

大黄鱼精液的高效超低温保存

肖志忠¹, 陈雄芳², 丁福红^{1, 3}, 刘清华^{1, 3}, 徐世宏¹, 李军¹

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生物技术研究发展中心, 山东青岛 266071; 2. 重庆邮电学院, 重庆 400065; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:采用 2 mL 的冷存管和程序降温仪高效超低温保存大黄鱼 (*Pseudosciaena croce*) 精液。分析比较了 5 种不同浓度抗冻剂(二甲基亚砷、乙二醇、丙二醇和甘油和甲醇)、3 种降温速率(10、20 和 30 /min)和 2 种解冻温度(28 和 43)对大黄鱼精液超低温保存效果的影响。实验结果表明,采用 Hanks 液作为稀释液,10%~20%甘油或 10% DMSO 作为抗冻剂,20 /min 的降温速率对精液进行超低温保存 43 水浴解冻,冻精激活后获得理想的运动率(76.6% ±11.4%~80.0% ±12.6%) ,而且对 10%甘油保存的冻精进行人工授精实验获得了与新鲜精液相似的受精率和孵化率。

关键词:超低温保存;抗冻剂;大黄鱼 (*Pseudosciaena croce*);精液;运动率;受精率
中图分类号:Q25 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2007)04-0001-04

鱼类精液的超低温保存在水产养殖、遗传育种以及种质资源保存中具有重要的意义。鱼类精液的超低温保存可以使种质的长距离运输得以实现,同时有利于鱼类的杂交、选育、优良形状的获得以及基因多样性的保护^[1,2]。中国随着海水养殖业发展的迫切需要以及对海洋种质资源保护的认识,海洋鱼类精液的超低温保存取得了巨大的进展,对于一些具有较高的经济价值的鱼类的精液如真鲷^[3,4]、黑鲷^[5]、大菱鲆^[6]和牙鲆^[7],进行了成功的超低温保存研究。

大黄鱼 (*Pseudosciaena croce*) 原为中国海洋经济鱼类四大主要捕捞对象之一,在中国及太平洋西部海洋渔业中具有相当重要的地位。20 世纪 70 年代前后,全国大黄鱼年捕捞量 12 万 t 左右。由于酷渔滥捕,80 年代初资源严重枯竭,大黄鱼甚至处于灭绝的边缘,踪影难觅。因此,建立大黄鱼精液超低温保存的可靠方法对海水养殖业的发展以及生物多样性的保护具有重要意义。

作者采用程序降温法,分析了 5 种抗冻剂,3 种降温速率和 2 种解冻温度对大黄鱼精液超低温保存的影响。通过检测冷冻解冻后精子的运动率、受精率以及孵化率评价冻精质量。本研究目的主要有:(1) 利用程序降温法建立高效超低温保存大黄鱼精液的方法;(2) 分析比较精液超低温保存中不同的影响因子对大黄鱼精液超低温保存的影响。

1 材料与方法

健康、自然成熟的大黄鱼(0.4~0.7 kg,2~3 龄),暂养于福建养殖场,解剖雄鱼取精巢。收集的精液立即进行镜检,显微镜下观察计算精子的运动率,运动率高于 80% 的精液,带回实验室用于实验。采用压雌鱼腹部的方法收集卵子,镜检观察卵子的颜色形态来鉴别卵子的质量,每次人工授精实验所用卵子均取自同一条雌鱼。

1.1 抗冻剂的筛选

将精液与 Hanks 液(NaCl,8.01 g/L;KCl,0.40 g/L;CaCl₂,0.14 g/L;NaHCO₃,0.35 g/L;KH₂PO₄,0.06 g/L;MgCl₂·6H₂O,0.10 g/L;MgSO₄·7H₂O,0.10 g/L;Na₂HPO₄·2H₂O,0.06 g/L;Glucose,10.00 g/L;pH,6.80) 稀释的不同种类不同浓度的抗冻剂:二甲基亚砷(DMSO)、乙二醇(EG)、丙二醇(PG)、甘油(Gly)、甲醇(Meth)以 1:3(V/V)的比例混合后,置于

收稿日期:2005-08-08;修回日期:2007-01-18

基金项目:国家 863 计划项目(2001AA621100,2003AA603510,2004AA603310)

作者简介:肖志忠(1968-),男,山东潍坊人,副研究员,主要从事海水鱼类繁育及低温生物学方面研究,电话:0532-82898718;李军,通讯作者,E-mail:junli@ms.qdio.ac.cn

程序降温仪中,平衡 10 min,以 20 /min 的速度降至 - 80 并停留 2 min,然后以 20 /min 的速度降至 - 180 ,转入液氮保存。保存 10 h 后 43 水浴解冻,计算运动率。每个实验均重复 3 次。

表 1 降温程序

Tab. 1 Freezing profiles

试验组	降温程序			
	第一步	第二步	第三步	第四步
0	平衡 10 min	0 ~ - 80 ,10 /min	- 80 平衡 2 min	- 80 ~ - 180 ,10 /min
0	平衡 10 min	0 ~ - 80 ,20 /min	- 80 平衡 2 min	- 80 ~ - 180 ,20 /min
0	平衡 10 min	0 ~ - 80 ,30 /min	- 80 平衡 2 min	- 80 ~ - 180 ,30 /min

1.3 解冻方法

将精液与 Hanks 液稀释的不同种类的抗冻剂以 1 : 3 的比例混合后,置于程序降温仪中,平衡 10 min,然后以 20 /min 的速度降至 - 80 并停留 2 min,然后以 20 /min 的速度降至 - 180 最后快速转入液氮中进行超低温保存。保存 10 h 后分别以 28 和 43 水浴解冻,计算运动率。每个实验均重复 3 次。

1.4 人工授精标准化及冻精人工授精

冻精人工授精实验前首先进行精卵比的优化和标准化实验。分别以 200 000 : 1,100 000 : 1,80 000 : 1,40 000 : 1,20 000 : 1 的精卵比例对鲜精进行人工授精,以确定最佳精卵比进行冻精的人工授精实验。每个实验均重复 3 次。对筛选出的最佳稀释比例、降温速率、抗冻剂的成分、解冻温度保存的冻精,以最适精卵比进行人工授精试验。每个实验均重复 3 次。

1.5 统计分析

本实验数据均用 SPSS11.0 软件进行分析(SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA)。实验数据均以平均数 ± 标准差表示,均数的比较采用 *t* 检验或 One-Way ANOVA 分析法,差异显著性分析采用 Student-Newman-Keuls test (SNK) 法,实验数据标有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2 结果

2.1 抗冻剂对冻精运动率的影响

抗冻剂对冻精运动率的影响如表 2 所示,10%, 20% Gly,以及 10% DMSO 保存的冻精获得了理想

1.2 降温速率的筛选

将精液与 Hanks 稀释的 10% Gly 以 1 : 3 的比例混合后,置于程序降温仪中,以不同的降温速率进行冷冻处理(表 1),然后保存于液氮中,10 h 后 43 水浴解冻计算运动率。每个实验均重复 3 次。

的运动率并且与鲜精的运动率差异不显著 ($P > 0.5$),其次为 10% EG、30% Gly 保存的精液,而 10% ~ 0% PG 以及 10% ~ 30% Meth 保存的冻精的运动率较差。

表 2 不同抗冻剂对冻精运动率的影响

Tab. 2 Effect of different cryoprotectants on post-thaw sperm motility

抗冻剂	抗冻剂体积分数 (%)	精子运动率 (%)
对照	-	82.7 ± 5.8 e
	10	76.6 ± 11.4 e
	30	47.5 ± 9.7 a
DMSO	10	62.1 ± 3.4 cd
	20	58.2 ± 6.8 cd
	30	47.5 ± 9.7 a
EG	10	62.1 ± 3.4 cd
	20	58.6 ± 9.1 cd
	30	59.1 ± 6.0 cd
Gly	10	80.0 ± 12.6 e
	20	77.0 ± 5.2 e
	30	67.5 ± 11.7 d
PG	10	50.7 ± 7.4 ab
	20	49.6 ± 2.8 ab
	30	43.6 ± 4.2 a
Meth	10	58.9 ± 6.5 c
	20	51.1 ± 3.4 b
	30	47.2 ± 8.1 a

注:平均值后标有相同的字母表示差异不显著 ($P > 0.05, n = 3$)

2.2 降温速率对冻精运动率的影响

降温速率对冻精运动率的影响如图 1 所示,以

10 /min (82.3% ± 6.7%) 和 20 /min (89.7% ± 17.5%) 的降温速率保存的冻精获得了较好的运动率, 而以 30 /min 的降温速率保存的冻精运动率显著下降 (55.9% ± 3.3%, $P < 0.05$)。

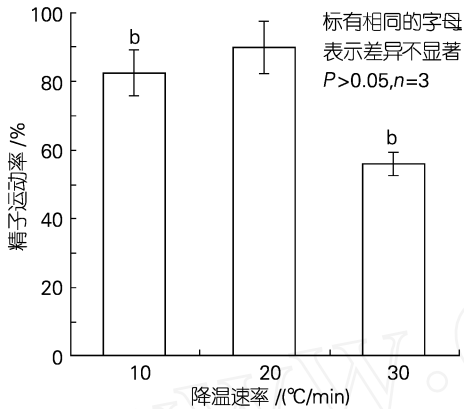


图1 降温速率对冻精运动率的影响

Fig. 1 Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility

2.3 解冻温度对精子运动率的影响

解冻温度对精子运动率的影响。43 (82.4% ± 8.1%) 水浴解冻获得的冻精的运动率显著高于 28 解冻获得的运动率 (70.8% ± 2.9%, $P < 0.05$)。

