

鱼类精子质量评价研究进展

季相山^{1,2}, 陈松林¹, 赵燕², 田永胜¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 山东农业大学 动物科技学院水产系, 山东 泰安 271018)

摘要:在鱼类人工繁育中,研究者主要关心的是卵子质量,长期以来对精子质量未引起足够重视。而精子质量同样会影响繁育效果的重要因素。鱼类精子质量的评价指标有多种,如精子活力、运动时间、密度、形态、受精率和生理功能等。其中最传统的评价指标是精子活力,其测定方便,能较准确地预测受精率。将精子运动时间和活力综合考虑可更好地反映精子的运动能力。而精子受精率则是精子质量的直接反映,但会受到卵质等因素的影响。质膜完整性、线粒体功能、染色质结构完整性等可体现精子的质量,但测定方法较繁琐。近年来,鱼类精子质量检测技术迅速发展,计算机辅助精子分析(CASA)、流式细胞术(FCM)分析、低渗肿胀(HOS)、单细胞凝胶电泳(SCGE)等技术的建立,使得测定指标更多样、客观、准确。本文逐一介绍了评价精子质量的各种指标,并对各指标的测定方法、测定原理、国内外研究情况进行详细叙述,旨为我国鱼类精子质量评价研究提供背景资料。[中国水产科学,2007,14(6):1048-1054]

关键词:鱼类;精液;质量;评价

中图分类号:S917.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2007)06-1048-07

鱼类个体之间精子质量差异较大,如个体大小、养殖温度和模式、季节、营养状况、采精频率和催产素使用情况^[1-4]等都会影响精子质量。甚至同一尾鱼不同时间采集的精液,质量也有差异,因此,每次采精后都要对其质量进行评定。但长期以来,在鱼类的人工繁育过程中,人们主要关注卵子质量,而对精子质量没引起足够的重视,这在一定程度上影响了养殖生产。在其他研究领域,精子质量评价也有着广泛的应用。在精子冷冻保存研究中^[2],只有准确测定冻精的成活率等指标,才能比较各冷冻程序的优劣,从而优化冷冻程序。在品系选育研究中,若将繁殖力作为育种目标,准确评价精子质量是非常必要的。由于鱼类精子对重金属等污染非常敏感,在重金属污染评价中,其质量可作为水质污染程度的重要依据^[5]。

常规的精液检查(精液密度、活力、形态等)虽然能快速评价精子质量,但由于信息量少,误差大,有时所得结果与精子受精率有较大差异。近年来,计算机辅助精子分析(Computer assisted sperm analysis, CASA)^[5]、流式细胞术(Flow cytometry, FCM)

分析^[6]、精子染色的显微镜检测^[7]、单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE)^[8]和低渗肿胀(Hypoosmotic test, HOS)^[9]等方法的建立为快速、多指标、客观、准确地评价鱼类精子质量提供了技术保证。本文就鱼类精子质量评价的研究进展作一综述,旨为中国鱼类精子质量评价研究提供背景资料。

1 精子活力

1.1 显微镜观察

精子活力一直是评价精子质量的主要指标,与精液受精率成显著正相关^[4]。传统的检测方法是显微镜观察^[10-11],用牙签等蘸少许精液于载玻片上,加入适量海(淡)水后混匀,立即在10×40倍显微镜下观察运动精子占全部精子的百分数。为防止人为主观因素的影响,每个样品至少观察、统计3次以上。有些学者用数字对精子活力等级进行划分,如“0”表示无运动精子,“1”表示有1%~5%的运动精子,“2”表示有5%~29%的运动精子,“3”表示有30%~79%的运动精子,“4”表示有79%~95%的

收稿日期:2006-12-12; 修订日期:2007-01-31.

