

doi: 10.7541/2023.2023.0027

精液添加精氨酸和亮氨酸对杂交黄颡鱼受精和孵化的影响

周全^{1*} 王家琪^{1*} 于贵杰¹ 吴建开² 王德忠² 熊阳¹ 郭稳杰¹
张茂森³ 唐琴^{1#} 梅洁^{1#}

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 射阳康余水产技术有限公司, 盐城 224300;
3. 苏乡溱水产科技有限公司, 泰州 225300)

摘要: 为提高杂交黄颡鱼[黄颡鱼*Tachysurus fulvidraco* (♀)×瓦氏黄颡鱼*Tachysurus vachelli* (♂)]的繁殖效率, 文章首先对精子保存液中L-精氨酸(L-Arg)和L-亮氨酸(L-Leu)两种功能性氨基酸的添加进行了研究, 以找出最适添加浓度。实验以受精率、孵化率和畸形率为评判指标。结果显示, 受精率随着L-精氨酸浓度的等倍增加, 呈先升后降的趋势, 且均显著高于对照组($P<0.05$)。其中以0.50 mmol/L的浓度组最高, 而对孵化率和畸形率均无显著影响($P>0.05$)。随着L-亮氨酸浓度增加, 受精率和孵化率呈先升后降, 畸形率呈先降后升的趋势, 其中0.80 mmol/L浓度组的受精率、孵化率最高, 畸形率最低, 且均显著优于对照组($P<0.05$)。在两种氨基酸同时添加, 当L-精氨酸浓度为0.4 mmol/L, L-亮氨酸浓度为1.0 mmol/L时, 受精率、孵化率和畸形率均显著优于对照组($P<0.05$)。其次, 研究利用计算机辅助精子分析系统(CASA)对精子活力进行检测, 结果显示, 0.4 mmol/L精氨酸与1.0 mmol/L亮氨酸的单独和同时添加均能显著促进精子活力($P<0.05$)。最后, 研究开发了一种更适合黄颡鱼人工繁殖的改良型孵化桶, 受精率和孵化率显著高于传统孵化桶($P<0.05$), 分别提高了12.13%和20.76%。畸形率显著低于传统孵化桶($P<0.05$), 降低了6.42%。研究建立了较高效而便捷的杂交黄颡鱼人工繁殖方法, 将有助于促进新品种的推广和加速产业化发展进程。

关键词: L-精氨酸; L-亮氨酸; 受精; 孵化; 黄颡鱼; 瓦氏黄颡鱼; 杂交黄颡鱼

中图分类号: S965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2023)10-1585-10



黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)和瓦氏黄颡鱼(*Tachysurus vachelli*)同属鲇形目、鲿科、黄颡鱼属, 是我国重要的经济鱼类^[1-5]。黄颡鱼肉质鲜美, 受消费需求的推动, 其养殖产量一直持续稳定增长, 至2022年已达到了58.78万吨^[6, 7]。在生长方面, 黄颡鱼虽然抗病能力强, 但相对的生长速度慢、个体小, 而瓦氏黄颡鱼生长快、个体大。因此, 我国学者利用了二者的优势, 通过黄颡鱼(♀)×瓦氏黄颡鱼(♂)杂交培育出了“黄优1号”新品种, 其形态特征近似于黄颡鱼, 且具有生长快、耐运输、杂交不育等

优点^[1], 目前已发展为市场上主流的养殖品种^[8]。

在“黄优1号”的培育过程中, 由于黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼存在生殖隔离, 不能自然交配繁殖, 因而依靠人工繁殖的方式批量获得鱼苗。而在人工繁殖实践中发现, 黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼通过人工授精杂交后, 无论是采用何种孵化方式, 受精率、孵化率和出苗率显著低于同种之间的繁殖, 而且部分胚胎均会发育致畸死亡, 严重影响人工繁殖的效率。此前有报道指出, 物种的优良性状可通过远缘杂交综合于杂种中, 但是一般亲本的相容性较低, 会出

收稿日期: 2023-01-17; 修订日期: 2023-02-27

基金项目: 国家重点研发计划“长江禁渔后特色土著鱼类规模化繁育与绿色高效养殖”项目(2022YFD2400901); 国家现代农业产业技术体系(CARS-46); 江苏省现代农业重点项目(BE2018348); 盐城渔业高质量发展重点项目(YCSCYJ2021013)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China “Large-Scale Breeding and Efficient Farming of Characteristic Indigenous Fish After the Banned Fishing of the Yangtze River” (2022YFD2400901); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-46); Modern Agricultural Key Projects in Jiangsu Province (BE2018348); Key Projects for the High-Quality Development of Yancheng Fisheries Industry (YCSCYJ2021013)]

作者简介: 周全(1998—), 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: qzhou@webmail.hzau.edu.cn 王家琪(1996—), 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: ml3017540131@163.com *共同第一作者

通信作者: 唐琴, E-mail: tangqin@mail.hzau.edu.cn 梅洁, E-mail: jmei@mail.hzau.edu.cn #共同通信作者

现杂交不易成功的问题^[9]。比如将吉富罗非鱼(*GIFT Oreochromis niloticus* ♀)与翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi* ♂)进行杂交,其胚胎存活率仅为0.34%左右^[10]。唐永凯等^[11]指出杂交胚胎的低成活率可能和配子的不亲和有关。而Chu等^[12]指出,杂交黄颡鱼父系线粒体DNA存在延迟消除现象,说明杂交黄颡鱼大量畸形苗的出现很可能与父系线粒体DNA的延迟消除导致胚胎出现异质性相关。

精液由精子和精浆两个部分组成。其中精液大部分的组成是精浆,含有矿物离子、单糖和各种游离氨基酸等,是输送精子的必需介质,能体现生殖系统的状况和精子质量^[13,14]。鱼类精浆中各种组成成分因物种的不同而不相同,其中游离氨基酸的组成差异较大,且对精子活力的促进作用有较强的物种特异性^[14]。Li等^[15]指出在母猪日粮中添加精氨酸可以提高克隆猪胚胎的发育能力。Kita等^[16]指出在鸡卵中注射亮氨酸可促进胚胎生长发育。此外,有研究证实亮氨酸和精氨酸能刺激着床,促进胚胎生长发育^[17]。精氨酸的生理活性以L-型精氨酸形式发挥作用。Holt等^[18-20]在1944年首次发现人缺乏L-精氨酸可降低睾丸的功能,成年男性长期缺乏氨基酸会导致精子数量和活力下降90%。精氨酸对鱼体的生长发育同样有促进作用,如在饲料中添加精氨酸可增加瓦氏黄颡鱼、斑点叉尾鲴和异育银鲫等机体中NO含量,从而改善精液质量;精氨酸还可以促进如鲤、加州鲈和团头鲂等鱼类成长和蛋白质沉积,提高饲料利用率。亮氨酸是3种具有脂肪族侧链的支链必需氨基酸之一,Lin等^[21]指出在公猪日粮中添加亮氨酸,可通过雷帕霉素(mTOR)信号通路促进睾丸发育,改善精子质量。亮氨酸还可以通过调节雷帕霉素复合物1(mTORC1)调控细胞自噬的发生^[22]。Zhang等^[23]对斑马鱼研究发现亮氨酸能通过PI3K/Akt途径抑制自噬体与溶酶体的融合,提升自噬水平,进而提高精子活力。Su等^[24]则指出在黄颡鱼秋繁时加入适量的亮氨酸可提高黄颡鱼精子活力,进而提高受精率。

