

黄鳍棘鲷精子冷冻保存方法探究

贾濮元^{1,2}, 郭华阳^{2,3}, 朱克诚^{2,3}, 刘宝锁^{2,3}, 郭 梁^{2,3},
张 楠^{2,3}, 江世贵^{2,3}, 张殿昌^{2,3}

(1. 河北农业大学海洋学院, 河北 秦皇岛 066003; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300; 3. 广东省海洋生物种业工程技术研究中心, 广东 广州 510300)

摘要: 黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*) 是中国具有重要商业价值的海水鱼类之一, 对其精子开展冷冻保存可为黄鳍棘鲷育种提供一定的技术支持, 可有效预防其种质资源衰退, 保持其养殖业的可持续发展。该研究以黄鳍棘鲷精子为实验材料, 对其精子冷冻保存的稀释液、葡萄糖浓度、抗冻剂种类及浓度、精子与保护液稀释比例和降温程序等进行了筛选优化。结果表明, 以含 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、5% 乙二醇的 MPRS 溶液与精子按 1:2 的比例稀释, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 平衡 30 min, 液氮面上 5 cm 熏蒸 5 min, 最后投入液氮保存 2 h, 将黄鳍棘鲷冷冻精子于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻后活性最好, 精子活力、运动时间和寿命可分别达到 $(85.17\pm 3.66)\%$ 、 $(9.16\pm 7.70)\text{ s}$ 和 $(94.29\pm 9.55)\text{ s}$ 。

关键词: 黄鳍棘鲷; 精子冷冻保存; 精子活力; 稀释液; 葡萄糖; 抗冻剂

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Cryopreservation of sperm of *Acanthopagrus latus*

JIA Puyuan^{1,2}, GUO Huayang^{2,3}, ZHU Kecheng^{2,3}, LIU Baosuo^{2,3}, GUO Liang^{2,3},
ZHANG Nan^{2,3}, JIANG Shigui^{2,3}, ZHANG Dianchang^{2,3}

(1. College of Ocean, Hebei Agricultural University, Qinhuangdao 066003, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China; 3. Guangdong Provincial Engineer Technology Research Center of Marine Biological Seed Industry, Guangzhou 510300, China)

Abstract: *Acanthopagrus latus* is one of the important breeding species in China, whose sperm cryopreservation can provide technical supports for its breeding, prevent the decline of its germplasm resources and maintain its sustainable development of the breeding industry effectively. In this experiment, we screened the diluent, glucose concentration, antifreeze type and concentration as well as dilution ratio and cooling procedure of the spermatozoa of *A. latus*. The results show that when the sperm were diluted with MPRS solution containing $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose and 5% ethylene glycol at the ratio of 1:2, balanced at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, fumigated 5 cm on the liquid nitrogen surface for 5 min, and finally stored in liquid nitrogen for 2 h, the frozen sperm had the best motility after thawing in $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath, and the sperm motility, motility time and life span could reach $(85.170\pm 3.66)\%$, $(9.16\pm 7.70)\text{ s}$ and $(94.297\pm 9.55)\text{ s}$, respectively.

Key words: *Acanthopagrus latus*; Cryopreservation of sperm; Sperm motility; Diluent; Glucose; Antifreeze type

收稿日期: 2021-03-19; 修回日期: 2021-05-28

资助项目: 广东省基础与应用基础研究基金联合基金青年基金项目 (2019A1515110309); 国家科技基础条件平台建设运行项目 (2019DKA30470); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2020TD29); 国家自然科学基金项目 (U20A2064)

作者简介: 贾濮元 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养和遗传育种。E-mail: pyjiawin@163.com

通信作者: 张殿昌 (1977—), 男, 博士, 研究员, 从事水产种质资源与遗传育种研究。E-mail: zhangdch@scsfri.ac.cn

鱼类精子冷冻是一种有效保护鱼类种质资源的生物技术, 具有极大的商业应用潜力^[1-2], 可有效简化对亲鱼的管理, 解决鱼类雌、雄配子发育不同步或地理隔离的问题, 从而有助于濒危物种资源保护和重要模式物种的谱系构建, 为鱼类遗传学研究不间断提供优质的配子材料, 增加养殖亲鱼的遗传变异性。Blaxter^[3]于1953年成功冷冻保存大西洋鲱 (*Clupea harengus*) 精子, 开启了鱼类精子冷冻保存的先河。近年来, 国内外学者已建立了鱼类精子冷冻保存技术体系, 构建了白斑狗鱼 (*Esox lucius*)^[4]、翘嘴鲌 (*Culter alburnus*)^[5]、红点鲑 (*Salvelinus leucomaenis*)^[1]、乌克兰鳞鲤 (*Cyprinus carpio*)^[6]、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)^[7]等重要经济鱼类的冷冻精子库, 并成功应用在鱼类的雌核发育和性别控制等方面。鱼类精子冷冻保存已成为长期保存鱼类优质资源的有效途径之一, 然而不同鱼类精子的生理特性不尽相同, 导致其冷冻保存技术具有特异性, 因此对特定养殖品种, 需要优化确定其精子冷冻保存技术参数, 建立适宜的精子冷冻保存技术体系。

黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*), 又名黄鳍鲷、黄脚立、赤翅等, 为浅海暖水性底层鱼类^[8], 因其肉质鲜美、口感极佳、营养价值较高, 加之其适应力强、生长快, 已成为我国南方池塘和网箱养殖的重要对象之一^[9]。黄鳍棘鲷是雌雄同体鱼类, 单个体时, 雄性1龄时可发育成熟, 到3龄时雄鱼转化为成熟雌性, 雌、雄发育不同步以及地理隔离的问题致使其育种受到限制, 制约了黄鳍棘鲷养殖产业的健康可持续发展。利用低温冷冻技术可有效解决雌、雄发育不同步的问题, 保证在人工授精时获得充足的鱼类精子供应, 使育种更加顺利, 保障其产业的健康可持续发展^[10]。自20世纪80年代起国内外开始了鲷科鱼类精子超低温冷冻保存的研究工作; 江世贵等^[9,11]对黑鲷 (*A. schlegelii*)、黄鳍棘鲷、平鲷 (*Rhabdosargus sarba*) 和真鲷 (*Pagrus major*) 4种鲷科鱼类精子的适盐性、精子激活条件以及pH对精子活力的影响等方面进行了研究; 李加儿等^[12]研究了环境因子对平鲷精子活力的影响; 其他学者在黑鲷^[13-14]、真鲷^[11,15]和金鲷 (*Sparus aurata*)^[16]等精子冷冻保存方面进行了研究。而目前关于黄鳍棘鲷精子冷冻保存的报道仅见 Gwo^[17]在冷冻保存稀释液、抗冻剂、降温程序等方面的研究。本实验进一步对黄鳍棘鲷精子超低温冷冻保存

条件进行优化筛选, 探索出适用于其精子简便有效的超低温冷冻保存方法, 以期为该种优良种质资源的保护以及开展其他鱼类精子超低温冷冻保存提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2龄黄鳍棘鲷亲鱼来自于中国水产科学研究院南海水产研究所热带研究开发中心, 体质量为300~450 g, 养于海南陵水新村港。2020年12月挑选性腺发育良好的雄性亲鱼, 采用轻轻挤压腹部的方法收集精液。采集精子时用干毛巾擦去鱼体表水分, 避免光线直射、避免血液、尿液及粪便的污染, 待精液流出后用洁净的注射器将精液收集于离心管并置于冰浴上 (4 ℃) 备用。

1.2 稀释液的筛选

将采集的精子进行镜检, 收集活力90%以上的精子进行后续实验。取50 μL精子, 分别加入100 μL的4种稀释液 (表1), 立即在显微镜下进行观察, 并以精子原地颤动为指标检测稀释液是否将精子激活。随后立即加入100 μL洁净灭菌的海水进行激活, 再次观察, 以检测稀释液是否对精子产生毒性以及能否有效保存精子, 筛选出精子活力最高的稀释液种类。每组实验设6个平行, 精子活力

表1 黄鳍棘鲷精子稀释液组成成分

Table 1 Composition of spermatozoon diluent of *A. latus* g·L⁻¹

成分 Ingredient	汉克斯液 Hank's	MPRS	科特兰液 Cortland	RS
氯化钠 NaCl	8.01	3.53	7.25	6.50
氯化钾 KCl	0.40	0.24	0.38	0.39
二水氯化钙 CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.14	0.17	0.18	0.12
碳酸氢钠 NaHCO ₃	0.35	0.25	1.00	0.20
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄	0.06	—	—	—
六水氯化镁 MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.10	0.19	—	—
七水硫酸镁 MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10	—	0.23	—
十二水磷酸氢二钠 Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.06	—	—	—
磷酸二氢钠 NaH ₂ PO ₄	—	0.22	0.41	0.01
葡萄糖 Glucose	10	11	1	—
胎牛血清 FBS	—	10	—	10

注: —. 稀释液中不含该成分。

Note: —. The diluent does not contain the ingredient.

为随机视野中被激活运动的精子占该视野全部精子的百分数。

1.3 葡萄糖浓度的筛选

使用筛选出的稀释液,将稀释液中葡萄糖质量浓度调整至 5、10、15 和 20 g·L⁻¹,并将精子与稀释液以 1:1 的比例稀释,总体积为 100 μL,每组实验设 6 个平行。稀释后立即加入 100 μL 洁净灭菌的海水进行激活,在显微镜下观察并记录精子活力、运动时间和寿命。精子运动时间为其由激活开始到 90% 的精子原地颤动为止所经历的时间 (s)。精子寿命为其从激活开始运动到 90% 的精子停止运动的时间 (s)。依据精子活力、运动时间和寿命筛选出适宜的葡萄糖浓度。

1.4 抗冻剂的筛选

选用甲醇 (MeOH)、乙二醇 (EG)、甘油 (Gly) 和二甲基亚砜 (DMSO) 4 种常见渗透性抗冻剂来检测其对黄鳍棘鲷精子的冷冻保护效果。分别以 4 种体积分数 (5%、10%、15% 和 20%) 添加甲醇、乙二醇、甘油和二甲基亚砜至筛选出的稀释液,配制成精子冷冻稀释保护液,与新鲜精子及不添加抗冻剂的冷冻精子进行筛选比较。冷冻稀释保护液配制完成后置于 4 ℃ 保存备用。为筛选黄鳍棘鲷精子冷冻保存的最优抗冻剂,将精子与配制好的冷冻稀释保护液以 1:1 的比例稀释,置于冰上平衡 1~2 min 使其混匀,总体积为 100 μL,每组实验设 6 个平行。将精子稀释混匀液置于 4 ℃ 冰箱中平衡 30 min,后置于液氮液面上方 10 cm 处熏蒸 5 min,最后投入液氮中保存供后续实验使用。2 h 后取出精子进行复苏,将冻精放入 37 ℃ 水浴中快速解冻至完全融化后,取少许精液均匀涂抹在载玻片上,滴加 100 μL 灭菌海水激活,利用显微镜观察并记录精子活力、测定快速运动时间和寿命,筛选出适宜冷冻精子的抗冻剂及浓度。