基金项目:国家自然科学基金(30570259);黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室开放课题(实开2005-02)。

作者简介:季相山(1977-),男,在读博士,助教,主要从事水产动物遗传育种和种质保存研究。E-mail:xsji@sdau.edu.cn

通讯作者:陈松林。Tel:0532-85844606;E-mail:chensl@ysfri.ac.cn

运动精子,“5”表示有95%~100%的运动精子^[12]。

稀释和未稀释精液均可用于活力检测,但用未稀释精液检测有许多缺点,如精液易黏连;精液密度高时,估计的精子活力往往过高。用稀释精液检测避免了上述缺点^[10]。因此,最好将精液稀释到固定浓度($25 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$ /mL)后用相差显微镜检测精子活力^[13]。混匀后精液在载玻片上呈一薄层,其厚度要适中,太厚,精子会上下游动跑出视野,太薄会限制精子头部的转动。

显微镜观察的优点是操作简便,对设备要求低,易于在生产实践推广^[5]。缺点是观察结果受主观因素影响较大,由于真正有受精能力的是快速运动的精子,慢速运动和摆动的精子受精能力极差^[1],这在一定程度上使得估计的精子活力与受精率之间有偏差。总之,用显微镜检测鱼类精子活力,其准确性在一定程度上依赖于观察者的技术水平和熟练程度。

1.2 计算机辅助精子分析

计算机辅助精子分析(CASA)是20世纪80年代发展起来的新技术,采用了显微录像技术和先进的图像处理技术^[14],可对精子的动(静)态图像进行全面的量化分析。CASA识别技术主要包括灰度识别和DNA荧光识别^[14]。DNA荧光染色分析技术可用于区分活精子(绿色)和死精子(橙色),并能将精子与杂质区分开;灰度识别是对精子头部体积大小和灰度阈值进行辨认,可提供精子动力学的量化数据,但很容易将精液中与精子体积非常接近的体细胞或杂质误认为是精子,因此其准确度比DNA荧光识别法低。CASA能较准确地测定精子成活率(Percentage of motile sperm, MOT),平均移动角度(Mean angular displacement, MAD),鞭打频率(Beating cross frequency, BCF),平均路径速率(Average path velocity, VAP),精子侧摆幅度(Amplitude of lateral head displacement, ALH),曲线运动速率(Curvilinear velocity, VCL)和直线运动速率(Straight line velocity, VSL)等参数(图1)。其中,最能反映精子质量的参数是MOT、VCL和VSL, VSL/VCL是精子运动轨迹弯曲程度的最好体现,与精子受精率成显著正相关^[7]。

CASA起初主要应用于哺乳类和人类,近年来才逐渐应用于鱼类^[14],其图像处理软件也是根据哺乳类精子的运动特性设计的。而与哺乳类不同,鱼类精子运动轨迹多为光滑的曲线,所以鱼类的VAP

和VCL是一致的^[15]。图像处理软件分析的是精子激活20 s后的图像,而鱼类精子激活后运动时间很短,因此,精液稀释、激活后要立即观察。进行CASA操作时还要尽量使稀释液各成分在大小上与精子头部有差异,避免被误认为死精子^[14]。

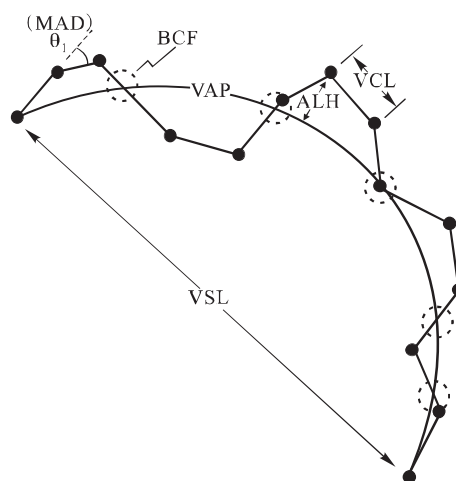


图1 CASA系统测定精子运动模式图^[14]

注:黑点代表连续运动精子的头部图像,用直线将其连接起来。曲线是拟合的精子运动轨迹。MAD:平均移动角度;BCF:鞭打频率;VAP:平均路径速率;ALH:精子侧摆幅度;VCL:曲线运动速率;VSL:直线运动速率。

Fig.1 Schematic representation of some of sperm motility patterns measured by CASA system (refer to 14)

Note: Black circles represent successive images of the head of a motile sperm and are joined by straight line. Curving line indicates fitted sperm movement track. MAD: mean angular displacement; BCF: beating cross frequency; VAP: average path velocity; ALH: amplitude of lateral head displacement; VCL: curvilinear velocity; VSL: straight line velocity.

CASA的优点是准确度高、可靠性强和重复性好^[14]。目前,CASA已被用于分析鲤(*Cyprinus carpio*)^[3,16-17]、黄鲈(*Acipenser fulvescens*)^[18]、庸鲈(*Acipenser fulvescens*)^[19]、真鲷(*Pagrus major*)^[20]、斑马鱼(*Pterois volitans*)^[21]、非洲鲶(*Clarias gariepinus*)^[7]的精子活力,结果表明CASA所测定的MOT和VCL 2个参数能较准确地预测精子受精率^[20-21]。

用CASA来检测精子活力,可用于很多方面的研究。在优化受精条件方面,Lahnsteiner等^[22]用精子活力为指标筛选精子稀释液和激活溶液,Fauvel等^[23]应用CASA检验采精频率对精子活力的影响;

在优化精子冷冻保存程序方面, Liu 等^[20]用 CASA 评价 DMSO 浓度对真鲷精子冻存效果的影响, 结果得出, 12%~21% DMSO 都能很好地保护真鲷精子免受冷冻损伤; 在检测重金属污染物影响方面, Kime 等^[24]发现人为排放的重金属污染可导致水生生物精子活力降低; 在品系选择方面, 如大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的某些品系产精量少, 繁殖力低^[25], 用 CASA 测定的产精量和精子活力作选育指标, 可提高其精液质量和数量^[5]。

总之, CASA 能提供大量准确和有用的信息, 是鱼类精子质量评价技术的一次飞跃。目前, 国产的 CASA 系统已有多款, 这必将加速该系统在鱼类精子质量分析上的应用^[26]。

2 精子运动时间

与哺乳类相比, 鱼类精子激活后运动时间很短^[27]。精子必须在有限时间里找到和进入受精孔^[26], Kime 等^[5]认为大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 卵径为 5 mm 左右, 若大麻哈鱼精子激活后运动时间小于 30 s, 它只能绕卵运动不到半圈 (3~4.9 mm), 其受精率会显著降低。精子激活后运动时间多用秒表直接测定^[10]。长期的进化过程使得精卵有最大的机会相遇, 一般情况下, 精子激活后会有充足的时间找到和进入受精孔^[5]。在评价精子质量时, 若精子激活后运动时间较长 (多于 2 min), 可只考虑精子活力, 若运动时间短, 就应将精子活力和运动时间综合考虑以预测受精率^[10]。

3 精子形态

鱼类精子形态是评价精液质量的一个较重要参数^[28]。鱼类精子一般由头部、中段和尾部组成, 头部较大, 中段有其供能器官——线粒体, 尾部较长, 但与哺乳动物精子有顶体不同, 除鲟形目外, 硬骨鱼类精子都无顶体^[10]。鱼类精子畸形率较高, Gill 等^[29]对 17 尾牙鲆雄鱼的精子形态进行研究, 只有 1 尾鱼所产精子形态全部正常, 畸形表现为尾短、双尾、双头、头小等。环境污染以及冷冻时添加抗冻剂或稀释液都能导致精子形态改变^[5], 降低精子质量。精子经吉姆萨、伊红等普通染料^[7]或荧光染料染色^[30]后在相差 (荧光) 显微镜下就可观察、研究其形态, 该法简便, 一般的精子形态异常均能被发现。尽管还没有鱼类精子形态异常影响受精率的研究报道, 但随着环境污染的加剧, 鱼类精子形态异常的比

例会增大, 这可能会影响到某些鱼类的繁殖^[24]。

4 精液密度

精液密度是评价精子质量的一个传统指标, 也是养殖工作者非常关心的一个问题^[31]。即使某尾鱼所产精子的成活率很高, 若密度达不到一定要求, 也不能算是好的精液。测定精液密度的传统方法是血球计数法, 该法费时、费力。用分光光度计先测定精液光密度, 再据此推算出精液的密度, 是一种简便、快速的方法。目前, 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[32]、白鲈虎鱼 (*Leucopsarion petersi*)^[32]、金鲈 (*Perca flavescens*)^[32]、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[10]、银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)^[33]、大西洋鲑^[34]等鱼类的精液密度和光密度的相关关系已建立。但精液的密度和受精率不一定相关^[35], 所以, 很难直接用精液密度来推测其受精率。但是, 当用固定精液量与不同体积的卵受精时, 精液密度就变得非常重要了。

5 精子受精率

精、卵受精后培养到原肠期统计其受精率, 可直接用于反映精子质量, 因此, 精子受精率是验证其他精子质量评价方法准确与否的重要指标, 研究发现虹鳟^[40]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[41]冻精和鲜精受精率与精子活力高度相关, 证实了检测的精子活力是准确的。某精子的成活率很高, 但不能受精或受精率低, 若卵子质量好, 则有可能是精子成活率测定方法不准确或精子生理功能等有缺陷。其他一些因素如卵子质量、精卵体积比、授精程序等都会影响精子受精率^[10, 36-39], 所以用精子受精率来间接评价精子质量并不完全可靠。

6 精子生理功能

6.1 质膜完整性

6.1.1 流式细胞术分析 流式细胞术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种单细胞快速分析技术。其基本原理是将特异荧光探针标记的单细胞一个个依次经过喷嘴, 经激光束激发后产生散射光和激发荧光, 被前向的光电二极管和侧向的光电倍增管接收, 经计算机处理, 细胞的一系列特性就被快速地测定^[42]。

细胞膜不通透的荧光染料有碘化丙锭 (Propidium iodide, PI)、Hoechst 33258、溴化乙锭 (Ethidium

bromide, EB)、溴乙锭二聚体 (Ethidium homodimer-1, EthD-1) 等^[42], 其中 PI 最为常用。只有当精子的质膜破损时, 它们才能进入并与其 DNA 结合。膜通透性的荧光染料有 SYBR-14、羧基荧光素双醋酸盐 (Carboxyfluorescein diacetate, CFDA)、羧基二甲基荧光素双醋酸盐 (Carboxy dimethyl fluorescein diacetate, CMFDA) 等, 它们能进入细胞膜完整的精子^[42]并与其 DNA 结合。

这两种类型染料经常联合使用, 其中 SYBR-14 和 PI 联合使用效果最佳。其原理是质膜完整的精子只允许 SYBR-14 进入, 被染成绿色; PI 和 SYBR-14 都能进入质膜不完整的精子内部, 但 PI 能取代 SYBR-14 或使 SYBR-14 的荧光猝灭将精子染成红色。样品经流式细胞仪分析可得 3 种亚群: ①被 SYBR-14 染成绿色的精子, 其质膜完整, 是活精子; ②被 PI 染成红色的精子, 其质膜不完整, 是死精子; ③同时染上并发出两种荧光的双阳性精子, 精子正处于由活到死的过渡状态。目前, 该技术已应用在大菱鲆 (*Dicentrarchus labrax*)^[8]、虹鳟^[43]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[43] 等鱼类精子质膜完整性分析上, 并取得了良好效果。He 等^[44]用 PI 染色研究抗冻剂——DMSO 浓度对黑鲈 (*Morone saxatilis*) 精子冷冻保存效果的影响, 结果发现, 用 10% DMSO 冻存的黑鲈精子质膜完整率最高, 为 $(88.0 \pm 2.5)\%$, 用 2.5% 和 5.0% DMSO 作为抗冻剂冻存的精子质膜完整率低, 仅为 $(9.0 \pm 1.4)\%$ 和 $(30.0 \pm 4.3)\%$ 。

6.1.2 低渗肿胀 (HOS) 完整的精子膜对分子和离子有选择透过性, 当精子处于低渗溶液中时, 为达到渗透平衡, 水分子将进入精子内部, 致使精子体积增大, 发生肿胀, 而尾部肿胀发生时间早、易于观察。尾部肿胀表现为尾全部肿胀、粗短肿胀、弯曲肿胀等类型^[45]。而破损的精子膜因失去渗透调节能力而不会发生肿胀, 低渗肿胀实验即据此原理而设计^[45]。

自从 1984 年 Jeyendran 等^[45]用精子尾部低渗肿胀 (HOS) 实验评估精子膜完整性以来, HOS 受到了国内外众多学者的关注, 后对其改进又建立了“水试验”^[46]法。低渗肿胀实验在鱼类精液功能检测上应用较少^[47], 但此法花费少, 设备要求低, 普通实验室, 甚至养殖场都能满足要求, 是非常适合在国内推广应用的一种精子质量评价方法。

6.2 线粒体功能

线粒体的主要功能是产生能量, 为精子运动提供 ATP, 其功能状态直接影响到精子的活力, 是评价精子质量的重要指标之一^[44]。常用的检测线粒体功能的荧光探针是 Rhodamine 123 (Rh123)。Rh123 是一种能渗透入细胞、带阳离子的荧光探针, 发绿色荧光。被 Rh123 染成绿色的精子表示其线粒体功能正常。Baulny 等^[6]用 Rh123 染色研究冷冻前后虹鳟精子线粒体功能的变化, He 等^[44]用该法检测黑鲈精子冷冻前后线粒体功能的变化, 均取得了较好的效果。

线粒体特异的荧光探针经常和检测精子质膜完整性的探针联合使用, 如用 Rh123 和 PI 同时染色精子, 流式细胞仪检测结果是死精子为 PI 阳性、Rh123 阴性; 有线粒体功能的活精子为 PI 阴性、Rh123 阳性; 无线粒体功能的活精子为 PI、Rh123 双阴性^[45]。对 PI、Rh123 双阴性和 PI 阴性/Rh123 阳性精子百分率与受精率的相关关系进行研究, 将有助于探讨无线粒体功能的活精子是否具有受精能力, 本项研究工作目前还未见报道。

6.3 染色质结构完整性

精子染色质结构完整性对于遗传物质的精确传递至关重要, 也是精子质量评价的一个重要指标。检测精子染色质结构完整性有 PI 和吖啶橙 (Acridine orange, AO) 染色两种方法, 但用 PI 染色来检测精子染色质结构完整性的报道还较少, 应用并不广泛^[42]。吖啶橙是一种荧光染料, 与双链 DNA 的结合方式是嵌入双链之间, 而与单链 DNA 和 RNA 结合则由静电吸引堆积在碱基的磷酸根上。在蓝光 (502_{nm}) 激发下, 双链 DNA 发亮绿色荧光 (约 530_{nm}), 单链 DNA 和 RNA 发桔红色荧光 ($> 580_{\text{nm}}$)。精液经 RNA 酶处理、染色、流式细胞仪分析后, 若在 DNA 直方图上仅有一主峰 (亮绿色荧光), 表示精子染色质结构稳定; 若该主峰右侧延伸出一小峰 (桔红色荧光), 代表精子核凝聚度降低, 精子中有大量的单链 DNA^[42], 染色质结构不完整。Lewin 等^[48]用 AO 染色对非洲鲶精子的染色质结构完整性进行了研究, 取得较好效果。

精子染色质结构分析 (Sperm chromatin structure assay, SCSA) 正是基于吖啶橙对 DNA 的染色原理, 即染色质异常的精子受热或酸变性后易形成单链 DNA, 与染料吖啶橙结合发红色荧光, 而染色质

正常的精子能保持完整 DNA 双链结构,与吖啶橙结合发绿色荧光。样品经热或酸变性处理后,若红光值比例增高,则说明染色质结构异常增加^[42]。目前,还未有用 SCSA 技术对鱼类精子染色质结构分析的报道。

6.4 DNA 链连续性

单细胞凝胶电泳 (SCGE) 技术由 Ostling 等^[49]首先提出,后经 Singh 等^[50]改进,因其细胞电泳形状颇似彗星,又称彗星实验 (Comet Assay)。它是一种测定和研究单个细胞 DNA 链断裂的电泳技术。其具体操作是将琼脂糖凝胶与细胞等混匀,置于载玻片上,在裂解液作用下,核膜等其他生物膜被破坏,细胞内的 RNA、蛋白质及其他成分进入凝胶,继而扩散到裂解液中,但核 DNA 仍保持缠绕的环 (Loop) 状附着在剩余的核骨架上。如果细胞核 DNA 未受损伤,电泳时,核 DNA 因其分子量大会停留在核基质中,荧光染色后呈圆形,无脱尾现象。若细胞核受损伤, DNA 双链断裂,其断片进入凝胶中,电泳时断片向阳极迁移,形成拖尾现象,形似彗星。细胞 DNA 受损越重,断片迁移的距离就越长,荧光显微镜观察时,表现为拖尾现象加重和尾部荧光强度增强。因此,通过测定 DNA 迁移部分的光密度或迁移长度可定量地测定单个细胞 DNA 损伤的程度^[51]。

单细胞凝胶电泳通常适用于研究冷冻、辐射等环境因素对精子 DNA 链损伤情况,Zilli 等^[8]应用 SCGE 研究发现山川棘花鮠 (*Plectranthias yamakarai*) 冻精 DNA 损伤程度显著大于鲜精,冷冻不仅导致了鱼类精子活力下降,精子 DNA 链也受到不同程度的损伤。Labbe 等^[52]在应用 SCGE 研究冷冻对虹鳟精子 DNA 损伤程度时也得出相似的结论。徐西长等^[53]用 SCGE 对用不同浓度 DMSO 冻存的真鲷精子 DNA 损伤情况进行研究,表明 30% DMSO 冷冻精子组 DNA 损伤状况与鲜精组差异显著,5%~25% DMSO 冻存组与鲜精无差异。

7 存在问题和展望

各鱼类养殖企业和科研单位都急切地需要一个可靠、准确的精子质量评价方法。而目前还没有一个鱼类精子质量评价指标能准确地预测受精率。精子活力与受精率成高度正相关,但具有运动能力的精子,其染色质、质膜不一定完整,可能是双头或双尾等畸形精子。开展各指标测定结果和受精率的相

关性研究,综合考虑各测定指标,建立一个各指标和受精率的相关性方程是今后研究的一个方向。

CASA 能准确测定精子直线运动速率、曲线运动速率、成活率等指标,较准确地预测受精率,是精子质量检测技术的一次革命,将会极大地促进遗传育种、精子冷冻等技术的发展。但计算机辅助精子分析系统价格昂贵,操作较繁琐,不适宜在各养殖场推广。目前,CASA 图像处理软件是专门为哺乳动物精子分析设计的,编制适合鱼类精子特点的处理软件也非常有必要。FCM 能测定精子功能,如线粒体功能,质膜完整性等,多角度、深层次地评价精子质量。但 FCM 应用于精液质量的检测,还处于实验室研究阶段。总之,将 FCM、SCSA、SCGE 等技术综合应用,分析冻精的遗传稳定性,研究意义重大,前景广阔。

参考文献:

- [1] Alavi S M H, Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review [J]. Cell Biol Int, 2005, 29: 101 - 110.
- [2] Sansone G, Fabbrocini A, Leropoli S, et al. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the motility of sea bass spermatozoa after thawing [J]. Cryobiology, 2002, 44: 229 - 239.
- [3] Christ S A, Toth G P, McCarthy H W, et al. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer - assisted sperm analysis (CASA) [J]. J Fish Biol, 1996, 48: 1 210 - 1 222.
- [4] Vlado T, Jarvi T. Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout—the effect of water temperature [J]. J Fish Biol, 1997, 50: 1 088 - 1 093.
- [5] Kime D E, Van Look K J, Mc Allister B G, et al. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 130C: 425 - 433.
- [6] Baulny B O, Vern Y L, Kerboeuf D, et al. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa [J]. Cryobiology, 1997, 34: 141 - 149.
- [7] Rurangwa E, volckaert F A M, Huyskens G, et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. Theriogenology, 2001, 55: 751 - 769.
- [8] Zilli L, Schiavone R, Zonno V, et al. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation [J]. Cryobiology, 2003, 47: 227 - 235.
- [9] Krasznai Z, Marian T, Balkay I, et al. Permeabilization and struc-

- tural changes in the membrane of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm induced by hypo-osmotic shock[J]. *Aquaculture*, 1995, 129: 134.
- [10] Ji X S, Chen S L, Tian Y S, et al. Cryopreservation of sea perch spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization[J]. *Aquaculture*, 2004, 241: 517–528.
- [11] Chen S L, Ji X S, Yu G C, et al. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization[J]. *Aquaculture*, 2004, 236: 547–556.
- [12] Trippel E A. Estimation of male reproductive success of marine fishes[J]. *J Northw Atlantic Fish Sci*, 2003, 33: 81–113.
- [13] Yao Z, Crim L W, Richardson G F, et al. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation[J]. *Aquaculture*, 2000, 181: 361–375.
- [14] Boyer S P, Davis R O, Katz D F. Automated semen analysis. Current problems in obstetrics[J]. *Gynecol Fertil*, 1989, 12: 165–200.
- [15] Rurangwa E, Kime D E, Ollevier F, et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish[J]. *Aquaculture*, 2004, 234: 1–28.
- [16] Toth G P, Christ S A, McCarthy H W, et al. Computer-assisted motion analysis of semen from the common carp[J]. *J Fish Biol*, 1995, 47: 986–1 003.
- [17] Ravinder K, Nasaruddin K, Majumdar K C, et al. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen[J]. *J Fish Biol*, 1997, 50: 1 309–1 328.
- [18] Toth G P, Ciereszko A, Christ S A, et al. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions[J]. *Aquaculture*, 1997, 154: 337–348.
- [19] Babiak I, Ottesen L, Rudolfson G, et al. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season[J]. *Theriogenology*, 2006, 65: 1 587–1 604.
- [20] Liu Q H, Li J, Xiao Z Z, et al. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 263: 20–25.
- [21] Jonas G, Wilson L, Rolf L I. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters[J]. *Theriogenology*, 2007, 67: 661–672.
- [22] Lahnsteiner F, Patzner R A. Characterization of spermatozoa and eggs of rabbitfish[J]. *J Fish Biol*, 1999, 55: 820–835.
- [23] Fauvel C, Savoye O, Dreanno C, et al. Characteristics of captive seabass in relation to fertilization potential[J]. *J Fish Biol*, 1999, 54: 356–369.
- [24] Kime D E, Ebrahimi M, Nystern K, et al. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish: application to the effects of heavy metals[J]. *Aquat Toxicol*, 1996, 36: 223–237.
- [25] Zohar Y. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish[J]. *Bull Natl Res Inst Aquac*, 1996, Suppl. 2: 43–48.
- [26] 周定刚, 温安祥. 黄鳝精子活力检测和精子入卵早期过程观察[J]. *水产学报*, 2003, 27: 398–402.
- [27] Billard R. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities[J]. *Aquaculture*, 1978, 14: 187–198.
- [28] Li J, Liu Q H, Zhang S C. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2006, 24: 370–377.
- [29] Gill M E, Spiropoulos J, Moss C. Testicular structure and sperm production in flounders from a polluted estuary: a preliminary study[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2002, 281: 41–51.
- [30] Zhang Y Z, Zhang S C, Liu X Z, et al. Cryopreservation of flounder (*Paralichthus olivaceus*) sperm with a practical methodology[J]. *Theriogenology*, 2003, 60: 989–996.
- [31] Suquet M, Dreanno C, Dorange G, et al. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities[J]. *J Fish Biol*, 1998, 52: 31–41.
- [32] Ciereszko A, Dabrowski K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using spectrophotometric technique[J]. *Aquaculture*, 1993, 109: 367–373.
- [33] Bouck G R, Jacobson J. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique[J]. *Trans Am Fish Soc*, 1976, 105: 534–535.
- [34] Piironen J. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* L.) during a spawning season[J]. *Aquaculture*, 1985, 48: 337–350.
- [35] Williot P, Kopeika E F, Goncharo B F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt)[J]. *Aquaculture*, 2000, 189: 53–61.
- [36] Suquet M, Billard R, Cosson J, et al. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact[J]. *Aquaculture*, 1995, 133: 83–90.
- [37] Dreanno C, Cosson J, Suquet M, et al. Nucleotides content, oxidative phosphorylation, morphology and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period[J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 53: 230–243.
- [38] Liu Q H, Li J, Zhang S C, et al. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials[J]. *J World Aquacul Soc*, 37: 289–297.
- [39] Warnecke D, Pluta H J. Motility and fertility capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant[J]. *Aquaculture*, 215: 167–185.

