

额尔齐斯河江鳕精子冷冻保存研究

田永胜^{1*} 姜静^{1,2} 马允³ 向伟⁴ 李胜忠⁵ 马骁³ 高坚³ 范镇民⁴ 钱龙⁴

1 中国水产科学研究院 黄海水产研究所/农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 青岛 266071; 2 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 3 新疆奔腾生物技术有限公司, 乌鲁木齐 830000; 4 新疆生产建设兵团水产技术推广总站, 乌鲁木齐 830002; 5 新疆农业大学 动物医学院, 乌鲁木齐 830052

*通讯作者, tianys@ysfri.ac.cn

摘要 额尔齐斯河中蕴藏着丰富的冷水鱼类种质资源, 江鳕(*Lota lota*)是其中之一, 建立其精子冷冻保存技术和精子冷冻库, 对种质资源保存具有重要意义。本研究利用无机盐、葡萄糖、蔗糖、胎牛血清等配制7种精子稀释液, 以5:1的比例稀释精液, 激活后观察统计精子活力。结果显示, 江鳕精子仅在SS、D15和CM中具有(13.33±2.89)%~(8.33±2.88)%活力。在此基础上配制22种梯度稀释液(SS-0~SS-10和D15-0~D15-7), 以同样的方法稀释和观察精子活力。结果显示, SS-0(56.67±5.77)%、SS-2(63.33±5.77)%、SS-5(53.33±5.77)%和D15-7(63.33±5.77)%中精子活力较高, 与鲜精活力(76.67±5.77)%接近($P < 0.05$)。将二甲基亚砜(DMSO)和甲醇(MeOH)以3:2比例配制成混合抗冻剂(DM), 分别以5%~12%浓度加入到精子稀释液SS-5和D15-7中, 以5:1比例稀释精液, 冷冻保存精子。结果显示, 冷冻前, 5%DM的SS-5和D15-7中精子活力(73.33±5.77)%与鲜精无显著差异($P > 0.05$), 当DM浓度升高到10%~12%时, 精子活力接近于0; 冷冻后, 在DM浓度为6%的SS-5中, 精子活力较高为(26.67±5.77)%($P < 0.05$); 在DM浓度为7%的D15-7中, 精子活力较高为(26.67±5.77)%($P < 0.05$)。本研究结果为额尔齐斯河江鳕精子冷冻保存提供了一定的理论和技术依据。

关键词 江鳕, 精子, 冷冻保存

Spermatozoa Cryopreservation of the Burbot (*Lota lota*) from Irtysh River

TIAN Yong-Sheng^{1*} JIANG Jing^{1,2} MA Yun³ XIANG Wei⁴ LI Sheng-Zhong⁵ MA Xiao³ GAO Jian³
FAN Zhen-Min⁴ QIAN Long⁴

1 Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3 Xinjiang Gallop Biotechnology Co., Ltd., Urumqi 830000, China; 4 Xinjiang Production and Construction Corps Fisheries Extension Station, Urumqi 830002, China; 5 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

* Corresponding author, tianys@ysfri.ac.cn

Abstract A large scale of cold water fish germplasm resources extensively distribute in Irtysh River of China, the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Telestei) is as one of cold water groundfish, and the establishment of sperm cryopreservation technology and cryobank is of great significance to its germplasm resources preservation. In the present study, 7 kinds of sperm diluents were prepared with the basic liquid including inorganic salt, glucose, sucrose and fetal bovine serum(FBS). The sperm were diluted at a ratio of 5:1 (extender: sperm), the motility were observed and recorded under the microscope. The results indicated that the sperm expressed certain motility in the SS, D15, and CM ((13.33±2.89)%~(8.33±2.88)%). On this

基金项目: 国家科技支撑计划(No. 2012BAD26B01)和国家高技术研究发展计划(863)(No. 2012AA10A402)

