



鱼类精液超低温冷冻保存研究进展*

ADVANCE IN CRYOPRESERVATION OF FISH SPERMATOZOA

张 轩 杰

湖南师范大学生物系

Zhang Xuanjie

(Department of Biology, Hunan Normal University)

鱼类精液超低温冷冻保存研究是从五十年代开始的,经过三十年的努力已取得很大成就。国外的主要是在海水鱼类和鲑科鱼类中开展的,并在某些鱼类,如鳕鱼、虹鳟、鲑鱼、大马哈鱼等的精液冷冻保存中获得成功。不少学者还对精液冷冻的原理,冷冻保存的技术环节如稀释液的配制、抗冻剂的种类及浓度、降温平衡、冷冻速度及保存方法等进行了较为详细的研究。我国在鱼类精液超低温冷冻保存方面的工作开展得比较晚。近年来,广东、广西和新疆等地对草、鲢、鳙、鲮等鱼的精液冷冻保存作了一些工作,也取得初步成效。本文拟就鱼类精液冷冻保存的原理、技术方法以及研究的主要成果作一综合评述,供国内同仁参考。

精液超低温冷冻保存的基本原理

鱼类精子是一种分化程度很高的细胞,精子排出体外后,很少利用外界的能量。在活动状态下,精子本身所贮存的能量很快就会消耗掉,直至丧失运动能力,最终死亡。所以,要长期保存鱼类精子,必须减少和停止精子的能量消耗,亦即停止精子的运动和代谢活动。这种抑制作用在给予适当条件后,又能立即解除,以恢复精子的活动能力。

降低温度是减少精子运动的有效途径之一。零度以上的低温保存,虽然能降低精子的代谢活动,延长精子的存活时间,但精子的活动和代谢没有完全停止,能量仍在消耗。因此,保存的时间是非常有限的,只能达到几天至十几天的短期保存。

精子在超低温(-196°C)条件下,其运动和代谢活动完全停止,精子处于假死状态,但其结构完整,生命以静止状态保存下来。精液的成份大部分是水,精液超低温冷冻保存在很大程度上取决于水的性质。温度低于精液冰点时,水开始结冰,冰点至 -60°C 是形成有序状态冰晶的温度区。细胞内冰晶的形成会机械地损伤细胞的结构;细胞外结冰会导致细胞失水,引起细胞收缩变形。当温度低于 -60°C 时,有序状态冰晶的形成减少,水分子运动能力减弱;当温度低于 -130°C 时,水分子停止运动,保持原来的无序状态,形成坚硬、均质的团块结构,这种现象称为玻璃化^[1]。玻璃化状态的精子,不会出现原生质的

*本文承刘筠教授审阅,谨致谢意。

严重脱水,细胞结构完整,精子解冻后即可恢复运动能力。因此,精液超低温冷冻保存的原理在于:通过添加一定的防冻保护剂,防止细胞在冷冻过程中的严重脱水和低温打击,避免细胞内冰晶的形成。采用适当的冷冻速度,使精子安全越过冰晶形成区,进入玻璃化状态,以达到长期保存的目的。但这种玻璃化状态是不稳定的,如温度回升到 -60°C 以上时,会发生次级重结晶现象^[17]。因此,冷冻精液需置液氮中长期保存。

鱼类精液超低温冷冻保存的技术方法

鱼类精液超低温冷冻保存技术主要包括稀释液的配制、降温平衡、冷冻速度和保存方法、以及冷冻精液的解冻等过程。

1. 稀释液的配制 鱼类精液在零度以上($0-10^{\circ}\text{C}$)的低温条件下,不经稀释也能保存一段时间。例如,鲤鱼(*Cyprinus carpio*)精液在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 时可保存14天^[11]。但鱼类精液在超低温条件下,不经稀释难以获得存活的精子。因此,鱼类精液的超低温冷冻保存需要添加适当的稀释液,以保护精子免受低温的突然打击和损伤。

鱼用稀释液包括基础溶液和抗冻剂两部分。稀释液的配制至今没有一个统一的理论依据,大都是凭经验去探索,因而不可避免地会出现一些盲目的做法。Withler F. C. 等(1967)分别以驼背马哈鱼(*Oncorhynchus gorbuscha*)、大马哈鱼(*O. keta*)、银马哈鱼(*O. kisutch*)等的精浆作稀释液,冷冻保存各自的精子,效果很差^[14]。同样,大鳞大马哈鱼(*O. tshawytscha*)的精浆和卵巢液,都不适合用作冷冻保存其精子的稀释液^[16]。Graybill J. R. (1969)曾配制由27种成份组成的稀释液冷冻保存虹鳟(*Salmo gairdneri*)精液,也未获得成功^[21]。Truscott B. (1969)根据大西洋鲑(*S. salar*)精液成份配制的稀释液包括NaCl、KCl、 NaHCO_3 、果糖、甘氨酸等九种成份,冷冻保存大西洋鲑精液,冻精受精率很低^[22]。1971年Ott A. G. 等通过对几种马哈鱼的精液冷冻保存研究后,设计了OH-235、OH-251、OH-275三种稀释液,其成份包括NaCl(0.85%)、 NaHCO_3 (0.375—0.5%)和磷酸(0.5—1.5%)三种。用这些稀释液保存驼背马哈鱼、银马哈鱼、大鳞大马哈鱼等的精液获得成功^[25]。Mounib M. S. 等(1978)用由 KHCO_3 (1%)、还原谷胱甘肽(2%)和蔗糖(4.27%)组成的稀释液冷冻鳕鱼(*Gadus morhua*)和大西洋鲑精液,获得近似对照组的冻精受精率^[24]。有的学者证明,海水鱼类用由葡萄糖和柠檬酸钠组成的稀释液就能获得良好的冷冻效果^[18]。由此看来,鱼类精液的冷冻保存并不需成份复杂的稀释液,非常简单的稀释液配方就能获得良好的冷冻效果。

