

文章编号: 1004-7271(2009)01-0021-07

## 褐牙鲆精子生理特性及超低温冷冻保存

章龙珍<sup>1</sup>, 闫文罡<sup>1,2</sup>, 庄平<sup>1</sup>, 黄晓荣<sup>1</sup>, 徐滨<sup>1,2</sup>, 江琪<sup>1,2</sup>

(1 中国水产科学研究院东海水产研究所农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090)

2 上海高校水产养殖 E-研究院, 上海海洋大学, 上海 201306)

**摘要:** 对褐牙鲆精子部分生理特性进行了研究, 结果表明, 褐牙鲆精浆 pH 值为  $(7.90 \pm 0.26)$ , 精子密度为  $(1.03 \times 10^{10}) / \text{mL}$ , 精浆渗透压为  $(308.50 \pm 7.85) \text{ mOsm/kg}$ ,  $\text{K}^+$  在精浆中的浓度为  $(27 \pm 3) \text{ mmol/L}$ ,  $\text{Na}^+$  在精浆中的浓度为  $(71 \pm 5) \text{ mmol/L}$ . 对不同盐度和 pH 与褐牙鲆精子活力和寿命的关系进行了研究, 结果表明, 在盐度为 35, pH 为 8.0 时, 精子的活力最高, 分别达到  $(93.33 \pm 5.67)\%$  和  $(89 \pm 3.33)\%$ , 与其生活环境相适应; 褐牙鲆精子寿命为  $(23 \pm 2) \text{ min}$ , 与已报道其它海水鱼精子寿命相近. 分别采用室温 ( $25^\circ\text{C}$ ) 和低温 ( $4^\circ\text{C}$ ) 保存精子, 发现精子在室温条件下, 可存活 4 d, 在低温条件下可以存活 7 d, 证明低温可有效延长精子存活时间. 另外, 分别采用 4 种不同稀释液 (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>) 与 4 种不同抗冻剂 (DMSO, EG, GV, PG) 配制成冷冻保存液对褐牙鲆精子进行超低温冷冻保存研究. 结果表明, 以 S<sub>3</sub> 液作为稀释液, 16% 的 DMSO 作为抗冻剂, 利用快速降温法对精子进行超低温冷冻保存,  $38^\circ\text{C}$  水浴快速解冻, 解冻后的精子获得最高的活力为  $(84 \pm 3.67)\%$ , 此方法可用于褐牙鲆精子的长期保存.

**关键词:** 褐牙鲆; 精子; 活力; 稀释液; 抗冻剂

**中图分类号:** S917 **文献标识码:** A

## Study on Physiological characteristics and cryopreservation of spermatozoa in *Paralichthys olivaceus*

ZHANG Longzhen<sup>1</sup>, YAN Wen gang<sup>1,2</sup>, ZHUANG Ping<sup>1,2</sup>,

HUANG Xiaorong<sup>1</sup>, XU Bin<sup>1,2</sup>, JIANG Qi<sup>1,2</sup>

(1. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, East China Sea

Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

2. E-Institute of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Some physiological characteristics of *Paralichthys olivaceus* sperm were studied. The results showed that the pH of *Paralichthys olivaceus* sperm was  $(7.90 \pm 0.26)$ , density of sperm was  $(1.03 \times 10^{10}) / \text{mL}$ , the osmolarity of semen was  $(308.50 \pm 7.85) \text{ mOsm/kg}$ . The concentration of  $\text{K}^+$  in semen was  $(27 \pm 3) \text{ mmol/L}$ , concentration of  $\text{Na}^+$  was  $(71 \pm 5) \text{ mmol/L}$ . The relation between salinity (or pH) and *Paralichthys olivaceus* sperm motility was also studied. The results demonstrated that sperm had the best motility of  $(93.33 \pm 5.67)\%$  under salinity of 35 and motility of  $(89 \pm 3.33)\%$  at pH 8.0, which adapt to the environment. The life span of *Paralichthys olivaceus* sperm was  $(23 \pm 2) \text{ min}$ , and it was similar to the life span of other

收稿日期: 2008-04-29

基金项目: 国家科技基础条件平台 (2006DKA30470-004); 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室开放课题 (开重-03-01); 上海市科委基础重大专项 (06d14003)

作者简介: 章龙珍 (1954-), 女, 湖北谷城人, 研究员, 主要从事水生动物生殖生物学和生理学方面的研究. Tel: 021-65807688 E-mail: longzhen2885@hotmail.com

reported marine fishes. The life span of *Paralichthys olivaceus* sperm was 4 d under room temperature (25 °C), whereas it was 7 d under low temperature (4 °C). It shows that low temperature could effectively extend the survival time of sperm. Four different diluters (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>) and cryoprotectants (DMSO, EG, Glycerol, PG) were used for cryopreservation of *Paralichthys olivaceus* sperm. Study results showed thawed sperm (38 °C water) had highest motility (84 ± 3.67)% under the S<sub>3</sub> diluter with 16% DMSO as cryoprotectant. This method can be used for long term preservation of *Paralichthys olivaceus* sperm.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; sperm; motility; diluter; cryoprotectants

超低温(液氮-196 °C)能抑制细胞内的生化反应,使细胞的代谢水平处于停止状态<sup>[1]</sup>,在长期保存时不发生变异。鱼类精子超低温冷冻保存的研究,对于鱼类,尤其是对于濒危、珍稀鱼类的种质资源保存能起到有效的保护作用,同时也有利于维持生物物种的多样性。国内外有文字记载的超低温保存的鱼类精子种类已有二百余种<sup>[2]</sup>。

褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)属鲽形目,牙鲆科、牙鲆属,俗称比目鱼、片口,是近海暖温性底层鱼类。常栖息泥沙、砂石或岩礁地质,水深20~50 m和潮流较为通畅的沿岸水域,具潜伏习性<sup>[3]</sup>。其自然分布区主要是中国沿海、朝鲜半岛、日本和俄罗斯的亚洲海区,且生长快、个体大、肉质细嫩鲜美,是名贵的重要海水养殖品种之一<sup>[4]</sup>。我国关于牙鲆人工繁殖、养殖及生理方面的研究主要集中在北方地区<sup>[5-6]</sup>。近几年来,为加快海水养殖结构调整,对舟山本地褐牙鲆生殖生理方面的研究逐渐增多,并已初步建立适于舟山褐牙鲆的育苗生产工艺<sup>[7]</sup>。本试验通过建立一种快速而高效的褐牙鲆精子超低温冷冻保存模式,为褐牙鲆苗种繁育、选育提供条件,为其种质资源保存提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 精液采集

试验所用的褐牙鲆亲鱼系浙江海洋水产研究所自然繁殖所用的亲鱼。2007年4月褐牙鲆繁殖期间,挑选体长(40.46 ± 1.59) cm、体重(1.08 ± 0.12) kg性成熟的雄性亲鱼,经人工催产,获得精液。将亲鱼从水中捞出后用纱布将鱼体表面的水擦干,轻挤压腹部,从生殖孔吸取无污染(无血、无水、无粪尿等)的精液放入密封袋内,充氧保存于冰盒中。经显微镜检查精子活力,活力在90%以上者用于试验,选取10尾褐牙鲆的精液作为试验材料。

### 1.2 精子活力观察

以Morisawa等的配方为基础<sup>[8]</sup>,调整NaCl的浓度含量,用便携式多参数水质分析仪(HACH YSI-ADV6600)进行测定,并配制成不同盐度梯度的人工海水,盐度范围为5~60,共12个梯度。不同pH值的海水,用1 mol/L的NaOH溶液和1 mol/L的HCl的溶液调节盐度为31的人工海水;用DELTA320 pH计进行测定,pH值范围为4.0~12.0,共12个梯度。

在1块干净载玻片上的3个位置滴加等量的相同处理的海水或pH溶液作为3个平行,然后用干净的注射器针头蘸取少量精液与载玻片上的海水混合,同时开始计时,显微镜下观察精子运动情况。观察低温和室温保存时间对精子活力影响时,每隔一段时间从低温(4 °C)和室温(25 °C)下取出精液,用盐度31的海水激活,观察精子活力和存活时间。精子活力评价标准参考苏天凤和艾红<sup>[9]</sup>的方法,将精子运动状态分为精子活力和存活时间(精子寿命)。精子活力以激活后视野中运动精子占所有精子的百分数表示,存活时间为精子从被激活到90%以上精子停止运动的时间。每个处理重复3次,结果取平均值。

### 1.3 精子密度的计算

取少量鲜精,以1:200比例稀释固定,在40倍显微镜下观察,并用血球计数板计数并计算精子密度。

## 1.4 精浆离子、PH值及渗透压测定

采集精液用 EPPendof5810R冷冻离心机在 3 000 r/min 4 °C下离心 10 min, 取上部精浆进行分析。精浆离子分析用 DSI905电解质分析仪进行测定。精浆渗透压用 (美国 Wesco公司 Vapo5520)渗透压计测定。PH值用 DELTA320 PH计测定。

## 1.5 冷冻保存方法

精子冷冻保存液由稀释液和抗冻剂组成, 稀释液以 NaCl、NaHCO<sub>3</sub>、KC为主, 添加其它成分见表 1。抗冻剂有二甲亚砜 (DMSO)、乙二醇 (EG)、甘油 (Glycerol)、1, 2-丙二醇 (PG)。精子冷冻保存液在实验前配制, 存于冰箱中 (4 °C)中备用。用 0.2 ml 的塑料离心管保存精子, 按抗冻保护液与精液比 1:1 迅速混匀, 将装有混合液的离心管置于液氮面上一 20 °C处平衡 1 min后迅速投入液氮中保存。

表 1 褐牙鲈精子超低温冷冻保存稀释液组成  
Table 1 Chemical composition and PH of four sperm diluents used for cryopreservation of Paralichthys olivaceus sperm

化学成分	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
NaCl	157	140	135	135
NaHCO <sub>3</sub>		20	20	20
KCl	8	16	24	32
CaCl <sub>2</sub>		1	1	1
MgCl <sub>2</sub>		1.13		1.6
PH	8.0	8.0	8.0	8.0
盐度	10	10	10	10

## 1.6 冻精的解冻与激活

冻精的解冻采用水浴 (38 ~ 40 °C) 快速解冻法。解冻后, 用砂滤海水 (PH为 8.0 盐度为 31) 激活精子, 在显微镜下观察精子活力。

## 1.7 数据处理

先用方差分析 (ANOVA) 检验每个实验的总体各组之间差异是否显著。若显著, 再用 Duncan氏多范围检验,  $P < 0.05$  差异显著,  $P > 0.05$  差异不显著。数据表示为平均值 ± 标准差。

# 2 结果

## 2.1 褐牙鲈精子生理特性

成熟好的褐牙鲈精液为乳白色, 入水后即散开, PH值为 (7.90 ± 0.26), 精子密度为 (1.03 × 10<sup>10</sup>) / ml, 精浆渗透压为 (308.50 ± 7.85) mOsm/kg, 精浆中 K<sup>+</sup> 浓度为 (27 ± 3) mmol/L, Na<sup>+</sup> 浓度 (71 ± 5) mmol/L, 每尾雄鱼可以采集到 3 ~ 5 ml 精液。

### 2.1.1 盐度与精子活力间的关系

用不同浓度的人工海水激活精子并镜检其活力, 褐牙鲈精子的激活与盐度有关, 随盐度的增加, 精子的活力先上升后下降 (图 1)。当盐度高于 60 时, 精子不能被激活。盐度在 5 ~ 30 的范围内, 精子的活力随盐度的增加逐渐上升, 其中盐度 35 时, 精子的活力最高, 平均可达到 (93.33 ± 5.67)%; 此后随着盐度的继续增加, 精子的活力逐渐下降, 当盐度增加至 55 时, 精子的平均活力下降到 20%。

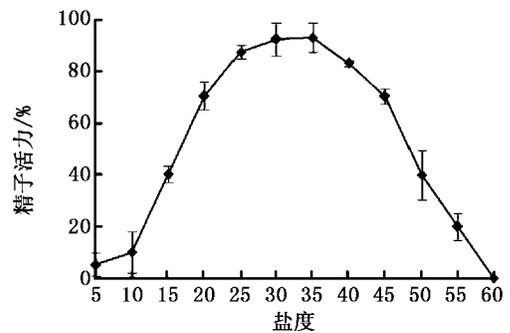


图 1 盐度与精子活力间的关系  
Fig. 1 Relationships between salinity and the sperm motility

### 2.1.2 pH与精子活力的关系

褐牙鲈精子对 pH的适应范围较广, pH 4~12 都可以被激活。在 pH 4-8的范围内, 精子的活力随 pH的增加逐渐升高, pH 4时精子的平均活力为 47.89%; pH 8时, 精子的活力最高, 平均达到 (89±3.33)%。此后随着 pH的继续增加, 精子的活力逐渐下降, 当 pH增加至 12时, 精子的平均活力仍可达到 60%(图 2)。

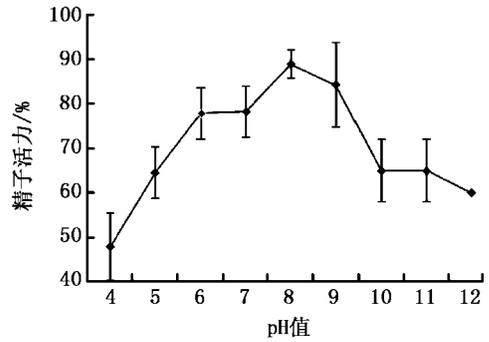


图 2 pH值与精子活力间的关系  
Fig 2 Relationships between pH and sperm motility

### 2.1.3 保存温度对精子活力和寿命的影响

在低温下, 0~3 d内精子活力从 93%下降到 76.67%; 3 d以后精子活力快速下降, 从 76.67%下降到第 6天的 5%, 7 d后精子完全失去活力(图 3)。而在室温下, 0~3 d内精子活力从 93%下降到了 5%, 下降速率远远快于低温保存下的精子。室温下 4 d时精子完全丧失活力(图 3)。

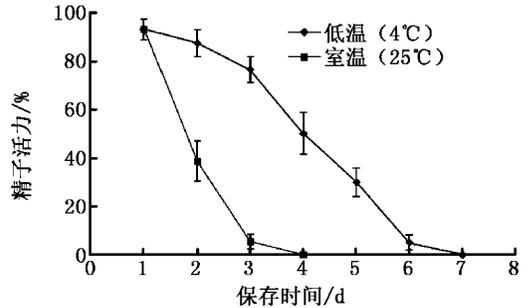


图 3 不同保存温度下精子活力与时间的关系  
Fig 3 Relationships between motility and storing time under different temperature

在低温和室温条件下, 精子寿命随着保存时间的延长逐渐缩短(图 4)。0~3 d内, 低温下保存的精子, 寿命从 23 min缩短到 15 min; 3 d后精子寿命从 15 min缩短为 2 min; 7 d后精子完全失去活力。在室温下, 0~3 d内精子寿命从 23 min缩短到 3 min; 缩短速率快于低温保存下的精子。4 d时精子寿命降为 0 min。

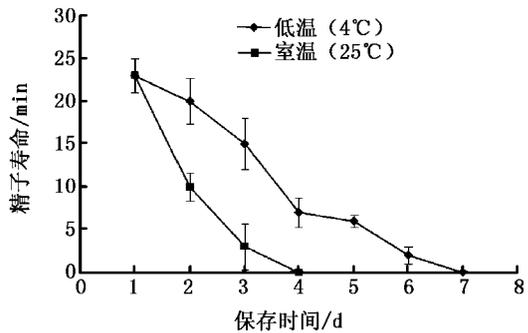


图 4 不同保存温度下精子寿命与时间的关系  
Fig 4 Relationship of life span and storing time under different temperature

## 2.2 褐牙鲈精子的超低温冷冻保存

### 2.2.1 保存液与解冻后精子活力间的关系

以 S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>和 16%不同的抗冻剂作为冷冻保存液对褐牙鲈精子进行超低温冷冻保存, 解冻后精子的活力如图 5所示: 其中以 S<sub>3</sub>+16% DMSO 作为冷冻保存液时, 解冻后精子的活力明显高于用 PG、EG和 G<sub>1</sub>保存的精子, 其活力可以达到 (84±3.67)%。此外当以 S<sub>3</sub>作为稀释液所获得的冻精活力明显比以 S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>4</sub>为稀释液时所获得活力要高。

### 2.2.2 抗冻剂对精子活力的影响

抗冻剂与解冻后精子活力和精子寿命密切相关。从图 6中可以看出, 抗冻剂对精子的冷冻保存效果是随着抗冻剂浓度升高保存效果增强, 冻后精子的活力升高。当 DMSO、EG、G<sub>1</sub>的浓度为 16%时保存效果依次为 DMSO>EG>G<sub>1</sub>。冻精活力分别达到 (84±3.67)%、(71.33±4.44)%、(60±3.67)%、(63.33±6.33)%; EG则在 12%时获得最好的冻精活力 (73.33±7.67)%。当抗冻剂的浓度超过 16%时, 随着浓度的增加冷冻精子的活力下降。浓度达到 32%时, 除 DMSO还有少量的精子存活以外, 其他抗冻剂保存的精子全部没有存活。

冷冻后精子的寿命和冷冻保存液中抗冻剂的种类和浓度密切相关。从图 7可以看出, 褐牙鲈精子冷冻后的寿命随着抗冻剂浓度的升高而延长, 当抗冻剂的浓度分别达到 24%时, 精子的寿命达到最长,

其中 DMSO 保存的精子寿命可达  $(23.67 \pm 0.89)$  min 而 Gly 保存的精子, 寿命仅为  $(9.88 \pm 1.67)$  min。当抗冻剂的浓度超过 24%, 冷冻后精子的寿命迅速下降, 当抗冻剂浓度达 32%, 以 EG 和 Gly 保存的冻后精子活力和寿命降为 0。

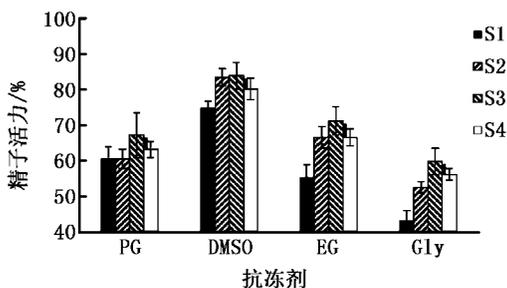


图 5 不同保存液对精子活力的影响

Fig 5 Effects of cryoprotectants on sperm motility under different diluters

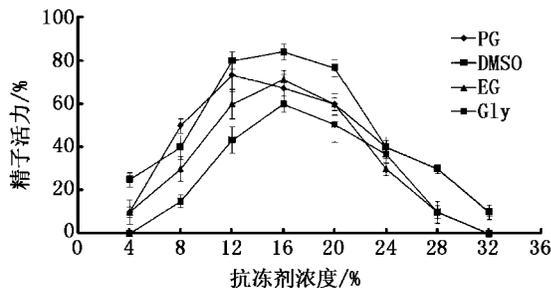


图 6 抗冻剂浓度对精子活力的影响

Fig 6 Relationships between cryoprotectant concentration and the sperm motility

## 3 讨论

### 3.1 褐牙鲈精子生理特性

在鱼类的繁殖中精子的质量至关重要, 精子的活力是决定精子受精能力的主要因素, 也是判断精子质量的重要指标之一<sup>[10]</sup>。精子离体后, 其中影响较大的环境因子有盐度、温度和 pH 值。褐牙鲈精子在盐度为 5 到 60 的海水中均有活力, 当海水盐度为 35 精子活力最好。褐牙鲈精子对 pH 值也具有较强的适应性, 在 pH 4.0 和 pH 12.0 的海水中, 精子的活力在 50% 以上, 最适宜的 pH 值为 8.0。这与检测到褐牙鲈生活环境中的盐度 (31), pH 值  $(7.90 \pm 0.26)$  非常相近。通过褐牙鲈精子生理特性研究, 褐牙鲈具有广盐性鱼类的特征, 可进行淡化并在低盐度的条件下养殖, 以便扩大养殖范围和规模, 为褐牙鲈的养殖开辟新的空间。

温度对精子的作用主要通过低温使精子消耗的 ATP 减少而延长精子运动时间<sup>[11]</sup>。褐牙鲈精子低温短期保存试验也表明, 低温下精子成活时间比室温下长。牛从从<sup>[12]</sup>等对单环刺螭虫精子 (*Urechis uniconctus*) 的研究也表明, 低温可以有效延长精子的运动时间。褐牙鲈精子, 在适宜的盐度和 pH 范围内, 激活后精子寿命可达 23 min (25 °C), 与大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 22 min<sup>[10]</sup>、厦门文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 21 min<sup>[13]</sup>、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 27 min<sup>[14]</sup> 等海水鱼精子的寿命相近。

### 3.2 褐牙鲈精子的超低温冷冻保存

#### 3.2.1 稀释液

鱼类精子离体后由于环境不适、营养的消耗、代谢产物积累等原因, 会很快死亡。人们通过配制适宜的稀释液的方式来延长其体外的成活时间<sup>[15]</sup>。为了提高精子冷冻保存的成活率, 通过模拟其体液<sup>[16-17]</sup>和根据精浆的成分和精浆的渗透压以及各种生理盐溶液、营养液等配制各种各样的稀释液<sup>[15]</sup>来稀释和保存离体的精液。在精子的冷冻保存过程中添加稀释液和抗冻剂组成的冷冻保存液是为了保证在冷冻过程中防止大的冰晶形成, 降低胞内溶质的浓度, 尽可能减少精子的冷冻损伤, 使精子经冷冻保存后, 获得高的成活率。

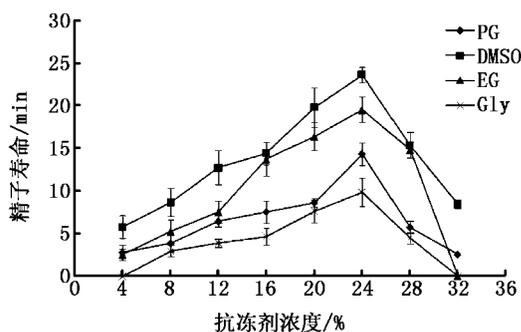


图 7 抗冻剂对精子寿命的影响

Fig 7 Relationships between cryoprotectant concentration and life span

本实验的4种稀释液,是根据文献中所涉及不同种类的海水鱼稀释液及根据作者所测到的褐牙鲷精浆成分进行了改进配制而成,盐度相同,均为10。四种稀释液的差别在于其中 $K^+$ 的浓度, $K^+$ 浓度分别为8、16、24、32 mmol/L。只有 $K^+$ 浓度达到24 mmol/L时,冻后的精子活力较好。而精浆中 $K^+$ 浓度为 $(27 \pm 3)$  mmol/L。稀释液中 $K^+$ 浓度与精浆相近的时候可以取得最佳的保存效果。说明稀释液中 $K^+$ 能起到抑制精子活力的作用,这与Morisawa等<sup>[18]</sup>研究的 $K^+$ 能抑制鲑鳟鱼类精子的活动是一致的。Scheuring<sup>[19]</sup>首次观察到虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)精子在高浓度的 $K^+$ 离子溶液中活力被抑制,Benau and Temer<sup>[20]</sup>发现通过稀释或透析方法降低精浆中的 $K^+$ 浓度可以使大麻哈鱼[*Oncorhynchus keta* (Walbaum)]精子被激活,Billard<sup>[21]</sup>发现稀释液中 $K^+$ 浓度大于精浆中的 $K^+$ 浓度可以抑制大麻哈鱼精子活力<sup>[21]</sup>,刘鹏等<sup>[22]</sup>的研究也发现 $K^+$ 可以抑制西伯利亚鲟精子的活力。由此可见,稀释液中添加高浓度的 $K^+$ 可以达到抑制精子新陈代谢,提高冻后精子活力的目的。而Zhang等<sup>[6]</sup>的研究中,稀释液中 $K^+$ 浓度远远低于褐牙鲷精浆中的浓度,这也可能是其结果相对较低的原因。

### 3.2.2 抗冻剂

细胞冻融过程中,胞内及胞间极易产生冰晶,能损伤各种膜结构的细胞器。对于精子来说,尤为重要是线粒体。若冰晶造成线粒体破损,则精子失去活动的能量来源,导致功能的丧失。通过添加冷冻保护剂或其它添加剂,可以达到抑制或降低冰晶形成,有效地减少精子的损伤<sup>[1]</sup>。单一的抗冻剂各有优缺点,H<sup>[23]</sup>对条纹狼鲈的研究中发现提高DMSO浓度可更好地保护质膜,但线粒体会受到伤害。结合冷冻保存后膜系统及线粒体结构和功能变化,筛选出合理的抗冻剂是提高冷冻保存精子成活率的一条有效途径。

目前,常用的冷冻保护剂主要有DMSO、EG、GLY、PG等,大多属于渗透型冷冻保护剂<sup>[24]</sup>,此类冷冻保护剂在溶液中易结合水分子,发生水合作用,使溶液的粘性增加,从而弱化了水的结晶作用,减少了冰晶的形成,达到保护冻存精子的目的。但对于不同的冷冻保护剂,使用浓度、对细胞膜的渗透能力、对水分子的水合作用等各不相同。DMSO的渗透性强,亲水性好,能与电解质螯合,从而降低细胞内电解质的浓度,使细胞内保持水分,但对细胞却具有毒性<sup>[25-26]</sup>。从本实验中也可以看出当抗冻剂的浓度为16%时冻后精子可以获得最大的活力,当抗冻剂的浓度达到24%时,虽然解冻后精子拥有最长的寿命,但冻后精子的活力仅为40%左右。抗冻剂的浓度过高时,就会对精子产生毒性作用,导致精子的活力和寿命快速下降(图7)。

近年来报道中,GLY作为抗冻保护剂已被应用于白鲑(*Coregonus lavaretus* L.)、红点鲑(*Salvelinus japonicus* Oshina)等冷水鱼类精子及太平洋鲱(*Clupea pallasii* Valenciennes)、鳕鱼(*Gadus macrocephalus* Tilesius)、黑鲷[*Sparus macrocephalus* (Basilewsky)]、真鲷[*Pagrus major* (Temminck et Schlegel)]等海水鱼类的精液冷冻保存,并被证明是一种有效的抗冻保护剂,DMSO是淡水鱼类精液冷冻保存有效的抗冻保护剂<sup>[24]</sup>。而在本试验中,褐牙鲷最佳的抗冻效果由DMSO获得。分析发现,DMSO由于有较佳的渗透能力被人们作为主要的抗冻剂之一,但由于其对细胞的毒性较大,因此一般用于快速冷冻过程,这样可以减小对细胞毒害作用。而GLY虽然对细胞的毒性较小,但渗透性较差,多用于慢速冷冻过程<sup>[19]</sup>,在褐牙鲷精子的超低温冷冻保存中,运用快速降温方法,这是导致用GLY保存的褐牙鲷精子解冻后活力较差的原因。

抗冻剂的浓度与冻后精子的活力和寿命密切相关,研究表明20%的甘油作为大黄鱼精子超低温冷冻保存的抗冻保护剂比使用10%的DMSO效果好,解冻后精子的成活率高<sup>[10]</sup>。太平洋鲱、鳕鱼和黑鲷分别使用12.5%、33.8%和17.0%的GLY作为抗冻保护剂<sup>[26]</sup>,条纹狼鲈[*Morone saxatilis* (Walbaum)]和尖吻鲈[*Lateolabrax japonicus* (Bloch)]以5%的DMSO作抗冻剂<sup>[27-29]</sup>,虹鳟以10%的DMSO作抗冻剂<sup>[30]</sup>,冷冻锦鲤(*Cyprinus carpio* L.)精液时DMSO浓度则高达65%<sup>[31]</sup>。而日本鳗鲡(*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel)精子在分别以12%的DMSO、8% GLY、12%的EG和12%的PG为抗冻剂的时候均有最高的活力<sup>[32]</sup>。不同鱼类的精子,在抗冻剂的种类和浓度选择上各不相同,即使同为海水或者同为淡水鱼类,不同种鱼的精子,其抗冻保护剂种类和浓度也不尽相同。而在本实验中也可以看出,当

DMSO的浓度为 16%时,冻后精子才能获得最大的活力。但当 DMSO的浓度达到 24%时,冻后精子寿命达到最长。

本实验所获得的褐牙鲈精子的冻后活力 ( $84 \pm 3.67\%$ ),高于黑鲟的  $59.81\%$ 和石鲮的  $71\%$ ,与大黄鱼的冻后精子活力 ( $89.5 \pm 4.2\%$ )相近<sup>[19]</sup>。此外,也高于 Zhang等<sup>[6]</sup>所作的褐牙鲈精子的冻后精子活力 ( $79.17 \pm 4.5\%$ )。本实验采用的是快速冷冻法,与 Zhang等<sup>[6]</sup>的研究中使用的分步平衡法不同。这也许也是本实验最后最终选择 DMSO作为抗冻剂,而不是 Glycerol的原因。

## 参考文献:

- [1] 李广武,郑从义,唐兵.低温生物学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1998
- [2] Tiersch TR, Mazik PM. Cryopreservation in Aquatic Species[M]. World Aquaculture Society Baton Rouge, Louisiana, USA, 2000.
- [3] 庄平,王幼槐,李圣法,等.长江口鱼类[M].上海:上海科学技术出版社,2006:348-374
- [4] 傅荣兵,柳敏海,罗海忠,等.舟山褐牙鲈亲鱼驯养、中间培育和促熟技术[J].水产养殖,2007,28(4):20-21
- [5] 季相山,陈松林,赵燕,等.石鲮、牙鲈精子冷冻保存研究及其在人工杂交中的应用[J].海洋水产研究,2005,26(1):13-16
- [6] 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(5): 989-996
- [7] 柳敏海,陈波,罗海忠,等.舟山褐牙鲈 [*Paralichthys olivaceus* Temminck & Schlegel]人工育苗技术初步研究[J].现代渔业信息,2006,21(9):24-26
- [8] Morisawa M, Morisawa S, Santis R D. Initiation of sperm motility in *Ciona* in testis by calcium and cyclic AMP[J]. Zool Sci, 1984, 1: 237-244
- [9] 苏天凤,艾红.鱼类精子活力及其超低温保存研究综述[J].上海水产大学学报,2004,13(4):343-347
- [10] 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
- [11] Billard R, Cosson P. Some problems related to the assessment of sperm of sperm motility in freshwater fish[J]. J Exp Zool, 1992, 61: 122-131
- [12] 牛从从,张志峰,邵明瑜.单环刺蛾虫精子生物学特性和环境因子的关系[J].中国水产科学,2005,12(5):556-561
- [13] 方永强,齐襄,洪桂英,等.不同海水盐度和 pH 对文昌鱼精子寿命的影响[J].台湾海峡,1990,9(1):73-77
- [14] 赵会宏,刘晓春,林浩然,等.斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、湿度、pH 对精子活力及寿命的影响[J].中国水产科学,2003,10(4):286-292
- [15] 陈松林,田永胜,李军,等.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,2007:32-33
- [16] Chao N H, Chao W C, Liu K C, et al. The biological properties of black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) sperm and its cryopreservation[J]. Proc Natl Sci Counc Repub China B, 1986, 10(2): 145-149
- [17] Ritar A J, Campbell M. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped mullet (*Larix lineata*) [J]. Theriogenology, 2000, 54(3): 467-480
- [18] Tanino O, Morisawa M. Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout [J]. Dev Growth Differ, 1988, 30: 117-124
- [19] Scheuring L. Biologische und physiologische Untersuchungen an Forellensperm [J]. Arch Hydrobiol, 1925, 4: 187-318
- [20] Benau D, Tener C J. Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa [J]. Gamete Res, 1980, (3): 247-257
- [21] Billard R, Cosson J, Percec G, et al. Sperm physiology and quality [M] // Bromage N R, Roberts R J, Ed. Brood stock management and egg and larval quality. Blackwell Science, 1995: 25-52
- [22] 刘鹏,庄平,章龙珍,等.人工养殖西伯利亚鲟精子超低温冷冻保存研究[J].海洋渔业,2007,29(2):120-127
- [23] He S Y, Woods L C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycerol on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm [J]. Cryobiology, 2004, 48: 254-262
- [24] Cabrera E, Alvarez R, Anel L, et al. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm [J]. Cryobiology, 1998, 37: 245-253
- [25] 柯亚夫,蔡难儿.中国对虾精子超低温冷冻保存的研究[J].海洋与湖泊,1996,27(2):187-193
- [26] 章龙珍,刘宪亭,陈松林,等.二甲亚砜对几种淡水鱼精子渗透压及成活率影响的研究[J].水生生物学报,1994,18(4):297-302
- [27] 张轩杰.鱼类精液超低温冷冻保存研究进展[J].水产学报,1987,9(3):259-267
- [28] 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(2):97-104
- [29] Gwo J C, Suawnb K, Longnecker M T, et al. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa [J]. Aquaculture, 1991, 94: 355-375
- [30] Baynes S M, Scott A P. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post thaw fertility [J]. Aquaculture, 1987, 66: 53-67
- [31] Palmer P J, Blackshaw A W, Garrett R N. Successful fertility experiments with cryopreserved spermatozoa of Bartramundi Lates cajarifer (*Bloch*), using Dimethyl Sulfoxide and glycerol as cryoprotectants [J]. Reprod Fertil Dev, 1993, 5: 285-293
- [32] 黄晓荣,章龙珍,乔振国,等.抗冻剂对日本鳗精子活力及运动时间的影响[J].海洋渔业,2007,29(3):193-199