1.5 稀释比例的筛选

确定最优的稀释液和抗冻剂后,将精子与冷冻稀释保护液分别按照 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:7 和 1:9 的比例稀释,总体积为 100 μL,每组实验设 6 个平行。按照 1.4 的方法冷冻、解冻,观察和记录精子活力、测定快速运动时间和寿命,筛选出适宜冷冻精子的稀释比例。

1.6 降温程序的筛选

使用筛选出的最优稀释液、抗冻剂,将精子与保护液以最优的稀释比例进行稀释,检测不同降温

程序对黄鳍棘鲷精子冷冻保存活力的影响。每组实验设 6 个平行,将精子冻存混匀液于 4 ℃ 冰箱平衡 30 min 后,置于液氮液面上方 2.5、5.0、7.5 和 10.0 cm 的 4 种高度熏蒸 5 min,然后移至液氮中冷冻保存供后续实验使用。按照 1.4 的方法解冻,观察和记录精子的活力、运动时间和寿命,筛选出最优的降温程序。

1.7 数据统计分析

用 Excel 2010 和 SPSS 26.0 软件处理分析实验数据,以单因素方差分析法 (One-way ANOVA) 检验各组精子活力、运动时间和寿命的差异显著性,再用多重比较检验各处理组之间的差异显著性, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著,并用 Origin (2019) 软件对所得数据做柱状图。

2 结果

2.1 黄鳍棘鲷精子冷冻保存稀释液的筛选

本实验选取 4 种常见的稀释液来检测其对黄鳍棘鲷精子保存的效果,并与新鲜精子进行比较(表 2)。黄鳍棘鲷新鲜精子的平均活力为 (94.83±1.47)%,加入 Hank's、MPRS、Cortland、RS 4 种稀释液后精子活力分别达到 (84.67±1.75)%、(2.00±1.41)%、(5.00±2.61)% 和 (25.83±4.92)%。MPRS 液和 Cortland 液的精子活力之间无显著性差异 ($P>0.05$),均极显著低于其他实验组 ($P<0.01$)。加入灭菌海水激活精子,其活力分别达到 (74.50±4.18)%、(90.17±2.79)%、(33.17±4.07)% 和 (72.50±5.01)%。MPRS 液对黄鳍棘鲷精子保存的效果显著低于新鲜精子的活力 ($P<0.01$),但显著高于其他各组稀释液

表2 黄鳍棘鲷新鲜精子加入4种稀释液以及激活前后活力对比

Table 2 Comparison of sperm activity before and after addition of four diluents to fresh sperm of *A. latus*

新鲜精子活力 Fresh sperm motility/%	加入稀释液 Add diluent	加入稀释液后精子活力 Sperm motility after adding diluent/%	加入激活液后精子活力 Sperm motility after adding activator/%
94.83±1.47 ^a	汉克斯液 Hank's	84.67±1.75 ^b	74.50±4.18 ^c
	MPRS	2.00±1.41 ^d	90.17±2.79 ^b
	科特兰液 Cortland	5.00±2.61 ^d	33.17±4.07 ^d
	RS	25.83±4.92 ^c	72.50±5.01 ^c

注: 同列不同小写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Values with different letters in the same column are significantly different ($P<0.05$).

($P<0.01$)。由上述结果得出 MPRS 液是适合黄鳍棘鲷精子保存的基础稀释液。

2.2 黄鳍棘鲷精子冷冻保存葡萄糖浓度的筛选

以 MPRS 液为稀释液, 将其葡萄糖质量浓度分别调整至 5、10、15 和 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 加入激活液后立即使用显微镜观察。随着葡萄糖质量浓度由 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加至 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 精子的活力、运动时间和寿命均呈先上升后下降的趋势 (图 1)。其中葡萄糖质量浓度为 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 精子的活力、运动时间和寿命均最高, 分别可达到 $(83.33\pm3.98)\%$ 、 (73.81 ± 17.28) s 和 (138.75 ± 20.70) s, 显著高于其他葡萄糖浓度组 ($P<0.01$)。

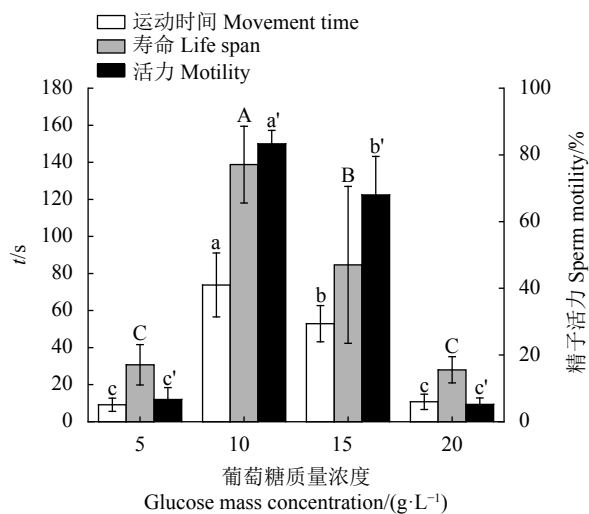


图1 不同葡萄糖质量浓度对精子活力、运动时间和寿命的影响

精子运动时间和寿命以左边纵轴为准, 精子活力以右边纵轴为准; 不同字母表示组间差异显著 ($P<0.05$); 后图同此。

Figure 1 Effects of different glucose concentration on sperm motility, sperm movement time and sperm life span

Sperm movement time and sperm life are based on the left vertical axis, and sperm motility is based on the right vertical axis; different letters indicate significant difference among the groups ($P<0.05$); the same case in the following figures.

2.3 黄鳍棘鲷精子冷冻保存抗冻剂的筛选

以 MPRS 液为黄鳍棘鲷精子冷冻保存稀释液, 分别以终体积分数为 5%、10%、15% 和 20% 加入抗冻剂甲醇、乙二醇、甘油和二甲基亚砜, 超低温冷冻保存黄鳍棘鲷精子, 检测冻精活力、运动时间及寿命来确定抗冻剂的保护效果 (图 2)。结果表明甘油对黄鳍棘鲷的精子基本无抗冻保护作用, 各浓度组之间无显著性差异 ($P>0.05$, 图 2-c); 甲醇组和二甲基亚砜组体积分数由 5% 增加到 20%, 精子活力、运动时间及寿命均有先上升后下

降的趋势 (图 2-a, 2-d), 两组中保存效果最好的分别是 10% 甲醇组和 15% 二甲基亚砜组, 精子活力分别为 $(46.00\pm4.97)\%$ 和 $(41.25\pm2.99)\%$, 精子运动时间分别为 (19.83 ± 4.44) s 和 (22.18 ± 2.61) s, 寿命分别为 (84.59 ± 12.76) s 和 (65.34 ± 12.85) s, 两者之间无显著性差异 ($P>0.05$); 乙二醇各浓度组中随着浓度的增高, 其对黄鳍棘鲷精子抗冻保护的作用逐渐减弱, 其中以 5% 乙二醇作为抗冻剂, 冷冻精子激活后的活力、运动时间和寿命最高, 分别为 $(89.67\pm3.44)\%$ 、 (74.02 ± 11.32) s 和 (341.33 ± 13.83) s, 均显著低于新鲜精子的活力 $[(94.83\pm1.47)\%]$ 、运动时间 $[(110.62\pm10.34)$ s] 和寿命 $[(408.79\pm16.16)$ s] ($P<0.05$, 图 2-b), 表明 5% 乙二醇对黄鳍棘鲷精子抗冻保护效果最好。

2.4 黄鳍棘鲷精子冷冻保存稀释比例的筛选

以 MPRS 液为稀释液, 以 5% 乙二醇为抗冻剂, 不同稀释比例下精子冷冻保存的效果见图 3。黄鳍棘鲷精子与保护液稀释比例为 1:2 时冻精激活后活力最高 $[(89.67\pm4.63)\%]$, 但与稀释比例为 1:3、1:4 和 1:5 时差异不显著 ($P>0.05$), 稀释比例为 1:7 和 1:9 时差异不显著 ($P>0.05$), 均显著低于稀释比例 1:2 ($P<0.05$), 活力最低的是稀释比例 1:1。精子运动时间和寿命均以稀释比例为 1:2 时最高, 分别为 (68.54 ± 12.91) s 和 (206.87 ± 33.08) s, 均显著高于其他实验组 ($P<0.05$), 稀释比例为 1:3、1:4、1:5、1:7 和 1:9 时精子运动时间无显著差异 ($P>0.05$), 均显著高于稀释比例 1:1 组 ($P<0.01$)。综合精子活力、运动时间和寿命可知, 稀释比例为 1:2 时黄鳍棘鲷精子冷冻保存的效果最优。

2.5 黄鳍棘鲷精子冷冻保存降温程序的筛选

以 MPRS 液为稀释液, 葡萄糖质量浓度为 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 以 5% 乙二醇为抗冻剂, 以 1:2 的比例稀释精液, 分别将精子冻存混匀液置于液氮液面上方不同高度进行黄鳍棘鲷精子的冷冻保存。解冻复苏后检测精子冷冻保存的效果 (图 4)。随着降温高度由 2.5 cm 升高至 10 cm, 冻精解冻后的精子活力、运动时间和寿命均呈先上升后下降趋势, 其中 5.0 cm 组的精子寿命为 (94.29 ± 9.55) s, 显著高于其他高度组 ($P<0.01$), 精子活力 $[(85.17\pm3.66)\%]$ 和运动时间 $[(59.16\pm7.70)$ s] 与 7.5 cm 组精子活力 $[(78.80\pm6.53)\%]$ 和运动时间 $[(53.12\pm6.87)$ s] 无显著性差异 ($P>0.05$), 10.0 cm 组各项指标均显著低于

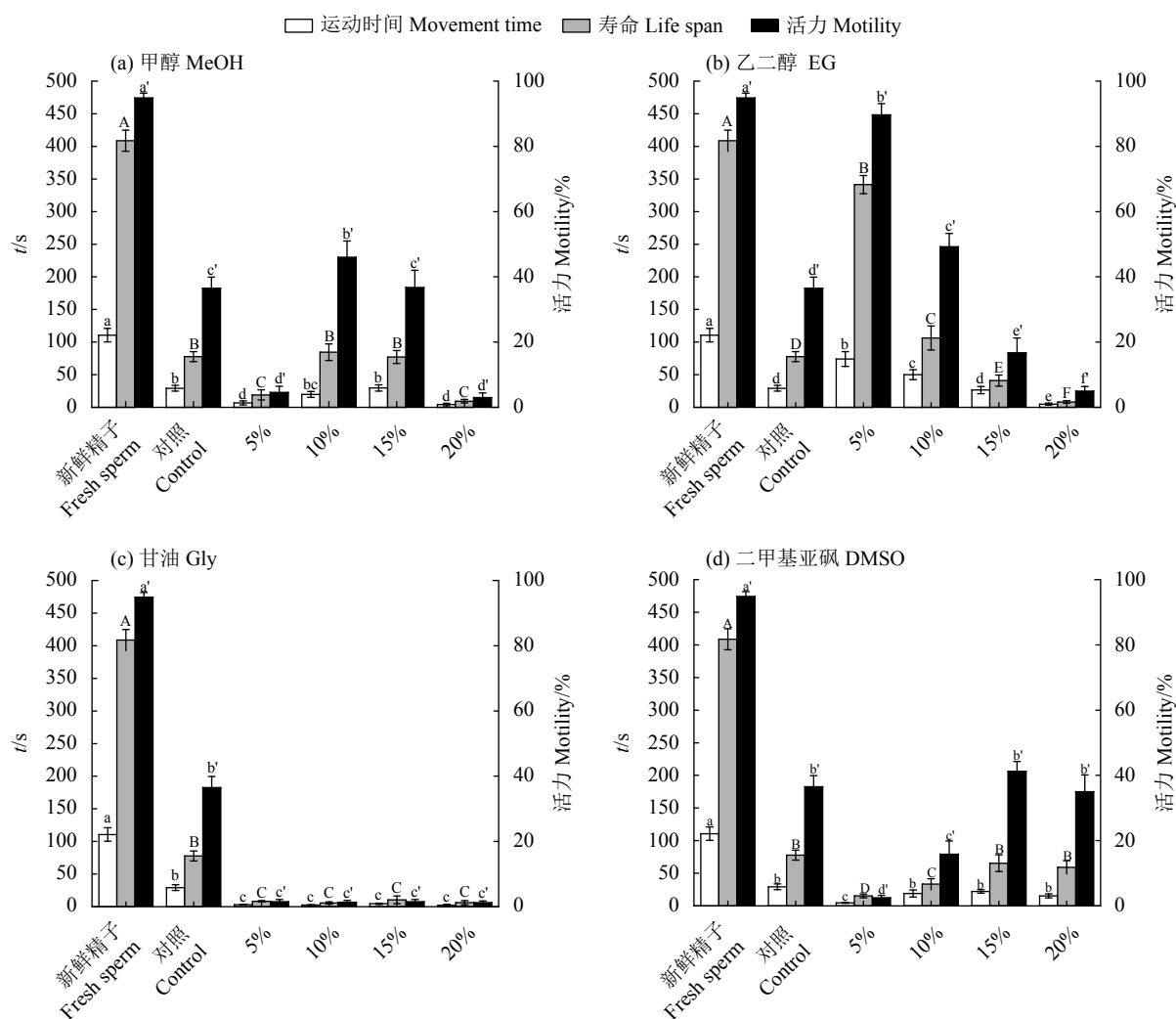


图2 同种稀释液、不同浓度的4种抗冻剂对精子活力的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of four kinds of cryoprotectant on sperm motility with same solution as diluent

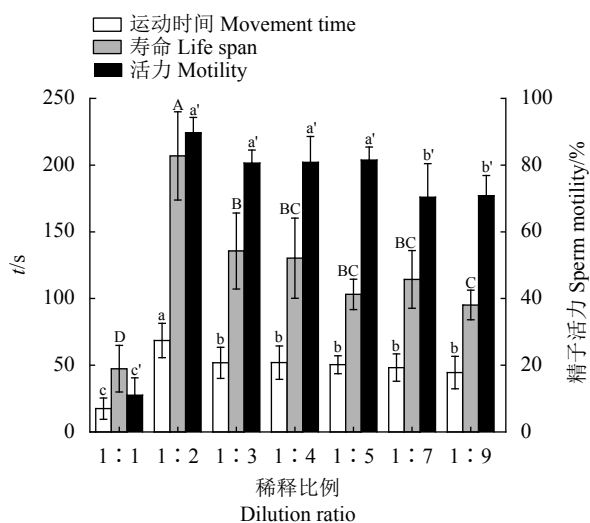


图3 冷冻保存中不同稀释比例对精子活力、运动时间和寿命的影响

Figure 3 Effects of different dilution ratios on sperm motility, sperm movement time and sperm life span

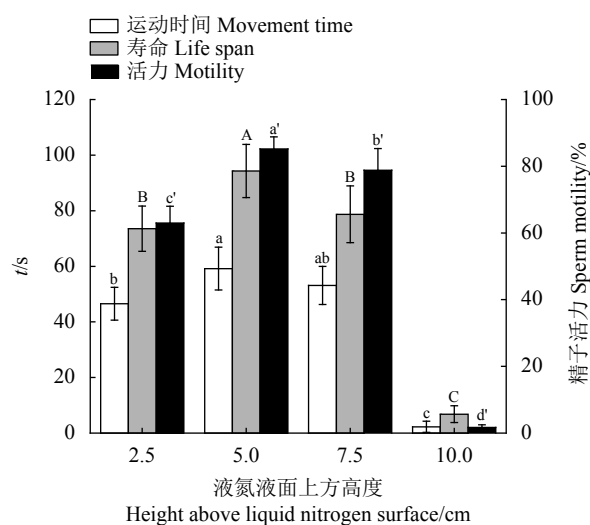


图4 冷冻保存中不同液氮液面上方高度对精子活力、运动时间和寿命的影响

Figure 4 Effects of different height above liquid nitrogen surface on sperm motility, sperm movement time and sperm life span

其他高度组。综上, 5.0 cm组对黄鳍棘鲷冷冻精子有良好的保护作用, 而 10.0 cm 组的保护作用较弱。

3 讨论

3.1 稀释液对黄鳍棘鲷精子活力的影响

通常精子被排出体外后与水或非等渗溶液结合后就会被激活发生剧烈运动。而稀释液可以为精子提供一个适宜的生存环境, 并为其提供一定营养, 提高精子离体后的生存时长, 减轻抗冻剂对精子的毒害作用, 降低精子冷冻保存中的负面影响, 有效预防精子被激活。因此稀释液应该对精子无毒或是毒性较小, 防止精子被激活^[18], 且组成成分应尽可能简单^[11]。目前鱼类精子稀释液尚无统一标准, 应根据不同物种鱼类精子的生理特性筛选出该种所适宜的稀释液种类。目前 Hank's、MPRS、Cortland 和 RS 都是常用的精子冷冻保存稀释液, 研究发现 Hank's 液较适用于鲈形目鱼类精子的保存, D-15 稀释液常用于草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 等鲤科鱼类精子的冷冻保存中^[19]。尤颖哲^[10]研究表明适宜双斑东方鲀 (*Takifugu bimaculatus*) 精子冷冻保存的稀释液是 MPRS 液。江世贵^[11]在进行黑鲷、真鲷及平鲷精子超低温冷冻保存时发现 5% 葡萄糖溶液、1% 氯化钠溶液、3% 柠檬酸钠溶液都是适宜的稀释液。精子离开鱼体后环境变化、营养消耗、能量代谢等致使其存活时间缩短而死亡, 稀释液则能维持精子在体外的生理状态, 使其不受损害并延长寿命^[18]。稀释液中钠离子 (Na^+)、钾离子 (K^+) 可以较好地维持精子的渗透压^[20]; 钙离子 (Ca^{2+}) 能引起精子聚集, 使精子活力降低, 对精子的活动具有抑制作用; 也有研究证实葡萄糖可以增强精子活力, 延长精子寿命^[21], 但至今关于稀释液还没有一个统一的说法^[22], 应根据不同鱼类进展特性进行逐个实验筛选。本实验中加入不同稀释液后黄鳍棘鲷精子活力差异较大, Hank's 液不能较好地抑制精子的活动, 保存期间精子活力有一定程度的损耗, 激活后由 $(84.67 \pm 1.75)\%$ 降低至 $(74.50 \pm 4.18)\%$; 而加入 MPRS 液和激活液激活前后, 精子活力由 $(2.00 \pm 1.41)\%$ 升高至 $(90.17 \pm 5.01)\%$, 保存过程中精子损耗小且更易被激活, 结果证实适宜黄鳍棘鲷精子超低温冷冻保存的稀释液为 MPRS 液, 可获得 80%

以上的冻精活力, 与双斑东方鲀的研究结果相同。由此说明 MPRS 液可为黄鳍棘鲷精子提供更为适宜的存活环境及营养。其他种类稀释液得到的精子活力显著低于 MPRS 液, 可能是其他稀释液未能为黄鳍棘鲷精子提供适合生存的冷冻环境, 或不能稀释抗冻剂, 使精子处于一个毒性较高的环境, 因此不适用于黄鳍棘鲷精子的冷冻保存。

3.2 葡萄糖浓度对黄鳍棘鲷精子活力的影响

葡萄糖可以在精子冷冻保存期间为其提供能量以维持正常的生理活动和功能, 具有较低的毒性, 并可以帮助精子在冷冻期间预防冰晶的形成, 降低精子形成冰晶的可能性, 保持精子活力、延长精子寿命^[23-24]。适宜的葡萄糖浓度可以提高精子耐受冷冻损伤的能力, 但过高的葡萄糖浓度则不利于精子活力的保持。冷冻保存条件下葡萄糖浓度继续增加会使糖酵解产物过多, 积累后产生较多的活性氧破坏了精子结构^[25-26], 进而致使精子凋亡^[24,27]。不同种类对葡萄糖的需求有差异, 哲罗鲑 (*Hucho tai-men*)^[28]精子冷冻保存过程中 30% 的葡萄糖有益于提高其精子活力; 江世贵^[11]使用 5% 的葡萄糖超低温冷冻保存真鲷精子 209 d 后的激活率可达 80%; 本实验中, 随着葡萄糖浓度的增加, 黄鳍棘鲷精子活力先升高后降低, 在葡萄糖质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时精子活力最高, 但当葡萄糖质量浓度达到 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时精子活力、运动时间和寿命均明显降低。

3.3 抗冻剂的种类和浓度对黄鳍棘鲷精子活力的影响

精子超低温保存过程中, 较低的温度可能会对精子产生冰晶损伤, 破坏精子的细胞结构, 使其丧失生理功能, 抗冻剂则可以降低冰点进而降低冰晶对精子结构的损伤^[29], 达到保护精子的目的。理论上抗冻剂浓度越高, 在精子冷冻保存期间对精子的保护效果越好, 但抗冻剂浓度与其对精子的毒性呈正相关^[30], 浓度过高可能对精子有毒甚至致死。目前常用渗透性抗冻剂有甲醇、乙二醇、甘油、丙二醇 (PG)、乙二醇甲醚 (MG) 和二甲基亚砜等, 这些抗冻剂在溶液中可自由通过细胞膜, 减缓精子冷冻过程中的收缩^[18], 降低超低温冷冻保存中对精子的冰晶损伤, 从而达到保护精子的目的, 有效减小超低温冷冻保存中对精子的冰晶损伤。其中甘油多被用于鱼类精子的冷冻保存, 并在花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、大黄鱼 (*L. crocea*) 等精子的保存中取

得较好的抗冻效果;二甲基亚砜和甲醇多用于淡水鱼类精子的冷冻保存,二甲基亚砜在鲤^[31]、大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)^[32]、光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)^[33]等精子的保存中有较为理想的效果;使用10%甲醇作为抗冻剂冷冻保存暗色唇鱼(*Semilabeo obscurus*)^[30]、圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)^[34]等鱼类精子时得到较高的激活率;真鲷精子按 $V(\text{精液}):V(\text{二甲基亚砜}):V(\text{葡萄糖})=10:75:15$ 进行超低温冷冻保存可获得较高的冻精活力^[35]。Gwo^[17]使用10%二甲基亚砜为抗冻剂冷冻保存黄鳍棘鲷精子,冷冻30 min取出检测后获得约75%的冻精活力,使用10%甲醇为抗冻剂则对精子无保护作用。在本实验中任何浓度的二甲基亚砜、甘油和甲醇对超低温冷冻保存的黄鳍棘鲷精子均有一定的保护作用,但乙二醇实验组中5%的终体积分数可获得黄鳍棘鲷冷冻精子复苏后的最佳活力,在其精子冷冻保存期间起到良好的抗冻作用。

3.4 稀释比例对黄鳍棘鲷精子活力的影响

在鱼类精子冷冻保存实验中,精子与冷冻稀释保护液一般以1:1~1:20的体积比稀释时可以取得良好的冷冻保存效果^[36],过高或过低的稀释比例都会降低精子活力甚至致死,因此适宜的稀释比例能够更好地保持精子良好的活力和稳定性,减轻高度稀释对精子产生的不利影响。张崇英等^[37]研究发现以D-17为稀释液稀释胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)精子时最佳的稀释比例为1:3,以D-20为稀释液稀释比例为1:3与1:6无显著性差异,均有较好的保存效果。Lee等^[38]研究发现较高的稀释率与解冻后精子活力降低有关。本实验中发现随着稀释率的增加,黄鳍棘鲷精子解冻后的活力、运动时间和寿命先增加后降低,这与大鳞副泥鳅^[32]精子超低温冷冻保存得到的精子活力趋势变化一致,其中解冻精子活力在稀释比例为1:2时达到最高,但稀释率过高会导致精子活力显著降低,这与Lee等^[38]研究结论一致,而与其他鲷科鱼类精子超低温冷冻保存中精液与保存液的比例1:4~1:9^[11]有所不同,这可能是由于采取了不同的操作程序或改变了某些工作参数导致最适稀释比有差异。

3.5 降温程序对黄鳍棘鲷精子活力的影响

不同种鱼类精子冷冻保存时所适用的降温程序

有所差异,需逐步对精子降温,寻求适宜的降温程序使其对低温冷冻有一个逐步适应的过程,以获取最好的保存效果。目前二步法、三步法和程序降温仪降温法常用于鱼类精子的降温,鲤形目^[33]多用二步法,鲷形目^[39]与鲱形目^[40]多用三步法。程序降温仪是连续降温,具有合理的降温梯度,但设备昂贵、操作烦琐,实际过程中多采用简便的二步法和三步法。Koh等^[41]在七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)精子的冷冻保存实验中于液氮液面上方2.5、5、7.5和10 cm处降温至-50℃后投入液氮保存,各组冻精解冻后活力无显著性差异;双斑东方鲀^[10]精子冷冻采用三步法降温可获得接近鲜精水平、高达83%的冻融精子活力;江世贵^[11]在黑鲷精子超低温保存中未采用降温平衡,直接将精子浸入液氮中保存,取得了最好的保存效果;Gwo^[17]在冷冻保存黄鳍棘鲷精子的实验中,于液氮液面上方1.0、4.0、8.0 cm和置于干冰中得到的精子活力没有差异。本实验中黄鳍棘鲷精子直接投入液氮未获得激活精子,使用二步法对黄鳍棘鲷精子进行降温,经过4℃平衡后分别置于液面上方2.5、5.0、7.5和10 cm熏蒸5 min后,投入液氮2 h后得到了一定的冻精活力,且由结果可知5.0 cm组精子活力、运动时间和寿命显著高于其他组,10.0 cm组为最低,可能是采取不同的稀释液、稀释比例以及冷冻保存时间等导致结果与Gwo^[17]的研究有所差异。

4 结论

通过对黄鳍棘鲷精子稀释液、抗冻剂、精子与保护液稀释比例、葡萄糖浓度筛选以及降温程序优化,确定了以含10 g·L⁻¹葡萄糖、5%乙二醇的MPRS溶液与精子按1:2比例稀释,4℃平衡30 min,液氮面上5 cm熏蒸5 min,最后投入液氮保存的方法,可有效冷冻保存其精子,液氮冷冻2 h后可恢复(85.17±3.66)%的黄鳍棘鲷冷冻精子活力。本实验结果可为黄鳍棘鲷精子冷冻保存技术及其精子冷冻库的建立提供一定的技术支持,有关黄鳍棘鲷精子冷冻保存技术还需要进一步优化完善,以获取更高质量的精子。

参考文献:

- [1] JUDYCKA S, NYNCA J, DIETRICH M A, et al. Development of an efficient and standardized method for the cryopreservation of

