

王 洲,王 权,刘美剑. 中华鲢精子超低温冷冻保存[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):186-188.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.047

中华鲢精子超低温冷冻保存

王 洲,王 权,刘美剑
(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225000)

摘要:对中华鲢精子超低温冷冻保存技术进行探究,评估了精子在激活后活力随时间的延长而变化趋势;选取 5%、10%、15% 3 种浓度二甲基亚砜(DMSO)作为冷冻保护剂,分别评估精子在液氮液面上方不同高度、不同保持时间情况下冷冻后解冻精子的动性,筛选出该条件下较优的冷冻方法。结果表明,中华鲢精子用 10% DMSO 在液氮上方 5 cm 处、保持 5 min 后转入液氮中冷冻后解冻精子可以保持较好活力。该研究为中华鲢精子冷冻保存提供一种可行的方法,为进一步优化冷冻保存技术提供参考。

关键词:中华鲢;精子;二甲基亚砜;超低温保存

中图分类号: S965.199 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0186-02

精子超低温冷冻保存技术能够长期保持种质资源、保证水产动物遗传物质的多样性。该技术已在多种鱼类精子保存中得到应用^[1],然而有关鲢精子超低温冷冻保存技术研究较少^[2],中华鲢精子冷冻保存技术方面还未有报道。本研究根据中华鲢与日本鲢生物学相近,参考日本鲢精子超低温冷冻保存方法,选取在鱼类中运用比较广泛的二甲基亚砜作为冷冻保护剂^[3],探讨了 3 种不同浓度的 DMSO、在不同的冷冻高度、特定高度下不同的保持时间对解冻后精子活力的影响。旨在筛选出一种可以用于中华鲢精子冷冻保存方案,同时为后期进一步优化冷冻保存方案、长期保存中华鲢优良种质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 鲢与精子的收集 2016 年 4—5 月从江苏泰州姜堰获得性成熟的中华鲢个体,置于实验室水族箱(55 cm ×

30 cm × 40 cm)内暂养 1 周。其间充氧并保持微流水,同时投喂优质饲料对鲢进行营养强化,水温为 18~20 ℃。取达到性成熟的鲢个体^[4-5],采精时先用干毛巾将鲢鱼擦干后,用指尖轻轻按压鲢腹部,精液从生殖孔中流出,将精液收集到玻璃培养皿中。取少量精液用生理盐水(5%)激活后在显微镜下镜检,收集活力超过 90% 的精液样本。将来自不同亲本的 3 个精液样本混合,室温设定为 20 ℃。

1.1.2 抗冻保护剂与人工精浆 二甲基亚砜(DMSO)具有快速渗透细胞膜的作用,作为冷冻保护剂已经在多种鱼类精子研究被证实具有较好的效果^[6]。本研究选取 3 种不同的浓度(5%、10%、15%)的 DMSO 用于试验研究。为避免抗冻保护剂添加过程中对精子活力的潜在影响,精液在冷冻前一步加入到人工精浆(ASP)^[2]-二甲基亚砜(DMSO)混合液中。ASP-DMSO 混合液的配制按表 1,试剂配好后用蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH 值至 8.0。所有试剂均为现用现配,室温存放时间不超过 2 h。

表 1 ASP-DMSO 混合液配方

ASP-DMSO 溶液	各配料的量(mmol)						二甲基亚砜(DMSO) 体积(mL)
	氯化钠 (NaCl)	氯化钾 (KCl)	氯化钙 (CaCl ₂)	氯化镁 (MgCl ₂)	碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸 (TAPS)	
ASP-DMSO ¹	55	82.4	2.0	0.8	20	20	50
ASP-DMSO ²	55	82.4	2.0	0.8	20	20	100
ASP-DMSO ³	55	82.4	2.0	0.8	20	20	150

1.2 试验方法

1.2.1 精子激活后活力受时间的影响 为评估精子在水中存活时间,首先对精子动性进行评估,制定精子活力随时间延长的变化图。取收集好的精液 0.1 mL,加 2.0 mL 生理盐水

(5%)激活,显微镜下对精子动性进行观察,用血球计数板记录精子数,统计活力。

1.2.2 精子冷冻 将取自 3 个不同鲢个体的精液收集好后混合,取 0.1 mL 精液与 2.0 mL ASP-DMSO 混合液混合,混合完成后移入 0.5 mL 的麦管(IMV,法国),将麦管置于泡沫板上平放,后转入含有液氮的泡沫箱中保持数分钟,最终转入液氮中。泡沫板呈阶梯状,阶梯水平面距离液氮表面距离不同用以控制冷冻速率的快慢。为筛选出较优的鲢冷冻保存方法,本研究对不同冷冻高度、液氮液面上不同保持时间进行筛选,以筛选出较优的冷冻方法。

1.2.2.1 不同冷冻高度对精子解冻后活力的影响 基于已

收稿日期:2017-04-13
基金项目:江苏省海洋与渔业局三新工程(编号:Y2015-25)。
作者简介:王 洲(1979—),男,辽宁营口人,硕士,讲师,从事水产动物繁殖、精子冷冻保存技术研究。E-mail: wangzhou8899@sina.cn。
通信作者:刘美剑,硕士,讲师,从事水产动物繁殖研究。E-mail: meijian.liu@jsahvc.edu.cn。

发表的日本鳊精子冷冻保存的研究^[7],本研究选取精子在加入 ASP-DMSO 混合液之后在液氮表面上方保持 5 min,后转入液氮中。本试验设置了 4 种冷冻高度(麦管置于阶梯泡沫上水平放置,距离液氮表面高度分别为 5、7、9、11 cm),以设置不同梯度冷冻速率。

1.2.2.2 精液在液氮液面上保持不同时间的影响 根据以上试验结果,选取液氮液面上 5 cm 作为精子冷冻高度,同时设置液氮液面上 4 种不同保持时间(4、5、6、7 min),用以筛选出较优的保持时间。根据试验结果,选取液氮液面上方 5 cm,每隔 10 s 记录该高度时的温度(Fluke,美国),绘制温度-时间变化曲线图(图 1),用以给出试验时温度参数。

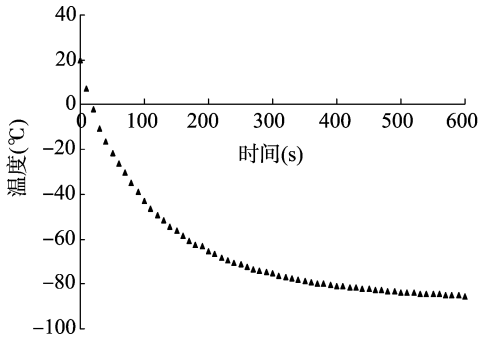


图1 液氮上方 5 cm 温度变化趋势(每隔 10 s 记录温度值)

1.2.3 精子解冻 麦管在投入液氮中保存 2 h 后,用镊子小心地取出,立即置于 20 °C 水中解冻 20 s。取解冻后的混合液 0.1 mL,用 2.0 mL 生理盐水稀释。后用血球计数板对解冻后精子活力进行计数,统计活力。

1.3 数据分析

试验数据采用“平均值±标准差”表示;数据分析使用 SPSS 23.0 进行单因素方差分析;绘图使用 Excel 2010 软件。

2 结果与分析

2.1 精子激活后活力受时间的影响

由图 1 可知,鳊精子激活后动性在所选取各个时间节点处明显下降;精子在 5 min 内能保持较高的活力,5 min 后活力明显下降,10 min 后只有少量精子能存活,未发现有超过 13 min 的精子。

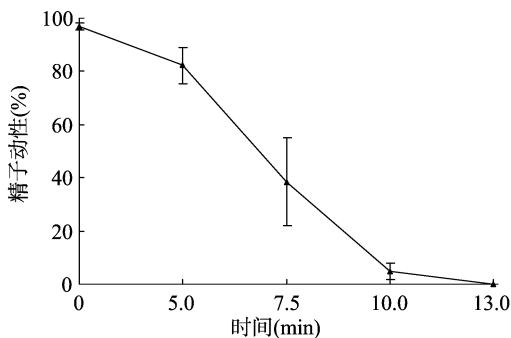


图2 精子动性随时间变化趋势

2.2 不同冷冻高度对精子解冻后活力的影响

由表 2 可知,液氮液面上方 5 cm 处冷冻后解冻精子效果较高,其中 10% DMSO 冷冻后解冻精子动性最高,15% DMSO 次之,5% DMSO 在此条件下未发现有解冻后精子游动

的现象;其余高度在不同浓度 DMSO 中冷冻后解冻精子均未发现具有动性。

表 2 精子在不同液面高度保持 5 min 后转入液氮冷冻后解冻精子活力

DMSO 浓度 (%)	不同液面高度下的精子活力 (%)			
	5 cm	7 cm	9 cm	11 cm
5	0	0	0	0
10	7.8 ± 2.7a	0	0	0
15	2.1 ± 1.8b	0	0	0

注:a、b 表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 液氮液面上保持不同时间冷冻对解冻后精子活力的影响

由图 3 可知,液氮上方 5 cm 保持 5 min 时冷冻后解冻精子能够获得较高的动性,高于其他几组(4、6、7 min);5% DMSO 保持 4 min 后冷冻后解冻观察到少量精子活动(3.19%),10% DMSO 在保持 7 min 后冷冻解冻后精子动性较低(1.15%),其余多数在振动,未发现游动精子(图中横坐标上加粗部分表示解冻后精子动性为零试验组)。

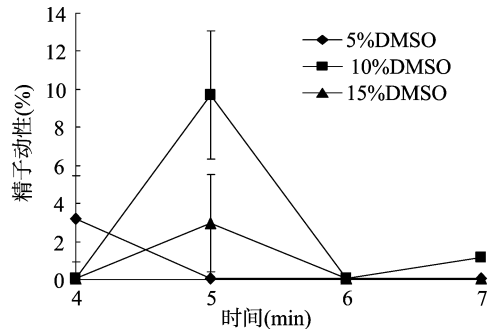


图3 精子在液氮上方 5 cm 处放置不同时间转入液氮冷冻后解冻精子动性趋势

3 讨论

精液超低温冷冻保存关键在于用一定浓度的抗冻保护剂充分渗透入精子内部、使之快速脱水;同时,尽量减少抗冻保护剂毒性对精子的影响。该试验中,中华鳊在激活后精子保持较高动性(82.25%)时间相对较短(< 5 min)。考虑到后期抗冻保护剂在加入后 DMSO 的毒性问题,本试验在收集好精液后直接和 ASP-DMSO 混合物混合,以防止 DMSO 在逐步加入过程中局部浓度过大对精子造成损伤;同时减少精子暴露在抗冻保护剂中时间从而降低其毒性。

有别于部分鱼类精子玻璃化冷冻保存方案,该试验采用低速慢冻保存技术。有研究认为,精子冷冻保存在降温时细胞内外在成冰过程中有冷冻损伤、细胞质变化、细胞骨架等影响^[8-10],影响精子解冻活力。慢速冷冻有助于缓解冷冻过程中胞内外渗透压急剧变化带来的生理生化影响,从而提高解冻精子存活率。本试验在液氮上方 5 cm 保持 5 min,该条件下冷冻速度为 19 ~ -75 °C/min,后转入液氮,解冻精子动性高于其他组,该趋势与日本鳊中的超低温冷冻结果相似(20 ~ -80 °C/min)^[7]。

该试验方法可用于中华鳊基因超低温冷冻保存,为进一步提高解冻后动性率,还须对抗冻保护剂毒性、冷冻速率、

李丹丹, 孟顺龙, 胡庚东, 等. 稻-蟹复合生态种养系统氮磷平衡及经济效益研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(18): 188-191.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.048

稻-蟹复合生态种养系统氮磷平衡及经济效益研究

李丹丹¹, 孟顺龙¹, 胡庚东¹, 陈家长^{1,2}, 邰旭文^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081; 2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081)

摘要:分析了不同密度中华绒螯蟹与水稻复合生态种养系统的利润与氮磷平衡情况, 结果显示: (1) 3个试验田块的利润分别为 72 504.94、88 111.89、69 125.85 元/hm², 其中放养河蟹密度最大的田块利润最高, 投放密度为 238.40 kg/hm²。表明在本试验密度的条件下可适当增加河蟹的放养量以提高利润。(2) 本研究中氮总输入量为 65.40 kg, 最主要的输入途径是肥料, 占氮总输入量的 50.14%, 磷总输入量为 28.51 kg, 主要的输入途径是肥料, 占总输入量的 78.92%。氮总输出量均值为 25.27 kg, 最主要的输出途径是稻谷的输出, 输出量为 16.46 kg, 占总输出量的 65.14%; 磷总输出量均值为 7.36 kg, 最主要的输出途径是稻谷的输出, 输出量为 6.17 kg, 占总输出量的 83.83%, 在生产过程中氮、磷元素的主要利用者是农作物。除了因收获农产品而输出的氮、磷外, 很大一部分氮磷元素盈余没有被当季农作物吸收利用, 盈余的氮为 40.14 kg, 占氮总输入量的 61.36%, 盈余的磷为 21.15 kg, 占磷总输入量的 74.19%, 大部分的氮磷都没有被农作物利用, 剩余的氮、磷都残留在土壤中, 应适当减少化肥的投入, 优化稻蟹复合生态种养系统, 提高氮磷利用率。

关键词: 稻蟹复合系统; 氮磷循环; 氮磷平衡; 经济效益

中图分类号: S96 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0188-04

近年来, 在农业生产中, 土地和水资源利用率低, 农药的大量使用使水稻品质下降, 已不能满足市民对食品安全的需求^[1]。以低污染、低能耗为基础的生态农业模式成为现代农业的发展趋势, 如稻蟹种养。稻蟹种养是根据稻养蟹、蟹养稻、稻蟹共生的理论, 在稻蟹种养的环境内, 蟹能以稻田中的杂草和害虫为食物, 吃掉杂草和害虫, 同时排泄物可以肥田, 促进水稻生长; 而水稻又为河蟹的生长提供丰富的天然饵料和良好的栖息条件, 互惠互利, 形成良性的生态循环^[2-4]。研究稻蟹养殖过程中氮磷平衡及利用效率可以优化生产过程中

肥料和饲料的投入, 节约成本, 同时研究氮素平衡是评价系统中氮肥投入对环境影响的主要方法之一^[5]。研究表明, 过量的氮素残留在土壤中, 一部分会通过淋洗渗透到地下水中, 一部分通过氨挥发和硝化反硝化进入大气中, 这些散失的氮素, 主要以活性氮形式存在环境中, 是导致温室气体排放量增加、地下水污染、水体富营养化和土壤酸化的原因之一^[6-8]。因此, 为进一步了解并优化稻蟹共作系统, 设计了不同密度的蟹与水稻共作试验, 分析各共作系统中氮素平衡以及经济效益情况, 为该生产模式的推广应用提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验设置

试验于 2016 年在江阴锦湖水产有限公司进行, 共设置 3 个处理, 选择中华绒螯蟹为养殖品种, 构建蟹-稻复合生态种养系统, 开展蟹-稻复合生态种养系统的基础设施改造。稻

收稿日期: 2017-03-07

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(编号: 2016HY-ZD0701)。

作者简介: 李丹丹(1989—), 女, 河南南阳人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为渔业环境监测与保护。E-mail: yunmoqianxi@163.com。

解冻方法进行优化。

参考文献:

- [1] 邹仕成, 李万, 周亚. 水生动物精子低温保存研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(12): 201-201.
- [2] Ohta H, Tsuji M. Ionic environment necessary for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during *in vitro* storage[J]. Fisheries Science, 1998, 64: 547-552.
- [3] 采克俊, 曹访, 叶金云. 鱼类精子低温冷冻保存研究进展[J]. 海洋科学, 2007, 31(4): 1-4.
- [4] 陈光辉, 倪勇, 伍汉霖. 江苏省鳊鲂属(*Rhodeus*) 鱼类的研究[J]. 海洋渔业, 2005, 27(2): 89-97.
- [5] 王权, 李育培, 建国, 等. 中华鳊鲂两性形态特征和雌性成体生育力[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 200-203.

- [6] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [7] Ohta H, Kawamura K, Unuma T, et al. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58(3): 670-681.
- [8] Crister J K, Huse H B, Aaker A, et al. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility[J]. Fertility and Sterility, 1988, 50: 314-320.
- [9] Fraga C G, Motchnik P A, Shigenaga M K, et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm[J]. Fisheries Science, 1998, 64: 547-552.
- [10] Perez-Sanchez F, Cooper T G, Yeung C H, et al. Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing[J]. Fisheries Science, 1998, 64: 547-552.