

DOI: 10.12264/JFSC2023-0289

瓦氏黄颡鱼精子冷冻保存技术

金佳利¹, 许金娇², 杜明润², 乔明辉^{1,3}, 阮瑞¹, 李创举¹

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. 鲁东大学农学院, 山东 烟台 264025;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)是我国极具发展前景的养殖品种, 本研究拟建立一套完善的瓦氏黄颡鱼精子冷冻保存体系, 为瓦氏黄颡鱼的人工繁殖、育种创新及种质资源保护提供技术支撑。利用计算机辅助精子分析系统进行精子质量检测, 对稀释液、稀释比例、抗冻剂、冷冻和复温程序进行了优化筛选。结果显示, 稀释液 2 对瓦氏黄颡鱼精子的保存效果较好, 最佳稀释比例为 1:10。以 DMSO 作为抗冻剂对瓦氏黄颡鱼精子毒性较大, 10% 的甲醇具有最佳的抗冻效果。瓦氏黄颡鱼精子冷冻程序的最优条件为: 平衡时间 30 min, 液氮上方 7 cm 处熏蒸 10 min。冻存的精子在 42 °C 水浴解冻 9 s 时具有较高的活力和运动性能。在本研究建立的冻存条件下, 复苏后的瓦氏黄颡鱼精子活力达 93%, 前向运动比例达 53%, 与鲜精无差异。

关键词: 瓦氏黄颡鱼; 精子保存; 精子活力; 稀释液; 抗冻剂; 平衡时间; 熏蒸高度

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)11-1301-10

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)隶属鲇形目(Siluriformes), 鲿科(Bagridae), 黄颡鱼属, 是黄颡鱼属鱼类中个体最大的种类, 是我国特有种, 广泛分布于长江流域。瓦氏黄颡鱼作为长江特色土著鱼类, 具有生长速度快、易驯养、肉味鲜美、抗病力强等优点, 是一个极具发展前景的养殖品种, 同时也在遗传育种方面表现出巨大的潜力^[1-2]。瓦氏黄颡鱼虽然具有一定的天然产量, 但目前野生资源呈下降趋势, 且种质资源利用程度低, 缺乏规模化的繁育体系。我国瓦氏黄颡鱼人工繁育技术已取得成功, 但在人工繁殖过程中, 瓦氏黄颡鱼雌、雄性腺发育不同步, 雄鱼较早发育, 繁殖过程中还需将雄鱼“杀鱼取精”, 导致瓦氏黄颡鱼人工繁育过程中受到诸多因素的限制^[3]。而筛选并建立一套优良的瓦氏黄颡鱼精子冷冻保存技术是提高人工繁殖技术、育种创新及保存优质良种资

源的有效手段^[4]。

精子冷冻保存技术已在 200 多种鱼类中建立并成功运用^[4-7]。汪亚媛等^[8]2014 年检测了瓦氏黄颡鱼精子在不同盐度和 pH 下的活力, 初步筛选了 4 种稀释液和 2 种抗冻剂(甲醇和 DMSO)的精子冷冻保存效果, 最优条件下解冻后的精子活力为 81.7%。该研究是瓦氏黄颡鱼精子保存中仅有的报道, 同时该研究未对精子冷冻程序进行优化筛选; 因此, 瓦氏黄颡鱼精子保存的相关研究还不深入。早期计算机辅助精子分析系统(computer-aided sperm analysis, CASA)还未普及, 仅通过显微镜观察肉眼识别和个人主观判断来评价精子活性误差较大。精子活性和运动性能是评估精子质量的重要参数^[4,9-10], 鱼类精子激活后运动速度快、持续时间短, 计算机辅助精子分析系统能快速准确地测定精子密度、活率、精子活力及运动

收稿日期: 2023-11-09; 修订日期: 2023-11-17.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400900); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023TD23).

作者简介: 金佳利(1990-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为鱼类营养与生理、鱼类遗传育种. E-mail: jljin@yfi.ac.cn

通信作者: 李创举, 研究员, 研究方向为鱼类生殖发育、鱼类营养与生理. E-mail: lcj@yfi.ac.cn

参数, 误差小、重复性好, 已在多种鱼类的精子保存研究中应用^[4,9]。本研究通过计算机辅助分析检测不同稀释液、抗冻剂及冷冻程序对瓦氏黄颡鱼精子质量的影响, 建立一套完善的瓦氏黄颡鱼精子冻存体系, 为瓦氏黄颡鱼的人工繁殖提供生产指导, 为瓦氏黄颡鱼规模化繁育、育种创新及种质资源保护和利用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 精液采集

实验对象为体重 500~750 g 的健康无伤且性腺发育成熟的瓦氏黄颡鱼雄性亲鱼, 购自荆州市鑫创渔业水产养殖专业合作社。采集精液时, 先用毛巾将瓦氏黄颡鱼鱼体擦干, 解剖取出精巢并在吸水纸上将精巢组织上的体液擦拭干净。将精巢放置在双层纱网上用剪刀剪碎, 挤出精液收集于 1.5 mL 离心管中。取新鲜精液于 3000 r/min 离心 10 min, 检测精浆渗透压和 pH。

1.2 精子活力检测

在载玻片上滴 10 μ L 纯水, 用枪头蘸取少量

精液在纯水中混匀激活, 迅速用计算机辅助精子分析系统(CASA, Hamilton Thoe CEROS II)检测精子的活力和各项运动参数, 包括精子总数、活力精子总数、前向运动精子数, 曲线运动速度(VCL, μ m/s)、直线运动速度(VSL, μ m/s)、平均路径速度(VAP, μ m/s)、鞭打频率(BCF, Hz)等。精子活力为运动精子数在精子总数中的占比, 前向运动精子比例为作前向运动的精子数在精子总数中的占比。

1.3 稀释液和稀释比例的筛选

按照表 1 的配方用超纯水配制 4 种精子稀释液, 并测定每种稀释液的 pH 和渗透压。将新鲜精液分别用 4 种稀释液按精液: 稀释液=1:5 的比例稀释。用精子分析仪检测每组精子活力和各项运动参数, 随后将稀释的精子 4 $^{\circ}$ C 保存, 在 24 h 和 48 h 再次对精子活力进行检测。用筛选出的最佳稀释液(E2)将新鲜精子按精液: 稀释液=1:2、1:5、1:8、1:10 和 1:15 的比例稀释, 在 0 h、24 h 和 48 h 用计算机辅助精子分析系统检测精子活力和各项运动参数, 确定精液的最佳稀释比例。

表 1 瓦氏黄颡鱼精子稀释液配方表

Tab. 1 The formula of the extenders for *Pelteobagrus vachelli* sperm

成分 composition	稀释液 1 (e1) extender 1 (e1)	稀释液 2 (e2) extender 2 (e2)	稀释液 3 (e3) extender 3 (e3)	稀释液 4 (e4) extender 4 (e4)	g/L
NaCl	10.3	10.01		6.2	
KCl	0.26	0.5	0.37		
CaCl ₂	0.28				
NaHCO ₃	0.03	0.44	2.49		
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.25			
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O		0.09			
KH ₂ PO ₄		0.07			
柠檬酸三钠 sodium citrate			10.93		
葡萄糖 glucose		0.99	26.39		
蔗糖 sucrose				34.31	
渗透压/(mmol/kg) osmotic pressure	350	336	261	303	
pH	6.5	7.5	7.5	6.0	

1.4 精子冷冻保护剂的筛选

本实验选取了鱼类精子冷冻保存中常用的 4 种抗冻剂: 甲醇、乙二醇、二甲基亚砷(DMSO)和乙二醇甲醚。将新鲜精液按 1:10 的比例用稀

释液 2 将精液稀释, 再分别加入 10%的抗冻剂。将精液分装在 0.5 mL 麦管中, 另留取少量精液检测冷冻前精子活力, 检测抗冻剂对精子毒性。将麦管在冰上平衡 10 min, 液氮上方 7 cm 处熏蒸

10 min, 随后将麦管投入液氮中冻存。将冻存后的精子在 37 °C 水浴中解冻 6 s, 然后转移到干净离心管中, 用精子分析仪检测复苏后的精子活力和各项运动参数。

1.5 抗冻剂浓度的筛选

将 1.4 中筛选的甲醇作为冷冻保护剂, 用稀释液 2 以 1:10 的比例对新鲜精液稀释, 分别加入 5%、8%、10%、12% 和 15% 甲醇, 将精液分装在 0.5 mL 麦管中, 按 1.4 中的冷冻程序对精子进行冻存和复苏, 随后用精子分析仪检测精子活力和运动参数, 筛选最佳抗冻剂浓度。

1.6 精子冷冻程序和复苏的优化

1.6.1 平衡时间优化 取新鲜精子, 用稀释液 2 将精液按 1:10 的比例稀释后加入 10% 的甲醇, 将精液分装在 0.5 mL 麦管中, 分别于冰上平衡 5、10、15、20、30、45 和 60 min, 随后按 1.4 中的冷冻步骤完成精子冻存。冷冻 24 h 后, 将麦管从液氮中取出, 在 37 °C 水浴锅中解冻 6 s, 用精子分析仪检测复苏后的精子的活力。

1.6.2 液氮熏蒸高度优化 将新鲜精液按 1.6.1 中的方法稀释和加入抗冻剂后, 将装有精液的麦管在冰上平衡 10 min, 随后在离液氮上方 3、5、7、9 和 11 cm 处熏蒸 10 min, 熏蒸结束后投入液氮中冻存, 37 °C 水浴锅中解冻 6 s 后用精子分析仪检测精子活力。

1.6.3 液氮熏蒸时间优化 取新鲜精液按 1.6.1 中的方法稀释和加入抗冻剂后, 将装有精液的麦

管在冰上平衡 10 min, 随后将麦管在离液氮上方 7 cm 处熏蒸 6、8、10、12 和 15 min, 熏蒸结束后将麦管投入液氮中冻存, 于 37 °C 水浴锅中解冻 6 s 后用精子分析仪检测精子活力。

1.6.4 解冻温度和时间的优化 取新鲜精液, 用稀释液 2 以 1:10 的比例稀释, 在精液中加入 10% 的甲醇, 混匀后分装在 0.5 mL 麦管中, 按 1.4 中的冷冻程序对精子进行冻存。将麦管从液氮中取出, 分别在 37 °C 解冻 6 s 和 9 s, 42 °C 解冻 6 s 和 9 s, 随后用精子分析仪检测不同复苏条件下的精子活力。

1.7 统计分析

实验数据以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, 使用 SPSS 22.0 对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 用 Turkey 检验法对数据进行显著性差异分析, 显著性水平设置为 0.05。

2 结果与分析

2.1 不同稀释液和稀释比例对精子质量的影响

瓦氏黄颡鱼新鲜精子的精浆渗透压为 295 mmol/kg, pH 为 8.0。本研究选取的 4 种稀释液调整后的配方见表 1, 测得渗透压分别为 350、336、261 和 303 mmol/kg, pH 分别为 6.5、7.5、7.5 和 6.0。4 种稀释液对瓦氏黄颡鱼精子的影响如图 1 所示, 精子活力在各组间没有显著性差异($P > 0.05$), 且随着保存时间的延长而降低, 在 24 h 和 48 h 稀释液 2 中的精子活力略高于其他各组精子活力。前

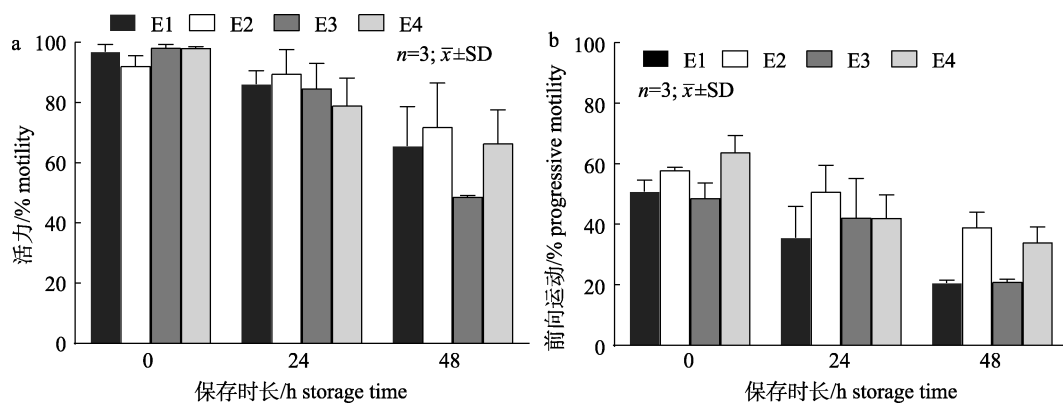


图 1 瓦氏黄颡鱼精子在不同稀释液中保存不同时间的精子活力(a)和前向运动精子比例(b)

E1、E2、E3 和 E4 分别代表稀释液 1、稀释液 2、稀释液 3 和稀释液 4。

Fig. 1 Sperm motility (a) and progressive motility (b) of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) in different extenders at different storage time

E1, E2, E3 and E4 represent extender 1, extender 2, extender 3 and extender 4, respectively.

向运动精子占比在 4 种稀释液中未出现显著差异 ($P>0.05$), 随着时间延长, 稀释液 2 中的前向运动精子具有较高的比例。

用稀释液 2 对瓦氏黄颡鱼新鲜精子进行不同

浓度的稀释, 结果显示, 瓦氏黄颡鱼精子在 1:10 的稀释比例下表现出最高的精子活力和前向运动比例, 但不同稀释比例下的精子活力和前向运动比例没有出现显著性差异(图 2)($P>0.05$)。

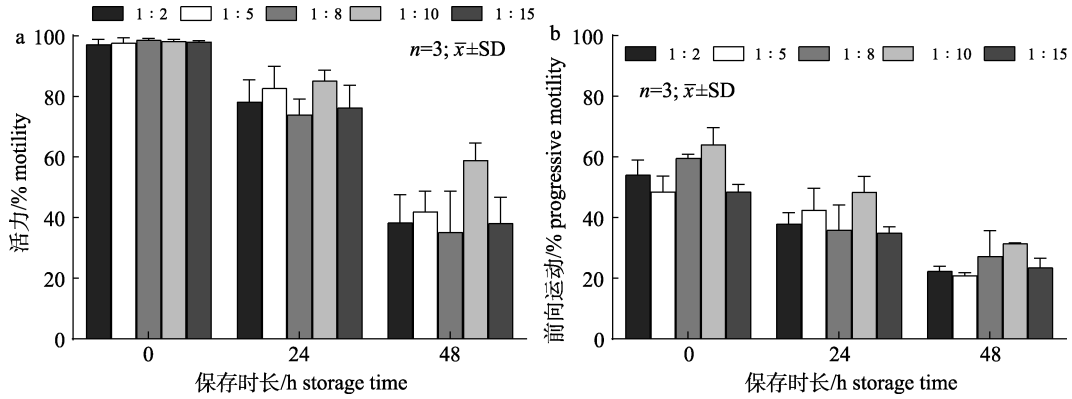


图 2 不同稀释比例下的瓦氏黄颡鱼精子在保存不同时长时的精子活力(a)和前向运动精子比例(b)
Fig. 2 Effect of different dilution ratios on sperm motility (a) and progressive motility (b) of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) at different storage time

2.2 不同冷冻保护剂对精子质量的影响

不同冷冻保护剂对瓦氏黄颡鱼精子冻前和冻后的影响如图 3 所示。加入乙二醇后, 检测到精子在冻前大量失活, 未作数据统计。瓦氏黄颡鱼精子冷冻前活力和前向运动比例在以 DMSO 作为

抗冻剂的处理组最低, 精子前向运动占比显著低于甲醇处理组 ($P<0.05$)。以甲醇作为冷冻保护剂的处理组精子冻前活力和前向运动比例最高, 但与乙二醇甲醚处理组间没有显著性差异 ($P>0.05$)。

冻存后的瓦氏黄颡鱼精子活力和前向运动较

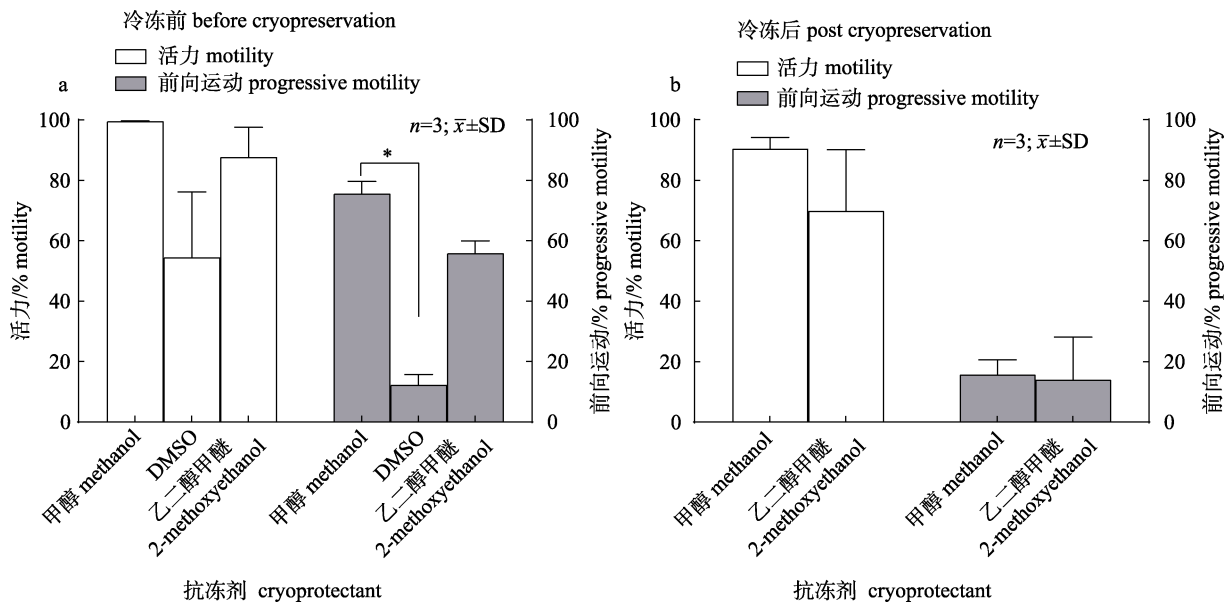


图 3 不同抗冻剂在冷冻前(a)和冷冻后(b)瓦氏黄颡鱼精子质量的影响
*表示两组之间具有显著差异 ($P<0.05$)。

Fig. 3 Effect of different cryoprotectants on darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) sperm quality before (a) and post (b) cryopreservation
* indicates significant difference between treatments ($P<0.05$).

冻存前均有所下降, 其中以 DMSO 作为冷冻保护剂的处理组, 冻存后检测到精子大量死亡, 未作数据统计。以甲醇为抗冻剂的瓦氏黄颡鱼精子冷冻后活力和前向运动比例均高于以乙二醇甲醚为抗冻剂的处理组, 但二者间没有显著性差异($P>0.05$)。

2.3 抗冻剂浓度对精子质量的影响

不同的甲醇浓度对精子活力造成了显著影响(图 4)($P<0.05$)。冷冻前, 瓦氏黄颡鱼精子活力和前向运动随着甲醇浓度的升高而降低, 在 15% 的甲醇处理组, 精子冻前活力显著低于 5%、8% 和

10% 的处理组, 精子前向运动比例显著低于 5% 的处理组($P<0.05$)。冷冻后, 瓦氏黄颡鱼精子活力随着甲醇浓度的增加呈先升高后降低的趋势, 在 10% 和 12% 的浓度下最高, 精子活力在各组间没有出现显著性差异($P>0.05$)。精子冷冻后前向运动比例随着甲醇浓度的升高而上升, 在 10% 的浓度组达到最高, 随后随着甲醇浓度的升高未产生显著性的变化。10% 和 12% 的甲醇处理组, 精子冷冻后前向运动比例显著高于 5% 和 8% 的甲醇浓度处理组($P<0.05$)。

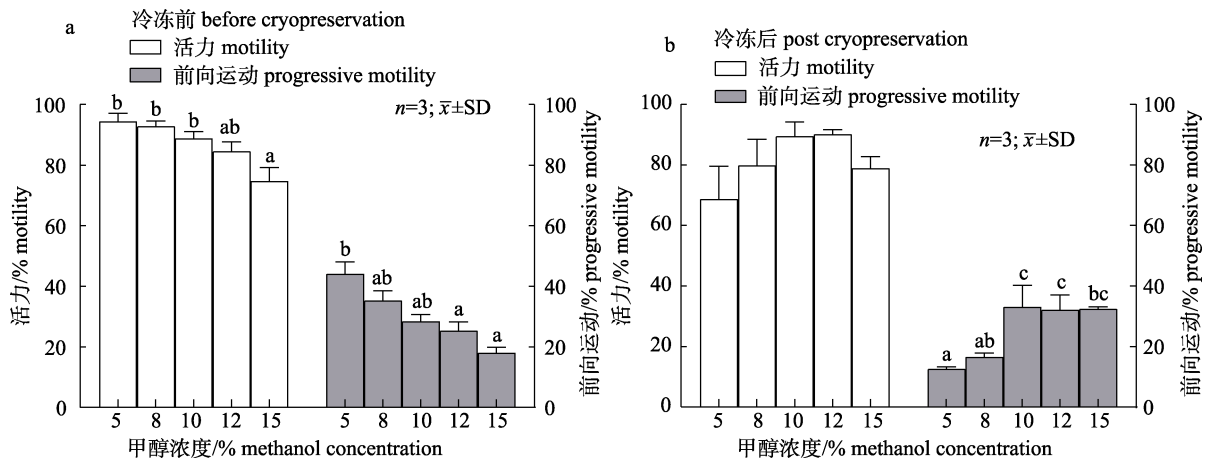


图 4 甲醇浓度对瓦氏黄颡鱼精子冷冻前(a)和冷冻后(b)精子质量的影响

柱形图上方字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Effect of methanol concentration on *Pelteobagrus vachelli* sperm quality before (a) and post (b) cryopreservation. Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

2.4 冷冻程序对精子质量的影响

如图 5 所示, 不同平衡时间对瓦氏黄颡鱼精子活力和精子前向运动没有产生显著影响($P>0.05$), 精子活力和前向运动比例在平衡 30 min 时略高于其他各平衡处理组。液氮上方的熏蒸高度对瓦氏黄颡鱼精子前向运动具有显著影响, 精子前向运动随着熏蒸高度的增加而升高, 在 7 cm 时达到最高值, 显著高于 3 cm 的处理组, 随后随着熏蒸高度的升高, 精子前向运动比例出现显著性的降低($P<0.05$)。然而熏蒸高度对瓦氏黄颡鱼精子活力没有造成显著性差异($P>0.05$)。熏蒸时间由 6 min 增加到 15 min, 瓦氏黄颡鱼精子活力未出现显著性差异, 而精子的前向运动比例在熏蒸 10 min 具有最高值, 与熏蒸 8 min 的处理组出现显著性差异($P<0.05$)。随着熏蒸时间延长至 12 min 和 15 min

时, 瓦氏黄颡鱼精子前向运动比例有所下降。

2.5 复苏程序对精子质量的影响

如图 6 所示, 不同的解冻温度和解冻时间对瓦氏黄颡鱼精子活力没有造成显著性影响($P>0.05$)。而精子前向运动在不同的复苏程序间出现了显著性差异, 在相同的解冻温度下, 复苏 9 s 时的精子前向运动比例高于复苏 6 s 时的精子。在 42 °C 水浴解冻 9 s 时, 瓦氏黄颡鱼精子前向运动比例达到最高, 显著高于 37 °C 水浴 9 s 和 42 °C 水浴 6 s 时的精子($P<0.05$)。

2.6 优化条件下冷冻保存后的精子质量

根据本实验优化条件下冷冻保存后的瓦氏黄颡鱼精子质量见表 2。结果显示, 鲜精活力为 98.43%, 前向运动比例为 54.94%, VCL、VSL 和 VAP 分别为 74.35、55.87 和 59.53 $\mu\text{m/s}$, 平均鞭

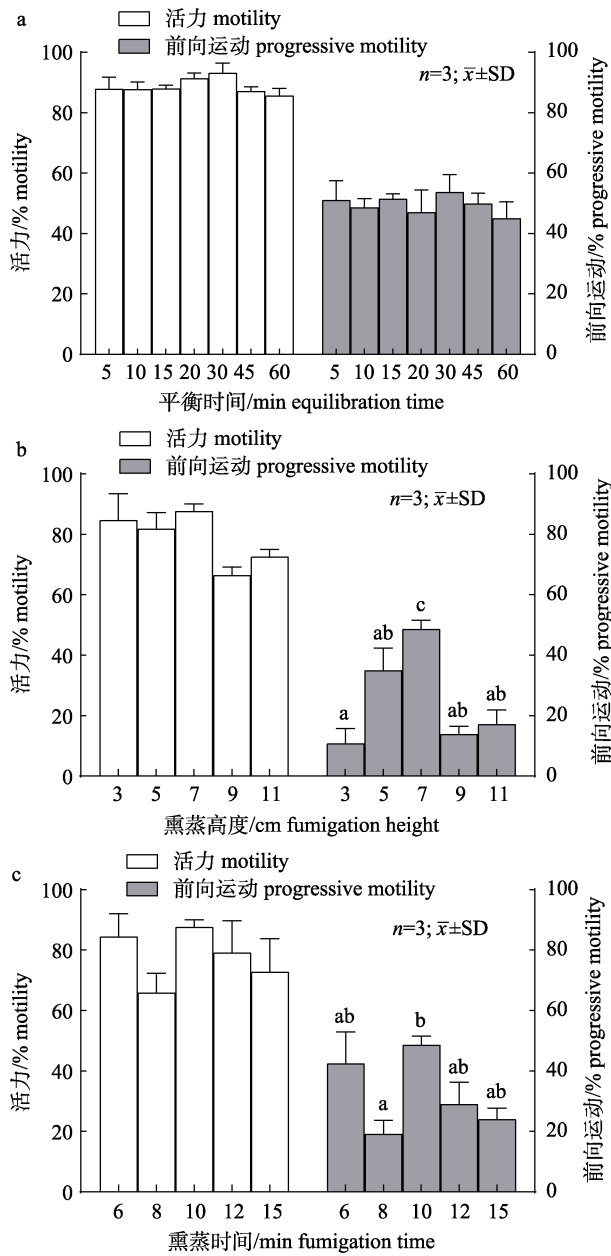


图 5 平衡时间(a)、熏蒸高度(b)和熏蒸时间(c)对瓦氏黄颡鱼精子质量的影响
柱形图上方字母不同表示差异显著($P < 0.05$).
Fig. 5 Effect of equilibration time (a), fumigation height (b) and fumigation time (c) on sperm quality of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*)
Different letters on the column indicate significant difference ($P < 0.05$).

打速率(BCF)为 30.06 Hz。冻存的精子复苏后活力达到 93%，前向运动比例达 53%，VCL、VSL 和 VAP 分别为 64.81、51.94 和 54.57 $\mu\text{m/s}$ ，平均鞭打频率为 28.10 Hz，与鲜精没有显著性差异($P > 0.05$)。

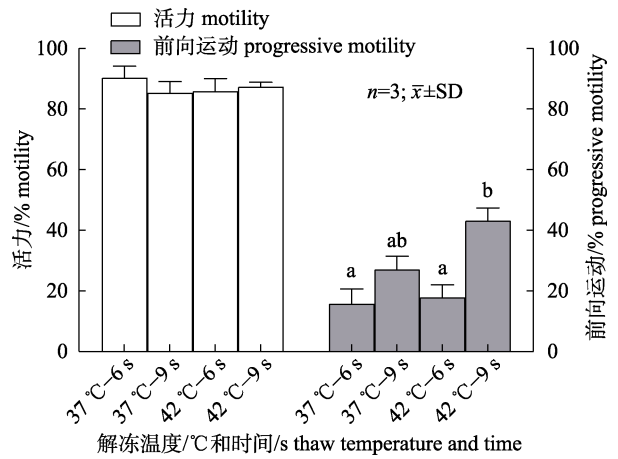


图 6 解冻温度和时间对冷冻后的瓦氏黄颡鱼精子质量的影响
柱形图上方字母不同表示差异显著($P < 0.05$).
Fig. 6 Effect of thawing temperature and time on post-thaw sperm quality of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*)
Different letters on the column indicate significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

本研究以黄颡鱼属精子冷冻保存相关研究^[8,11-13]为参考，选取了 4 种常用的精子稀释液配方，建立并优化瓦氏黄颡鱼精子冷冻保存方案。在预实验过程中，初筛稀释液配方下精子大量失活死亡，经检测稀释液渗透压均低于瓦氏黄颡鱼精浆渗透压(294.75 mmol/kg)。将稀释液配方做调整后(表 1)，4 种稀释液都能达到较好的保存效果，激活后的精子活力和前向运动比例与鲜精没有显著差异。选择精子稀释液需遵循的首要原则是稀释液渗透压需与精液等渗或高于精液，以防精子被激活^[14-16]；其次，稀释液的成分和配比应根据鱼的种类及其精子生理特性进行针对性的筛选，其基础液配方基本为具有一定缓冲能力的无机盐溶液，同时还含有能为精子提供营养的有机物，以维持代谢需要^[15-19]。本研究中稀释液 2 含有葡萄糖及多种无机盐成分，对瓦氏黄颡鱼精子的保存效果略优于其他 3 种稀释液。结果表明，维持瓦氏黄颡鱼精子体外成活的营养需求较为容易满足，适当的无机盐和糖源添加可在一定程度上保护和促进精子活性，提高精子运动能力。

表 2 鲜精和冻存后的瓦氏黄颡鱼精子质量参数

Tab. 2 Quality parameters of fresh and post cryopreservation sperm of *Pelteobagrus vachelli*n=3; $\bar{x} \pm SD$

处理 treatment	活力/% motility	前向运动/% progressive motility	VAP/($\mu\text{m/s}$)	VSL/($\mu\text{m/s}$)	VCL/($\mu\text{m/s}$)	BCF/Hz
新鲜精子 fresh sperm	98.43 \pm 0.27	54.94 \pm 1.70	59.53 \pm 2.08	55.87 \pm 2.13	74.35 \pm 1.73	30.06 \pm 0.35
解冻精子 frozen-thawed sperm	93.23 \pm 3.13	53.76 \pm 5.68	54.57 \pm 4.01	51.94 \pm 4.19	64.81 \pm 3.58	28.10 \pm 0.60

注: VAP 为平均路径速度, VSL 为直线运动速度, VCL 为曲线运动速度, BCF 为鞭打频率。

Note: VAP is average path velocity, VSL is straight linear velocity, VCL is curvilinear velocity, BCF is beat cross frequency.

精液稀释能延长精子活力, 稀释比例通常在 1:1 到 1:20^[16,20]。汪亚媛等^[8]在对瓦氏黄颡鱼精子生理特性及其超低温冷冻保存的研究中, 以精子与稀释液为 1:6 的比例进行冷冻保存研究, 解冻后的精子活力为(81.7 \pm 0.9)%, 与鲜精活力(95%)存在一定差距。古勇明等^[13]筛选的 YY 超雄黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)精子保存液在对精子 8 倍的稀释比例下, 精子活力保持较好。本研究用保存效果较好的稀释液 2 对瓦氏黄颡鱼鲜精进行不同比例的稀释, 结果显示, 瓦氏黄颡鱼精子在 1:10 的稀释比例下, 精子活性维持较好, 当稀释比例增加到 1:15 时, 精子活力和前向运动出现下降。

精子冷冻过程中添加抗冻剂能使细胞免受冰晶损伤和溶质损伤并调节细胞渗透压^[7,15,21-22], 然而, 抗冻剂在保护精子的同时, 也可能对精子细胞产生毒性^[7]。本研究结果显示, 以甲醇和乙二醇甲醚作为冷冻保护剂时瓦氏黄颡鱼精子在冷冻前具有较高的活力和前向运动比例, 而 DMSO 在冷冻前对瓦氏黄颡鱼精子表现出一定的毒性, 精子前向运动比例显著低于甲醇处理组。经过超低温冷冻程序处理后, 复苏的瓦氏黄颡鱼精子活力和前向运动比例较冷冻前均有所降低, 其中 DMSO 处理组的精子在冷冻后检测到大量死亡。由于不同鱼类精子细胞膜对不同抗冻剂的通透性不同, 鱼类对抗冻剂的选择具有特异性^[7]。鲈(*Lateolabrax japonicus*)、大菱鲂(*Psetta maxima*)等鱼类精子以 DMSO 作为抗冻剂效果较好^[14-15,23-24]; 中国花鲈(*Lateolabrax maculatus*)和黄鳍棘鲷(*Acanthopagrus latus*)等鱼类精子冷冻保存选用乙二醇为宜^[18,25]; 乙二醇甲醚则对条纹鲮脂鲤(*Prochilodus lineatus*)精子具有较好的保护效果^[26]。本研究结果显示,

以甲醇作为冷冻保护剂对瓦氏黄颡鱼精子具有较低的毒性及较好的抗冻效果, 与黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼中的研究结果一致^[8,12,27]。

抗冻剂对精子细胞的毒性会随着添加浓度的升高而增加^[7,28]。瓦氏黄颡鱼精子冷冻前活力和前向运动随着甲醇浓度的升高而下降, 在最高浓度组(15%)显著降低, 可能是由于甲醇对精子的负作用所造成。而超低温冷冻后, 甲醇对瓦氏黄颡鱼精子的保护作用随着甲醇浓度的增加呈先升高后降低的趋势, 精子前向运动在 10% 的浓度达到最高值, 随后趋于平稳。在高浓度的处理组, 精子活性并没有得到更好的保护, 可能是由于在冷冻前甲醇对精子的毒性作用已造成了精子损伤。结果表明, 在瓦氏黄颡鱼精子冷冻保存中使用 10% 的甲醇可最大限度减小对精子负面作用的同时也能达到最好的保护效果。

冷冻时的降温速率和解冻条件都可能会对精子细胞造成冰晶损伤或渗透性休克^[6,15,18,29]。精子冷冻前的平衡时间是冷冻保护剂进入细胞内的时间, 取决于精子细胞的渗透性及抗冻剂的类型和浓度^[19,30-31]。本研究中, 平衡时间对瓦氏黄颡鱼精子冷冻后活力和运动性能没有显著性影响, 平衡 30 min 时的精子活力和前向运动比例略高于其他各组。熏蒸高度决定了冷冻过程中的降温速率。本研究发现, 熏蒸高度和熏蒸时间对瓦氏黄颡鱼精子冻后活力的影响差异不显著, 但精子冷冻后的前向运动受到了熏蒸高度和熏蒸时间的显著影响。鱼类精子适宜的降温程序与鱼类精子生理特性、抗冻剂种类及浓度、冻存体积大小等因素有关, 如小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)精子在液氮上方 3.5 cm 处降温 5 min 效果较好^[32], 黄鳍棘鲷精子适宜的冷冻程序是在液氮上方 5 cm 处熏蒸

5 min^[25]。本研究结果表明,瓦氏黄颡鱼精子在 0.5 mL 麦管中平衡 30 min 后,于液氮上方 7 cm 处熏蒸 10 min,精子活性和运动能力保持最高。精子复苏常用的复温方法是在 30~40 °C 水浴中解冻。本研究发现,在不同的温度下解冻时间不同,瓦氏黄颡鱼精子运动性能在同一复苏温度下随解冻时间的延长而升高,在相同的解冻时间下,复苏温度高的处理组瓦氏黄颡鱼精子运动性能显著升高。在本实验条件下,瓦氏黄颡鱼精子在 42 °C 的温度下解冻 9 s 精子运动活力最强。

4 结论

本研究对 4 种稀释液对瓦氏黄颡鱼精子的保存效果进行了优化筛选,其中稀释液 2 对瓦氏黄颡鱼的保存效果较好,最佳稀释比例为 1:10;10% 的甲醇对瓦氏黄颡鱼精子的冷冻保护效果最好。瓦氏黄颡鱼精子冷冻程序的最优条件为:平衡时间 30 min,液氮上方 7 cm 处熏蒸 10 min。精子在 42 °C 水浴复温 9 s 时具有较高的活力和运动性能。在本研究优化条件下冻存的瓦氏黄颡鱼精子复苏后的活力和运动性能与鲜精无显著性差异。

参考文献:

- [1] Gong G R, Zhang J, Dan C, et al. Identification of *Pelteobagrus fulvidraco*, *Pelteobagrus vachelli* and their interspecific hybrid by DNA markers[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(2): 321-325. [巩高瑞, 张晋, 丹成, 等. 应用 DNA 分子标记鉴定黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及其杂交种的研究[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(2): 321-325.]
- [2] Wang W M, Yan A S, Zhang Z G, et al. Artificial hybridization of *Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *Pelteobagrus vachelli* ♂[J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, 32(3): 3-5. [王卫民, 严安生, 张志国, 等. 黄颡鱼♀与瓦氏黄颡鱼♂的杂交研究[J]. *淡水渔业*, 2002, 32(3): 3-5.]
- [3] Duan Z H, Sun J Y. Studies on the reproductive biology of *Pelteobagrus vachelli* (Richardson)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(6): 610-616. [段中华, 孙建贻. 瓦氏黄颡鱼的繁殖生物学研究[J]. *水生生物学报*, 1999, 23(6): 610-616.]
- [4] Zhou Z, Li S K, Zhao F, et al. Effect of different cryoprotectants on spermatozoa cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri baeri*)[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 34(6): 1347-1350. [周洲, 李世凯, 赵飞, 等. 不同抗冻剂对西伯利亚鲟精子冷冻保存的影响[J]. *西南农业学报*, 2021, 34(6): 1347-1350.]
- [5] Song L N, Tian Y S, Li X K, et al. Cryopreservation of marbled flounder (*Pseudopleuronectes yokohamae*) sperm and analysis of its physiological characteristics[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(4): 584-592. [宋莉妮, 田永胜, 李祥孔, 等. 钝吻黄盖鲽精子冷冻保存及生理特性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(4): 584-592.]
- [6] Li J C, Ke W J, Yang H, et al. Research progress of cryo-freezing technology applied in fish sperm preservation[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(18): 66-69. [李景春, 柯文杰, 杨虹, 等. 超低温冷冻技术应用于鱼精子保存的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(18): 66-69.]
- [7] Wang X F, Fan T J. The cryopreservation of fish spermatozoa [J]. *Marine Sciences*, 2003, 27(7): 28-31. [汪小锋, 樊廷俊. 鱼类精子冷冻保存的研究进展[J]. *海洋科学*, 2003, 27(7): 28-31.]
- [8] Wang Y Y, Zhang G S, Li L, et al. On physiological characteristics and cryopreservation of spermatozoa in *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Marine Fisheries*, 2014, 36(1): 29-34. [汪亚媛, 张国松, 李丽, 等. 瓦氏黄颡鱼精子的生理特性及其超低温冷冻保存的初步研究[J]. *海洋渔业*, 2014, 36(1): 29-34.]
- [9] Figueroa E, Valdebenito I, Farias J G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa [J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(6): 1691-1705.
- [10] Pereira J R, Pereira F A, Perry C T, et al. Dimethylsulfoxide, methanol and methylglycol in the seminal cryopreservation of Suruvi, *Steindachneridion scriptum*[J]. *Animal Reproduction Science*, 2019, 200: 7-13.
- [11] Ding S Q, Wan Q, Liu L, et al. Effects of sperm preservation liquid on the activity of sperms of *Pelteobagrus fulvidraco* at different temperatures[J]. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(1): 10-12. [丁淑荃, 万全, 刘磊, 等. 不同温度下精子保存液对黄颡鱼精子活力的影响[J]. *水利渔业*, 2007, 27(1): 10-12.]
- [12] Xia L P, Chen M T, Chen Y P, et al. Cryopreservation technology of *Pelteobagrus fulvidraco* sperm[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(10): 196-198. [夏良萍, 陈梦婷, 陈悦萍, 等. 黄颡鱼精子超低温冷冻保存技术[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(10): 196-198.]
- [13] Gu Y M, Chen B X, Han L Q, et al. Screening of sperm preservation solution and activation solution of YY super-*Pelteobagrus fulvidraco* and its application in production[J]. *Animals Breeding and Feed*, 2015(8): 5-10. [古勇明, 陈柏湘, 韩林强, 等. YY 超雄黄颡鱼精子保存液和激活液的筛选及在生产上的应用[J]. *养殖与饲料*, 2015(8): 5-10.]
- [14] You Y Z. Research on cryopreservation of *Takifugu bimaculatus* spermatozoa[J]. *Fishery Modernization*, 2017, 44(1): 35-39. [尤颖哲. 双斑东方鲀精子冷冻保存方法探究[J]. *渔业现代*

- 代化, 2017, 44(1): 35-39.]
- [15] Ma L, Li N, Hao S, et al. Cryopreservation of sperm in Ukraine scale carp[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(4): 473-478. [马林, 李楠, 郝爽, 等. 乌克兰鳞鲤精子超低温冷冻保存方法研究[J]. *水产科学*, 2019, 38(4): 473-478.]
- [16] Contreras P, Dumomé K, Ulloa-Rodríguez P, et al. Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: A review[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(3): 1373-1389.
- [17] Irawan H, Vuthiphandchai V, Nimrat S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm[J]. *Animal Reproduction Science*, 2010, 122(3-4): 236-243.
- [18] 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.]
- [19] Thapliyal M, Thapliyal A, Bhatt J P. Himalayan aquatic biodiversity conservation & new tools in biotechnology[M]. Srinagar (Garhwal) Uttarakhand: Transmedia Publication, 2011: 104-127.
- [20] Cabrita E, Robles V, Herráez P. Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species[M]. Boca Raton: CRC Press, 2009: 219-235.
- [21] Zhang Y, Qi X, Wang X J, et al. Ultrastructure and ultra-low temperature freezing effect of spermatozoon in black rockfish *Sebastes schlegelii*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(3): 355-359. [张莹, 齐鑫, 王孝杰, 等. 许氏平鲷精子超微结构及超低温冷冻对其形态的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(3): 355-359.]
- [22] Ding X Y, Li Z T, Duan P F, et al. Effects of long-term cryopreservation on ultrastructure and enzyme activity of *Epinephelus lanceolatus* sperm[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(7): 48-64. [丁小雨, 李振通, 段鹏飞, 等. 长期超低温冷冻保存对鞍带石斑鱼精子超微结构及酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2023, 47(7): 48-64.]
- [23] Ji X S, Chen S L, Tian Y S, et al. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization[J]. *Aquaculture*, 2004, 241(1-4): 517-528.
- [24] 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(1-4): 547-556.
- [25] Jia P Y, Guo H Y, Zhu K C, et al. Cryopreservation of sperm of *Acanthopagrus latus*[J]. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(6): 58-65. [贾濮元, 郭华阳, 朱克诚, 等. 黄鳍棘鲷精子冷冻保存方法探究[J]. *南方水产科学*, 2021, 17(6): 58-65.]
- [26] Viveiros A T M, Nascimento A F, Leal M C, et al. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(1): 193-201.
- [27] 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.
- [28] Santana J, Cabrita E, Eggen B, et al. Step by step optimization of a sperm cryopreservation protocol for spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen, 1772)[J]. *Theriogenology*, 2020, 149: 16-24.
- [29] Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, et al. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(5): 623-635.
- [30] Sandoval-Vargas L, Dumomé K, Contreras P, et al. Cryopreservation of coho salmon sperm (*Oncorhynchus kisutch*): Effect on sperm function, oxidative stress and fertilizing capacity[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736151.
- [31] Yang H P, Tiersch T R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 149(2): 224-232.
- [32] Zheng X B, Du C, Wang J Q, et al. Physiological characteristics and cryopreservation effect of *Larimichthys polyactis* sperm[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(1): 193-205. [郑学斌, 杜晨, 王景倩, 等. 小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)精子的生理特性及超低温冷冻保存研究[J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(1): 193-205.]

Cryopreservation technique for sperm of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*)

JIN Jiali¹, XU Jinjiao², DU Mingrun², QIAO Minghui^{1,3}, RUAN Rui¹, LI Chuangju¹

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. College of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China;
3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) is native to the Yangtze River basin. This fish species is intensively cultured because of its economic value and genetic advantage in breeding. The development of a sperm cryopreservation technique has facilitated the reproductive management and conservation of germplasm resources of numerous aquatic animals. However, this technique has not been thoroughly studied and established in darkbarbel catfish. This study aims to assess the effects of different extenders, cryoprotectants, and freezing procedures on the sperm quality of darkbarbel catfish, to develop a cryopreservation protocol for this fish. Computer-assisted sperm analyses of darkbarbel catfish sperm motility and velocity revealed the preferable viability of semen in extender 2 (all g/L; NaCl 10.01, KCl 0.5, NaHCO₃ 0.44, MgSO₄·7H₂O 0.25, Na₂HPO₄·12H₂O 0.09, KH₂PO₄ 0.07, glucose 0.99). The optimal dilution ratio was 1:10. The effects of methanol, glycols, 2-methoxyethanol, and dimethylsulfoxide (DMSO) on darkbarbel catfish sperm before and after cryopreservation were assessed. Sperm stored in an extender containing DMSO displayed significantly lower motility before freezing and poor quality after cryopreservation ($P<0.05$). Sperm motility and progressive motility were highest when methanol was used as the cryoprotectant. Sperm quality decreased significantly with increasing methanol concentrations before milt samples were frozen, with opposite results evident in post-thaw samples ($P<0.05$). The progressive motility of darkbarbel catfish sperm following cryopreservation was highest in 10% methanol and was stable with further increases in methanol concentration ($P<0.05$). Freezing and thawing procedures were optimized in this study. Equilibration time had no significant effect on sperm post-thaw quality. However, significant effects of fumigation height and time on sperm progressive motility were observed ($P<0.05$). Sperm progressive motility displayed a significantly high value at the height of 7 cm above the surface of liquid nitrogen and then decreased significantly with increasing fumigation height ($P<0.05$). Sperm placed horizontally 7 cm above the liquid nitrogen surface for 10 min exhibited preferable post-thaw quality. Thawing temperature and time did not significantly affect sperm total motility, but significantly affected the progressive motility of darkbarbel catfish sperm. The highest post-thaw sperm quality was observed using a water bath at a higher temperature of 42 °C for 9 s. In conclusion, the high quality of darkbarbel catfish sperm, compared to fresh milt, is achieved by storing the milt in extender 2 at a dilution ratio of 1:10, adding 10% methanol as a cryoprotectant, equilibrating at 4 °C for 30 min, fumigating 7 cm above the liquid nitrogen surface for 10 min, and thawing sperm at 42 °C for 9 s.

Key words: *Pelteobagrus vachelli*; sperm cryopreservation; sperm motility; extender; cryoprotectant; equilibration time; fumigation height

Corresponding author: LI Chuangju. E-mail: lcj@yfi.ac.cn