

条纹锯鲂精液超低温冷冻保存研究

韩龙江^{1,2}, 刘清华², 官曙光³, 纪利芹¹, 温海深^{1*}, 李 军^{2*}

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;

3. 山东省海水养殖研究所, 山东 青岛 266002)

摘要: 为建立条纹锯鲂精液超低温冷冻保存方法, 实验采用计算机辅助精子分析系统(CASA)分析了采用 6 种抗冻保护剂(GLY[甘油]、DMSO[二甲基亚砷]、PG[丙二醇]、EG[乙二醇]、METH[甲醇]、DMA[二甲基乙酰胺])在 4 种浓度(5%、10%、15%、20%, v/v)下对条纹锯鲂精液的冷冻保存效果。结果发现, 以 HBSS 为稀释液, 采用程序降温仪分步降温冷冻保存条纹锯鲂精液, 37 ℃ 水浴解冻后的精子中, 15% PG 作为抗冻保护剂的精子运动率最高, 达到(93.1 ± 0.9)%, 与鲜精差异不显著($P > 0.05$), 15% PG 作为抗冻保护剂的精子水浴解冻后精子的运动速度最高, 平均直线速度、平均曲线速度、平均路径速度分别达到了(88.3 ± 0.3) μm/s、(76.2 ± 0.5) μm/s、(86.7 ± 0.7) μm/s, 与鲜精差异不显著($P > 0.05$)。在不同种类及不同浓度抗冻保护剂保护下, 15% PG 作为抗冻保护剂的精子解冻后 1 min 内运动率变化与鲜精差异不显著($P > 0.05$)。研究表明, 15% PG 为条纹锯鲂最佳抗冻保护剂, 可用于条纹锯鲂精液的超低温冷冻保存。

关键词: 条纹锯鲂; 精子; 超低温保存; 抗冻保护剂; 计算机辅助精子分析系统(CASA)

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

鱼类精子超低温冷冻保存在保护物种多样性方面具有广泛的应用前景, 鱼类精液的超低温冷冻保存对于提高鱼类种质、选择培育优质鱼种具有重要意义:能够有效避免近亲交配, 突破地理隔离, 扩大杂交组合范围^[3], 通过该技术可将一些濒危、名贵、优良鱼种的精液保存起来, 建立鱼类精子原种库, 保护鱼类的种质资源^[4-5]。随着海水养殖业的发展, 我国迫切需要建立海洋生物种质资源保护体系, 近几年在海水鱼类精液的冷冻保存方面也取得了巨大的进展, 对一些具有较高经济价值的鱼类, 如真鲷(*Pagrus major*)^[6]、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)^[7]、大菱鲆(*Scophamus maximus*)^[8]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[9]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[10]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[11]等进行了一系列的精子超低温冷冻保存研究, 为我国水产养殖业做出了巨大的贡献。

条纹锯鲂(*Centropristis striata*)属于脊椎动物门(Vertebrata)、真骨鱼纲(Division Teleostei)、鲂科(Serranidae)、锯鲂属(*Centropristis*), 俗称美洲黑石斑, 主要分布于加拿大东南和美国东岸近海及墨西哥湾水域, 属于广温、广盐、耐低温、耐低氧鱼类, 具有生长快, 抗逆性强等优良性状^[1]。条纹锯鲂于 2002 年被成功引入我国并进行了一系列人工繁育研究, 在我国北方, 特别是山东、河北、辽宁等地推广养殖, 适应了我国的气候环境, 人工驯养取得了较为理想的效果^[2]。条纹锯鲂属于雌雄同体、雌性先成熟的鱼类, 自然群体中雌鱼比例高于雄鱼且存在性逆转现象, 这种性转变造成雌雄配子发育不同步, 雄鱼少、精液量不足等一系列问题, 为条纹锯鲂的育种工作带来了很大困难。本研究在实验室多年精子冷冻保存研究基础上, 通过筛选多种不同抗冻保护剂与不同浓度下的组合对条纹锯鲂精

收稿日期:2014-06-30 修回日期:2014-08-01

资助项目:国家自然科学基金(31072212, 41076100); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A402); 水产种质资源平台运行服务项目

通信作者:李 军, E-mail: junli@qdio.ac.cn; 温海深, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

