007年6月16日

签名日期：2007年6月16日

## 第一章 文献综述

### 1.1 中华鲟生物学概述及其研究进展

中华鲟 (*Acipenser sinensis* Gray, 1834) 隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、鲟形目(Acipenseriformes), 是起源最早的脊椎动物类群之一, 是世界上鲟型目鱼类中个体最大、分布区域纬度最南的种类, 在鱼类系统发育和动物地理学研究中具有重要的学术价值(四川省长江水产资源调查组, 1988; Bemis *et al.*, 1997; 危起伟, 2003)。

#### 1.1.1 中华鲟的生物学特征概述

中华鲟体形为长梭形, 横切面呈五角形, 头部呈三角形, 略为扁平。头部腹面及侧面有许多梅花状的斑纹, 称为罗伦氏器。鳃孔位于头之两侧, 鳃耙数 14~25, 有喷水孔 1 对位于鳃盖前上方, 呈新月形。躯干部具 5 行骨板, 其中背骨板 1 行 10~16 块; 侧骨板左右各 1 行, 均为 26~42 块; 腹骨板左右各 1 行, 均为 8~16 块。体前部腹侧有胸鳍 1 对, 鳍条 48~54; 体后部腹侧有腹鳍 1 对, 鳍条 32~42; 尾部背面有背鳍 1 个, 鳍条 50~68; 尾部腹面有臀鳍 1 个, 鳍条 26~40; 尾鳍弯尾形。侧骨板上方面色为青灰、灰褐或灰黄色, 侧骨板下方至腹部由浅灰色向黄白色过渡, 各鳍呈灰色(四川省长江水产资源调查组, 1988)。

中华鲟属典型的溯河产卵洄游型(江海洄游)鱼类, 主要分布在我国东海、黄海、珠江和长江干流, 历史分布范围还包括朝鲜半岛和日本海域, 有珠江和长江 2 个种群, 珠江种群目前近乎绝迹。其生活史的主要阶段在我国东海、黄海以及朝鲜近海大陆架区域度过, 性成熟后上溯到长江和珠江上游产卵。中华鲟一般于繁殖前一年 6~8 月进入长江河口并溯河而上, 9~10 月陆续到达湖北江段越冬, 此时其卵细胞处于第Ⅲ期, 翌年 10~11 月洄游到产卵场繁殖, 历时 1 年之久, 在此期间, 亲鲟不摄食, 卵细胞发育完全靠其自身储备的能量和营养, 在到达产卵场后才完成最终发育, 达到第Ⅳ期, 产后亲鱼再返回海洋。受精卵经过 4~5 天发育, 孵化出仔鱼; 初孵仔鱼不具游泳和摄食能力, 只能顺江而下继续依靠卵黄囊营养物质发育, 直到具备游泳和摄食能力; 其后幼鱼也行降河洄游, 进入河口咸淡水后陆续进入海洋生长、肥育。河口地区中华鲟幼鱼主食底栖无脊椎动物, 在海洋中中华鲟以摄食底栖鱼类为主, 甲壳类次之, 软体动物较少。

中华鲟生长速度快, 是 27 种鲟鱼类中生长速度最快的种类之一, 人工养殖条件下生长优势更为明显, 养殖 1 年可达 4kg 以上。中华鲟寿命较长, 根据所捕获到的中华鲟的年龄结构来看, 雄鲟多数个体的年龄是 12~15 龄, 最小个体是 8 龄, 最大个体是 26 龄, 雌鲟多数个体的年龄是 17~25 龄, 最小个体是 13 龄, 最大个体是



35 龄(柯福恩, 1999)。Wei 等于 1981~1993 年间, 鉴定了 384 尾中华鲟年龄, 其种群平均年龄 17 龄, 雄性年龄在 8~27 龄, 平均 14 龄, 10~18 龄占 90.2%; 雌性年龄在 13~34 龄, 平均 20.7 龄, 16~27 龄占 86.4%(Wei *et al.*, 1997)。

中华鲟性成熟较晚, 雌性性腺初次成熟在 14~26 龄, 平均在 18 龄, 体重一般在 150 kg 以上; 雄性性腺初次成熟在 8~18 龄, 平均 12 龄, 体重一般在 50 kg 以上。中华鲟属于一生多次产卵鱼类, 但是雌性不能每年繁殖, 在一次繁殖过后一般要间隔 1~6 年才能再次繁殖(余志堂等, 1986; 常剑波和曹文宣, 1999)。一般而言, 在繁殖群体中雌性个体较雄性个体大, 雄鲟在 42~168 kg, 雌鲟在 105~420 kg (Wei *et al.*, 1997)。中华鲟雄鲟怀精量一般在 1000mL 以上, 最多可以达到 5760 mL(刘鉴毅等, 2007); 雌鲟的繁殖力较高, 雌鲟成熟系数一般可以达到 20%, 平均怀卵量 64.5 万粒, 最高可以达到 570 万粒(余志堂等, 1986)。故在生长对策上, 中华鲟是采取 r 对策, 其死亡率与种群密度关系较小, 把较多的物质用于生殖(危起伟, 2003)。中华鲟个体大、怀卵量高, 弥补了它们对繁殖条件要求高、洄游距离长等所导致后代成活率低的缺陷, 是物种的生存适应机制(Beamesderfer and Farr, 1997)。

中华鲟的生殖配子在离体、非激活条件下可以存活数小时至数天, 精子常温保存最长可以达到 1 周时间, 而卵子在常温下保存 18~24 h 还具有受精能力(郑跃平等, 2006)。中华鲟精子进入淡水激活后, 活动时间最长可以达到 40 min 以上(四川省长江水产资源调查组, 1988)。中华鲟卵子卵粒较大, 受精卵粘性强, 胚胎耗氧率高(唐国盘, 2005)。中华鲟精子和卵子的这些特征, 是对激流产卵的一种适应(危起伟, 2003)。

中华鲟繁殖的水温在 16~21℃, 产卵水温在 17~20℃之间, 以 18.0~20.0℃为最佳, 在鲟类中属于繁殖水温较高的种类; 同时, 中华鲟生存的水温也较其他鲟类要高, 这些特征, 可能与中华鲟的起源有关(危起伟, 2003), 此外中华鲟自然繁殖对产卵场的水文条件也有很大依赖性。

### 1.1.2 中华鲟的研究现状和资源保护概述

葛洲坝水利枢纽的建设, 阻碍了中华鲟的洄游和产卵, 种群濒临灭绝。从 1950 年开始零星的对其生态及生物学方面展开研究, 1970 年又开始对人工繁殖及增殖放流进行研究, 每年都有一定的放流增殖量(王玉堂, 1999)。但是对中华鲟进行较为系统的研究是从 1972 年开始历时多年的“长江鲟鱼专题调查”, 其研究成果汇编成《长江鲟形目鱼类生物学及人工繁殖研究》(四川省长江水产资源调查组, 1988), 这也是迄今为止对我国鲟形目鱼类进行基础性研究的唯一一本专著。

在葛洲坝水利枢纽工程大江截流(1981 年 1 月 4 日)后, 1982 年 10-11 月多家研究单位, 几乎同时在葛洲坝下宜昌江段发现长江中的铜鱼和瓦氏黄颡鱼等底层鱼类的消化道内含有不同发育时期的中华鲟受精卵, 由此证明了中华鲟已经在葛洲坝下形成了新的产卵场并进行自然繁殖(胡德高等, 1983; 余志堂等, 1983)。1982 年国家明令禁止长江鲟形目鱼类的所有商业捕捞, 科学研究用鱼的数量也受到严格的限制和监控, 1988 年我国《野生动物保护法》和 1989 年《野生动物保护名录》颁

布以后,中华鲟被列为国家一级重点保护动物。而长江水产研究所和葛洲坝工程水产处(现更名为葛洲坝集团公司中华鲟研究所)的中华鲟人工增殖放流工作已经坚持开展了 20 多年。

目前长江中华鲟种群数量尚维持有一定的规模,这说明国家所采取的保护策略是有效的。随着科学研究的深入,1996 年开始尝试利用化学标记、遗传标记和物理标记等多种手段进行人工放流效果评价(常剑波, 1999; Wei and Yang, 2002; 杨德国等, 2005),尤其是引进国外的电子跟踪技术(超声波遥测追踪及定位系统、河床扫描系统)进行自然繁殖生态和产卵条件研究(危起伟等, 1998)。Wei 等突破了中华鲟培育成活率低的技术难题,开始进行批量人工后备亲体驯养工作,为中华鲟实现全人工繁殖奠定了基础(Wei *et al.*, 2002; Wei and Yang, 2004)。20 多年来,广大科研人员开展了大量的研究工作,对自然产卵的具体时间和地点、产卵规模、前仔鱼期的耗氧量、低龄中华鲟的性别鉴定、产卵群体的资源量、繁殖群体的结构及其变化、产卵场的水文条件及河床底质地貌、中华鲟在产卵场中的分布和迁移、幼鱼的降海洄游、人工放流对长江口幼鲟的贡献率、蛋白质化学、精液生物学、精液冷冻保存技术、受精细胞生物学、分子生物学等方面进行了研究(邓中彝等, 1985; 许雁和熊全沫, 1990; Deng *et al.*, 1991; Deng *et al.*, 1991; 柯福恩和危起伟, 1992; Wei *et al.*, 1997; 鲁大椿等, 1998; 柳凌等, 1999; 张四明等, 1999; 张四明等, 2000; 陈细华等, 2004a; 陈细华等, 2004b; 唐国盘, 2005; 付小莉等, 2006),获得了大量宝贵的科学数据,为今后研究的深入化和系统化奠定了基础。

关于中华鲟的资源状况,1983 年前,没有对长江中华鲟产卵群体资源量进行过估算(危起伟, 2003)。柯福恩等(1984)指出在没有禁捕的 1972-1980 年间,长江全流域中华鲟成体的年捕捞量波动在 394-636 尾(平均每年 517 尾)。葛洲坝水利工程的阻隔作用使得长江中游中华鲟产卵亲鱼的数量明显增多,仅宜昌至石首江段(约 300km),由于没有禁止捕捞,1981 年就捕捞 827 尾,1982 年捕捞 558 尾,而在此之前该江段捕捞到的中华鲟记录是很少的(常剑波, 1999)。危起伟指出葛洲坝截流后,中华鲟在坝下江段聚集,形成了长江中华鲟的年捕捞高峰,1982 年(没有禁捕)达到 1163 尾(包括截流于坝上的 161 尾)(危起伟, 2003)。1982 年国家实施中华鲟亲鱼群体保护措施,禁止一切商业捕捞,以后每年的捕捞数量都得到严格控制,其中捕捞量约一半用来做人工繁殖放流,而另一半用于标记放流等其它有关的科学研究。危起伟等对葛洲坝截流 24 年来中华鲟产卵群体结构的变化研究结果表明,葛洲坝截流 24 年来中华鲟产卵群体的结构发生了显著的变化,24 年中的后 15 年间的变化明显大于前 9 年的变化(危起伟等, 2005)。这种变化突出表现在雌雄性比的严重失调,这不仅给人工繁殖工作带来不便,也降低了繁殖后代的遗传多样性,不利于物种的生存和发展。

由于中华鲟个体大、成熟周期长,全人工繁殖尚未突破。柯福恩和危起伟指出进行人工规模化养殖和后备亲鱼培育,进而实现中华鲟全人工繁殖,建立中华鲟资源的人工备份,是保护中华鲟物种的另一途径(柯福恩, 1999; 危起伟, 2003)。但

在国家批准的允许驯养繁殖中华鲟的养殖场中, 饲养的最高龄人工繁殖子一代也仅仅是 1997 年世代, 因此加强对现有资源的保护力度就显得极为重要。

## 1.2 鱼类精子生理生态特性研究进展

精子生物学的研究开始于 19 世纪, 研究内容主要涉及精子的发生发育、精子的形态结构、精子的活力、精子的新陈代谢、精子和精浆的生化特性等(Billard and Cosson, 1992; Billard *et al.*, 1995a; Billard *et al.*, 1995b)。鱼类精子生物学的研究仅限于少数种群, 主要集中在有重要经济价值的鱼类和列入各级保护计划的鱼类(Billard and Cosson, 1992)。随着科学技术水平的不断发展和新方法的应用, 精子生物学研究也逐步深入, 已从精子发生、形态与结构发展到分子生物学水平。丰富的研究成果为鱼类的精液保存、人工授精和物种保护提供了理论参考与技术保障, 也为在生产实践中的应用打下了基础。

### 1.2.1 鱼类精子的一般特征

鱼类精子形态特征与大多数脊椎动物相似, 为鞭毛型精子, 由头部、颈部(又称中段或中片)、尾部三部分组成。鱼类精子头部形态多种多样, 但绝大多数硬骨鱼类精子头部成圆球形或椭球形。精子头部主要由细胞核所占据, 核内为高度浓缩的染色质, 核外包围细胞质。与高等动物不同的是, 绝大多数硬骨鱼类精子头部均无顶体结构, 这可能是由于硬骨鱼类卵子的表膜上具有精子入卵的通道—受精孔的缘故, 例外的是鲟类精子具有顶体。鲟鱼精子个体较一般硬骨鱼类大, 精子头部呈圆柱形, 大小是一般硬骨鱼类的 4~9 倍(Linhart *et al.*, 1995; Linhart and Kudo, 1997)。鱼类精子颈部较短, 主要是中心粒的结构。鱼类精子中段包含少许的线粒体, 有些种类高度发达(如网纹花鱗, *Poecilia reticulata*), 而有些种类则明显退化(如鲑科、鲤科鱼类)(Billard *et al.*, 1995b)。精子尾部仅有一根从中心粒处延伸而出的细长鞭毛, 鞭毛通常为 9+2 的微管结构, 鞭毛的摆动是鱼类精子运动的直接动力。一些体内受精鱼类, 如大洋鳕(*Macrozoarces americanus*)具有双鞭毛精子(Yao *et al.*, 1995), 而一般体外受精的鱼类通常只有一根简单鞭毛, 也有报道在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中发现有双鞭毛精子(Jaspers *et al.*, 1976)。

多数体外受精的硬骨鱼类的精子在鱼体内和精原液中不能活动, 精子只有在排出体外后, 接触外界淡水或海水环境, 精子细胞周围的环境因子发生很大改变, 才会启动精子活动, 并在适宜的条件下完成受精(Billard and Cosson, 1992; 邓岳松和林浩然, 1999; Alavi and Cosson, 2005)。鱼类精子运动时间有限, 运动强度也会随时间推移而显著下降。在许多淡水鱼类中, 精子运动持续时间通常不到 2 min, 并且在多数情况下其快速运动只能维持不到 30s (Morisawa and Suzuki, 1980; Perchec *et al.*, 1995; Billard *et al.*, 1995a; Kime *et al.*, 2001)。在一些鱼类中, 如斑点狼鱼(*Anarhichas minor*)、3 刺棘鱼(*Gasterosteus aculeatus*)和 5 刺棘鱼(*Spinachia spinachia*)在排卵过程中伴随有大量凝胶状粘性物质, 可以使精子在排出之后维持很长的活动时间(Kime

and Tveiten, 2002; Elofsson *et al.*, 2003)。体内受精鱼类, 如海水中的杜父鱼和大洋鳕, 他们的精子在雄鱼体内即能运动(Koya *et al.*, 1993; Yao and Crim, 1995)。大洋鳕的精子在原精液或者人工配置的稀释液中, 在 4℃ 下可以保持运动 5 天(Yao *et al.*, 1999)。

鱼类精液一般呈弱碱性, pH 在 7.0~8.5 之间。我国的青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙 (*Aristichthys nobilis*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 精液的 pH 在 6.5~7.5 之间(鲁大椿等, 1989), 中华倒刺鲃 (*Barbodes sinensis*)、白甲鱼 (*Varicorhinus simus*) 和岩原鲤 (*Procypris rabaudi*) 精液的 pH 分别为 7.5~7.7、7.3~7.5 和 7.2~7.4 (谭娟等, 2006), 大口鲶 (*Silurus meridionalis*) 精液 pH 值为 7.3~7.5 (罗相忠等, 2002), 华鲮 (*Sinilabeo decorus*) 为 7.5 (李萍等, 2005), 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 为 6.72~7.25 (林丹军和尤永隆, 2002)。

精子密度和精液浓度是鱼类精子主要的基本特征, 通常使用血球计数板或者类似的计数工具计算精子密度, 也可采用分光光度法测量精液光学密度来快速测量精子密度, 精液浓度则采用离心法测量(% 白色物质体积占总精液体积的比率)(鲁大椿等, 1989; Rurangwa *et al.*, 2004)。硬骨鱼类的精子密度范围在  $2 \times 10^6 \sim 5.3 \times 10^{10}$  ind./mL 之间, 我国四大家鱼精子密度为  $2.66 \sim 3.56 \times 10^{10}$  ind./mL, 精液浓度在 58.3~69.1% 之间(鲁大椿等, 1989)。广东鲂 (*Megalobrama hoffmanni*) 的精子平均密度为  $2.45 \times 10^{10}$  ind./mL (潘德博等, 1999), 和四大家鱼差别不大。大口鲶精子密度为  $1.34 \times 10^9$  ind./mL, 精液浓度为 9.1% (罗相忠等, 2002), 比四大家鱼低了 1 个数量级。华鲮精子密度更低, 仅为  $4.244 \times 10^7$  ind./mL (李萍等, 2005), 较四大家鱼低了整 3 个数量级。鱼类精液浓度和精子密度在不同种类之间、同种的不同个体之间以及同一个体在繁殖季节的不同阶段都是不同的。高浓度的精子并不一定有更高的活性或者更高的受精率(鲁大椿等, 1989; Williot *et al.*, 2000; Geffen and Evans, 2000)。因此, 在采用受精实验来分析精子受精能力的时候, 必须注意精子的密度。

鱼类精子和精浆中包含多种化学成分, 包括与精子活动的抑制和启动有关的无机成分( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  等)(Morisawa *et al.*, 1983; Morisawa *et al.*, 1983; Morisawa *et al.*, 1983; Morisawa, 1985; Alavi *et al.*, 2004; Cosson, 2004); 与能量代谢直接相关的有机化合物 (甘油三酸酯、丙三醇、脂肪酸、葡萄糖、乳酸盐等) (Lahnsteiner *et al.*, 1993); 多种酶 (酸性磷酸酯酶、碱性磷酸酯酶、 $\beta$ -D-葡萄糖苷酸酶、蛋白酶、苹果酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、三磷酸腺苷酶、天门冬氨酸转氨酶等)(Lahnsteiner *et al.*, 1996; Babiak *et al.*, 2001); 各类氨基酸(鲁大椿等, 1998); 以及在精子代谢过程中最重要的酶作用物和代谢物 ATP, ADP, AMP, NADH, 脂质, 脂肪酸, 葡萄糖, 乳酸盐, 丙酮酸盐, 肌酸磷酸盐(Lahnsteiner *et al.*, 1998), 其中研究较多的是与精子活动的抑制和启动有关的无机成分, 涉及鲤科、鲑科、鲟科等的多种鱼类, 表 1-1 中列出了几种鱼类精浆的主要离子成分, 可见  $Na^+$ 、 $K^+$  是鱼类精浆中最主要的阳离子成分, 海水鱼类和鲑鳟鱼类精浆中  $Na^+$  含量明显高于鲤科鱼类和鲟鱼类, 而  $K^+$  则以鲤科鱼类和鲑鳟鱼类精浆中含量较高。

## 1.2.2 鱼类精子活力的评价

精子活力是检测鱼类精子质量和受精能力的关键指标,对于鱼类精子活力的评价,传统的方法主要采用在光学显微镜下观察所得的精子激活率、精子运动时间和精子运动激烈程度等少数几个指标,随着显微成像、显微录像和计算机辅助精子运动分析(CASA)等技术的应用,使得对鱼类精子活力的评价指标达20种之多,主要包括轨迹速度(Curvilinear velocity, VCL)、平均路径速度(Average path velocity, VAP)、直线运动速度(Straight-line velocity, VSL)、激活率(Motile, MOT)、线性性(Linearity, LIN)、精子侧摆幅度(Amplitude of lateral head displacement, ALH)、直线性(Straightness, STR)、鞭打频率(Beat cross frequency, BCF)、摆动性(WOB)、运动精子密度等。通常采用精子运动时间、精子激活率、精子运动速度、精子运动模式和精子运动分级等一方面或几方面的指标来评价精子活力(严安生等, 1993; 严安生等, 1995; Kime *et al.*, 1996; 邓岳松和林浩然, 1999; Kime *et al.*, 2001; Rurangwa *et al.*, 2004; 苏天凤和艾红, 2004; 胡家会等, 2005)。

### 1.2.2.1 精子激活率和精子活率

精子激活率指精子被激活后几秒内活动精子占总精子的百分率,可以反映精子群体的活动能力。精子活率指精子激活后,某一时刻活动精子占总精子的百分率。精子激活率常随鱼的种类及内外环境条件的变化而变化,质量较好的精子在适宜的条件下其激活率一般可达90%以上。生活在淡水中的图门江杜父鱼(*Cottus hangionensis*)的精液被渗透压为679.5kPa的溶液稀释时,精子激活比例为22%,当溶液渗透压下降到452.9 kPa时,精子激活比例上升为63%,当溶液渗透压为226.5 kPa时,精子激活比例达到90%(Oda and Shinriki, 1998);在海水中繁殖的鳗鲡(*Anguilla marmorata*),精子在渗透压为679.5~905.9 kPa的NaCl中保持静止状态,16.8%的精子在1132.4 kPa的NaCl中开始运动,在2038.3 kPa的NaCl溶液中精子激活比例达93.4%(Ohta and Izawa, 1996)。此外,精子激活后随运动时间延长,精子活率逐步下降,西伯利亚鲟经激活液稀释后,几秒内即有90%左右的精子被激活,此后精子活力逐步下降,至2min时精子活率降至10-20%(Billard *et al.*, 1999)。

### 1.2.2.2 精子运动时间

鱼类精子的运动过程可以分为3个主要阶段,即运动启动阶段(motility initiation)、运动持续阶段(motility maintenance / persistence)和运动终止阶段(motility ceasing)。运动启动阶段既是精子的激活,是精子经激活液稀释后,由于外界环境变化激发精子内部生化过程,引起鞭毛摆动的过程,这一阶段时间较短,通常不到1s。精子运动持续阶段是精子运动过程的主要部分,在此阶段精子有多种运动方式,包括直线运动、圆周运动、旋转运动等,还可根据精子运动过程中有无位移分为向前运动和原地颤动。运动终止阶段是指精子激活运动后,由于自身能量消耗殆尽、功能性结构损伤或某些抑制因子的作用,导致精子鞭毛停止摆动的过程,此时精子处于死亡或假死状态。

表 1-1 几种鱼类精浆的主要离子成分和精浆渗透压

Table 1-1 Ions composition and osmolality of seminal plasma of several fishes

中文名	学名	离子					渗透压	参考文献
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>		
鲟鱼类								
波斯鲟	<i>Acipenser persicus</i>	62.44±6.82	6.92±0.88	0.79±0.03	0.52±0.03	21.11±5.41	82.56±8.10 ~ 55.13±5.54	Alavi et al., 2004
西伯利亚鲟	<i>Acipenser baeri</i>	28±0.7	2.5±0.3				38.0±3.0	Gallis et al., 1991
湖鲟	<i>Acipenser fulvescens</i>	25.6±2.8	5.78±0.49	0.16±0.05	0.21±0.02	5.41±2.79		Toth et al., 1993, 1997
施氏鲟	<i>Acipenser schrenckii</i>	31.8±7.0	6.97±1.42	0.13±0.02	0.22±0.07	2.31±1.28		Toth et al., 1994, 1997
小体鲟	<i>Acipenser ruthenus</i>	38.92	2.29		0.47	0.013		张涛等, 2003
		48.32	2.05		0.34	0.016		张涛等, 2003
匙吻鲟	<i>Polyodon spathula</i>	21.739	2.495	0.195	2.292		69.7±1.8 ~ 79.1±4.8	Piros et al., 2002
		11.11	1.56	0.52	0.36		33.0-62.7	Mims, 1991 Linhart et al., 2003
蛙鱼类								
蛙鱼	Salmonids	103-140	20-66	0.3-2.6	0.8-3.6			Billard et al., 1995a,b
硬头鲮	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	122±14.2	30.4±4.5	1.10±0.26	0.85±0.12		322.1±21.76	Glogowski et al., 2000
大西洋蛙	<i>Salmo salar</i>	103	22	1.3	0.9		313.3±22.3	Lahnsteiner et al., 1996
大麻哈鱼	<i>Oncorhynchus keta</i>	142±1.7	66.1±4.90	2.2±0.10	1.6±0.10	134±1.33	232±13 332±5.1	Hwang and Idler, 1969 Morisawa et al., 1979

续表 1-1

中文名	学名	离子					渗透压	参考文献
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>		
鲤科鱼类								
鲢	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	15.72	32.02		0.039			鲁大椿 等, 1992
鳙	<i>Aristichthys nobilis</i>	15.83	32.05		0.043	0.002		鲁大椿 等, 1992
草鱼	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	16.43	32.39		0.003	0.003		鲁大椿 等, 1992
团头鲂	<i>Megalobrama amblycephala</i>	15.900	30.630		0.061			鲁大椿 等, 1992
鲤	<i>Cyprinus carpio</i>	12.54	31.39		0.026	0.01		鲁大椿 等, 1992
		75±3.2	82.4±3.3	2±0.18	0.8±0.04		302±5	Morisawa et al., 1983
		59.00±3.16	73.01±3.46	11.54±0.73			96.25±3.58	Kruger et al., 1984
		78±5	63±6	43.5±4.5				Krasznai et al., 2003b
欧白鱼	<i>Alburnus alburnus</i>	66.6±12.2	40.6±5.2				266.6±20.1	Lahnsteiner et al., 1996
鲤科鱼类	Cyprinids	94-107	39-78	0.3-12.5	0.02-1.2			Billard et al., 1995a,b
海水鱼类								
吉氏杂鳞杜父鱼								
	<i>Hemilepidotus gilberti</i>	162.0±12.1	20.4±2.60	0.92±0.16				Hayakawa and Munehara, 1998
大菱鲆	<i>Psetta maxima</i>	150±7	4.5±0.31	4.76±0.40	30.8±5.2			Dreanno et al., 1998
海七鳃鳗	<i>Petromyzon marinus</i>	106.3±12.8	10.5±12.8	0.57±0.08	1.24±0.28			Ciereszko et al., 2002

鱼类精子的运动时间受内因和外因的影响,内因包括亲鱼的种类、所处的生殖季节、性腺发育状况、亲鱼体质和营养状况、年龄等,外因包括所处水环境的渗透压、环境的离子组成、酸碱度、温度等(Billard and Cosson, 1992; 邓岳松和林浩然, 1999; Alavi and Cosson, 2005; Alavi and Cosson, 2006)。根据精子激活后的活力变化情况,可以将运动持续阶段继续划分为激烈运动阶段、快速运动阶段、慢速运动阶段、摇摆运动(原地颤动)阶段等,对应于各阶段的时间则分别是精子的激烈运动时间、快速运动时间、慢速运动时间、摇摆运动时间等(鲁大椿等, 1989; 严安生等, 1993; 赵振山等, 1995a; 严安生等, 1995; 赵振山等, 1995b; 鲁大椿等, 1998; 谷巍等, 2005)。通常所说精子运动时间是指精子从运动启动到运动停止所经历的时间,即所谓精子寿命(Life time, LT)。而在鱼类人工繁殖过程中,更注重精子的快速运动时间,因为精子的快速运动时间越长其有效受精时间越长,意味着可以获得较高的受精率,所以精子快速运动时间也变成考察精子活力的常用指标之一(鲁大椿等, 1989; 严安生等, 1993; Rurangwa *et al.*, 2004)。淡水鱼精子的运动多呈爆发式,运动时间较短,从十几秒钟到几分钟不等。虹鳟(*Salmo gairdneri*)精子快速运动时间一般不超过 30 s,寿命在 60 s 内,鲫鱼精子寿命不超过 10 min,而海水鱼类精子运动时间较长,如叉线六线鱼(*Hexagrammos octogrammu*)精子在海水中寿命超过 50 min(Koya *et al.*, 1993),网纹花鲈(*Poecilia reticulata*)的精子可在水中运动 48 h。

渗透压是影响精子运动时间的主要因素之一,纯海水或纯淡水均不利于精子的长期运动,经过稀释的海水或具有一定渗透压的溶液可维持精子较长时间的运动。离子同样对精子寿命有较大影响,适当的 pH 值、葡萄糖、ATP 均可延长精子运动时间。温度也是影响精子运动时间的主要因素,鱼类精子运动时间随温度的升高而逐渐降低。因此在鱼类人工受精时,要注意受精液调整至适当渗透压、pH 值及离子组成,尽可能延长精子运动时间(Alavi and Cosson, 2006)。

### 1.2.2.3 精子运动速度

鱼类精子运动速度可以反映精子运动激烈程度,不同鱼类精子运动速度不同,鱼类精子一般在起始运动阶段运动速度最快,随时间的推移,ATP 被大量消耗,运动速度迅速降低(Perchec *et al.*, 1995; 邓岳松和林浩然, 1999; 苏天凤和艾红, 2004)。在 12.5 °C 和 16 °C 时,亚东鲑(*Salmo truttafarrio*)精子经淡水激活后 4 秒内向前运动的速度为 160~164  $\mu\text{m/s}$ , 8s、16s、26s 之后,速度分别降至 85~91、24~33、2~5  $\mu\text{m/s}$  (Schlenk and Kahmann, 1938)。鱼类精子运动速度易受外界环境因子的影响,而温度的影响最为明显。黄鳝(*Monopterus albus*)精子在 28.5 °C 被 0.1% NaCl 激活时,其平均直线运动速度为  $8.37 \pm 1.02 \mu\text{m/s}$ , 鲤鱼精子在 20 °C 被激活时,起始 10 s 内精子运动平均速度为  $130 \pm 11 \mu\text{m/s}$ , 为黄鳝的 16.35 倍,在随后的 2 min,精子运动速度降为  $16 \pm 11 \mu\text{m/s}$  (Perchec *et al.*, 1995)。由于虹鳟卵子直径达 4~5 mmol/L,且精子只有通过受精孔才能进入卵子,限于精子的运动速度和运动时间,卵子受精孔反面的精子是没有机会受精的,因此虹鳟只有排放大量的精子才能保证受精率(Rurangwa *et al.*, 2004),其它鱼类也存在类似情况。



#### 1.2.2.4 精子鞭毛摆动频率

鱼类精子运动激烈程度还可用精子鞭毛摆动频率来表示。不同种鱼类的精子鞭毛摆动频率不同,和运动速度一样容易受环境因子,特别是温度的影响。在精子运动早期阶段鞭毛摆动频率最高,之后随时间延长而下降。如黄鳝精子在 28.5 °C 被 0.1% NaCl 激活时,其精子鞭毛摆动频率为  $6.30 \pm 0.18$  Hz(周定刚和温安祥, 2003); 鲤鱼精子在 20 °C 被激活时,起始 10 s 内精子鞭毛摆动频率为 50~60 Hz,分别为黄鳝的 7.91~9.52 倍;在随后的 2 min,鞭毛摆动频率也降至 7~10 Hz(Perchee *et al.*, 1995)。20 °C 时,虹鳟精子起始运动鞭毛摆动频率为 60 Hz,在随后的 30 s 内降为 15 Hz,15 °C 时虹鳟精子起始摆动频率为 48 Hz,5 °C 时其精子起始摆动频率为 30 Hz(Cosson *et al.*, 1985)。

#### 1.2.2.5 精子运动模式

鱼类精子运动模式主要包括圆周运动、曲线运动、直线运动、原地颤动和静止等。不同鱼类其运动模式各不相同,同种鱼类精子通常包括多种运动模式。欧白鱼精子有 5 种运动方式:圆周运动、非直线运动、直线运动、原地运动及静止(Lahnsteiner *et al.*, 1996)。多数鱼类精子为非直线运动,鲑鳟鱼类精子运动轨迹是圆周形,细须石首鱼(*Micropogonias Bonnaparte*)的精子运动轨迹也是圆周形,圆周直径随运动时间的增加而减小。国内学者多采用快速运动、中速运动、慢速运动、原地颤动或静止来划分精子的运动形式,这与前面的划分是基本一致的。精子运动方式可随溶液离子组成的不同而改变,如  $Ca^{2+}$  可改变精子的运动方式,  $Ca^{2+}$  使虹鳟精子运动轨迹直径变小(Billard and Cosson, 1992);低浓度的  $Ca^{2+}$  (0.1 mmol/L)即可使细须石首鱼的精子运动方向变化率(turning rate)发生明显改变,高浓度的  $Ca^{2+}$  也可使其精子运动轨迹直径变小,外观上表现为精子头部聚集。

#### 1.2.2.6 精子运动分级

许多研究者常根据精子的上述运动特征,如精子激活率或精子运动速度将精子的运动分成不同等级。McMaster 等(1992)曾按照活动精子百分比定义精子运动等级(McMaster *et al.*, 1992)。Viveiros 等(2003)根据精子激活率将精子运动分为 0~4 共 5 个等级:0 级,无精子运动;1 级,25%的精子运动;2 级,50%的精子运动;3 级,达到 75%的精子运动;4 级,超过 75%的精子运动(Viveiros *et al.*, 2003)。按世界卫生组织(WHO)推荐的方法,可以将精子运动定为 4 级:A 级,呈快速直线前向运动的精子;B 级,呈慢速或非直线前向运动的精子;C 级,原地颤动或旋转的非前向运动的精子;D 级,无活力的不动精子(非死亡精子)(周定刚和温安祥, 2003)。Lahnsteiner 等认为,精子的运动速度是评价精子运动的主要指标,可以通过 CASA 将所有精子进行分类,可分为如下种类:不运动 ( $V < 5 \mu\text{m/s}$ ),原地运动 ( $V = 5 \sim 20 \mu\text{m/s}$ ),以及完全运动 ( $V > 20 \mu\text{m/s}$ ) (Lahnsteiner *et al.*, 1996)。

### 1.2.3 鱼类精子活力的影响因素

大多数鱼类的精子在精巢和精浆中是不活动的,因为精巢和精浆中存在抑制因子,只有当精子释放到水环境并被水环境稀释后才能被激活。如鲑鱼,其精子在精

浆中活动的抑制主要受  $K^+$  浓度的制约, 而渗透压是抑制鲤科鱼类精子在精浆中运动的主要因素(Morisawa and Suzuki, 1980; Billard *et al.*, 1995)。鲟鱼精子和其他硬骨鱼类相同, 在精浆中不能活动, 有研究表明, 鲟鱼精子在精浆中活动的抑制主要是受  $K^+$  浓度的调节, 而其他因素如渗透压也起到一定作用(Gallis *et al.*, 1991; Linhart *et al.*, 1995; Billard *et al.*, 2000; Alavi and Cosson, 2002; Alavi, 2003)。精浆不仅可以抑制精子的运动, 还具有保护精子的功能。鱼类精子经激活液稀释后即开始运动, 精子活力是检测精子质量和受精能力的关键指标, 许多研究表明, 激活液中的各种因子, 如温度, pH, 渗透压, 离子成分 ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), 以及稀释比例等, 均会对鱼类精子的活力产生影响(Billard *et al.*, 1995b; Cosson *et al.*, 1999), 这是鱼类精子生理特性与环境相适应的结果。到目前为止, 有关鱼类精子活力的研究涉及了鲑科、鲤科、鲟科、鲂科、鳊科、鳙科、鳜科、鳊科、鳊科等的多种鱼类, 以前 3 类居多。

### 1.2.3.1 温度

激活液温度、亲本培育温度以及精子保存温度均能影响鱼类精子的活力(Billard *et al.*, 1995b; Williot *et al.*, 2000; Alavi and Cosson, 2005)。温度主要是通过控制精子的能量代谢强度而影响其活力, 由于精子自身的能量储备非常有限, 在适宜的温度条件下, 随着温度的升高精子运动速度加快, 能量消耗加快, 就会导致精子运动时间缩短, 当然过高的温度则会抑制精子活动或直接导致精子死亡; 温度降低精子细胞代谢强度降低, 精子运动速度降低, 能量消耗减缓, 因此使精子运动时间延长(Alavi and Cosson, 2005; 胡家会, 2005)。

湖鱥 (*Salvelinus namaycush*) 精子在 12.5~16 °C 条件下激活后, 向前运动时间仅有 29 s, 而在 2.25 °C 条件下其向前运动时间可以达到 56 s (Schlenk and Kahmann, 1938)。Billard 和 Cosson 研究发现, 虹鳟精子运动时间随激活温度的升高而缩短, 5 °C 时激活 3 min 后仍有大多数精子保持向前运动, 而 21 °C 时多数精子的向前运动只能持续 40s (Billard and Cosson, 1992)。其他鱼类精子也有类似特征, 20 °C 时鲤鱼精子的运动时间比 26 °C 和 30 °C 时长, 20 °C 时草鱼精子运动时间较 30 °C 时长, 较低的温度条件 (4 °C) 可以显著延长非洲鲶 (*Clarias gariepinus*) 精子的运动时间(Mansour *et al.*, 2002)。真鲷 (*Pagrosomus major*) 精子在高于 18.8 °C 时, 活力下降很快, 低于该温度时, 运动时间缩短但寿命并没有明显缩短(区又君等, 1998)。在一定的温度范围内, 平鲷 (*Rhabdosargus sarba*) 精子的寿命随温度升高而降低(李加儿等, 1996)。Perchec 等发现, 鲤鱼精子不活动时 ATP 的含量较高, 精子运动时, ATP 被迅速水解, 供精子运动需要, 当 ATP 消耗达 70% 时, 精子停止向前运动, 温度升高 ATP 消耗加快, 由此可见, 精子运动的速度与温度成正比, 而精子运动的维持时间则与温度成反比(Perchec *et al.*, 1995)。

温度可以影响鱼类精子的鞭毛摆动频率(Cosson *et al.*, 1985)。较高的温度可以增加鞭毛摆动频率, 降低向前运动的时间, 而较低的温度(4~10 °C)可以降低鞭毛摆动频率, 延长精子的运动时间(Billard and Cosson, 1992; Van-look, 2001)。Billard 和 Cosson 研究了不同温度下虹鳟精子鞭毛摆动频率的变化规律, 发现 5 °C 时鞭毛频率

较低,至 10℃基本保持不变,而在 14℃时其鞭毛频率迅速增加,21℃以上时其频率保持恒定,随着温度升高精子激活率和运动时间均降低(Billard and Cosson, 1992)。

精子保存温度和亲本培育温度对精子活力也有显著影响。在 2~5℃保存的鲤鱼精子,其运动时间比 22℃长(Ravinder et al. 1997)。室温(25℃)下,红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)精子活力随保存时间延长而下降,保存 15.5 h 后精子失去快速运动能力,在 0~4℃条件下,红鳍笛鲷精子可以保存 72 h(舒琰等, 2005)。Williot 等发现,在 10.0℃和 17.5℃下培育的西伯利亚鲟,其精子的活力随着温度的升高而降低(Williot et al., 2000)。水温在 17~19℃时施氏鲟的精液量和精子活力处于正常范围内,水温高于 20℃时,精子活力下降,当水温达到 23℃后,精子几乎没有明显活力(孙大江等, 2002)。

### 1.2.3.2 pH

目前为止已经在一些鱼类中进行了有关 pH 对精子活力影响的研究,如大头鳊(*Mugil capito*) (Hines and Yashov, 1971),虹鳟(Billard, 1983; Gatti et al., 1990),庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*) (Billard et al., 1993),匙吻鲟(Linhart et al., 1995; Cosson and Linhart, 1996),高首鲟(*Acipenser transmontanus*) (Ingermann et al., 2002),西伯利亚鲟(Gallis et al., 1991),以及波斯鲟(Alavi, 2003)等,从现有研究结果来看,大多数鱼类精浆偏碱性,pH 值界于 7.3~8.5 之间,精浆、激活液和保存液的 pH 均会影响鱼类精子的活力,影响的程度因鱼的种类不同而有差异。

鱼类精子在中性或弱碱性的溶液中活力较高,酸性和强碱性溶液会降低或抑制精子活力,影响其受精率(Baynes et al., 1981)。碱性条件下虹鳟精子活力和受精率均有一定提高(Billard, R, 1981),5~21℃下虹鳟精子运动的最适 pH 为 9.0,虹鳟受精最适 pH 条件为 8.0~8.2 (Lahnsteiner et al., 1998)。长颌姬鰕虎鱼(*Gillichthys mirabilis*)和舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)精子在 pH 5~10 的稀释液或海水中皆可活动,最适 pH 为 9;吉利罗非鱼(*Tilapia zilli*)精子可活动的 pH 范围是 5~10,最适 pH 为 7~8 (Deng and Lin, 1999)。雀杜父鱼(*Alcichthys alcicornis*)精子活动的 pH 范围是 6~9,最适 pH 为 7.5 (Koya et al., 1993)。美洲大锦鲷精子活动范围 pH 6.5~9.5,最适 pH 为 8~9 (Wang and Criml, 1997)。欧白鱼精子活动 pH 值范围 7.68~8.5,其活力随 pH 值升高而增加。鲤鱼精子可以在 pH 值为 6~9 的激活液中活动(Redondo-muller et al., 1991)。

pH 值也是影响许多鲟类精子活力的重要因子,如匙吻鲟(Linhart et al., 1995; Cosson and Linhart, 1996)、高首鲟(Ingermann et al., 2002)、西伯利亚鲟(Gallis et al., 1991)和波斯鲟(Alavi et al., 2004; Alavi et al., 2004)。波斯鲟精子可在 pH 6.0~9.0 范围内运动,pH 8.0 时运动时间最长,精子活率最高 (Alavi et al., 2004),西伯利亚鲟的精子也有相似特征(Gallis et al., 1991)。pH 在精浆的生理范围内 (pH 8 左右) 激活液不会对精子的活力产生不利影响,而保存液的 pH 会影响精子的活力(Cosson and Linhart, 1996)。Ingermann 等研究发现,精液的缓冲能力越差,精子对外界 pH 的变化就越敏感,就越容易受到外界环境和自身代谢酸性产物的影响(Ingermann et al., 2002)。

pH 值也是精子抑制及激活的调节因子之一,细胞外的 pH 值会影响细胞内质子的浓度,从而影响到膜电位,也就影响到精子的运动启动(Boitano and Omoto, 1992)。鳙的精子在酸性或中性等渗液中不活动,当添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$  使溶液 pH 值升高后精子可被激活(Oda and Morisawa, 1993)。Billard (1986)和 Gatti 等(1990)发现,细胞内 pH 值随着细胞外界溶液 pH 值的变化而变化,前者总是低后者 1 个 pH 值单位。当溶液 pH 值低于 7.5 时虹鳟精子运动受抑制,但这种抑制作用可以通过增加  $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Mg}^{2+}$ 浓度得以克服(Billard and Cosson, 1992)。

