

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19102

圆口铜鱼精子超低温冷冻保存

刘光霞^{1,2}, 吴兴兵¹, 何勇凤¹, 邓智明¹, 杨德国^{1,2}, 王小明³, 杨少荣³, 刘欢³

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 中国三峡建设管理有限公司, 四川 成都 610041

摘要: 为建立圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)精子超低温冷冻保存方法, 采用计算机辅助精子分析系统(CASA)评价了 4 种稀释液(D15、D20、L1、D1), 3 种抗冻保护剂[二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、甲醇(METH)]在 3 种体积浓度(7.5%、10%、12.5%, V/V)下对圆口铜鱼精液的冷冻保存效果, 并比较了 150 mOsm/kg NaCl 与超纯水作为激活剂对精子活力的影响。结果表明, D1 组稀释液的精子活率(MOT)最高, 为(74.64±13.17)%, 与鲜精无显著差异($P>0.05$); 以 10%甲醇作为抗冻保护剂的圆口铜鱼精子经超纯水激活后, 测得 MOT 最高, 达到(78.11±14.74)%, 与鲜精无显著差异($P>0.05$), 精子运动速度达最大, 平均曲线运动速度(VCL)、平均直线运动速度(VSL)、VAP(平均路径运动速度)分别达到(50.28±12.46) $\mu\text{m/s}$ 、(35.06±10.82) $\mu\text{m/s}$ 、(39.44±12.46) $\mu\text{m/s}$, 精子快速运动时间和寿命分别为(8.67±1.15) s、(33.33±5.00) s, 显著低于鲜精($P<0.05$); 7.5%甲醇组和 7.5%二甲基甲酰胺组的 MOT 次之, 分别为(77.71±17.74)%、(76.42±12.49)%, 抗冻剂二甲基亚砜组的 MOT 显著低于甲醇组、二甲基甲酰胺组($P<0.05$)。12.5%的 3 种抗冻保护剂中, 几乎无精子存活; 在不同种类不同浓度的抗冻剂保护下, 10%甲醇组, 相较于使用超纯水激活, 用 150 mOsm/kg NaCl 激活后的精子活率和寿命更高, 说明 Na^+ 有延长冻精寿命, 提高精子活率的作用。研究表明, D1+10% METH (7.8 g/L NaCl+0.5 g/L KCl+15 g/L 葡萄糖+10% METH)可用于圆口铜鱼精液超低温冷冻保存, 为圆口铜鱼的繁育工作和种质资源保护奠定了基础。

关键词: 圆口铜鱼; 精子; 超低温冷冻保存; 稀释液; 抗冻剂

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)01-0044-09

精子超低温冷冻保存技术对人工繁殖、幼鱼管理、优良品种种质保存、遗传育种具有重要的应用价值^[1]。通过精子超低温冷冻保存技术, 可将种类繁多的鱼类精液长期有效保存, 避免濒危鱼类灭绝与种质资源退化, 并解决雌雄个体性成熟不同步、地域不同产生的生殖隔离、近亲交配、性转换个体不能自交等问题^[2]。20 世纪 50 年代初, 英国学者 Blaxter 首次采用干冰(-79℃)冷冻保存太平洋鲱精子 6 个月, 经人工授精可获得 80% 的受精率, 为鱼类精液冷冻保存研究奠定了基础。研究者在鱼类精子冷冻保存方面取得的成果主要

集中在鲑鳟类领域, 在鲤科、鲑科、鲟科等鱼类精子超低温冷冻保存研究中也取得良好的成绩。经过 60 余年的探索与研究, 目前已相继建立草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、条纹锯鲂(*Centropristis striata*)、鳕(*Gadus morhua*)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)及鲮(*Mugil cephalus*)等 200 多种鱼类精子的冷冻保存技术。然而大量研究表明, 鱼类精子具有种属特异性, 不同鱼类的精子在冷冻保存过程中所需稀释液、抗冻剂种类和浓度不同, 迄今尚未有一个稳定可重复的方法对鱼类精子进

收稿日期: 2019-04-16; 修订日期: 2019-07-16.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-46); 中国长江三峡集团公司科研专项(JGJ0252013).

作者简介: 刘光霞(1993-), 女, 硕士研究生, 专业方向为鱼类生理学. E-mail: 1289091760@qq.com

通信作者: 杨德国, 研究员. E-mail: yangdg@yfi.ac.cn

行冷冻保存。圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)精子的超低温冷冻保存技术至今未见报道。

圆口铜鱼隶属鲤科(Cyprinidae), 铜鱼属, 俗称水密子、金鳅^[3], 主要分布于长江上游、金沙江中游、沱江、乌江下游等水系, 具有生长速度快、食性广、营养价值高等优点, 曾是长江上游江段的主要优势物种和重要经济鱼类^[4]。受栖息地变迁和人类过度捕捞影响, 其资源量显著下降, 已被列为长江上游珍稀特有鱼类保护区指标性物种。虽然目前在圆口铜鱼人工驯养繁殖方面已取得初步成功, 但亲鱼难捕获、养殖亲鱼数量少、雌雄配子发育不同步以及雄鱼精液量少等问题仍制约着圆口铜鱼的规模化人工繁育。本研究通过精液常规分析(精子快速运动时间, 寿命)和计算机辅助精子分析(computer assisted sperm analysis, CASA)技术, 探究不同抗冻剂种类和浓度组合对圆口铜鱼精液超低温冷冻保存效果的影响, 对比分析精子冻存前后的活力参数及不同激活液对精子活力的影响, 初步探索出圆口铜鱼精子超低温冷冻保存方法, 旨在为圆口铜鱼繁育工作提供技术支持, 为其种质保存奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用圆口铜鱼为中国水产科学研究院长江水产研究所人工驯养、性腺发育良好的雄性亲鱼。将体重(667.00±69.25) g 的亲鱼从循环水养殖桶中捞出, 使用干毛巾擦干鱼体表面, 再用纸巾擦净生殖孔, 从鱼体两侧胸鳍处往臀鳍方向按压, 弃去部分精液后, 再次擦干生殖孔, 采集约 0.8 mL 精液至 1.5 mL 干净离心管中, 采集完后, 放置冰盒保存。

首先在显微镜下进行初步质量检查, 弃去已污染、被激活精液样本, 然后使用超纯水激活其他精液样本, 记录精子快速运动时间和寿命, 将快速运动时间≥16 s 的圆口铜鱼精液样本迅速带回实验室, 采用计算机辅助精子分析系统(computer assisted sperm analysis, CASA)检测精子活率、运动性能, 选取精子活率大于 85%精液样品进行冷冻保存实验。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选稀释液 选取 L1、D1、D15、D20 等 4 种稀释液进行实验(表 1), 其中 L1 为本团队开展圆口铜鱼精液 4 ℃冷藏保存研究期间筛选得到, D1 为经预实验初选确认配方, D15 为翘嘴鲌精子冷冻保存稀释液^[5], D20 为冷冻保存软鳍新光唇鱼(*Neolissochilus benasi*)的稀释液^[6], 每种稀释液 100 mL, 分别与甲醇(METH)配制成含 20% METH 的抗冻液, 于 4 ℃冰箱保存待用。

表 1 各稀释液成分
Tab. 1 Components of the extenders used for cryopreservation

成分 component	D15	D20	L1	D1
氯化钠 NaCl	8	8	8	7.8
氯化钾 KCl	0.5	1	0.5	0.5
葡萄糖 glucose	15	15	5	15
pH	5.24	5.18	5.48	6.88
渗透压/(mOsm/kg) osmolarity	348	360	295	345

精液冷冻保存采用两步法^[5]并加以调整, 将圆口铜鱼精液样本与抗冻液按 1 : 1(V/V)的比例混匀装入 0.5 mL 麦管(IMV, 法国), 4℃平衡 25 min, 置于液氮面上平衡 5 min, 于液氮中保存 24 h。取出装有样品的麦管, 将其放入 37℃恒温水浴锅中解冻 12~15 s, 使用超纯水激活, 采用 CASA 检测精子激活后 10 s 的精子活率(MOT)、平均直线运动速度(VSL)、平均曲线运动速度(VCL)、平均路径运动速度(VAP)等指标。所得参数值均用平均值和标准差表示, 以未经任何处理的圆口铜鱼鲜精作对照。

1.2.2 抗冻剂筛选 选取二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇(METH) (国药, 99.5%)、二甲亚砜(DMSO)(购自 SIGMA 公司)3 种抗冻保护剂, 使用 D1 稀释液将上述抗冻剂配制成 3 种不同体积分数(15%、20%、25%, V/V)的抗冻液, 于 4 ℃冰箱中保存备用。

将圆口铜鱼精液样本与抗冻液按 1 : 1 (V/V)的比例混匀装入 0.5 mL 麦管(IMV, 法国), 使抗冻剂最终体积分数为 7.5%、10%、12.5% (V/V), 4℃平衡 25 min 后, 液氮面上平衡 5 min, 于液氮中保存 24 h。将装有样品的麦管放入 37 ℃恒温水浴锅中解冻 12~15 s, 使用超纯水激活精子, 观察记录精子快速运动时间和寿命, 并采用 CASA 检测精

子激活后 10 s 的 MOT、VSL、VCL、VAP 等指标。所得参数值均用平均值和标准差表示,以未经任何处理的圆口铜鱼鲜精作对照。

1.2.3 不同激活液中冻精质量检测 选取二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇(METH)(国药, 99.5%)、二甲基亚砜(DMSO)(购自 SIGMA 公司) 3 种抗冻保护剂,使用 D1 稀释液将上述抗冻剂配制成 3 个不同体积分数(15%、20%、25%, V/V)的抗冻液,于 4℃ 冰箱中保存备用。

将圆口铜鱼精液样本与抗冻液按 1:1 (V/V) 的比例混匀装入 0.5 mL 麦管(IMV, 法国),使抗冻剂最终体积分数为 7.5%、10%、12.5%(V/V), 4℃ 平衡 25 min 后,液氮面上平衡 5 min,于液氮中保存 24 h。取出装有冻存精液样品的麦管并将其放入 37℃ 恒温水浴锅中解冻 12~15 s,分别使用超纯水和 150 mOsm/kg NaCl 溶液激活,记录快速运动时间和寿命,采用 CASA 检测精子激活后 10 s 的 MOT、VSL、VCL、VAP 等指标。以未做任何处理的鲜精做对照。

1.3 数据处理

所得数据采用 SPSS 22.0 软件进行处理,单因素方差分析(one-way ANOVA)比较实验结果差异显著性,多重比较采用 Duncan 方法, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 不同稀释液对圆口铜鱼精子活力的影响

圆口铜鱼鲜精的活率平均为 $(88.30 \pm 7.24)\%$, VCL(平均曲线运动速度)为 $(65.78 \pm 13.10) \mu\text{m/s}$, VSL(平均直线运动速度)为 $(33.02 \pm 6.43) \mu\text{m/s}$, VAP(平均路径运动速度)为 $(43.83 \pm 8.69) \mu\text{m/s}$, 精子快速运动时间和寿命分别为 $(20.00 \pm 2.83) \text{s}$ 、 $(42.67 \pm 5.20) \text{s}$ 。采用 4 种稀释液对圆口铜鱼精子进行超低温冷冻保存后, D1 稀释液保存精子,激活后 10 s 的精子活率最高,为 $(74.64 \pm 13.17)\%$,与鲜精无显著差异($P > 0.05$),其次是 D15 和 D20,三者间无显著差异($P > 0.05$)。经 L1 稀释液保存后的精子活率为 0,无冷冻保存效果(图 1)。D1 稀释液组精子的 VCL 为 $(47.83 \pm 16.23) \mu\text{m/s}$, VSL 为 $(31.75 \pm 14.57) \mu\text{m/s}$, VAP 为 $(37.31 \pm 15.52) \mu\text{m/s}$ 。

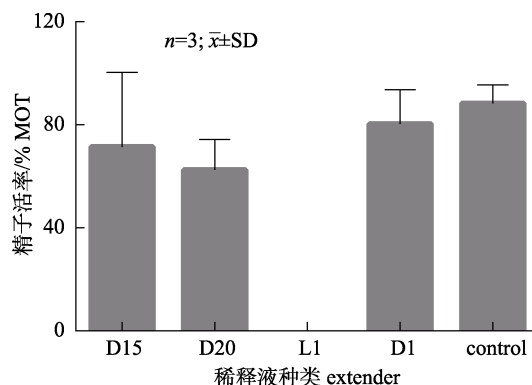


图 1 不同稀释液对圆口铜鱼精子活率的影响
Fig. 1 Effects of extenders on motility of frozen-thawed sperms of *Coreius guichenoti*

2.2 抗冻剂对精子快速运动、寿命和活率的影响

采用 3 种不同浓度的抗冻剂对圆口铜鱼精子进行超低温冷冻保存,实验结果如图 2、图 3 所示。对于同一种抗冻剂,以 METH 为抗冻剂组,解冻后用水激活,10% METH 组的精子快速运动时间、寿命和精子活率大于 12.5%和 7.5%甲醇组,但 10% METH 与 7.5% METH 组无显著性差异

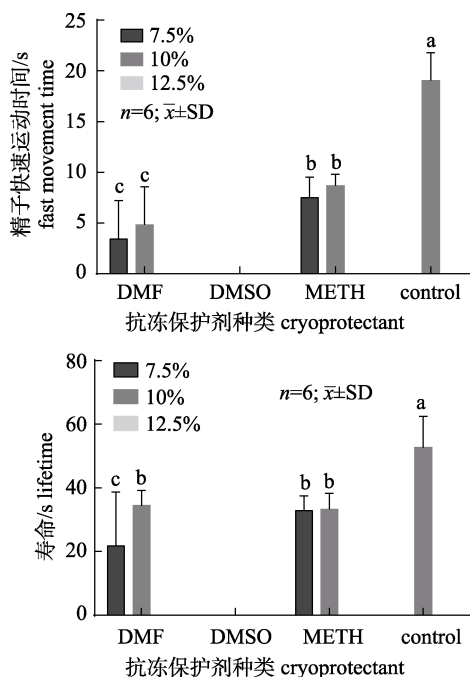


图 2 不同抗冻剂种类不同浓度下圆口铜鱼精子的快速运动时间和寿命

数据上方标注不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 Different cryoprotectants in different concentrations on fast movement time and life time of *Coreius guichenoti* sperm. Different letters show significant differences among them ($P < 0.05$).

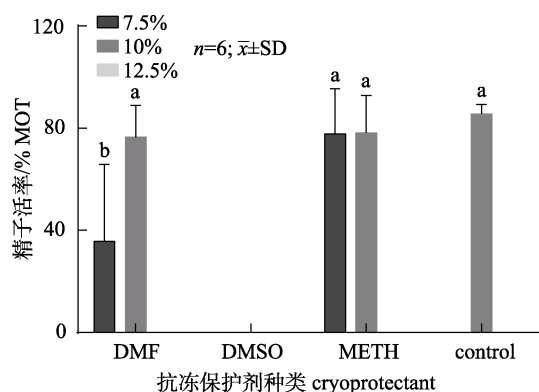


图 3 抗冻剂种类和浓度对冻后圆口铜鱼精子活率的影响
数据上方标注不同字母表示各组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 Effects of cryoprotectants on motility of frozen-thawed sperms of *Coreius guichenoti*. Different letters show significant differences among different groups ($P < 0.05$).

($P > 0.05$)。对照组的精子活率为(88.54 ± 6.91)%, 与 10%组的精子活率无显著差异($P > 0.05$)。DMF 抗冻剂组, 10% DMF 组的精子活率、快速运动时间、寿命高于其他两个浓度组。DMSO 抗冻剂组, 精子无快速运动, 7.5% DMSO 组有少量精子存活。

3 种抗冻剂浓度在 7.5%时, METH 组精子快速运动时间、寿命、活率分别为(7.5 ± 2.02) s、(32.83 ± 4.67) s、(77.71 ± 17.74)%, 显著大于其他两种抗冻剂。当抗冻剂浓度为 10%时, METH 组的精子快速运动时间最长, 为(8.67 ± 1.15) s, 活率为(78.11 ± 14.74)%, 优于其他所有组合。其次是 DMF 组, 精子快速运动时间、活率分别为(4.83 ± 3.74) s、(76.42 ± 12.49)%, 精子寿命在这两种抗冻剂(METH 与 DMF)中无显著差异($P > 0.05$)。当抗冻剂浓度增加

到 12.5%时, METH 组精子活率较低, DMF 和 DMSO 中已无精子存活。

2.3 不同浓度不同种类的抗冻剂对精子运动速率的影响

如图 4 所示, 圆口铜鱼鲜精的 VCL 为(77.79 ± 15.22) $\mu\text{m/s}$, VSL 为(44.57 ± 12.75) $\mu\text{m/s}$, VAP 为(56.41 ± 14.99) $\mu\text{m/s}$ 。圆口铜鱼精子经超低温冷冻保存, 解冻复苏, 精子的 VCL、VSL、VAP 显著降低($P < 0.05$)。

METH 组中, 10% METH 组精子的 VCL 为(50.28 ± 12.46) $\mu\text{m/s}$, VSL 为(35.06 ± 10.82) $\mu\text{m/s}$, VAP 为(39.44 ± 12.46) $\mu\text{m/s}$, 大于其他两个浓度的 METH 组。其次是 7.5%的 METH 组, 精子的 VCL、VSL、VAP 分别为(40.23 ± 12.46) $\mu\text{m/s}$ 、(27.85 ± 9.93) $\mu\text{m/s}$ 、(32.91 ± 11.39) $\mu\text{m/s}$, 其中 VAP 值与 10% METH 组无显著差异($P > 0.05$)。DMF 组中, 10% DMF 组的 VCL、VSL、VAP 值显著大于 7.5%和 12.5%DMF 组的值($P < 0.05$); DMSO 组, 精子运动性能全部减弱, 趋向于静止。

抗冻剂浓度为 7.5%时, METH 组 VCL、VSL、VAP 值显著大于 DMF 和 DMSO 组($P < 0.05$)。抗冻剂浓度为 10%时, METH 组 VCL、VSL、VAP 值也显著大于另外两组的($P < 0.05$)。当抗冻剂浓度为 12.5%时, 3 种抗冻剂保存效果均不好, 精子运动速率低于 5 $\mu\text{m/s}$, 近似于零。

2.4 激活液中 Na^+ 对冻精质量的影响

圆口铜鱼精子经超低温冷冻保存, 于 37℃恒温水浴中解冻, 分别采用 150 mOsm/kg NaCl 和超纯水激活。精子活率和寿命如图 5、图 6 所示。

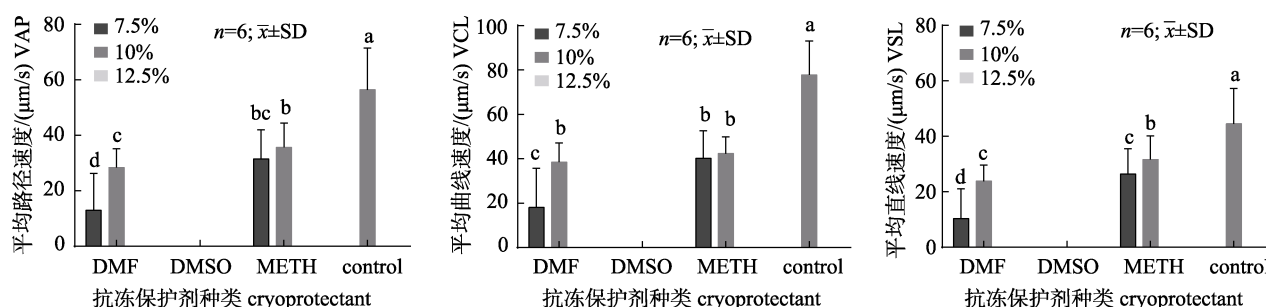


图 4 不同抗冻剂不同浓度下圆口铜鱼精子的运动速率

数据上方标注不同字母表示各组差异显著($P < 0.05$).

Fig. 4 Effect of cryoprotectants in different concentrations on velocity of *Coreius guichenoti* sperm. Different letters show significant differences among different groups ($P < 0.05$).

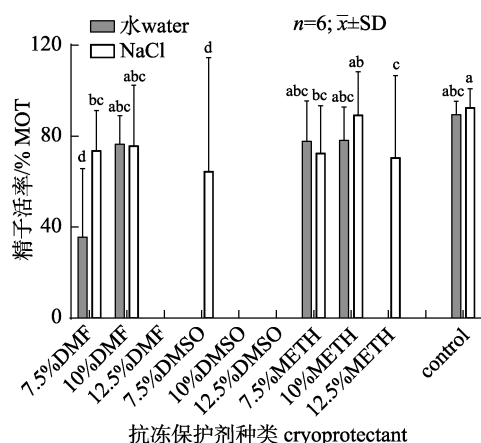


图 5 Na^+ 对冷冻圆口铜鱼精子活率的影响
数据上方标注不同字母表示各组差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 5 Effects of Na^+ on motility of frozen-thawed sperms of *Coreius guichenoti*

Different letters show significant differences among different groups ($P<0.05$).

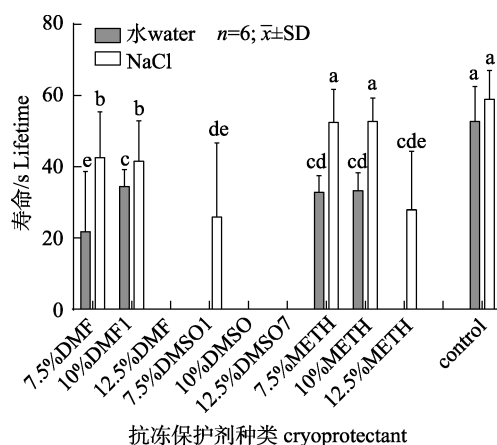


图 6 Na^+ 对冷冻圆口铜鱼精子寿命的影响
数据上方标注不同字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 6 Effects of Na^+ on lifetime of frozen-thawed sperms of *Coreius guichenoti*

Different letters show significant differences among different groups ($P<0.05$).

对照组中, 采用 150 mOsm/kg NaCl 和超纯水激活后的精子活率分别为 $(92.59\pm 8.25)\%$ 、 $(89.44\pm 5.93)\%$ 。对于同一种抗冻剂, 以 METH 为抗冻剂组, 解冻后用 150 mOsm/kg NaCl 激活, 10% METH 组的精子寿命和活率分别为 (52.67 ± 6.60) s、 $(89.21\pm 19.09)\%$, 与对照组无显著差异 ($P<0.05$), 并且大于 12.5%、7.5% METH 和用水激活的 10% METH 组, 精子的 VCL、VSL、VAP 分别为 (50.10 ± 9.25) $\mu\text{m/s}$ 、 (26.92 ± 7.80) $\mu\text{m/s}$ 、 (32.93 ± 9.81) $\mu\text{m/s}$ 。

DMF 抗冻剂组, 经 150 mOsm/kg NaCl 激活后, 10% DMF 组的精子活率与寿命显著大于 12.5% DMF 组。DMSO 抗冻剂组, 仅 7.5% DMSO 组, 经 150 mOsm/kg NaCl 激活后有少量精子存活。

3 种抗冻剂浓度在 7.5% 时, 使用 150 mOsm/kg NaCl 激活的 METH 组精子寿命为 (52.42 ± 9.32) s, 显著大于其他两种抗冻剂; 活率为 $(72.40\pm 17.92)\%$, 与 7.5% DMF, NaCl 激活组无显著差异。当抗冻剂浓度为 10% 时, METH 组中使用 150 mOsm/kg NaCl 激活后的精子寿命最长, 活率最高, 优于其他实验组。当抗冻剂浓度增加到 12.5% 时, METH 组, 使用 150 mOsm/kg NaCl 激活后有部分精子存活, DMF、DMSO 和用水激活的 METH 组中已无精子存活。

10% METH 组中, 相较于使用无离子水激活, 使用 150 mOsm/kg NaCl 激活后的精子寿命显著增加。且在 7.5% DMF、12.5% METH、7.5% DMSO、鲜精组, 使用 150 mOsm/kg NaCl 激活后, 精子活率与寿命均高于水激活组。

3 讨论

3.1 稀释液对精子活力的影响

鱼类精子具有种属特异性, 精子超低温冷冻保存稀释液也各不相同^[7]。因此, 对于稀释液的成分, 至今无确定的理论依据可循, 需凭借丰富经验与大量实验不断探索。Horton 等^[8]认为稀释液成分在满足精子所需元素基础上, 越简单越适宜。本研究选用的稀释液中, D15 常应用于草鱼 (*Ctenopharynodon idellus*) 和鲢、鲤 (*Cyprinus carpio*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 等^[9]鲤科鱼类精子冻存中, 解冻激活后可获得 50% 以上的精子活力, 且受精率稳定在 70% 以上。D20 在黄颡鱼 (*Pecheobagrus fuhidrac*)、翘嘴鲮 (*Chuatsi basilewsky*) 等鱼类精子保存中效果最好。D1 是参照陈松林等^[9]冻存鲤科鱼类精子 D15 稀释液, 做适当调整所得。这 3 组稀释液, 成分简单, 用于圆口铜鱼精子超低温保存后, 精子活率达 60% 以上, 与鲜精无显著差异。

稀释液主要从渗透压、pH、离子成分等方面影响精子活力, 有学者提出淡水鱼类精子在弱酸

性或中性的稀释液中保存效果较好^[7]。本研究表明, 圆口铜鱼精子在 pH 为 6.88 的 D1 稀释液中获得最佳保存效果。圆口铜鱼精子经 L1 稀释液冷冻保存后, 精子活率显著低于其他 3 组。分析可能是由于稀释液渗透压偏低, 未完全抑制圆口铜鱼精子活力, 导致精子在冻存过程中能量消耗殆尽。至于影响机制尚待深入研究。同时表明, 精子 4℃ 保存效果好的稀释液不一定适用于精子超低温冷冻保存。

3.2 抗冻剂种类和浓度对精子活力的影响

精子冻融过程中, 细胞内外易产生冰晶, 损害细胞膜和线粒体, 使细胞丧失功能^[6], 抗冻剂可抑制细胞内外冰晶形成, 保护精子细胞。已有研究表明, DMSO 在鲤科鱼类^[10]、鲷科鱼类^[11-12]和鳊鲂科鱼类^[13]精液保存中取得良好效果。本研究发现, DMSO 作为抗冻剂对圆口铜鱼精子的保护作用较差。这可能是因物种不同, 精子细胞本身适应能力存在差异, 致使 DMSO 不适合圆口铜鱼精子超低温冷冻保存。有研究表明 DMSO 具有毒性, 在精子冻存过程中可损伤精子细胞^[14], 同时 DMSO 渗入精子细胞时, 造成细胞内外渗透压相差太大, 精子细胞溃解^[15]。

相对 DMSO, DMF 对圆口铜鱼精子有较好的保护作用。姜仁良等^[16]的研究表明相较于 DMSO, DMF 在冷冻过程中能更有效保护鲤、团头鲂精子免受冷冻损伤, 与上述结果相似。分析是 DMF 对低温的缓冲作用稍胜于 DMSO^[16], 也可能是两者的分子量与渗透性能不同, 使渗透过程中, 精子细胞的损伤程度产生差异。数据表明, METH 保存效果优于 DMF、DMSO, 刘鹏等^[17]认为 METH 更适合作为淡水鱼类精子超低温冷冻保存的抗冻剂, 冻后精子活力最高, 与之相符。抗冻保护剂的浓度与精子冷冻保存效果密切相关。研究表明在黄颡鱼^[18]、暗色唇鱼(*Semilabeo obscurus*)^[19]、西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)^[17]、美洲鲟(*Alosa sapidissima*)^[17]等精子冷冻保存中, 经 10% METH 冻存的精子, 其活率最高。本实验对比分析 DMF、DMSO、METH 3 种抗冻剂在 3 种浓度(7.5%、10%、12.5%)下对圆口铜鱼精子的冷冻保存效果。同样表明, 采用 10% METH 冻存的圆口铜鱼精子经无

离子水激活, 精子活率最高, 达(72.26± 19.08) μm/s。10% METH 在圆口铜鱼精子冷冻保存中, 可以减少精子冷冻损伤, 发挥保护作用, 是一种适宜的抗冻剂。

在史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labras*)、花狼鱼(*Anarhich minor*)精子^[20-21]的研究中表明, 精子运动速度是评价精子质量的重要指标。CASA 能准确分析激活后精子 VSL、VCL、VAP 等指标, 为评价精子质量与受精率提供有效的技术保证。Rurangwa 等^[22]的研究表明, 用 CASA 测得的 VSL、VAP、VCL 与用极小精卵比授精获得的孵化率呈显著正相关。本实验中 10% METH 组精子运动速率显著高于其他实验组($P < 0.05$)。数据分析表明, 冻存前后圆口铜鱼精子的 VCL 分别为(77.79±15.22) μm/s、(50.28±12.46) μm/s, 均小于鲤科鱼类平均曲线速度(120 μm/s)^[23], 分析可能是激活后 10 s 精子能量随时间的延长不断消耗, 运动速率随之变小, 亦或是精子本身的体积形态与其他鲤科鱼类不同而产生的差异。精子运动受外界环境变化的影响, 如离子浓度、pH 或渗透压发生变化时, 精子内部发生能量转换, 由内部原生质营养物质的能量驱使鞭毛摆动, 精子产生运动。精子经不同抗冻剂冷冻保存后, 精子的结构损伤程度和能量耗损情况有所差异, 因此解冻后测得的精子运动速度不同。

3.3 激活液中 Na⁺对冷冻精子质量的影响

离子对精子的激活和活力持续时间有影响^[24-26]。当鱼类精液接触外界环境, 细胞外的离子通过改变细胞内的离子浓度或渗透压作用, 参与调节精子运动^[27]。Na⁺作为鱼类精浆中含量最高的阳离子, 对维持精浆渗透压稳定与精子的运动有着重要作用。Lahnsteiner 等^[28]的研究发现 Na⁺水平与翘嘴鲌精子运动的百分率呈显著正相关关系。Alavi 等^[29]观察到鲟精子在 25 mmol/L Na⁺时最大限度地提高运动精子百分比和精子活动周期。并且在对松浦镜鲤(*Cynipus carpio*)、方正鲫(*Carassius auratus gibelio*)、大鳞鲃(*Barbus capito*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)精子的研究中发现, Na⁺浓度影响精子寿命的长短, 一定浓度的 Na⁺可延长精子寿命。实验分析表明, Na⁺对新鲜采集与

冻存后的圆口铜鱼精子均有影响。采用 150 mOsm/kg NaCl 激活不同抗冻剂组冷冻保存的圆口铜鱼精子, 7.5%、10%的 DMF 和 METH 组, 鲜精组中, 精子活率与寿命均有不同程度的增加, 说明圆口铜鱼精子对细胞外 Na^+ 敏感, 在此渗透压浓度时, Na^+ 有增强精子活力的作用, 此发现对圆口精子的冷冻保存和人工繁殖具有重要意义, 但具体作用机制尚待进一步研究。10%DMSO、12.5%DMF 和 DMSO 中, 无论采用何种溶液激活, 都不起作用, 冻存后精子已死亡。7.5%DMSO、12.5%METH 中使用超纯水激活时, 无精子运动, 但采用 Na^+ 溶液激活后, 精子活率与寿命显著增加, 说明在冷冻保存过程中, 这两组抗冻剂对精子具有保护作用, 冻存后, 采用水激活, 可能是精子受渗透压、离子等影响, 精子活力暂时受到抑制, 呈假死状态, 而采用 150 mOsm/kg NaCl 激活, 精子细胞内外 Na^+ 浓度改变, 渗透压产生变化, 精子运动启动。

参考文献:

- [1] Hao C, Yan W H, Ding S Y, et al. Cryopreservation technology of fish sperm and its application[J]. Journal of Aquaculture, 2014, 35(7): 48-52. [郝忱, 严维辉, 丁淑燕, 等. 鱼类精子超低温冷冻保存技术及其应用[J]. 水产养殖, 2014, 35(7): 48-52.]
- [2] Zhou L, Luo D, Lu X, et al. Cryopreservation and its effects on spermatozoa quality in *Siniperca scherzeri* (Perciformes: Siniperidae)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(2): 250-259. [周磊, 罗渡, 卢薛, 等. 斑鳊精液超低温冷冻保存及其效果分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 250-259.]
- [3] Yang Z, Qiao Y, Zhang Y C, et al. Estimate on population mortality of *Coreius guichenoti* and its conservation in the middle and upper Yangtze River[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 30(2): 50-55. [杨志, 乔晔, 张铁超, 等. 长江中上游圆口铜鱼的种群死亡特征及其物种保护[J]. 水生生态学杂志, 2009, 30(2): 50-55.]
- [4] Li X M, Yan Q Y, Ringø E, et al. The influence of weight and gender on intestinal bacterial community of wild large-mouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*, 1874)[J]. BMC Microbiology, 2016, 16: 191.
- [5] Hao C. Study on sperm cryopreservation technology of two important fresh water fish[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009. [郝忱. 两种淡水经济鱼类精子超低温冷冻保存技术的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.]
- [6] Wang X A, Yang J X, Chen X Y, et al. Cryopreservation of sperm from *Neolissochilus benasi*[J]. Zoological Research, 2012, 33(3): 283-289. [王晓爱, 杨君兴, 陈小勇, 等. 软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存[J]. 动物学研究, 2012, 33(3): 283-289.]
- [7] Chen Y M. Cryogenic preservation of sperm from the king grouper (*Epinephelus lanceolatus*)[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013. [陈亚敏. 鞍带石斑鱼精子低温保存研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.]
- [8] Horton H F, Ott A G. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1976, 33(4): 995-1000.
- [9] Chen S L, Liu X T, Lu D C, et al. Cryopreservation of spermatozoa of silver carp, common carp, blunt snout bream and grass carp[J]. Acta Zoologica Sinica, 1992, 38(4): 413-424. [陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究[J]. 动物学报, 1992, 38(4): 413-424.]
- [10] Magyary I, Urbányi B, Horváth L. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization[J]. Journal of Applied Ichthyology, 1996, 12(2): 117-119.
- [11] Ye T, Zhu J Q, Yang W X, et al. Sperm cryopreservation in *Sparus macrocephalus* and DNA damage detection with SCGE[J]. Zoological Research, 2009, 30(2): 151-157. [叶霆, 竺俊全, 杨万喜, 等. 黑鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的 SCGE 检测[J]. 动物学研究, 2009, 30(2): 151-157.]
- [12] Wei P, Zhu J Q, Yan J Q, et al. Sperm cryopreservation and the DNA damage detection in *Pagrosomus major*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(5): 1049-1055. [魏平, 竺俊全, 闫家强, 等. 真鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的检测[J]. 水生生物学报, 2010, 34(5): 1049-1055.]
- [13] Fauvel C, Suquet M, Cosson J. Evaluation of fish sperm quality[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2010, 26(5): 636-643.
- [14] Harvey B, Ashwood-Smith M J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes[J]. Cryobiology, 1982, 19(1): 29-40.
- [15] Chen S L. Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(2): 161-168. [陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161-168.]
- [16] Jiang R L, Zhao W X, Zhang Y J. Application of a new cryoprotectant on cryopreservation of freshwater fish sperm[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1992(Z1): 27-32. [姜仁良, 赵维信, 张饮江. 一种新抗冻剂 DMF 在淡水鱼类精液超低温保存上的应用[J]. 上海海洋大学学报,

- 1992(Z1): 27-32.]
- [17] Liu P, Zhuang P, Zhang L Z. Study on cryopreservation of spermatozoa in cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [J]. Marine Fisheries, 2007, 29(2): 120-127. [刘鹏, 庄平, 章龙珍. 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.]
- [18] Pan J L, Ding S Y, Ge J C, et al. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm [J]. Aquaculture, 2008, 279(1-4): 173-176.
- [19] Wang X A, Yang J X, Chen X Y, et al. Effects of four penetrating cryoprotectants on cryopreservation of *Semilabeo obscurus* sperm [J]. Journal of Hydroecology, 2012, 33(5): 88-93. [王晓爱, 杨君兴, 陈小勇, 等. 4 种渗透性抗冻剂对暗色唇鱼精子冷冻保存的影响[J]. 水生生态学杂志, 2012, 33(5): 88-93.]
- [20] Liu L, Otomar L, Wei Q W, et al. Comparative study of activating mediums for the cryopreserved sperm of several sturgeons using CASA [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(6): 711-720. [柳凌, Otomar Linhart, 危起伟, 等. 计算机辅助对几种鲟鱼冻精激活液比较[J]. 水产学报, 2007, 31(6): 711-720.]
- [21] Shi Y X, Cheng S, Zhu J Q, et al. Sperm cryopreservation and enzyme activity detection in *Lateolabrax maculatus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(6): 1241-1247. [史应学, 程顺, 竺俊全, 等. 中国花鲈精子的超低温冷冻保存及酶活性检测[J]. 水生生物学报, 2015, 39(6): 1241-1247.]
- [22] 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(3): 751-769.
- [23] Wang H T, Zhang P J, Xu Y L. Effects of salinity and storing periods on sperm motility of flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Marine Sciences, 1999, 23(5): 4-5. [王宏田, 张培军, 徐永立. 盐度及保存时间对牙鲆精子活力的影响[J]. 海洋科学, 1999, 23(5): 4-5.]
- [24] Ciereszko A, Dabrowski K, Ochkur S I. Characterization of acrosin-like activity of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa [J]. Molecular Reproduction and Development, 1996, 45(1): 72-77.
- [25] Krasznai Z. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility [J]. Aquatic Living Resources, 2003, 16(5): 445-449.
- [26] Krasznai Z, Morisawa M, Krasznai Z T, et al. Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea- and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility [J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2003, 55(4): 232-243.
- [27] Linhart O. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa [J]. Reproduction, 2002, 124(5): 713-719.
- [28] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, et al. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1996, 15(2): 167-179.
- [29] Alavi S M H, Cosson J, Karami M, et al. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: Effects of pH, dilution rate, ions and osmolality [J]. Reproduction, 2004, 128(6): 819-828.

Cryopreservation and its effects on spermatozoa quality of *Coreius guichenoti*

LIU Guangxia^{1,2}, WU Xingbing¹, HE Yongfeng¹, DENG Zhiming¹, YANG Deguo^{1,2}, WANG Xiaoming³, YANG Shaorong³, LIU Huan³

1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. China Three Gorges Projects Development Co., Ltd, Chengdu 610041, China

Abstract: The largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) is a dominant species and important economic fish in China, which is distributed in the upstream regions of the Yangtze River. However, it is currently classified as threatened due to a rapid decline in its population. Cryopreservation technology enables germplasm cells to be safely and effectively preserved for a long time, which will help with artificial reproduction (e.g., captive brood-stock management and seedling cultivation). In addition, cryopreservation can assist in maintaining original genotypes for the conservation of threatened and endangered species. Many studies have suggested that due to the species specificity of fish sperm, the extender composition, cryoprotectant type, and cryoprotectant concentration are different during cryopreservation. More importantly, there is currently no research on sperm cryopreservation of the largemouth bronze gudgeon. In the present study, to establish a sperm cryopreservation method for the largemouth bronze gudgeon, a computer assisted sperm motion analysis system (CASA) was used to find a suitable sperm cryopreservation method, by comparing the effects of four extenders (D15, D20, L1, and D1) and three cryoprotectants, including dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), and methanol (METH), at three concentrations (7.5%, 10%, and 12.5%; V/V) on sperm motility after thawing. Our procedures followed the two-step method of cooling the mixture and thawing the frozen semen in a 37°C water bath for 12–15 s. The results showed that D1 and METH are suitable choices for the extender and cryoprotectant, respectively. The motility of the sperm reached (78.11±14.74)%, which showed no significant difference compared to fresh sperm ($P>0.05$). In comparison with the other treatments, the 10% METH group performed better in terms of the average velocity of (50.28±12.46) µm/s, average linear velocity of (35.06±10.82) µm/s, and average path velocity of (39.44 ± 12.46) µm/s, which are significantly different values compared to those of fresh sperm ($P<0.05$). The fastest movement time and lifetime of the sperm were (8.67±1.15) s and (33.33±5.00) s, respectively. In summary, 10% METH as an antifreeze protective agent in D1 was the best cryoprotectant protocol for *C. guichenoti* sperm and could be applied in practice. The results provide a feasible technique for sperm preservation of largemouth bronze gudgeon, which could assist in artificial breeding and species conservation of the species.

Key words: *Coreius guichenoti*; sperm; cryopreservation; extender; cryoprotectant

Corresponding author: YANG Deguo. E-mail: yangdg@yfi.ac.cn