液超低温冷冻保存的影响,详细分析了解冻后精子的活力参数,优化了条纹锯鲈精子冷冻方法,以期条纹锯鲈繁育工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用条纹锯鲈来自山东省莱州市东方海洋养殖车间,将性腺发育良好的5尾雄性亲鱼(平均体质量1 850 g)从养殖池中捞出,放置于海绵上,蒸馏水冲洗生殖孔3次,纸巾擦净,从后向前轻轻挤压腹部采集雄鱼的新鲜精液,精液存于干净的离心管中,离心管放置于冰盒中,采集完后迅速将精液带回实验室,采用计算机辅助精子分析系统(computer-assisted sperm analysis, CASA)检测其运动性能,运动率高于95%的样品进行冷冻保存实验。

1.2 实验方法

选取6种抗冻保护剂(GLY[甘油]、DMSO[二甲基亚砷]、PG[丙二醇]、EG[乙二醇]、METH[甲醇]、DMA[二甲基乙酰胺])(DMSO购自SIGMA公司,其他药品均购自国药集团化学试剂有限公司),用HBSS稀释液^[12]稀释成4个不同的浓度(5%、10%、15%、20%, v/v)作为抗冻液保存于4℃冰箱中备用。将采集的新鲜条纹锯鲈精液与冷冻保护液按1:3的比例装入2 mL的冻存管中,立即放入程序降温仪中(型号Kryo-360-1.7)分步降温,0℃预冷5 min后,以15℃/min的降温速率从0℃降至-80℃,停留5 min后再以20℃/min的降温速率降至-180℃取出,直接投入液氮中保存。每一实验组设3个平行。

1.3 鲜精与冻精的活力测定

鲜精活力的测定:吸取1~2 μL新鲜精液,用添加有5% (v/v) BSA的过滤海水激活,光学显微镜(型号Nikon-YS-100)下检测活力,采用计算机辅助精子分析系统(CASA)计算并统计精子的运动率(激活后运动精子占所有精子的百分比, MOT)、平均直线速度(单位时间内精子头部运动两点间距离, VSL)、平均曲线速度(精子运动轨迹切线上速度, VCL)、平均路径速度(单位时间内精子实际运动距离, VAP)及激活后精子运动率(激活后精子每隔单位时间采集精子运动率)等指标。

冻精活力的测定:将存有精液的冻存管直接放入37℃水浴中解冻100~110 s,然后置于室温(18~20℃)条件下完全融化,用添加有5% (v/

v) BSA的过滤海水激活,采用计算机辅助精子分析系统(CASA)计算并统计精子的运动率(MOT)、平均直线速度(VSL)、平均曲线速度(VCL)、平均路径速度(VAP)及激活后精子运动率等指标。

1.4 数据处理

实验数据分析采用SPSS 17.0软件进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,比较实验结果差异显著性,结果以mean ± SD表示。多重比较采用Duncan方法。

2 结果

2.1 抗冻剂种类和浓度对精子运动率的影响

采用4种不同浓度的6种抗冻保护剂对条纹锯鲈精子超低温冷冻保存后, GLY、DMSO、PG和EG对条纹锯鲈精子冷冻保存效果较好, DMA和METH冷冻保存效果较差。10% DMSO、10% PG及15% PG组解冻后精子运动率最高,达到90%以上,显著高于其他实验组($P < 0.05$),与鲜精差异不显著($P > 0.05$),且与15% GLY、15% DMSO、20% PG、10% EG、15% EG组差异也不显著($P > 0.05$),其中15% PG组精子运动率最高,达到 $(93.1 \pm 0.9)\%$ (图1)。10% GLY、15% DMSO、20% PG、10% EG组解冻后精子运动率显著高于其余各组($P < 0.05$)。5% DMA、5% METH、20% DMA及20% METH组解冻后精子运动率低于20%,显著低于其他各组($P < 0.05$)。