国内学者也在 pH 值对鱼类精子活力影响方面开展了广泛的研究。在 pH 值为 8~9 水体中黄颡鱼精子强烈运动时间最长为 29s(杨彩根等, 2003),草鱼精子在 pH 8.5 的溶液中强烈运动时间最长。鳊鱼精子适合在 pH 7~9 的弱碱性溶液中运动(邓岳松和林浩然, 2000)。泥鳅精子激活的适宜 pH 为 7.2~8.0,最适 pH 在 7.6 左右(阮国良等, 2004)。其他鱼类如花鲈(洪万树等, 2001)、真鲷、黑鲷、平鲷、黄鳍鲷(李加儿等, 1996; 黄巧珠等, 1999; 江世贵等, 2000)、乌鳢(赵振山等, 1995b)、斜带石斑鱼(赵会宏等, 2003)、大黄鱼(林丹军和尤永隆, 2002; 朱冬发等, 2005)等,均有类似特性。当然也有少数鱼类略有区别,如真鲷精子在 pH 6.4~9.6 的海水中均有较强活力,并且在弱酸性环境中的活力比弱碱性的略高,这应该是该种群与环境相适应的结果(区又君等, 1998)。

### 1.2.3.3 渗透压

多数鱼类精浆渗透压一般维持在 286~334 mOsm/kg (大约 656.8~838 kPa)的水平(Morisawa *et al.*, 1983; Morisawa *et al.*, 1983; Tan-fermin *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2003; He *et al.*, 2004)。鲟鱼类精浆渗透压较鲤科、鲑科和海水鱼类低,通常低于 100 mOsm/kg,海水鱼类精浆渗透压明显高于淡水鱼类。鱼类精浆的渗透压在不同的季节存在一定的变化(Billard *et al.*, 1995b),也存在个体差异,这主要和精液的“稀释”(水合作用)有关,此外人工繁殖过程中催产剂的使用也会对其产生影响(Redondo-muller *et al.*, 1991)。精浆保持稳定的渗透压对于精子形态和功能的稳定有积极的作用。淡水和海水环境的渗透压大约是 40 和 1000 mOsm/kg,与精浆的渗透压存在着相当大的差异,这种差异是大多数硬骨鱼精子运动的重要调节因素(Morita *et al.*, 2003)。

大多数硬骨鱼的精子,在精巢和精浆中不运动,在与精浆等渗的电解质和非电解质溶液中也不运动,对于淡水鱼来说,精子经低渗(低于 300 mOsm/kg)溶液稀释后,精子即被激活;相反,海水鱼类的精子只有稀释到高渗(高于 300 mOsm/kg)的溶液环境中,精子才能被激活,而渗透压过高(>1200 mOsm/kg)时,海水鱼类精子的活力则会受到抑制(Morisawa and Suzuki, 1980; Morisawa *et al.*, 1983; Morisawa *et al.*, 1983; Oda and Morisawa, 1993; Morisawa, 1994)。Morisawa 等(1990)用不同渗透压的 NaCl、KCl 和甘露醇溶液作为精子激活液,发现一些淡水硬骨鱼,如鲫(*Carassius auratus*)、褐三齿雅罗鱼(*Tribolod onhakonensis*)的精子,可被低于精浆渗透压的溶液激活;而一些海水硬骨鱼,如鳕(*Gadus morhua maorocephalus*)、黄盖鲽

(*Pseudopleuronectes yokohamae*)的精子, 可被高于精浆渗透压的溶液激活。Oda 和 Shinriki (1998) 把杜父鱼(*Cottus hangiongensis*)的精液稀释在 300 mOsm/L 的甘露醇溶液中, 有 22%的精子被激活; 用 200 mOsm/kg 的甘露醇溶液稀释, 有 63%的精子产生运动; 在 100 mOsm/kg 的甘露醇溶液中, 有超过 90%的精子产生运动; 把在 300 和 200 mOsm/kg 的甘露醇溶液中停止运动的精子, 再转移到 100 mOsm/kg 的甘露醇溶液中时, 又有超过 80%的精子再次重新运动。区又君等研究发现, 真鲷精子在盐度 30‰的海水中活力最高, 而在低于 15‰的海水中活力明显受到抑制, 在精子激烈活动时, 加入过量的盐度为 10‰的海水, 精子立即停止运动(区又君等, 1998)。Takai 和 Morisawa 研究显示, 通过改变溶液的渗透压(分别用 150 和 300 mOsm/kg 的 NaCl 溶液), 可以在短时间内重复几次激活和抑制斑马鱼精子活动(Takai and Morisawa, 1995)。中华倒刺鲃精子在 308 kPa 的 NaCl 或 KCl 溶液中活力最高, 而在与精浆等渗(约 680.10 kPa)条件下精子的活力被完全抑制(张春霖等, 1999)。亚洲鲶(*Clarias macrocephalus*)的精子在 200 mOsm/kg 的电解质溶液(NaCl、CaCl<sub>2</sub> 和 KCl)和非电解质溶液(甘露醇)中具有最高的激活率(Tan-fermin *et al.*, 1999)。大黄鱼精子随着盐度的升高, 其激活率和运动时间也逐步提高, 当盐度为 20‰~35‰时, 精子活率都在 90% 以上, 运动时间超过 10 min(林丹军和尤永隆, 2002)。

渗透压不仅可以影响鱼类精子运动的启动, 而且对精子运动的维持具有显著影响。渗透压过低对淡水鱼类精子的运动维持是不利的, 过高的渗透压则不利于海水鱼类精子运动的维持。对淡水鱼类来说, 精子在 100-200 mOsm/kg 的低渗溶液中能维持较长时间的运动, 如 Tan-Fermin 等(1999)发现亚洲鲶的精子在 200 mOsm/kg 的电解质溶液(NaCl、CaCl<sub>2</sub> 和 KCl)和非电解质溶液(甘露醇)中运动时间最长, 当溶液的渗透压大于 400 mOsm/kg 时, 精子运动被完全抑制。宽口光唇鱼精子在 0.51% (约 410 kPa) 氯化钠溶液运动持续时间最长, 在 0.35%~0.51% (287~410 kPa) 范围内, 精子寿命随浓度升高而延长, 浓度高于 0.51% (约 410 kPa) 后, 精子的活动即受到抑制, 运动时间缩短(罗芬和何学福, 1999)。鲢鱼精子在 0.5% 的 NaCl 溶液中 (约 410 kPa), 快速运动时间和寿命最长(魏开金等, 1996)。兴国红鲤精子在渗透压为 170 mOsm/L (410~420 kPa) 溶液中运动时间最长(黄辨非和罗静波, 2000)。其他淡水鱼类, 如鲤和团头鲂(严安生等, 1993)、乌鳢(赵振山等, 1995a)、南方鲶(蒲德永, 1996)、美国大口胭脂鱼(黄辨非等, 2000)、泥鳅(阮国良等, 2004) 等的精子均有相同特性。在海水鱼类中, 东方鲀(*Fugu niphobles*)的精子在 400 mOsm/kg 的溶液中运动时间最长的, 随着渗透压的升高, 运动时间缩短, 在大于或等于 1200 mOsm/kg 的渗透压溶液中, 精子停止运动(Morisawa and Suzuki, 1980)。日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)的精子, 在低于或等于精浆渗透压的溶液中不运动, 在 400~1500 mOsm/kg 的渗溶液范围内可激活精子运动, 高于 1500 mOsm/kg 时精子活动也受抑制(邓岳松和林浩然, 2000)。杜父鱼(*Blepsia scirrhusus*)精子在 1358.9 kPa (纯海水渗透压为 2264.9 kPa 左右) 溶液中运动时间最长(Koya *et al.*, 1993)。这些结果说明, 精液排出以后, 周围环境渗透压的变化不仅是激发精子运动启动的主要因素, 也是维持精子

运动的决定因素之一。

#### 1.2.3.4 离子

鱼类精浆中的离子成分主要包括  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等, 各种离子含量存在一定的种间差异(Morisawa *et al.*, 1983; Morisawa *et al.*, 1983; Billard *et al.*, 1995b; Tan-fermin *et al.*, 1999; 李霞等, 2002; Morita *et al.*, 2003; He *et al.*, 2004)。在鱼类精浆中含量最多的离子成份的是  $\text{Na}^+$ , 其次是  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等含量一般较少。精浆与外界环境中离子成份的差异, 被认为是鱼类精液排到水体后精子激活的直接动力之一(王宏田等, 1999)。激活液的离子成分会影响鱼类精子的激活和运动维持, 不同的离子对鱼类精子活力的影响存在差异, 而且同种离子对不同鱼类精子的影响效果也有很大差异。

##### 1.2.3.4.1 $\text{K}^+$ 对鱼类精子活力的影响

$\text{K}^+$ 是鱼类精浆中主要离子之一, 在鱼类精子活力的调节中扮演重要角色。早在 1925 年 Scheuring 就指出  $\text{K}^+$ 能抑制虹鳟精子的激活。此后许多学者对  $\text{K}^+$ 的作用开展了深入的研究。Kusa (1950)发现高浓度的  $\text{K}^+$ 对马苏大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 精子的活力和受精能力有显著的抑制作用。Bena 和 Terner (1980)研究发现将  $\text{K}^+$ 稀释或者经透析将其从精浆中除去, 可以引起鲑鱼精子运动(Benau and Terner, 1980)。Morisawa 等发现在鲑鳟鱼类如虹鳟、马苏大麻哈鱼、亮斑红点鲑 (*Salvelinus leucomaenis*) 的精液中  $\text{K}^+$ 含量很高, 高出血浆  $\text{K}^+$ 含量 5~10 倍, 用渗透压为 0~679.5 kPa (0~112 mmol/L) 的  $\text{NaCl}$  或甘露醇溶液来稀释精液, 精子都能被激活, 而渗透压为 0.57~1.13 kPa (1.5~3 mmol/L) 的  $\text{KCl}$  便能抑制精子运动, 当有  $\text{Na}^+$ 存在时,  $\text{K}^+$ 对精子激活的抑制浓度随  $\text{Na}^+$ 浓度的提高而增加, 在含 339.7 kPa 的  $\text{Na}^+$ 的溶液中需 13.5~14.7 kPa 的  $\text{K}^+$ 才能抑制精子运动(Morisawa *et al.*, 1983)。由此可见,  $\text{K}^+$ 对鲑科鱼类精子活力有显著的抑制作用。

鲟鱼精子也有类似特征, 而且鲟鱼精子对  $\text{K}^+$ 含量变化更为敏感。溶液中  $\text{K}^+$ 浓度的提高可以明显降低西伯利亚鲟(Gallis *et al.*, 1991), 匙吻鲟(Cosson and Linhart, 1996) 和湖鲟(Toth *et al.*, 1997) 精子的活力。Gallis 等(1991)发现 0.1 mmol/L 的  $\text{K}^+$ 可以完全抑制西伯利亚鲟精子的活力, 而在 0.05 mmol/L 时对精子的活力无任何影响。 $\text{K}^+$ 对湖鲟精子抑制浓度  $\text{EC}_{50}$ (半数抑制有效浓度)为 0.5 mmol/L(Toth *et al.*, 1997)。

在鲤科鱼类, 如鲤、鲫等, 虽然精浆  $\text{K}^+$ 含量较高 (50~82 mmol/L), 比血浆高出 18~29 倍, 但该浓度的  $\text{KCl}$  溶液并不能抑制精子运动, 相反,  $\text{K}^+$ 能提高精子运动速度, 延长精子运动时间(Morisawa and Suzuki, 1980)。鲤科鱼类丁鲃精子在 453.0 kPa 的  $\text{KCl}$  溶液中活力最强(苏德学等, 2004a)。白斑狗鱼的精子在 0~679.6 kPa 的  $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$  溶液中的活动变化趋势十分相似, 但在 453.0 kPa  $\text{KCl}$  溶液中的精子寿命则是同渗透压  $\text{NaCl}$  溶液的 3~4 倍, 这充分地表现出  $\text{K}^+$ 对提高精子活力所起的作用, 也说明白斑狗鱼精子生理特性类似于鲤科鱼类, 而有别于鲑鳟鱼类(苏德学等, 2004b)。这些研究都说明  $\text{K}^+$ 对精子活力的影响存在明显种属差异。

##### 1.2.3.4.2 $\text{Ca}^{2+}$ 对鱼类精子活力的影响

$\text{Ca}^{2+}$ 在鱼类精浆中含量较少,但是在鱼类精子活力的调节中具有重要作用,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内的 $\text{Ca}^{2+}$ 增加,是多数鱼类精子激活所必需的(Detweiler and Thomas, 1998)。Tanimoto等(1988)用QUIN 2/AM作为虹鳟精子细胞内自由 $\text{Ca}^{2+}$ 的荧光探针,发现精子细胞内的自由 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度从精子激活前的30 nmol/L增加到精子运动停止后的180 nmol/L,但是当激活液中有高浓度的 $\text{K}^+$ 或有 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断剂存在时,就观察不到 $\text{Ca}^{2+}$ 的增加。虽然 $\text{Ca}^{2+}$ 是多数鱼类精子激活所必须的,但是随浓度升高, $\text{Ca}^{2+}$ 就会表现出对精子活力强烈的抑制作用。0~16 mmol/L (105.6 kPa)的 $\text{Ca}^{2+}$ 不影响100 mmol/L (453.0 kPa) NaCl溶液中大马哈鱼精子的运动时间(Marian *et al.*, 1993),而当 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度高于20 mmol/L (132.0 kPa)则会引起虹鳟精子聚集,从而使精子活力明显降低(Billard *et al.*, 1993)。苏学德等(2004)研究发现,56.7 kPa的 $\text{CaCl}_2$ 就能引起白斑狗鱼精子的聚集,而且随 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增加,聚集现象更趋强烈,认为白斑狗鱼精子在 $\text{CaCl}_2$ 溶液中活力减弱,产生聚集现象与溶液渗透压无关,而是 $\text{Ca}^{2+}$ 作用的结果。在鲤、团头鲂、中华倒刺鲃、丁鲃、波斯鲟等鱼类的研究中均发现了 $\text{Ca}^{2+}$ 的这一作用(严安生等, 1993; 张春霖等, 1999; 苏德学等, 2004)。Alavi等发现在3 mmol/L  $\text{CaSO}_4$ 溶液中波斯鲟精子激活比率最高,持续运动时间最长,而当 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度高于5 mmol/L时,精子激活比率随浓度增加而迅速下降,说明波斯鲟精子对 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化较为敏感(Alavi *et al.*, 2004)。上述研究表明 $\text{Ca}^{2+}$ 对鱼类精子活力的促进或抑制作用是有浓度依赖性和种属依赖性的。

#### 1.2.3.4.3 $\text{Na}^+$ 对鱼类精子活力的影响

$\text{Na}^+$ 是鱼类精浆中含量最多的阳离子成分,对精浆维持稳定的渗透压有重要作用,鱼类精子对 $\text{Na}^+$ 浓度变化的敏感性远不如 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ ,鲟鱼类精子对 $\text{Na}^+$ 浓度变化的敏感性高于鲑鳟鱼类和鲤科鱼类(Gallis *et al.*, 1991; Toth *et al.*, 1997; Alavi *et al.*, 2004)。Toth等对湖鲟精子活力的研究中发现,随着激活液(Tris/glycine缓冲溶液)中 $\text{Na}^+$ 浓度的增加,精子运动时间先增加后减少,在浓度为10 mmol/L时,运动时间最长,超过1500 s (Toth *et al.*, 1997)。波斯鲟的精子在 $\text{Na}^+$ 浓度为25 mmol/L的激活溶液中,精子激活率最高,运动时间最长(Alavi *et al.*, 2004)。0.35%~0.55%的NaCl溶液均能明显提高瓣结鱼精子活力,而在0.75%~0.95%的NaCl溶液中,精子活力被抑制(谢恩义等, 1999)。鲟鱼精子在0~0.5%的NaCl溶液中,精子快速运动的时间和寿命相应延长,升高至0.6%后,精子活力开始受到抑制,至0.9%精子不见活动(魏开金等, 1996)。大口鲈精子在低浓度NaCl溶液(0.3%~0.6%)中活力有所提高,在高浓度NaCl溶液(0.85%~1.2%)中精子活力受抑制(罗相忠等, 2002)。此外,国内学者在对白斑狗鱼(苏德学等, 2004)、黄颡鱼(杨彩根等, 2003)、瓦氏黄颡鱼(杨家云, 2005)、黄鳝(周定刚和温安祥, 2003)、中华倒刺鲃、白甲鱼、岩原鲤(谭娟等, 2006)、乌鳢(赵振山等, 1995a)、高白鲑(谷巍等, 2005)、鲤和团头鲂(严安生等, 1993)等鱼的研究中发现, $\text{Na}^+$ 对多数鱼类精子活力的影响都表现出十分相似的变化趋势,即随着 $\text{Na}^+$ 浓度的升高,精子活力先升高后降低,而且对 $\text{Na}^+$ 离子浓度的变化有较高的适应性。

#### 1.2.3.4.4 离子间的相互作用

Scheuring (1925)首次报道了  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Mg}^{2+}$ 能解除  $\text{K}^+$ 对鲑鱼类精子活力的抑制作用, 并且  $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Mg}^{2+}$ 比  $\text{Na}^+$ 的作用更为有效, 这些作用存在浓度依赖效应。Schlenk 和 Kahmann (1957)发现, 当溶液中的  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 比小于或等于 1/16 时, 能激活大马哈鱼的精子运动。Morisawa 等(1983)发现, 有  $\text{Na}^+$ 存在时,  $\text{K}^+$ 对精子活力的抑制作用随着  $\text{Na}^+$ 浓度的提高而降低, 在含 150 mmol/L 的  $\text{Na}^+$ 的溶液中, 需要 6~6.5 mmol/L 的  $\text{K}^+$ 才能抑制精子的运动, 而在缺少  $\text{Na}^+$ 的溶液中, 0.25~0.5 mmol/L 的  $\text{K}^+$ 就可以抑制精子的运动。Billard 等研究发现, 在 2 mmol/L、20 mmol/L 和 40 mmol/L 的  $\text{K}^+$ 溶液中, 当  $\text{Ca}^{2+}$ 含量分别低于  $10^{-6}$ 、 $10^{-3}$  和  $10^{-2}$  mmol/L 时, 虹鳟精子的活力被抑制(Alavi and Cosson, 2006)。  $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{K}^+$ 浓度的变化与细须石首鱼精子运动的启动有关(Detweiler and Thomas, 1998)。  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Mg}^{2+}$ 也能解除  $\text{K}^+$ 对鲟鱼精子活力的抑制作用, Linhart 等(2002)研究表明, 匙吻鲟精子的运动启动是在  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的相互作用下实现的,  $\text{KCl}$  大于 0.5 mmol/L 可抑制精子的激活, 0.25mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 可以解除 0.5 mmol/L  $\text{K}^+$ 的这一抑制作用。

#### 1.2.3.5 其他因素对鱼类精子活力的影响

除了温度、pH、渗透压和离子成分之外, 精浆和环境中的其他因素如卵子分泌物、气体、营养物质等均会对鱼类精子活力产生影响。

鲱鱼和海鞘精子运动的启动, 则需要来自同种动物卵细胞的刺激物质 (Oda and Shinriki, 1998)。太平洋鲱(*Clupea pallasii*)的精子排到海水中不运动, 只有当它接触到卵细胞时才被激活, 激活物是来自卵的一种具有很高活性的糖基多肽, 称之为精子运动启动因子(sperm motility initiation factor, SMIF)(Vines *et al.*, 2003)。海鞘(*Ciona intestinalis* & *Csavignyi*)的精浆渗透压与海水的渗透压接近, 海鞘的精子在海水中不运动, 由来自卵细胞的“精子激活和吸引因子”(sperm-activating & -attracting factor, SAAF)刺激, 引起  $\text{Ca}^{2+}$ 内流和 cAMP 水平的提高, 才会引发精子运动的启动(Yoshida *et al.*, 1994; Izumi *et al.*, 1999)。

一氧化氮(NO)是新发现的细胞信使因子, 在免疫、心血管系统和神经信息传导中发挥重要作用。国内学者采用自低到高的系列浓度观察了 SNP 对精子活力的影响, 发现 SNP 对精子活力的影响存在剂量依赖效应, 在低浓度下可以促进精子的运动, 人工授精的试验表明 SNP 显著提高了鳗鲡的受精率, 表明 SNP 整体提高了精子的受精能力(谢骏等, 2003)。Dreanno 等发现,  $\text{CO}_2$  能抑制大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)精子的运动, 这种抑制作用是不依赖 pH 的,  $\text{CO}_2$  可阻止精子线粒体氧化磷酸化作用, 使 ATP 含量降低, 鞭毛停止摆动(Dreanno *et al.*, 1995)。

事实上鱼类生活的环境是十分复杂的, 往往包含着多种因素, 因此鱼类精子在排出体外后会受到多种因素共同作用, 精子活力的提高或降低将会直接影响鱼类的繁殖效果, 因此在人工繁殖过程中, 要优化各种环境条件, 通过提高精子活力来提高人工繁殖效果。



### 1.2.4 鱼类精子生理生态特性研究的意义

大多数硬骨鱼类及水生动物的精子在精巢和精浆中并不运动,当释放到水体中后,精子细胞周围的渗透压或离子浓度发生改变时,精子运动才被启动,这种运动的启动机制保证精液释放之前精子细胞中贮藏的能量没有任何浪费,为精液释放后精子的运动与受精打下了能量基础(Oda and Shinriki, 1998);在保证能量不被消耗的同时,还避免了精子细胞膜和内部结构的损伤,减少由于线粒体活动而产生的氧化剂的危害等。所以,这种运动启动的机制能有效地保护精子,提高排精后的受精能力。水生动物精子的这种运动特点,是对生存环境的一种保护性适应,是通过自然选择长期进化的结果。通过研究不同类动物精子生理生态特性,比较它们的相同和差异,总结规律,为探讨不同动物的演化地位提供可能的参考。

环境污染和过度开发导致物种资源破坏日益严重,对物种繁殖性能的破坏性影响已经是一个不争的事实,鱼类也无法逃避。配子质量的下降已经成为限制许多鱼类人工繁殖成功率的关键限制因素,开展鱼类精子生理生态特性的研究,将有助于开展鱼类精子的冷冻保存,人工授精稀释液的开发,促进人工繁殖技术的发展,这不仅具有一定的商业价值,对于珍稀濒危物种的保护更具有实际意义。

## 1.3 本研究的的目的和意义

近 20 多年来,由于水利工程建设、环境污染和航运发展等多种因素,中华鲟的生活环境受到极大的破坏,其资源量急剧下降,致使中华鲟种群达到濒危状态。为保护中华鲟物种资源,在大坝截流后的几年时间里,中国政府制定了一系列的政策法规及保护措施,包括实行人工繁殖放流,全长江禁捕,限制科研用鱼,将中华鲟列为国家一级保护动物等。尽管如此,从 1981 年至 1999 年的 19 年间,中华鲟的幼鲟补充群体和亲鲟补充群体分别减少了 80%和 90%左右(柯福恩, 1999; 危起伟等, 2005)。长江三峡水利工程等在建、拟建的大型水利工程和其他人类活动将对中华鲟资源产生进一步影响,物种保护任务仍然十分艰巨。

面对以上的问题,继续开展人工繁殖和增殖放流工作,仍然是保护这一珍稀物种的必要措施,但在中华鲟人工繁殖过程中仍然存在很多关键性技术点,需要做进一步的研究,以期在技术和效果上有更大的提高。近几年的研究发现,参与人工繁殖的野生亲鲟繁殖力呈明显下降的趋势,怀卵量和精子质量与上世纪 70~80 年代相比,有显著下降(刘鉴毅等, 2007)。此外,在人工繁殖过程中还存在雌雄成熟不同步和雌多雄少性比严重失调的问题,极大地制约了中华鲟人工繁殖的效果。因此在有限的资源条件下,如何提高资源的利用率,最大限度提高人工繁殖效果就是一个急需解决的问题。对中华鲟精子的生理生态特性进行研究,一方面是为了积累中华鲟繁殖生物学的相关数据,丰富鱼类精子生物学研究内容,另一方面期望对中华鲟人工授精液配方的改进提供有益的参考,也期望能够为中华鲟精液冷冻保存技术的研究提供相关参考。

## 第二章 中华鲟精液的基本特征

鱼类精液的基本特征包括精液浓度、精子密度、精液pH值和精子活力等若干常规的精液基础生物学特征。对中华鲟精液的基本特征进行检测和分析,一方面有助于在人工繁殖过程中较为准确地判断精液的质量,从而合理安排人工繁殖技术流程,提高资源利用效率;另一方面可以积累科学数据,通过与前人资料的对比,了解中华鲟精液基础生物学特征的变化。

### 2.1 材料和方法

#### 2.1.1 精液采集

中华鲟雄性亲本系长江水产研究所于2005年11月和2006年10月在长江宜昌葛洲坝下江段科研捕捞获取,捕获后运往中华鲟研究所暂养池,采用LRH-A进行人工催产,采集的精液装入干燥洁净的双层塑料保鲜袋中,充入纯氧气后放入装有冰块的保温箱中,带回实验室后马上进行相关检测。

#### 2.1.2 精液浓度、精子密度和精液的 pH 值

将新鲜精液装入刻度离心管中,常温下以4000 r/min离心30 min,计算精子细胞占精液总体积百分率,即为精液浓度,重复5次,结果取平均值。

将中华鲟精液稀释1000倍,稀释液为0.65%的NaCl溶液,用血球计数板法求出精子密度,重复3次,结果取平均值。

用精密试纸测定精液的pH。

#### 2.1.3 精子活力检测

精子活力分级参照严安生(1993)、江世贵(2000)、Alavi(2004a, 2005)等方法,并稍做修改。根据中华鲟精子的活动状态,可将其运动过程分为:快速运动,精子运动速度很快,其运动路线不清晰,只见精子从视野中迅速游过,多直线或半径较大的曲线运动;慢速运动,运动路线极清晰,能看清精子呈直线或曲线从一处缓慢移至另一处,部分精子偶有停顿;原地颤动,精子只在原地作摇摆运动,无明显位移;运动终止,精子原地静止,无任何动作。

自精子激活开始,至视野中70%以上精子由快速运动转入慢速运动时的时间为快速运动时间(Fast-movement time, FT),至90%以上精子无位移运动,转入原地颤动的时间为总运动时间(即精子向前运动时间, Total-movement time, TT),至90%以上精子停止任何运动的时间为精子寿命(Lifetime, LT),视野中作向前运动的精子占总精子的百分率为精子活率(Motile sperm percentage, MP)。

实验前先在载玻片上观察精子在精原液中的活动情况。检测时用一次性注射器

针头粘精液涂于载玻片上,用胶头滴管滴加2-3滴淡水,迅速与精液混合均匀,马上置于显微镜下观察(100×),同时按下秒表计时,本实验仅记录精子的快速运动时间、总运动时间和精子寿命,重复3次,结果取平均值。

### 2.1.4 数据分析与处理

用 Microsoft Excel 2003 软件进行数据分析处理。

## 2.2 结果

实验测得中华鲟新鲜精液的一般特征见表 2-1,中华鲟精子密度在  $1.48\sim 5.04\times 10^9$  ind./mL,平均为  $3.26\times 10^9$  ind./mL,精液浓度在 9.4~25.12%,平均为 17.37%,精子密度和精液浓度存在明显的个体差异;中华鲟精液的 pH 值在 7.5~8.5 之间,呈弱碱性;新鲜精子经淡水激活后其快速运动时间、总运动时间和寿命分别为 76s、114s 和 162s;中华鲟精液颜色为乳白色和白色,其中乳白色精液较浓,似浓牛奶但不粘稠,白色精液则显得稀薄。镜检发现中华鲟精子在精原液中即有微弱的颤动,并且精液越稀其中精子的颤动越明显。

表 2-1 中华鲟精液的一般特征

Table 2-1 The basic characteristics of milt of Chinese sturgeon

亲本 Brood stock	精子密度 Sperm density (ind./mL)	精液浓度 Milt concentration (%)	pH	精子活力 Sperm motility (s)			颜色 Colour
				FT	TT	LT	
♂1	$2.25\times 10^9$	10.30		89	-	181	白色 white
♂2	$5.04\times 10^9$	25.12		93	-	160	乳白色 ivory-white
♂3	$4.27\times 10^9$	24.64	7.5~8.5	62	111	158	乳白色 ivory-white
♂4	$1.48\times 10^9$	9.40		58	117	148	白色 white
平均 Average	$3.26\times 10^9$	17.37		76	114	162	

注: FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime

## 2.3 讨论

中华鲟精子的平均密度为  $3.26\times 10^9$  ind./mL, 和我国多数淡水鱼类相比, 中华鲟精子密度较低, 如高白鲑精子平均密度为  $27.8\times 10^9$  ind./mL (谷巍, 2005), 大黄鱼精子平均密度为  $14.5\times 10^9$  ind./mL (林丹军和尤永隆, 2002), 鲤鱼精子平均密度为

$29.4 \times 10^9$  ind./mL, 团头鲂精子平均密度为  $33.2 \times 10^9$  ind./mL, “四大家鱼”精子平均密度为  $26.6 \times 10^9$  ind./mL(鲁大椿等, 1989); 和其他鲟鱼相比差别不大, 史氏鲟精子密度为  $2.45 \sim 9.5 \times 10^9$  ind./mL(孙大江等, 2002), 有学者认为这和中华鲟精子个体较大, 单体排精量较一般鱼类多有一定关系, 较大的排精量弥补了中华鲟精子密度较低的缺陷, 保证了自然繁殖的受精率。根据报道, 1982~1984 年间中华鲟精子密度为  $5 \sim 12 \times 10^9$  ind./mL(鲁大椿等, 1998), 明显高于近两年(2005~2006)精子的密度, 现今最高密度还不及过去的最低密度, 可见雄性中华鲟个体繁殖力下降是非常明显的。虽然精液的密度下降, 但由于中华鲟个体排精量巨大, 雄鲟的精液量都高于 1000 mL, 最高可达 5952 mL, 因此排出精子总数仍然巨大, 根据  $1:3.5 \times 10^5$  的卵精比(鲁大椿等, 1989), 1 尾雄鱼排出的精子足可以使数百万卵子受精。

中华鲟精液和多数鱼类一样, 为白色或乳白色, 但不粘稠。7.5~8.5 的 pH 值范围和其他鱼类相似, 是对自然水体环境适应的结果。

和其他淡水鱼类相比, 中华鲟精子活力较高, 寿命较长, 具有鲟鱼类精子的基本特征。如瓣结鱼精子快速运动时间仅 21.9s, 寿命 80.5s(谢恩义等, 1999), 大银鱼精子快速运动时间 35.5s, 寿命 51.3s(李勃等, 1997) 均明显低于中华鲟精子快速运动时间和寿命, 中华鲟精子的这一特点是对急流繁殖的一种适应(危起伟, 2003)。虽然中华鲟精子活力较一般淡水鱼类高, 但是仍然无法掩盖其精子活力逐步衰退的事实, 根据相关资料发现 1973~1976 年、1982~1984 年、1998~2004 年、2005~2006 年 4 个时期精子快速运动时间平均值分别为 397 s、213s、103 s 和 76 s, 寿命分别为 2624 s、2579 s、923 s 和 162 s(四川省长江水产资源调查组, 1988; 鲁大椿等, 1998; 刘鉴毅等, 2007), 精子活力呈规律性下降趋势, 反映出中华鲟精子质量的不断下降。参与繁殖的中华鲟亲鲟的繁殖力的下降, 对于中华鲟自然种群的恢复是非常不利的, 是对中华鲟保护工作的一大挑战。

## 第三章 中华鲟精液离体短期保存

目前在中华鲟人工繁殖工作中,时常发生雌雄亲鲟成熟不同步,和雌多雄少性比失调现象,因此中华鲟精液离体短期保存已经成为保证中华鲟人工繁殖工作顺利进行的重要的技术手段,四川省长江水产资源调查组曾于1973和1974年做了有关中华鲟精液离体短期保存的研究,但由于相隔时间较长,目前的保存条件和精液质量已经和过去发生较大的变化,因此有必要对中华鲟精液离体保存再进行研究,以积累相关资料,了解精子在保存过程中活力变化规律,为保存条件的优化提供参考。

### 3.1 材料和方法

#### 3.1.1 精液采集

中华鲟雄性亲本系长江水产研究所于2005年11月在长江宜昌葛洲坝下江段科研捕捞获取,捕获后运往中华鲟研究所暂养池,采用LRH-A进行人工催产,采集的精液装入干燥洁净的双层塑料保鲜袋中,充入纯氧气后放入装有冰块保温箱中,经汽车运输至荆州中华鲟增殖放流基地后,马上进行实验。

#### 3.1.2 实验条件

试验场地在荆州中华鲟增殖放流基地人工繁殖场,室内温度18~21℃。实验用水为荆州中华鲟增殖放流基地人工繁殖用水,水温18~19℃,水质状况良好。温度调节设备包括保温箱、恒温加热棒、冰箱、温度计。

#### 3.1.3 保存条件设置

本试验设置2℃、12℃、20℃共3个保存条件,2℃为冰箱设定温度,12℃采用冰水浴设定,20℃采用温水浴,用25 mL取样瓶分装2 mL鲜精液保存在以上温度中。每隔2~3 h观察水浴温度,温度变动幅度要求在±1℃之内,超出此范围立即调整至设定温度。

#### 3.1.4 精子活力检测

精子活力检测方法同2.1.3,记录精子快速运动时间和总运动时间。实验开始后前24 h内,每4 h左右观察一次精子活力;24 h后,每8~12 h观察一次。每一观察均重复3次以上,结果取平均值。实验中注意记录初次出现死精、50%死精、100%死精时间。

#### 3.1.5 数据分析和处理

采用SPSS 13.0软件进行数据分析,用SigmaPlot 10.0软件作图。

### 3.2 结果

中华鲟精子在保存过程中，随保存时间的延长，其活力逐渐下降。在不同的保存温度下，精子活力下降的速度有所不同（见图3-1、图3-2），保存温度越高，活力下降越快，并且精子死亡也越快（见表3-1）。

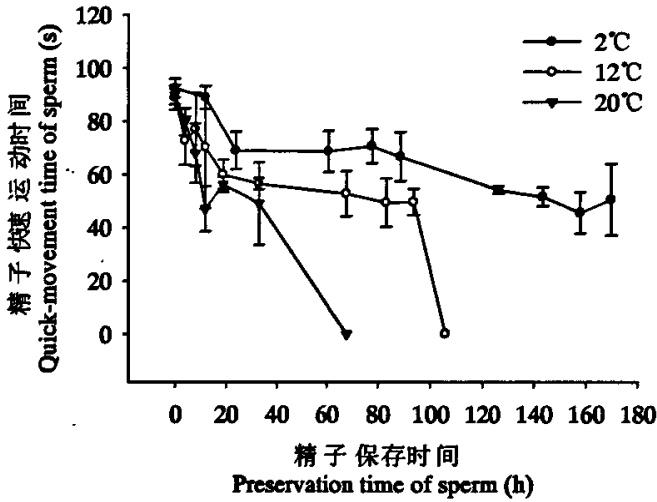


图 3-1 不同温度下保存中华鲟精子快速运动时间变化

Fig. 3-1 The variety of quick-movement time of Chinese sturgeon sperm preserved under different temperature

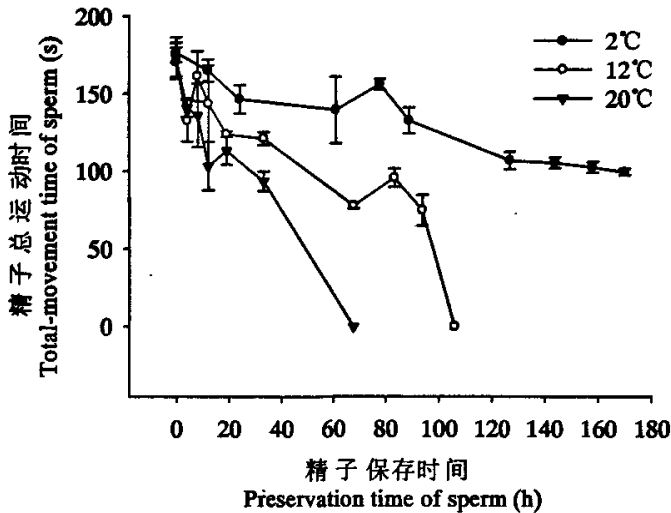


图 3-2 不同温度下保存中华鲟精子总运动时间变化

Fig. 3-2 The variety of total-movement time of Chinese sturgeon sperm preserved under different temperature

在 20 ℃下保存, 精子快速运动时间和总运动时间快速下降, 12 h 就出现死精, 24 h 后有 50%精子死亡, 快速运动和总运动时间迅速下降, 到 68 h 则精子全部死亡, 并且样瓶内滋生大量细菌, 散发臭味。在 12 ℃保存的精子, 保存至 32 h 精子明显死亡, 至 82 h 有近 50%精子死亡, 到了 106 h 几乎没有存活, 瓶内细菌繁殖。在 2 ℃下保存的精子, 保存 89 h 后才出现明显死精, 至 50%精子死亡时间为 242 h, 并且至 170 h 精子的快速运动时间保持在 50 s 以上, 总运动时间超过 100 s, 瓶内几乎未见细菌生长。

表 3-1 不同温度下保存中华鲟精子的死亡时间

Table 3-1 Death-time of the Chinese sturgeon sperm preserved under different temperature

保存温度	死精出现时间	50%精子死亡时间	100%精子死亡时间
Preservation temperature (°C)	Time of died sperm appearance (h)	Time of death of 50% sperm (h)	Time of death of 100% sperm (h)
2	89	242	>242
12	32	82	106
20	12	24	68

### 3.3 讨论

鱼类精子短期保存最主要的目的就是为了方便生产管理、提高配子资源利用率, 以提高人工繁殖效率, 而对于本身资源有限的珍稀濒危鱼类的保护更有实际意义。多种鱼类精子短期保存技术的研究已经获得成功, 并已经被广泛应用在人工繁殖和生产管理中(Vladic and Jarvi, 1997; Rodriguez-munoz and Oianguren, 2002), 温度是影响鱼类精子短期保存主要因素, 温度主要从两方面影响鱼类精子保存的时间: 一方面是影响精子自身的能量代谢, 温度可以影响精子细胞中酶的活性、ATP 消耗率、精子呼吸作用的强度等, 在生理耐受范围内, 温度升高酶活性提高, 精子呼吸作用增强, 能量物质消耗率提高, 当精子细胞中的 ATP 含量降低到原有水平的 20%左右, 精子就基本失去活动能力(Billard and Cosson, 1992; 江世贵等, 2000; 赵会宏等, 2003); 另一方面则影响精子所处的微环境, 如代谢产物浓度、精浆中各种离子浓度、有害细菌的繁殖。较高的温度利于各种有害菌繁殖, 在实验中可以观察到在较高温度下保存的精液中细菌出现最早, 繁殖最快。Brown 和 Mims (1995)研究发现, 添加适量的青霉素和链霉素可以显著延长精子保存时间。

降低温度是抑制精子能量代谢的有效途径之一。在不同温度下保存效果的比较可以看到, 随保存时间延长, 无论是精子快速运动的时间还是总运动时间, 低温下保存的精子明显比高温下保存的长, 此结果与其他有关精子短期保存的研究结果基本一致(区又君等, 1998; Park and Chapman, 2005; Alavi and Cosson, 2005)。但是在

低温中保存的精子其代谢活动并未完全停止,在精原液中的精子仍在不断消耗能量,致使在低温中保存的精子的活力也会随保存时间的延长而逐渐下降,被激活后的快速运动时间和总运动时间都呈下降趋势,因此精子短期保存的时间是有限的(舒琥等, 2005)。实际应用中,在较低温度(0~2℃)下短期保存中华鲟精子是可行的,1周内可以用于人工授精,而且适当添加抗生素以抑制细菌繁殖,也许能取得更为理想的效果,若要长期保存(long-term storage)则需要采用超低温保存的方法(Billard *et al.*, 2004)。



## 第四章 中华鲟精浆主要离子成分

鱼类精浆中含有多种化学成分,包括无机物和有机物,其中无机成分( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 、 $Cl^-$  等)与精子活动的启动和抑制有关,是构成精浆渗透压的主要成分,对鱼类精子在精原液中维持结构和功能的稳定有重要作用。对精浆离子成分进行研究分析,对于精子保存液和受精稀释液配方的设计和改良有极大的参考价值。至今已在鲤科鱼类、鲑科鱼类、鲟科鱼类等多种鱼类中开展的相关研究,但未见有关中华鲟精浆主要离子成分的研究报道,因此对中华鲟精浆主要离子成分进行研究分析,具有一定的科学和现实意义。

### 4.1 材料和方法

#### 4.1.1 精浆提取

中华鲟雄性亲本系长江水产研究所于2006年10月在长江宜昌葛洲坝下江段科研捕捞获取,捕获后运往中华鲟研究所暂养池,采用LRH-A进行人工催产,采集的精液装入干燥洁净的双层塑料保鲜袋中,充入纯氧气后放入装有冰块的保温箱中,带回实验室后,将采集的新鲜精液在4℃条件下,以4000 r/min离心10 min,之后取中上层精浆在-21℃下保存待用。

#### 4.1.2 离子成分检测

本实验主要检测以下离子成分: $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cl^-$ ,其中 $Na^+$ 、 $K^+$ 采用火焰发射光谱法检测, $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 采用原子吸收光谱法检测,检测仪器为Varian AA240FS原子吸收分光光度计, $Cl^-$ 采用南京建成生物制品有限公司生产的 $Cl^-$ 检测试剂盒检测,检测仪器为可见光分光光度计,按说明书操作。采用WX-4000快速微波消解系统对样品进行预处理,消除有机物质对实验结果的影响。实验在常温下进行,所有样品均在同一时间段内检测,重复3次,结果以平均值 $\pm$ 标准差(Mean  $\pm$  S D)表示。

#### 4.1.3 数据分析与处理

用SPSS 13.0软件进行数据分析和处理,进行配对样本t检验,显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

### 4.2 结果

中华鲟精浆主要离子成分检测结果见表4-1,3号雄鲟精浆的 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cl^-$ 含量分别为 $18.63\pm 0.12$ 、 $7.78\pm 0.47$ 、 $0.11\pm 0.020$ 、 $0.84\pm 0.13$ 、

0.040±0.0030、0.016±0.0030、4.68±0.62 mmol/L，4号雄鲟精浆的Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>含量分别为16.67±0.098、4.46±0.020、0.10±0.010、0.81±0.10、0.043±0.0020、0.017±0.0020、0.98±0.52mmol/L。可见中华鲟精浆中以Na<sup>+</sup>含量最高，其次是K<sup>+</sup>，之后分别是Cl<sup>-</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>，Na<sup>+</sup>为K<sup>+</sup>含量的2~4倍，为Cl<sup>-</sup>含量的5~10倍。两尾雄鱼间Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>含量有极显著差异(p<0.01)，而Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>的含量无明显差异(p>0.05)。

表 4-1 中华鲟精浆中主要离子成分 (单位: mmol/L)

Table 4-1 The main ions composition of seminal plasma of Chinese sturgeon

离子成分 Ions composition	♂3	♂4	P
Na <sup>+</sup>	18.63±0.12	16.67±0.098	<0.01
K <sup>+</sup>	7.78±0.47	4.46±0.020	<0.01
Ca <sup>2+</sup>	0.11±0.020	0.10±0.010	>0.05
Mg <sup>2+</sup>	0.84±0.13	0.81±0.10	>0.05
Cu <sup>2+</sup>	0.040±0.0030	0.043±0.0020	>0.05
Zn <sup>2+</sup>	0.016±0.0030	0.017±0.0020	>0.05
Cl <sup>-</sup>	4.68±0.62	0.98±0.52	<0.01

### 4.3 讨论

精液是精子和精浆的混合物，精浆中含有许多复杂的成分，一部分主要起维持精子存活的功能，另一部分则主要反映了鱼类生殖系统和精子的功能(Alavi and Cosson, 2006)。精液生化检测已经成为鱼类繁殖能力评估的重要辅助手段(Kruger *et al.*, 1984)，研究精浆成分特征对于了解精子产生、精子运动和受精过程中的生物化学变化，评估不同种类繁殖能力，改进精液短期和长期储藏的方法都非常有益。和其他硬骨鱼类一样，Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>是鲟鱼精浆中主要的离子成分，但是鲟鱼精浆中Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>的浓度通常低于其他鱼类，鲑鳟鱼类精浆中的Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>的浓度范围分别为103~159、20~66和130~156 mmol/L，鲤科鱼类分别为13~107、20~87和96~110mmol/L，而鲟鱼类分别为25~63、2.5~7.5和2~11 mmol/L (鲁大椿等, 1992; Alavi *et al.*, 2004; Alavi and Cosson, 2006)。

实验检测所得中华鲟精浆中Na<sup>+</sup>含量仅有18.63±0.12和16.67±0.098 mmol/L，明显低于其他鲟鱼类，如波斯鲟为62.44±20.47 mmol/L (Alavi *et al.*, 2004)，湖鲟为25.6±2.8 (1993)和31.8±7.0 (1994) mmol/L (Toth *et al.*, 1997)，西伯利亚鲟为28±0.7 mmol/L

(Gallis *et al.*, 1991), 匙吻鲟为21.74 mmol/L (Mims, 1991)。中华鲟精浆中K<sup>+</sup>含量和湖鲟、波斯鲟精浆中含量相近, 湖鲟为6.97±1.42 mmol/L, 波斯鲟为5.77-7.47 mmol/L, 但比匙吻鲟(2.49 mmol/L)和西伯利亚鲟高(2.5±0.3 mmol/L)。中华鲟精浆中Ca<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>含量较其他鲟鱼类低, 而Mg<sup>2+</sup>含量略高于其他鲟类。

从表4-1中可以发现, 2尾中华鲟精浆中的Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>含量存在极显著差异, 而其他离子Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>均无显著差异, 而且含量非常接近, 其他鲟鱼如波斯鲟和湖鲟也有类似现象。虽然还无法确定是否所有中华鲟精浆中的Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>含量均具有这样的特征, 但可以肯定的是中华鲟精浆中Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>含量在不同个体间存在较大的波动。个体间的这一差异可能会影响精液的质量和精子的活力, 已有研究发现Na<sup>+</sup>含量和精浆渗透压存在显著正相关关系(Kruger *et al.*, 1984; Lahnsteiner *et al.*, 1996), Alavi等(2004)研究发现波斯鲟精子的活率和运动持续时间随着精浆中Na<sup>+</sup>含量的增加而显著提高。

## 第五章 理化因子对中华鲟精子活力的影响

大多数鱼类精子在精巢和精浆中是不运动的,只有在排出体外释放到自然水体或者人工授精稀释液中后才能被激活运动。多数淡水鱼类精子在淡水中的运动时间非常短,通常不到2 min,而快速运动常低于30s,鲟鱼类精子的运动时间比一般淡水鱼类要长,寿命可达到几分钟至几十分钟。精子活力是检测精液质量和受精能力的关键指标,外界环境的离子成分、渗透压、pH值和温度等均能影响鱼类精子的活力。已有研究表明,鲤科鱼类精子的激活主要受溶液渗透压调节,而鲑科鱼类和鲟鱼类精子的激活主要受 $K^+$ 的调节。正是由于精子活力容易受到许多外界因素的影响,因此研究中华鲟精子在不同理化条件下精子活力的变化规律,对人工繁殖技术的改进具有实际意义。

### 5.1 材料与方法

#### 5.1.1 精液采集

中华鲟雄性亲本系长江水产研究所分别于2005年11月和2006年10月在长江宜昌葛洲坝下江段科研捕捞获取,捕获后运往中华鲟研究所暂养池,采用LRHA-2进行人工催产,采集的精液装入干燥洁净的双层塑料保鲜袋中,充入纯氧气后放入装有冰块的保温箱中,经汽车运输至荆州中华鲟增殖放流基地,更换氧气后保存于0~4℃冰箱中,此后每4h换氧一次。

#### 5.1.2 溶液配制

pH梯度为5、6、7、8、9、10,NaCl溶液浓度梯度为0、25、50、75、100、125、150mmol/L,KCl溶液浓度梯度为0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5mmol/L,CaCl<sub>2</sub>溶液浓度梯度为0、1、3、5、10、15、20mmol/L,MgCl<sub>2</sub>溶液浓度梯度为0、1、3、5、10、15、20mmol/L,蔗糖和葡萄糖溶液浓度梯度为0、50、100、150、200、250mmol/L,根据NaCl、蔗糖和葡萄糖实验结果,确定中华鲟精子活动渗透压范围为0~150mOsm/L,从而设定渗透压梯度0、25、50、75、100、125、150 mOsm/L。实验所用的NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、蔗糖、葡萄糖、浓盐酸、Tris试剂均为分析纯,用蒸馏水配制,渗透压溶液为NaCl、蔗糖和葡萄糖3种溶液,pH溶液为20 mmol/L Tris-HCl缓冲溶液,用上海今迈仪器厂PHS-5C型pH计调节酸碱度,使用前按说明书进行校准。

#### 5.1.3 精子活力检测

精子活动分级同2.1.3。试验温度18~20℃,用移液枪移取100 μL试验溶液,滴加于载玻片上,再用微量移液枪移取1 μL精液加入试验溶液中迅速混匀(稀释比

1:100), 同时按下秒表计时。采用 Leica 1000 型显光学显微镜 10×40 倍下观察精子活力, 观察以一个视野为准, 每个梯度重复 3 次以上。本试验记录精子快速运动时间、总运动时间、寿命和精子激活率。

#### 5.1.4 数据分析

用 SPSS 13.0 软件进行数据分析和处理, 用 LSD 法进行组间多重比较, 用 Duncan 氏新复极差检验法作子集一致性检验, 显著性水平  $\alpha=0.05$ , Microsoft Office Excel 2003 软件作图, 结果以平均值±标准差 (Mean ± S D) 表示。

## 5.2 结果

### 5.2.1 pH 对中华鲟精子活力的影响

不同 pH 条件下中华鲟精子活力的变化情况见表 5-1 和图 5-1, 随着溶液 pH 的升高, 中华鲟精子快速运动时间、总运动时间、寿命和精子活率均呈现出先升高后降低的变化趋势。在 pH 8.0 时, 精子活力最高, 各项指标均达到最大值, 精子快速运动时间、总运动时间和寿命分别为  $58.50\pm 13.18$  s、 $174.75\pm 12.01$  s、 $210.67\pm 18.82$  s, 在 pH 10.0 时, 精子活力最低, 分别为  $33.00\pm 2.00$  s、 $82.67\pm 10.69$  s、 $113.00\pm 4.36$  s。pH 8.0 时精子快速运动时间与 pH 10.0 时比较有显著差异 ( $p<0.05$ ), 和其他各项差异不显著 ( $p>0.05$ ), pH 8.0 时的总运动时间和寿命与其他各项比较有极显著差异 ( $p<0.01$ ), pH 7.0~8.0 时精子活率达到 90% 以上。

### 5.2.2 Na<sup>+</sup> 对中华鲟精子活力的影响

Na<sup>+</sup>对中华鲟精子活力的影响见表 5-2 和图 5-2, 可见随着 Na<sup>+</sup>浓度增加, 中华鲟精子活力先提高后逐步下降, 50 mmol/L 时即表现出了对精子活力的抑制作用, 至 100 mmol/L 则显著抑制了精子活力, 125 mmol/L 完全抑制精子活力。Na<sup>+</sup>浓度为 25 mmol/L 时, 精子活力最高, 精子快速运动时间、总运动时间和寿命均达最大值, 分别为  $62.3\pm 3.0$  s、 $136\pm 11.9$  s 和  $198.3\pm 13.5$  s, 与 0.50 mmol/L 时比较有显著差异 ( $P<0.05$ ), 与 75、100、125、150 mmol/L 相比差异极显著 ( $P<0.01$ )。

### 5.2.3 K<sup>+</sup> 对中华鲟精子活力的影响

不同浓度的 K<sup>+</sup>对中华鲟精子活力的影响结果见表 5-3 和图 5-3, 中华鲟精子对 K<sup>+</sup>含量变化非常敏感, K<sup>+</sup>浓度由 0.01 mmol/L 提高至 0.5 mmol/L 时, 中华鲟精子运动时间稍有延长, 变幅不大, 在 0.5 mmol/L 时精子活率有所下降, 当 K<sup>+</sup>浓度达到 1 mmol/L 以上, 精子活力立即受抑制, 不见精子运动。0.5 mmol/L 时精子快速运动时间最长, 为  $76.5\pm 7.7$  s, 与 0.01、0.05、0.1 mmol/L 组比较差异不显著 ( $P>0.05$ ), 与 1、2、5 mmol/L 组比较差异极显著 ( $P<0.01$ ); 0.1 mmol/L 时精子总运动时间和寿命最长, 分别为  $173.3\pm 11.2$  s、 $214.7\pm 6.7$  s, 与 0.01、0.05、0.5 mmol/L 组比较差异不显著 ( $P>0.05$ ), 与 1、2、5 mmol/L 组比较差异极显著 ( $P<0.01$ )。

表 5-1 不同 pH 条件下中华鲟精子的 FT、TT 和 LT (单位: s)

Table 5-1 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different pH condition

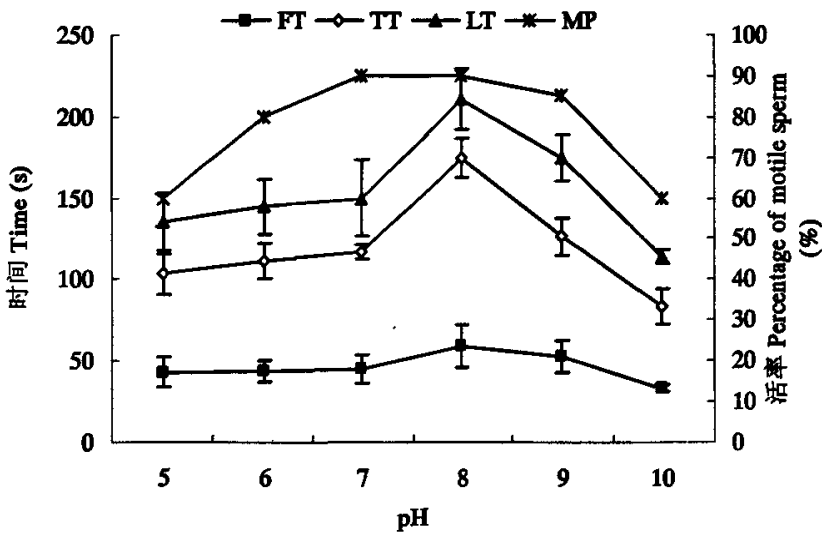
pH value	FT		TT		LT	
	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差
	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD
5	33~51	43.00±9.17 <sup>ab</sup>	84~111	103.25±12.89 <sup>b</sup>	118~152	135.25±17.23 <sup>ab</sup>
6	37~51	43.50±6.61 <sup>ab</sup>	102~126	111.25±11.24 <sup>bc</sup>	128~168	145.00±1.01 <sup>b</sup>
7	33~55	44.50±9.00 <sup>ab</sup>	112~123	117.00±4.54 <sup>bc</sup>	122~179	149.75±23.34 <sup>bc</sup>
8	46~77	58.50±13.18 <sup>b</sup>	163~187	174.75±12.01 <sup>d</sup>	189~223	210.67±18.82 <sup>d</sup>
9	43~64	52.00±9.72 <sup>b</sup>	113~140	126.20±11.08 <sup>c</sup>	160~194	174.60±14.06 <sup>c</sup>
10	31~35	33.00±2.00 <sup>a</sup>	76~95	82.67±10.69 <sup>a</sup>	108~116	113.00±4.36 <sup>a</sup>

注: 1) 同列数字右上角所标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

2) FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: 1) superscript in the same column with the different lowercase means significant difference (P<0.05)

2) FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 1 不同 pH 条件对中华鲟精子活力的影响

Fig. 1 Effect of different pH value on motility characteristics of Chinese sturgeon sperm

表 5-2 中华鲟精子在不同浓度 NaCl 溶液中的 FT、TT 和 LT (单位: s)

Table 5-2 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different concentration of NaCl solution

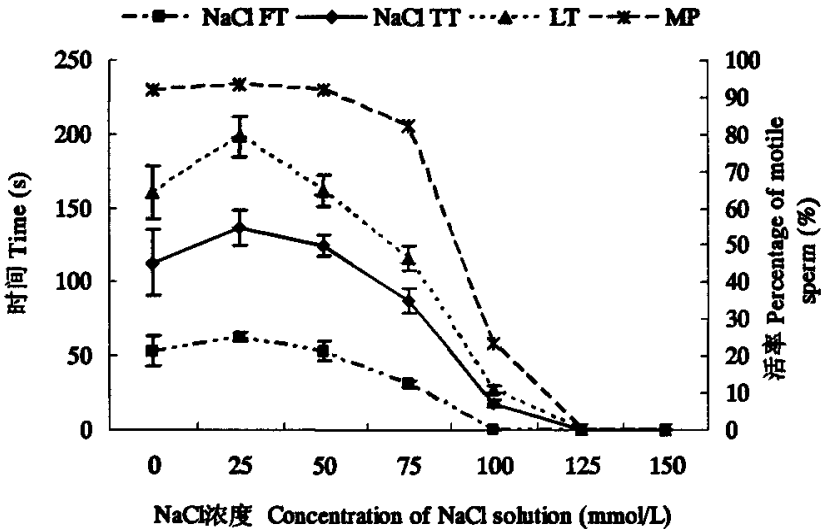
NaCl (mmol/L)	FT		TT		LT	
	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差
	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD
0	43~63	53.00±10.00 <sup>c</sup>	74~117	112.67±22.05 <sup>d</sup>	115~150	160.33±17.89 <sup>e</sup>
25	59~66	62.25±2.99 <sup>d</sup>	105~131	136.00±11.92 <sup>e</sup>	131~164	198.25±13.50 <sup>e</sup>
50	44~58	53.00±6.22 <sup>c</sup>	100~105	124.75±6.94 <sup>de</sup>	120~145	161.75±11.03 <sup>e</sup>
75	28~35	31.20±2.86 <sup>b</sup>	60~79	87.00±8.37 <sup>c</sup>	90~105	115.67±8.14 <sup>b</sup>
100	0	0 <sup>a</sup>	15~20	17.67±2.52 <sup>b</sup>	15~20	27.67±2.52 <sup>a</sup>
125	0	0 <sup>a</sup>		0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
150	0	0 <sup>a</sup>		0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>

注: 1) 同列数字右上角所标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

2) FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: 1) superscript in the same column with the different lowercase means significant difference (P<0.05)

2) FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 5-2 Na<sup>+</sup>对中华鲟精子活力的影响

Fig. 5-2 Effect of Na<sup>+</sup> on motility characteristics of Chinese sturgeon sperm

表 5-3 中华鲟精子在不同浓度 KCl 溶液中的 FT、TT 和 LT (单位: s)

Table 5-3 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different concentration of KCl solution

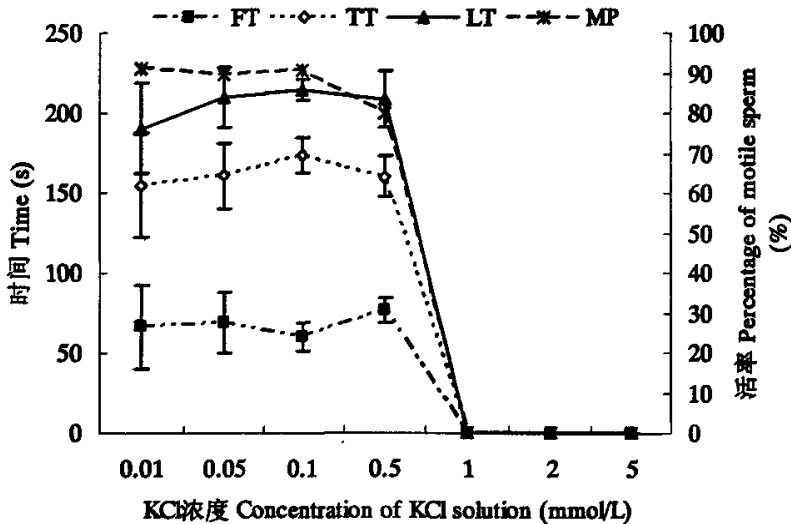
KCl (mmol/L)	FT		TT		LT	
	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差
	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD
0.01	45~95	66.33±25.79 <sup>b</sup>	117~175	155.00±32.92 <sup>b</sup>	162~218	190.33±28.00 <sup>b</sup>
0.05	47~83	68.67±19.09 <sup>b</sup>	138~179	160.67±20.84 <sup>b</sup>	196~231	209.67±18.72 <sup>b</sup>
0.1	54~70	60.00±8.72 <sup>b</sup>	161~183	173.33±11.24 <sup>b</sup>	207~219	214.67±6.66 <sup>b</sup>
0.5	72~88	76.50±7.72 <sup>b</sup>	146~176	160.50±12.37 <sup>b</sup>	188~228	208.50±17.92 <sup>b</sup>
1	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
2	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
5	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>

注: 1) 同列数字右上角所标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

2) FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: 1) superscript in the same column with the different lowercase means significant difference (P<0.05)

2) FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 5-3 K<sup>+</sup>对中华鲟精子活力的影响

Fig. 5-3 Effects of K<sup>+</sup> on motility characteristics in Chinese sturgeon sperm



### 5.2.4 $\text{Ca}^{2+}$ 对中华鲟精子活力的影响

$\text{Ca}^{2+}$ 对中华鲟精子活力的影响效果见表 5-4 和图 5-4。 $\text{Ca}^{2+}$  离子含量增加, 精子运动时间变化较小, 但精子活率随浓度升高而呈明显下降趋势。在 5 mmol/L 时精子快速运动时间、总运动时间和寿命最长, 分别为  $49.7 \pm 12.9$  s、 $134.3 \pm 13.5$  s、 $184.3 \pm 22.2$  s, 其中快速运动时间和 10~20 mmol/L 组比较差异显著 ( $P > 0.05$ ), 总运动时间和寿命与 20 mmol/L 组比较差异显著 ( $P > 0.05$ ), 其它各组比较均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 此时中华鲟精子活率已有明显下降, 至 10 mmol/L 时, 精子活率降至 50% 以下。

### 5.2.5 $\text{Mg}^{2+}$ 对中华鲟精子活力的影响

$\text{Mg}^{2+}$ 对中华鲟精子活力的影响和  $\text{Ca}^{2+}$ 相似, 随  $\text{Mg}^{2+}$  离子浓度增加, 精子运动时间变化较小, 但精子活率随浓度升高而呈明显下降趋势 (见表 5-5、图 5-5)。 $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 5 mmol/L 时精子快速运动时间、总运动时间和寿命最长, 分别为  $53.0 \pm 9.0$  s、 $159.7 \pm 28.4$  s、 $190.0 \pm 9.4$  s, 其中快速运动时间和其它组比较差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 总运动时间和其它组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 寿命和其他组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ), 在 15 mmol/L 时, 精子活率降至 50% 以下。

### 5.2.6 葡萄糖对中华鲟精子活力的影响

中华鲟精子在不同浓度葡萄糖溶液中的活力存在明显差异, 随溶液浓度升高精子运动时间先升高后下降, 精子活率则呈下降趋势 (见表 5-6、图 5-6)。葡萄糖浓度为 50 mmol/L 时, 精子活力最高, 其快速运动时间、总运动时间和寿命最长, 分别为  $84.8 \pm 31.2$  s、 $221.7 \pm 31.7$  s、 $266.0 \pm 14.5$  s, 仅快速运动和 0 mmol/L 差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 其余各项比较均有极显著差异 ( $P < 0.01$ )。当浓度超过 100 mmol/L 时即对精子活力有抑制作用, 至 150 mmol/L 时精子无快速运动, 总运动时间仅  $34.67 \pm 5.13$  s, 至 200 mmol/L 则完全抑制精子活力。

### 5.2.7 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对 $\text{K}^+$ 抑制作用的解除效果

在 1 mmol/L 和 2.5 mmol/L 的 KCl 溶液中分别添加不同浓度的 NaCl、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ , 观察  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对  $\text{K}^+$ 抑制作用的解除效果, 所得结果见表 5-7~5-9 和图 5-7~5-9, 可见  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 均能解除  $\text{K}^+$ 的抑制作用, 但效果各不相同。 $\text{Na}^+$ 可以解除 1 mmol/L 的  $\text{K}^+$ 的抑制作用, 有效浓度为 37.5~50 mmol/L, 但  $\text{Na}^+$ 不能解除 2.5 mmol/L 的  $\text{K}^+$ 的抑制作用, 仅在 50 mmol/L 时有极少数精子活动几秒即停止;  $\text{Ca}^{2+}$ 可解除 1 mmol/L 和 2.5 mmol/L 的  $\text{K}^+$ 的抑制作用,  $\text{K}^+$ 为 1 mmol/L 时有效浓度为  $=0.25$  mmol/L, 以 0.5~1.5 mmol/L 效果最佳,  $\text{K}^+$ 为 2.5 mmol/L 时有效浓度为  $=1.5$  mmol/L, 以 2.5~5 mmol/L 效果最佳;  $\text{Mg}^{2+}$ 亦可解除 1 mmol/L 和 2.5 mmol/L 的  $\text{K}^+$ 的抑制作用,  $\text{K}^+$ 为 1 mmol/L 时有效浓度为  $=0.25$  mmol/L, 以 0.5~2.5 mmol/L 均有良好效果,  $\text{K}^+$ 为 2.5 mmol/L 时有效浓度为  $=7.5$  mmol/L。三种离子解除  $\text{K}^+$ 抑制作用强弱依次为:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+$ 。

表 5-4 中华鲟精子在不同浓度  $\text{CaCl}_2$  溶液中的 FT、TT 和 LT (单位: s)

Table 5-4 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different concentration of  $\text{CaCl}_2$  solution

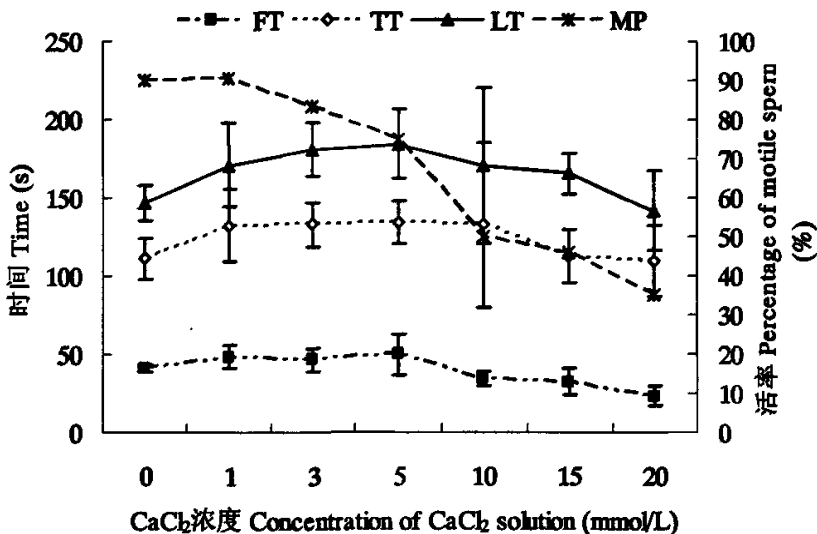
CaCl <sub>2</sub> (mmol/L)	FT		TT		LT	
	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差
	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD
0	42~76	40.50±2.12 <sup>b</sup>	135~193	111.00±12.73 <sup>a</sup>	188~251	147.00±11.32 <sup>ab</sup>
1	44~59	48.25±7.59 <sup>ab</sup>	104~154	132.20±23.19 <sup>a</sup>	138~193	170.60±26.74 <sup>a</sup>
3	39~56	46.50±7.33 <sup>ab</sup>	117~145	132.50±14.64 <sup>a</sup>	172~203	180.50±16.90 <sup>a</sup>
5	35~59	49.67±12.86 <sup>ab</sup>	121~148	134.33±13.50 <sup>a</sup>	166~209	184.33±22.19 <sup>a</sup>
10	31~39	34.00±4.36 <sup>a</sup>	89~191	132.67±22.56 <sup>a</sup>	115~213	170.00±20.09 <sup>a</sup>
15	30~46	32.33±8.02 <sup>a</sup>	122~155	112.00±17.06 <sup>a</sup>	161~185	165.67±12.86 <sup>ab</sup>
20	33~44	23.00±6.08 <sup>a</sup>	104~133	108.67±22.81 <sup>a</sup>	142~190	141.33±25.72 <sup>b</sup>

注: 1) 同列数字右上角所标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

2) FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: 1) superscript in the same column with the different lowercase means significant difference ( $P<0.05$ )

2) FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 5-4  $\text{Ca}^{2+}$ 对中华鲟精子活力的影响

Fig. 5-4 Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on motility characteristics in Chinese sturgeon sperm

表 5-5 中华鲟精子在不同浓度  $MgCl_2$  溶液中的 FT、TT 和 LT (单位: s)

Table 5-5 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different concentration of  $MgCl_2$  solution

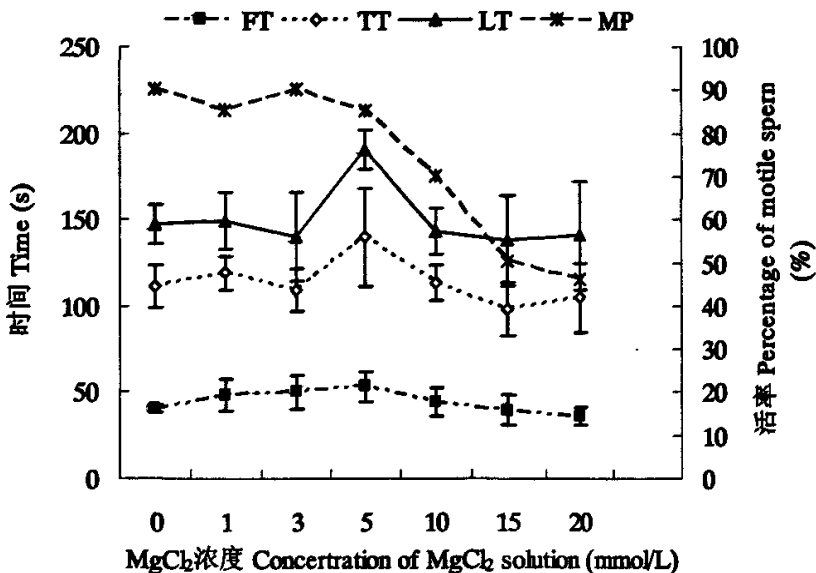
MgCl <sub>2</sub> (mmol/L)	FT		TT		LT	
	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差	范围	平均值±标准差
	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD
0	39~46	40.50±2.12 <sup>a</sup>	102~120	111.00±12.73 <sup>a</sup>	139~158	147.00±11.31 <sup>a</sup>
1	46~58	48.50±9.11 <sup>a</sup>	107~131	119.25±9.81 <sup>a</sup>	127~165	149.00±16.63 <sup>a</sup>
3	47~62	50.00±10.10 <sup>a</sup>	99~117	109.50±12.37 <sup>a</sup>	125~179	140.00±26.05 <sup>a</sup>
5	44~62	53.00±9.00 <sup>a</sup>	139~192	139.67±28.36 <sup>b</sup>	177~198	190.00±11.36 <sup>b</sup>
10	38~54	44.33±8.50 <sup>a</sup>	85~108	112.75±10.37 <sup>a</sup>	109~141	143.25±13.28 <sup>a</sup>
15	32~50	39.50±8.58 <sup>a</sup>	85~122	97.75±15.46 <sup>a</sup>	107~162	137.50±26.41 <sup>a</sup>
20	39~50	36.25±4.99 <sup>a</sup>	83~125	104.50±20.17 <sup>a</sup>	101~174	140.75±31.35 <sup>a</sup>

注: 1) 同列数字右上角所标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

2) FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: 1) superscript in the same column with the different lowercase means significant difference ( $P<0.05$ )

2) FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 5-5  $Mg^{2+}$ 对中华鲟精子活力的影响

Fig. 5-5 Effect of  $Mg^{2+}$  on motility characteristics in Chinese sturgeon sperm

表 5-6 中华鲟精子在不同浓度葡萄糖溶液中的 FT、TT 和 LT (单位: s)

Table 5-6 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different concentration of glucose solution

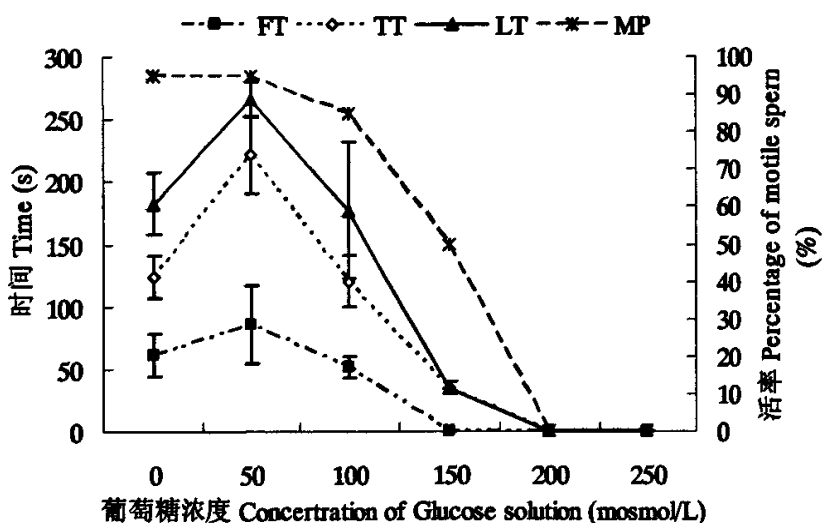
葡萄糖 Glucose (mmol/L)	FT		TT		LT	
	范围 Range	平均值±标准差 Mean ± SD	范围 Range	平均值±标准差 Mean ± SD	范围 Range	平均值±标准差 Mean ± SD
0	42~76	61.33±17.47 <sup>bc</sup>	102~140	124.25±17.10 <sup>c</sup>	155~205	182.67±25.42 <sup>b</sup>
50	57~117	84.75±31.22 <sup>c</sup>	192~255	221.67±31.66 <sup>d</sup>	250~283	266.00±14.49 <sup>c</sup>
100	46~64	51.50±8.39 <sup>b</sup>	104~146	120.00±20.20 <sup>c</sup>	125~252	177.00±54.49 <sup>b</sup>
150	0	0 <sup>a</sup>	29~39	34.67±5.13 <sup>b</sup>	29~39	34.67±5.13 <sup>a</sup>
200	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
250	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>

注: 1) 同列数字右上角所标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

2) FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: 1) superscript in the same column with the different lowercase means significant difference ( $P < 0.05$ )

2) FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 5-6 不同浓度的葡萄糖溶液对中华鲟精子活力的影响

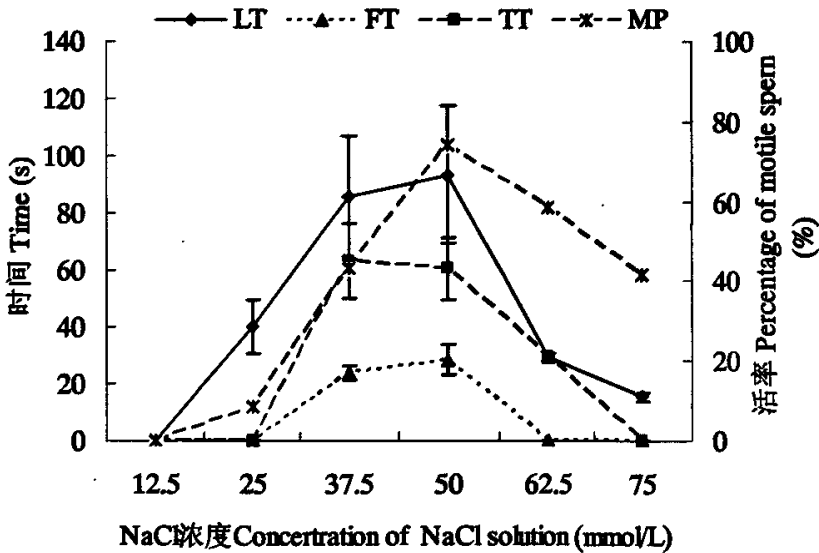
Fig. 5-6 Effect of Glucose on motility characteristics of Chinese sturgeon sperm

表 5-7 中华鲟精子在含不同浓度 Na<sup>+</sup>的 K<sup>+</sup>溶液中的 FT、TT 和 LT (单位: s)  
 Table 5-7 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different concentration of Na<sup>+</sup> in K<sup>+</sup> solution

NaCl (mmol/L)	KCl 1mmol/L			KCl 2.5mmol/L		
	FT	TT	LT	FT	TT	LT
12.5	0	0	0	0	0	0
25	0	0	40.00±9.54	0	0	0
37.5	23.67±2.31	63.00±13.23	85.33±21.83	0	0	0
50	28.40±5.13	60.40±11.15	93.40±24.11	0	0	0
62.5	0	29.33±1.53	29.33±1.53	0	0	0
75	0	0	15.33±1.53	0	0	0

注: FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 5-7 1mmol/L K<sup>+</sup>溶液添加 Na<sup>+</sup>对中华鲟精子活力的影响

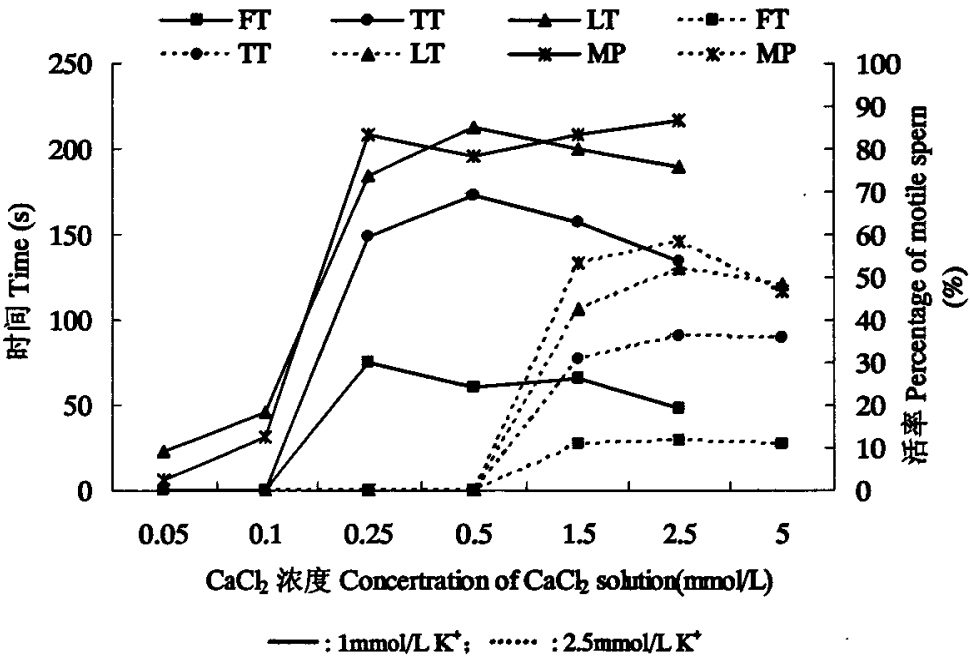
Fig. 5-7 The effect of Na<sup>+</sup> on motility characteristics of Chinese sturgeon sperm within 1mmol/L K<sup>+</sup> solution

表 5-8 中华鲟精子在含不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  的  $\text{K}^+$  溶液中的 FT、TT 和 LT (单位: s)  
 Table 5-8 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{K}^+$  solution

$\text{CaCl}_2$ (mmol/L)	$\text{KCl}$ 1mmol/L			$\text{KCl}$ 2.5mmol/L		
	FT	TT	LT	FT	TT	LT
0.05	0	0	22.67±7.37	0	0	0
0.1	0	0	45.67±11.24	0	0	0
0.25	74.67±18.01	149.33±4.73	184.67±6.66	0	0	0
0.5	60.67±5.51	173.33±14.84	213.00±16.82	0	0	0
1.5	66.00±21.17	157.33±4.73	200.00±13.00	27.00±3.61	76.67±2.87	106.67±4.16
2.5	47.67±3.06	134.67±12.86	189.67±24.68	29.67±1.53	90.67±14.22	130.67±12.86
5	—	—	—	26.67±2.52	90.00±3.60	120.33±10.21

注: FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 5-8 在  $\text{K}^+$  溶液添加  $\text{Ca}^{2+}$  对中华鲟精子活力的影响

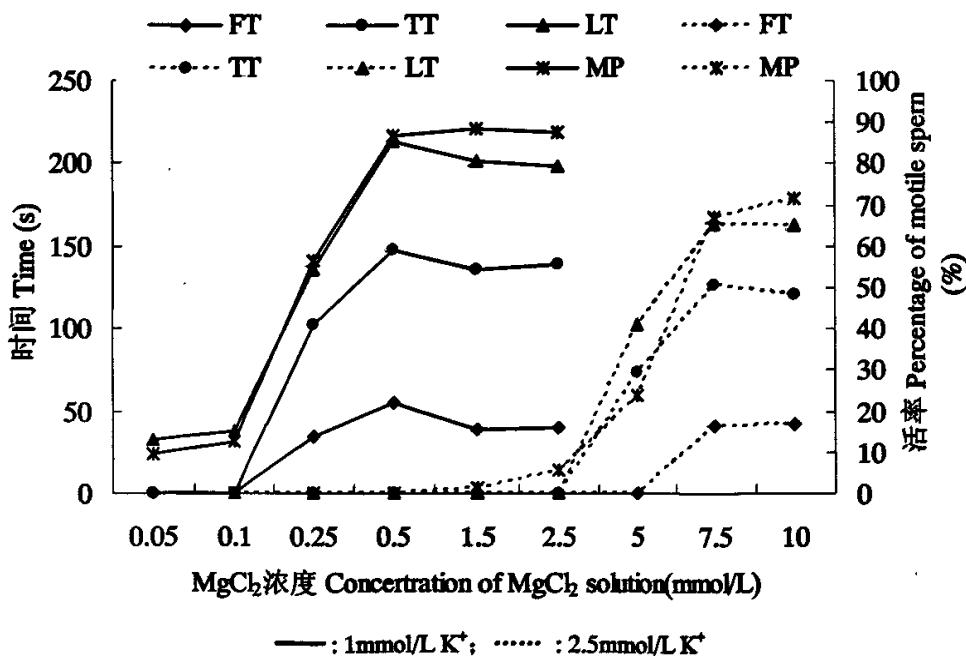
Fig. 5-8 The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on motility characteristics of Chinese sturgeon sperm within  $\text{K}^+$  solution

表 5-9 中华鲟精子在含  $Mg^{2+}$  的  $K^+$  溶液中的 FT、TT 和 LT (单位: s)  
Table 5-9 The FT, TT and LT of Chinese sturgeon sperm under different concentration of  $Mg^{2+}$  in  $K^+$  solution

MgCl <sub>2</sub> (mmol/L)	KCl 1mmol/L			KCl 2.5mmol/L		
	FT	TT	LT	FT	TT	LT
0.05	0	0	32.33±4.16	0	0	0
0.1	0	0	38.00±6.08	0	0	0
0.25	34.67±3.21	102.33±6.51	135.33±6.51	0	0	0
0.5	55.00±7.21	147.33±4.73	213.67±12.66	0	0	0
1.5	38.67±6.66	135.67±18.01	202.00±19.70	0	0	0
2.5	40.33±4.73	139.33±7.21	198.03±13.69	0	0	0
5	—	—	—	0	73.33±14.36	102.33±7.77
7.5	—	—	—	40.67±12.90	125.67±18.04	162.67±23.12
10	—	—	—	41.67±0.58	120.33±9.29	162.67±4.93

注: FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命

Note: FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime



FT: 快速运动时间; TT: 总运动时间; LT: 寿命; MP: 精子活率

FT: Fast-movement Time; TT: Total-movement time; LT: Lifetime; MP: Motile sperm percentage

图 5-9 在  $K^+$  溶液添加  $Mg^{2+}$  对中华鲟精子活力的影响

Fig. 5-9 The effect of  $Mg^{2+}$  on motility characteristics of Chinese sturgeon sperm within  $K^+$  solution

### 5.2.8 渗透压对中华鲟精子活力的影响

3 种不同溶质的渗透压溶液对中华鲟精子活力影响见图 5-10~5-13, 可见 3 种溶液对中华鲟精子的快速运动时间、总运动时间、寿命和精子活率的影响具有很高的吻合性, 变化趋势一致。随渗透压升高精子活力先升高后降低, 中华鲟精子适宜的渗透压范围为 25~75 mOsm/L, 最适渗透压在 50 mOsm/L 左右, 葡萄糖和蔗糖溶液对精子活力的提高优于 NaCl 溶液。

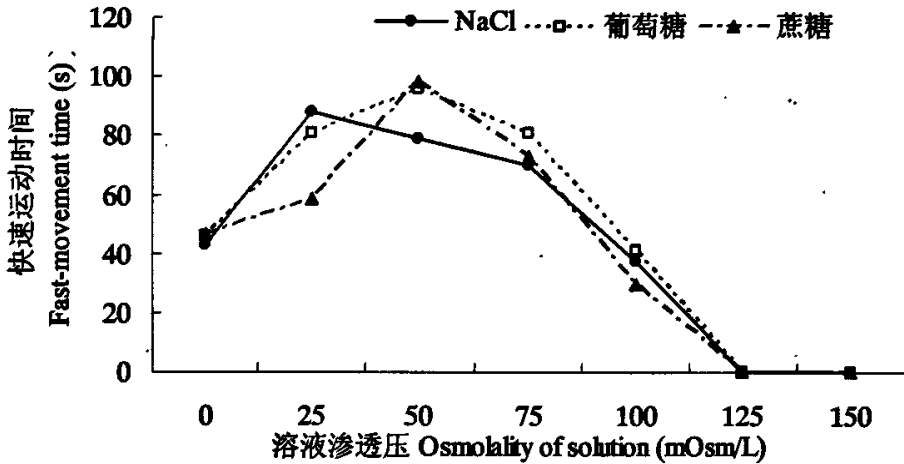


图 5-10 渗透压对中华鲟精子快速运动时间的影响

Fig. 5-10 Effect of osmolality on fast-movement time of Chinese sturgeon sperm

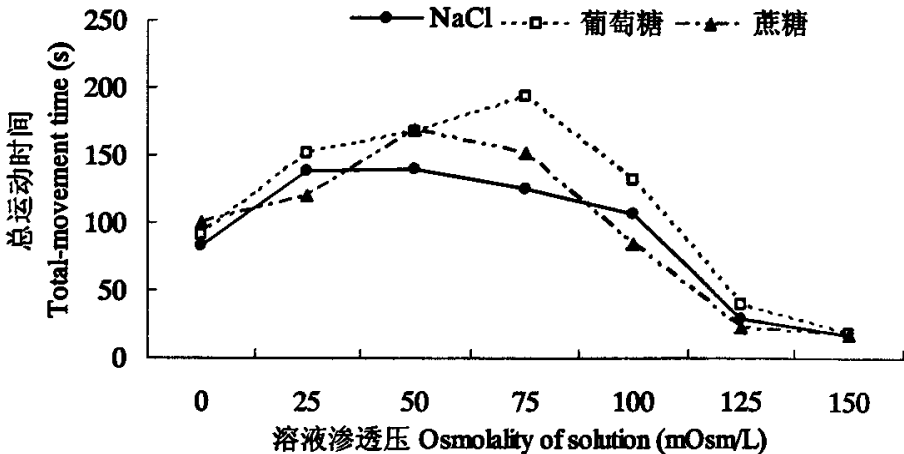


图 5-11 渗透压对中华鲟精子总运动时间的影响

Fig. 5-11 Effect of osmolality on total-movement time of Chinese sturgeon sperm



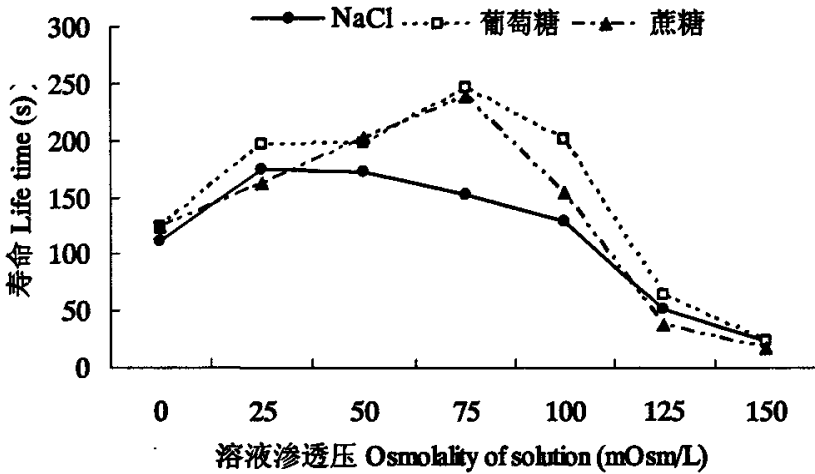


图 5-12 渗透压对中华鲟精子寿命的影响

Fig. 5-12 Effect of osmolality on life time of Chinese sturgeon sperm

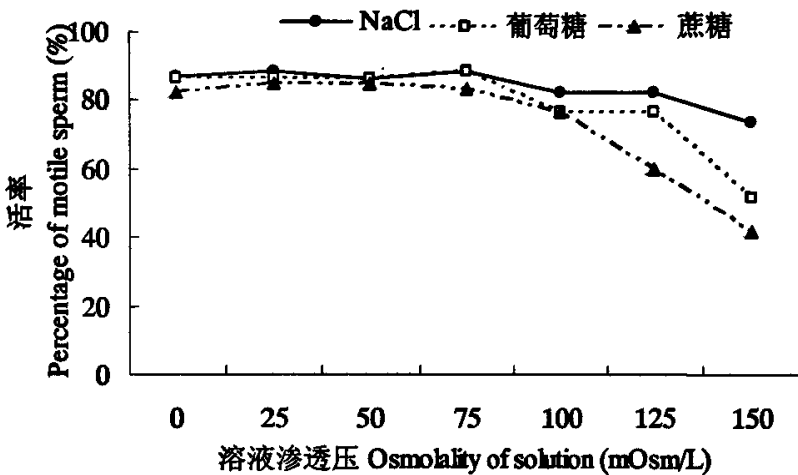


图 5-13 渗透压对中华鲟精子活率的影响

Fig. 5-13 Effect of osmolality on motile sperm percentage of Chinese sturgeon

## 5.3 讨论

### 5.3.1 关于 pH 对中华鲟精子活力的影响

pH 是影响鱼类精子活力的主要因素之一，对精子运动的维持有显著的影响，激活液的 pH 可以影响精子的受精能力，弱碱性激活液可以提高精子活力(Billard *et al.*, 1995b)。日本鳗鲡精子在偏碱性的溶液(pH 7.0~8.9)中活力较强(邓岳松和林浩然, 2000)，黄鳍鲷、平鲷、黑鲷和真鲷精子激活的最适 pH 值依次为 7.8、8.0、8.0、

>8.0(江世贵等, 2000)。本试验结果表明, 溶液的酸碱度不仅可以影响中华鲟精子的运动时间, 还能影响其精子的激活。中华鲟精子可在 pH 5.0~10.0 的溶液中活动, 而在弱碱性 (pH 7.0~9.0) 条件下中华鲟精子的活力有显著提高, 在 pH 为 8.0 时精子活力最高。其他鲟鱼精子也有类似特征, 西伯利亚鲟、湖鲟、波斯鲟和匙吻鲟精子运动最适 pH 条件分别为 8.2、8.0、8.0 和 7.0- 8.0(Gallis *et al.*, 1991; Cosson and Linhart, 1996; Toth *et al.*, 1997; Alavi *et al.*, 2004), 均是弱碱性条件。Ingermann 等(2002; 2003) 对高首鲟的研究发现, 精浆的缓冲能力弱, 则精子对外界 pH 变化更敏感, 认为生殖管道中的上皮细胞可以通过分泌重碳酸盐调节精浆的 pH 值, 从而调节精子活力。

### 5.3.2 关于 Na<sup>+</sup>对中华鲟精子活力的影响

Na<sup>+</sup>是鱼类血浆、精浆的重要组分, 是构成渗透压的主要离子。在适当的范围内, 多数淡水鱼类精子活力随溶液中 Na<sup>+</sup>浓度的增加而提高, 超出适宜范围精子活力即受抑制, 白斑狗鱼精子可在 0~679.6 kPa 的 NaCl 溶液种运动, 最适浓度为 339.8 kPa(苏德学等, 2004), 0.20%~ 0.50% 的 NaCl 溶液能延长黄颡鱼精子的寿命, 而 0.90%~1.20% 的 NaCl 溶液对黄颡鱼精子活力有明显抑制作用(杨彩根等, 2003)。与鲤科和鲑科鱼类相比, 鲟类精子对胞外 Na<sup>+</sup>的浓度变化更为敏感。随着激活液 (Tris/glycine 缓冲溶液) 中 Na<sup>+</sup>浓度的增加, 湖鲟精子运动时间先增加后减少, 在浓度为 10 mmol/L 时运动时间最长(>1500s), 50 mmol/L 则无精子运动(Toth *et al.*, 1997), 波斯鲟的精子可在 Na<sup>+</sup>含量为 0~125 mmol/L 的激活液 (20 mmol/L Tris- HCl) 中运动, 在 25 mmol/L 时精子运动时间最长(Alavi *et al.*, 2004), 试验表明, 中华鲟精子可在 0~100 mmol/L 的 Na<sup>+</sup>溶液运动, 和多数鱼类一样, 随浓度升高精子活力先升高后下降, 精子运动适宜的 Na<sup>+</sup>浓度范围为 0-50 mmol/L, 最适浓度为 25 mmol/L, 明显高于中华鲟精浆中 Na<sup>+</sup> 浓度 (10-20mmol/L)。上述研究说明 Na<sup>+</sup> 确实可以促进和调节鲟鱼精子的活力。已有研究表明鲟鱼精子对 Na<sup>+</sup>和其他离子的生物敏感性主要由精浆的成分和 Na<sup>+</sup>含量决定(Alavi and Cosson, 2006)。

### 5.3.3 关于 K<sup>+</sup>对中华鲟精子活力的影响

K<sup>+</sup>也是鱼类血浆、精浆的重要组分, 不同鱼类精子对 K<sup>+</sup> 的敏感性不同, 鲟鱼精子对 K<sup>+</sup>浓度的变化最为敏感, 其次是鲑科鱼类、鲤科鱼类。K<sup>+</sup> 对鲟鱼精子活力的影响和 Na<sup>+</sup> 的作用有很大的区别, K<sup>+</sup>主要起抑制鲟鱼精子活力的作用(Alavi and Cosson, 2006), 在精子激活液中提高 K<sup>+</sup>的浓度, 可以显著降低西伯利亚鲟、匙吻鲟和湖鲟精子的活力。K<sup>+</sup> 浓度为 0.05mmol/L 时对西伯利亚鲟精子的活力无显著影响, 升至 0.1 mmol/L 即可完全抑制西伯利亚鲟精子的活力(Gallis *et al.*, 1991), 0.5 mmol/L 的 K<sup>+</sup> 可使 50%湖鲟精子停止运动(Toth *et al.*, 1997), 匙吻鲟精子在 K<sup>+</sup>浓度为 1 mmol/L 的 Tris- HCl 缓冲溶液中, 激活率迅速下降, 10s 后降至 10%, 1 min 后即 0%(Cosson and Linhart, 1996)。0.01~ 0.5 mmol/L 的 K<sup>+</sup>对中华鲟精子活力影响不明显, 在 0.5 mmol/L 时表现微弱的抑制效果, 当浓度升高至 1 mmol/L 时, 中华鲟精子活力被完全抑制。由此可见鲟鱼精子对低浓度的 K<sup>+</sup>具有很高的敏感性, 其活力可受低浓度 K<sup>+</sup>调控(Cosson *et al.*, 1999)。Alavi 等研究表明, 波斯鲟精浆中 K<sup>+</sup> 浓度为

6.92±0.88 mmol/L, 细胞外 2 mmol/L K<sup>+</sup>即具有抑制作用, 说明精浆中的 K<sup>+</sup> 是波斯鲟精子活动的主要抑制因子(Alavi *et al.*, 2004a; Alavi *et al.*, 2004b)。中华鲟精浆中的 K<sup>+</sup>浓度为 4~8mmol/L, 远高于精子活力抑制浓度, 因此作者认为, K<sup>+</sup>是抑制中华鲟精子在精浆中活动的主要因子。

### 5.3.4 关于 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>对中华鲟精子活力的影响

Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>作为鱼类精浆主要离子, 其含量较 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>低很多, 鲟鱼精浆中的 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>含量通常都低于 1 mmol/L, 但是在精子活力的调节中具有重要的作用。Ca<sup>2+</sup>是调节鱼类精子活力的重要因子, 外界环境的 Ca<sup>2+</sup>通过 Ca<sup>2+</sup>通道进入精子细胞使精子细胞内的 Ca<sup>2+</sup>增加, 是精子激活所必需的(Cosson, 2004)。Alavi 等研究发现 0~3 mmol/L 的 Ca<sup>2+</sup>溶液可以提高波斯鲟精子的活力, 在 3 mmol/L 时精子活力最高, 当浓度超过 5 mmol/L 时精子活力迅速下降(Alavi *et al.*, 2004)。在对中华鲟精子的研究中发现, 中华鲟精子对 Ca<sup>2+</sup> 敏感性较波斯鲟差, 随着 Ca<sup>2+</sup> 浓度的升高, 精子活力先升高后下降, 但变化不显著, 在 5 mmol/L 时活力最高, 据刘鉴毅研究, Ca<sup>2+</sup> 浓度高于 20 mmol/L 可明显抑制中华鲟精子的活力, 在 40 mmol/L 时精子活力完全被抑制, 实际上在 5 mmol/L 时就观察到约 15%的精子在极短的时间内停止运动, 只是其他多数精子仍保持在较高的活力状态, 在 10 mmol/L 时有约 40%的精子未能激活运动, 此时多数精子活力下降。可见虽然 Ca<sup>2+</sup>是精子激活所必须的, 但是其浓度并不是越高越好, 中华鲟精子运动适宜的 Ca<sup>2+</sup>浓度应在 0~5 mmol/L 范围内。此外 Ca<sup>2+</sup>还可解除 K<sup>+</sup>对鲟鱼精子的抑制作用(Alavi and Cosson, 2006), 研究发现 0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>即可部分解除 1 mmol/L K<sup>+</sup>对中华鲟精子的抑制, 0.25 mmol/L 时即可完全解除, 随 K<sup>+</sup>浓度升高, Ca<sup>2+</sup>有效浓度也相应提高。

有关 Mg<sup>2+</sup>对鲟鱼精子活力影响的报道较少, Linhart 等(2002)和 Alavi 等(2004)做过相关研究。Mg<sup>2+</sup>对中华鲟精子活力影响效果与 Ca<sup>2+</sup>的作用相似, 在 5 mmol/L 时精子活力最高, 当浓度超过 10 mmol/L 时就有部分精子活力受抑制, 随浓度升高其负作用越为明显, 使精子产生凝集现象。Mg<sup>2+</sup>也能解除 K<sup>+</sup>对中华鲟精子的抑制作用, 不同的是中华鲟精子对 Mg<sup>2+</sup>的敏感性比 Ca<sup>2+</sup>更低, 在 0.5 mmol/L 时才能完全解除 1 mmol/L K<sup>+</sup>对中华鲟精子的抑制作用。

### 5.3.5 关于渗透压对中华鲟精子活力的影响

淡水鱼类精子只有释放到低渗溶液中, 精子才能激活运动, 不同鱼类对渗透压适应性不同。高渗透压(400 mOsm/L)可抑制虹鳟精子的运动, 但是其精浆渗透压(约 300 mOsm/L)并不能阻止精子的运动(Billard and Cosson, 1992)。低于 150~200 mOsm/L 的渗透压可完全抑制鲤科鱼类精子的运动, 而鲤科鱼类精浆的渗透压已远高于精子激活所需的条件, 如鲤为 286 mOsm/L (Alavi and Cosson, 2006)。在鲟鱼中, 西伯利亚鲟、波斯鲟和匙吻鲟精子活动的渗透压范围为 1~100 mOsm/L, 密西西比铲鲟为 1~120 mOsm/L, 50 mOsm/L 时波斯鲟精子活力最高(Linhart *et al.*, 1995; Alavi *et al.*, 2004b), 而鲟鱼精浆渗透压均低于精子活动的渗透压范围, 如西伯利亚鲟精浆渗透压仅有 38±3 mOsm/L, 匙吻鲟为 33~36 mOsm/L, 波斯鲟为 82.56 mOsm/L 左右,

因此, Alavi 等(2004b) 认为渗透压不是抑制鲟鱼精子在精浆中运动首要因素, 并且较低的渗透压可以提高鲟鱼精子的活力。中华鲟也不例外, 实验发现中华鲟精子在不同溶质的渗透压溶液中活力变化极为相似, 随渗透压升高, 精子活力先升后降, 其精子可在 0~150 mOsm/L 渗透压范围内活动, 在 25~75 mOsm/L 范围内中华鲟精子活力显著提高, 最适渗透压应该在 50 mOsm/L 左右。

## 参考文献

1. 常剑波. 长江中华鲟繁殖群体结构特征和数量变动趋势研究. [博士学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1999
2. 常剑波, 曹文宣. 中华鲟物种保护的历史与前景. 水生生物学报, 1999, 23(6): 712-720
3. 陈细华, 危起伟, 杨德国, 朱永久, 刘筠. 养殖中华鲟性腺发生与分化的组织学研究. 水产学报, 2004, 28(6): 633-637
4. 陈细华, 危起伟, 朱永久, 杨德国, 罗刚, 刘筠. 低龄中华鲟外科手术性别鉴定技术. 中国水产科学, 2004, 11(4): 371-374
5. 邓岳松, 林浩然. 鱼类精子活力研究进展. 生命科学研究, 1999, 3(4): 271-278
6. 邓岳松, 林浩然. 渗透压和 pH 对日本鳗鲡精子活力的影响. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(4): 85-89
7. 邓中彝, 余志堂, 许蕴珩等. 中华鲟年龄鉴别和繁殖群体结构的研究. 水生生物学报, 1985, 10(6): 99-100
8. 付小莉, 李大美, 金国裕. 葛洲坝下游中华鲟产卵场流场计算和分析. 华中科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(9): 111-113
9. 谷巍. Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、葡萄糖和果糖对高白鲑精子活力影响的研究. [硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学动物科学学院, 2005
10. 谷巍, 李胜忠, 蔡林钢, 张人铭, 马燕武, 郭焱. Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>对高白鲑精子活力影响的初步研究. 水利渔业, 2005, 25(2): 8-10
11. 洪万树, 翁幼竹, 林君卓, 方永强, 戴燕玉. 鲮鱼精子发生和形成的超微结构研究. 海洋学报(中文版), 2001, 23(5): 116-120
12. 胡德高, 柯福恩, 张国良. 葛洲坝下中华鲟产卵情况初步调查及探讨. 淡水渔业, 1983, (3): 15-18
13. 胡家会. 文昌鱼和玫瑰无须鲃的精子运动及其在污染物急性毒性检测中的应用. [博士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2005
14. 胡家会, 张士瑾, 张永忠, 许玉艳. 计算机辅助精子分析(CASA)系统检测青岛文昌鱼精子运动. 见: 第十届全国生殖生物学学术研讨会论文摘要集. 第十届全国生殖生物学学术研讨会, 中国云南昆明, 2005
15. 黄辨非, 罗静波. 氯化钠溶液对兴国红鲤精子活力的影响. 湖北农学院学报, 2000, 20(1): 62-64
16. 黄辨非, 罗静波, 杨代勤, 方长琰. 氯化钠溶液对美国大口胭脂鱼精子活力影响的观察. 湖北农业科学, 2000, 20(6): 61-62
17. 黄巧珠, 区又君, 喻达辉, 李加儿, 江世贵. pH 对 4 种鲷鱼精子活力的影响. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(3): 14-16
18. 江世贵, 李加儿, 区又君, 郑运通. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系. 生态学报, 2000, 20(3): 468-473
19. 柯福恩. 论中华鲟的保护与开发. 淡水渔业, 1999, 29(9): 4-7
20. 柯福恩, 胡德高, 张国良. 葛洲坝水利枢纽对中华鲟的影响——数量变动调查报告. 淡水渔业, 1984, (3): 16-19
21. 柯福恩, 危起伟. 中华鲟产卵洄游群体的结构和资源量估算的研究. 淡水渔业, 1992, (4): 7-11
22. 李勃, 唐作鹏, 解玉浩. 大银鱼精子活力观察与人工授精方法的探讨. 水利渔业, 1997, (5): 31-3251

23. 李加儿, 区又君, 江世贵. 环境因子变化对平鲷精子活力的影响. 动物学杂志, 1996, 31(3): 6-9
24. 李萍, 张耀光, 殷江霞, 虞云, 金丽, 赵海鹏. 华鲮精子活力的观察. 西南师范大学学报(自然科学版), 2005, 30(6): 1100-1104
25. 李霞, 刘淑范, 康蕾, 徐丹霞. 环境因子对鲍和牡蛎精子运动能力及受精率的影响. 大连水产学院学报, 2002, 17(1): 25-30
26. 林丹军, 尤永隆. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 69-75
27. 柳凌, 危起伟, 鲁大椿, 郭峰, 刘宪亭, 章龙珍. 中华鲟精子低温保存的相关因子. 水产学报, 1999, 23(增刊): 86-89
28. 鲁大椿, 傅朝君, 刘宪亭. 我国主要淡水养殖鱼类精液生物学特性. 淡水渔业, 1989, 19(2): 34-37
29. 鲁大椿, 刘宪亭, 方建萍, 张龙珍. 我国主要淡水养殖鱼类精浆的元素组成. 淡水渔业, 1992, 22(2): 10-12
30. 鲁大椿, 柳凌, 方建萍, 章龙珍. 中华鲟精液的生物学特性和精浆的氨基酸成分. 淡水渔业, 1998, 28(6): 18-20
31. 罗芬, 何学福. 氯化钠浓度对宽口光唇鱼精子活力的影响. 四川动物, 1999, 18(2): 70-72
32. 罗相忠, 邹桂伟, 潘光碧. 大口鲇精子生理特性的研究. 淡水渔业, 2002, 32(2): 51-53
33. 潘德博, 许淑英, 叶星, 谢刚, 庞世勋, 祁宝伦, 苏植逢. 广东鲂精子主要生物学特性的研究. 中国水产科学, 1999, 6(4): 111-113
34. 蒲德永. 南方鲇精子活力的观察. 水产科学, 1996, 15(6): 11-12
35. 区又君, 李加儿, 江世贵. 保存和激活对真鲷精子生理特性的影响. 热带海洋, 1998, 17(3): 65-74
36. 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. 湖北农学院学报, 2004, 24(1): 22-25
37. 舒琰, 黄燕, 张海发, 王云新, 刘付永忠. 盐度及温度对红鳍笛鲷精子活力的影响. 广州大学学报(自然科学版), 2005, 4(1): 29-32
38. 四川省长江水产资源调查组. 长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究. 成都: 四川科学技术出版社, 1988, 1-284
39. 苏德学, 严安生, 田永胜, 宋全德, 胡金波, 杜劲松, 陈莉. 钠、钾、钙和葡萄糖对白斑狗鱼精子活力的影响. 动物学杂志, 2004, 39(1): 16-20
40. 苏德学, 严安生, 田永胜, 汪金怀, 李大鹏, 海萨, 陈莉. 阳离子、葡萄糖及渗透压对丁鲷精子活力的影响. 水利渔业, 2004, 24(1): 7-8
41. 苏天凤, 艾红. 鱼类精子活力及其超低温保存研究综述. 上海水产大学学报, 2004, 13(4): 343-347
42. 孙大江, 韩志忠, 曲秋芝, 新洋, 王丙乾. 施氏鲟全人工繁殖研究— I. 精子生物学特性观察. 水产学杂志, 2002, 15(2): 32-34
43. 谭娟, 张耀光, 刘本祥, 李萍, 李勇, 周传江, 颜忠, 薛治泉, 谭国良. 中华倒刺鲃、白甲鱼和岩原鲤精子的生理特性比较. 淡水渔业, 2006, 36(6): 3-7
44. 唐国盘. 中华鲟胚胎发育和早期生活史阶段耗氧率的研究. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学水产学院, 2005
45. 王宏田, 张培军, 徐永立. 盐度及保存时间对牙鲆精子活力的影响. 海洋科学, 1999, 23(5): 5-7
46. 王玉堂. 鲟鱼资源现状. 中国水产, 1999, (9): 16-18

47. 危起伟. 中华鲟繁殖行为生态学与资源评估. [博士学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2003
48. 危起伟, 陈细华, 杨德国, 刘鉴毅, 朱永久, 郑卫东. 葛洲坝截流 24 年来中华鲟产卵群体结构的变化. 中国水产科学, 2005, 12(4): 452-457
49. 危起伟, 杨德国, 柯福恩. 长江中华鲟超声波遥测技术. 水产学报, 1998, 22(3): 211-217
50. 魏开金, 王汉平, 林加敬, 麦家柏. 氯化钠浓度对鲢鱼精子活力影响的初步观察. 淡水渔业, 1996, 26(4): 9-10
51. 谢恩义, 何学福, 阳清发. 瓣结鱼的繁殖习性以及精子的活力与寿命. 动物学杂志, 1999, 34(2): 5-8
52. 谢骏, 王广军, 潘德博, 余德光, 杨小静. 离子浓度和一氧化氮供体对池塘养殖鳊鲴精子活力的影响. 水产学报, 2003, 27(4): 386-390
53. 许雁, 熊全沫. 中华鲟受精细胞学研究. 动物学报, 1990, 36(3): 275-279
54. 严安生, 李诗模, 王其和. 鲤鱼和团头鲂精子生理生态特性的研究 II. 钙、镁对精子活力的影响. 淡水渔业, 1993, 23(5): 5-7
55. 严安生, 宋贵文, 闫拥军. 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. 淡水渔业, 1995, 25(2): 3-5
56. 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. 淡水渔业, 1993, 23(3): 19-21
57. 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. 水利渔业, 2003, 23(3): 10-11
58. 杨德国, 危起伟, 王凯, 刘鉴毅, 朱永久, 郑卫东. 中华鲟幼鲟的人工放流及其洄游和分布特点. 水生生物学报, 2005, 29(1): 26-30
59. 杨家云. 瓦氏黄颡鱼精巢发育及精子生物学研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 2005, 30(4): 719-724
60. 余志堂, 许蕴吁, 邓中彝. 葛洲坝水利枢纽下游中华鲟繁殖生态的研究: 鱼类学论文集(第五辑)北京: 科学出版社, 1986, 1-13
61. 余志堂, 周春生, 邓中彝等. 葛洲坝枢纽下游中华鲟自然繁殖的调查. 水库渔业, 1983, (2): 2-4
62. 张春霖, 李英文, 邹奇志, 潘仲华. 金属离子及低温对中华倒刺鲃精子活力的影响. 西南农业大学学报, 1999, 21(3): 274-278
63. 张四明, 邓怀, 危起伟, 汪登强, 吴清江. 中华鲟天然群体蛋白质水平遗传多样性贫乏的初步证据. 动物学研究, 1999, 20(2): 93-98
64. 张四明, 邓怀, 晏勇, 汪登强, 吴清江. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究. 海洋与湖沼, 2000, 31(1): 1-7
65. 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. 中国水产科学, 2003, 10(04): 286-290
66. 赵振山, 曹克驹, 杨立军. 乌鳢精子生理生态特性的研究 II. 钠、钾及渗透压对精子活力的影响. 水利渔业, 1995a, (3): 13-15
67. 赵振山, 曹克驹, 杨立军. 乌鳢精子生理生态特性的研究 I. 不同 pH 溶液对精子活力的影响. 水利渔业, 1995b, (3): 11-12
68. 周定刚, 温安祥. 黄鳍精子活力检测和精子入卵早期过程观察. 水产学报, 2003, 27(5): 398-402
69. 朱冬发, 成永旭, 王春琳, 薛良义. 环境因子对大黄鱼精子活力的影响. 水产科学, 2005, 24(12): 4-6
70. Alavi S M H, Cosson J. Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH. *Cell Biology*

- International*, 2005, (29): 101-110
71. Alavi S M H, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 2006, 30(1): 1-14
  72. Alavi S M H, Cosson J, Karami M, Abdolhay H, Amiri B M. Chemical composition and osmolality of seminal plasma of *Acipenser persicus*: their physiological relationship with sperm motility. *Aquaculture Research*, 2004a, 35(13): 1238-1243
  73. Alavi S M H, Cosson J, Karami M, Amiri B M, Akhoundzadeh M A. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction*, 2004b, 128(6): 819-828
  74. Babiak I, Głogowski J, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H, Strzezek J, Demianowicz W. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, 2001, 56(1): 177-192
  75. Baynes S M, Scott A P, Dawson A P. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *Journal of Fish Biology*, 1981, 19(3): 259-267
  76. Beamesderfer R C P, Farr R A. Alternatives for the protection and restoration of sturgeons and their habitat. *Environmental Biology of fishes*, 1997, 48: 407-417
  77. Bemis W E, Findeis E K, Grande L. An overview of Acipenseriformes. *Environment Biology of Fish*, 1997, 48(1-4): 25-71
  78. Benaou D, Ternier C. Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa. *Gamete Research*, 1980, 3: 247-257
  79. Billard R. Effects of ceolomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1983, 68: 77-84
  80. Billard R. Short- term preservation of sperm under oxygen atmosphere in Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 1981, 23: 287-293
  81. Billard R, Cosson J, Noveiri S B, Pourkazemi M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 2004, 236(1- 4): 1-9
  82. Billard R, Cosson J, Crim L W. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 1993, 6: 67-75
  83. Billard R, Cosson J, Fierville F, Brun R, Rouault T, Williot P. Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 1999, 15(4): 199-203
  84. Billard R, Cosson J, Linhart O. Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility. *Aquaculture Research*, 2000, 31(3): 283-287
  85. Billard R, Cosson J, Percec G, Linhart O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 1995, 129(1-4): 95-112
  86. Billard R, Cosson M P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, 1992, 261(2): 122-131
  87. Boitano S, Omoto C K. Trout sperm swimmol/Ling patterns and role of intracellular Ca<sup>++</sup>. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1992, 21(1): 74-82
  88. Brown G G, Mims S D. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. *Progress of Fish Culture*, 1995, 57: 64-69
  89. Cosson J, Billard R, Cibert C, Dreanno C, Suquet M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon C ed., *The male gamete: from basic to clinical applications*. Vienna: Cache Rive Press, 1999, 161-186
  90. Cosson J, Linhart O. Paddlefish, *Polyodon spathula*, spermatozoa: effects of potassium and pH on



- motility. *Folia Zoologica*, 1996, 45(4): 361-370
91. Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 2004, 12(1): 69-85
  92. Cosson M P, Billard R, Gatti J L, Christen R. Rapid and qualitative assessment of trout sperm motility using stroboscopy. *Aquaculture*, 1985, 46: 71-75
  93. Detweiler C, Thomas P. Role of ions and ion channels in the regulation of Atlantic croaker sperm motility. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(2): 139-148
  94. Elofsson H, Mcallister B G, Kime D E, Mayer I, Borg B. Long lasting stickleback sperm; is ovarian fluid a key to success in fresh water? *Journal of Fish Biology*, 2003, 63(1): 240-253
  95. Gatti J, Billard R, Christen R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa: Role in the initiation of sperm motility. *Journal of Cellular Physiology*, 1990, 143(3): 546-554
  96. Geffen A J, Evans J P. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2000, 182(1-2): 61-72
  97. He S, Jenkins-keeran K, Woods L C. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. *Theriogenology*, 2004, 61(7-8): 1487-1498
  98. Hines R, Yashov A. Some environmental factors influencing the activity of spermatozoa of *Mugil cephalus* Cuvier, a grey mullet. *Aquaculture*, 1971, 3: 123-127
  99. Ingermann R L, Robinson M L, Cloud J G. Respiration of steelhead trout sperm: sensitivity to pH and carbon dioxide. *Journal of Fish Biology*, 2003, 62(1): 13-23
  100. Ingermann R L, Holcomb M, Robinson M L, Cloud J G. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *The Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(18): 2885-2890
  101. Kime D E, Ebrahimi M, Nysten K, Roelants I, Rurangwa E, Moore H D, Ollevier F. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic Toxicology*, 1996, 36(3-4): 223-237
  102. Kime D E, Tveiten H. Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. *Journal of Fish Biology*, 2002, 61(6): 1549-1559
  103. Kime D E, Van-look K J W, Mcallister B G, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. Computer assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Physiology and Biochemistry*, 2001, 130(1): 425-433
  104. Koya Y, Takano K, Takano K. Effects of extracellular environments on the motility of spermatozoa in several marine sculpins with internal gametic association. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1993, 106A(1): 25-29
  105. Kruger J C, Smith G L, Vanvuren J H J, Ferreira J T. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 1984, 24: 263-272
  106. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner R A. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (*Cyprinidae*) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1996, 15(2): 167-179
  107. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner R A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, 1998, 163(1-2): 163-181
  108. Linhart O, Cosson J, Mims S D, Shelton W L, Rodina M. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reproduction*, 2002, 124(5): 713-719
  109. Linhart O, Kudo S. Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization. *Journal*

- of *Fish Biology*, 1997, 51(3): 573-582
110. Linhart O, Mims S D, Shelton W L. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon and paddlefish. *Journal of Fish Biology*, 1995, 47(5): 902-909
  111. Mansour N, Lahnsteiner F, Patzner R A. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. *Journal of Fish Biology*, 2002, 60(3): 545-560
  112. Marian T, Krasznai Z, Balkay L, Balazs M, Emri M, Bene L, Tron L. Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1993, 41(2): 291-297
  113. McMaster M E, Portt C B, Munkittrick K R, Dixon D G. Milt characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1992, 23(1): 103-117
  114. Mims S D. Evaluation of activator solutions, motility duration and short-term storage of paddlefish spermatozoa. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1991, 22(4): 224-229
  115. Morisawa M. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zoological Sciences*, 1985, (2): 605-615
  116. Morisawa M. Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoological science*, 1994, 11(5): 647-662
  117. Morisawa M, Okuno M, Suzuki K, Morisawa S, Ishida K. Initiation of sperm motility in teleosts. *Journal of Submicrosc. Cytology*, 1983, 15(1): 61-65
  118. Morisawa M, Suzuki K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 1980, 210(4474): 1145-1147
  119. Morisawa M, Suzuki K, Morisawa S. Effects of osmolality and potassium on spermatozoan motility of fresh water salmonid fishes. *Journal of Experimental Biology*, 1983, 107(1): 105-113
  120. Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Morisawa S, Yasuda K. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology*, 1983, 107(1): 95-103
  121. Morita M, Takemura A, Okuno M. Requirement of  $Ca^{2+}$  on activation of sperm motility in euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(5): 913-921
  122. Oda S, Morisawa M. Rises of intracellular  $Ca^{2+}$  and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleost. *Cell Motility and Cytoskeleton*, 1993, 25(2): 171-178
  123. Oda S, Shinriki Y. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in the river sculpin, *Cottus hangiongensis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1998, 18(1): 29-35
  124. Ohta H, Izawa T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 1996, 142(1-2): 107-118
  125. Park C, Chapman F A. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. *North American Journal of Aquaculture*, 2005, 67(1): 52-57
  126. Perchec G, Jeulin C, Cosson J, Andre F, Billard R. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*, 1995, 108(2): 747-753
  127. Redondo-muller C, Cosson M P, Cosson J, Billard R. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 1991, 29(3): 259-270
  128. Rodriguez-munoz R, Oianguren A F. Effect of short-term preservation of sea lamprey gametes on fertilization rate and embryo survival. *Journal Applied Ichthyology*, 2002, 18: 127-128
  129. Rurangwa E, Kime D E, Ollevier F, Nash J P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 2004, 234(1-4): 1-28
  130. Takai H, Morisawa M. Changes in intracellular  $K^+$  concentration caused by external osmolality

- change regulate sperm motility of marine and freshwater teleosts. *Journal of Cell Science*, 1995, 108(3): 1175-1181
131. Tan-fermin J D, Miura T, Adachi S, Yamauchi K. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther). *Aquaculture*, 1999, 171(3-4): 323-338
132. Tanimot S, Morisawa M. Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout. *Development, Growth & Differentiation*, 1988, 30(2): 117-124
133. Toth G P, Ciereszko A, Christ S A, Dabrowski K. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions. *Aquaculture*, 1997, 154(3-4): 337-348
134. Viveiros A T M, Jatzkowski A, Komen J. Effects of oxytocin on semen release response in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 2003, 59(9): 1905-1917
135. Vladic T, Jarvi T. Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout: The effect of water temperature. *Journal of Fish Biology*, 1997, 50: 1088-1093
136. Wang Z, Criml W. Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 16(1): 77-83
137. Wei Q W, Ke F E, Zhang J M, Zhuang P, Luo J D, Zhou R Q, Yang W H. Biology, Fisheries and Conservation of Sturgeon and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48: 241-255
138. Wei Q W, Yang D G. Stock enhancement of Chinese sturgeon, *A. sinensis*, in the Yangtze River: Preliminary evaluation of stocking effectiveness using CWT. In: Book of Abstracts. The World Aquaculture 2002 Conference and Exposition, Beijing, China, 2002, Beijing, China: 2002, 810
139. Wei Q W, Yang D G. Status of sturgeon aquaculture and trade in China: a review based on two recent nationwide survys. *Traffic Bulletin*, 2004, : 1-15
140. Wei Q W, Yang D G, Wang K. The current status of sturgeon farming in China and its prospect. In: Book of Abstract. The World Aquaculture 2002 Conference and Exposition, Beijing, China, 2002, Beijing, China: 2002, 811
141. Wei Q, Ke F, Zhang J, Zhuang P, Luo J, Zhou R, Yang W. Biology, Fisheries and Conservation of Sturgeons and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48: 241-255
142. Williot P, Kopeika E F, Goncharov B F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt ). *Aquaculture*, 2000, 189(1): 53-61
143. Yao Z, Crim L W. Spawning of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.): evidence in favour of internal fertilization of eggs. *Aquaculture*, 1995, 130(4): 361-372
144. Yao Z, Emerson C J, Crim L W. Ultrastructure of the spermatozoa and eggs of the ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.), an internally fertilizing marine fish. *Molecular Reproduction and Development*, 1995, 42(1): 58-64
145. Yao Z, Richardson G F, Crim L W. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. *Aquaculture*, 1999, 174(1-2): 183-193

## 致 谢

值此硕士论文完成之际，首先要感谢我的导师谢从新教授，三年来，谢老师在学习和生活上都给予我极大的关心、信任、鼓励和支持，在课题选择上给了我很大的空间，使我很好地完成硕士论文。谢老师严谨的治学态度和忘我的工作精神使我受益终身，在此向谢老师致以最诚挚的谢意！

长江水产研究所刘鉴毅副研究员作为第二导师，在试验设计方面给予了大量的指导与帮助，亲自带领我们进行试验，对我们的试验方法、试验技能的提高有重要的帮助，在生活上也给予我很大的关心，同时，刘老师乐观、积极的生活态度深深感染了我，对我树立正确的人生观和价值观有很大的帮助，在此表示深深的谢意！

在此我还要感谢长江水产研究所危起伟研究员，感谢给予我在其实验室学习的机会，并提供了完成实验所需的条件，还要感谢危老师提供了很多科研实践锻炼的机会，使我的个人能力有了很大的提高。危老师在中华鲟的保护和研究中强烈的责任感和献身科学的精神深深的感染了我，使我受益终生，在此向危老师表示衷心的感谢！

在实验过程中，我还得到了长江水产研究所的甘芳、李罗新、甘金华、张燕，长江大学的杨芳芳、李俊生，江西农业大学的吴湘香，华中农业大学的高平、赵智勇等多位老师和同学的帮助，正是有了他们无私的帮助，我才能顺利完成实验，在此向他们表示由衷的谢意！感谢郭宝英、熊冬梅、张惠娟、沈丽在论文修改上提供的帮助！

同时还要感谢 3 年学习期间在学习和生活上给予关心和帮助的老师与同学，他们是长江水产研究所的老师陈细华、杨德国、杜浩，华中农业大学的老师沈振峰、许炎生、熊海林，师兄李红敬，博士周小云、张辉，硕士生杜海明、张慧杰、厉萍等，还有其他许多同志就不一一列出，在此一并致谢！

我要特别感谢我的家人，在我三年研究生学习期间给予了我大力的鼓励、支持和理解，他们无私的爱和殷切的期望给了我无限的欢乐和动力！

最后，我再次向所有关心、支持和帮助过我的老师、同学、朋友和亲人表示衷心的感谢！

郑跃平

2007 年 6 月于武汉狮子山

# 中华鲟精子生理生态特性研究

作者: [郑跃平](#)  
学位授予单位: [华中农业大学](#)  
被引用次数: 2次

## 本文读者也读过(10条)

1. [邱实](#) [中华鲟内部器官超声成像识别技术的研究](#)[学位论文]2009
2. [陈细华](#) [中华鲟胚胎发育和性腺早期发育的研究](#)[学位论文]2004
3. [杨宇](#) [中华鲟葛洲坝栖息地水力特性研究](#)[学位论文]2007
4. [徐滨](#) [三种麻醉方法对鲟鱼类麻醉效应比较研究](#)[学位论文]2008
5. [厉萍](#) [中华鲟精子结构特征及其精液超低温冷冻保存技术研究](#)[学位论文]2007
6. [蔡宇青](#) [中华鲟产卵场水文因子特征分析及其所受工程影响研究](#)[学位论文]2008
7. [甘芳](#) [养殖中华鲟卵黄发生初步研究](#)[学位论文]2010
8. [冯琳](#) [溶液铅暴露对中华鲟幼鱼的毒性效应](#)[学位论文]2010
9. [姚志峰](#) [铜\(Cu<sup>2+</sup>\)对中华鲟幼鱼毒性效应的研究](#)[学位论文]2010
10. [马境](#) [中华鲟和施氏鲟胚后发育及生长研究](#)[学位论文]2007

## 引证文献(2条)

1. [甘芳](#), [杜浩](#), [危起伟](#), [陈细华](#), [刘鉴毅](#), [郑跃平](#) [Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>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](#)[期刊论文]-[动物学杂志](#) 2009(1)
2. [杨君兴](#), [潘晓赋](#), [陈小勇](#), [王晓爱](#), [赵亚鹏](#), [李建友](#), [李再云](#) [中国淡水鱼类人工增殖放流现状](#)[期刊论文]-[动物学研究](#) 2013(4)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis\\_Y1198317.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1198317.aspx)