

## 软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存

王晓爱<sup>1,2</sup>, 杨君兴<sup>1,\*</sup>, 陈小勇<sup>1,\*</sup>, 潘晓赋<sup>1</sup>, 李再云<sup>1</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 2011年, 对软鳍新光唇鱼 (*Neolissochilus benasi*)进行了精子超低温冷冻保存研究。以解冻后的精子活力为指标, 采用稀释液 D-15, 设计不同的抗冻剂种类和浓度, 以及不同的实验条件(包括冷冻体积、4 °C平衡时间和解冻温度等)探索软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存方法。筛选出了适合软鳍新光唇鱼精子超低温冷冻保存的两种抗冻保护剂及其浓度分别为 10% MeOH 和 15% EG, 确定了精液与稀释液的最适稀释比例为 1:7, 4 °C平衡时间区间为 10~60 min、冷冻体积为 60 μL, 以及复苏方法为 37 °C水浴快速解冻 30 s。当鲜精活力为(62.33±2.05)%, 综合以上最佳实验条件进行保存, 解冻后精子的最高活力为(29.67±0.47)%, 但效果不理想, 不能达到广泛生产运用水平; 产生这一结果, 可能与异地保育物种的饲养管理有关。因此, 在亲鱼培育管理中要最大限度地降低捕获诱发的压力, 尽量提供适合的养殖条件。在珍稀鱼类异地保育时, 繁殖用雄鱼的培育与雌鱼同等重要, 是获得大量高质量仔鱼的关键。

**关键词:** 软鳍新光唇鱼; 精子; 超低温冷冻保存; 活力

中图分类号: Q959.468; Q954.43; Q492 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2012)03-0283-07

## Cryopreservation of sperm from *Neolissochilus benasi*

WANG Xiao-Ai<sup>1,2</sup>, YANG Jun-Xing<sup>1,\*</sup>, CHEN Xiao-Yong<sup>1,\*</sup>, PAN Xiao-Fu<sup>1</sup>, LI Zai-Yun<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Genetic resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Cryopreservation of sperm from *Neolissochilus benasi* was studied in 2011. The effects of various cryoprotectants of different concentrations, dilution ratios of milt to extender, storage volume and thawing temperature on motility of post-thawing of spermatozoa were examined to optimize cryopreservation procedures. Semen was stored in liquid nitrogen in 1.8 mL cryovial for 24 h, and the intensity of sperm motility was measured before and after cryopreservation. Post-thawing motility of frozen sperm obtained with cryoprotectants 10% MeOH or 15% EG were higher than for others. The most effective dilution ratio of milt to extender is 1:7. The maximal storage volume is 60 μL of 1.8 mL cryovial and the optimal sperm equilibration period in the extender D-15+10% MeOH was between 10-60 min. Thawing was optimal in a 37 °C water bath. When fresh sperm motility is (62.33±2.05)%, this cryopreservation protocol resulted in frozen-thawed semen with 20%-30% motile. The overall effect is not ideal, and cannot achieve extensive application. Different breeding management of different ground protection may have contributed to this result. Therefore, it is necessary to reduce stress capture induced in management of parent fish and provide suitable forming conditions. In the ex situ conservation of rare fish the broodstocks management of males is as important as that for females and the key to obtaining high quality larval fish.

**Key words:** *Neolissochilus benasi*; Sperm; Cryopreservation; Motility

动物种质资源(精子、卵细胞和胚胎)包含了物种的全部遗传物质, 而遗传物质决定了物种的多样性。种质资源亦是水产养殖生产、优良品种培育及水产养殖业可持续发展的重要物质基础。然而, 由

于忽视鱼类种质保护及品种选育等工作, 养殖鱼类近亲交配越来越严重, 造成种质退化, 遗传多样性减少, 病害发生日益严重, 经济损失巨大(Li, 2001)。因此, 培育优良水产养殖品种, 保护种质及其遗传

收稿日期: 2011-11-04; 接受日期: 2012-02-14

基金项目: 云南大唐国际李仙江流域水电开发有限公司委托项目; 国家电力云南阿墨江发电有限公司委托项目

\*通信作者(Corresponding author), 杨君兴 E-mail: yangjx@mail.kiz.ac.cn; 陈小勇 E-mail: chenxy@mail.kiz.ac.cn

多样性已成为水产养殖业中亟待解决的重要科技问题。

目前鱼类的种质细胞保存中,精液保存是重要组成部分之一(Chen, 2007)。自20世纪50年代初首次成功冷冻保存大西洋鲱(*Clupea harengus*)精巢以来(Blaxter, 1953),世界各国学者对鱼类配子的冷冻保存进行了大量研究,从稀释液的选择(Gallant et al, 1993)、保护剂的使用浓度(Kopeika et al, 2003; Muchlisin, 2005)、不同冷冻保护剂的配合、平衡时间(He & Woods, 2003)、降温速率、解冻方式及复温速率(Tiersch et al, 2007),到先进低温仪器设备的研制和利用等方面解决了不同生物材料的超低温冷冻保存问题(Leung & Jamieson, 1991; Li et al, 1998)。目前,已经报道了200余种鱼类精子冷冻保存的研究,形成了60余种淡、海水鱼类精液成熟的冷冻保存技术,并建设了首个淡水鲤科鱼类冷冻精子库(Chen, 2007)。

软鳍新光唇鱼(*Neolissochilus benasi*)(Pellegrin & Chevey, 1936),旧称软鳍四须鲃(*Barbodes benasi*),隶属于鲤科(Cyprinidae)鲃亚科(Barbinae)新光唇鱼属(*Neolissochilus*),有关软鳍新光唇鱼的研究主要集中在其分类地位上(Chen & Yang, 2003),在精子冷冻方面未见有报道。随着中国境内红河水电的开发,对河道内多种珍稀土著鱼类产生了诸多的不利影响(Yang et al, 2011)。因此,云南大唐国际李仙江流域水电开发有限公司和国家电力云南阿墨江发电有限公司委托中国科学院昆明动物研究所开展了软鳍新光唇鱼、异鱲(*Parazacco spilurus*)、越鱧(*Mystus pluriradiatus*)和暗色唇鱼(*Semilabeo obscurus*)的人工增殖放流研究(Yang et al, 2010; Yang et al, 2011)。在长期的塘养环境下,塘养种群会发生遗传适应性变化,从而导致放流的鱼类个体相对野生个体具有更低的繁殖成功率(Fleming & Gross, 1993);而很多的研究报道将造成这一结果的原因归结于环境的改变,而这种环境改变对塘养环境下雌鱼所产鱼卵质量造成的影响更能引起人们的广泛关注(Pan et al, 2009)。在鱼类塘养种群遗传管理实践中,精子低温和超低温冷冻保存能有效地“延长”繁殖个体的繁殖寿命,并在塘养种群的世代数最小化方面显示出很广泛的应用潜力,但该技术仅在一小部分动物物种中使用(Frankham et al, 2002)。目前,鲜见对塘养环境下,异地保育鱼类雄鱼精液品质检测的报道。本研究旨

在通过借鉴其他鱼类精子的冷冻保存操作规程,探索不同抗冻剂及其浓度、稀释比例、冷冻体积和降温速率等对软鳍新光唇鱼精子冷冻保存的影响,确定超低温冷冻保存的最适条件,监测异地保育雄鱼精子品质的变化,最终达到保存软鳍新光唇鱼种质资源的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料选取与处理

1.1.1 亲本来源与饲养方案 实验用的雄鱼系2008年5月采集自云南李仙江流域,饲养在中国科学院昆明动物研究所珍稀鱼类保育研究基地。养殖池塘面积以100~200 m<sup>2</sup>、水深以1.0~1.5 m为宜。软鳍新光唇鱼养殖密度通常要低(<3 kg/m<sup>3</sup>),雌雄比1:1.5。水温在16~25 °C之间,10月到第二年3月光周期(光照:黑暗为10 h:14 h)3—9月(12 h:12 h)。软鳍新光唇鱼是杂食性鱼类使用的饲料为111 鲤鱼种鱼饲料(颗粒直径=2.0 mm,通威股份有限公司昆明分公司)。一天投喂两次,上午和下午各一次。日粮为亲鱼体重的3%左右,每次的投喂量以15~30 min 吃完为度。

1.1.2 精液收集与超低温冷冻 精液收集方法:随机选取24尾性腺成熟的雄鱼[体长(173.0±16.3) mm,体重(89.58±21.5) g]捞出水池,用100×10<sup>-6</sup>的MS-222 (Tricaine, C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>S)麻醉5 min,鱼类腹部用毛巾擦干,然后轻轻挤压腹部,成熟的精液自然流出到1.5 mL离心管中。

精液超低温冷冻方法:选取24尾雄鱼[精子密度为(17.50±2.47)×10<sup>9</sup>个/mL,鲜精的平均活力为(62.33±2.05)%,经检验,个体间鲜精活力差异不显著]个体的精液,混合后用含抗冻保护剂的稀释液,D-15(0.8% NaCl、0.05% KCl、1.5% Glucose)(Chen et al, 1992)稀释成相应比例,以一定体积装入1.8 mL冻存管中,4 °C平衡一段时间,然后将冻存管在液氮面上6 cm放置2 min,液氮面上放置2 min,然后投入液氮中(Chen, 2007)。24 h后,取出液氮中的样品,一定温度水浴解冻30 s。

### 1.2 实验方法

1.2.1 不同抗冻剂及浓度对精子冷冻的影响 选取抗冻剂二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、甘油(Glycerol)、乙二醇(Ethylene glycol, EG)和甲醇(MeOH)等4种,浓度梯度分别为5%、10%和15%,实验选用的稀释比例(精液体积:稀释液体积)为1:7,

冻存体积为 20  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  平衡 40 min 后, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.2.2 稀释比例对精子冷冻的影响 稀释比例(精液体积: 稀释液体积)设为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:7 和 1:9 等 7 个梯度, 抗冻剂为 10% MeOH, 冻存体积为 20  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  平衡 40 min 后, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.2.3 冻存管冻存体积对精子冷冻的影响 冻存体积设为 10、15、20、30、40、50、60、80 和 100  $\mu\text{L}$  等 9 个梯度, 抗冻剂为 10% MeOH, 稀释比例为 1:7, 4  $^{\circ}\text{C}$  平衡 40 min 后, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.2.4 4  $^{\circ}\text{C}$  平衡时间对精子冷冻保存的影响 4  $^{\circ}\text{C}$  平衡时间设为 0、5、10、20、40、60、90、120 min 8 个梯度, 稀释液为 D-15+10% MeOH, 稀释比例为 1:7, 冻存体积为 20  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  平衡 40 min 后, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.2.5 复苏温度对精子冷冻的影响 复苏温度选择 28、32、37 和 40  $^{\circ}\text{C}$  等 4 个梯度, 本实验采用的稀释液为 D-15+10% MeOH, 稀释比例为 1:7, 冻存体积为 20  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  平衡 40 min, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

### 1.3 数据处理

精子密度(sperm density): 用稀释液将精液稀释 200 倍后, 用血球计数板计数精子数量, 再计算出精子密度(Rakitin et al, 1999)。

精子活力(sperm motility): 用淡水激活精子后立即在显微镜下观察运动精子占全部精子的百分数(Mana, 1964; Mounib, 1978)。

先用方差分析(ANOVA)测验每个实验的总体各组之间差异是否显著。若显著, 再用 LSD 多重比较检验处理组之间差异显著性。数据表示均为 mean $\pm$ SD。

## 2 结果

### 2.1 抗冻剂及浓度对精子活力的影响

不同抗冻剂及浓度保存的精子复苏后精子活力均低于鲜精(图 1,  $n=24$ ), 在几种抗冻剂及浓度的组合中, 10% MeOH 和 15% EG 效果最好, 解冻后精子活力最高, 分别为(27.67 $\pm$ 2.05)%和(24.33 $\pm$ 3.30)%;

两者间无显著差异( $P>0.05$ ), 但这两种处理方式与其他的处理方式均有显著差异( $P<0.01$ )。

DMSO 和 Glycerol 为抗冻剂时, 随着浓度的增加, 冻精活力则降低, 而 EG 为抗冻剂时, 随着浓度的递增, 冻精活力随之增高, MeOH 为抗冻剂时, 在浓度为 10% 时出现冻精活力的最大值。

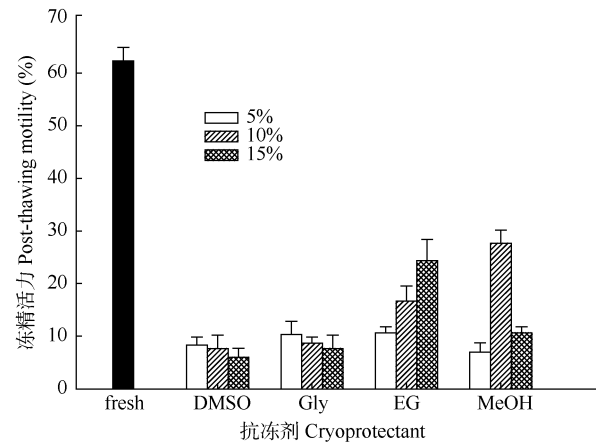


图 1 抗冻剂及其浓度对精子活力的影响  
Fig. 1 The effect of cryoprotectants of different concentrations on sperm motility ( $n=24$ , mean $\pm$ SD) when refrigerated

### 2.2 稀释比例对精子活力的影响

精液量和稀释液配比对精子冻存的影响(图 2,  $n=24$ )结果显示, 在稀释比例为 1:7 时, 解冻后的精子活力最高, 为(19.67 $\pm$ 1.25)%。稀释比例 1:4(17.67 $\pm$ 2.05)%、1:5(18.00 $\pm$ 1.63)%和 1:7 间无显著差异( $P>0.05$ ), 三者与其他各组间均差异显著。

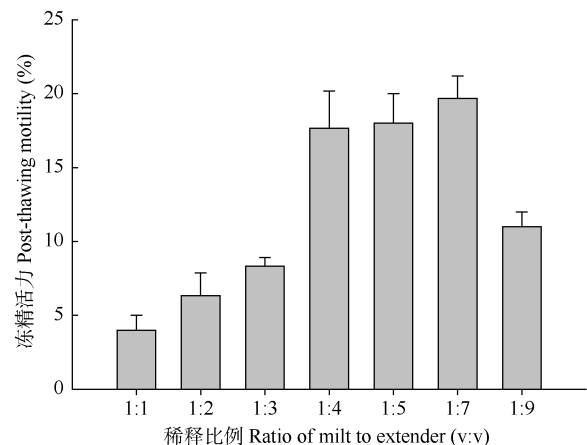


图 2 稀释比例对精子活力的影响  
Fig. 2 The effect of different dilution ratios of milt to extender on sperm motility ( $n=24$ , mean $\pm$ SD) when refrigerated

### 2.3 冻存体积对精子活力的影响

冻存管中保存的精液体积不同,解冻后精子活力有差异(图 3,  $n=24$ ),冻存体积为 60  $\mu\text{L}$  时,解冻后精子活力最高,为  $(29.67\pm 0.47)\%$ ,且 60  $\mu\text{L}$  与 20  $\mu\text{L}$   $(27.33\pm 0.94)\%$ 、30  $\mu\text{L}$   $(27.33\pm 1.89)\%$ 、40  $\mu\text{L}$   $(28.00\pm 1.63)\%$ 、50  $\mu\text{L}$   $(29.33\pm 2.62)\%$ 、80  $\mu\text{L}$   $(28.33\pm 1.25)\%$  之间无显著差异。冻存体积为 10、15 和 100  $\mu\text{L}$  时,解冻后精子活力都较低,分别为  $(9.00\pm 1.41)\%$ 、 $(10.67\pm 1.70)\%$  和  $(15.67\pm 2.33)\%$ 。

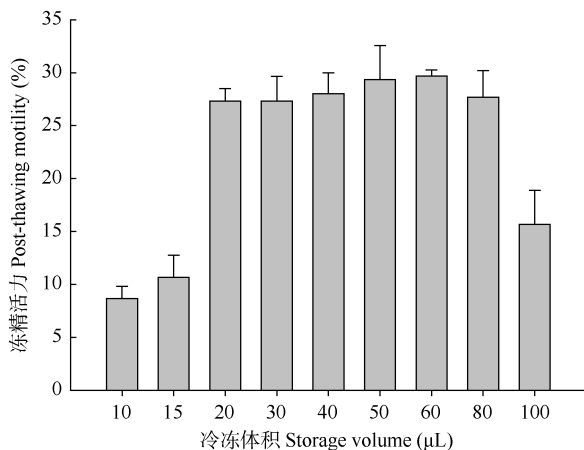


图 3 冷冻体积对精子活力的影响

Fig. 3 The effect of different storage volumes on sperm motility ( $n=24$ , mean $\pm$ SD) when refrigerated

### 2.4 4 $^{\circ}\text{C}$ 平衡时间对冷冻后精子活力的影响

4  $^{\circ}\text{C}$  不同平衡时间,解冻后精子活力结果显示(图 4,  $n=24$ ),平衡时间在 10~60 min 间,冻精平均活力均大于 20.0%;平衡时间 40 min 时,冻精活力最大为  $(25.20\pm 2.20)\%$ ;平衡时间 5 min 与 90 min 间、10 min 与 60 min 间、20 min 与 60 min 间无显著差

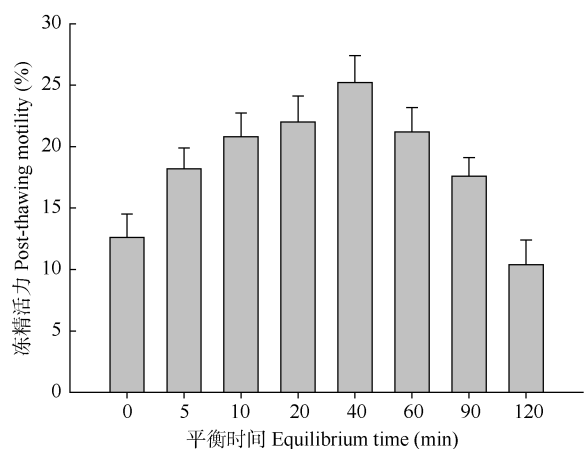


图 4 4  $^{\circ}\text{C}$  平衡时间对精子活力的影响

Fig. 4 The effect of different 4  $^{\circ}\text{C}$  equilibrium time on sperm motility ( $n=24$ , mean $\pm$ SD) when refrigerated

异,平衡时间 0 min 与 120 min 间、5 min 与 60 min 间和 10 min 与 20 min 间差异显著,其它各组间差异极显著。

### 2.5 复苏温度对精子活力的影响

复苏温度对解冻后精子活力的影响(图 5,  $n=24$ ),结果显示:当复苏温度为 37  $^{\circ}\text{C}$  时,复苏后的精子活力最高,为  $(22.80\pm 2.49)\%$ ,其次是 40  $^{\circ}\text{C}$ ,精子活力为  $(21.60\pm 2.91)\%$ ,两者间无显著差异 ( $P>0.05$ ),28  $^{\circ}\text{C}$   $(17.00\pm 2.16)\%$  和 32  $^{\circ}\text{C}$   $(17.33\pm 1.70)\%$  组,差异亦不显著,其余各组差异极显著。

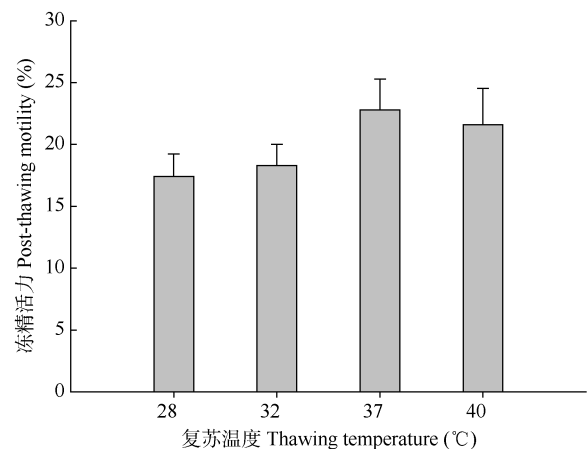


图 5 复苏温度对精子活力的影响

Fig. 5 The effect of different thawing temperatures on sperm motility ( $n=24$ , mean $\pm$ SD) when refrigerated

## 3 分析与讨论

### 3.1 稀释液对精子活力的影响

Chen et al (1992)对我国主要淡水鲤科养殖鱼类草、鲢、鳙和团头鲂等鱼类精液冷冻保存技术进行了深入系统地研究,研制出理想的稀释液配方,即 D-15,获得冷冻精子活力高达 70%、受精率高达 94%和孵化率高达 92%的结果,达到了生产应用水平。因此,本研究中选择 D-15 作为软鳍新光唇鱼精子冷冻的稀释液,但效果不理想,不能达到生产运用水平;产生这一原因,可能与异地保育的饲养管理有关。由于实验用软鳍新光唇鱼鲜精的平均活力为  $(62.33\pm 2.05)\%$ ,较鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)(Chen et al, 1992)的鲜精活力低,加上所用鱼类采自野外,经过短暂的池塘饲养,还未建立系统的亲鱼培育技术体系。因此,在亲鱼培育管理中要最大限度地降低捕获诱发的压力,尽量提供适合的养殖条件。

抗冻保护剂的种类和浓度是影响一些敏感细胞(如精子等)超低温冷冻保存的重要因素。由于不同种类鱼类精子的生理特性具有很大差异。因此, 确定最适的抗冻剂种类和浓度非常重要。DMSO、Glycerol、EG 和 MeOH 是较为常见的 4 种渗透性抗冻剂。DMSO 因其高渗透性和易与精子膜上磷脂层发生相互作用而被广泛应用于多种鱼类精子冷冻(Cabrita et al, 2010), Glycerol 主要用于海水鱼类精子冷冻保存(Zhang et al, 2003), EG 和 MeOH 应用于少数水生生物精子冷冻也取得了较好的抗冻效果(Harvey et al, 1982; Horvath et al, 2008)。因抗冻剂的毒性会随着其浓度升高而增强(Ye et al, 2009), 因此, 所用抗冻剂浓度一般不会超过 15%(Lahnsteiner & Mansour, 2008), 故本研究中抗冻剂的浓度最高为 15%。随着 DMSO 和 Glycerol 浓度的增加, 软鳍新光唇鱼冻精活力呈下降趋势, 且各种浓度下, 冻精活力均在较低水平, 而 MeOH 在浓度为 10% 时出现最大值, 这与北极嘉鱼和淡水鳕两种淡水鱼类的精子冷冻结果相似(Mansour et al, 2006; Lahnsteiner & Mansour, 2008), 可能是在平衡时间为 40 min 的前提下, 10% 这个浓度既能使 MeOH 渗入细胞起到保护作用, 毒性又不会太高。对于 EG, 随着浓度增高, 冻存效果越好, 当浓度达到 15% 时, 冻存效果最佳。

精液获取之后, 需要采用稀释液稀释以获得实验所用的大量精液, 然而在牡蛎、鱼类和哺乳动物精液稀释过程中, 稀释倍数太大会导致精子活力下降(Paniagua et al, 1998)。因此, 最适的稀释比例也是影响冻精活力的一个重要因素。对于多数淡水鱼类, 其精液与稀释液的最佳稀释比例在 1:2 与 1:10 之间(Tiersch, 2007; Cabrita et al, 2010)。软鳍新光唇鱼精子冷冻的最适稀释比例 1:7 亦在此范围内。

### 3.2 冷冻体积与平衡时间对精子活力的影响

冻存管冷冻法具有经济、降温速率易于控制、操作简单、快速和装精容量大等优点(Chen et al, 1987), 而冷冻体积对精子冷冻的影响主要通过降温速率和解冻条件来实现(Ritar & Campet, 2000)。软鳍新光唇鱼精子冷冻体积在 20~80  $\mu\text{L}$  区间内, 解冻后精子活力无显著差异, 说明在三步降温法和 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴解冻 30 s 的情况下, 冷冻体积不是影响软鳍新光唇鱼冻精活力的重要因素。

冷冻前, 为了让渗透性抗冻剂渗入精子起到保护作用所用的时间就是平衡时间, 平衡温度一般在 4~15  $^{\circ}\text{C}$  间, 温度低有利于减小抗冻剂对精子的毒

性, 温度高则能够提高抗冻剂渗入速率(Lahnsteiner et al, 2000)。对于不同的渗透性抗冻剂及浓度, 因其渗透性和对精子毒性的不同, 平衡时间亦不同, 一般鱼类精子的平衡时间多控制在 10~20 min (Billard, 2001)。4  $^{\circ}\text{C}$  平衡时间在 10~60 min 间, 软鳍新光唇鱼冻精活力无显著差异, 说明对软鳍新光唇鱼的精子而言, 抗冻剂为 10% MeOH 时, 平衡时间不是影响冻精活力的重要因素。

### 3.3 解冻速度对精子活力的影响

解冻是冷冻降温的逆步骤, 冷冻降温中出现的一些冷冻损伤效应在解冻复温中同样存在, 因此, 快速解冻以度过损伤敏感区是必要的(Li et al, 1998)。鱼类冷冻精液的解冻速度和解冻效果之间的关系在不同种类中有所差别, 鲤科鱼类所报道的解冻温度区间为 20~50  $^{\circ}\text{C}$ , 比较常用的是 30~40  $^{\circ}\text{C}$  水浴, 冻存管解冻时间在 20~45 s 间(Lahnsteiner et al, 2000), 而麦管解冻时间一般是 10 s 左右, 如剑尾鱼的最适解冻方法为 40  $^{\circ}\text{C}$ 、7 s(Dong et al, 2008)。本研究结果表明水浴 37  $^{\circ}\text{C}$ , 冻精活力最高, 效果最佳, 但与 40  $^{\circ}\text{C}$  间并无显著差异, 可能是因为解冻时间都为 30 s, 足以让其充分解冻又不至于温度过高而影响精子活力。

### 3.4 精子超低温冷冻效果评价

精子在冷冻过程中, 冷冻损伤造成部分精子头部和尾部的质膜破裂, 细胞死亡(Zhao et al, 1992), 使冷冻精子内异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、激酶及 ATP 酶的含量明显低于鲜精(Maisse, 1994)。因此, 冷冻精液的活力与质量很难达到鲜精的水平。即使鲜精活力差异不显著, 不同物种间解冻后精子活力仍存在差异, 三种鱼类模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)和剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)解冻后精子活力差异显著(Yang & Tiersch, 2009), 在斑马鱼中, 不同个体间在鲜精活力(91 $\pm$ 3)%无显著差异的前提下, 解冻后精子活力却差异显著, 在 10%~60%区间内变动, 受精率在 0%~18%区间内变化(Yang et al, 2007), 且精子活力与受精率间不一定存在相关性(He & Woods, 2004), 所以相对较低的冻精活力并不意味着低的受精率, 这一点将在以后对软鳍新光唇鱼的研究中阐述。

## 4 结 论

对于软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存, 本

研究以冻精活力为指标,采用D-15为稀释液,所得的最佳冷冻保存方案为:抗冻剂为10% MeOH或15% EG,精液与稀释液的稀释比例为1:7,4℃平衡时间区间为10~60 min,冻存管冻存体积为60 μL,解冻方法为37℃水浴30 s快速解冻。以后的研究将增加更多指标,如膜完整率、受精率和孵化率等,探索更多因素,如渗透压、离子浓度对精子冷冻的

影响,以改善软鳍新光唇鱼精子的冷冻保存技术,以期达到应用水平。

**致谢:**中国科学院昆明动物研究所生殖生物学组的司维和王鑫轶在实验操作中给予悉心指导,珍稀鱼类保育基地的杨世论、倪仰居、施丛永和施茂在实验过程中给予诸多帮助,在此一并表示感谢!

## 参考文献:

- Billard R, Zhang T. 2001. Techniques of genetic resource banking in fish [M] // Walson PF, Holt WV. Cryobanking the Genetic Resource Wildlife Conservation for the Future. New York: Yaylor & Franeis, 143-170.
- Blaxter THS. 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring[J]. *Nature*, **172**(4391): 1189-1190.
- Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives[J]. *J Appl Ichthyol*, **26**(5): 623-635.
- Chen SL, Liu XT, Lu DC, Zhang LZ, Fu CJ, Fang JP. 1992. Cryopreservation of spermatozoa of siler carp, comon carp, blunt snout bream and grass carp[J]. *Acta Zool Sin*, **38**(4): 413-424. [陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 章龙珍, 傅朝君, 方建平. 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.]
- Chen SL, Zhang LZ, Guo F. 1987. The research of DMSO effects of Chinese carp[J]. *Freshwat Fish*, **17**(5):17-20. [陈松林, 章龙珍, 郭峰. 1987. 抗冻剂二甲亚砷家鱼精子生理特性影响的初步研究. *淡水渔业*, **17**(5): 17-20]
- Chen SL. 2002. Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos[J]. *J Fish Chn*, **26**(2): 161-168. [陈松林. 2002. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望. *水产学报*, **26**(2): 161-168.]
- Chen SL. 2007. Theory and Techniques of Fish Spermatozoa and Embryos Cryopreservation[M]. Beijing: China Agriculture Press. [陈松林. 2007. 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]
- Chen XY, Yang JX. 2003. A systematic revision of "Barbodes" fishes in China[J]. *Zool Res*, **24**(5): 377-386.
- Dong Q, Huang C, Hazlewood L, Walter R.B, Tiersch TR. 2008. Sperm cryopreservation for live-bearing fishes of the genus *Xiphophorus* [M] //Cabrita E, Vanesa R, Herraez P. Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species: Biology series. London: CRC Press, 339-344.
- Fleming IA, Gross MR. 1993. Breeding success of hatchery and wild coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in competition[J]. *Ecol Appl*, **3**(2): 230-245.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to Conservation Genetics[M]. 2nd Ed. Cambridge UK: Cambridge University Press, 1-618.
- Gallant RK, Richardson GF, McNiven MA. 1993. Comparison of different extenders for the cryopreservation of atlantic salmon spermatozoa[J]. *Theriogenology*, **40**(3): 479-486.
- Harvey B, Kelley NR, Ashwood-Smith MJ. 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol[J]. *Can J Zool*, **60**(8): 1867-1870.
- He SY, Woods LC. 2003. The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass *Morone saxatilis* sperm motility[J]. *J World Aquacult Soc*, **34**(3): 255-265.
- He SY, Woods LC. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, **48**(3): 254-262.
- Horvath A, Wayman WR, Dean JC, Urbányi B, Tiersch TR, Mims SD, Johnson D, Jenkins JA. 2008. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study[J]. *J Appl Ichthyol*, **24**(4): 443-449.
- Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM. 2003. Studies on the toxicity of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol and glycerol to loach (*Misgurnus fossilis*) sperm and the effect on subsequent embryo development[J]. *Cryoletters*, **24**(6): 365-374.
- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes[J]. *Theriogenology*, **54**(9): 1477-1498.
- Lahnsteiner F, Mansour N. 2008. Protocols for the cryopreservation of Salmonidae semen, *Lota lota* (Gadidae) and *Esox lucius* (Esocidae) Northerpike (Livro)[M]//Cabrita E, Robles V, Herraez MP. Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species: Biology series. London: CRC Press (Taylor and Francis group), 373-384.
- Leung LKP, Jamieson BGM. 1991. Live preservation of fish gametes [M] //Jamieson BGM. Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. London: Cambridge University Press, 245-269
- Li GW, Zheng CY, Tang B. 1998. Cryobiology. Changsha: Hunan: Science and Technology Press. [李广武, 郑从义, 唐兵. 1998. 低温生物学. 长沙: 湖南科学技术出版社]
- Li SF. 2001. A Study on Biodiversity and its Conservation of Major Fishes in the Yangtze River [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1-170. [李思发. 2001. 长江重要鱼类生物多样性和保护研究[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1-170.]
- Maisse G. 1994. Comparison of different carbohydrates for the cryopreservation of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Aquat Living Resour*, **7**(3): 217-219.
- Mann T. 1964. The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract[M]. 2nd Ed. Methuen, London: Wiley, 493.
- Mansour N, Richardson GF, McNiven MA. 2006. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa[J]. *Aquac Res*, **37**(9), 862-868.
- Mounib M. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa[J]. *Reproduction*, **53**(1): 13.
- Muchlisin ZA. 2005. Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation[J]. *Biodiversitas*, **6**(1): 66-69.
- Pan XF, Liu SW, Li ZY, Yang JX. 2009. Artificial propagation and larvae cultivation of *Sinocyclocheilus tingi*[J]. *Zool Res*, **30**(4): 463-467. [潘晓斌, 刘淑伟, 李再云, 杨君兴. 2009. 抚仙金线鲃人工繁殖与鱼苗培育技术. *动物学研究*, **30**(4): 463-467]
- Paniagua-Chavez CG, Buchanan JT, Tiersch TR. 1998. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of Eastern

- oyster sperm[J]. *J Shellfish Res*, **17**(1-3): 231-237
- Rakitin A, Ferguson MM, Trippel EA. 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season[J]. *Aquaculture*, **170**(3-4): 349-358.
- Ritar AJ, Campet M. 2000. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris lineata*)[J]. *Theriogenology*, **54**(3): 467-480.
- Stoss J, Holtz W. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: 4. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution[J]. *Aquaculture*, **32**(3-4): 321-330.
- Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish[J]. *Aquac Res*, **31**(3): 231-243.
- Tiersch T, Yang H, Jenkins JA, Dong Q. 2007. Sperm cryopreservation in fish and shellfish[J]. *Soc Reprod Fertil Suppl*, **65** (supp): 493-508.
- Yang J, Pan XF, Chen XY, Yang JX. 2010. Status and conservation strategy of fish resources in Lixianjiang river[J]. *J Hydroecol*, **3**(2): 54-60. [杨剑, 潘晓赋, 陈小勇, 杨君兴. 2010. 李仙江鱼类资源的现状与保护对策. 水生生态学杂志, **3**(2): 54-60.]
- Yang HP, Carie J, Varga ZM, Tiersch TR. 2007. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*[J]. *Theriogenology*, **68**(2): 128-136.
- Yang HP, Tiersch TR. 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*[J]. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, **149**(2): 224-232.
- Yang YH, Yang JX, Pan XF, Zhou W, Yang ML. 2011. Fishery resource protection by artificial propagation in hydroelectric development: Lixianjiang River drainage in Yunnan as an example[J]. *Zool Res*, **32**(2): 188-195. [杨永宏, 杨君兴, 潘晓赋, 周伟, 杨美临. 2011. 云南李仙江流域水电开发中的鱼类资源保护. 动物学研究, **32**(2): 188-195.]
- Ye T, Zhu JQ, Yang WX, Wei P, Wu XF. 2009. Sperm cryopreservation in sparus macrocephalus and DNA damage detection with SCGE[J]. *Zool Res*, **30**(2): 151-157. [叶霆, 竺俊全, 杨万喜, 魏平, 吴雄飞. 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.]
- Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YY, Wang CL, Sawant MS, Li J, Chen SL. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology[J]. *Theriogenology*, **60**(5): 989-996.
- Zhao WX, Jiang RL, Liu XY, Zhou SZ. 1992. A study on scanning electron microscope of several carp sperm and embryo freezing damage[J]. *Freshwat Fish* **22**(5): 3-5. [赵维信, 姜仁良, 刘修英, 周士中. 1992. 几种鲤科鱼类精子和胚胎冷冻损伤的扫描电镜研究. 淡水渔业, **22**(5): 3-5.]