2.2 抗冻剂种类和浓度对精子运动性能的影响

采用4种不同浓度的6种抗冻保护剂对条纹锯鲈精子超低温冷冻保存后, 15% PG组与鲜精平均直线速度(VSL)差异不显著($P > 0.05$); 15% GLY、10% DMSO、10% PG、10% EG及15% EG组与15% PG组差异不显著($P > 0.05$),且显著高于其他各组($P < 0.05$)。15% GLY、10% DMSO及10% PG实验组精子平均曲线速度(VCL)与鲜精的平均曲线速度(VCL)差异不显著($P > 0.05$); 10% GLY及15% EG组与15% GLY、10% DMSO、10% PG及5% GLY组差异不显著($P > 0.05$),且显著高于其他实验组($P < 0.05$)。鲜精及冻精平均路径速度(VAP)方面, 15% PG组与鲜精差异不显著($P > 0.05$); 15% GLY、10% DMSO、10% PG、10% EG及15% EG组与15% PG组差异不显著($P > 0.05$),且显著高于其余各组($P < 0.05$)(图2)。

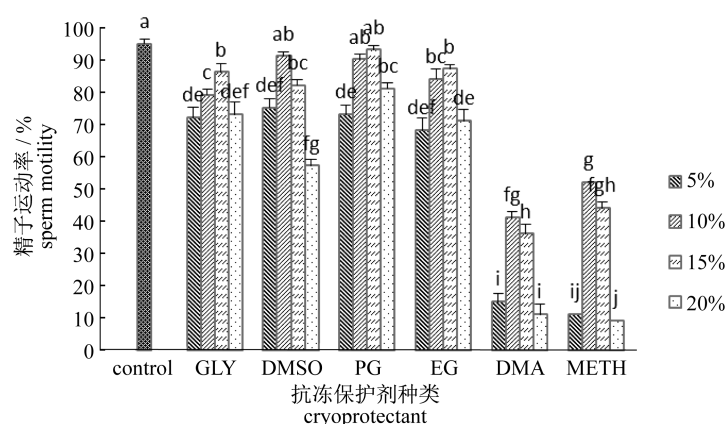


图1 抗冻剂对精子运动率的影响

相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下图注释同此

Fig.1 Effect of cryoprotectant on motility of sperm

Same letters indicate a significant difference ($P > 0.05$), different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$), the same as the following