除了添加氨基酸,其他途径如合适的孵化方式也能提高受精率和生产效率。网片孵化是目前比较常见的孵化方式,该孵化方式主要采用的设备是网片,将所有鱼卵一起孵化,在孵化的过程中,未受精的鱼卵容易生长水霉,对受精卵造成影响,从而降低孵化率及出苗率。而且,网片孵化容易受到环境的影响,由于没有外源水注入,天气的变化会导致水温变化,进而影响孵化。为了解决网片孵化所存在的弊端,孵化桶因其高效、便捷、节省人力而被广泛使用。而受精卵在孵化桶中孵化同样受多

方面的影响,如水流速度、溶氧等。在传统孵化桶的使用过程中,黄颡鱼苗种的畸形率偏高,且死亡幼苗较多。比如水流速度过快同样会影响受精卵的死亡率^[25],且破膜的受精卵和死卵会与传统孵化桶上方罩子相黏连,进而影响孵化桶中溶氧及水质。因此,对孵化桶进行改良变得至关重要。基于此,本研究开发了改良型孵化桶,一方面减小孵化桶锥体夹角,避免受精卵在桶体内壁堆积,使其均匀翻滚,提高出苗率;另一方面,除去过滤网,降低劳动强度,提高生产效率。且从受精率、孵化率、畸形率等方面与传统孵化桶进行了比较。

本研究首先以L-精氨酸和L-亮氨酸为调控因子,在精子保存液中单独或共同添加,研究不同浓度的添加对黄颡鱼杂交时的受精和孵化的影响,试图找到最适浓度,并探讨两种氨基酸之间是否存在协同效应。其次,本研究尝试开发了一款更适合杂交黄颡鱼孵化的孵化设施,寻找高效、节省成本的杂交黄颡鱼生产方式,为指导繁殖实践提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

黄颡鱼为射阳河黄颡鱼和洞庭湖黄颡鱼两个野生种群杂交、群体选育的第二代亲鱼,系2019年6月人工繁殖的后代,择优挑选。年龄为2冬龄,平均体长19.34 cm,体重超过100 g。瓦氏黄颡鱼为公司2018年8月从长江监利-洞庭湖江段收集的瓦氏黄颡鱼野生幼鱼,经驯养培育而成。年龄3冬龄以上,平均体长为37.8 cm,体重超过750 g。

实验所用传统孵化桶如图1所示,由玻璃钢材料制作,主体部分由上圆柱形桶体和下圆锥形桶体组成。上圆柱形桶体直径70 cm,高度10 cm,设有Φ50 mm PVC管溢流口,安装有孔径为0.25 mm的防逃过滤网。下圆锥形桶体上沿直径70 cm,高度100 cm,桶体分为圆柱形与椎体两部分,其中圆柱形65 cm,椎体部分35 cm,椎体底角超过45°。进水管为Φ40 mm PVC管,通过Φ40 mm PVC管接与桶体底的Φ40 mm PVC弯头链接。孵化时通过Φ40 mm PVC管进水,使水流缓缓进入下圆锥形桶体,均匀翻动桶中受精卵,孵化产生的杂质、卵膜和死卵等污物,随水流经上圆柱形桶体的Φ50 mm PVC管溢流口排出。出苗时关闭Φ40 mm PVC流水控制球阀,使鱼苗沉积于下圆锥形桶体的锥底,打开Φ40 mm出苗控制球阀,从Φ40 mm PVC出苗管中收集鱼苗。

1.2 精子保存液中不同浓度L-精氨酸和L-亮氨酸对受精率、孵化率和畸形率的影响

根据文献查阅及前期实验初步探索^[24],实验通

过预实验选择3个浓度梯度以确定大致的浓度范围, 为了满足实验的需求, L-精氨酸和L-亮氨酸的浓度以倍差设计如表 1所示。

如表 2所示, 由于精子保存液添加L-精氨酸或L-亮氨酸时会对精子保存液的渗透压造成影响, 因此, 根据氨基酸浓度产生的渗透压比等量替代精子保存液中的葡萄糖, 使各个浓度组的渗透压相同, 配制的精子保存液在4℃的冰箱中冷藏备用。每个浓度组取2 mL碾磨成浆的瓦氏黄颡鱼精液以1:8的

比例与相应浓度的精子保存液混合均匀, 在4℃的冰箱中冷藏孵育1h, 然后用于人工授精。

每个浓度组各设3个重复。实验时将采集的成熟卵子用鸡毛搅拌均匀, 每个重复用移液枪取约300粒卵子, 加入保存的精子, 在直径18 cm的培养皿中人工授精和孵化, 当胚胎发育至原肠中期时测定受精率。

1.3 精子保存液中L-精氨酸和L-亮氨酸同时添加对受精率、孵化率和畸形率的影响

为探讨精氨酸和亮氨酸之间是否存在协同效应, 实验解析1.2的试验结果以响应实验的数学模型求出最适浓度, 以最适浓度为中间值, 上下各取一个等差浓度进行2因子3水平的3²正交试验。

1.4 瓦氏黄颡鱼精子活力进行检测

从水泥池中取5条瓦氏黄颡鱼检测精子活力, 用干毛巾拖住雄鱼, 头朝下, 剪鳃放血(防止血液回流污染精子, 血液会影响精子活力), 解剖取出精巢备用。在精巢上剪开小口, 挤压收集精液样本。将瓦氏黄颡鱼精巢按照质量体积比1:2添加精子保存液。根据1.3中已有实验结果, 实验组分别添加0.4 mmol/L 精氨酸、1.0 mmol/L亮氨酸及同时添加0.4 mmol/L精氨酸和1.0 mmol/L亮氨酸; 对照组不做处理。在洁净的匀浆器中均质, 放入4℃冰箱备用。

精子活力和运动参数利用计算机辅助精子分析系统(Computer-Aided Sperm Analysis, CASA)检测分析, 设定60帧/s, 选择10×相位差进行分析每个样品中的精子移动。用0.1% BSA 的双蒸水激活测定, 每个样品至少随机检测3次。精子活力的指标可以通过多个参数来显示, 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)、直线性(Linearity, LIN)及鞭打频率(Beat cross frequency, BCF)。

1.5 改良型孵化桶与传统孵化桶孵化效果的比较

采用传统孵化桶和改良型孵化桶两种孵化方式比较, 每种孵化方式各设3个重复, 每个重复取2.5 kg 人工授精的卵子放养在一个孵化桶内。受精时不添加L-精氨酸和L-亮氨酸, 孵化桶孵化采用黄泥浆脱黏孵化。以两种孵化方式的受精率、孵化率及畸形率进行比较。

1.6 数据统计与分析

在原肠中期统计受精率(Fertilization rate, FR)、孵化脱膜后统计孵化率(Hatching rate, HR)和畸形率(Deformity rate, DR)。受精率、孵化率和畸形率按照下列公式进行计算:

受精率(FR, %)=(受精卵数/卵总数)×100

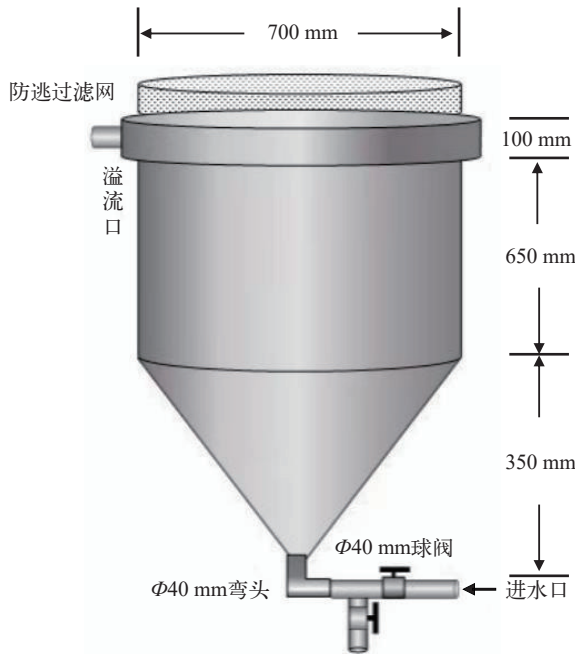


图 1 传统孵化桶
Fig. 1 Traditional hatching bucket

表 1 实验设计的L-精氨酸和L-亮氨酸的浓度梯度

Tab. 1 The concentration gradient of L-arginine and L-leucine designed in the experiment

编号 Number	氨基酸 Amino acid	浓度梯度 Concentration gradient (mmol/L)					
		对照 Control	1	2	3	4	5
实验1 Test 1	L-精氨酸 L-arginine	0.00	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00
实验2 Test 2	L-亮氨酸 L-leucine	0.00	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80

表 2 精子保存液的组成

Tab. 2 Composition of sperm preservation solution

试剂名称 Name	分子式 Molecular formula	质量Molecular mass (g)
柠檬酸钠	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	10.0
氯化钠	KCl	0.3
碳酸氢钠	NaHCO ₃	2.0
葡萄糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	29.0
蒸馏水 (mL)	H ₂ O	1000

孵化率(HR, %)=(孵化的鱼苗数/受精卵数)×100

畸形率(DR, %)=(畸形苗数/孵化总苗数)×100

打开HTCASA II Animal系统,调整相差显微镜焦距和光源至适当位置,以及调整其测量参数等,使黄颡鱼的运动精子能够被正常捕捉。将精液样品稀释到合适浓度后,取出带有2 μL凹槽的载玻片和透明盖玻片待用,确保其表面无擦痕和污渍。按照稀释后的精液与0.1%BSA的双蒸水1:2的比例在凹槽内迅速混匀激活并盖上盖玻片,迅速调整玻片到显微镜镜头下,点击软件“Capture”键开始捕捉精子运动参数,视频采集帧率为60 Hz,需要每隔约3s(系统记录前一段精子运动所需时间)持续点击“Capture”键捕捉精子运动参数,直至显微镜视野中没有做前进性运动的精子。每次测得的精子活力数据“hmv”格式保存在电脑硬盘中,可以使用HTCASA II Animal再次打开,以视频的方式呈现。根据视频分别比较精氨酸、亮氨酸及联合使用精氨酸与亮氨酸处理对精子活力的影响。

数据处理和分析分别使用GraphPad Prism 8.0和SPSS 26.0软件进行。采用单因素方差分析(ANOVA),研究功能氨基酸处理精子对杂交黄颡鱼繁殖效率的影响。差异的统计学意义:显著性差异(* $P<0.05$)和极显著性差异(** $P<0.01$);相同小写字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异性显著($P<0.05$)^[1]。

2 结果

2.1 精子保存液中添加不同浓度L-精氨酸对受精率、孵化率和畸形率的影响

如表3所示,受精率随精氨酸浓度的等倍增加呈先升后降的趋势,即在0.25—0.50 mmol/L呈上升趋势,从0.50—8.00 mmol/L呈下降趋势。添加精氨酸浓度组的受精率均显著高于对照组($P<0.05$),高出5.62%—17.37%。在各浓度组中,受精率以0.50 mmol/L组最高,达69.83%,显著高于除1.00 mmol/L组以外的其余各组($P<0.05$)。其余各组,以最高添加8.00 mmol/L的受精率最低,仅58.08%,显著低于1.00—2.00 mmol/L组($P<0.05$),剩余各组之间则无显著差异($P>0.05$)。添加精氨酸对孵化率和畸形率无明显影响,各浓度组的孵化率与畸形率与对照组相比,均无显著性差异($P>0.05$),各浓度组之间也无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 精子保存液中添加不同浓度L-亮氨酸对受精率、孵化率和畸形率的影响

如表4所示,受精率随亮氨酸浓度的等倍提高

呈先升后降的趋势,即在0.05—0.80 mmol/L呈上升趋势,从0.80到1.60 mmol/L呈下降趋势。在各浓度组中,除0.05和1.60 mmol/L组与对照组无显著差异($P>0.05$)以外,其余各组的受精率则显著高于对照组($P<0.05$),高出5.19%—11.37%;其中以0.80 mmol/L组受精率最高,达72.37%,显著高于0.05—0.10 mmol/L组和1.60 mmol/L组($P<0.05$)。剩余各组之间则无显著差异($P>0.05$)。孵化率的变化与受精率相似,随着亮氨酸浓度的提高,以0.80 mmol/L浓度组为顶峰呈先升后降的趋势。在各浓度组中,除0.05—0.10 mmol/L组与对照组无显著差异($P>0.05$)外,其余各组的孵化率均显著高于对照组($P<0.05$),也显著高于0.05 mmol/L组($P<0.05$),比对照组高出10.14%—16.51%;其中0.80 mmol/L组的孵化率最高,达77.94%,显著高于除0.40 mmol/L组以外的其他各组($P<0.05$)。在剩余各组中,0.05—0.10 mmol/L组和0.20—0.40 mmol/L组则无显著差异($P>0.05$)。

畸形率的变化则与受精率和孵化率不同,随着

表3 L-精氨酸浓度对受精率、孵化率和畸形率的影响

Tab. 3 Effects of L-arginine concentration on fertilization rate, hatching rate and deformity rate

组别(精氨酸浓度) Group (Arg; mmol/L)	受精率 Fertilization rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)	畸形率 Deformity rate (%)
对照组 Control	52.46±2.84 ^d	67.78±2.14	25.84±1.07
0.25	60.08±1.59 ^{bc}	71.23±3.78	25.41±0.80
0.50	69.83±1.52 ^a	69.39±3.69	23.65±0.79
1.00	66.41±1.68 ^{ab}	70.55±2.13	24.47±2.32
2.00	64.82±1.58 ^b	69.18±1.92	25.78±2.72
4.00	61.23±2.36 ^{bc}	67.31±1.18	25.61±2.40
8.00	58.08±0.58 ^c	72.93±1.25	25.23±2.79

注:同一列数值中上标字母不同表示存在差异性显著($P<0.05$), $n=3$;下同

Note: Significant differences exist in different representations of superscript letters in the same column ($P<0.05$), $n=3$. The same applies below

表4 L-亮氨酸浓度对受精率、孵化率和畸形率的影响

Tab. 4 Effects of L-leucine concentration on fertilization rate, hatching rate and deformity rate

组别(亮氨酸浓度) Group (Leu; mmol/L)	受精率 Fertilization rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)	畸形率 Deformity rate (%)
对照组 Control	61.00±3.36 ^c	61.43±1.71 ^c	27.53±1.04 ^a
0.05	64.54±1.67 ^{bc}	60.80±1.49 ^c	25.43±2.31 ^a
0.10	66.19±1.91 ^b	65.54±7.39 ^{bc}	17.17±4.53 ^b
0.20	67.90±3.39 ^{ab}	71.57±4.17 ^b	12.02±2.71 ^{bc}
0.40	68.03±1.28 ^{ab}	76.80±1.73 ^{ab}	7.65±2.26 ^c
0.80	72.37±1.92 ^a	77.94±3.90 ^a	6.80±2.17 ^c
1.60	64.29±1.64 ^{bc}	73.37±3.46 ^b	11.41±2.69 ^c

亮氨酸浓度的提高呈先降后升趋势。0.10—1.60 mmol/L 浓度组的畸形率显著低于对照组和 0.05 mmol/L 浓度组 ($P<0.05$), 比对照组降低出 10.36%—20.73%; 0.10—0.20 和 0.40—1.60 mmol/L 浓度组之间则无显著差异 ($P>0.05$)。各组中以 0.80 mmol/L 浓度组的畸形率最低, 为 6.80%, 显著低于 0.05—0.10 mmol/L 浓度组 ($P<0.05$), 但与 0.20—0.40 mmol/L 浓度组和 1.60 mmol/L 浓度组无显著差异 ($P>0.05$)。

2.3 精子保存液中 L-精氨酸和 L-亮氨酸共同添加对受精率、孵化率和畸形率的影响

精氨酸和亮氨酸 2 因素 3 水平正交实验对受精率、孵化率和畸形率影响的结果如表 5 所示, 添加氨基酸的各组受精率均高于对照组, 受精率提高 11.20%—19.33%。而精氨酸每个水平所对应的 3 个水平的亮氨酸各组之间受精率均无显著差异 ($P>0.05$), 但精氨酸 0.4 mmol/L 水平对应的亮氨酸 3 个水平组的受精率均显著高于其他 2 个精氨酸水平所对应的亮氨酸 3 个水平组 ($P<0.05$), 达 62.43%。其他 2 个精氨酸水平所对应的亮氨酸 3 个水平组之间则无显著差异 ($P>0.05$)。

孵化率的变化与受精率的相似, 添加氨基酸每个水平的各组孵化率均显著高于对照组 ($P<0.05$), 孵化率提高 13.03%—25.51%。亮氨酸 0.5 mmol/L 对应的精氨酸 3 个水平组, 随着精氨酸浓度的提高, 孵化率略呈增加趋势, 但无显著差异 ($P>0.05$)。而在 1.5 mmol/L 亮氨酸水平组中, 随着精氨酸浓度的提高, 孵化率呈显著增加趋势 ($P<0.05$), 其中, 0.4 和

表 5 L-精氨酸和 L-亮氨酸浓度共同作用对受精率、孵化率和畸形率的影响

Tab. 5 Effects of L-Arginine and L-Leucine concentrations on fertilization rate, hatchability rate and deformity rate

组别 Group	L-精氨酸浓度 L-arginine (mmol/L)	L-亮氨酸浓度 L-leucine (mmol/L)	受精率 Fertilization rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)	畸形率 Deformity rate (%)
对照组 Control			43.10± 0.77 ^c	67.02± 4.48 ^d	22.85± 4.62 ^d
1	0.2	0.5	55.02± 4.18 ^{bc}	81.36± 0.66 ^{bc}	9.10± 1.04 ^c
2	0.2	1.0	56.02± 3.49 ^b	85.45± 0.62 ^b	5.68± 0.28 ^d
3	0.2	1.5	54.30± 1.88 ^{bc}	80.05± 2.15 ^c	11.77± 0.38 ^b
4	0.4	0.5	60.03± 1.02 ^a	83.81± 1.07 ^{bc}	8.36± 0.92 ^{cd}
5	0.4	1.0	62.43± 4.26 ^a	92.53± 1.00 ^a	5.23± 0.34 ^d
6	0.4	1.5	60.96± 2.01 ^a	85.56± 4.59 ^b	10.15± 1.34 ^{bc}
7	0.6	0.5	54.53± 1.93 ^{bc}	86.61± 1.61 ^b	8.19± 0.76 ^{cd}
8	0.6	1.0	57.44± 2.61 ^b	89.40± 1.82 ^{ab}	6.22± 0.76 ^d
9	0.6	1.5	55.68± 2.58 ^b	87.01± 0.44 ^b	9.97± 2.13 ^d

0.6 mmol/L 精氨酸水平组显著高于 0.2 mmol/L 水平组 ($P<0.05$)。在所有组中, 1.0 mmol/L 亮氨酸水平对应的精氨酸 0.4 mmol/L 水平组的孵化率显著高于其他组 ($P<0.05$), 最高达 92.53%。

与受精率和孵化率相反, 添加氨基酸的各组畸形率均显著低于对照组 ($P<0.05$), 畸形率降低了 11.08%—17.62%。亮氨酸 0.5 mmol/L 对应的精氨酸 3 个水平组, 随着精氨酸浓度的提高, 畸形率呈降低趋势, 但无显著差异 ($P>0.05$)。而在 1.5 mmol/L 亮氨酸的水平组中, 随着精氨酸浓度的提高, 畸形率呈显著降低趋势 ($P<0.05$)。1.0 mmol/L 亮氨酸水平对应的 3 个精氨酸水平组的畸形率低于其他 2 个亮氨酸水平对应的 3 个精氨酸水平组, 以 1.0 mmol/L 亮氨酸水平对应的 0.4 mmol/L 精氨酸水平的浓度组畸形率最低, 为 5.23%。

2.4 L-精氨酸与 L-亮氨酸处理对精子运动速度的影响

为探究精氨酸与亮氨酸影响繁殖效率的因素, 我们猜测有可能是添加氨基酸改变了精子质量, 因此我们检测了相关处理的精子活力。在关于精子的研究中, 计算机辅助精子分析系统 (CASA) 被广泛用于精子质量的分析, 平均路径速度 (VAP), 直线运动速度 (VSL)、曲线运动速度 (VCL)、直线性 (LIN) 和鞭打频率 (BCF) 等参数与精子质量有显著相关性, 是评判精子质量的重要参数。为检测不同氨基酸处理对瓦氏黄颡鱼精子活力的影响, 我们分别使用 0.4 mmol/L 精氨酸、1.0 mmol/L 亮氨酸及 0.4 mmol/L 精氨酸+1.0 mmol/L 亮氨酸联合处理瓦氏黄颡鱼精子, 然后通过计算机辅助精液分析评估不同处理组瓦氏黄颡鱼精子活力。通过检测常用的精子活力运动参数 VAP、VSL 和 VCL 等 (表 6), 同时添加精氨酸与亮氨酸处理组的 VAP、VSL 和 VCL 参数显著高于其他处理组 ($P<0.05$), 而 LIN 与 BCF 无明显差异 ($P>0.05$), 表明其精子活力显著高于对照组。

表 6 CASA 分析不同处理组精子活力

Tab. 6 CASA analysis of sperm motility in different treatment groups

参数 Parameter (μm/s)	对照组 Control	精氨酸 Arg	亮氨酸 Leu	精氨酸+亮氨酸 Arg+Leu
VAP	81.53± 14.04 ^c	110.38± 5.25 ^b	113.43± 5.42 ^b	120.76± 3.76 ^a
VSL	82.71± 10.52 ^c	104.49± 3.88 ^b	109.93± 6.12 ^b	123.19± 3.11 ^a
VCL	82.38± 16.94 ^c	106.20± 5.55 ^b	115.90± 4.64 ^b	126.28± 5.98 ^a
LIN	81.38± 7.90	80.68± 5.87	79.40± 4.97	78.04± 4.87
BCF	26.89± 5.03	28.43± 3.66	27.12± 4.80	29.99± 7.31

2.5 L-精氨酸与L-亮氨酸处理对精子运动时间的影响

如图2所示,不同的氨基酸处理组都可以不同程度地提高精子寿命。其中,各实验组的精子的寿命都显著高于对照组,以0.4 mmol/L精氨酸+1.0 mmol/L亮氨酸联合处理组最高,其精子的寿命为(111.67±2.05)s,比对照组延长了接近30s。同时,其快速运动的精子与慢速运动的精子数量也显著高于其他组。其结果显示,精氨酸与亮氨酸联合处理精子具有协同作用,提高精子活力。

2.6 改良型孵化桶设计

相较于传统孵化桶,改良型孵化桶在外形上做出了较大改变。如图3所示,由玻璃钢材料制作,主体部分由上圆柱形桶体和下圆锥形桶体组成。上圆柱形桶体直径70 cm,高度10 cm,设有Φ50 mm PVC管溢流口,溢流口前无过滤网,相较于传统孵化桶可以省去鱼苗破膜时刷网的工序,降低劳动强度。下圆锥形桶体上沿直径70 cm,锥体底角约39.5°,高度100 cm,相较于传统孵化桶角度更小,斜坡更长,有助于受精卵翻滚均匀,从而提高出苗率。进水管为Φ25 mm PVC管,通过Φ25—40 mm PVC变径接与桶体底的Φ40 mm PVC弯头链接,变径接头前设Φ25 mm PVC出苗管,由Φ25 mm PVC球阀控制。孵化时通过Φ25 mm PVC管进水,由Φ25 mm PVC球阀控制和调节水流量,并由Φ25—40 mm PVC变径接头缓冲水流,相较于传统孵化桶的Φ40 mm PVC球阀,Φ25 mm PVC球阀能够更有效减缓水流冲击力,使水流缓缓进入下圆锥形桶体,均匀翻动桶中受精卵,孵化产生的杂质、卵膜和死卵等污物,随水流经上圆柱形桶体的Φ50 mm

PVC管溢流口排出。出苗时关闭Φ25 mm PVC流水控制球阀,使鱼苗沉积于下圆锥形桶体的锥底,打开Φ25 mm出苗控制球阀,从Φ25 mm PVC出苗管中收集鱼苗。

2.7 传统孵化桶与改良型孵化桶对黄颡鱼受精和孵化的影响

由表7可知,改良型孵化桶77.63%的受精率高于传统孵化桶65.5%的受精率,差异显著($P<0.05$),高出12.13%。与受精率相似,改良型孵化桶79.49%的孵化率高于传统孵化桶58.73%的孵化率,改良型孵化桶的孵化率极显著高于传统孵化桶($P<0.001$),高出20.76%。与孵化率和受精率相反,畸形率以改良型孵化桶较低,为25.28%,显著低于传统孵化桶31.70%的畸形率($P<0.05$)。

3 讨论

本研究探索了L-精氨酸的添加对受精率、孵化率和畸形率的影响,发现L-精氨酸在一定浓度下可以提高受精率。此前也有研究证实了L-精氨酸对精子活力有促进作用。如在哺乳动物中,Öztürk等^[26]通过对公牛的研究指出,在精子补充液中添加L-精氨酸能够显著提高精子DNA的完整性。Li等^[27]通过对公猪精子的研究指出补充L-精氨酸可以改善热引起的活性氧水平升高,进而维持精子活力。Liu等^[28]也指出,高精氨酸肽能够促进白消安诱导后小鼠睾丸损伤的恢复。在代谢过程中,精氨酸可产生多种功能性产物,如多胺、肌酸和一氧化氮(NO)等^[29]。其中,NO的生物合成是L-精氨酸对精子活力的主要作用机制^[30]。Jarazo等^[31]指出,对小鼠的研究发现精氨酸能够催化一氧化氮合成酶(NOS)

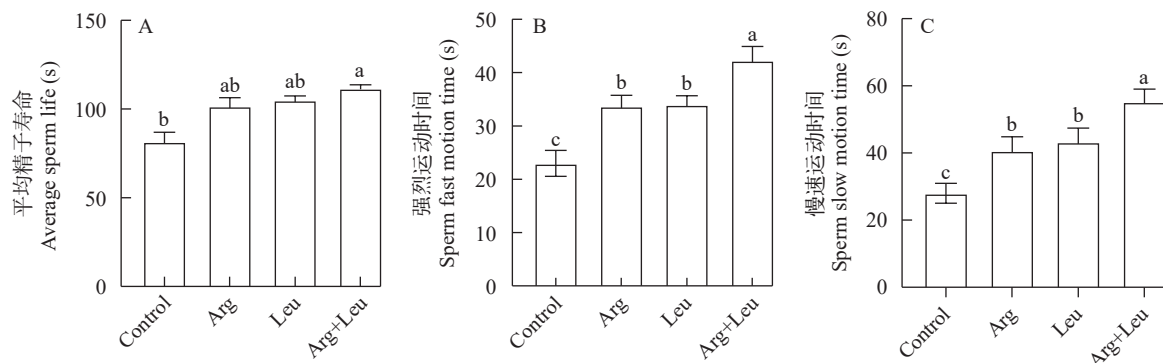


图2 不同氨基酸处理对精子运动时间的影响

Fig. 2 Effect of different amino acid treatments on sperm motility time

对照组不做处理,实验组精子保存液分别添加精氨酸0.4 mmol/L、亮氨酸1.0 mmol/L及精氨酸0.4 mmol/L+亮氨酸1.0 mmol/L,利用计算机辅助精子分析(CASA)系统检测精子运动时间

The control group is left untreated, and the sperm preservation fluid of the experimental group is supplemented with arginine 0.4 mmol/L, leucine 1.0 mmol/L and arginine 0.4 mmol/L+leucine 1.0 mmol/L, respectively, and sperm motility time is detected using the computer-assisted sperm analysis (CASA) system

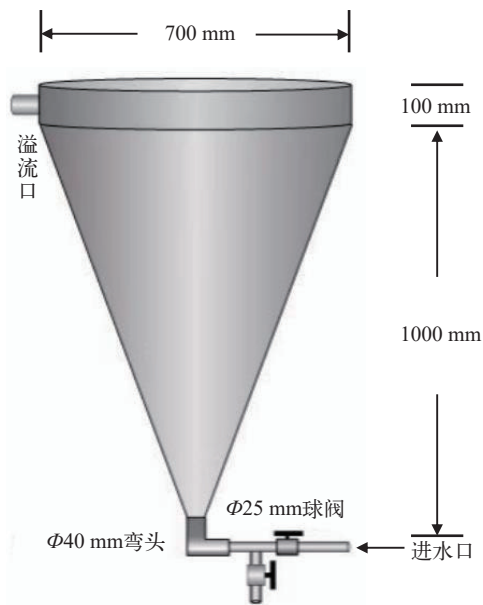


图 3 改良型孵化桶
Fig. 3 Improved bucket

表 7 不同孵化方式对受精率、孵化率和畸形率的影响

Tab. 7 Effects of different incubation modes on fertilization rate, hatching rate and deformity rate

孵化方式 Incubation mode	受精率 Fertilization rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)	畸形率 Deformity rate (%)
传统孵化桶 Traditional hatching tank	65.50±2.73 ^b	58.73±2.04 ^b	31.70±2.52 ^a
改良型孵化桶 Improved hatching tank	77.63±0.90 ^a	79.49±0.81 ^a	25.28±1.57 ^b

产生NO, 减少氧化应激引起的睾丸损伤。Maciel等^[32]则指出L-精氨酸是一氧化氮(NO)的天然前体, 在公牛精子获能过程中可提高精子质量。而在公猪日粮中补充精氨酸则可提高血清中NO水平及睾丸精氨酸和腐胺丰度, 进而改善睾丸发育和精液质量^[33]。另外, 精氨酸还可激活哺乳动物中mTOR细胞机制靶, 抑制自噬, 提高精子质量和促进精子发生^[34]。

作为蛋白质合成重要底物氨基酸之一, 亮氨酸在蛋白质合成, 代谢等方面都具有重要的生物学功能^[35]。与L-精氨酸类似, 本研究也探索了L-亮氨酸对繁殖效率的影响。研究结果显示在适宜浓度下, L-亮氨酸对受精率、孵化率及畸形率均有显著的改善作用。这与人研究结果吻合, 如Zhang等^[23]指出, 亮氨酸短期处理可以通过影响自噬途径来提高斑马鱼精子的运动性。Su等^[24]提出, 在黄颡鱼秋繁生产中添加适量的亮氨酸可以提高受精率。Lin等^[21]指出在日粮中添加亮氨酸可增加睾丸中亮氨酸的吸收和利用, 促进睾丸的发育, 通过mTOR信

号通路改善公猪的精液质量, 提高精子活力。但是, 在极端条件下, 如在亮氨酸饥饿的条件下, 能促进或诱导细胞自噬, 重新补充L-亮氨酸可以缓解依赖mTOR信号通路的自噬过程^[36]。其机制是亮氨酸可通过中间代谢产物乙酰辅酶A(AcCoA)激活mTORC1, 进而通过蛋白激酶ULK1缓解自噬的发生^[37]。除了mTORC1, 磷酸酶1B(PPM1B)同样控制ULK1的氧化磷酸化状态, 亮氨酸缺乏诱导14-3-3ε巴豆酰化, 导致PPM1B从14-3-3ε相互作用中释放, 活化的PPM1B将ULK1去磷酸化并随后启动自噬, 且14-3-3ε-PPM1B-ULK1通路与mTORC1-ULK1通路可能是协同互补机制^[38]。此外, 虽然本研究发现0.4 mmol/L精氨酸与1.0 mmol/L亮氨酸的单独和同时添加均能显著促进精子活力, 但是同时添加比单独添加的促进效果更佳。同时添加将受精率提高了11.20%—19.33%, 单独添加L-精氨酸提高了5.62%—17.37%, 单独添加L-亮氨酸提高了5.19%—11.37%, 由此可见同时添加效果优于单独添加。此结果从一定程度上体现了两种氨基酸的协同作用, 虽然亮氨酸和精氨酸的协同效应在鱼中属首次发现, 但在哺乳动物的肉类品质研究中已有报道。如Hu等^[39]指出, 亮氨酸和精氨酸共同添加可诱导猪体脂下降, 提高其食用品质。Chu等^[12]指出杂交黄颡鱼在胚胎发育的过程中存在父系线粒体DNA延迟消除现象, 且推测其可能是杂交黄颡鱼畸形率高的原因之一。从机制上发现, 自噬与父系线粒体消除相关, 推测杂交鱼畸形率高是由于自噬不完全导致的^[40]。Zhang等^[23]指出添加亮氨酸能促进自噬体的形成或抑制自噬体的降解, 促进细胞自噬从而提高精子活力。精液中添加精氨酸和亮氨酸可以激活精子中的细胞自噬通路, 受精后可能传递到杂交黄颡鱼的受精卵中, 促进父系线粒体的清除, 进而降低杂交黄颡鱼的畸形率。

除了探究L-精氨酸和L-亮氨酸对受精率、孵化率及畸形率的影响, 本实验还借助计算机辅助精子分析系统(CASA)^[1]进一步证实了精氨酸和亮氨酸确实可以显著提高精子活力。这也和前人研究结果一致。如Su等^[24]也指出适量的氨基酸能提高黄颡鱼精子活力。Lenis等^[41]使用不同剂量的精氨酸灌喂大鼠后, 发现附睾精子的运动能力明显提高, 推测可能是精氨酸酶在多胺生物合成中形成的鸟氨酸被鸟氨酸脱羧酶转化为腐胺, 然后腐胺参与精氨酸的合成, 即精氨酸通过影响多胺导致精子活力增加。

根据生产性验证显示, 改良型孵化桶对生产效率有显著的提升作用, 且能够满足人工孵化和生产实践的需求。与其他黏性卵类型的鱼类孵化相似,

目前黄颡鱼孵化的方式多以网片孵化,或通过特定的设施设备孵化,而本研究设计的改良型孵化桶,不仅解决了传统孵化桶受精卵翻动不均匀、水流冲击力大和不能及时排出孵化污物及死卵等问题,也避免了畸形苗死亡和水质恶化对正常苗造成影响。同时孵化桶容量较大,每次可容纳受精卵3—4 kg,且孵化桶上部未设置滤网,可减少鱼苗破膜时刷网的工序,保证桶内的溶氧维持正常水平,对生产实际具有重要意义。

4 总结

本研究发现在精子保存液中添加精氨酸,对改善受精起主导作用;在精子保存液中添加亮氨酸,对改善孵化起决定作用;在精子保存液中同时添加精氨酸和亮氨酸,对改善受精和孵化具有显著的促进和协同效应。针对传统孵化桶由于水流及溶氧等因素影响生产效率,本研究设计采用的改良型孵化桶,改善了水流冲击力过大而对受精卵和孵化的影响,破除了传统孵化桶不能及时排出孵化污物的弊端,提高受精卵孵化过程中的溶氧,显著改善了孵化水质和孵化效率,为人工孵化提供了一种操作简便、劳动强度小、节水、高效的孵化设备。在瓦氏黄颡鱼精液中添加适量的氨基酸,使用改良型孵化桶能大量快捷生产杂交黄颡鱼种苗,并能达到黄颡鱼种内繁殖水平。

参考文献:

- [1] Hu W H, Dan C, Guo W J, *et al.* The morphology and gonad development of *Pelteobagrus fulvidraco* and its interspecific hybrid “Huangyou No. 1” with *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(6): 1231-1238. [胡伟华, 丹成, 郭稳杰, 等. 黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优1号”形态及性腺发育的比较 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(6): 1231-1238.]
- [2] Peng Y, Li J, Wang T, *et al.* Preliminary study on distribution characteristics and positioning of microsatellites in whole genome of *Pelteobagrus vachelli* [J]. *South China Fisheries Science*, 2022, **18**(1): 90-98. [彭治, 李杰, 王涛, 等. 瓦氏黄颡鱼全基因组微卫星的分布特征及其定位的初步研究 [J]. 南方水产科学, 2022, **18**(1): 90-98.]
- [3] Li S H, Wang Y F, Zhang Y. Breeding techniques of *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Fishery Guide to be Rich*, 2020(22): 49-55. [李圣华, 王玉峰, 张杨. 瓦氏黄颡鱼养殖技术 [J]. 渔业致富指南, 2020(22): 49-55.]
- [4] Xiong Y, Wang S, Guo W J, *et al.* Effects of different animal baits on the gonad development of YY super-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, **44**(2): 245-252. [熊阳, 王帅, 郭稳杰, 等. 不同动物饵料对YY超雄黄颡鱼性腺发育的影响 [J]. 水产学报, 2020, **44**(2): 245-252.]
- [5] Yang T Y, Xiong Y, Dan C, *et al.* Production of xx male yellow catfish by sex-reversal technology [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(5): 871-878. [杨天毅, 熊阳, 丹成, 等. 利用鱼类性逆转技术创制黄颡鱼XX雄鱼的方法 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(5): 871-878.]
- [6] China Bureau of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 24-25. [中华人民共和国渔政局, 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社. 2022: 24-25.]
- [7] Hu W H, Xiong Y, Guo W J, *et al.* The effect of mesenteric fat deposition on reproduction performance of female parent fish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(6): 1181-1189. [胡伟华, 熊阳, 郭稳杰, 等. 黄颡鱼母本的肠系膜脂肪沉积对繁育性能的影响 [J]. 水生生物学报, 2021, **45**(6): 1181-1189.]
- [8] Gong G R, Zhang J, Dan C, *et al.* Identification of *Pelteobagrus fulvidraco*, *Pelteobagrus vachelli* and their interspecific hybrid by DNA markers [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(2): 321-325. [巩高瑞, 张晋, 丹成, 等. 应用DNA分子标记鉴定黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及其杂交种的研究 [J]. 水生生物学报, 2017, **41**(2): 321-325.]
- [9] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes [J]. *Science China-Life Sciences*, 2010, **53**(4): 416-425.
- [10] Yang N, Cao J M, Liu Z G, *et al.* Analysis of genetic characteristics of distant hybridization progenies of *Oreochromis niloticus*, GIFT (♀) and *Siniperca chuatsi* (♂) [J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, **51**(5): 60-69. [杨娜, 曹建萌, 刘志刚, 等. 吉富罗非鱼(♀)与翘嘴鲃(♂)远缘杂交子代的遗传特征分析 [J]. 淡水渔业, 2021, **51**(5): 60-69.]
- [11] Tang Y K, Yang H, Wu T T, *et al.* Study on fertilization cytology and embryonic development in hybridization between *Oreochromis aurea* (♀) and *Siniperca chuatsi* (♂) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(5): 559-562. [唐永凯, 杨弘, 吴婷婷, 等. 奥利亚罗非鱼与鳊杂交的受精细胞学及胚胎发育研究 [J]. 水生生物学报, 2006, **30**(5): 559-562.]
- [12] Chu Z Z, Guo W J, Hu W H, *et al.* Delayed elimination of paternal mtDNA in the interspecific hybrid of *Pelteobagrus fulvidraco* and *Pelteobagrus vachelli* during early embryogenesis [J]. *Gene*, 2019(704): 1-7.
- [13] Dadras H, Dzyuba B, Cosson J, *et al.* Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review [J]. *Aquaculture Research*, 2017, **48**(3): 729-740.
- [14] 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 and Biochemistry*, 2010, **36**(4): 1297-

- 1305.
- [15] Li Z, Yue Z, Ao Z, *et al.* Maternal dietary supplementation of arginine increases the ratio of total cloned piglets born to total transferred cloned embryos by improving the pregnancy rate of recipient sows [J]. *Animal Reproduction Science*, 2018(196): 211-218.
- [16] Kita K, R Ito K, Sugahara M, *et al.* Effect of intraovarian injection of branched chain amino acids on growth and hatching time of chicken embryos [J]. *Feed Review*, 2015(4): 42. [Kita K, R Ito K, Sugahara M, 等. 卵内注射支链氨基酸对鸡胚胎生长发育和孵化时间的影响 [J]. 饲料博览, 2015(4): 42.]
- [17] Correia B, Sousa M I, Branco A F, *et al.* Leucine and arginine availability modulate mouse embryonic stem cell proliferation and metabolism [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**(22): 14286.
- [18] Zhou H, Chen N, Qiu X, *et al.* Arginine requirement and effect of arginine intake on immunity in largemouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2012, **18**(1): 107-116.
- [19] Liang H, Ren M, Habte-Tsion H-M, *et al.* Dietary arginine affects growth performance, plasma amino acid contents and gene expressions of the TOR signaling pathway in juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. *Aquaculture*, 2016(461): 1-8.
- [20] Hoseini S M, Yousefi M, Hoseinifar S H, *et al.* Effects of dietary arginine supplementation on growth, biochemical, and immunological responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.), stressed by stocking density [J]. *Aquaculture*, 2019(503): 452-459.
- [21] Lin Y, Li J, Wang K, *et al.* Effects of dietary L-leucine supplementation on testicular development and semen quality in boars [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022(9): 904653.
- [22] Yan G K. Dissection of leucine-regulated mTORC1 and fatty acid β -oxidation [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019: 9-11. [严国楷. 亮氨酸调节mTORC1及脂肪酸 β 氧化的机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019: 9-11.]
- [23] 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.
- [24] Su Z, Mei J, Tian J, *et al.* Effects of leucine on sperm motility of yellow catfish during periods of autumn breeding [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, **38**(4): 71-76.
- [25] Han X L, Hu J Y, Gao P, *et al.* Effects of temperature and current on hatching ratio of *Esox lucius* [J]. *Fisheries of Heilongjiang*, 2020, **39**(3): 32-34. [韩小丽, 胡建勇, 高攀, 等. 温度、水流对白斑狗鱼孵化率的影响 [J]. 黑龙江水产, 2020, **39**(3): 32-34.]
- [26] Ozturk C, Gungor S, Ataman M B, *et al.* Effects of arginine and trehalose on post-thawed bovine sperm quality [J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2017, **65**(3): 429-439.
- [27] Li Y, Chen J, Li Z, *et al.* Mitochondrial OXPHOS is involved in the protective effects of L-arginine against heat-induced low sperm motility of boar [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019(84): 236-244.
- [28] Liu W, Zhang L, Gao A, *et al.* Food-derived high arginine peptides promote spermatogenesis recovery in busulfan treated mice [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021(9): 791471.
- [29] Wu G, Meininger C J, Knabe D A, *et al.* Arginine nutrition in development, health and disease [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2000, **3**(1): 59-66.
- [30] Srivastava S, Desai P, Coutinho E, *et al.* Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide [J]. *Biology of Reproduction*, 2006, **74**(5): 954-958.
- [31] Jarazo D S, Irina F M, Veronica J P, *et al.* Inhibition of NOS-NO system prevents autoimmune orchitis development in rats: relevance of NO released by testicular macrophages in germ cell apoptosis and testosterone secretion [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(6).
- [32] Maciel V L, Caldas-Bussiere M C, Silveira V, *et al.* L-arginine alters the proteome of frozen-thawed bovine sperm during in vitro capacitation [J]. *Theriogenology*, 2018(119): 1-9.
- [33] Wei D, Wu D, Zeng W, *et al.* Arginine promotes testicular development in boars through nitric oxide and putrescine [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2022, **106**(2): 266-275.
- [34] Wu G, Meininger C J, Mcneal C J, *et al.* Role of L-arginine in Nitric Oxide Synthesis and Health in Humans [M]//Wu G (Eds.), *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in Gene Expression, Metabolic Regulation, and Exercising Performance*. 2021: 167-187.
- [35] Wang Q, Qi R, Wang J, *et al.* Investigation of autophagy induced by amino acid deprivation and the regulatory mechanisms of mirna in autophagy [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, **32**(9): 38-43.
- [36] Zhu Y Q. A study on the signaling pathway through which leucine regulates autophagy [D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2010: 6-7. [朱娅琴. 亮氨酸调节自噬的信号通路研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 6-7.]
- [37] Son S M, Park S J, Stamatakou E, *et al.* Leucine regulates autophagy via acetylation of the mTORC1 component raptor [J]. *Nature Communications*, 2020, **11**(1): 3148.
- [38] Zheng Z, Yan G, Li X, *et al.* Lysine crotonylation regulates leucine-deprivation-induced autophagy by a 14-3-3epsilon-PPM1B axis [J]. *Cell reports*, 2022, **41**(12): 111850.

- [39] HU C, LI F, DUAN Y, *et al.* Dietary supplementation with leucine or in combination with arginine decreases body fat weight and alters gut microbiota composition in finishing pigs [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019(10): 1767.
- [40] Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2013, **1833**(8): 1979-1984.
- [41] Lenis Y Y, Elmetwally M A, Maldonado-Estrada J G, *et al.* Physiological importance of polyamines [J]. *Zygote*, 2017, **25**(3): 244-255.

SEMEN SUPPLEMENTED WITH ARGININE AND LEUCINE ON FERTILIZATION AND HATCHING OF HYBRID YELLOW CATFISH (*TACHYSURUS FULVIDRACO*)

ZHOU Quan¹, WANG Jia-Qi¹, YU Gui-Jie¹, WU Jian-Kai², WANG De-Zhong², XIONG Yang¹, GUO Wen-Jie¹, ZHANG Mao-Sen³, TANG Qin¹ and MEI Jie¹

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Kangyu Fisheries Technology Co. Ltd. of Sheyang County, Sheyang 224300, China; 3. Suxiangqin Fisheries Technology Co. Ltd., Taizhou 225300, China)

Abstract: In order to increase the reproductive efficiency of hybrid yellow catfish [*Tachysurus fulvidraco* (♀)×*Tachysurus vachelli* (♂)], the addition of two functional amino acids L-arginine (L-Arg) and L-Leucine (L-Leu) in sperm preservation solution was studied to find out the optimal concentration. The fertilization rate, hatching rate and malformation rate were used as factors to evaluate reproductive efficiency. Results showed that the fertilization rate increased first and then decreased with the fold increase in L-arginine concentration, and all of them were significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). The highest fertilization rate was found in the 0.50 mmol/L concentration group, but there was no significant influence on the hatching rate and malformation rate ($P>0.05$). As the increasing of L-leucine concentration, the fertilization rate and hatching rate increased first and then decreased, while the malformation rate decreased and then increased, with the highest fertilization rate, the highest hatching rate and the lowest malformation rate in the 0.80 mmol/L concentration group, and all three evaluation factors were significantly improved in values when compared with the control group ($P<0.05$). We also tried to add the two amino acids simultaneously, at the concentrations of 0.4 and 1.0 mmol/L for L-arginine and L-leucine, respectively. We found that the fertilization rate, hatching rate and malformation rate were significantly improved ($P<0.05$). Besides, we examined sperm motility using a computer-assisted sperm analysis system (CASA), the results indicated that the addition of 0.4 mmol/L arginine and 1.0 mmol/L leucine, alone or simultaneously, significantly promoted sperm motility ($P<0.05$). Finally, an improved hatching bucket of *Tachysurus fulvidraco* was developed. It was proved to be more suitable for artificial breeding with the fertilization rate and hatching rate significantly higher than those of the traditional hatching bucket, by 12.13% and 20.76%, respectively ($P<0.05$), with the malformation rate significantly lower than the traditional hatching bucket (reduction of 6.42%; $P<0.05$). This study established a more efficient and convenient method for the artificial breeding of hybrid yellow catfish, which will help to promote the new species and accelerate the industrial development process.

Key words: L-Arginine; L-leucine; Fertilization; Hatching; *Tachysurus fulvidraco*; *Tachysurus vachelli*; *Tachysurus fulvidraco*(♀)×*Tachysurus vachelli*(♂)