- Arctic charr milt and its use in the fertilization of brook trout eggs to produce 'spartic' hybrids[J]. *Aquaculture*, 2019, 513: 734363.
- [2] 张美娜, 郭富强, 宋国欣, 等. 冷冻保护剂对家畜精液冷冻保存的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019(21): 37-41, 45.
- [3] BLAXTER J. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring[J]. *Nature*, 1953, 172(4391): 1189-1190.
- [4] MOLNÁR J, BOKOE Z, VÁRKONYI L, et al. The systematic development and optimization of large-scale sperm cryopreservation in northern pike (*Esox lucius*)[J]. *Cryobiology*, 2020, 94: 26-31.
- [5] 程顺, 顾志敏, 刘士力, 等. 翘嘴鲌精子生理特性及超低温冷冻的研究[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(7): 175-179.
- [6] 马林, 李楠, 郝爽, 等. 乌克兰鱈精子超低温冷冻保存方法研究[J]. *水产科学*, 2019, 38(4): 473-478.
- [7] 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.
- [8] 樊冀蓉, 吴仁协, 赵元若, 等. 中国鲷科鱼类分类和系统发育研究进展[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(2): 472-480.
- [9] 江世贵, 李加儿, 区又君, 等. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系[J]. *生态学报*, 2000, 20(3): 468-473.
- [10] 尤颖哲. 双斑东方鲀精子冷冻保存方法探究[J]. *渔业现代化*, 2017, 44(1): 35-39.
- [11] 江世贵. 鲷科鱼类精子超低温保存技术[J]. *水产科技*, 1996(3): 22-25.
- [12] 李加儿, 区又君, 江世贵. 环境因子变化对平鲷精子活力的影响[J]. *动物学杂志*, 1996, 31(3): 6-9.
- [13] HSU T H, LIN K H, GWO J C. Genetic integrity of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) sperm following cryopreservation[J]. *J Appl Ichthyol*, 2008, 24(4): 456-459.
- [14] YE T, ZHU J Q, YANG W X, et al. Sperm cryopreservation in *Sparus macrocephalus* and DNA damage detection with SCGE[J]. *Zool Res*, 2009, 30(2): 151-157.
- [15] 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.
- [16] ENGIN S, SAKA A, FRAT M K. Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) and thawing rates on sperm motility for cryopreservation of sperm in gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Fresenius Environ Bull*, 2020, 29(4A): 2691-2697.
- [17] GWO J C. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (Teleost, Perciformes, Sparidae)[J]. *Theriogenology*, 1994, 41(5): 989-1004.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 赵谭军, 尹文露, 邹炆, 等. 刺参精子冷冻保存方法研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(1): 57-65.
- [21] 苏德学, 严安生, 田永胜, 等. 钠、钾、钙和葡萄糖对白斑狗鱼精子活力的影响[J]. *动物学杂志*, 2004, 39(1): 16-16.
- [22] IRAWAN H, VUTHIPHANDCHAI V, NIMRAT S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm[J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 122(3/4): 236-243.
- [23] NAING S, WAHID H, AZAM K M, et al. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation[J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 122(1/2): 23-28.
- [24] 栗瑞兰, 张通, 刘志红, 等. 葡萄糖对绒山羊精子冷冻保存及代谢的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(9): 2054-2062.
- [25] AITKEN R J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage[J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84(10): 1039-1052.
- [26] ZHU Z, FAN X, LV Y, et al. Vitamin E analogue improves rabbit sperm quality during the process of cryopreservation through its antioxidative action[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145383.
- [27] RAMÍO-LLUCH L, YESTE M, FERNÁNDEZ-NOVELL J, et al. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2014, 26(6): 883-897.
- [28] 田永胜, 马允, 解子牛, 等. 哲罗鲑精子冷冻保存[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(1): 90-97.
- [29] 周洲, 孔杰, 赵凤, 等. 鱼类精子超低温冷冻保存技术研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2019, 47(3): 89-92.
- [30] WANG X, YANG J, CHEN X, et al. Effects of four penetrating cryoprotectants on cryopreservation of *Semilabeo obscurus* sperm[J]. *J Hydroecol*, 2012, 33(5): 88-93.
- [31] CEJKO B I, KREJSZEFF S, SAROSIEK B, et al. Biochemical factors of common carp *Cyprinus carpio* L. 1758, seminal plasma and its relationship with sperm motility parameters[J]. *J Appl Ichthyol*, 2015, 31(S1): 10-17.
- [32] 乔瑞峰, 陆专灵, 高爽爽, 等. 大鳞副泥鳅精液超低温冷冻保存方法的优化[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(7): 142-147.
- [33] 王鑫伟, 史应学, 竺俊全, 等. 光唇鱼精子的超低温冷冻保存及酶活性检测[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(4): 639-649.
- [34] 刘光霞, 吴兴兵, 何勇凤, 等. 圆口铜鱼精子超低温冷冻保存[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(1): 44-52.
- [35] 区又君, 李加儿, 江世贵. 保存和激活对真鲷精子生理特性的影响[J]. *热带海洋学报*, 1998, 17(3): 65-74.
- [36] 姜静, 田永胜, 王波, 等. 星斑川鲈精子冷冻保存与生理特性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(1): 17-26.
- [37] 张崇英, 陈育宇, 周亚, 等. 胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 精液超低温冷冻保存及酶活性测定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(4): 1556-1564.
- [38] LEE Y H, PARK J Y, LEE I Y, et al. Effects of cryoprotective agents and treatment methods on sperm cryopreservation of stone flounder, *Kareius bicoloratus*[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735969.
- [39] 宋莉妮, 田永胜, 李祥孔, 等. 钝吻黄盖鲈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.
- [40] 丁淑燕, 李跃华, 黄亚红, 等. 刀鲚精子超低温冷冻保存技术的研究[J]. *水产养殖*, 2015, 36(1): 32-34.
- [41] KOH I C C, YOKOI K I, TSUJI M, et al. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*[J]. *Cryobiology*, 2010, 61(3): 263-267.