

王明华, 陈友明, 丁淑燕, 等. 美洲鲟鱼精子超低温冷冻保存技术初探[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 250–251.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.086

美洲鲟鱼精子超低温冷冻保存技术初探

王明华¹, 陈友明¹, 丁淑燕¹, 钟立强¹, 秦 钦¹, 边文冀¹, 蔡永祥², 陈校辉¹

(1. 江苏省淡水水产研究所, 江苏南京 210017; 2. 江苏省海洋水产研究所, 江苏南通 226007)

摘要:对美洲鲟鱼精液的超低温冷冻保存技术进行了研究。以解冻后精子的活力为参数, 探讨了鱼用任氏液为稀释液、不同体积分数甲醇为保护剂、不同冻前平衡时间以及不同精液稀释比对美洲鲟鱼精液进行超低温冷冻保存的保护效果。结果显示, 以鱼用任氏液和体积分数为 10% 的甲醇组成抗冻保护剂, 精液稀释比(精液与抗冻保护剂的体积比)为 1:3, 于 4℃ 冰箱平衡 20 min, 液氮面上方 6 cm 处平衡 10 min, 然后在液氮面上平衡 5 min, 最后投入液氮中的保存方式, 保存 60 d 后检查精子活力, 存活率可达 80%。研究结果为保护淡水鱼类的种质资源提供了理论基础。

关键词:美洲鲟鱼; 精液; 抗冻保护剂; 超低温保存

中图分类号: S965.219.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0250-02

美洲鲟鱼(*Alosa sapidissima*)属鲱形目鲱科, 鱼肉细脂厚, 味道鲜美, 营养丰富, 为集约化养殖的优良品种。美洲鲟鱼与我国的长江鲟、富春江鲟同科不同地理种群, 且其自然分布水域纬度相同, 肉味和外形也基本一致。据调查, 由于野生资源的破坏, 已有十多年未能在长江捕到长江鲟鱼, 资源濒临灭绝, 恢复长江鲟鱼资源已经很难。自 2003 年美洲鲟鱼被引进中国作为长江鲟鱼的替代品^[1], 美洲鲟鱼养殖在中国呈现出广阔的市场前景^[2]。精子超低温保存技术能为珍稀物种和重要经济种类基因资源的长期保存提供有效的技术手段, 在繁殖生物学、遗传育种和种质资源保护等方面具有重要意义。超低温保存是一种有效的并能长期保存鲜精的方法^[3]。迄今为止约有 200 多种海淡水鱼类被用于超低温保存研究^[4-5], 而关于美洲鲟鱼精液的超低温保存研究却未见报道, 本研究开展美洲鲟鱼精子超低温冷冻保存技术研究, 为更好地保护利用优良美洲鲟鱼种质资源提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

美洲鲟鱼精子样品来源于南通龙洋水产有限公司海安中洋河鲢庄园养殖的美洲鲟鱼亲本, 它们生长良好、形态正常、无疾病、达到性成熟。

1.2 试验方法

1.2.1 精子采集 2014 年 5 月 15 日, 采用促黄体释放激素类似物(LHRH-A2)、促绒毛膜性腺激素(HCG)、马来酸地欧酮(DOM)、鱼类催产剂对挑选的成熟雄鱼进行注射催情; 同年 5 月 16 日采取挤压法采集精子。所采集的精液要求乳白色, 无血污、粪便污染。采集的精液于 4℃ 冰箱中暂存备用。

1.2.2 鲜精质量的检测 先用细口吸管吸 1 滴激活液于载

玻片上, 对准视野, 然后用解剖针针尖在装有精液的培养皿中挑取适量精液, 取出后立即在载玻片上的激活液中搅匀观察, 激活液激活后测活力。观察 3~5 个视野, 精子活力(存活率)统计方法为估测视野中活动精子的数量占全部精子数量的百分比, 取其平均值, 选取活力达 90% 以上的精子作为后续试验材料进行冷冻保存。

1.2.3 稀释液和抗冻剂 稀释液为鱼用任氏液, 配制方法为: 0.780 g NaCl, 0.021 g CaCl₂, 0.020 g KCl, 0.200 g NaHCO₃ 加双蒸水至 1 L, pH 值 8.0。抗冻剂为甲醇, 分别配制了 5%、10%、15% 3 个不同体积分数, 置 4℃ 冰箱预冷备用。

1.2.4 精子冷冻保存方法 精子于 4℃ 冰箱分别平衡 0、10、20、30 min; 在液氮面上方 6 cm 处平衡 10 min, 然后在液氮面上平衡 5 min, 最后投入液氮中。

1.2.5 不同稀释比的样品制备 经清水激活镜检后, 选择精子活力好的精液与抗冻保护剂按 1:3、1:5、1:8、1:10 的体积比稀释, 混匀样品后, 以每管 1 mL 样品量存放于冻存管内。

1.2.6 冷冻精子活力检测 精子在液氮中保存 60 d 后, 将其从液氮中取出, 于液氮口处平衡 5 min 后, 再于 37℃ 水浴中快速解冻直至融化, 立即放入显微镜视野下, 用清水激活后观察运动力。

2 结果与分析

2.1 不同体积分数甲醇抗冻剂对保存效果的影响

在美洲鲟鱼精液中加入 3 个不同体积分数的甲醇抗冻剂, 在超低温(-196℃)冷冻保存 60 d, 解冻后显微镜观察表明, 10% 甲醇作为抗冻剂, 保存效果最好, 精子存活率达到 80%; 甲醇体积分数为 5% 时, 精子存活率最低, 保存效果最差(表 1)。

2.2 冻前平衡时间对保存效果的影响

以鱼用任氏液和 10% 甲醇组成抗冻保护剂, 测定 0、10、20、30 min 平衡时间对美洲鲟鱼精子存活率的影响。结果显示, 在平衡时间 20 min 时精子存活率最高(表 2)。

收稿日期: 2014-08-08

基金项目: 国家星火计划(编号: 2012GA690001)。

作者简介: 王明华(1973—), 女, 江苏南京人, 高级工程师, 主要从事水产健康养殖和鱼类育种研究。E-mail: w19731224@sina.com。
通信作者: 陈校辉, 硕士, 副研究员, 主要从事水产健康养殖和鱼类育种研究。E-mail: cxiaohui416@hotmail.com。

表 1 不同体积分数甲醇抗冻剂对美洲鲟鱼精液保存效果的影响

甲醇体积分数(%)	冻后存活率(%)
5	35
10	80
15	50

表 2 不同冻前平衡时间对保存效果的影响

平衡时间(min)	冻后存活率(%)
0	20
10	35
20	70
30	65

2.3 不同精液稀释比对保存效果的影响

用鱼用任氏液作稀释液、10% 甲醇作抗冻保护剂,对用不同精液稀释比保存的精子活力进行测定,表 3 结果显示精液按 1:3 稀释时,冻精存活率最高,达到 80%。

表 3 不同精液稀释比对保存效果的影响

稀释比	冻后存活率(%)
1:3	80
1:5	70
1:8	50
1:10	40

3 讨论与结论

目前精液超低温冷冻保存的方法一般遵循的原则是慢冻速融,本试验的结果符合该原则。关于鱼类精液保存稀释液的配制,由于试验用鱼种类的不同,稀释液也有所差异。稀释液的配制是鱼类精液冷冻保存中关键的一步,稀释液的适合与否直接影响到保存结果^[6]。一般认为稀释液的成分在合适的范围内越简单越好,目前用于鱼类精液超低温冷冻保存的稀释液配方多数都是借鉴家畜的精液超低温保存配方或者凭经验配制。鱼用任氏液是被广泛用于淡水鱼类精子的稀释液^[7],本研究选用了任氏液配方作稀释液进行冷冻保存,取得了较好的试验效果。不同的稀释倍数对精子的保存效果不同,在 3 个不同的稀释比试验中,以 1:3 的稀释比保存效果最好。在加抗冻保护剂之前,于 4℃ 平衡 20 min,既可以降低温度速降带来的损伤,又能使抗冻剂充分渗透。于海涛等认为,平衡一段时间有利于抗冻剂更好地发挥作用,并且精子在冷冻之前代谢活动降低,对低温冷冻有一个逐步适应的过程^[8]。

由于不同种类鱼的精子生理特性具有很大差异,确定最适的抗冻剂种类和浓度非常重要^[9]。甲醇是较为常见的渗透性抗冻剂,应用于少数水生生物精子冷冻也取得了较好的抗冻效果。由于抗冻剂的毒性会随着其浓度升高而增强,因

此所用抗冻剂浓度一般不会超过 15%,本试验中抗冻剂甲醇的浓度最高为 15%。Pan 等研究发现,10% 甲醇对黄颡鱼冷冻保护效果最佳^[10-11]。本研究选用 3 个不同体积分数的甲醇抗冻剂,结果表明 10% 甲醇抗冻剂对美洲鲟鱼冷冻有较好的保护效果。

有关鱼类精液的冷冻方法,目前文献报道的主要有 3 种,即颗粒冻精法、安瓿瓶法、麦细管法。选用哪种方法受试验条件和技术手段的限制,最终结果也各有优劣。曾经有不少学者用颗粒冻精法冷冻精子并获得较高的受精率,但是由于该方法需要特殊的解冻液,实用性不高。安瓿瓶体积较大,降温难以均匀,且操作比较复杂。本试验采取的塑料冻存管冷冻法具有操作简便、安全的特点,易于推广应用。

通过精液冷冻保存技术,可将一些名贵、优良的淡水鱼类精液,尤其是将那些濒危、珍稀物种的种质资源进行长期有效的保存。通过建立相应的鱼类种质资源库,将这些物种的基因资源完全保存下来,可为淡水鱼类种质资源的保护开辟一条新的途径。

参考文献:

[1] 张云龙,邵 辉,袁 娟,等. 美国鲟鱼高产模式关键技术[J]. 渔业致富指南,2010(19):35-36.
[2] 徐钢春,张呈祥,郑金良,等. 美洲鲟的人工繁殖及胚胎发育的研究[J]. 海洋科学,2012,36(7):89-96.
[3] Gausen D. The Norwegian gene bank programme for Atlantic salmon (*Salmo salar*) [M]// Cloud J C,Thorgaard G H. Genetic conservation of Salmonid fishes. New York: Plenum Press,1993:181-187.
[4] Pan J L,Ding S Y,Ge J H,et al. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm[J]. Aquaculture,2008,279(1/2/3/4):173-176.
[5] Ding S Y,Ge J H,Chen H,et al. Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Animal Reproduction Science,2009,113(1/2/3/4):229-235.
[6] 廖 馨,严维辉,唐建清,等. 淡水鱼类精子的冷冻与保存[J]. 生物学通报,2006,41(8):16-17.
[7] 李 晶,李 莹,赵晓祥,等. 精子作载体的转基因鱼研究[J]. 生物技术,1994,4(3):20-22.
[8] 于海涛,张秀梅,陈 超,等. 鱼类精液超低温冷冻保存的研究展望[J]. 海洋湖沼通报,2004(2):66-71.
[9] 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.
[10] 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(1/2/3/4):173-176.
[11] 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.