- [40] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, et al. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilisation capacity of rainbow trout semen following cryopreservation [J]. *Prog Fish Cult*, 1996, 58: 149 – 159.
- [41] Magyary I, Urbanyi B, Horvath L. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm: II. Optimal conditions for fertilization [J]. *J Appl Ichthyol*, 1996, 12: 117 – 119.
- [42] 采克俊, 司维, 李亚辉, 等. 流式细胞术在哺乳动物精液质量检测中的应用 [J]. *动物学研究*, 2003, 24: 311 – 317.
- [43] Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, et al. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm [J]. *Cryobiology*, 2005, 50: 144 – 153.
- [44] He S, Woods L C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm [J]. *Cryobiology*, 2004, 48: 254 – 262.
- [45] Jeyendran R S, Van der ven H H, Perez-Pelaez M. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics [J]. *J Reprod Fertil*, 1984, 70: 219 – 228.
- [46] Lemeo A M, Giambersio A M. water-test: a simple method to assess sperm-membrane integrity [J]. *Int J Androl*, 1991, 14: 278.
- [47] Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa [J]. *Aquac Int*, 2004, 12: 69 – 85.
- [48] Lewin L M, Golan R, Freidlin P, et al. Comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1999, 124A: 133 – 137.
- [49] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123: 291 – 298.
- [50] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res*, 1988, 175: 184 – 191.
- [51] Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies [J]. *Mutation Res*, 2000, 463: 13 – 31.
- [52] Labbe C, Martoriati A, Devaux A, et al. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60: 397 – 404.
- [53] 徐西长, 丁福红, 李军. 单细胞凝胶电泳用于检测低温保存的真鲷 (*Pagrosomus major*) 精子 DNA 损伤 [J]. *海洋与湖泊*, 2005, 36: 221 – 225.

Review of assessing sperm quality in fish

JI Xiang-shan^{1,2}, CHEN Song-lin², ZHAO Yan¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Animal Science Institute, Shandong Agriculture University, Taian 271018, China)

Abstract: The quality of sperm of fish species has not been emphasized. In fact, poor sperm quality and quantity could be a limiting factor in propagation of some species such as *Cynoglossus semilaevis* and *Verasper variegatus*. In the present paper, several parameters such as sperm motility, density, morphology, membrane integrity were used to precisely assess quality of fish semen, among which the most conventional evaluation method was sperm motility, which correlated strongly with fertilization success rate. Duration of sperm motility and percentage of motable sperm are usually considered together. Fertilization rate of sperm can directly reflect sperm quality. Sperm membrane integrity, Mitochondrial function and chromatin structure integrity can embody sperm quality. In the recent years, methods of evaluating sperm quality such as computer assisted sperm analysis (CASA), flow cytometry (FCM) analysis, hypoosmotic test (HOS) and single cell gel electrophoresis (SCGE), were developed. This paper reviewed methods of sperm quality assessment in fish in order to promote its development in China. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 1 048 – 1 054]

Key words: fish; semen; quality; assess

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn