亮氨酸对秋繁时黄颡鱼精子活力的影响

苏子豪　梅　洁　田进松　何　焱

华中农业大学水产学院,武汉 430070

摘要　在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)精卵质量较差的秋繁早期,挑选体质量接近 100 g 的雄性黄颡鱼并分为 3 组,分别注射生理盐水(对照组)、100 μmol/L 亮氨酸(亮氨酸适量处理组)和 1 000 μmol/L 亮氨酸(亮氨酸高浓度处理组),剂量均为 200 μL,研究亮氨酸对秋繁时黄颡鱼精子活力的影响。通过计算机辅助精子分析(CASA)系统检测精子活力,发现亮氨酸适量处理组的精子活力衰退速度减小,精子运动时间提高。将 3 组黄颡鱼精子用于人工繁殖,发现亮氨酸适量处理组受精率为 34.9%±4.7%,相比对照组的 15.9%±2.2%有显著性提高;亮氨酸高浓度处理组精子的受精率为 16.4%±3.4%,与对照组相比无明显变化($P<0.05$)。结果表明适量的亮氨酸能提高黄颡鱼精子活力,但过量的亮氨酸并不能提高精子的繁殖能力。在黄颡鱼秋繁生产上可以适度添加亮氨酸以提高受精率。

关键词　亮氨酸;黄颡鱼;秋繁;精子活力;受精率

中图分类号　S 917　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-2421(2019)04-0071-06

黄颡鱼肉质鲜美细嫩,营养丰富,无肌间刺,深受广大消费者喜爱,而且在近年来其养殖业发展迅猛,成为我国重要的经济鱼类之一[1-2]。黄颡鱼精子寿命短,激活后精子活力迅速衰退,运动时间较短,仅 40 s 左右,其中精子具有足够运动速度穿过透明带完成受精的时间就更少,这就使得精子质量成为黄颡鱼人工繁殖工作的主要制约因素之一。

精子质量是后代成功受精和存活的重要因素,通常从多方面进行评价。其中,精子活力是精子质量的基本指标,是精子繁殖能力的关键决定因素。与哺乳动物相同,鱼类精液中也含有大量的游离氨基酸,且不同鱼类精液氨基酸成分具有较大差异[3]。有研究表明,补充氨基酸是提高精子活力的有效方法。2009 年,Lahnsteiner[4]在调查虹鳟和鲤精液中游离氨基酸的组成时,发现甲硫氨酸对 2 种鱼类精子活力均有积极作用。但并不是所有的氨基酸都能提高精子活力,2010 年 Lahnsteiner[5]在研究金头鲷和鲈精液的过程中,发现除了部分种类氨基酸能提高精子活力外,还有部分种类氨基酸能抑制精子活力,且氨基酸对精子活力的影响具有种间特异性。Zhang 等[6]在对斑马鱼精子活力试验研究中发现,亮氨酸能通过 PI3K/Akt 通路,抑制细胞自噬,提高斑马鱼精子活力。但是亮氨酸能否提高黄颡鱼的精子活力,改善黄颡鱼的人工繁殖条件还不清楚。

黄颡鱼对水温有一定需求,繁殖的适宜水温一般在 20～30 ℃。在四季分明的江汉平原区域,黄颡鱼的繁殖时间由水温而定,一般在 5 月中旬到 7 月中旬[7]。然而随着夏季气温持续升高,过高的水温会使黄颡鱼性腺退化无法繁殖。之后气温随季节下降又或者连绵阴雨天后,黄颡鱼性腺会因为温度适宜而恢复繁殖能力。黄颡鱼的这段繁殖时间被称为秋繁,一般从 8 月 20 日左右开始。随着江汉平原区域的水温继续下降到 15 ℃以下,黄颡鱼便进入不吃食的越冬阶段。越冬阶段由于水质不好调节,黄颡鱼易病,故养殖上经常避开越冬,1 a 仅繁殖 1 次。正常情况下 5 月份左右繁殖的鱼会直接在当年 10 或 11 月份进行售卖。而秋繁的鱼则能紧接着下塘,填补池塘无鱼的空荡期,并于来年 6 月份上市。秋

收稿日期:2019-02-06
基金项目:国家现代农业产业技术体系特色淡水鱼体系项目(CARS-46);华中农业大学大北农青年学者提升专项(2017DBN015);湖北省自然科学基金项目(ZRMS2017001354)
苏子豪,硕士研究生.研究方向:鱼类发育遗传学. E-mail:18202749341@163.com
通信作者:何　焱,博士,副教授.研究方向:鱼类性别决定和两性生长异形. E-mail:heyan@mail.hzau.edu.cn

繁不仅使池塘利用率最大化,能够实现1年养2次鱼,而且能在淡季为消费者提供黄颡鱼商品,达到同时满足生产和消费市场需要的双赢局面。

本试验拟针对秋繁期间,黄颡鱼繁殖能力还未完全恢复的阶段,研究亮氨酸对其精子活力及繁殖能力的影响,以期为提高秋繁时期黄颡鱼的繁殖能力提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验在2018年8月进行,分为8月7日(正常繁殖季节)与8月31日(秋繁早期)2批。所用黄颡鱼父母本均挑选于湖北省武汉市江夏区国营鲁湖养殖场,其中雄鱼体质量为100 g左右,体型正常,鱼体健康无伤。

1.2 雄鱼亮氨酸处理与雌鱼催产

8月31日,即黄颡鱼秋繁初期,进行亮氨酸处理。根据Zhang等[6]试验中斑马鱼的亮氨酸注射量进行换算,最后将雄黄颡鱼分为对照组、亮氨酸适量处理组和亮氨酸高浓度处理组3组,分别经胸鳍基部注射0 μmol/L亮氨酸(生理盐水)、100 μmol/L亮氨酸和1 000 μmol/L亮氨酸,注射量均为200 μL,每12 h注射1次,共注射3次。

在雄鱼第2次和第3次进行亮氨酸处理的同时,对雌黄颡鱼进行催产。雌黄颡鱼催产方法为二针注射法,分别进行雌鱼催产剂第1针和第2针的注射。第1针注射LRH-A2(促黄体素释放激素,宁波三生药业有限公司),剂量为18 μg/kg;第2针注射LRH-A2、HCG(鱼用绒毛膜促性腺激素,宁波三生药业有限公司)和DOM(地欧酮,宁波三生药业有限公司),剂量分别为18 μg/kg、2 500 IU/kg和10 mg/kg。考虑到催产处理可能干扰亮氨酸对黄颡鱼精子质量的影响,没有对雄黄颡鱼进行催产处理。

1.3 精子活力的检测

正常繁殖季与秋繁早期2批雄性黄颡鱼精子活力的检测方法一致,均解剖雄鱼取精巢,然后剪破精巢收集精液样本,并配制任氏液(7.80 g/L NaCl、0.20 g/L KCl、0.21 g/L $CaCl_2$、0.021 g/L $NaHCO_3$)稀释精液。通过计算机辅助精子分析(CASA)系统对精子活力进行检测[8],并记录每个短视频的相对拍摄时间。对照组、100 μmol/L和1 000 μmol/L组分别有5、4、3尾鱼,每尾鱼的精液样本测量重复6次。根据数据中所有短视频的拍摄时间,统计精子每隔3 s的运动参数,用GraphPad Prism 5绘制精子活力随时间变化曲线。

1.4 受精率与孵化率

雌黄颡鱼挤卵混匀,按照1 g精巢的研磨液与1 kg卵的比例进行人工授精,12 h后统计受精率(受精卵/总卵粒数×100%),受精卵孵化后根据出膜的卵黄苗数量统计孵化率(卵黄苗/受精卵×100%)。

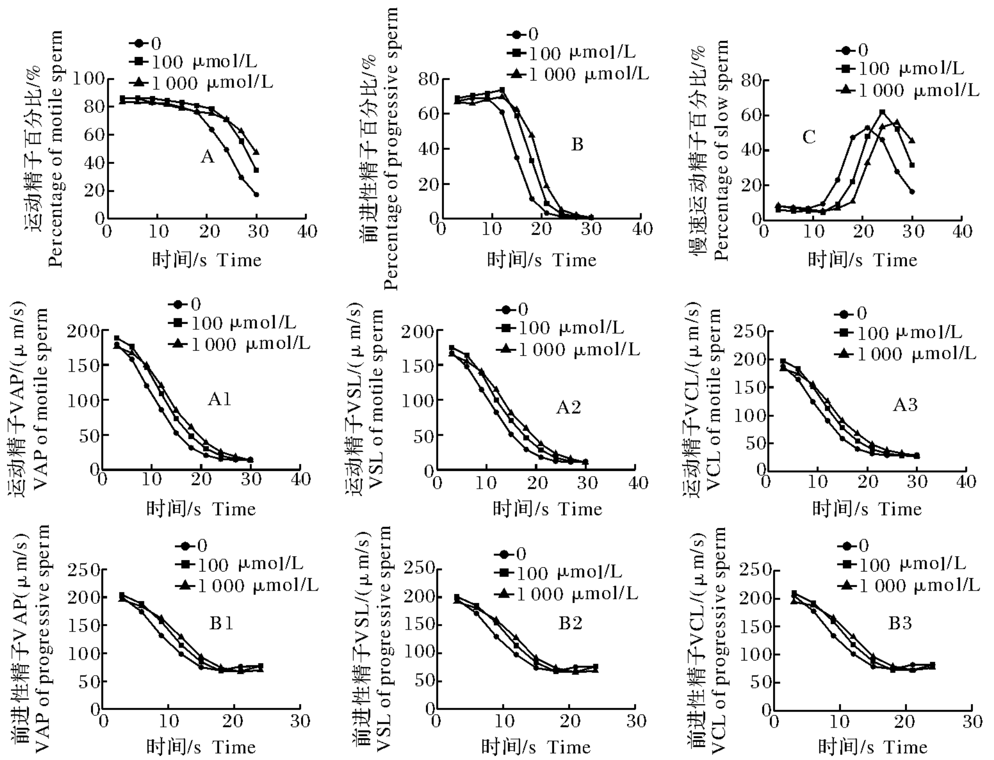
2 结果与分析

2.1 亮氨酸对黄颡鱼精子活力的影响

如图1所示,与对照组相比,亮氨酸处理组精子的初始运动速度VAP(average path velocity,平均路径速率,精子沿着平滑路径的运动速度)、VSL(straight line velocity,直线运动速率,精子运动开始点和结束点之间的直线距离除以运动时间)、VCL(curvilinear velocity,曲线运动速率,精子沿着运动轨迹的实际运动速度)以及运动精子(motile,激活精子,移动距离大于头部长度的精子)和前进性精子(progressive,前进性运动,精子运动参数符合VAP>50 μm/s并且前进性VSL/VAP>80%)比例并无明显变化,但亮氨酸浓度越高,精子活力参数随时间的衰减速度就越低,精子运动时间相对增加。到30 s时,亮氨酸适量处理组(100 μmol/L)和亮氨酸高浓度处理组(1 000 μmol/L)运动精子比例分别为34.7%±16.0%和47.3%±12.0%,明显高于对照组的17.4%±12.8%,且各组之间均存在显著性($P<0.05$)。亮氨酸适量处理组的慢速运动精子(slow,慢速运动,精子运动参数符合0<VAP<20 μm/s或者0<VSL<30 μm/s)增加速度也明显放缓,直到24 s时慢速运动精子比例才达到顶峰,与对照组的21 s相比,精子活力维持时间相对延长。结果表明,亮氨酸能够通过延长精子运动时间来提高黄颡鱼精子活力,且适宜的亮氨酸浓度能延长精子运动约3 s的时间。

2.2 亮氨酸对黄颡鱼精子繁殖能力的影响

图2为3组试验鱼进行人工繁殖时的受精率和孵化率的比较。亮氨酸适量处理组(100 μmol/L)受精率为34.9%±4.7%,相比对照组的15.9%±2.2%有显著提高($P<0.05$);而亮氨酸高浓度处理组(1 000 μmol/L)精子的受精率为16.4%±3.4%,与对照组相比无明显变化($P>0.05$)。而对照组、亮氨酸适量处理组和亮氨酸高浓度处理组的孵化率



A-C:亮氨酸处理影响黄颡鱼运动精子比例(A)、前进性精子比例(B)以及慢速运动精子比例(C)。A1-A3:亮氨酸处理影响黄颡鱼运动精子的平均路径速率 VAP(A1)、直线运动速率 VSL(A2)和曲线运动速率(A3)。B1-B3:亮氨酸处理影响黄颡鱼前进性精子的平均路径速率 VAP(B1)、直线运动速率 VSL(B2)和曲线运动速率(B3)。A-C:Leucine treatment affects the percentage of motile sperm (A),progressive sperm (B) and slow sperm (C).A1-A3:Leucine treatment affects the average path velocity (A1),straight line velocity (A2) and curvilinear velocity (A3) of motile sperm.B1-B3:Leucine treatment affects the average path velocity (B1),straight line velocity (B2) and curvilinear velocity (B3) of progressive sperm.

图 1　亮氨酸处理对秋繁黄颡鱼精子活力的影响

Fig.1　The effects of leucine treatment on yellow catfish sperm motility during the periods of autumn breeding

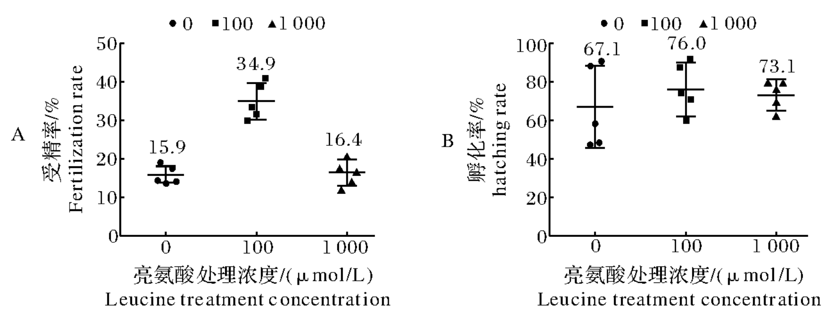


图 2　亮氨酸处理对秋繁黄颡鱼受精率(A)和孵化率(B)的影响

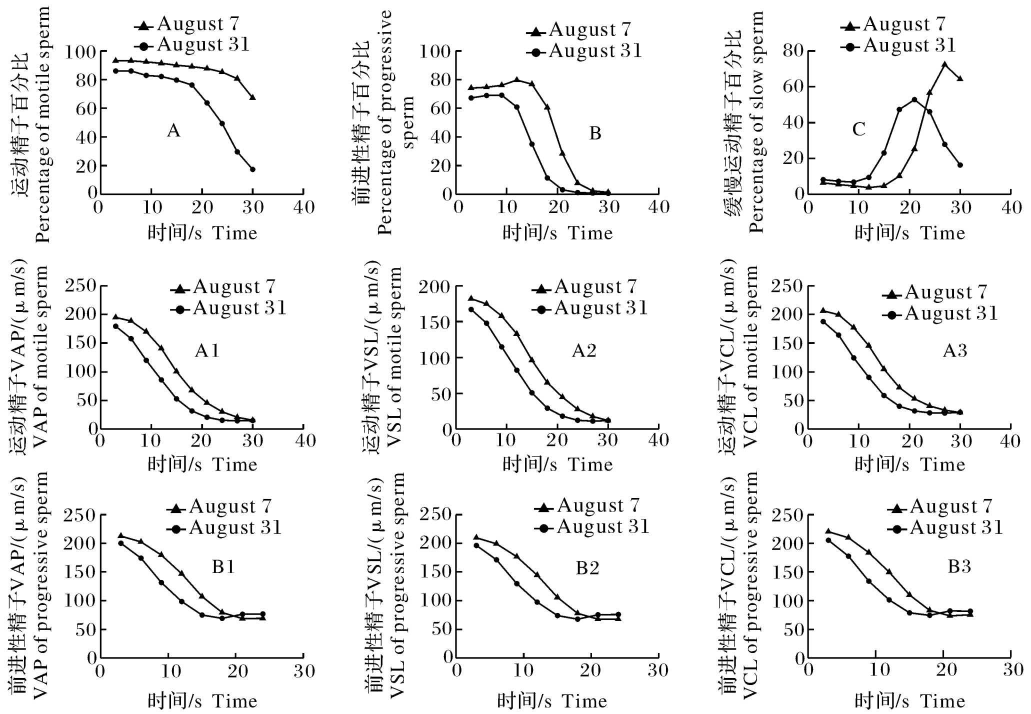
Fig.2　The effects of leucine treatment on yellow catfish fertilization rate (A) and hatching rate (B) during the periods of autumn breeding

分别为 67.1%±21.3%、76.0%±14.0%和 73.1%±8.2%,均维持较高的水平且相互之间不存在显著性($P>0.05$)。结果说明亮氨酸能提高黄颡鱼精子秋繁时的繁殖能力,但过量的亮氨酸却无法促进黄颡鱼精子的繁殖能力。

2.3　秋繁时与正常繁殖季节黄颡鱼精子活力比较

图 3 比较了 8 月 7 日(正常繁殖季节)与 8 月 31 日(秋繁早期)的黄颡鱼精子活力,黄颡鱼秋繁时的精子活力明显低于正常繁殖季节。黄颡鱼正常繁殖季节和秋繁早期的初始运动精子(MOT)比例分别

为 93.1%±4.0%和 85.9%±8.5%，前进性精子(PRO)比例分别为 74.1%±9.2%和 67.2%±6.1%，运动精子的平均路径速率(VAP)分别为(194.6±16.8) μm/s 和(179.6±10.7) μm/s，运动精子的直线运动速率(VSL)分别为(181.8±18.5) μm/s 和(166.9±8.8) μm/s，运动精子的曲线运动速率(VCL)分别为(206.3±17.8) μm/s 和(187.8±12.1) μm/s，前进性精子的平均路径速率(VAP)分别为(212.5±8.3) μm/s 和(200.2±10.1) μm/s，前进性精子的直线运动速率(VSL)分别为(209.7±9.3) μm/s 和(196.4±9.6) μm/s，前进性精子的曲线运动速率(VCL)分别为(220.2±9.7) μm/s 和(205.2±11.0) μm/s。与正常繁殖季节相比，秋繁早期的黄颡鱼初始精子活力参数均有显著降低($P<0.05$)。慢速运动精子比例更早的在 21 s 达到峰值，而正常繁殖季节的慢速运动精子比例在 27 s 才达到峰值，这说明其精子活力衰退较快，运动时间大幅度缩短(约 6 s)。



A-C:不同繁殖时间黄颡鱼运动精子比例(A)、前进性精子比例(B)以及慢速运动精子比例(C)。A1-A3:不同繁殖时间黄颡鱼运动精子的平均路径速率 VAP(A1)、直线运动速率 VSL(A2)和曲线运动速率(A3)。B1-B3:不同繁殖时间黄颡鱼前进性精子的平均路径速率 VAP(B1)、直线运动速率 VSL(B2)和曲线运动速率(B3)。其中 8 月 7 日处于正常繁殖季节，8 月 31 日处于秋繁早期。A-C:The percentage of motile sperm (A), progressive sperm (B) and slow sperm (C) in different breeding times. A1-A3:The average path velocity (A1), straight line velocity (A2) and curvilinear velocity (A3) of motile sperm in different breeding times. B1-B3:The average path velocity (B1), straight line velocity (B2) and curvilinear velocity (B3) of progressive sperm in different breeding times. August 7 was in the normal breeding period and August 31 was in autumn breeding period.

图 3 黄颡鱼秋繁与正常繁殖季节精子活力比较

Fig.3 Comparison of sperm motility between the periods of autumn breeding and normal

3 讨 论

在水产养殖中使用高质量的配子是确保成功生产有价值后代的关键[9]。鱼类精子在受精时的相对数量和质量上与其他养殖动物相比都较差，在水产养殖的人工授精过程中并不总是能成功受精[10]。这一点在某些不容易释放精子的鱼类中尤其严重，例如黄颡鱼。黄颡鱼雄鱼精巢呈精小叶型结构，催产后很难挤出精液，往往需要杀鱼取精，而且人工繁殖结果经常受天气水温等的影响而不稳定。然而渔业上更重视卵和仔鱼的质量，而不是精子质量[11]，尽管精子质量对健康鱼苗的生产也是同样重要。

精子质量直接关系到精子的受精能力、胚胎的发育，其评价指标有：精子形态、精子活力、精子密

度、精液量、线粒体活性、染色质状态、顶体完整性、精子质膜完整性等。此外在生产中，人工授精后检测受精率和孵化率能够更加直观地反映精子的质量。

精子活力是精子质量的重要指标之一，可以直观地反映精子的运动能力。透明带是受精的第一道屏障，在精子与卵子质膜融合并进入卵细胞前，精子必须粘附、结合并穿入透明带内，而一个较高的运动速度是精子穿过卵子透明带、完成受精过程的必需条件。但精子活力能间接地反映精子的繁殖能力，精子活力高的繁殖能力可能会更强，这也并不绝对，完成受精过程还需要精子其他功能健全，如顶体酶的准备、线粒体和染色质的健全等，这些都需要精子有良好的营养物质基础。本研究通过对黄颡鱼注射亮氨酸，发现适量的亮氨酸能够提高精子活力以及受精能力，但过量的亮氨酸在提高黄颡鱼精子活力的同时，却无法促进黄颡鱼精子的繁殖能力。

在黄颡鱼正常繁殖季节，精子活力与繁殖能力均处于一个极高的水平，亮氨酸处理的影响难以观测。秋繁时由于黄颡鱼精卵质量未完全恢复，精子活力处于一个较低的水平，亮氨酸处理对精子活力的影响更加显著。从图 3 我们可以看出，正常繁殖季节黄颡鱼的精子活力远远高于秋繁时，这不仅包括精子的运动时间，还包括精子运动速度以及运动精子和前进性精子比例。而在图 1 中，亮氨酸处理仅仅减缓了黄颡鱼精子活力的衰退速度、提高了精子运动时间，而精子运动速度以及运动精子和前进性精子比例并没有显著变化。

因此，亮氨酸能够通过延长精子运动时间来提高精子活力，但是无法直接提高精子的初始运动活性，例如精子运动速度以及运动精子比例。秋繁时精子活力下降，可能与亮氨酸缺少有一定联系，但不仅仅只是亮氨酸。我们推测，秋繁时黄颡鱼退化的性腺需要恢复，然而恢复时间过短，营养物质需求较大，性腺并不能恢复到正常水平，所以黄颡鱼繁殖效率低。虽然黄颡鱼精巢恢复需要的不仅仅是亮氨酸，但在这个试验中，适宜浓度的亮氨酸可能是通过 PI3K/Akt 通路等，刺激了黄颡鱼的生殖功能，也可能是直接作为营养物质投入，加速了精巢的恢复，提高了精子质量，并提高了其繁殖能力。在斑马鱼中，亮氨酸能通过 PI3K/Akt 途径，抑制细胞自噬，进而提高精子活力[6]。而适量的氯喹也同样可以抑制自噬，通过激活包括 PI3K/Akt 在内的多种信号通路来提高黄颡鱼精子活力和繁殖能力[12]。PI3K/Akt 通路是两者调节精子质量的关键枢纽，所以亮氨酸调节黄颡鱼精子质量很可能是通过 PI3K/Akt 通路实现的。

生产繁殖是鱼类生产中承上启下的关键一环，直接关系到鱼类养殖的健康可持续发展。但在鱼类生产中，亲本的性腺状态经常会受到季节、天气、水温或者营养等条件的限制，最终导致繁殖结果的不稳定。亮氨酸能提高精子质量，对于鱼类繁殖有着重要意义。此外，卵子质量对繁殖能力的影响也至关重要，亲本卵子质量及繁殖能力的提高，也是值得进一步关注的课题。

参　考　文　献

[1] 黄峰，严安生，熊传喜，等.黄颡鱼的含肉率及鱼肉营养评价[J].淡水渔业，1999(10)：3-6.

[2] 杨兴丽，周晓林，常东洲，等.池养与野生黄颡鱼肌肉营养成分分析[J].水生态学杂志，2004，24(5)：17-18.

[3] 鲁大椿，游文章，方建萍，等.我国主要淡水养殖鱼类精浆的氨基酸成分[J].淡水渔业，1987(3)：14-16.

[4] LAHNSTEINER F.The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio* [J].Journal of fish biology，2009，75(4)：816-833.

[5] LAHNSTEINER F.A comparative study on the composition and importance of free amino acids in semen of gilthead sea bream，*Sparus aurata*，and perch，*Perca fluviatilis* [J].Fish physiology & biochemistry，2010，36(4)：1297-1305.

[6] ZHANG J，ZHANG X，LIU Y，et al.Leucine mediates autophagosome-lysosome fusion and improves sperm motility by activating the PI3K/Akt pathway[J].Oncotarget，2017，8(67)：111807-111818.

[7] 倪勇，伍汉霖.江苏鱼类志[M].北京：中国农业出版社，2006：392-404.

[8] KIME D E，VAN LOOK K J W，MCALLISTER B G，et al.Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish[J].Comparative biochemistry and physiology part C：toxicology & pharmacology，2001，130(4)：425-433.

[9] BROMAGE N，ROBERTS R J.Broodstock management and egg and larval quality[J].Aquaculture，1995，141(s1/s2)：140-142.

[10] RURANGWA E，KIME D E，OLLEVIER F，et al.The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish[J].Aquaculture，2004，234(1/2/3/4)：1-28.

[11] 季相山,陈松林,赵燕,等.鱼类精子质量评价研究进展[J].中国水产科学,2007,14(6):1048-1054.

[12] ZHANG J,MA W,XIE B,et al.Beneficial effect and potential molecular mechanism of chloroquine on sperm motility and fertilizing ability in yellow catfish[J].Aquaculture,2017,468:307-313.

Effects of leucine on sperm motility of yellow catfish during periods of autumn breeding

SU Zihao MEI Jie TIAN Jinsong HE Yan

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, *China*

Abstract To study the effects of leucine on the sperm motility of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) during early stage of autumn breeding when the quality of sperms and eggs is lower than in summer breeding, males about 100 g were divided into three groups and injected with 200 μL physiological saline (control group), 100 μmol/L leucine (moderate leucine treatment group) and 1 000 μmol/L leucine (high concentration leucine treatment group), respectively. It was found that sperm motility of the moderate leucine treatment group declined more slowly detected by the computer assisted sperm analysis (CASA) system. In artificial reproduction, the fertilization rate of the moderate leucine treatment group sperm was 34.91%±4.7%, significantly higher than that of the control group (15.9%±2.2%)($P<0.05$), and the fertilization rate of the high concentration leucine treatment group sperm was 16.4%±3.4%, significantly lower than that of the moderate group ($P<0.05$), but not significant different from the control group ($P>0.05$). The results showed that moderate leucine could enhance the sperm motility of yellow catfish, but excessive leucine could not improve the sperm reproduction. So appropriate leucine can be added to improve the sperm reproduction of yellow catfish during the early stage of autumn breeding.

Keywords leucine; yellow catfish; autumn breeding; sperm motility; fertility

(责任编辑:边书京)