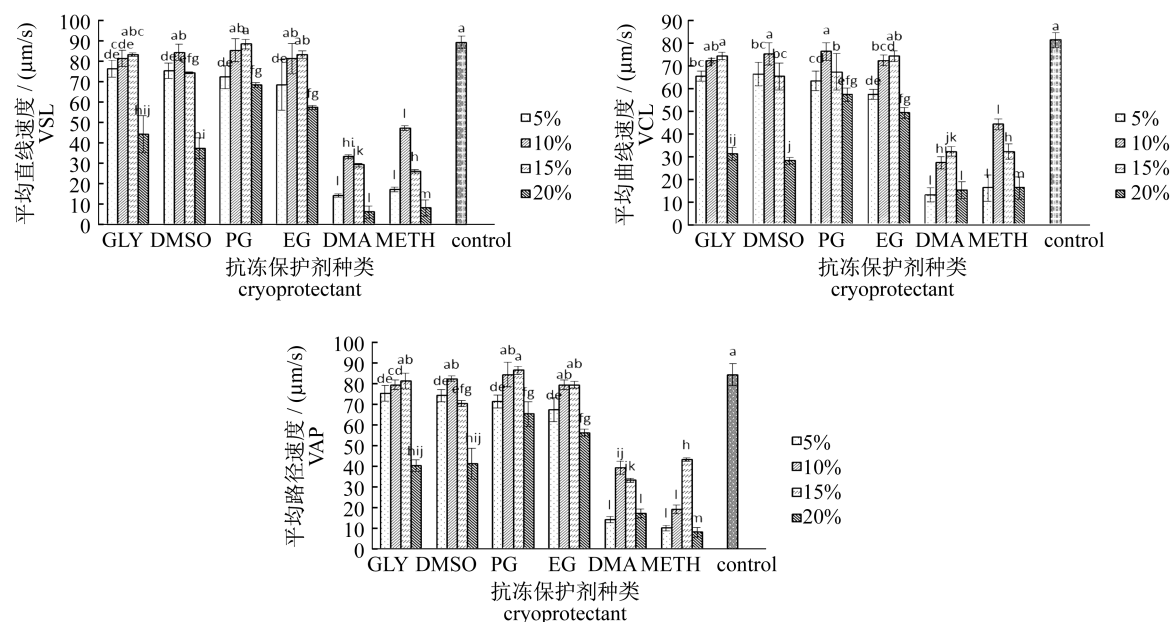


图2 不同抗冻剂不同浓度下精子的运动速率

Fig.2 Different cryoprotectants in different concentrations on velocity of sperm

2.3 不同浓度不同种类的抗冻剂对精子激活后运动率的影响

GLY 组冻精 37 °C 水浴解冻后, 冻精在 1 min 内运动率下降不明显, 从激活后第 2 min 开始, 运动率急速下降, 且在 15% 浓度下下降较慢, 其次为 20% 浓度下, 5% 浓度下精子运动率下降最为剧烈, 激活后 3 min 时冻精的运动率只有刚刚激活时的 1/3 (图 3)。DMSO 组冻精 37 °C 水浴解冻后活力呈现逐渐下降的趋势。冻精运动率在

10% 浓度时下降最慢, 其次为 5% 浓度, 20% 浓度下精子运动率下降最为剧烈, 激活后 5 min 时冻精的运动率接近 0。冷冻精子活力下降速度显著高于鲜精对照组 ($P < 0.05$)。

PG 组冻精 37 °C 水浴解冻后活力呈现逐渐下降的趋势。冻精活力在 10%、15% 浓度下下降较慢, 且在 1 min 内与鲜精对照组差异不显著, 从第 1 min 开始, 冻精活力下降速度显著高于鲜精对照组。5% 和 20% 浓度下, 精子活力下降较快, 激

活后 5 min 时冻精的运动率低于 10%。

EG 组冻精 37 ℃ 水浴解冻后,10% 和 15% 浓度下冻精在 2 min 内活力下降不明显,且在 1 min 内与鲜精差异不显著,从激活后第 2 min 开始活力急速下降,激活后 5 min 时各浓度下冻精的运动率低于 20%。

精子解冻后,DMA 组和 METH 组在不同浓

度下的活力显著低于鲜精对照组。DMA 组精子在 10% 和 15% 浓度下活力下降较为缓慢,5% 和 20% 浓度下活力下降相对较快。METH 组精子在 10% 浓度下,精子活力下降最慢,而在 5% 和 20% 浓度下精子活力下降较快,1 min 后精子运动率低于 5%。

