

点带石斑鱼的精子活力及超低温冷冻前后精子超微结构的比较

王小刚^{1,2,3}, 骆 剑², 尹绍武¹, 朱晓平², 胡 静²

(1. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210023; 2. 海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228; 3. 海南省农业干部学校, 海南 海口 571100)

摘要: 研究了盐度、pH 对点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)精子活力的影响; 同时对超低温冷冻前后点带石斑鱼精子的超微结构进行了比较观察。研究结果表明: (1)该鱼精子活力的适宜盐度范围为 15~35, 盐度为 15 时, 精子寿命最长为 26 min; 最适 pH 值范围为 6.5~8.0, 当 pH 值为 7.5 时, 精子的寿命最长为 4 min; (2)超低温冷冻保存前, 正常的点带石斑鱼精子由头部、中段和尾部 3 部分组成, 精子头部呈球形或近圆形, 直径约 1.8 μm ; 中段不明显, 可见线粒体; 鞭毛细长, 约 15 μm , 尾部主要结构是轴丝, 为典型“9+2”微管结构; (3)超低温冷冻保存后, 点带石斑鱼精子的形态结构损伤明显, 主要表现为质膜褶皱、破裂, 细胞质外漏, 线粒体膨胀破损, 脱落和鞭毛断裂等特征。

关键词: 点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*); 精子; 精子活力; 盐度; pH; 超低温保存; 超微结构

中图分类号: Q31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)02-0070-06

点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)属鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus bloch*)。该鱼具有分布广、生长快、肉质鲜美等特点, 是中国东南沿海重要的名贵海水养殖经济鱼种, 目前已成为南方养殖石斑鱼中数量最大、最普遍的种类^[1-2]。鉴于点带石斑鱼在中国海水增养殖业中的重要经济地位, 有必要建立精子种质保存库, 保存优良的种质资源, 这对点带石斑鱼的遗传改良及石斑鱼增养殖业的可持续发展都具有重要的理论和现实意义。

鱼类精子活力是精液质量的一个重要指标, 也是精液低温冷冻保存、人工授精等研究的基础。精子活动的抑制与激活受到盐度、pH、温度、渗透压、离子浓度、激素及季节变化等因素影响, 这是鱼类精子生理特性与环境适应的结果^[3]。精子超低温冷冻保存已在鱼类种质保存研究领域广泛应用^[4], 但对鱼类精子超低温冷冻保存造成精子结构损伤的研究报道较少^[5-8]。目前, 尚未见点带石斑鱼的精子活力及其超微结构的研究报道。本实验一方面研究盐度和 pH 值对点带石斑鱼精子活力的影响, 另一方面利用电子显微镜技术比较超低温冷冻前后精子超微形态结构的差异, 以期保存点带石斑鱼种质资源、建立点带石斑鱼精子超低温冷冻保存库提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 精子的采集

雄性点带石斑鱼由海南省三亚市红沙港养殖基地提供。在点带石斑鱼繁殖季节(3~9 月)中, 选取健康、无外伤的雄性亲鱼 5 尾(体质量约 6~15 kg, 体长约 0.4~0.6 m)进行实验。亲鱼经麻醉后采用挤压法采集精液, 用干毛巾擦干鱼体生殖孔周围的水分与黏液, 然后轻压腹部, 挤出精液, 用准备好的干净注射器吸取精液置于冰上的 1.5 mL 离心管中。采精过程中要防止海水溅入和避免粪便、尿液污染精液。

1.2 精子活力观察

25 下, 用蒸馏水和氯化钠调节过滤天然海水的盐度, 手持盐度计测定设置盐度梯度为 10、15、20、25、30、35、40, 其中盐度 35 为天然海水; 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠和盐酸溶液调节天然海水的 pH, Starter pH 计测定设置 pH 梯度为 6.5、7.0、7.5、8.0、

收稿日期: 2011-11-01; 修回日期: 2012-03-08

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重点资助项目(2007BAD29B03)

作者简介: 王小刚(1984-), 男, 安徽人, 硕士, 主要从事鱼类种质资源与遗传育种研究, E-mail: x8778@126.com; 尹绍武, 通信作者, 电话: 025-85891840, E-mail: yinshaowu@163.com

