丁淑燕,严维辉,郝 忱,等. 兴国红鲤精液超低温冷冻保存及效果分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):277-279.
doi:10.15889/j. issn. 1002-1302. 2016. 02. 081

兴国红鲤精液超低温冷冻保存及效果分析

丁淑燕, 严维辉, 郝 忱, 葛家春
(江苏省淡水水产研究所,江苏南京 210017)

摘要:对兴国红鲤精液的超低温冷冻保存技术进行了研究。以解冻后精子的寿命和运动力为参数,分别探讨了不同组合的稀释液、抗冻剂以及冷冻程序对兴国红鲤精液进行超低温冷冻保存的保护效果。试验结果表明,选用 Ringer 液为稀释液,8% DMSO 为抗冻剂,按照程序 -80 ℃平衡 15 min,后保存于 -196 ℃液氮中,37 ℃水浴 100 s 解冻,精液解冻激活后镜检,精子活力达到(83±9.6)%,寿命在(86.25±24.7) s,接近鲜精的水平。本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:兴国红鲤;精液;超低温保存
中图分类号:S965.116 **文献标志码**: A **文章编号**:1002-1302(2016)02-0277-02

兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singuonesis*)别称金狮红鲤,隶属鲤形目鲤科鲤属,是江西省兴国县特有的淡水养殖品种。在渔业生产上具有较广泛的实际应用价值。据史料记载,该鱼已有 1 300 年的养殖历史,具有体色全红、个体长大、背宽肉厚、肉质鲜嫩、繁殖力强等特点,深受广大渔业工作者欢迎。由于受到长期、密集的人工选育影响以及缺乏科学的选育指导,在形态和生长性状等方面出现了不同程度的衰退[1]。水产生物种质资源的保护关系到水产业的可持续发展。研究兴国红鲤精液的超低温保存,无论从良种的保存还是水产上的实际生产来讲都是很有意义的。本研究通过筛选 D-20、Kurokura-1、Ringer 液 3 种稀释液和二甲基亚砜(DMSO)、甘油(Gly)、甲醇(Meth)3 种抗冻剂,并对冷冻保存的精子进行活力测定,旨在探索一套有效的兴国红鲤精子超低温冷冻保存方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的兴国红鲤取自江苏洪泽水产良种场,充气运回后于笔者所在研究所水池内暂养。

1.2 试验方法

1.2.1 精液的采集 根据鱼体质量,分别注射催产激素 HRH-A_2 5 μg/kg、HCG 250 IU/kg、DOM 1.5 mg/kg、脑垂体 5 mg/kg;12 h 后,挤压腹部,若有精液流出,即可取精。方法为用干毛巾擦干其生殖孔,轻轻挤压雄鱼腹部,有精液流出,采集至干燥容器中。所采集的精液要求乳白色,无血液、粪便污染。

1.2.2 精子的形态观察 取 1 滴精液于干净载玻片上,通过自来水流水冲洗调节密度至适中,置于空气中干燥后,加苏木精染色液,后再次置于空气中干燥,再加入曙红染色液,空气中干燥后重新置于显微镜下观察,并进行显微摄影。

1.2.3 精液质量的测定 先用细口吸管吸 1 滴激活液于载玻片上,对准视野后,用解剖针针尖挑取培养皿中的精液,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,大于 90% 用于保存。将精液稀释 10 000 倍,采用血球计数板计数,统计精子密度。

1.2.4 稀释液的配制 将精液经过不同稀释液适当稀释后,分别与含有 16% DMSO、25% 甘油、20% 甲醇的同种稀释液等体积混合,使其终浓度为 5×10^8 精子/mL,每管 400 μL。以不含有任何保护剂的稀释液为对照组。每组试验均重复 3 次($n=3$)。

表 1 各稀释液成分

名称	成分(g/L)					渗透压(mOsm/kg)
	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$	Glucose	
Ringer 液	7.8	0.2	0.21	0.021	—	260
Kurokura-1	7.5	0.2	0.16	0.2	—	250
D-20	8	1	—	—	15	350

1.2.5 冷冻保存方法 将配好的精液稀释液迅速按照下列程序进行冷冻保存:(1)两步冷冻:-80 ℃平衡 15 min,后投入液氮中保存;(2)多步冷冻:4 ℃平衡 30 min,-20 ℃平衡 15 min,-80 ℃平衡 15 min,后投入液氮中保存。

1.2.6 解冻方法与精子激活 经过一定时间的冻存,将冷冻管从液氮罐中取出,于 37 ℃水浴 90 s,用 SM 试剂(NaCl 2.6 g/L、KCl 0.4g/L、Tris-HCl 2.4 g/L,pH 值为 8.0)激活,具体激活方法为每 900 μL SM 试剂加入 6 μL 解冻后的精液,立即放入显微镜视野下观察精子运动力和寿命。

1.2.7 精子活力的测定 精子活力分别以精子寿命及精子运动力来评价,精子寿命是指精子被激活至绝大部分停止摇摆运动所需的时间。精子运动力指运动精子占全部精子的百分数。

收稿日期:2015-03-16
基金项目:江苏省科研院所社会公益研究与服务专项(编号:BM2006703);江苏省水产三项工程项目(编号:K2006-3)。
作者简介:丁淑燕(1978—),女,山东烟台人,硕士,助理研究员,主要从事水产种质资源与遗传育种研究。Tel:(025)86581571;E-mail:dshy7869@sina.com。
通信作者:葛家春,博士,研究员,主要从事种质资源保藏与利用。Tel:(025)86581570;E-mail:gjc09@sina.com。

2　结果与分析

2.1　兴国红鲤精子的形态观察

在 400 倍光学显微镜下，兴国红鲤精子头部为卵圆形，尾长而弯曲，形如蝌蚪（图 1）。

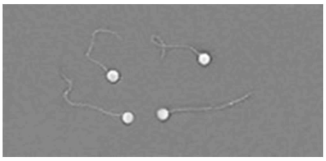

图1　兴国红鲤新鲜精子苏木精-曙红染色(400×)

2.2　兴国红鲤新鲜精子的质量鉴定

该精子是一类分化程度很高的细胞，在精巢中不活动，与其生存水环境接触后，99% 的精子被激活开始做快速直线运动，经稀释液一定程度的稀释，血球计数板计数，其精子浓度为 3.2×10^{10} 精子/mL。

2.3　兴国红鲤冷冻保存精子的活力测定

2.3.1　稀释液对精子冷冻保存的影响　应用上述含有 16% DMSO 的 3 种冷冻稀释液对兴国红鲤精子按照两步冷冻法进行冷冻保存，其冷冻保存效果见图 2。在 3 种稀释液中，Ringer 液的冻后成活率最高，达（83 ± 9.6）%；寿命最长，达（86.25 ±24.7）s。Kurokura - 1、D - 20 液的冻后成活率和寿命分别为（33 ±20.6）%、（75 ±5.8）% 和（54.5 ±28.2）s、（56.25 ±13.6）s。因此兴国红鲤精子冷冻保存的最适稀释液为 Ringer 液。

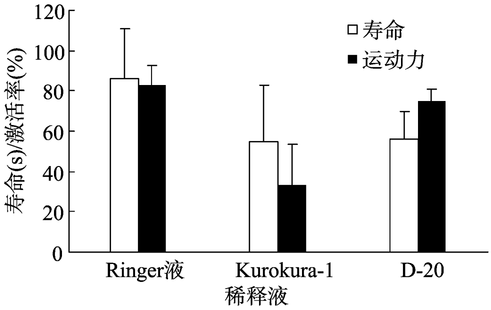

图2　稀释液对兴国红鲤冻精激活率的影响

2.3.2　保护剂对精子冷冻保存的影响　用 Ringer 液作稀释液，按照两步冷冻法进行冷冻保存，比较了 3 种抗冻剂（DMSO、Gly、Meth）的冷冻保存效果，结果见图 3。DMSO 冻存兴国红鲤精子效果最好。8% 的 DMSO 冻后精子成活率为（83 ±9.6）%，寿命为（86.25 ±24.7）s。12.5% 甘油、10% 甲醇冻后精子成活率较差，分别为（7.5 ±9.6）%、（33 ±34）%；寿命较短，分别为（10.5 ±14.2）s、（40 ±36.9）s。

2.3.3　冷冻程序对精子冷冻保存的影响　用 Ringer 液作稀释液，8% DMSO 作保护剂，比较了 2 种冷冻方法对兴国红鲤精子的冷冻保护效果，结果见图 4。采用两步冷冻法保存的精子成活率为（83 ±9.6）%，寿命为（86.25 ±24.7）s，而三步冷冻法保存的精子成活率为（85 ±5.8）%，与两步冷冻法无显著差异，寿命为（68 ± 6.7）s，与两步冷冻法差异显著（$P<0.05$）。

3　讨论

目前，精液超低温冷冻保存的方法一般遵循的原则是慢

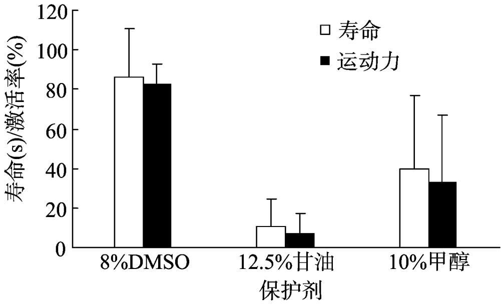

图3　保护剂对兴国红鲤冻精激活率的影响

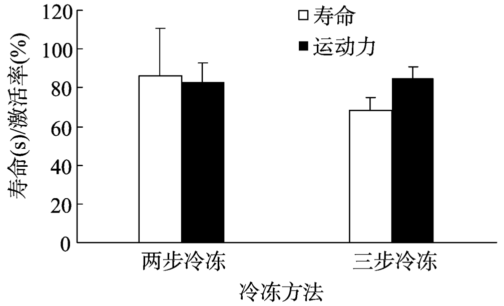

图4　冷冻方法对兴国红鲤冻精激活率的影响

冻速融，本次试验的结果符合该原则。关于鱼类精液保存稀释液的配制至今没有一个统一的理论依据，而且由于试验用鱼种类的不同，稀释液可能也有所差异。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。一般来说弱酸性稀释液的保存效果高于弱碱性的稀释液。本研究采用以往文献中较为成功的几种稀释液配方[2-4]，通过试验，筛选出最适合用于兴国红鲤精液超低温保存的冷冻稀释液—Ringer 液。

不同的冷冻保护剂被成功用于不同鱼类精子的超低温冷冻保存。DMSO 常被用于大菱鲆[5-6]、海鲈鱼[7]、黑石斑鱼[8]、美洲黄盖鲽[9]等精子的冷冻保存，本试验比较了 DMSO、甘油、甲醇对兴国红鲤精子的冷冻保护效果，结果显示，DMSO 比甘油、甲醇更适合兴国红鲤精子的冷冻保存。DMSO 对精子有毒性但又有较好防冻效果的双重特性，在本研究中 8% DMSO 既能起到良好的抗冻作用，且不会导致精子损伤。

鱼类精液经过冷冻保存及解冻后的激活方式对于获得高的精子活力具有重要意义。陈松林等研究表明，在冷冻过程中，在 DMSO 的作用下，鱼类精子的渗透压升高，先前用于鲜精的激活方式已经不再适合冻精。如果用水直接激活，会导致冻精内外渗透压过大，精子吸水膨胀、活力降低、寿命缩短。而用有一定渗透压的溶液去激活冻精，效果要好得多[10]。本研究激活冻精所用的 SM 试剂即能获得较好的激活效果。

鱼类精液经过超低温冷冻后，活力都有一定降低。本次试验用曙红染色冻精，在显微镜 40 倍物镜下观察发现经过冷冻/解冻后的精子中有部分精子的形态结构发生变化，主要表现在：（1）精子的细胞膜变得疏松、膨胀甚至破裂、脱落；（2）精子尾部的鞭毛断裂，有基部断裂和中部断裂 2 种；（3）精子鞭毛非正常缠绕、扭曲。精子在冷冻/解冻过程中发生冻存损伤是难免的[11-12]。在冻存过程中，一方面由于温度的不断下降，精子不耐低温可能导致结构及功能发生变化，另一方面由于加入的抗冻剂本身对精子有毒性，以及精细胞中水分不断

曹　昆,李杰雄,韩晓磊,等. 克氏原螯虾选育后代生长特性的初步研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):279 - 281.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2016.02.082

克氏原螯虾选育后代生长特性的初步研究

曹　昆[1,2], 李杰雄[1], 韩晓磊[1], 徐建荣[1]
(1. 常熟理工学院生物与食品工程学院,江苏常熟 215500; 2. 苏州大学基础医学与生物科学学院,江苏苏州 215123)

摘要:将抱卵克氏原螯虾的离体幼虾按体质量分为大、中、小 3 组,进行 2 次选育,每次试验均设 3 个平行组,进行选育后代生长特性的研究。结果表明:各种规格幼虾培育 40 d 后,体质量和体长均有极显著变化($P < 0.01$),存活率均超过 50%,大规格幼虾增质量率和体长增长率显著高于其他规格幼虾($P < 0.01$)。继续培育 40 d 后发现,大规格螯虾之间的大小差异在减小,而 3 种规格螯虾种群之间的竞争更加强烈,存活率均低于 50%,尤其大规格螯虾之间尤为突出。小规格螯虾的增质量率和体长增长率显著高于其他规格螯虾($P < 0.01$)。

关键词:克氏原螯虾;选育后代;生长特性
中图分类号: S966.12^{+}9.2　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 - 1302(2016)02 - 0279 - 03

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*),俗称淡水小龙虾,原产于墨西哥东北部和美国中南部[1]。1981 年,由美国引进日本,1929 年又由日本传入我国江苏南京附近[2],现已广泛分布于全国,成为我国一种重要的淡水虾类资源,深受国内外市场欢迎[3]。目前,人工养殖所需的虾苗大多是从天然水域捕捞或是依靠上年养殖的留塘虾进行自主繁育[4]。由于缺乏系统的良种保持和选育技术体系,这样的虾苗品质参差不齐,生长速率不一,产量低。为了进一步开发利用克氏原螯虾,提高其后代优良品质,本试验对克氏原螯虾选育后代生长特性进行了研究,为克氏原螯虾的选择育种提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料

从常熟理工学院谢桥基地采集抱卵克氏原螯虾若干尾,试验前暂养 10 d。暂养期间养殖用水为曝气 24 h 的自来水,以增氧泵增氧,并每天适时投喂配合饲料。试验于 2014 年在常熟理工学院笃行楼实验室进行。试验用克氏原螯虾抱卵虾个体(33.41 ± 5.23) g,要求颜色暗红或深红、附肢齐全、活动能力强、体质健壮。

收稿日期:2015 - 01 - 27
基金项目:江苏省海洋与渔业局水产三项工程项目(编号:PJ2011 - 58),苏州市基础研究项目(编号:SYN201120)。
作者简介:曹　昆(1986—),男,江苏南通人,硕士研究生,主要从事克氏原螯虾人工养殖研究。E - mail:1275776517@qq.com。
通信作者:徐建荣,教授,主要从事水产繁殖、养殖与遗传育种研究。E - mail:xujrcs@163.com。

渗出导致精子内外渗透压变化也会导致精子的冻存损伤。

虽然目前在冷冻稀释液、抗冻剂、降温速率以及激动方法等方面还没有统一标准,但随着精液超低温保存技术的不断发展,使得精子冻存后的损伤大大减小,这项技术会更加完善。

参考文献:

[1]曾繁振,俞小牧,童金苟. 三个鲤品种微卫星丰度与遗传多样性分析[J]. 水生生物学报,2013,37(5):967 - 973.
[2]Linhart O,Rodina M,Cosson J. Cryopreservation of sperm in common *Carp cyprinus* carpio: sperm motility and hatching success of embryos [J]. Cryobiology,2000,41(3):241 - 250.
[3]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.
[4]Ding S,Ge J,Hao C,et al. Long - term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. Animal Reproduction Science,2009,113(1/2/3/4):229 - 235.
[5]Dreanno C,Suquet M,Quemener L,et al. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa[J]. Theriogenology,1997,48(4):589 - 603.
[6]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.
[7]Fauvel C,Suquet M,Dreanno C,et al. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions[J]. Aquatic Living Resources,1998,11(6):387 - 394.
[8]Palmer P J,Blackshaw A W,Garrett R N. Successful fertility experiments with cryopreserved spermatozoa of barramundi,Lates calcarifer (*Bloch*),using dimethylsulfoxide and glycerol as cryoprotectants[J]. Reproduction Fertility and Development,1993,5(3):285 - 293.
[9]Richardson G F,Wilson C E,Crim L W,et al. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes platessa*) semen large straws [J]. Aquaculture,1999,174(1/2):89 - 94.
[10]陈松林;刘宪亭;鲁大椿. 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.
[11]张轩杰,张良平,沈晓勤. 鱼类冷冻精子结构变异的电子显微镜研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报,1991,14(2):160 - 164.
[12]侯明佳,刘睿智. 精子冻存损伤[J]. 中国优生与遗传杂志,2005,13(4):5 - 6,12.