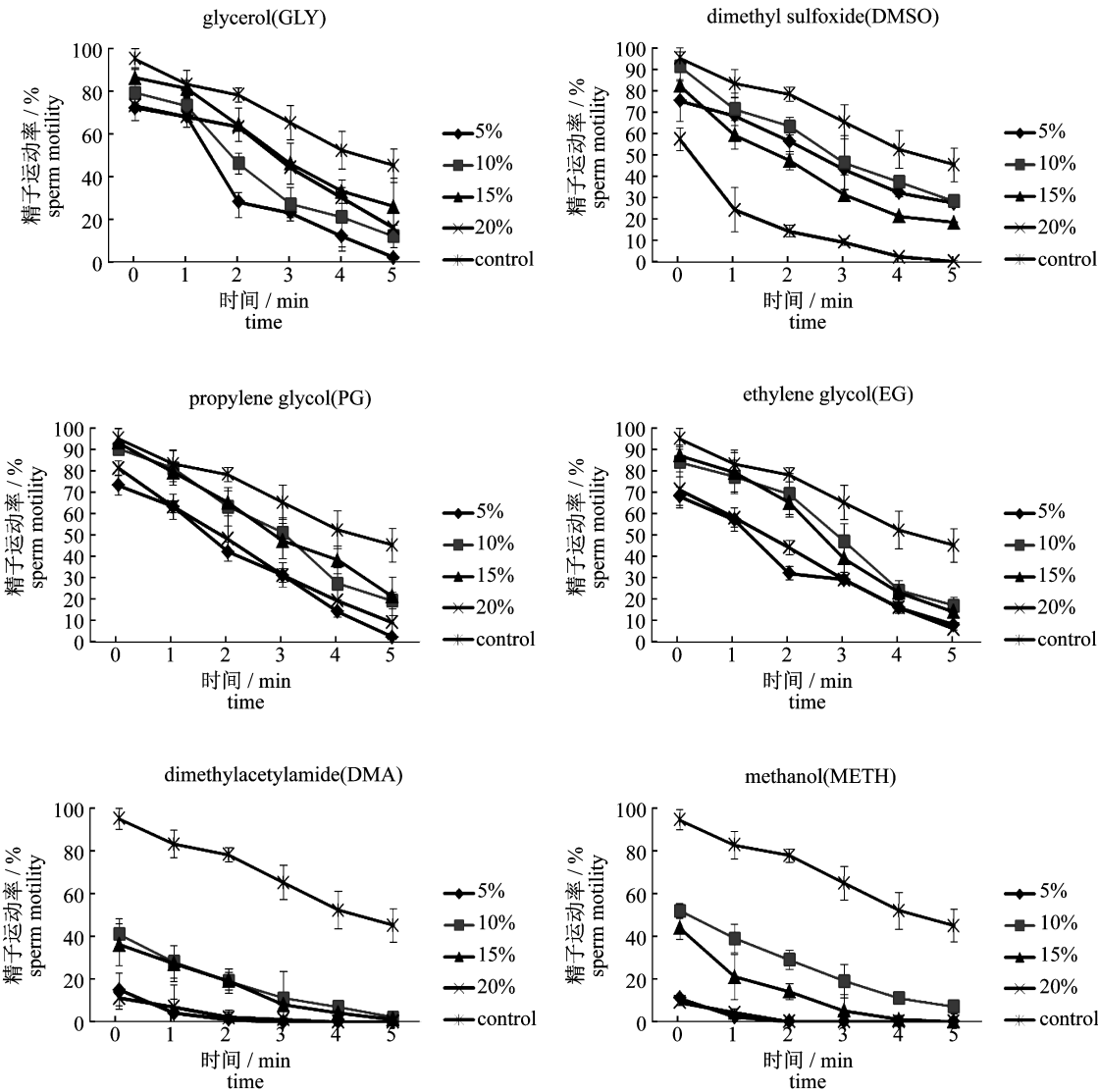


图 3 不同抗冻剂激活后对精子运动率影响
Fig.3 Different cryoprotectants in different concentrations on sperm motility

3 讨论

3.1 抗冻剂种类和浓度对精子运动率的影响

渗透性抗冻保护剂主要是通过渗入精子细胞内部,调节精子细胞渗透压,降低精子的冰点,减少冰晶损伤的方式起到保护精子的作用^[13]。不同鱼

类的最适抗冻保护剂种类不同^[14],常用的抗冻保护剂主要有甘油 (GLY)、二甲基亚砷 (DMSO)、二甲基乙酰胺 (DMA)、乙二醇 (EG)、丙二醇 (PG)、甲醇 (METH) 等。其中 DMSO 水溶性好、渗透速度快、毒性低,在冷冻过程中能有效保护大菱鲆、真鲷、条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 等精子免受冷冻

损伤,具有较好的冷冻保存效果。GLY 有良好的吸水性并能自由通过细胞膜,有利于保持细胞水分和稳定渗透压,但 GLY 在水中的加入量会影响冰晶的结构,加入量越多,液体粘性越强、热传导越快,针形冰晶越钝^[15-16]。GLY 在白鲑(*Coregonus clupeaformis*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的精子冷冻保存中应用效果较好。PG 毒性小,在大西洋鳕(*Gadus morhua*)、夏鲱(*Paralichthys dentatus*)等鱼类精子冷冻保存中应用效果较好,在淡水鱼类精子冷冻保存中应用较广泛的是 METH^[17]。抗冻保护剂浓度亦是影响精液冷冻保存的一个重要因素,抗冻保护剂对鱼类精子会产生一定毒性^[18]。有研究表明,抗冻保护剂的浓度越高,对精子的毒性作用越强。在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)中,当抗冻剂 DMSO 的浓度为 10%~12% 时,精子存活时间不到 2 h,而当浓度为 8% 时,精子存活可超过 3 h^[19]。本实验通过对甘油(GLY)、丙二醇(PG)、二甲基亚砷(DMSO)、乙二醇(EG)、甲醇(METH)和二甲基乙酰胺(DMA)6 种抗冻剂的筛选发现:GLY、DMSO、PG、EG 均对条纹锯鲈精子具有较好的冷冻保存效果,其中采用 10% DMSO、10% PG 及 15% PG 解冻后条纹锯鲈精子运动率较高,解冻后精子运动率达到 90% 以上,15% PG 作为抗冻保护剂冷冻保存的精子解冻后运动率最高,与鲜精差异不显著($P > 0.05$)。从实验结果可以看出,15% PG 作为抗冻保护剂的精子具有最高的运动率。PG 作为一种渗透性的小分子物质,作为抗冻剂,具有渗透速度快,毒性小等特点,主要通过渗入精子细胞内部,发生部分水合作用结合水分子,增加抗冻液的粘性,弱化水的结晶过程,保护精子不受冷冻损伤。抗冻保护剂的使用浓度对其渗入细胞的能力影响不同。15% PG 在条纹锯鲈精子的冷冻过程中,既能够有效降低冰点,防止大冰晶的产生,避免冷冻和解冻过程中细胞死亡,又不会因抗冻保护剂本身所具有的毒性对精子造成损伤,是一种较为适宜的浓度。

3.2 抗冻剂种类和浓度对精子运动速度的影响

精子运动速率是评价精子质量的一个重要的指标,采用计算机辅助精子分析系统(CASA)检测精子质量的方法已广泛应用于受精生物学的研究中^[20],CASA 主要用于分析精子激活后精子平均直线速度(VSL)、平均曲线速度(VCL)、平均

路径速度(VAP)等指标,能够方便、快捷地统计分析精子运动状态,评价精子质量^[21]。本实验中,15% GLY、10% DMSO、10% PG 及 15% PG 实验组精子运动速率显著高于其他实验组($P < 0.05$),其中 15% PG 作为抗冻保护剂的冻精解冻后其各项运动速度与鲜精差异不显著($P > 0.05$)。冻精受精率和孵化率与精子运动速率呈正相关。精子的运动主要是由鞭毛系统控制的,鞭毛含有 ATP 酶,提供了精子运动的动力,诱导精子运动主要与离子浓度、pH 和渗透压有关。条纹锯鲈精子冷冻后造成部分鞭毛、线粒体结构受损,最终导致运动速率的下降,不同浓度和种类的抗冻剂对精子鞭毛、线粒体结构的保护作用不同造成解冻后精子运动速率的差异。精子在冷冻保存及复温复活的过程中,不可避免地会造成部分精子结构的损伤,这其中包括线粒体和鞭毛的损伤,导致精子功能紊乱。线粒体和鞭毛在精子运动过程中起着重要作用,线粒体提供能量,促使鞭毛摆动。精子激活后,依靠尾部鞭毛的摆动而运动。优良的抗冻保护剂在适宜的浓度下,能够有效地保护精子线粒体及鞭毛,保证其激活后的运动性能。

3.3 不同浓度和种类抗冻剂激活时间对精子运动率的影响

精子激活时间指精子从开始运动到运动停止的时间。在此过程中精子运动率呈逐渐下降的趋势。鱼类精子的运动时间受线粒体和鞭毛的控制,不同种鱼类精子激活后运动时间不同,其激活后运动率的变化也不尽相同。海水鱼类精子的运动多呈暴发式,大多是从几十秒钟到几分钟不等,如大菱鲆精子运动时间为 1 min 左右^[8],点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)精子海水中激活后运动时间为 10 min 左右^[24]。随着运动时间的延长,精子运动率呈现下降趋势,其结构亦发生一系列变化,如细须石首鱼(*Ctenosciaena gracilicirrhus*)的精子在高渗透压的人工海水中运动 5 min,精子的线粒体逐渐膨胀,最后破裂,精子也终止运动^[25]。鱼类精子激活时间受内、外不同因素的影响,内因主要包括亲鱼的种类、年龄、性腺发育状况等,外因主要包括精子所处水环境的渗透压、离子组成、pH 值、温度等。海水鱼类精子运动时间较短,这就要求精子激活后必须在较短时间里找到卵子并顺利进入受精孔才能受精^[22]。