8.5、9.0。观察设置的盐度和 pH 各个梯度对点带石斑鱼精子活力与寿命的影响。精子活力观察方法参照文献[9]报道。活力指标分为：(1)快速运动时间：精子自激活开始到约 80%原处颤动前的激烈运动；(2)寿命：精子自激活开始到约 80%停止原处颤动。每个梯度重复 5 次，结果取平均值，采用 Excel 和 spss11.0 软件对数据进行分析。

1.3 电镜样品处理

1.3.1 扫描电镜样品处理

样品加适量 2.5% 戊二醛于 4℃ 固定，经 pH 7.4 磷酸缓冲液冲洗，各级丙酮脱水，醋酸乙戊酯置换后，置于 HITACHI, S-3000N 型扫描电镜观察。

1.3.2 透射电镜样品处理

样品加适量 4% 戊二醛于 4℃ 固定，经 pH 7.4 磷酸缓冲液冲洗，再用 1% 锇酸后固定，各级丙醇脱水，Epon812 树脂包埋，切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色后，置于 JEOL, JEM-1010 透射电镜观察。

1.4 精子超低温冷冻处理

取适量精液置于 1.8 mL 冷冻管中，未加任何抗冻保护液，采用三步法降温保存 2 h 以上，在液氮蒸汽中平衡 10 min 后，直接置于 40℃ 水浴中解冻 70 s，将冻精样品按电镜样品方法进行处理后，置于扫描电镜和透射电镜观察冷冻保存后精子结构的变化。

2 结果

2.1 精子活力观察

2.1.1 盐度对点带石斑鱼精子活力的影响

由图 1 可见，盐度 10 时精子不能够激活，盐度从 10 升高到 15 时，精子活力迅速上升，海水盐度在 15~25，其精子活力与寿命差异不明显 ($P>0.05$)。当海水的盐度为 15 时精子活力最强，此时精子的快速

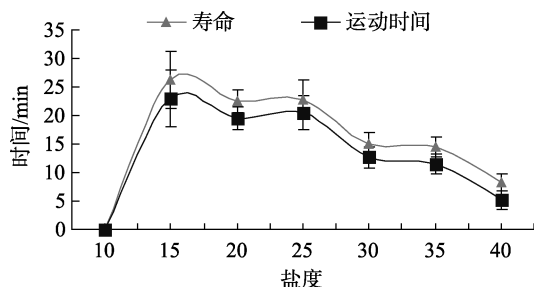


图 1 盐度对点带石斑鱼精子活力的影响

Fig. 1 The effects of salinity value on spermatozoa motility of *E. malabaricus*

运动时间和寿命分别为 23 和 26 min。盐度在 25 上升到 40 时，精子活力与寿命随着盐度升高而缓慢降低，海水盐度为 40 时，其精子活力最低，精子的快速运动时间和寿命分别为 5 和 8 min。认为点带石斑鱼精子活力的适宜盐度范围为 15~35。

2.1.2 pH 对点带石斑鱼精子活力的影响

由图 2 可见，海水的 pH 从 6.5 变化到 8.0 时，精子的快速运动时间和寿命均较长；在 pH 从 7.0 变化到 8.0 时，精子活力与寿命无明显差异 ($P>0.05$)，当 pH 为 7.5 时精子的快速运动时间及寿命最长，分别达到了 2.5 和 4 min；当 pH 从 7.5 变化到 9.0 时，精子活力与寿命随 pH 升高而明显下降，在 pH 为 9.0 时精子活力与寿命最低，精子的快速运动时间和寿命分别为 1 和 1.5 min。可见点带石斑鱼精子活力的适宜 pH 范围为 6.5~8.0。

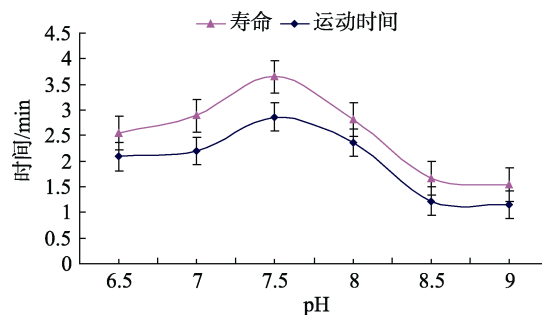


图 2 pH 值对点带石斑鱼精子活力的影响

Fig. 2 The effects of pH value on spermatozoa motility of *E. malabaricus*

2.2 正常精子超微结构

扫描电镜下观察，点带石斑鱼的精子由头部、中段和尾部 3 部分组成。精子头部呈球圆形或近圆形，直径约 1.8 μm；中段不明显，可见线粒体；鞭毛细长，约 15.0 μm (图 3-1~3-2)。

2.2.1 精子头部

点带石斑鱼的精子头部未见顶体 (Acrosome)，主要结构有细胞核 (Nuclear)，外周由双层质膜包围。从精子透射电镜纵切面观察，细胞核呈圆形或卵圆形，占据精子头部的大部分空间，核长径约 1.5 μm。核染色质密集，染色较深。精子头部浓缩细胞核中观察到相对疏松空隙区域，染色较浅部分称为核泡 (Nuclear vacuole)。细胞核膜与质膜的表面不平整，呈波浪状；精子质膜与核膜中间有较大空隙，之间有细胞质及染色浅的囊泡，核后端与中段相连 (图 3-3~3-4)。

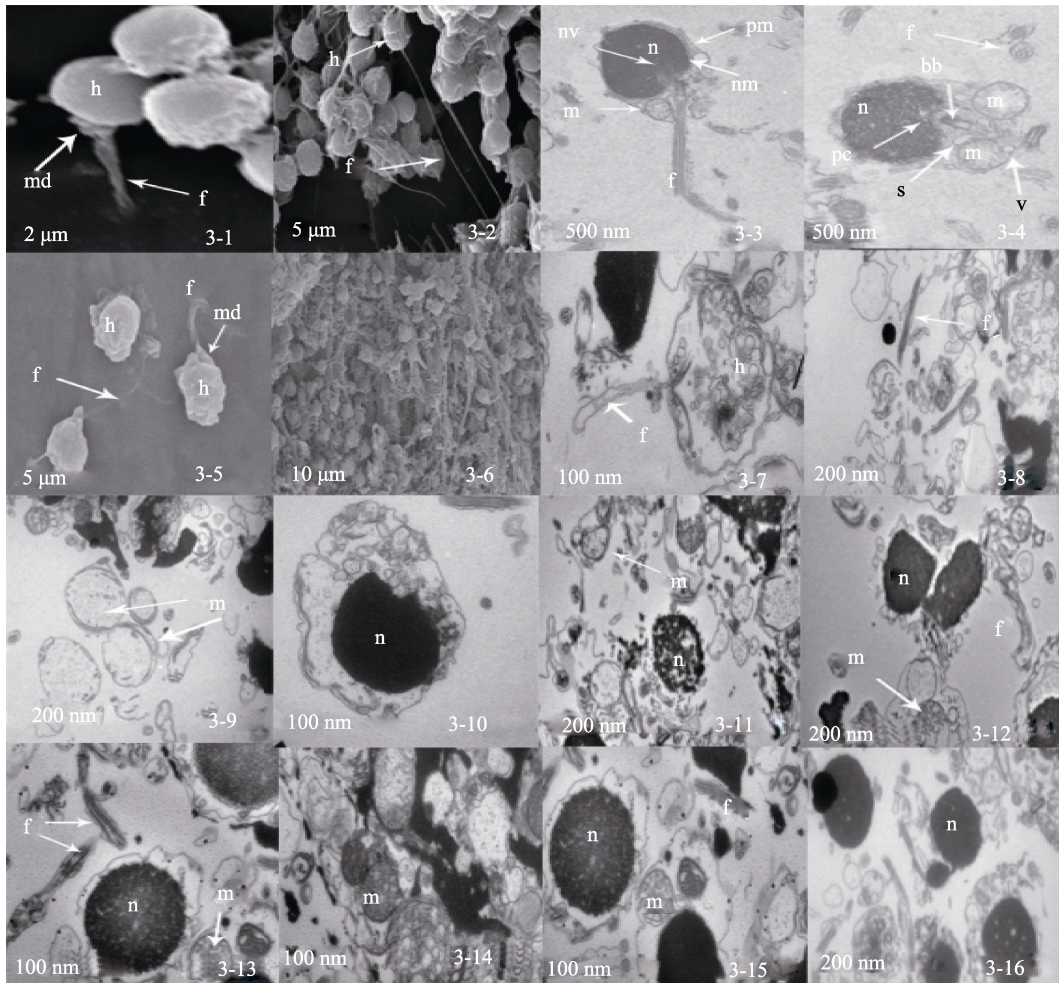


图3 点带石斑鱼精子冷冻前后超微结构

Fig. 3 The ultrastructure of the spermatozoa in *E. malabaricus* before and after the ultra-low temperature cryopreservation 3-1~3-2.正常点带石斑鱼精子扫描电镜图片; 3-3~3-4.正常精子透射电镜图; 3-5~3-6.冻精扫描电镜图片; 3-7~3-8.冻精透射电镜图片。3-1~3-2.示正常精子核、中段、鞭毛形态; 3-3.精子纵切示正常精子形态; 3-4.精子头部纵切示核、近端中心粒、基体、线粒体、袖套腔、囊泡、鞭毛横切示轴丝“9+2”结构; 3-5~3-6.示精子质膜变形,线粒体脱落,尾部断裂; 3-7~3-8.精子纵切示核膜褶皱变形,泡状化,头部破裂,细胞质分散; 3-9~3-16.冻精透射电镜图片, 3-9.精子纵切示线粒体膨胀; 3-10.精子纵切示核膜破裂,质膜泡状化;3-11~3-16.精子纵切示头部破裂,质膜消失,细胞质分散,线粒体膨胀破损,鞭毛纵切示鞭毛断裂; pm.精子细胞质膜; nm.核膜; nv.核泡; pc.近端中心粒; bb.基体; m.线粒体; s.袖套; v.囊泡; f.鞭毛; h.头部; n.细胞核; md.中段
3-1~3-4. Scanning and transmission electron micrograph of normal *E. malabaricus* sperm. Showing the morphology of normal sperm. Longitudinal section of sperm at head and midpiece, Showing proximal centriole, basal body, mitochondria, sleeve, vesicle and flagellum. Cross section of sperm at tail, showing the “9+2” structure of axoneme; 3-5~3-6. Scanning electron micrograph of unthawed damaged sperm. Showing sperm cytoplasmic membrane deformation, mitochondrion lost and tail break off; 3-7~3-8. Transmission electron micrograph of unthawed damaged sperm. Longitudinal section of sperm at head, showing nucleus membrane swelled and folded, head disrupted, cytoplasmic dispersion; Longitudinal section of sperm at midpiece, showing mitochondrion swelled a, disrupted, lost, cytoplasmic dispersion; Longitudinal section of sperm at tail, showing flagellum break off; Pm. cytoplasmic membrane; nm. nucleus membrane; nv. nucleus vacuole; pc. proximal centriole; bb. basal body; m. mitochondria; s. sleeve; v. vesicle; f. flagellum; h. head; n. nucleus; md. midpiece

2.2.2 精子中段

细胞核后端有一个明显凹陷,从核端中央陷入核中,称植入窝(Nuclear fossa)(图 3-3)。中心体复合(Centriolar complex)体位于核小窝内,包括近端中心粒和基体。近端中心粒位于核小窝前端,基体与轴丝连接并发出“9+2”微管结构(图 3-4),是尾部鞭毛的起始点。袖套(Sleeve)位与中段前端,与核后端相连,呈

筒状,中央的空隙部分为袖套腔,袖套两侧不对称,分布有线粒体及囊泡。线粒体排列对称,电镜可观察到 2 个成对的线粒体;线粒体是精子能量储存场所,为精子运动提供能量。线粒体的切面呈圆形或卵圆形,双层膜明显,内膜与外膜之间有间隙存在,由内膜形成的嵴较粗,嵴间隙较狭,基质疏松(图 3-3~3-4)。

