

小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)精子的生理特性 及超低温冷冻保存研究*

郑学斌¹ 杜 晨¹ 王景倩¹ 詹 炜² 谢庆平² 楼 宝^{2①} 竺俊全^{1①}

(1. 宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室 宁波 315211; 2. 浙江省农业科学院 杭州 310016)

摘要 为了解养殖小黄鱼精子的生理特性及超低温冷冻保存效果,用计算机辅助精子分析系统(CASA)检测了小黄鱼精子的运动参数及盐度、pH、葡萄糖、离子等环境因子的变化对其精子活力的影响;探究了稀释液、抗冻剂、稀释比及降温高度等对精子冷冻保存效果的影响。结果显示:小黄鱼精液的精子密度为 $(6.92 \pm 1.20) \times 10^9/\text{mL}$ 。精子经自然海水激活后,运动率、运动时间及寿命分别为 $(59.31 \pm 4.85)\%$ 、 $8.44 \pm 0.87\text{min}$ 及 $12.20 \pm 0.50\text{min}$,直线运动速率(VSL)、曲线运动速率(VCL)及平均路径运动速率(VAP)分别为 11.96 ± 5.21 、 25.38 ± 7.19 和 $22.33 \pm 6.88 \mu\text{m/s}$ 。精子运动适宜的盐度范围为25—30、适宜的pH范围为7.5—8.5,精子在盐度25或pH 8.0的海水中活力较好。精子激活效果较好的葡萄糖浓度为0.7—0.9mol/L;浓度0.9mol/L时,精子活力较好。精子激活效果较好的KCl、NaCl、MgCl₂及CaCl₂溶液浓度分别为0.4—0.5、0.4—0.6、0.7—1.0和0.2—0.3mol/L;精子在KCl及CaCl₂溶液中活力相对较差,运动率等参数显著低于对照组;精子在不同人工海水中的运动率显著低于自然海水中的运动率,但精子在单一离子缺陷型人工海水及全人工海水中的运动率无显著差异。以0.25mL麦细管为冻存管,6种稀释液、不同浓度的4种抗冻剂、5种稀释比及5种降温高度对小黄鱼精子冷冻保存效果的影响试验发现,以HBSS液1:3稀释精液,添加10% DMSO及15% PG为抗冻剂,液氮面上3.5cm处降温5min后投入液氮中保存效果较好,冻精解冻后运动率达 $(43.57 \pm 2.59)\%$ 及 $(43.06 \pm 6.77)\%$ 。

关键词 小黄鱼; CASA; 生理特性; 精子冷冻

中图分类号 Q492; Q953; S917 **doi:** 10.11693/hyhz20191000198

精子活力是评价精子质量的重要指标,也是精子生理特性研究的主要内容(季相山等, 2007)。鱼类精子活力受盐度、pH、离子等环境因子的影响,研究精子活力与环境因子的关系,有助于筛选人工授精用激活液及精子冷冻保存用稀释液(Islam *et al*, 2011; Ögretmen *et al*, 2016; 王鑫伟等, 2017)。目前,鱼类精子活力及其影响因子的研究已在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)(朱冬发等, 2005)、黄姑鱼(*Nibea albiflora*)(闫家强等, 2010)、眼斑拟石首鱼(*Csiaenopso cellatus*)(魏平等, 2009)、大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)(洪万树等, 1997)、夏牙鲆

(*Paralichthys dentatus*)(王学颖等, 2016)、真鲷(*Pagrosomus major*)(江世贵等, 2000)、黄鳍鲷(*Sparus latus*)(黄晓荣等, 2008)等海水鱼类中研究报道,研究较多的影响因子有盐度、pH、离子及葡萄糖等。鱼类精子活力检测常用传统的显微观察法,该法主观性较强,易产生人为误差,近年来,计算机辅助精子分析系统(Computer-assisted sperm analysis, CASA)已在鱼类精子活力(运动率、运动速率、鞭打频率等)的检测中得到广泛应用,它可避免传统显微观测方法所造成的人为误差(Kime *et al*, 2001; 刘清华等, 2006; 季相山等, 2007; Kowalski *et al*, 2019)。

* 浙江省科技计划项目, 2017C02013 号。郑学斌, 博士研究生, E-mail: zhengxuebin308@163.com

① 通信作者: 竺俊全, 教授, E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn; 楼 宝, 研究员, E-mail: loubao6577@163.com

收稿日期: 2019-10-29, 收修改稿日期: 2019-11-25

鱼类精子的超低温冷冻保存技术在人工繁殖、遗传育种及种质资源保存等方面具有重要应用价值(Cabrita *et al.*, 2010)。目前, 已取得精子冷冻保存成功的海水鱼类有大黄鱼(程顺等, 2013)、黄姑鱼(金春华等, 2011)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)(叶霆等, 2009)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(Chereguini *et al.*, 2003)、鲮鱼(*Mugil cephalus*)(Balamurugan *et al.*, 2017)、太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)(Wang *et al.*, 2016)、褐石斑鱼(*Epinephelus bruneus*)(Lim *et al.*, 2013)等种类。

小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)属鲈形目、石首鱼科、黄鱼属, 广泛分布于渤海、黄海、东海及朝鲜半岛西岸海区, 曾与大黄鱼、曼氏无针乌贼(*Sepia maindroni*)、带鱼(*Trichiurus japonicus*)并称为我国“四大海产”(李建生等, 2009)。近年来, 小黄鱼自然资源因过度捕捞及水环境污染而衰退, 并出现个体小型化、低龄化及性成熟提前等问题(林龙山等, 2004; 郭旭鹏等, 2006; Liu *et al.*, 2017), 因此, 其种质资源保护、繁殖生物学、人工繁殖及增殖技术研究引起研究者重视, 如性腺发育(吴佩秋, 1981; Lim *et al.*, 2010)、精卵发生(吴佩秋, 1980; Kang *et al.*, 2013)、精子生理特性(Le *et al.*, 2011b)、精子冷冻保存(Le *et al.*, 2011a)、人工育苗及养殖(徐献明等, 2014; 陈睿毅等, 2016)等方面均已见研究报道。但对人工养殖的小黄鱼精子活力及超低温冷冻保存的研究未见报道。本研究检测分析了养殖小黄鱼精子的运动特征及盐度、pH、离子、葡萄糖等环境因子的变化对其精子活力的影响; 探究了稀释液、抗冻剂、稀释比及降温高度等对精子冷冻保存效果的影响, 旨在了解小黄鱼精子的生理特性及超低温冷冻保存效果, 为其人工繁殖及种质细胞保存提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人工培育的性成熟小黄鱼取自浙江省宁波市象山港湾水产苗种有限公司, 挑选成熟度好的雄鱼 60 尾, 体长 13.7 ± 1.13 cm, 体质量 35.38 ± 7.82 g。

1.2 方法

1.2.1 精液的采集 用干毛巾擦净小黄鱼泄殖孔周围体表水分, 轻压鱼腹使精液自然流出, 吸取无污染精液于 4°C 冰盒内保存, 供后续实验。

1.2.2 精子密度测定 取适量精液与 HBSS 稀释液以 1:1000 比例混匀, 滴一滴于血球计数板(计数区

16×25 格, 总体积 0.1 mm^3)上, 加盖玻片后于显微镜下观察并测定精子密度($n=3$)。实验重复 3 次, 下同。

1.2.3 精子运动特征检测 取 $0.5 \mu\text{L}$ 精液, 加入 $500 \mu\text{L}$ 自然海水激活, 并用计算机辅助精子分析系统(CASA)测定激活 20s 后精子的运动率(percentage of motile, MOT, 运动精子占有所有精子的百分率)、直线运动速率(straight line velocity, VSL)、曲线运动速率(curvilinear velocity, VCL)、平均路径运动速率(average path velocity, VAP)、侧摆幅值(amplitude of lateral head displacement, ALH)、鞭打频率(beating cross frequency, BCF)、平均移动角度(mean angular displacement, MAD)等指标(视野数 3, 捕捉精子数 ≥ 200), 并人工记录精子的运动时间(moving time, MT)及寿命(life span, LS)(精子激活开始至 90%精子原地颤动的时间为运动时间, 90%精子停止运动的时间为寿命)。