Kime 等^[23]指出,大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 精子激活后运动时间若小于 30 s,受精率会显著降低。在评价精子质量时,若精子激活后运动时间较长,可以弥补精子运动率不高等缺陷。因此,在评价精子质量的过程中,精子的激活时间也是一项重要的指标,本实验采用 CASA 直接测定精子激活后的运动时间,发现条纹锯鲷在 PG、DMSO 及 GLY 作为抗冻保护剂时,当浓度为 10%~15%,较短时间内(<1 min)精子活力下降不明显,对比抗冻保护剂种类及其浓度对条纹锯鲷精子激活后运动率的影响,精子激活后运动率的变化,可以作为精子活力的一项指标,指示精子活力的大小,进而反映精子冷冻保存的效果,具有一定的生产实践价值。

参考文献:

- [1] Stuart K R, Smith T I J. Development of nursery systems for black sea bass *Centropristis striata* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2003, 34 (3): 359 – 367.
- [2] Wang B, Zhu M Y, Mao X H. A new species for culture-black seabass (*Centropristis striata*) [J]. Hebei Fisheries, 2003 (5): 26 – 27. [王波, 朱明远, 毛兴华. 养殖新品种—美洲黑石斑鱼. 河北渔业, 2003 (5): 26 – 27.]
- [3] Liu Q H, Li J, Ding F H, et al. Use CASA analysis and detection cryopreservation of *Pagrus major* sperm [J]. Progress in Natural Science, 2006, 16 (9): 1181 – 1185. [刘清华, 李军, 丁福红, 等. 运用计算机辅助分析检测超低温保存的真鲷 (*Pagrus major*) 精子的质量. 自然科学进展, 2006, 16 (9): 1181 – 1185.]
- [4] Chen Y K, Liu Q H, Zhao C Y, et al. Quality change of *Pagrus major* sperm after long-term cryopreservation [J]. Marine Sciences, 2010, 34 (6): 50 – 54. [陈亚坤, 刘清华, 赵春彦, 等. 长期超低温保存后真鲷精子的质量变化. 海洋科学, 2010, 34 (6): 50 – 54.]
- [5] Chen Y K, Liu Q H, Li J, et al. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm [J]. Cryobiology, 2010, 61 (2): 189 – 193.
- [6] Liu Q H, Li J, Zhang S C, et al. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2006, 37 (3): 289 – 297.
- [7] Ye T, Zhu J Q, Yang W X, et al. Sperm cryopreservation in *Sparus macrocephalus* and DNA damage detection with SCGE [J]. Zoological Research, 2009, 30 (2): 151 – 157. [叶霆, 竺俊全, 杨万喜, 等. 黑鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的 SCGE 检测. 动物学研究, 2009, 30 (2): 151 – 157.]
- [8] 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.
- [9] Zhang Y Z, Zhang S C, Liu X Z, et al. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology [J]. Theriogenology, 2003, 60 (5): 989 – 996.
- [10] Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, et al. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant [J]. Theriogenology, 2010, 74 (2): 282 – 289.
- [11] Tian Y S, Chen S L, Ji X S, et al. Cryopreservation of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* sperm [J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30 (6): 97 – 102. [田永胜, 陈松林, 季相山, 等. 半滑舌鲷精子冷冻保存. 渔业科学进展, 2009, 30 (6): 97 – 102.]
- [12] Hanks J H. Hanks' balanced salt solution and pH control [J]. Methods in Cell Science, 1975, 1 (1): 3 – 4.
- [13] Chen S L. Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos [J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26 (1): 161 – 168. [陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望. 水产学报, 2002, 26 (1): 161 – 168.]
- [14] Comizzoli P, Songsasen N, Hagedorn M, et al. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species [J]. Theriogenology, 2012, 78 (8): 1666 – 1681.
- [15] Dai T R, Zhao E H, Lu G, et al. Sperm cryopreservation of yellow drum *Nibea albiflora*: A special emphasis on post-thaw sperm quality [J]. Aquaculture, 2012, 368 – 369: 82 – 88.
- [16] Groison, Anne-Laure, Suquet, et al. Sperm motility in European hake, *Merluccius merluccius*, and characterization of its spermatozoa concentration and volume, spermatocrit, osmolality and pH [J].