2.2.3 精子尾部

尾部鞭毛细长,直径约 0.5 μm ,长度 15.0 μm 以上(图 3-2~3-3)。鞭毛的起始端位于核小窝中的基体并通过袖套腔。尾部的核心结构是轴丝。鞭毛轴丝的切面结构是由 9 组外周二联微管构成,中央有一对微管,即典型的“9+2”结构(图 3-4)。尾部除轴丝之外,无其他明显的结构存在。

2.3 冷冻精子超微结构

扫描电镜下观察,与正常的点带石斑鱼精子形态相比,经超低温冷冻保存后的精子形态不完整及变形严重,精子头部破裂,中段线粒体破裂及脱落,尾部与头部断裂等(图 3-5~3-6)。精子头部表面褶皱不平滑,质膜破损变形,细胞质流失,细胞器分散。核膜破裂及消失,染色质松散甚至解体,头部的囊泡数量多,呈空泡状(图 3-7~3-8,图 3-9~3-11)。精子线粒体的形态结构明显变化,膜膨胀变大破损,线粒体内部电子密度下降,染色较浅,嵴膜破损及内部结构弥散(图 3-12~3-14)。精子鞭毛与头部及中段的断裂和脱离现象明显(图 3-7,3-11),也出现了鞭毛破损的现象(图 3-5,3-7~3-8,图 3-15~3-16)。

3 讨论

3.1 盐度、pH 与鱼类精子活力的关系

鱼类的精子激活所需要的最低盐度与其生长环境的最低适应盐度有关,精子激活条件与其生态习性两者之间变化规律相似,精子活动所需要的最适盐度接近于该物种繁殖时期环境盐度^[10]。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)精子在盐度为 33 时精子活力最强,与产卵期间海水的盐度(28~34.8)相似;在盐度为 10 时未能激活精子,认为可能是斜带石斑鱼精子激活的最低盐度^[9]。黄鳍鲷(*Sparus latus*)、平鲷(*Sparus sarba*)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)和真鲷(*Pagrus major*)精子激活所需的最低盐度分别为 8、10、>8、>10;激活的最适盐度则分别为 21、22、25、25,4 种鲷科精子最适盐度接近与繁殖时期的环境盐度,其盐度是在 21~25 的狭窄范围内^[10]。本实验结果表明,盐度变化对点带石斑鱼精子的快速运动时间和寿命有明显影响。点带石斑鱼精子在 15~35 的盐度范围内具有较强活力,与点带石斑鱼繁殖季节的海水盐度范围相似(30~35);当盐度在 15~25,其精子活力最强,当盐度过高或过低时,精子活力相对减弱或不能激活,在盐度为 10 时不能正常激活精

子。

据文献报道,多数鱼类精浆 pH 偏碱性,介于 7.3~8.5,精子在中性或偏碱性的溶液中活力较高,酸性溶液会降低或抑制精子活力^[3]。pH 对 4 种鲷科(Sparidae)鱼类精子活力影响研究结果表明,4 种鲷科鱼类精子的最适 pH 范围在 7.8~8.8^[11]。如长颌大口鰕虎鱼(*Chasmichthys dolichognathus*)和鲈鱼(*Perca fluviatilis*)的精子在 pH 5.5~10 的缓冲海水溶液中都能运动,而最佳 pH 为 9.0^[3]。本实验显示,pH 变化明显影响点带石斑鱼的精子快速运动时间和寿命。当 pH 从 6.5 变化到 7.5 时,精子的快速运动时间和寿命均较长;而当 pH 从 7.0 变化到 8.0 时,精子活力与寿命无明显差异,可见精子活力与寿命随 pH 高而明显下降。点带石斑鱼精子活力适宜的 pH 范围为 6.5~8.0,与该鱼繁殖季节的海水 pH 范围相近(7.0~8.7)。

3.2 鱼类精子的超微结构

3.2.1 正常精子的超微结构

点带石斑鱼精子形态与多数硬骨鱼一样,由头部、中段和尾部 3 部分构成。精子头部为球形或椭圆形,精子头部主要空间是被细胞核占据,细胞核有染色深、致密的染色质,细胞核后端有植入窝。在透射电镜中清晰观察到,精子中段分布有中心粒复合体,成对出现的线粒体和袖套等结构。精子尾部细长,主要结构为轴丝,由基体末端向袖套外延伸而成,无其他结构存在,轴丝的结构为典型的“9+2”结构。

点带石斑鱼的成熟精子未见顶体结构。据文献报道,硬骨鱼类的精子一般不具有顶体结构^[12]。如大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[6]、斜带石斑鱼^[9]、红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)^[14]等鱼类精子均不具顶体结构。但鲟类的精子形态较特殊,其精子具有顶体结构^[5]。

3.2.2 冻精的超微结构

在超低温冷冻保存过程中,温度变化使精子细胞受到严重损伤,影响精子细胞的复活率。一种是因快速降温,细胞内水分少量渗出,导致细胞内形成冰晶,而造成细胞组织损伤;一种是因慢速降温,细胞内水分大量渗出,使细胞极度脱水而损伤^[14]。

精子经超低温冷冻保存,其损伤主要表现为精子形态结构的变化。在对一些鱼类精子冷冻后超微形态结构变化研究中,发现常见的精子形态异常现象变化包括:精子质膜的变化,如膨胀或破损;其次是核的变化,如核膜消失,染色质解体等;细胞器主

要是线粒体和轴丝的损伤,如线粒体膨胀破损、轴丝断裂等^[5~8,13~14]。本实验可明显观察到,点带石斑鱼精子冷冻保存后,对点带石斑鱼精子产生严重的损伤,从精子的超微形态结构上来看,尤其是在未添加任何冷冻保护的情况下,其损伤特征为细胞膜皱缩、质膜破裂、细胞质外漏、线粒体膨胀破损、脱落和鞭毛断裂等(图 3-5, 3-7~3-8, 图 3-9~3-11)。这些结构的改变会影响精子获能,导致精子活力、授精能力下降和精子死亡。

细胞膜主要结构是由脂类和膜蛋白组成的,其主要功能是为细胞提供一个稳定的内环境及细胞与环境之间物质、能量的交换和信息传递等有着决定性的作用^[15]。降温冷冻过程中对精子细胞膜造成损伤是致命的,破坏细胞膜的选择性渗透机制,这会导致精子细胞功能紊乱。据章龙珍^[5]等研究报道认为,冷冻过程中,精子细胞内形成冰晶,低温使细胞膜相变和膜脂晶格化,对膜形成物理损伤,导致膜蛋白容易从膜上脱落,给细胞造成不可逆的损伤;另外,由于细胞水分在冷冻-复温过程变化及细胞内物质浓度改变,导致细胞内环境稳定性降低,影响复活后的精子活力及受精能力。实验观察到精子受损的膜系统有核膜,质膜,线粒体膜等(图 3-7~3-8, 图 3-9, 3-11)。因此,冷冻保存后的精子活力急剧下降,与精子细胞膜的损伤是密切相关的。

线粒体是精子能量贮存场所,提供激活后精子的运动能量。尾部鞭毛是精子的运动器官,精子激活后,精子运动是依靠尾部鞭毛的摆动来实现。冷冻过程对鱼类精子的线粒体与鞭毛结构造成不同程度的破坏,包括线粒体膨胀变形、脱落消失、鞭毛断裂等现象。不同学者对于这个现象的观点不一样,据章龙珍等^[5]研究报道认为,鞭毛和中段的结合部位发生断裂损伤现象,鞭毛与中段结合处是 2 种不同的细胞骨架结构过渡所在,结合部位间存有脆弱的膜结构,缺少骨架结构连接,因此在冷冻过程中鞭毛与精子中段结合部位容易受到损伤,造成不同程度的脱节、断裂现象。而林丹军等^[6]对大黄鱼的研究报道则认为,该现象可能冷冻—解冻过程中精子头部质膜连同尾部的质膜胀大,同时,轴丝断裂,断裂的轴丝又发生移位的缘故。作者在实验中观察到,冷冻的精子中段的线粒体和尾部轴丝形态结构破损严重,如线粒体膨胀破损、线粒体消失、鞭毛断裂等现象(图 3-5, 3-7, 图 3-10~3-13),作者认同章龙珍等报道的观点。因此,冷冻复温后的精子获能及精子运动能力

下降,与线粒体和鞭毛结构的破损是密切相关的。

参考文献:

- [1] 陈国华, 张本. 点带石斑鱼人工育苗技术[J]. 海洋科学, 2001, 25(1): 1-4.
- [2] 尹绍武, 廖经球, 黄海, 等. 海南近海点带石斑鱼野生和养殖群体微卫星多态分析[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 215-219.
- [3] 邓岳松, 林浩然. 鱼类精子活力研究进展[J]. 生命科学研究, 1999, 3(4): 271-278.
- [4] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [5] 章龙珍, 刘鹏, 庄平, 等. 超低温冷冻对西伯利亚鲟精子形态结构损伤的观察[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 558-565.
- [6] 林丹军, 尤永隆, 陈炳英. 大黄鱼精子冷冻复苏后活力和超微结构的变化[J]. 福建师范大学学报, 2006, 22(3): 71-76.
- [7] Taddei A R, Barbato F, Abelli L, et al. Is cryopreservation a homogeneous process-Ultra-structure and motility of untreated, prefreezing, and post thawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti) [J]. Cryobiology, 2001, 42(4): 244-255.
- [8] He S, Woods L C. Effects of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm [J]. Cryobiology, 2004, 48(3): 254-262.
- [9] 赵会宏, 刘晓春, 林浩然, 等. 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[J]. 中国水产科学, 2003, 10(4): 286-292.
- [10] 江世贵, 李加儿, 区又君, 等. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系[J]. 生态学报, 2000, 20(3): 468-473.
- [11] 黄巧珠, 区又君, 俞达辉, 等. pH 对 4 种鲷鱼精子活力的影响[J]. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(3): 14-16.
- [12] 刘雪珠, 杨万喜. 硬骨鱼类精子超微结构及其研究前景[J]. 东海海洋, 2002, 20(3): 32-37.
- [13] 张轩杰, 张良平, 沈晓勤. 鱼类冷冻精子结构变异的电子显微镜研究[J]. 湖南师范大学学报(自然科学版), 1991, 14(2): 160-164.
- [14] 于海涛, 张秀梅, 陈超, 等. 红鳍东方鱼精子超低温保存前后的超微结构观察[J]. 海洋科学, 2007, 31(2): 17-19, 26.
- [15] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

Investigation of spermatozoa motility of *Epinephelus malabaricus* and comparison of the spermatozoa ultrastructure before and after ultra-low temperature freeze

WANG Xiao-gang^{1,2,3}, LUO Jian², YIN Shao-wu¹, ZHU Xiao-ping², HU Jing²

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2. The Ocean College of Hainan University, Haikou 570228, China; 3. The Agriculture Cadre School of Hainan Province, Haikou 571100, China)

Received: Nov., 1, 2011

Key words: *Epinephelus malabaricus*; spermatozoa; spermatozoa motility; salinity; pH; cryopreservation; ultrastructure

Abstract: The effects of salinity and pH value on spermatozoa motility of *Epinephelus malabaricus* were studied by setting gradients of them respectively. The differences in ultrastructure of the *E. malabaricus* spermatozoa before and after ultra-low temperature cryopreservation were observed and compared. The results are shown as follows: (1) the optimum range of salinity for the spermatozoa motility is 15~35. The longest life span of the spermatozoa is 26 min when salinity is 15. The optimum range of pH value is 6.5~8.0, the longest life span of the spermatozoa is 4 min when pH value is 7.5; (2) Before ultra-low temperature cryopreservation, the normal sperm consists of head, mid-piece and tail. The spermatozoon has a shaped round or ellipse head with diameter about 1.8 μm . The mid-piece is obscure but the mitochondria could be observed. The slender flagellum is about 15 μm . The main structure of tail is axoneme with a typical structure of "9 + 2" model; (3) After ultra-low temperature cryopreservation, the morphological structure of the sperm has been changed obviously. The main damages include membrane crimped, cytoplasm leakage, mitochondria swelling or broken and tail cracked.

(本文编辑: 谭雪静)