收稿日期: 2014-03-24

修订日期: 2014-04-28

basis, 22 kinds of gradient dilutions (SS-00~SS-10 and D15-0~D15-7) were prepared, and then diluted sperm, observed motility as in the same way. The results indicated that the motility were relatively higher in the SS-0($56.67\pm 5.77\%$), SS-2($63.33\pm 5.77\%$), SS-5($53.33\pm 5.77\%$) and D15-7 ($63.33\pm 5.77\%$), closed to the fresh sperm motility ($76.67\pm 5.77\%$) ($P<0.05$). Mixed cryoprotectants and DM were prepared with dimethyl sulfoxide (DMSO) and MeOH at a ratio of 3:2. And sperm were diluted by diluents selected, SS-5 and D15-7 at a ratio of 5:1 (extender: sperm), then added 5%~12% DM, respectively, for sperm cryopreservation. Before cryopreservation, the sperm was activated with 2 °C freshwater, observed and recorded the motility under microscope. The results indicated that the motility of 5% DM within the SS-5 and D15-7 was ($73.33\pm 5.77\%$), there were no significant difference with fresh sperm ($P>0.05$), but the sperm motility almost was 0 with the rised DM concentration to of 10%~12%. After cryopreservation, the frozen sperm motility results showed that with the DM concentration of up to 6% in the SS-5, the sperm motility were relatively higher of ($26.67\pm 5.77\%$) ($P<0.05$). In addition, when the DM concentration was 7% in the D15-7, the motility was also relatively higher ($26.67\pm 5.77\%$) ($P<0.05$). The present study results provide the theoretical and technical basis for cryopreservation of spermatozoa of the burbot from Irtysh River of China.

Keywords *Lota lota*, Sperm, Cryopreservation

0 引言

额尔齐斯河发源于阿尔泰山,向北经哈萨克斯坦、俄罗斯注入北冰洋,全长4 248 km,在中国境内633 km,流域面积 5.73×10^4 km²,年径流量多达 111.09×10^8 m³(任慕莲等, 2002),仅次于伊犁河,是新疆境内第二大国际河流,其中蕴藏着丰富的冷水鱼类种质资源。江鳕(*Lota lota*)是分布于该流域中极其珍贵的鱼类种质之一,属鳕形目(Gadiformes)、鳕科(Gadidae)、江鳕属(*Lota* (Cuvier) Oken),俗称鲈鱼,为淡水冷水性底栖凶猛鱼类。在世界上分布于45 °N以北的欧亚和北美洲的内陆水域和海湾处,最南可达美国东侧的俄亥俄河上游,是高纬度水域珍贵的经济鱼类(肖国华等, 2011a)。在中国主要分布于额尔齐斯河、黑龙江和鸭绿江上游流域(董崇智等, 2002)。江鳕肉质细嫩,无肌间刺,味道鲜美,肝脏占其体重的6%~9%,食用极佳。江鳕是鳕科鱼类中唯一的淡水种类,在0~2 °C的冷水水域中繁殖(钱龙等, 2008),在自然环境中分布数量少,是中国冷水鱼类的珍稀物种,也是世界抢救性开发的品种之一,在鱼类进化、分类和种质保存研究方面具有重要的科学研究价值,同时在冷水鱼类品种开发和养殖方面具有较高的经济价值和药用价值(任慕莲等, 2002)。

由于江鳕在自然环境中分布水域、种群数量的局限性,以及繁殖环境条件的特殊性,对于江鳕的

生物学、人工繁殖、养殖、种质保存和开发方面的研究起步较晚,相关研究报道较少。国内在本世纪初开始对江鳕进行人工繁殖研究(钱龙等, 2008; 殷建国等, 2008),但人工繁殖和苗种培育技术设施相对落后,卵受精率低、苗种培育成活率低,在市场上可流通的苗种数量约在10万尾左右。国内外对胚胎发育(张永泉等, 2013)、胚后发育(肖国华等, 2011b; 肖国华等, 2011c)人工育苗技术(Lahnsteiner et al., 2012b; Harzevili et al., 2003)、形态和生化遗传特征(张俊丽等, 2008)、温度对胚胎和幼鱼发育影响(Lahnsteiner et al., 2012a)等方面进行研究,在江鳕精子冷冻保存研究方面,仅有萨尔茨堡大学动物研究所的Lahnsteiner等(2003)报道了江鳕精子冷冻保存的结果,但利用该研究中冷冻保存方法无法重复实现额尔齐斯河江鳕精子冷冻保存。本研究从精子稀释液筛选、抗冻剂成份和浓度筛选等方面进行了江鳕精子冷冻保存研究,以期为江鳕种质冷冻保存、精子库建立及应用建立一套技术方法,同时为新疆珍稀冷水鱼类种质库的建立提供必要的基础资料。

1 材料与方法

1.1 鱼类收集和培育

2012~2013年在额尔齐斯河哈拉朔克水库上游利用围网捕捞江鳕,鱼体长40~60 cm,体重500~2 000 g。培育和驯化至2014年1月,养殖水温降低

到4~6℃时进入性成熟期,将30尾亲鱼放入2个5.0 m×1.0 m×0.5 m的水槽中采用流水培育,同时雄鱼注射LRH-A₂ 2.5 μg/kg和HCG 400 IU/kg催熟。水流保持在1 m³/h,水温1~2℃,溶解氧含量为7~8 mg/L, pH 8。经过10~15 d培育达到性成熟,通过人工挤压腹部排出精液和卵。

1.2 精液的采集

选择性成熟的雄鱼,利用湿润的毛巾将鱼体裹住,将鱼体腹部朝上,用纸巾将生殖孔周围的水滴擦干,以免混入精液。自前向后轻轻挤压鱼体腹部至生殖孔流出乳白色精液,利用10 mL注射器吸取精液,防止尿液和水混入。将采集的精液注入100 mL玻璃瓶,并放置在有冰块的保温盒中。精子的

采集和观察,以及所有的筛选实验均在0~2℃的室温环境下进行。将采集的精液稀释20倍,显微镜(Olympus, BX43, 日本)下观察活力,利用细胞计数板统计并筛选精子活力在60%~90%以上的用于冷冻保存。

1.3 精子稀释液和冷冻保存液的配制

利用无机盐、葡萄糖、蔗糖、胎牛血清等(表1)配制了LLS(Lahnsteiner et al., 2003)、EG1(Erdahl and Graham's 1) (Babiak et al., 2001)、EG2(Erdahl and Graham's 2)(Cabrita et al., 2001)、CM(Cortland medium) (Merino et al., 2012)、SS(Drokin et al., 1998)、MS(Mounib, 1978)和D15(陈松林等, 2007)7种稀释液,作为冷冻保存精子的初选稀释液,并以

表1 精子稀释液配方

Table 1 Composition of extenders for sperm cryopreservation of *Lota lota* (Gadidae, Teleostei)

成分 Composition	LLS	EG1	EG2	CM	SS	MS	D15
NaCl/(g·L ⁻¹)	5.84	5.85		1.88	7.5		8.00
KCl/(g·L ⁻¹)	0.015	2.55		7.20	0.4		0.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O/(g·L ⁻¹)	0.11	0.145	0.103	0.23			
MgCl ₂ ·6H ₂ O/(g·L ⁻¹)		0.20	0.22				
Na ₂ HPO ₄ /(g·L ⁻¹)		0.25	2.557				
NaHCO ₃ /(g·L ⁻¹)				1.00	2.0		
MgSO ₄ ·7H ₂ O/(g·L ⁻¹)	0.12			0.23			
NaH ₂ PO ₄ /(g·L ⁻¹)				0.41			
KHCO ₃ /(g·L ⁻¹)						10.00	
KOH/(g·L ⁻¹)		0.127	0.127				
葡萄糖 Glucose/(g·L ⁻¹)		10.00	10.00	1.00	1.0		15.00
蔗糖 Sucrose/(g·L ⁻¹)				42.79		42.70	
柠檬酸 Citric acid/(g·L ⁻¹)		0.10	0.10				
精浆 Seminal plasma/(g·L ⁻¹)				40			
谷胱甘肽 Reduced glutathione/(g·L ⁻¹)						2.00	
Tris/%				10			
胎牛血清 BSA /%			4	1			
Hepes/(g·L ⁻¹)	4.77						
N-二(羟乙基)甘氨酸 Bicine/(g·L ⁻¹)		0.53	1.06				
Egg yolk/%	7	10	10				
DMSO/%			7				10
DMA/%		10					
EG/%				10			
MeOH/(g·L ⁻¹)	10						

精子稀释液配方参考文献参见1.3; DMSO: 二甲基亚砷; DMA: 二甲基乙酰胺; EG: 乙二醇

References about composition of sperm dilutions see 1.3; DMSO: Dimethyl sulfoxide; DMA: Dimethyl acetamide; EG: Ethylene glycol

二甲基乙酰胺(dimethyl acetamide, DMA)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、乙二醇(ethylene glycol, EG)、甲醇(MeOH)、甘油等作为抗冻剂,配制精子抗冻保护剂。精子稀释液配制成分和抗冻剂组成分别见表1。

1.4 精子稀释液的初步筛选

利用表1中7种精子稀释液以5:1的比例稀释精液,用牙签蘸取少许精液涂在载玻片上,置于显微镜下,滴加1滴2℃的淡水激活,利用10倍物镜(Olympus, BX43,日本)观察精子活力,连续取样观察3次,统计每次观察到的精子活力。精子活力为运动精子占全部精子数量的百分比。

1.5 精子稀释液的进一步筛选

利用1.4中初步筛选到的二种精子稀释液SS和D15,分别配制13种和9种梯度液(表2),再分别加入10%小牛血清(FBS),以5:1的比例稀释精液,

表2 SS和D15梯度稀释液配方

Table 2 Composition of SS and D15 serial dilutions

稀释液	氯化钠	碳酸氢钠	氯化钾	葡萄糖	小牛血清
Dilutions(g·100mL ⁻¹)/(g·100mL ⁻¹)/(g·100mL ⁻¹)/(g·100mL ⁻¹)/%	NaCl	NaHCO ₃	KCl	Glucose	FBS
SS-00	0.40	0.2	0.04	1.0	10
SS0	0.50	0.2	0.04	0.1	10
SS	0.75	0.2	0.04	0.1	10
SS-1	1.00	0.2	0.04	0.1	10
SS-2	1.25	0.2	0.04	0.1	10
SS-3	1.50	0.2	0.04	0.1	10
SS-4	1.75	0.2	0.04	0.1	10
SS-5	0.50	0.2	0.04	1.0	10
SS-6	0.75	0.2	0.04	1.0	10
SS-7	1.00	0.2	0.04	1.0	10
SS-8	1.25	0.2	0.04	1.0	10
SS-9	1.50	0.2	0.04	1.0	10
SS-10	1.75	0.2	0.04	1.0	10
D15-0	0.80		0.05	0.2	10
D15	0.80		0.05	1.5	10
D15-1	0.80		0.05	3.0	10
D15-2	0.80		0.05	4.0	10
D15-3	1.20		0.05	4.0	10
D15-4	1.50		0.05	4.0	10
D15-5	0.80		0.05	2.0	10
D15-6	0.80		0.05	1.0	10
D15-7	0.40		0.05	1.5	10

用牙签蘸取少许精液涂在载玻片上,置于显微镜下,滴加1滴2℃的淡水激活,利用10倍物镜观察精子活力,连续取样观察3次,统计每次观察到的精子活力。

1.6 抗冻剂的筛选和精子冷冻保存

将二甲基亚砷(DMSO)和甲醇(MeOH)以3:2的比例配制成混合抗冻剂(DM),利用筛选出的适宜的精子稀释液SS-2和D15-7以5:1的比例稀释精液,再分别加入5%、6%、7%、8%、10%和12%的混合抗冻剂DM。将稀释后的精液注入2 mL的塑料冷冻管中,每管中加入1 mL精液,0~2℃平衡5~10 min。将冷冻管装入小布袋中,先在距液氮面以上10 cm处平衡10 min,再在液氮面以上5 cm处平衡5 min,然后将小布袋吊入液氮罐-196℃中冷冻保存。

精液冷冻2~3 h后,将小布袋从液氮中提出至液氮蒸气中平衡1~2 min,再将冷冻管从布袋中取出,放入事先准备好的25℃水浴中摇动解冻约2 min,待精液可以流动即可。然后用牙签蘸取少许解冻后的精液涂在载玻片上,置于显微镜下,滴加1滴2℃的淡水激活,利用10~20倍物镜观察精子活力,连续取样观察3次,统计每次观察到的精子活力。

1.7 数据统计分析

利用SSPS统计软件对获得的数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用Student-Newman-Keuls进行多重比较和差异显著性分析,筛选精子活力最高的精子稀释液配方、抗冻剂成份和浓度。利用Excel软件对统计结果作图, $P<0.05$ 表示具有显著性差异, $P>0.05$ 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 适宜精子稀释液的筛选

在0~2℃的环境下,利用表1中7种精子稀释液以5:1的比例稀释江鳕精液,再用2℃淡水激活精子,在显微镜下观察统计精子的活力。结果显示,SS、D15和CM3种稀释液中精子活力分别达到 $(13.33\pm 2.89)\%$ 、 $(13.33\pm 2.89)\%$ 和 $(8.33\pm 2.88)\%$,但与鲜精活力 $(36.67\pm 5.77)\%$ 比较差异显著($P<0.05$) (图1)。而其它几种稀释液中精子无活力,加水激活后精液絮状,说明这几种稀释液中 Ca^{2+} 浓度太

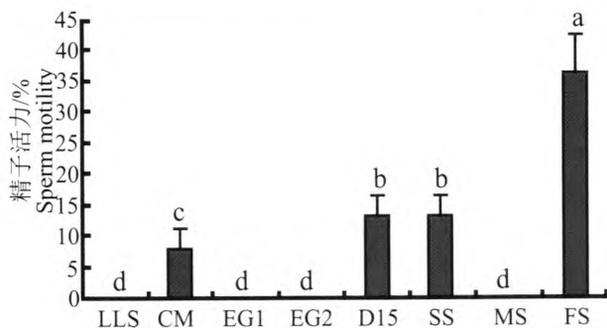


图1 江鳕精子在不同稀释液中活力

Figure 1 Sperm motility of *Lota lota* in different dilutions
 SS和D15中精子活力最高,CM中的次之,其它几种稀释液中精子无活力。FS:鲜精;不同小写字母表示精子活力差异显著($P < 0.05$, $n=3$),下同

The highest sperm motility was in SS and D15, the second in CM, and non-viable sperm motility in other dilutions. FS: Fresh sperm; Different lowercases stand for significant difference of sperm motility ($P < 0.05$, $n=3$), the same below

高,不适宜于江鳕精子的冷冻保存,而SS和D15不含有Ca²⁺离子。

对SS和D15的成分进行调整后配制的梯度稀释液中,SS-0、SS-2和SS-5中精子活力较高,分别达到(56.67 ± 5.77)%、(63.33 ± 5.77)%和(53.33 ± 5.77)%,无显著性差异($P > 0.05$),与鲜精活力接近(76.66 ± 5.77)%,但差异显著($P < 0.05$)。其它几种梯度液中精子活力较低,为10%~(46.66 ± 5.77)%(图2A)。

在D15系列稀释中,D15、D15-1、D15-3和

D15-7中精子活力较高,分别达到(53.33 ± 5.77)%、(56.66 ± 5.77)%、(53.33 ± 5.77)%和(63.33 ± 5.77)%,其它几种梯度释中精子活力较低,为(6.67 ± 2.89)%~(23.33 ± 11.55)%,与鲜精活力(76.67 ± 5.77)%比较差异显著($P < 0.05$)。相比之下D15-7中精子活力最高(图2B)。

2.2 适宜抗冻剂的筛选

在SS-5稀释精液中分别加入5%~12%的混合抗冻剂DM,冷冻前,DM浓度为5%时,精子活力可达(73.77 ± 5.77)%,与鲜精活力(73.77 ± 5.77)%比较无显著差异($P > 0.05$)。随着DM浓度的逐渐升高,精子活力下降,当DM浓度达到12%时,精子活力为0。解冻后,DM浓度为6%和7%的2组精子活力分别达到(26.67 ± 5.77)%和(8.33 ± 2.89)%,其它浓度组冷冻后精子活力为0(图3A)。

在D15-7稀释精液中分别加入5%~12%的混合抗冻剂DM,冷冻前检测DM浓度为5%时精子活力达到(73.33 ± 5.77)%,与鲜精活力(73.33 ± 5.77)%比较无显著差异($P > 0.05$);随着DM浓度升高,精子活力逐渐下降,当DM浓度达到12%时,精子活力降低到(6.67 ± 2.89)%,与鲜精活力比较差异显著($P < 0.05$)。冷冻后检测精子活力显示,DM浓度在6%~8%时精子活力为(8.33 ± 2.88)%~(26.67 ± 5.77)%,DM为7%时精子活力较高(26.67 ± 5.77)%。当DM浓度小于5%以下或大于10%以上时,精子活力趋于0(图3B)。

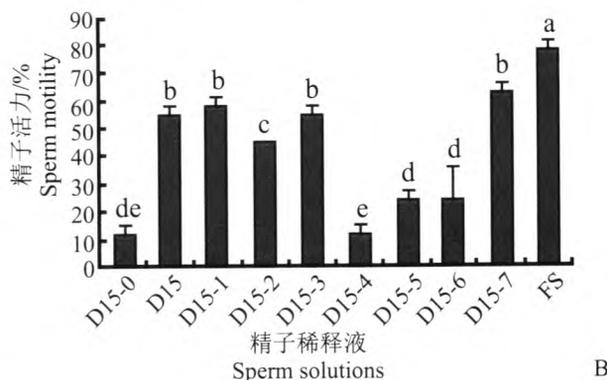
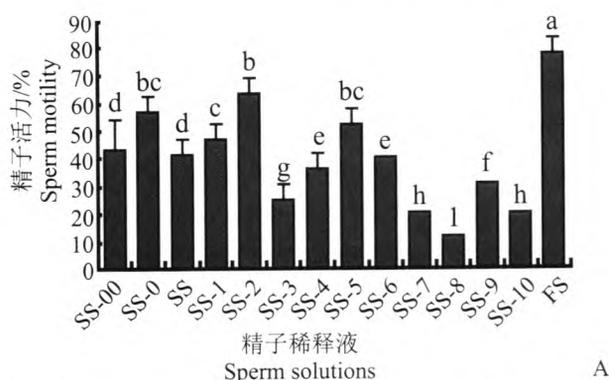


图2 江鳕精子在SS(A)和D15(B)系列稀释液中活力

Figure 2 Sperm motility of *Lota lota* in SS(A) and D15(B)

在SS梯度稀释液中SS-0、SS-2和SS-5中精子活力较高,其它稀释液中精子活力较低($P < 0.05$, $n=3$);在D15梯度稀释中D15、D15-1、D15-3和D15-7中精子活力较高($P < 0.05$, $n=3$)

Sperm motility in SS-0,SS-2 and SS-5 was higher than that in other dilutions of SS($P < 0.05$, $n=3$). Sperm motility in D15, D15-1, D15-3 and D15-7 was higher than that in other dilutions of D15($P < 0.05$, $n=3$)

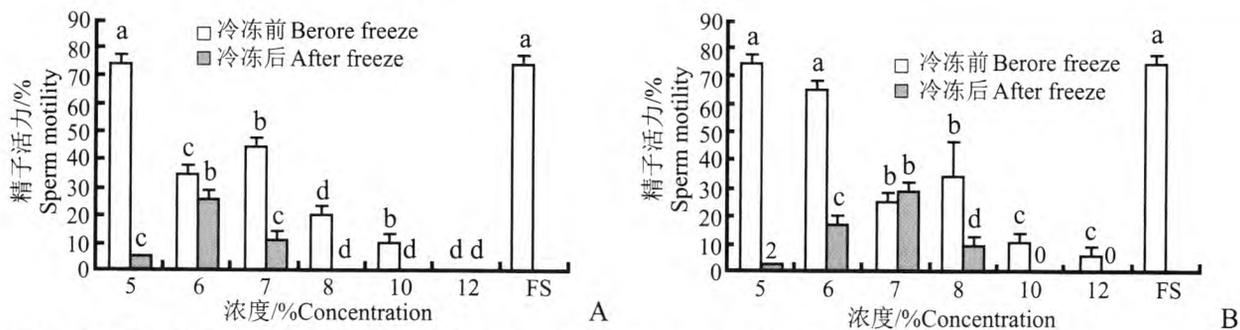


图3 江鲤精子在SS-5+DMSO+MeOH(A)和D15-7+DMSO+MeOH(B)中冷冻前后的活力

Figure 3 Sperm motility of *Lota lota* in SS-5+DMSO+MeOH (A) and D15-7+DMSO+MeOH (B)

在两个系列的不同浓度冷冻保存液中,冷冻前精子在5%DM中活力最高(A),冷冻后精子活力在SS-5+6%DM(A)、D15-7+7%DM(B)中活力较高($P < 0.05$, $n = 3$)

The sperm motility in 5% DM(A) was the highest before freeze, was relatively higher in SS-5 +6% DM (A) and D15-7 +7% DM(B) after freeze($P < 0.05$, $n = 3$)

3 讨论

额尔齐斯河是我国唯一流入北冰洋的河流,该流域中分布着35种鱼类(任慕莲等, 2002),其中土著鱼类29种,冷水性鱼类有西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*)、小体鲟(*Acipenser ruthenus*)、哲罗鲑(*Hucho taimen*)、细鳞鲑(*Brachymystax lenok*)、北鲑(*Stenodus leucichthys*)、北极鱼 鲟 鱼 (*Thymallus arcticus arcticus*)、白斑狗鱼(*Esox lucius*)、江鲤、河鲈(*Perca fluviatilis*)、梭鲈(*Lucioperca Lucioperca*)等10多种(田永胜等, 1994),但由于对河流水资源开发和利用强度加大,水域环境的演变,渔业资源的无序利用,目前该流域中部分土著鱼类:如西伯利亚鲟、小体鲟、哲罗鲑、细鳞鲑、北鲑等已经濒临灭绝或相当稀少,因此对该流域中冷冻鱼类资源进行积极保护,已经迫在眉睫。精子冷冻保存技术研究及精子冷冻库建立,对于珍稀鱼类种质资源的保存和恢复是一条有效的途径(陈松林等, 2007)。

冷水鱼类精子冷冻保存在国际受到普遍重视(Gallant et al., 1993; Babiak et al., 2001),但是不同鱼类由于其生理特性不同,精浆的成分、渗透压和pH值都不同,因此在精子冷冻保存中精子稀释液成分、浓度的筛选和配制是精子冷冻保存中首先需要解决的问题。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)精子冷冻保存中分别应用EG1(Babiak et al., 2001)、EG2(Cabrita et al., 2001)和CM(Merino et al., 2012)等精子稀释液(表1),获得了81%~86%的冷冻成活率。在大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)和大西洋鳕(*Gadus morhua*)的精子冷冻中应用了MS(Mounib, 1978)精

子稀释液(表1),冷冻后受精率与正常精子无显著的差异。在褐鳟(*Salmo trutta*)和虹鳟精子冷冻和细胞结构观察中应用了SS精子稀释液(Drokin et al., 1998),在鲤(*Cyprinus carpio*)、鲢(*Silver carp*)等淡水鱼类精子冷冻保存中应用了D15(陈松林等, 2007),获得较理想的精子活力。Lahnsteiner等(2003)利用100 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgSO₄, 20 mmol/L Hepes (pH 7.8)配制的精子稀释液(简称LLS)冷冻保存江鲤精子,获得了(46.6±8.0)%的冷冻成活率。本研究利用多种配方的稀释液对额尔齐斯河江鲤精子进行稀释,然后用养殖江鲤的淡水激活,只有SS和D15两种稀释液中精子具有一定的活力,其它配方活力太低或无法获得成活的精子,Lahnsteiner等(2003)配制的冷冻江鲤精子的稀释液也不能使本研究中江鲤精子成活。因此本研究在SS和D15两种稀释液基础上,对NaCl和葡萄糖成分和浓度进行调整和扩展,并增加了小牛血清配制了一系列稀释(表2),对适合于江鲤精子冷冻保存的稀释液进行筛选,得到SS-5和D15-7两种较好的精子稀释液,可以将精子活力提高到(8.33±2.88)%~(26.67±5.77)%。

在精子稀释液中加入抗冻剂,能够在超低温冷冻过程中减少细胞中冰晶的形成,起到保护精子细胞膜和细胞结构的作用。目前使用最多的抗冻剂有二甲基亚砷,此外还有1,2-丙二醇、乙二醇、甘油、甲醇和二甲基乙酰胺等应用较少。在虹鳟精子冷冻保存中应用了DMSO(Mounib et al., 1978)和二

甲基乙酰胺(DMA)(Babiak et al., 2001),大西洋鲑精子冷冻中应用了DMSO(Gallant et al., 1993)。Lahnsteiner 等(2003)在江鳕精子稀释液中加入10% 甲醇、1.5% 葡萄糖和7% 鸡卵黄。不同鱼类精子对抗冻剂种类和浓度的适应性不同,通常鱼类精子冷冻中加入8%~15% DMSO(陈松林等, 2007)。本研究中,利用以上抗冻剂单一成分进行保存,均无法获得成活的精子。冷冻前在精子稀释液中加入抗冻剂后再稀释精子,会导致精子的死亡;利用精子稀释液以1:5的比例先稀释精液,再加入抗冻剂有利用于精子的成活,究其原因,精子与稀释液混合可以使精子渗透压事先得到平衡,之后加入抗冻剂可以对精子渗透压的变化起到缓冲作用。为了解决DMSO在0~2℃环境中已经结冰,无法加入到稀释液中,其它几种抗冻剂在此温度不会结冰,但加入后精子在冷冻前就已死亡的问题,本研究中先将DMSO分别与1,2-丙二醇、甘油、甲醇和二甲基乙酰胺以3:2的比例混合,经过预实验筛选到DM混合抗冻剂(DMSO:MeOH=3:2)利于江鳕精子成活率,进一步筛选DM的适宜浓度发现,在冷冻前DM浓度达到12%时精子几乎全部死亡;冷冻后,在DM浓度为6%的SS-5中的精子活力较高,在DM浓度为7%的D15-7中的精子活力较高。

4 结论

本研究筛选得到适于江鳕精子冷冻保存稀释液SS-5和D15-7,在其中分别加入6%和7%的混合抗冻剂DM(DMSO:MeOH=3:2),冷冻前精子活力可以达到(63.33±5.77)%,冷冻后精子活力为(8.33±2.88)%(26.67±5.77)%。本研究结果为额尔齐斯河江鳕精子冷冻保存及冷冻精子库的建设提供了重要的技术资料。

参考文献

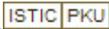
陈松林,田永胜,李军,等. 2007. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, pp. 47-255.
(Chen S L, Tian Y S, Li J, et al. 2007. Fish Sperm and Embryo Cryopreservation Theory and Technology[M]. Agriculture Press of China, Beijing, China, pp. 47-255.)
董崇智,李怀明,牟振波,等. 2002. 中国淡水冷水性鱼类[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, pp. 198-200.
(Dong C Z, Li H M, Mou Z B, et al. 2002. Cold Water

Fish of China[M]. Haribing, Science and Technology Press of Heilongjiang, China, pp. 198-200.)
钱龙,胡伯林,艾涛. 2008. 江鳕人工繁殖试验[J]. 科学养鱼, 3: 10-11.(Qian L, Hu B T, Ai T. 2008. Artificial breeding trials of burbot[J]. Scientific Fish Farming, 3: 10-11.)
田永胜,王国英,潘育英. 1994. 新疆土著鱼类数值分类[J]. 八一农学院学报, 17(1): 86-93.(Tian Y S, Wang G Y, Pan Y Y. 1994. Numerical classification studies on native fishes of Xingjiang[J]. Journal of August Ist Agri. Collige, 17(1): 86-93.)
任慕莲,郭炎,张入铭,等. 2002. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, pp. 1-183. (Ren M L, Gou Y, Zhang R M, et al. 2002. Fisheries Resources and Fishery of the Ertixhe River in China[M]. Xinjiang Science and Technology Publishing House, Urumqi, China, pp. 1-183.)
肖国华,高晓田,蒋燕,等. 2011c. 江鳕苗种培育技术研究[J]. 河北渔业, 4: 26-29.(Xiao G H, Gao X T, Jiang Y, et al. 2011c. Fry rearing technology research of burbot[J]. Hebei Fisheries, 4: 26-29.)
肖国华,高晓田,蒋燕,等. 2011a. 江鳕仔鱼幼体发育及生长研究[J]. 海洋湖沼通报, 1: 137-141.(Xiao G H, Gao X T, Jiang Y, et al., 2011a. Larval development and growth of burbot[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 1: 137-141.)
肖国华,赵振良,高晓田,等. 2011b. 江鳕胚后形态发育特征[J]. 水产学杂志, 24(1): 34-41.(Xiao G H, Zhao Z L, Gao X T, et al. 2011b. The morphological characteristics of post embryonic development in freshwater cod *Lota lota*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 24(1): 34-41.)
殷建国,蔡晓琴,何志杰,等. 2008. 江鳕人工繁育技术研究[J]. 中国水产, 4: 43-45.(Yen J G, Cai X Q, He Z J, et al. 2008. Artificial breeding technology research of burbot[J]. China Fisheries, 4: 43-45.)
张俊丽,高天翔,方华华,等. 2008. 黑龙江多布库尔河和新疆额尔齐斯河江鳕的形态特征及生化遗传分析[J]. 中国水产科学, 15(3): 386-391.(Zhang J L, Gao T X, Fang H H, et al. 2008. Morphological comparison and isoxyme analysis of *Lota lota* populations in Duobukù er River and Eerqisi River[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 15(3): 386-391.)
张永泉,尹家胜,张超,等. 2013. 黑龙江流域江鳕的胚胎发育[J]. 水产学杂志, 26(3): 20-26.(Zhang Y Q, Yin J S, Zhang C, et al. 2013. Embryonic development of burbot (*Lota lota*) in Heilongjing river[J]. Chinese Journal of Fisheries, 26(3): 20-26.)
Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, et al. 2001. Effect of

- extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa[J]. *Theriogenology*, 56(1): 177-92.
- Cabrita E, Anel L, Herraéz M P. 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm[J]. *Theriogenology*, 56(4): 623-35.
- Drokin S, Stein H, Bartscherer H. 1998. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta F. fario*) [J]. *Cryobiology*, 37(3): 263-270.
- Gallant R K, Richardson G F, McNiven M A. 1993. Comparison of different extenders for the cryopreservation of Atlantic salmon spermatozoa[J]. *Theriogenology*, 40(3):479-86.
- Harzevili A S, De Charleroy D, Auwerx J, et al. 2003. Larval rearing of burbot (*Lota lota* L.) using *Brachionus calyciflorus* rotifer as starter food[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 84-87.
- Lahnsteiner F, Kletzl M, Weismann T. 2012a. The effect of temperature on embryonic and yolk- sac larval development in the burbot *Lota lota*[J]. *Journal of Fish Biology*, 81: 977-986.
- Lahnsteiner F, Kletzl M, Weismann T. 2012b. Rearing of burbot, *Lota lota* (Pisces, Teleostei), Larvae with zooplankton and formulated microdiets[J]. *Journal of Agricultural Science*, 4(9): 269-277.
- Lahnsteiner F, Mansour N, Weismann T. 2003. The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei)[J]. *Cryobiology*, 45(3): 195-203.
- Merino O, Sánchez R, Risopatrón J, et al. 2012. Cryoprotectant- free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: First report[J]. *Andrologia*, 44: 390-395.
- Mounib M S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53: 13-18.

(责任编辑 任立刚)

额尔齐斯河江鳕精子冷冻保存研究

作者: 田永胜, 姜静, 马允, 向伟, 李胜忠, 马骁, 高坚, 范镇民, 钱龙
作者单位: 田永胜(中国水产科学研究院黄海水产研究所/农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 青岛, 266071), 姜静(中国水产科学研究院黄海水产研究所/农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 青岛266071; 上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306), 马允, 马骁, 高坚(新疆奔腾生物技术有限公司, 乌鲁木齐, 830000), 向伟, 范镇民, 钱龙(新疆生产建设兵团水产技术推广总站, 乌鲁木齐, 830002), 李胜忠(新疆农业大学动物医学院, 乌鲁木齐, 830052)
刊名: 农业生物技术学报 
英文刊名: Journal of Agricultural Biotechnology
年, 卷(期): 2014, 22(9)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_nyswjsxb201409012.aspx