- Aquaculture, 2010, 301 (1-4): 31-36.
- [17] Chen S L, Liu X T, Lu D C, *et al.* Cryopreservation of spermatozoa of silver carp, common carp, blunt snout bream and grass carp [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1992, 38 (4): 413-424. [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. *动物学报*, 1992, 38 (4): 413-424.]
- [18] Chen S L. Theory and techniques of fish spermatozoa and embryos cryopreservation [M]. China agriculture Publishing House, 2007: 31. [陈松林, 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 2007: 31]
- [19] Yang A G, Wang Q Y, Kong J, *et al.* studies on spermatozoa cryopreservation of scallops, *Patinopecten yessonesis* and *Chlamys farreri* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30 (6): 624-628. [杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究. *海洋与湖沼*, 1999, 30 (6): 624-628.]
- [20] Liu L, OTOMAR Linhart, Wei Q W, *et al.* Comparative study of activating mediums for sperm of several sturgeons using CASA [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31 (6): 711-720. [柳凌, OTOMAR Linhart, 危起伟, 等. 计算机辅助对几种鲟鱼冻精激活液的比较. *水产学报*, 2007, 31 (6): 711-720.]
- [21] Liu Q H, Li J, Xiao Z Z, *et al.* Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*) [J]. *Aquaculture*, 2007, 263 (1-4): 20-25.
- [22] Zhou D G, Wen A X. The sperm motility and initial stages of penetration of sperm into eggs in *Monopterus albus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 27 (5): 398-402. [周定刚, 温安祥. 黄鳝精子活力检测和精子入卵早期过程观察. *水产学报*, 2004, 27 (5): 398-402.]
- [23] Kim J D, Kaushik S J. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1992, 106 (2): 161-169.
- [24] Wang X G, Luo J, Yin S W, *et al.* Investigation of spermatozoa motility of *Epinephelus malabaricus* and comparison of the spermatozoa ultrastructure before and after ultra-low temperature freeze [J]. *Marine Sciences*, 2013, 37 (2): 70-75. [王小刚, 骆剑, 尹绍武, 等. 点带石斑鱼的精子活力及超低温冷冻前后精子超微结构的比较. *海洋科学*, 2013, 37 (2): 70-75.]
- [25] Gwo J C. Ultrastructural study of osmolality effect on spermatozoa of three marine teleosts [J]. *Tissue and Cell*, 1995, 27 (5): 491-497.

Cryopreservation for spermatozoa of *Centropristis striata*

HAN Longjiang^{1,2}, LIU Qinghua², GUAN Shuguang³, JI Liqin¹, WEN Haishen^{1*}, LI Jun^{2*}

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Mariculture Institute of Shandong Province, Qingdao 266002, China)

Abstract: In order to establish *Centropristis striata* sperm cryopreservation method, this paper used a computer – assisted sperm motion analysis system (CASA), and selected six cryoprotectants, such as glycerin (GLY), dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol (PG), ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMA), methanol (METH) at four concentrations (5%, 10%, 15% and 20%, V/V) in HBSS to find the influence of *C. striata* sperm cryopreservation. Results showed that the best cryopreservation protocol for *C. striata* was 15% PG as antifreeze protective agent in HBSS with step cooling scheme. After 37°C water bath thawed, motility of the sperm reached $(93.1 \pm 0.9)\%$, which was higher than other combination groups and showed no significant difference with fresh sperm ($P > 0.05$). The group of 15% PG performed best in average linear velocity, average velocity, and average path velocity at $(88.3 \pm 0.3) \mu\text{m/s}$, $(76.2 \pm 0.5) \mu\text{m/s}$, and $(86.7 \pm 0.7) \mu\text{m/s}$, which showed no significant difference with fresh sperm ($P > 0.05$). In different cryoprotectants with different concentration, the motility of 15% PG within 1 min had no significant difference with fresh semen. Therefore, 15% PG was the best cryoprotectant for *C. striata* and could be applied in practice.

Key words: *Centropristis striata*; sperm; cryopreservation; cryoprotectant; concentrations, computer-assisted sperm motion analysis system (CASA)

Corresponding author: LI Jun. E-mail: junli@qdio.ac.cn;

WEN Haishen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn