

超低温保存时间与抗冻剂浓度对真鲷精子质量的影响

史雪辉¹, 李 军²

(1. 青岛农业大学 山东 青岛 266109; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 研究了不同浓度的抗冻剂二甲基亚砜(DMSO)和不同保存时间对真鲷(*Pagrus major*)冻精质量的影响。试验结果表明, DMSO 体积分数和保存时间对冻精的受精率、孵化率影响显著。15% 二甲基亚砜作为抗冻剂保存 10~ 60 d 的冻精受精率、孵化率与鲜精无差异, 而保存 360 d 的冻精受精率、孵化率开始出现下降。12%, 18%, 21% DMSO 保存 60 d 的冻精受精率差异不显著, 均高于 90%, 而对于保存 360 d 的冻精受精率、孵化率均显著地降低。

关键词: 真鲷(*Pagrus major*); 超低温保存; 抗冻剂浓度; 二甲基亚砜(DMSO); 保存时间; 受精率

中图分类号: Q25 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)08-0085-03

自从 50 年前 Blaxter 成功冷冻保存大西洋鲱鱼(*Clupea harengus*) 精巢以来, 鱼类精液的超低温保存研究取得了巨大的成就^[1]。鱼类精液的超低温保存在鱼类养殖、遗传育种及种质资源的保护与保存中具有重要的意义, 而且鱼类精液冷冻库的建立可以为水产养殖业和试验生物学研究长期稳定地提供种质材料^[2]。目前已经有 200 多种淡水鱼类的精液, 40 多种海水鱼类的精液成功地获得了保存^[3, 4]。

一般认为保存时间长短对精子的活力无显著影响, 精子在液氮(-196℃)超低温条件下, 新陈代谢处于休眠状态, 从理论上说保存时间对精液的质量没有影响, 精液可以被保存 200~ 32 000 a^[5]。目前在鱼类精液超低温保存方法的研究中, 大部分试验是短期保存, 一般保存几个小时或者几周的时间, 然后解冻进行质量检测。作者在真鲷(*Pagrus major*)精液超低温保存过程中发现保存时间以及抗冻剂的浓度对冻精质量有一定的影响。为此, 本实验检测了超低温保存时间以及抗冻剂浓度对真鲷冻精质量的影响。

1 材料与方法

1.1 配子的采集

采用人工挤压鱼的腹部的方法采取精液, 操作前雄鱼首先麻醉, 将鱼体洗净擦干, 轻轻挤压腹部采集精液。操作过程中注意海水、粪便、尿液等的污染。收集的精液立即进行镜检, 运动率高于 85% 的精液, 置于 0~ 4℃ 保温箱中带回实验室。当雌鱼即将排卵

时轻轻挤压雌鱼腹部收集卵子, 镜检观察卵子的颜色形态来鉴别卵子的质量。

1.2 精液超低温保存

精液超低温保存详细的步骤参照文献[6]。从 3 条成熟的雄鱼中采集精液大约 30 mL, 精液与不同体积分数的二甲基亚砜(Cortland+ DMSO)以 1: 3 的体积混合, 将混合液吸冷存管中, 置于程序降温仪中, 0℃ 平衡 5 min, 然后以 20℃/min 的速度从 0℃ 降到 -150℃, 然后快速从腔体取出样品投入到液氮容器中。样品在液氮容器中经不同时间保存后, 从液氮容器中取出迅速浸入到 40℃ 水浴锅中, 水浴解冻, 进行冻精运动活力和受精率的检测。

1.3 人工授精实验

冻精人工授精采用 500: 1 作为标准化的精卵比进行冻精的人工授精实验。对不同体积分数的 DMSO 保存不同时间的精液进行人工授精试验。具体操作步骤参考文献[6]。

收稿日期: 2007-04-13; 修回日期: 2007-06-01

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

作者简介: 史雪辉(1979), 男, 山东莱州人, 学士, 主要从事海洋鱼类繁育方向研究; 李军, 通讯作者, 电话: 0532-82898718, 传真: 0532-82898718, E-mail: junli@ms.qdio.ac.cn

1.4 统计分析

本实验数据均用 SPSS 11.0 软件进行分析 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA)。实验数据均以平均数±SD 表示, 均数的比较采用 One Way ANOVA 分析法, 差异显著性分析采用 SNK (Student New mar Keuls' test) 法。

2 结果与讨论

2.1 超低温保存时间对受精率和孵化率的影响

15% DMSO 超低温保存的精液保存 10, 30, 60, 360 d 受精率、孵化率参见图 1。

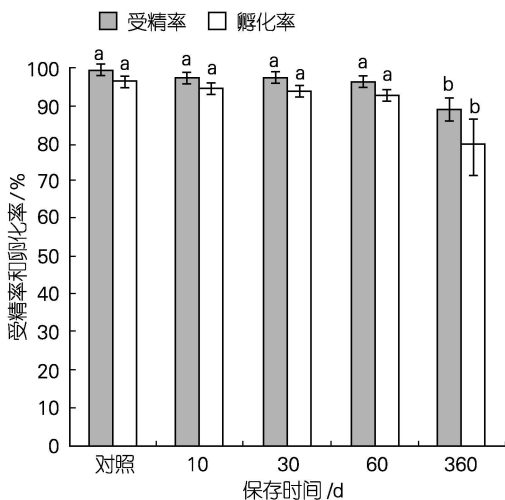


图 1 保存时间对冻精受精率和孵化率的影响

Fig. 1 Effect of storage time on fertilization rate and hatchability rate

保存 10, 30, 60 d 冻精受精率、孵化率差异不显著; 而保存 360 d 冻精受精率 (88.6%±3.0%)、孵化率 (79.2%±7.4%) 出现下降。由此可见, 冻精的保存时间对精子的质量是有影响的。真鲷精液短时间内超低温保存对其质量的影响不显著, 但随着时间的延长冻精的受精率和孵化率都明显地降低。

2.2 DMSO 的体积分数和保存时间对受精率的影响

12%~21% DMSO 保存 60 d 和 360 d 的精液的受精率见图 2。12%~21% DMSO 保存 60 d 的冻精

受精率差异不显著, 均高于 90%, 而保存 360 d 的精液受精率差异极为显著 ($P < 0.05$), 15% DMSO 保存的精液受精率显著地高于其它体积分数, 其次为 12% DMSO, 18% DMSO, 而 21% DMSO 保存的精液的受精率极低。DMSO 的体积分数对于保存 60 d 冻精的受精率的影响不显著 ($P > 0.05$), 然而对保存 360 d 的精液的受精率的影响极为显著, 而且体积分数越高对冻精的损伤越严重。

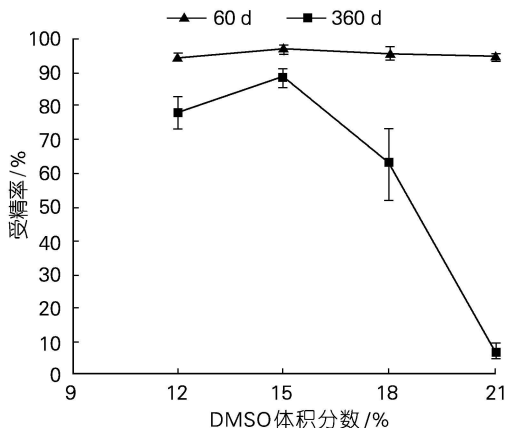


图 2 DMSO 体积分数和保存时间对冻精受精率的影响

Fig. 2 Effects of DMSO concentration and cryopreservation time on post-thaw sperm fertilization rate

2.3 DMSO 体积分数对保存 360 d 精子受精率和孵化率的影响

12%~21% DMSO 保存 360 d 的冻精受精率、孵化率参见图 3。DMSO 的体积分数对保存 360 d 的冻精的受精率和孵化率影响显著 ($P < 0.05$)。15% DMSO 保存的冻精受精率、孵化率最高分别为: 88.6%±3.0%, 79.4%±7.2%, 其次为 12% DMSO 保存的冻精, 受精率、孵化率分别为: 78.1%±4.9%, 67.1%±7.9%; 18% DMSO 保存的精液虽然受精率为 62.9%±10.8%, 然而孵化率却较低 25.9%±2.5%; 21% DMSO 保存的冻液受精率和孵化率都极低, 分别为: 7.0%±1.9%, 3.3%±0.8%。保存 360 d 的冻精受精率和孵化率受 DMSO 体积分数的影响显著 ($P < 0.05$), 12%~21% DMSO 保存 360 d 后的精液的受精率都出现显著的下降, 其中高体积分数的 DMSO (18%, 21%) 对冻精损伤更为严重。

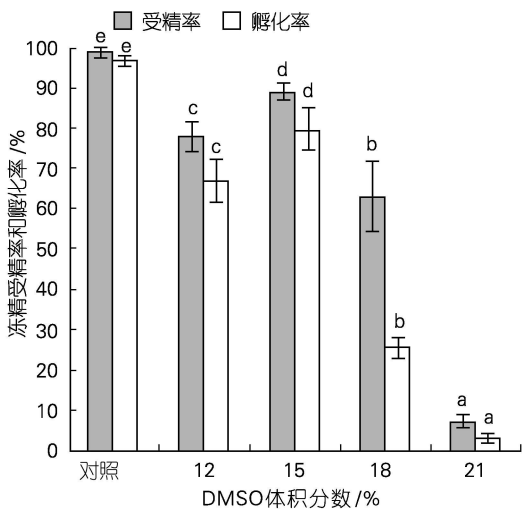


图3 DMSO 体积分数对保存 360 d 的冻精受精率和孵化率的影响

Fig. 2 Effect of DMSO concentration on fertilization rate of postthaw sperm cryopreserved for 360 d

从实验结果可以看出, 保存时间会明显地影响鱼类精液超低温保存的效果。精液经过某些抗冻剂短时间保存效果并不能代表其长时间保存的效果。鱼类精液的超低温保存时间对精子质量影响的相关研究较少, 一般实验都是进行短时间的保存。本实验发现真鲷精液超低温保存 2 个月内其受精率和孵化率与鲜精的差异不显著, 然而保存 1a 后其受精率、孵化率明显降低。同时作者发现冻精的质量还受到抗冻剂浓度的影响, 短期内高体积分数的抗冻剂保存的精液其受精率、孵化率与鲜精的差异并不明显, 但长期保存会显著地降低冻精的受精率和孵化率。在条纹鲈鱼(*Morone chrysops*) 精液的超低温保存^[7]中也发现长时间的保存会降低冻精的授精能力。但是在其它鱼类的精液超低温保存中还没有报道。Suquet 等^[8]报道大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) 精液保存 9 个月, 冻精的受精力、存活率都与鲜精差异不显著。保存 1 年的大黄鱼精液其受精率、孵化率与鲜精相近^[9]。或许由于保存条件的限制目前还未对保存的精液进行长时间跟踪研究的报道。对于真鲷精液超低温保存, 由于条件的限制, 本试验对真鲷精液超低温保存的最长时间为 1 年, 而且在 1 年中不能排

除由于多次从液氮管内存取冷存管等人为操作的影响, 因此有关鱼类精液长期超低温保存与冻精质量的相关性有待于近一步的探索研究。

参考文献:

[1] Blaxter J H S. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring [J]. **Nature**, 1953, 172: 1 189-1 190.

[2] Lubzens E, Daube N, Pekarsky I, et al. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks- Strategies in research and application. [J] **Aquaculture**, 1997, 155: 13-30.

[3] Gwo J C. Cryopreservation of sperm of some marine fishes[A]. Tiersch T R, Mazik P M. Cryopreservation in Aquatic species[C]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 2000. 138-160.

[4] Li J, Liu QH, Zhang S C. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation [J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 2006, 24: 370-377.

[5] AshwoodSmith M J. Low temperature preservation of cells, tissues and organs[A]. AshwoodSmith M J, Farrant J. Low temperature preservation in medicine and biology [C]. Turnbridge Well: Pitman Medical Ltd, 1980. 19-44.

[6] Liu Q H, Li J, Shi C Z, et al. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2 mL Cryovials[J]. **Journal of the World Aquaculture Society**, 2006, 37: 289-296.

[7] Kerby J H. Cryogenic preservation of sperm from striped bass [J]. **Transactions of the American Fisheries Society**, 1983, 112: 86-94.

[8] Suquet M, Dranno C, Petton, B, et al. Long term effect of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa [J]. **Aquatic Living Resources**, 1998, 11: 45-48.

[9] 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.

(下转第 96 页)

The effect of storage time and cryoprotectant concentration on sperm quality of red seabream (*Pagrus major*)

SHI Xuehui¹, LI Jun²

(1. Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 2. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Apr., 3. 2007

Key words: red seabream (*Pagrus major*); cryopreservation; cryoprotectant concentration; DMSO; storage time; fertilization capacity

Abstract: The present study focused on the effects of the storage time and cryoprotectant concentration on the post thaw sperm quality in red seabream (*Pagrus major*). The results demonstrate that cryoprotectant concentration and storage time could significantly influence the fertilization and hatching rates of post thaw sperm. The fertilization capability of the post thaw sperm cryopreserved with 15% DMSO for 360 d began to decrease; however, no significant difference was found among 10~ 60 d cryopreserved sperm. No significant differences were found among 12% ~ 21% DMSO cryopreserved sperm for 60 d in fertilization capacity, and the fertilization rate was higher than 90%; however, the fertilization capacities of 12%, 18%, 21% DMSO cryopreserved for 360 d were reduced significantly. The effects of the storage time, and cryoprotectant concentration, and their interaction still need further study.

(本文编辑:刘珊珊)