1.2.4 盐度对精子活力的影响实验 在过滤海水(盐度 27, pH 8.1)中添加蒸馏水或海水晶, 配制成盐度为 5、10、15、20、25、30、35、40 的实验溶液, 检测精子在各实验溶液中的活力(运动率, 运动时间及寿命, 下同)。

1.2.5 pH 对精子活力的影响实验 在过滤海水(盐度 27, pH 8.1)中滴加 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH, 配制成 pH 为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0、11.0 的实验溶液, 检测精子在各实验溶液中活力。

1.2.6 葡萄糖对精子活力的影响实验 在去离子水中添加葡萄糖, 配制成浓度梯度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、 1.0 mol/L 的实验溶液, 检测精子在各实验溶液中的活力。

1.2.7 KCl、NaCl、 MgCl_2 及 CaCl_2 溶液对精子活力的影响实验 在去离子水中添加 NaCl、KCl、 MgCl_2 及 CaCl_2 , 配制成浓度梯度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、 1.0 mol/L 的实验溶液, 检测精子在各实验溶液中的活力。

1.2.8 不同海水对精子活力的影响实验 参考魏平等(2009)方法配制全人工海水(每 1000 mL 人工海水中含 19.29 g NaCl 、 4.24 g MgSO_4 、 0.84 g CaCl_2 、 0.51 g KCl 、 0.12 g NaHCO_3), 并用相同摩尔数的 MgCl_2 、 Na_2SO_4 和 NaCl 依次替换 ASW 中的 CaCl_2 、 MgSO_4 和 NaHCO_3 , 配制成缺 Ca^{2+} 、缺 Mg^{2+} 和缺 HCO_3^- 的人工海水, 检测精子在各实验溶液中的活力。

1.2.9 稀释液种类对冷冻保存效果的影响实验 分别用 MFRS、ASP、Hank's、MPRS、HBSS、Cortland 为稀释液(各稀释液成分见表 1), 稀释比 1:3, 并添加

表 1 小黄鱼精子超低温冷冻保存稀释液的组成成分
Tab.1 Composition of extender for cryopreservation of *L. polyactis* sperm

稀释液	NaCl(g/L)	KCl	CaCl ₂	CaCl ₂ ·2H ₂ O	NaHCO ₃	MgSO ₄ ·7H ₂ O	MgCl ₂
MFRS	13.5	0.6	0.35	—	0.03	—	0.02
ASP	9.92	0.77	0.13	—	—	—	0.05
Hank's	8.01	0.4	0.14	—	0.35	0.1	—
MPRS	3.35	0.39	—	0.166	0.252	—	—
HBSS	8	0.4	—	0.16	0.35	—	—
Cortland	7.25	0.38	0.18	—	1	0.23	—
稀释液	MgCl ₂ ·6H ₂ O	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	NaH ₂ PO ₄	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	葡萄糖	pH
MFRS	—	—	—	—	—	—	7.7
ASP	—	—	—	—	—	0.01	7.6
Hank's	0.1	0.06	0.09	—	—	10	6.8
MPRS	0.299	—	—	0.216	—	10	6.68
HBSS	—	0.06	0.12	—	—	1	7.2
Cortland	—	—	—	—	0.41	1	7.0

注: “—”表示无此成分

10%二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(终浓度,下同)为抗冻剂, 0.25mL 麦细管为冻存管, 用二步降温法于液氮面上 3.5cm 处平衡 5min 后投入液氮中保存, 12h 后取出, 40℃ 水浴解冻 6s 后测定精子活力。

1.2.10 抗冻剂种类及浓度对冷冻保存效果的影响实验 以 HBSS 为稀释液, 稀释比 1 : 3, 分别以 5%、10%、15%及 20%的 DMSO、乙二醇(ethylene glycol, EG)、丙二醇(propyleneglycol, PG)、甘油(glycerol, Gly)作为抗冻剂, 0.25mL 麦细管为冻存管, 用二步降温法于液氮面上 3.5cm 处平衡 5min 后投入液氮中保存, 12h 后取出, 40℃ 水浴解冻 6s 后测定精子活力。

1.2.11 稀释比对冷冻保存效果的影响实验 以 HBSS 为稀释液, 分别以 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7, 1 : 9 稀释精液, 添加 10% DMSO 为抗冻剂, 0.25mL 麦细管为冻存管, 二步降温法于液氮面上 3.5cm 处平衡 5min 后投入液氮中保存, 12h 后取出, 40℃ 水浴解冻 6s 后测定精子活力。

1.2.12 降温高度对冷冻保存效果的影响实验 以 HBSS 为稀释液, 稀释比 1 : 3, 并添加 10% DMSO 为抗冻剂, 0.25mL 麦细管为冻存管, 用二步降温法分别于液氮面上 2、3.5、5、7.5、10cm 处平衡 5min 后投入液氮, 12h 后取出, 40℃ 水浴解冻 6s 后测定精子活力。

1.3 数据处理

数据统计与分析采用 Excel 和 SPSS19.0 软件完成, 用 Excel 进行作图, 用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行显著性分析(SPSS19.0)。统计结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

2 结果

2.1 小黄鱼精子密度

经检测, 小黄鱼精液中精子密度为(6.92±1.20)×10⁹/mL。

2.2 小黄鱼精子运动特征

小黄鱼精子经自然海水激活后各运动参数见表 2(n=10), 曲线运动速率和平均路径运动速率较高, 直线运动速率较低。

表 2 小黄鱼精子的运动参数(n=10)
Tab.2 The parameters of sperm movement of *L. polyactis* (n=10)

运动参数	数值
运动率 MOT(%)	59.31±4.85
运动时间 MT(min)	8.44±0.87
寿命 LS(min)	12.20±0.50
直线运动速率 VSL(μm/s)	11.96±5.21
曲线运动速率 VCL(μm/s)	25.38±7.19
平均路径运动速率 VAP(μm/s)	22.33±6.88
侧摆幅值 ALH(μm)	3.88±0.13
鞭打频率 BCF(次/s)	12.02±2.38
平均移动角度 MAD(°/s)	18.56±3.95

2.3 盐度对小黄鱼精子活力的影响

水温 16℃、pH 8.1, 小黄鱼精子在不同盐度溶液中的活力(运动率、运动时间、寿命)见图 1。精子在盐度 10—40 溶液中均有一定比例被激活, 在盐度 25—30 溶液中, 精子运动率大于 45%, 在盐度 25 溶液中, 精子运动率、运动时间及寿命分别达(53.43±5.08)%、8.17±0.41min 及

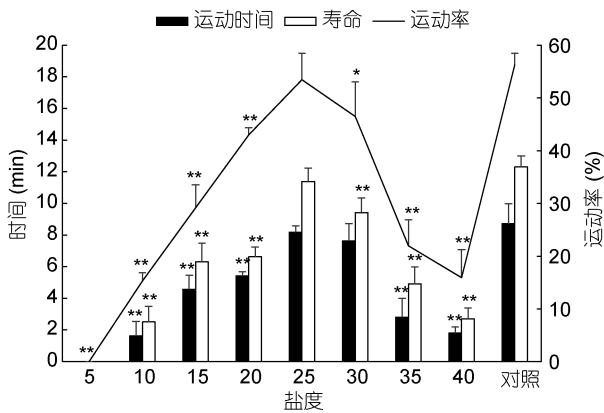


图1 盐度对小黄鱼精子活力的影响

Fig.1 Effects of salinity on the motility of *L. polyactis* sperm
注: *差异显著, $P<0.05$; **差异极显著, $P<0.01$; 对照为自然海水 (盐度 27, pH 8.1) 激活组, $n=3$, 下同

11.37 $\pm$ 0.86min, 与对照组无显著差异。精子在盐度为 5 的溶液中未被激活。

2.4 pH 对小黄鱼精子活力的影响

水温 16°C、盐度 27, 小黄鱼精子在不同 pH 溶液中的活力见图 2。精子在 pH 5.0—11.0 的实验溶液中均有一定比例被激活, 在 pH 7.5—8.5 溶液中, 精子运动率大于 50%, 在 pH 8.0 溶液中, 精子运动率、运动时间及寿命分别达(59.12 $\pm$ 8.62)%、8.32 $\pm$ 0.33min 及 11.64 $\pm$ 0.74min, 与对照组无显著差异。

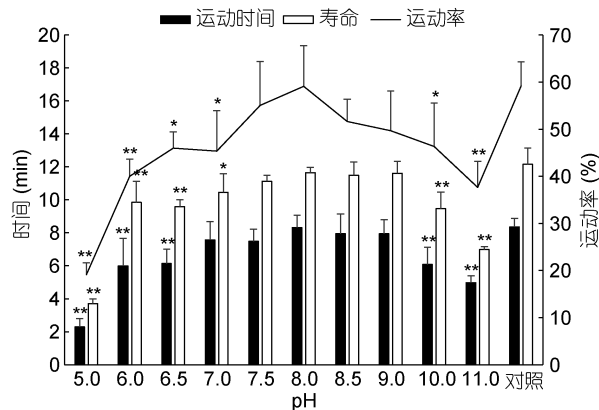


图2 pH 对小黄鱼精子活力的影响

Fig.2 Effects of pH value on the motility of *L. polyactis* sperm

2.5 葡萄糖溶液对小黄鱼精子活力的影响

水温 16°C, 小黄鱼精子在葡萄糖溶液中的活力见图 3。在 0.3—1.0mol/L 葡萄糖溶液中, 均有部分精子被激活, 在 0.7—0.9mol/L 溶液中, 精子运动率与对照组无显著差异, 在 0.8mol/L 溶液中, 精子运动率、运动时间及寿命分别达(56.65 $\pm$ 5.01)%、8.51 $\pm$ 0.46min 及 12.19 $\pm$ 0.67min。在 0.1 或 0.2mol/L 葡萄糖

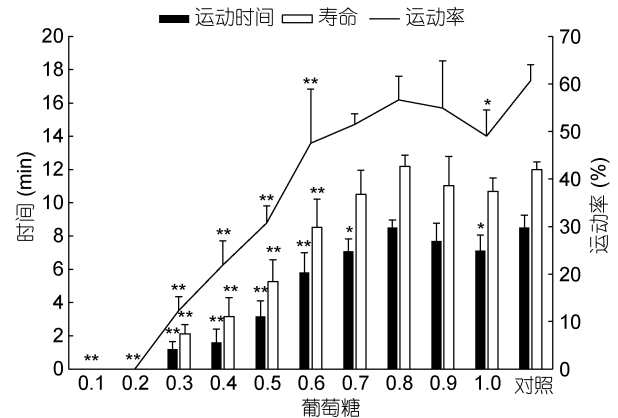


图3 葡萄糖溶液对小黄鱼精子活力的影响

Fig.3 Effects of glucose solutions on the motility of *L. polyactis* sperm

溶液中, 精子未被激活。

2.6 KCl、NaCl、MgCl₂ 及 CaCl₂ 溶液对小黄鱼精子活力的影响

水温 16°C, 小黄鱼精子在 KCl、NaCl、MgCl₂ 及 CaCl₂ 溶液中的活力见表 3、表 4、表 5。精子在 0.1—0.9mol/L 的 KCl 溶液中均有部分被激活, 在 0.4 或 0.5mol/L KCl 溶液中, 精子的运动率相对较高(约 45%), 但均显著低于对照组; 在 0.1mol/L KCl 溶液中, 精子未被激活。精子在 0.2—1.0mol/L 的 NaCl 溶液中均有一定比例被激活, 在 0.4—0.6mol/L NaCl 溶液中, 精子活力较好, 在 0.5mol/L NaCl 溶液中, 精子运动率、运动时间及寿命分别达(53.80 $\pm$ 12.17)%、7.79 $\pm$ 1.45min 及 10.77 $\pm$ 0.88min, 与对照组差异不显著; 在 0.1mol/L NaCl 溶液中, 精子未被激活。精子在 0.3—1.0mol/L MgCl₂ 溶液中均有一定比例被激活, 在 0.7—1.0mol/L MgCl₂ 溶液中, 精子运动率大于 40%, 在 0.9mol/L MgCl₂ 溶液中, 精子运动率、运动时间及寿命分别达(58.39 $\pm$ 1.83)%、8.04 $\pm$ 0.32min 及 11.71 $\pm$ 0.54min, 与对照组差异不显著; 在 0.1—0.2mol/L MgCl₂ 溶液中, 精子未被激活。精子在 0.1—0.8mol/L CaCl₂ 溶液中均有部分被激活, 在 0.2—0.3mol/L CaCl₂ 溶液中, 精子运动率, 运动时间及寿命相对较高, 但均显著低于对照组; 精子在 0.9—1.0mol/L CaCl₂ 溶液中未被激活。

2.7 不同海水对小黄鱼精子活力的影响

水温 16°C, 小黄鱼精子在各人工海水及自然海水中的活力见表 6。小黄鱼精子在自然海水中的运动率显著高于各人工海水, 运动时间及寿命也比各人工海水更长; 而在各离子缺陷型人工海水中, 精子的运动率与全人工海水相比无显著差异。

表 3 KCl、NaCl、MgCl₂、CaCl₂ 溶液对小黄鱼精子运动率的影响Tab.3 Effects of KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂ solutions on the percentage of *L. polyactis* sperm motile

浓度(mol/L)	运动率(%)			
	KCl	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂
0.1	0**	0**	0**	19.01±2.47**
0.2	25.80±2.28**	31.41±6.75**	0**	43.08±5.01**
0.3	40.88±5.92**	38.03±0.31**	28.64±4.74**	42.55±3.44**
0.4	45.32±7.88**	46.73±8.05*	28.93±4.42**	37.57±5.38**
0.5	45.80±7.28**	53.80±12.17	31.47±3.72**	38.16±0.32**
0.6	39.46±9.43**	47.69±7.57*	38.93±1.88**	33.36±2.65**
0.7	41.04±0.71**	41.04±0.71**	41.04±2.17**	28.71±7.50**
0.8	22.52±5.97**	39.10±7.48**	43.45±1.77**	18.84±3.65**
0.9	21.29±5.65**	30.04±5.30**	58.39±1.83	0**
1.0	15.14±7.95**	27.47±6.07**	47.26±4.50**	0**
对照	60.70±3.34	63.31±4.04	62.89±3.52	62.89±3.52

注: *差异显著, $P<0.05$; **差异极显著, $P<0.01$; 对照为自然海水(盐度 27, pH 8.1)激活组, $n=3$ 。下同

表 4 KCl、NaCl、MgCl₂、CaCl₂ 溶液对小黄鱼精子运动时间的影响Tab.4 Effects of KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂ solutions on the moving time of *L. polyactis* sperm

浓度(mol/L)	运动时间(min)			
	KCl	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂
0.1	0**	0**	0**	1.27±0.18**
0.2	1.80±0.18**	3.26±1.27**	0**	6.35±0.45**
0.3	3.78±0.62**	5.02±0.52**	1.43±0.29**	7.10±0.75**
0.4	7.80±0.86	7.12±1.40	2.51±0.06**	7.49±0.27*
0.5	6.67±0.79**	7.79±1.45	3.50±0.24**	6.65±0.37**
0.6	5.69±0.77**	7.57±0.79	4.98±0.26**	5.08±0.39**
0.7	3.34±0.59**	6.38±0.07*	5.90±0.29**	2.44±0.78**
0.8	2.00±0.29**	5.65±1.24**	6.61±0.53**	0.80±0.09**
0.9	1.69±0.33**	2.51±1.86**	8.04±0.32	0**
1.0	0.94±0.39**	1.32±0.73**	7.75±0.53*	0**
对照	8.38±0.58	8.51±0.74	8.38±0.58	8.35±0.58

表 5 KCl、NaCl、MgCl₂、CaCl₂ 溶液对小黄鱼精子寿命的影响Tab.5 Effects of KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂ solutions on the life span of *L. polyactis* sperm

浓度(mol/L)	寿命(min)			
	KCl	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂
0.1	0**	0**	0**	2.59±0.37**
0.2	3.76±0.13**	4.83±1.32**	0**	9.32±0.61**
0.3	6.24±0.70**	7.39±0.96**	2.70±0.08**	9.32±1.19**
0.4	10.73±0.64**	10.03±1.37*	3.88±0.36**	9.59±1.13**
0.5	9.86±0.36**	10.77±0.88	5.88±0.48**	8.02±0.33**
0.6	8.90±0.50**	10.15±0.70	6.92±0.79**	7.56±0.50**
0.7	5.58±0.81**	9.73±0.59*	7.95±0.25**	5.21±0.64**
0.8	2.87±0.57**	8.62±0.83**	10.27±0.46**	1.05±0.11**
0.9	2.73±0.35**	4.42±2.33**	11.71±0.54	0**
1.0	1.88±0.78**	2.09±1.04**	11.63±0.73	0**
对照	12.27±0.32	11.99±0.47	12.27±0.32	12.27±0.32

表 6 不同海水对小黄鱼精子活力的影响
Tab.6 Effects of different seawater on the motility of *L. polyactis* sperm

浓度(mg/L)	运动率(%)	运动时间(min)	寿命(min)
ASW	49.82±1.19 ^b	7.23±0.41 ^{bc}	10.33±0.95 ^{bc}
Ca ²⁺ free ASW	52.08±1.52 ^b	7.98±0.69 ^{ab}	11.05±1.25 ^{ab}
Mg ²⁺ free ASW	48.02±6.05 ^b	6.54±0.45 ^c	9.96±0.55 ^c
HCO ₃ ⁻ free ASW	53.57±1.72 ^b	8.09±0.77 ^{ab}	11.56±0.30 ^{ab}
自然海水	60.70±3.34 ^a	8.51±0.74 ^a	11.99±0.47 ^a

注: 不同上标字母表示差异显著

2.8 稀释液种类对精子冷冻保存效果的影响

以 MFRS 等 6 种溶液为稀释液, 10% DMSO 为抗冻剂冷冻保存小黄鱼精子, 结果显示, 精子在 HBSS 稀释液中冷冻保存效果最好, 冻精运动率为(41.38±5.03)%, 其次是 MFRS, 运动率(39.56±6.08)%, 在 ASP、Hank's、Cortland 及 MPRS 稀释液中冷冻保存效果较差。对照组鲜精运动率为(59.93±3.41)%, 显著高于各冻精组(图 4)。

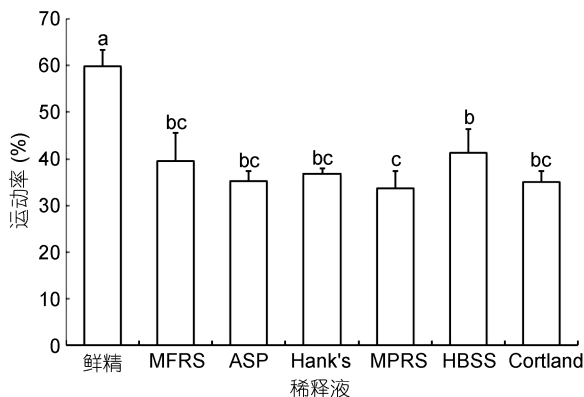


图 4 稀释液种类对小黄鱼精子冷冻保存效果的影响

Fig.4 Effects of different extenders on cryopreservation of *L. polyactis* sperm

2.9 抗冻剂种类及浓度对小黄鱼精子冷冻保存效果的影响

以 HBSS 为稀释液, 不同浓度的四种抗冻剂对精子冷冻保存效果的影响见图 5。10% DMSO 及 15% PG 对精子冷冻保存效果较好, 运动率分别为(43.57±2.59)%和(43.06±6.77)%, 5%、10% EG, 5%、15%、20% DMSO 及 10%、15%、20% PG 保存效果次之, 而不同浓度 Gly 保存效果较差, 运动率显著低于 10% DMSO 及 15% PG。对照组鲜精运动率为(59.27±1.38)%, 显著高于各冻精组(图 5)。

2.10 稀释比对小黄鱼精子冷冻保存效果的影响

以 HBSS 为稀释液, 10% DMSO 为抗冻剂, 不同

稀释比冷冻保存小黄鱼精子, 结果显示, 精子经 1:3 或 1:5 稀释后冷冻保存效果较好, 运动率分别为(43.59±1.59)%和(42.83±3.72)%, 其次为 1:7, 而 1:1 及 1:9 冷冻保存效果较差。对照组鲜精运动率为(57.55±2.44)%, 显著高于各冻精组(图 6)。

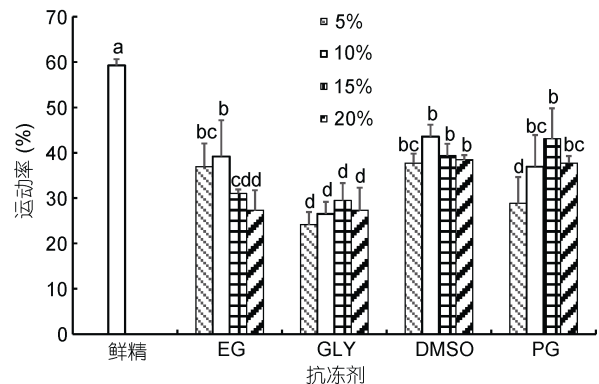


图 5 抗冻剂种类及浓度对精子冷冻保存效果的影响

Fig.5 Effects of different cryoprotectants on cryopreservation of *L. polyactis* sperm

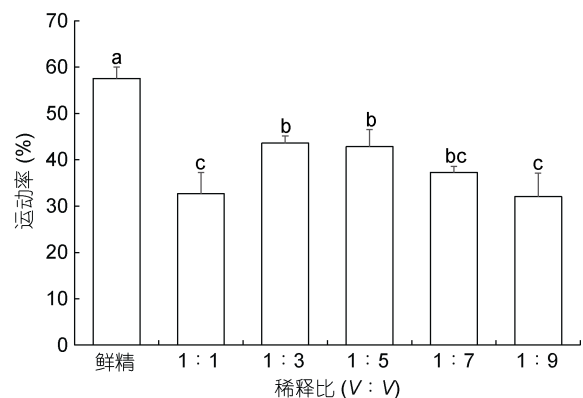


图 6 稀释比对小黄鱼精子冷冻保存效果的影响

Fig.6 Effects of milt/diluent ratios on cryopreservation of *L. polyactis* sperm

2.11 降温高度对精子冷冻保存效果的影响

以 HBSS 为稀释液, 10% DMSO 为抗冻剂, 不同液氮面高度降温 5min 后冷冻保存小黄鱼精子, 结果

显示,液氮面 3.5cm 处降温 5min 后冷冻保存效果较好,冻精运动率为 $(45.67\pm 0.95)\%$,其次为 2cm,而 5、7.5 或 10cm 保存效果较差。对照组鲜精运动率为 $(57.70\pm 2.72)\%$,显著高于各冻精组(图 7)。

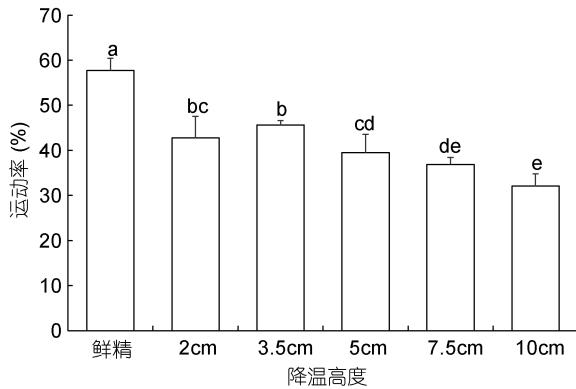


图 7 降温高度对小黄鱼精子冷冻保存效果的影响

Fig 7 Effects of the height above surface of liquid nitrogen on cryopreservation of *L. polyactis* sperm

3 讨论

3.1 精子的运动特征

鱼类精子的运动特征因种的不同存在差异,现将部分鱼类精子的运动参数列于表 7,对其进行比较。由表 7 可知,鱼类精子的运动速率一般介于几十至几百微米每秒,如高体雅罗鱼(Siddique *et al*, 2016)精子的运动速率约为 30 $\mu\text{m/s}$,条纹锯鲈(韩龙江等, 2014)精子的运动速率约为 80 $\mu\text{m/s}$,而鲤鱼(Cejko *et al*, 2015)精子的运动速率较高,可达 250 $\mu\text{m/s}$ 以上。本研究中,小黄鱼精子的 VSL、VCL 及 VAP 分别为 11.96 ± 5.21 、 25.38 ± 7.19 及 $22.33\pm 6.88\mu\text{m/s}$,低于大西

洋鳕(Butts *et al*, 2010),欧洲鳗鲡(Gallego *et al*, 2013)及条纹锯鲈(Gallego *et al*, 2013)等海水鱼类,而与淡水的高体雅罗鱼(Siddique *et al*, 2016)相近。研究表明,养殖大西洋鳕精子的运动速率要显著低于野生大西洋鳕,且两种环境条件下,大西洋鳕精子的运动速率均随繁殖时间的推移呈逐渐上升趋势(Butts *et al*, 2010),小黄鱼精子是否存在此类现象,值得进一步研究。鱼类精子的运动轨迹常为光滑的曲线,因此精子 VCL 和 VAP 的值基本一致(Rurangwa *et al*, 2004)。表 7 中,鲤鱼(Cejko *et al*, 2015)、高体雅罗鱼(Siddique *et al*, 2016)、西伯利亚鳕(Siddique *et al*, 2016)、大西洋鳕(Butts *et al*, 2010)等鱼的运动速率均以 VCL 值最大,且 VCL 和 VAP 值较接近(表 7),表明这些鱼类精子多呈曲线式运动。本研究中,小黄鱼精子 VCL 和 VAP 值也较接近,且 VSL 较小,表明小黄鱼精子的运动方式也是以曲线运动为主。

3.2 环境因子对精子活力的影响

盐度是影响海水鱼类精子活力的主要因子,且精子适宜的盐度范围往往与其生境或繁殖环境相关(江世贵等, 2000)。据研究,眼斑拟石首鱼(魏平等, 2009)、黄姑鱼(闫家强等, 2010)及大黄鱼(朱冬发等, 2005)精子运动适宜的盐度分别为 20—35、25—35 及 19.61—24.87,而大弹涂鱼(洪万树等, 1997)精子运动适宜的盐度范围较低(15—20)。本研究中,小黄鱼精子运动适宜的盐度为 25—30,与黄姑鱼(闫家强等, 2010)及眼斑拟石首鱼(*C. ocellatus*)(魏平等, 2009)精子运动适宜的盐度相似,小黄鱼繁殖期的海区盐度一般为 27—32,是其精子运动适宜的盐度范围。

表 7 部分鱼类精子运动特征比较
Tab.7 Comparison in kinetic characteristics of sperm in some fish species

物种	直线运动速率 ($\mu\text{m/s}$)	曲线运动速率 ($\mu\text{m/s}$)	平均路径运动速率 ($\mu\text{m/s}$)	参考文献
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	201.0 $\pm$ 9.3	267.0 $\pm$ 26.5	246.8 $\pm$ 17.4	Cejko <i>et al</i> , 2015
高体雅罗鱼 <i>Leuciscus idus</i>	22.49 $\pm$ 1.17	31.83 $\pm$ 1.32	26.89 $\pm$ 1.44	Siddique <i>et al</i> , 2016
西伯利亚鳕 <i>Acipenser baeri</i>	86.8 $\pm$ 9.3	119.9 $\pm$ 19.1	102.4 $\pm$ 12.0	Sieczyński <i>et al</i> , 2015
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	22.85 $\pm$ 3.16 ^a	74.22 $\pm$ 10.29 ^a	31.71 $\pm$ 6.45 ^a	柳凌等, 2007
史氏鲟 <i>Acipenser schrencku</i>	45.02 $\pm$ 6.72 ^a	100.16 $\pm$ 13.75 ^a	56.66 $\pm$ 5.45 ^a	柳凌等, 2007
大西洋鳕 <i>Gadus morhua</i>	116.9 $\pm$ 5.6	128.2 $\pm$ 6.5	124.9 $\pm$ 6.1	Butts <i>et al</i> , 2010
欧洲鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i>	87.03 $\pm$ 5.77	162.88 $\pm$ 7.28	110.58 $\pm$ 6.33	Gallego <i>et al</i> , 2013
条纹锯鲈 <i>Centropomus striata</i>	88.3 $\pm$ 0.3 ^a	76.2 $\pm$ 0.5 ^a	86.7 $\pm$ 0.7 ^a	韩龙江等, 2014
小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	11.96 $\pm$ 5.21	25.38 $\pm$ 7.19	22.33 $\pm$ 6.88	本研究

注: 上标字母^a表示冷冻精子

pH 对鱼类精子活力影响也较大。据报道,鱼类精浆 pH 大多介于 7.3—8.5 之间,多数鱼类精子在中

性或偏碱性的水体中激活效果更好(邓岳松等, 1999; Kowalski *et al*, 2019)。据研究,大黄鱼(朱冬发等,

2005)精子运动适宜的 pH 范围是 7.5—8.0, 精子在 pH 7.5 溶液中运动率最高、运动时间最长; 黄姑鱼(闫家强等, 2010)精子运动适宜的 pH 范围是 7.5—8.5, 在 pH 8.0 时, 精子活力最好; 此外, 真鲷(江世贵等, 2000)、黄鳍鲷(*S. latus*)(黄晓荣等, 2008)、欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)(Ögretmen *et al*, 2016)等海水鱼类精子也都在中性偏碱的激活液中活力较高。本研究, 小黄鱼精子运动适宜的 pH 范围是 7.5—8.5, pH 为 8.0 时, 精子运动率、运动时间及寿命分别达(59.12±8.62)%、8.32±0.33min 及 11.64±0.74min, 表明小黄鱼精子也是在偏碱性的环境中活力较好, 因此, 在配制小黄鱼人工授精激活液或精子冷冻保存抗冻液时, 应首选 pH 偏碱性(8.0 左右)的配方。

据报道, 适宜浓度的葡萄糖溶液对江鳕(*Lota lota*)(王位莹等, 2015)、高体雅罗鱼(张涛等, 2017)、中华鲟(*Acipenser sinensis*)(刘鉴毅等, 2007)及乌原鲤(*Procypris mterus*)(吴清毅等, 2011)等淡水鱼类精子活力有促进作用, 可延长精子的运动时间或寿命; 葡萄糖溶液对眼斑拟石首鱼(魏平等, 2009)、黄姑鱼(闫家强等, 2010)、大黄鱼(朱冬发等, 2005)等海水鱼类精子活力无明显促进作用, 而对夏牙鲆(王学颖等, 2016)精子活力有一定提升。本研究中, 小黄鱼精子在 0.7—0.9mol/L 葡萄糖溶液中保持较高活力, 在 0.8mol/L 时, 精子运动率、运动时间及寿命分别达(56.65±5.01)%、8.51±0.46min 及 12.19±0.67min, 但与对照组各活力参数基本持平, 表明葡萄糖对小黄鱼精子活力无明显促进作用。

K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 是激活鱼类精子的重要因子, 也是精浆中的主要离子成分(Alavi *et al*, 2006; Figueroa *et al*, 2016), 不同种鱼类精子对各种离子的敏感性不同(Alavi *et al*, 2006), 可能会导致其激活适宜的离子浓度有所差异。据研究, 大弹涂鱼(魏平等, 2010)精子激活效果较好的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 浓度分别为 0.3、0.15、0.1、0.3mol/L, 眼斑拟石首鱼(魏平等, 2009)精子激活效果较好的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 浓度均为 0.6mol/L, 而大黄鱼(朱冬发等, 2005)精子激活效果较好的 K^+ 、 Na^+ 浓度分别为 0.5 和 0.3mol/L, 本研究小黄鱼精子激活效果较好的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 浓度分别为 0.4、0.5、0.2、0.9mol/L, 与上述几种鱼类有所不同。

本研究显示, 小黄鱼精子在不同离子激活液中的运动率均低于自然海水, 这表明单一金属阳离子对小黄鱼精子的激活效果要低于含复合金属阳离子

的自然海水; 小黄鱼精子在单一离子缺陷型人工海水和全人工海水中的运动率非常接近(介于 48%—53%之间), 表明单一离子缺失的人工海水并没有对其精子活力造成明显的影响。王学颖等(2016)研究发现夏牙鲆精子在自然海水中的运动率要显著高于各人工海水, 自然海水的渗透压为 939mosm/kg, 而缺 Ca^{2+} 、缺 Mg^{2+} 、缺 HCO_3^- 人工海水或全人工海水的渗透压介于 1029—1131mosm/kg 之间, 因此渗透压可能是导致精子运动率不同的因素之一。本研究中的小黄鱼精子在自然海水中的运动率显著高于各人工海水, 这可能是自然海水与人工海水的离子成分不同及渗透压不同所致。

3.3 精子超低温保存的适宜条件

不同种鱼类精子超低温冷冻保存适宜的条件(稀释液、稀释比、抗冻剂种类及浓度等)不同(王鑫伟等, 2017)。表 8 是部分海水鱼类精子冷冻保存条件及其效果比较。

不同规格的麦管(0.25、0.5mL)和冻存管(2、5mL)在鱼类精子冷冻保存研究中均有应用, 麦管具有体积小、降温速率快、稳定性高等特点, 适用于精液量较少的冷冻保存研究(表 8)。而冻存管体积较麦管大、降温速率相对较慢, 适用于精液量较多的冷冻保存研究(Liu *et al*, 2015; Nomura *et al*, 2018)。本研究的养殖小黄鱼雄鱼个体较小、精液量较少, 因此使用 0.25ml 麦管进行了冷冻保存研究, 以确定其适宜的冷冻条件。今后, 若培育较大规格的小黄鱼雄鱼, 精液量多时, 可采用体积较大的冻存管进行精子冷冻保存研究, 以便于冷冻保存大量精液。

不同种鱼类精子冷冻保存用适宜的稀释液及其稀释比不同。Fabbrocini 等(2000)和 Gwo 等(1991)用 1% NaCl 溶液为稀释液, 分别以 1:6 和 1:9 的稀释比冷冻保存金头鲷及细须石首鱼精子效果较好; Chereguini 等(2003)用 Mounib's 稀释液, 以 1:2 的稀释比冷冻保存大菱鲆精子, 获得与鲜精相近的受精率; Degraaf 等(2004)调整了 Mounib's 稀释液成分, 并以 1:3 的稀释比冷冻保存条纹锯鲈精子, 获得与鲜精相近的运动率和受精率。此外, HBSS、Hank's、Ranger、Cortland 等稀释液在庸鲽、夏牙鲆、紫红笛鲷、大黄鱼等海水鱼类精子冷冻保存研究中获得较好的效果(表 8)。本研究, 以 10% DMSO 为抗冻剂, 以 HBSS 为稀释液、1:3 或 1:5 的稀释比, 超低温冷冻保存小黄鱼精子, 获得了较好的运动率, 但与鲜精运动率相比仍有一定差距。

表 8 各种海水鱼类精子超低温冷冻保存效果比较
Tab.8 Comparison of sperm cryopreservation effects in various marine fish species

物种	冻存体积 (mL)	稀释液	稀释比	抗冻剂	降温方法	鲜精运动率 (%)	冻精运动率 (%)	鲜精受精率 (%)	冻精受精率 (%)	参考文献
庸鲽 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	2	HBSS	1 : 3	10% DMSO	4°C 预冷,液氮面 5cm 平衡 5min, 投入液氮	—	—	58.4±23.6	68.5±29.5	Ding <i>et al.</i> , 2011
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	0.25	1%NaCl	1 : 6	5% DMSO	0°C 至-150°C, 15°C/min, 之后投入液氮	约 95	约 70	—	—	Fabbrocini <i>et al.</i> , 2000
夏牙鲆 <i>P. dentatus</i>	5	Hank's	4 : 1	15% PG	0°C 至-150°C, 20°C/min, 之后投入液氮	81.3±3.7	74.6±7.9	93.1±4.0	94.7±2.6	Liu <i>et al.</i> , 2015
大菱鲆 <i>S. maximus</i>	0.5	Mounib's	1 : 2	10% DMSO	液氮面 5cm 平衡 7min, 投入液氮(约 10°C/min)	—	—	约 75	约 75	Chereguini <i>et al.</i> , 2003
大西洋鲑 <i>G. macrocephalus</i>	—	—	1 : 3	12% PG	0°C 至-150°C, 20°C/min, 之后投入液氮	87.67±2.56	约 50	—	—	Wang <i>et al.</i> , 016
绿鳍马面鲈 <i>Thamnaconus septentrionalis</i>	0.5	ASW	1 : 6	5% Gly	室温至-100°C, 40°C/min, 之后投入液氮	>95	60	61±3.8	58±3.6	Kang <i>et al.</i> , 004
细须石首鱼 <i>Micropogonias undulatus</i>	0.25	1%NaCl	1 : 9	15% DMSO	10°C 至-90°C, 10°C/min, 之后投入液氮	—	—	62.7±3.6	53.8±3.5	Gwo <i>et al.</i> , 1991
紫红笛鲷 <i>Lutjanus argentimaculatus</i>	0.25	Ranger	1 : 1	10% DMSO	25°C 至-80°C, 10°C/min, 之后投入液氮	94.6±2.3	91.3±3.4	75.5±2.4	72.4±2.4	Vuthiphandchai <i>et al.</i> , 2009
条纹锯鲷 <i>C. striata</i>	0.5	MME	1 : 3	10% DMSO	3°C 至-150°C, 10°C/min, 之后投入液氮	75±1.2	70±5.5	69±2.4	67±4.1	Degraaf <i>et al.</i> , 2004
鲷鱼 <i>M. cephalus</i>	2	V2	1 : 1	10% Gly	4°C 至-150°C, 20°C/min, 之后投入液氮	98.65±2.07	48.19±3.12	—	—	Balamurugan <i>et al.</i> , 2017
褐石斑鱼 <i>E. bruneus</i>	0.5	LG-ASP2	1 : 2	10% Gly	4°C 预冷, 液氮面 3cm 平衡 3min, 投入液氮	>80	66.3±2.0	—	—	Lim <i>et al.</i> , 2013

续表

物种	冻存体积 (mL)	稀释液	稀释比	抗冻剂	降温方法	鲜精运动率 (%)	冻精运动率 (%)	鲜精受精率 (%)	冻精受精率 (%)	参考文献
钝吻黄盖鲽 <i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	2	MFs-3	1 : 1	20% PG	液氮面 10cm 平衡 10min, 液氮面 5cm 平衡 5min, 投入液氮 :	95.48±0.73	95.15±0.41	81.60±1.19	80.08±0.68	宋莉妮等, 2016
黑鲷 <i>S. macrocephalus</i>	0.5	Cortland	1 : 3	10% DMSO	液氮面 3—5cm 平衡 5—8min, 投入液氮	94.21±3.03	92.91±1.25	91.16±2.92	89.35±1.99	叶霆等, 2009
黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	0.25	HBSS	1 : 3	10% DMSO	液氮面 3—4cm 平衡 3—5min, 投入液氮	88.00±2.94	85.25±3.95	—	—	金春华等, 2011
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	0.5	Cortland	1 : 3	10% Gly	液氮面 3—4cm 平衡 3—5min, 投入液氮	90.90±2.59	89.93±1.07	—	—	程顺等, 2013
小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	0.25	HBSS	1 : 3	10% DMSO	液氮面 3.5cm 平衡 5min, 投入液氮	57.70±2.72	45.67±0.95	—	—	本研究

注: “—”表示数据缺少; ASW: 人工海水; MME: modified Mounib's extender

超低温冷冻过程会导致精子结构损伤, 适宜浓度的抗冻剂可有效保护精子结构(陈松林等, 1992; Kowalski *et al*, 2019)。DMSO、Gly、EG、PG 等是鱼类精子冷冻保存常用的抗冻剂, 其中 DMSO 具有渗透速度快、分布均匀、毒性低等特点(李纯等, 2000), 在庸鲽、金头鲷、细须石首鱼等海水鱼类精子冷冻保存中起到较好的抗冻保护效果(表 8)。抗冻剂适宜的使用浓度一般在 5%—20% 之间(表 8)。本研究的小黄鱼精子冷冻保存采用 10% DMSO 及 15% PG 为抗冻剂, 冻精解冻后运动率分别为(43.57±2.59)%和(43.06±6.77)%, 与鲜精运动率(57.70±2.72)%较为接近, 表明 10% DMSO 和 15% PG 适用于小黄鱼精子超低温冷冻保存。

精子冷冻保存的降温方法主要有液氮面高度降温法或程序降温法, 两者使用的仪器设备和操作方法有所不同, 但都是控制降温速率。由表 8 可知, 使用程序降温法超低温冻存鱼类精子, 其适宜的降温速率因鱼的种类不同存在差异, 但多数在 10—20°C/min; 少数鱼如绿鳍马面鲀降温速率较高(40°C/min)。使用液氮面高度降温法超低温冻存鱼类精子, 多数在液氮面 3—5cm 处降温 3—5min 后投入液氮保存。液氮面 3.5cm 处的温度约-76°C (Lim *et al*, 2013), 如果在此高度降温 5min, 平均降温速率为 15.2°C/min。本研究的小黄鱼精子冷冻保存也是在液氮面 3.5cm 处平衡 5min 后投入液氮, 其降温速率在 15°C/min 左右。今后, 应开展程序降温法超低温冻存小黄鱼精子试验, 以确定其最佳降温速率, 提高冻存效果。

4 结论

小黄鱼精子主要以曲线运动为主, 精子适宜的盐度为 25—30, 适宜的 pH 为 7.5—8.5, 适宜浓度的葡萄糖溶液对精子活力无明显促进作用。小黄鱼精子在 KCl 和 CaCl₂ 溶液中受到一定程度抑制, 活力明显低于对照组。单一离子缺陷型人工海水对小黄鱼精子活力影响不大, 但激活效果不及自然海水。小黄鱼精子经 HBSS 稀释液 1:3 稀释, 添加 10% DMSO 及 15% PG 为抗冻剂, 液氮面 3.5cm 处降温 5min 后投入液氮保存效果较好, 冻精运动率与鲜精较接近。

参 考 文 献

- 王位莹, 李胜忠, 张俊杰等, 2015. 江鳕精子在不同激活液中的活力测定. 贵州农业科学, 43(10): 144—146
- 王学颖, 徐世宏, 刘清华等, 2016. 渗透压、pH、葡萄糖及离子溶液对夏牙鲆精子激活及运动特征的影响. 海洋科学, 40(3): 40—46
- 王鑫伟, 史应学, 竺俊全等, 2017. 光唇鱼精子的超低温冷冻保存及酶活性检测. 农业生物技术学报, 25(4): 639—649
- 邓岳松, 林浩然, 1999. 鱼类精子活力研究进展. 生命科学杂志, 3(4): 271—278
- 叶 霆, 竺俊全, 杨万喜等, 2009. 黑鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的 SCGE 检测. 动物学研究, 30(2): 151—157
- 朱冬发, 成永旭, 王春琳等, 2005. 环境因子对大黄鱼精子活力的影响. 水产科学, 24(12): 4—6
- 刘清华, 李 军, 丁福红等, 2006. 运用计算机辅助分析检测超低温保存的真鲷(*Pagrosomus major*)精子的质量. 自然科学进展, 16(9): 1181—1185
- 刘鉴毅, 甘 芳, 危起伟等, 2007. 几种不同浓度的离子及单糖对中华鲟精子活力的影响. 水生生物学报, 31(6): 849—854
- 闫家强, 魏 平, 姜建湖等, 2010. 环境因子及超低温冻存对黄姑鱼精子活力的影响. 生态科学, 29(4): 339—344
- 江世贵, 李加儿, 区又君等, 2000. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系. 生态学报, 20(3): 468—473
- 李 纯, 李 军, 薛钦昭, 2000. 海洋生物种质细胞低温保存与机理. 海洋科学, 24(4): 12—15
- 李建生, 林龙山, 程家骅, 2009. 东海北部秋季小黄鱼分布特征及其与底层温度和盐度的关系. 中国水产科学, 16(3): 348—356
- 吴佩秋, 1980. 小黄鱼卵母细胞发育的形态特征和季节变化. 动物学报, 26(4): 337—345
- 吴佩秋, 1981. 小黄鱼不同产卵类型卵巢成熟期的组织学观察. 水产学报, 5(2): 161—169
- 吴清毅, 孙翰昌, 李云瑶, 2011. 不同浓度的 K⁺、Ca²⁺ 和葡萄糖对乌原鲤精子活力的影响. 水产科学, 30(4): 202—205
- 宋莉妮, 田永胜, 李祥孔等, 2016. 钝吻黄盖鲈精子冷冻保存及生理特性分析. 农业生物技术学报, 24(4): 584—592
- 张 涛, 李胜忠, 牛建功等, 2017. Na⁺、K⁺、葡萄糖及甘油对高体雅罗鱼精子活力的影响. 南方农业学报, 48(4): 734—738
- 陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿等, 1992. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究. 动物学报, 38(4): 413—424
- 陈睿毅, 楼 宝, 詹 炜等, 2016. 小黄鱼亲鱼驯养及苗种繁育. 科学养鱼, (1): 42—43
- 林龙山, 程家骅, 任一平等, 2004. 东海区小黄鱼种群生物学特性的分析. 中国水产科学, 11(4): 333—338
- 季相山, 陈松林, 赵 燕等, 2007. 鱼类精子质量评价研究进展. 中国水产科学, 14(6): 1048—1054
- 金春华, 闫家强, 竺俊全, 2011. 黄姑鱼精子的超低温冻存及细胞结构损伤的检测. 水产学报, 35(6): 846—853
- 柳 凌, Otomar L, 危起伟等, 2007. 计算机辅助对几种鲟鱼冻精激活活性的比较. 水产学报, 31(6): 711—720
- 洪万树, 张其永, 周东晨, 1997. 四种海产经济鱼类精子的生理特性和环境因子的关系. 海洋科学, (3): 64—66
- 徐献明, 张志勇, 曹 昆, 2014. 小黄鱼幼鱼人工培育技术. 水产养殖, 35(8): 22—24
- 郭旭鹏, 金显仕, 戴芳群, 2006. 渤海小黄鱼生长特征的变化. 中国水产科学, 13(2): 243—249
- 黄晓荣, 章龙珍, 庄 平等, 2008. 黄鳍鲷精子主要生物学特性的研究. 热带海洋学报, 27(2): 54—59
- 韩龙江, 刘清华, 官曙光等, 2014. 条纹锯鲈精液超低温冷冻保存研究. 水产学报, 38(10): 1714—1721
- 程 顺, 闫家强, 竺俊全等, 2013. 甘油为抗冻剂超低温冷冻保存大黄鱼精子的 DNA 损伤. 中国畜牧杂志, 49(11): 34—36

- 魏 平, 叶 霆, 吴向丹等, 2009. 环境因子对眼斑拟石首鱼精子活力的影响. 生态科学, 28(5): 438—442
- 魏 平, 闫家强, 竺俊全, 2010. 几种环境因子对大弹涂鱼精子活力的影响. 宁波大学学报(理工版), 23(3): 11—15
- Alavi S M H, Cosson J, 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biology International, 30(1): 1—14
- Balamurugan R, Munuswamy N, 2017. Cryopreservation of sperm in Grey mullet *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). Animal Reproduction Science, 185: 205—213
- Butts I A E, Litvak M K, Trippel E A, 2010. Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*. Theriogenology, 73(7): 873—885
- Cabrera E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S *et al*, 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology, 26(5): 623—635
- Cejko B I, Krejszef S, Sarosiek B *et al*, 2015. Biochemical factors of common carp *Cyprinus carpio* L. 1758, seminal plasma and its relationship with sperm motility parameters. Journal of Applied Ichthyology, 31(S1): 10—17
- Chereguini O, de la Banda I G, Herrera M *et al*, 2003. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: Fertilization and hatching rates. Aquaculture Research, 34(9): 739—747
- Degraaf J D, King V W, Benton C *et al*, 2004. Production and storage of sperm from the black sea bass *Centropristis striata* L. Aquaculture Research, 35(15): 1457—1465
- Ding F H, Lall S P, Li J *et al*, 2011. Cryopreservation of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) for commercial application. Cryobiology, 63(1): 56—60
- Fabbrocini A, Lavadera S L, Rispoli S *et al*, 2000. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Cryobiology, 40(1): 46—53
- Figuerola E, Valdebenito I, Farias J G, 2016. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. Aquaculture Research, 47(6): 1691—1705
- Gallego V, Carneiro P C F, Mazzeo I *et al*, 2013. Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. Theriogenology, 79(7): 1034—1040
- Gwo J C, Strawn K, Longnecker M T *et al*, 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture, 94(4): 355—375
- Islam SM, Akhter T, 2011. Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. Advances in Life Sciences, 1(1): 11—19
- Kang H W, Chung E Y, Chung J S *et al*, 2013. Ultrastructural studies of spermatogenesis and the functions of Leydig cells and Sertoli cells associated with spermatogenesis in *Larimichthys polyactis* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). Animal Cells and Systems, 17(4): 250—258
- Kang K H, Kho K H, Chen Z T *et al*, 2004. Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis* Gunther, 1877) sperm. Aquaculture Research, 35(15): 1429—1433
- Kime D E, Van Look K J W, McAllister B G *et al*, 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 130(4): 425—433
- Kowalski R K, Cejko B I, 2019. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. Theriogenology, 135: 94—108
- Le M H, Lim H K, Min B H *et al*, 2011a. Semen cryopreservation of yellow croaker *Larimichthys polyactis*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 21(4): 789—797
- Le M H, Lim H K, Min B H *et al*, 2011b. Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish *Larimichthys polyactis*. Journal of Environmental Biology, 32(3): 271—276
- Lim H K, Le M H, 2013. Evaluation of extenders and cryoprotectants on motility and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm. Theriogenology, 79(5): 867—871
- Lim H K, Le M H, An C M *et al*, 2010. Reproductive cycle of yellow croaker *Larimichthys polyactis* in southern waters off Korea. Fisheries Science, 76(6): 971—980
- Liu Q H, Ma D Y, Xu S H *et al*, 2015. Summer flounder (*Paralichthys dentatus*) sperm cryopreservation and application in interspecific hybridization with olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Theriogenology, 83(4): 703—710
- Liu L W, Sui Y Z, Zhu W B *et al*, 2017. In-depth transcriptome analysis of *Larimichthys polyactis*, *de novo* assembly, functional annotation. Marine Genomics, 33: 27—29
- Nomura K, Koh I C C, Iio R *et al*, 2018. Sperm cryopreservation protocols for the large-scale fertilization of Japanese eel using a combination of large-volume straws and low sperm dilution ratio. Aquaculture, 496: 203—210
- Öğretmen F, Inanan B E, Kutluer F, 2016. Combined effects of physicochemical variables (pH and salinity) on sperm motility: characterization of sperm motility in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 49(3): 217—222
- Rurangwa E, Kime D E, Ollevier F *et al*, 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture, 234(1—4): 1—28
- Siddique M A M, Linhart O, Krejszef S *et al*, 2016. Effects of preincubation of eggs and activation medium on the percentage of eyed embryos in ide (*Leuciscus idus*), an externally fertilizing fish. Theriogenology, 85(5): 849—855
- Sieczyński P, Cejko B I, Grygoruk C *et al*, 2015. Cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) and sterlet (*Acipenser ruthenus*, Linnaeus, 1758) semen and its influence on sperm motility parameters assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system. Journal of Applied Ichthyology, 31(S1): 99—103
- Vuthiphandchai V, Chomphuthawach S, Nimrat S, 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology, 72(1): 129—138
- Wang X Y, Shi X H, Liu Y F *et al*, 2016. Effects of chilled storage and cryopreservation on sperm characteristics, antioxidant enzyme activities, and lipid peroxidation in Pacific cod *Gadus microcephalus*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 34(4): 763—771

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND CRYOPRESERVATION EFFECT OF *LARIMICHTHYS POLYACTIS* SPERM

ZHENG Xue-Bin¹, DU Chen¹, WANG Jing-Qian¹, ZHAN Wei², XIE Qing-Ping², LOU Bao²,
ZHU Jun-Quan¹

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
2. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310016, China)

Abstract To study the physiological characteristics and understand the cryopreservation effect on sperm motility of cultivated *Larimichthys polyactis*, we determined the kinetic parameters of *L. polyactis* sperm using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system and the effects of several environmental factors (salinity, pH, glucose, ions, etc.) on motility of sperm. Moreover, we established the optimal protocol (including extenders, cryoprotectants, milt/diluent ratios, cooling rate, etc.) for the sperm cryopreservation. The results show that the mean density of sperm was $(6.92 \pm 1.20) \times 10^9/\text{mL}$. When sperm was activated by filtered seawater, the percentage of motile (MOT), moving time (MT), and life span (LS) of sperm were $(59.31 \pm 4.85)\%$, $8.44 \pm 0.87\text{min}$, and $12.20 \pm 0.50\text{min}$, respectively; and the straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), and average path velocity (VAP) of sperm were 11.96 ± 5.21 , 25.38 ± 7.19 , and $22.33 \pm 6.88 \mu\text{m/s}$, respectively. The suitable salinity for sperm activation was 25—30; the suitable pH was 7.5—8.5, and the highest motility were obtained at salinity 25 or pH 8.0. In addition, a better motility was detected when sperm was activated in glucose solutions at the concentration of 0.7—0.9mol/L, and the highest motility was obtained at 0.9mol/L. What's more, a better motility was also detected when sperm was activated in solutions containing 0.4—0.5mol/L potassium chloride, 0.4—0.6mol/L sodium chloride, 0.7—1.0mol/L magnesium chloride or 0.2—0.3mol/L calcium chloride. The motility of sperm activated in potassium chloride or calcium chloride solutions was significantly lower than the control group (sperm was activated in filtered seawater). Besides, the MOT of sperm that obtained in control group was significantly higher than groups of various artificial seawater, but it showed no significant difference in different types of artificial seawater. For cryopreservation, 0.25mL straw was used; 6 types of extenders, 4 types of cryoprotectants in different concentrations, 5 ratios (milt to diluent), and 5 cooling rates (realized by adjusting the height above the surface of liquid nitrogen) were tested. The results show that the semen diluted by HBSS solution with 10% DMSO or 15% PG at a ratio of 1 : 3 and suspended 3.5cm above the surface of liquid nitrogen for 5 min produced better results; and the MOT of post-thaw sperm was $(43.57 \pm 2.59)\%$ or $(43.06 \pm 6.77)\%$, respectively.

Key words *Larimichthys polyactis*; CASA; physiological characteristics; sperm cryopreservation