2.4 人工授精精卵比的标准化

精卵比对受精率的影响如图 2 所示, 当精卵比高于 80 000 : 1 (包括 80 000 : 1) 时受精率均高于 50%, 而当精卵比降至 40 000 : 1 时, 受精率迅速下降至 35.4% ± 6.4% ($P < 0.05$)。

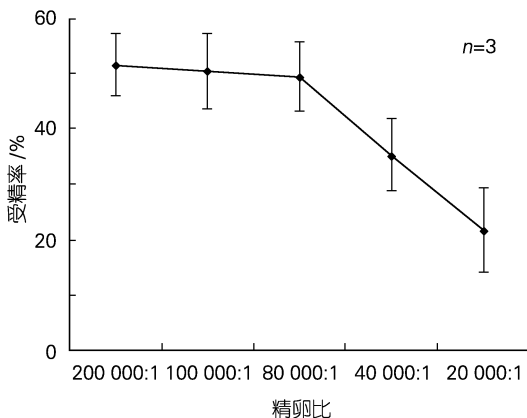


图2 精卵比对受精率的影响

Fig. 2 Effect of sperm to egg ratio on fertilization rates

2.5 冻精人工授精试验

冻精人工授精实验结果如图 3 所示, 以最佳冷冻、解冻方法超低温保存的冻精其受精率为 52.8% ±

7.0%, 孵化率为 47.6% ± 6.6%。鲜精的受精率、孵化率分别为 56.3% ± 2.7%, 50.8% ± 8.8%。

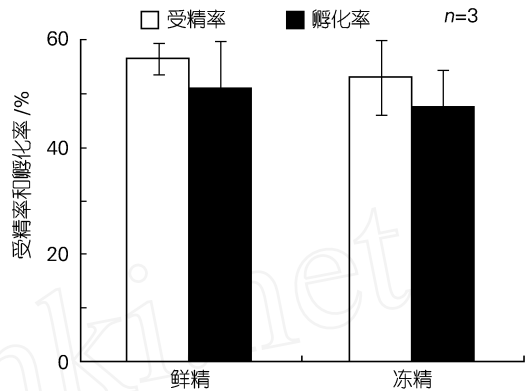


图3 鲜精与冻精的受精率和孵化率

Fig. 3 Fertilization and hatching rates of fresh and post-thaw sperm

3 讨论

不同的抗冻剂对不同种鱼的精液保护作用差异很大。甘油常用于牙鲆^[6]以及一些淡水鱼类精液的超低温保存^[9,10]获得了很好的效果, 但是在美洲拟鲈^[11]精液超低温保存中得到的冻精的活动率较低。作者在大黄鱼的精液超低温保存中发现 10% 和 20% 甘油表现出最佳的保存效果, 类似的结果在林丹军和尤永隆^[12]直接投氮法超低温保存的大黄鱼精液实验中被报道。DMSO 是鱼类精液超低温保存应用最广泛的一种抗冻剂, 5% ~ 20% DMSO 在许多海水鱼类精液的超低温保存中都取得了令人满意的效果, 例如, 黄鳍鲷^[13], 细须石首鱼^[14] 和大菱鲆^[6,15]。在大黄鱼精液超低温保存中 10% DMSO 也表现出较好的保护效果。但是大黄鱼精液以 EG, PG 作为保护剂冷冻的精液其运动率一般。然而 PG, EG 对细须石首鱼^[14]、黄鳍鲷^[13] 精液的超低温保存取得了理想的运动率和受精率。对于甲醇许多文献报道其对海水鱼类精液超低温保存效果极差, 例如, 大菱鲆。Meth 对海洋鱼类精液较差的保护作用在大黄鱼精液的超低温保存中再一次得到了证实。一些研究者认为抗冻剂种类以及浓度对精子的保护效果具有较强的鱼种的特异性, 因此适宜抗冻剂及其浓度的选择是鱼类精液成功保存的关键环节。

降温速率和解冻温度对鱼类精液的超低温保存

有重要作用。对于大黄鱼精液,降温速率 10 /min 或 30 /min 对冷冻解冻后的精液活动率没有明显的影响,相比较而言 30 /min 的降温速率冷冻的精液的活动率出现下降。解冻方式也是影响冻精解冻后质量的一个重要的因子,快速解冻对防止冻精在解冻过程中遭受重结晶损伤极为重要。在大黄鱼精液超低温保存中作者发现 43 水浴解冻其运动率明显地高于 28 水浴解冻,然而在另一大黄鱼精液冷冻保存实验中林丹军和尤永隆^[12]却发现室温解冻要优于 38~40 水浴解冻。有文献报道解冻温度的选择应取决于降温速率以及样品投氮的温度^[16]。

作者首次采用 2 mL 冷存管程序降温法成功地超低温保存大黄鱼精液,获得了较为理想的保存效果,冻精的活动率和受精率均接近于新鲜精液的水平。通过实验建立了大黄鱼精液高效、系统、完整的超低温保存方法。大黄鱼精液超低温保存方法的建立对于海洋鱼类精子库的建立,以及种质资源的保存和生物多样性的保护具有重要意义。

致谢:感谢集美水产大学陈学豪、周立红老师给予本实验无私的帮助。

参考文献:

[1] Gwo J C, Ohta H, Okuzawa K, *et al.* Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) [J]. **Theriogenology**, 1999, 51:569-582.

[2] Tiersch T R, Figiuel C R, Jr W R, *et al.* Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker [A]. Tiersch T R, Mazik P M. Cryopreservation in aquatic species [C]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 2000. 117-122.

[3] Liu Q H, Li J, Zhang S C, *et al.* An efficient methodology of spermatozoa cryopreservation with 2-mL cryovials in red seabream *Pagrosomus major* [J]. **Journal of the World Aquaculture Society**, 2006, 37:289-297.

[4] 李纯,李军,薛钦昭. 真鲷精液超低温保存研究[J]. 海洋科学, 2001, 12:6-8.

[5] 李纯,李军,薛钦昭. 黑鲷精液超低温保存研究[J]. 海

洋科学, 2001, 11:1-4.

[6] Chen S L, Ji X S, Yu G C, *et al.* Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization [J]. **Aquaculture**, 2004, 236:547-556.

[7] Zhang Y Z, Zhang S C, Liu X Z, *et al.* Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology [J]. **Theriogenology**, 2003, 60:989-996.

[8] 洪万树,张其永,许胜发,等. 花鲈精子生理特性及其精液超低温冷冻保存[J]. 海洋学报,1996,18:97-104.

[9] Linhart O, Billard R, Proteau J P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa [J]. **Aquaculture**, 1993, 115:347-359.

[10] Young J A, Capra M F, Blackshaw A W. Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliata*) spermatozoa [J]. **Aquaculture**, 1992, 102:155-160.

[11] Rideout R M, Litvak M K, Trippel E A. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents [J]. **Aquaculture**, 2003, 34:653-659.

[12] 林丹军,尤永隆. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存[J]. 热带海洋学报, 2002, 21: 69-75.

[13] Gwo J C. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (teleost, perciformes, sparides) [J]. **Theriogenology**, 1994. 41:989-1004.

[14] Gwo J C, Strawn K, Longnecker M T, *et al.* Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa [J]. **Aquaculture**, 1991, 94:355-375.

[15] Dr anno C, Suquet M, Quemener L, *et al.* Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa [J]. **Theriogenology**, 1997, 48:589-603.

[16] Denniston R S, Michelet S, Godke R A. Principles of Cryopreservation [A]. Tiersch T R, Mazik P M. Cryopreservation in aquatic species [C]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 2000. 59-74.

An efficient methodology of sperm cryopreservation of large yellow croaker (*Pseudosciaena croce*)

XIAO Zhi-zhong¹, CHEN Xiong-fang², DING Fu-hong^{1,3}, LIU Qing-hua^{1,3}, XU Shi-hong¹, LI Jun¹

(1. Center of Marine Biotechnology Research & Department, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Chongqing College of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received : Aug. ,8, 2005

Key words : cryopreservation; cryoprotectant; large yellow croaker (*Pseudosciaena croce*); sperm; motility; fertility

Abstract : In the present study, a great deal of yellow croaker (*Pseudosciaena croce*) sperm were efficiently cryopreserved in 2 mL cryovials by using a programmable freezer. The motility and fertility of both fresh and post-thaw sperm were investigated in order to optimize the spermatozoa cryopreservation protocols for red large yellow croaker. Five cryoprotectants with different concentrations, three cooling rates (10, 20 and 30 / min) from 0 °C to -180 as well as two thawing temperatures (28 and 43) were designed and tested in the sperm cryopreservation, and their effects on post-thaw sperm motility were studied. Optimal post-thaw motility (76.6 % ±11.4 % ~ 80.0 % ±12.6 %) was achieved when using Hanks' supplemented with 10 % to 20 % glycerol or 10 % dimethyl sulfoxide in combination with 20 / min cooling rate, and thawing in 43 water bath. Furthermore, optimal fertilization rate of sperm frozen with 10 % glycerol and hatching rate were obtained, which were similar to those of fresh sperm.

(本文编辑 : 刘珊珊)