已经应用过的鱼类精液冷冻保存稀释液成份种类很多。主要有盐类(如 NaHCO_3 、NaCl、 KHCO_3 、柠檬酸钠等)、糖类(如葡萄糖、果糖、蔗糖等)、脂类(主要是磷脂)和蛋白质(如卵黄、牛奶、小牛血清等)、以及其他微量添加剂(如甘氨酸、抗生素等)。这些物质在精液冷冻保存中的作用,目前尚不十分清楚。一般认为,NaCl浓度在200毫摩尔以下时,能起到维持精子细胞渗透压的作用,而对精子无毒害; K^+ 能抑制精子的运动; NaHCO_3 等有一定的缓冲能力,能维持稀释后精液pH值的稳定性;脂类和蛋白质能在精子细胞外形成一层保护膜;糖类主要是一种能源物质^[29]。但鱼类精子排出体外后,能否利用外界的能源物质,目前尚无定论。

组成稀释液的另一主要成份是抗冻剂。鱼类精液冷冻保存中,采用的抗冻剂主要有甘油和二甲亚砜(DMSO)两种。甘油被广泛应用于家畜和海鱼类的精液冷冻保存,并被证明是一种有效的抗冻剂。Blaxter J. H. (1953)^[11]冷冻太平洋鲱(*Clupea harengus*)、Mounib M. S. 等(1968)冷冻鳕鱼、Pullin (1972)冷冻黑鲷(*Pleuronectes platessa*)等鱼的精液,分别采用了12.5%、23.8%和17%的甘油作抗冻剂^[20]。但甘油对于其他淡水鱼类精液的冷冻保存,抗冻效果不佳。而DMSO是目前发现的,最有效的淡水鱼类精液冷冻抗冻剂。例如,冷冻大西洋鲑(Truscott, 1969)、大鳞大马哈鱼和银马哈鱼(Ott等, 1971)、虹鳟(Stoss, 1978)、褐鳟(*Salmo trutta*)(Stein, 1978, 1979)等鱼类精液,以及卢敏德等(1981)

冷冻家鱼、王祖昆等(1984)冷冻家鱼和鲮鱼(*Cirrhina molitorella*)精液等都是用 DMSO 为抗冻剂。稀释液中加入抗冻剂的量不尽一致。Kebby J. H. (1983)^[18]在冷冻条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)时,采用浓度为 5% 的 DMSO;而岩桥正雄(1979)^[6]冷冻锦鲤(*Cyprinus carpio*, variety)精液时, DMSO 的用量高达 65%;Horton H. F. 等(1976)通过对虹鳟、大鳞大马哈鱼精液冷冻进行深入的研究后指出,10% 的 DMSO 是一个高度有效的浓度,既能起到良好的抗冻作用,又不会因抗冻剂浓度过高而导致精子中毒。这一浓度现被许多研究者所采用。甘油和 DMSO 在抗冻效果上的差异可能是由其本身性质的差异造成的。McGann H. (1978)指出,甘油渗透能力弱,短时间的平衡主要起细胞外的抗冻作用^[20]。甘油具有亲水性,并能降低原生质冰点至 -35°C ,因而可以减少细胞内冰晶的形成^[19]。但甘油既有保护精子的一面,也有损伤精子的一面。据电镜观察,甘油可造成公牛精子顶体和颈部的损伤,尾部弯曲,精子缩短等现象^[1]。DMSO 渗透能力强,亲水性强,能与电解质螯合从而降低细胞内电解质浓度;并有细胞内保水,降低原生质冰点至 -45°C 等优点^[20]。故有优于甘油的抗冻效果。

稀释液的用量是在试验的基础上确定的,精液与稀释液比例多在 1:3 至 1:9 之间。有的研究者采用 1:4 (Ott 等, 1971a; Graybill, 1969; Truscott, 1969);有的采用 1:9 (Idler 等, 1969; Ott 等, 1971b);而有的则采用 1:3 (Stein 等, 1976; Mounib, 1978)和 1:1 (Stoss, 1978)^[20]。1977 年, Moczarski M.^[23]在冷冻鲤鱼(*Cyprinus carpio*)精液时发现,稀释比为 1:1 或 1:2 时,精子的生活力比 1:6 时强。Sin (1974)^[6]冷冻鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鳊鱼(*Aristichthys nobilis*)精液时,亦有类似结果。

稀释液的配制是鱼类精液冷冻保存中的关键一环。稀释液的适合与否直接影响到冷冻结果。不同种类的鱼,精子生理特性有差异,因而对稀释液成份和浓度有不同要求。总的说来,稀释液的配制应以下述几点为原则:1)稀释液成份应对精子无毒害;2)稀释液应无激活精子的作用,精液稀释后,精子应保持原来的静止状态;3)稀释液应具有营养精子、增强精子抗冻能力的作用;4)稀释液成份应尽可能简单些。

2. 稀释后的降温平衡 鱼类精液稀释后是否需要放置在低温($0-10^{\circ}\text{C}$)环境中平衡。目前尚无定论。从现有的文献中可看到三种不同的做法:1)混合之前置 4°C 条件下预冷一段时间,冷冻时再按一定比例稀释;2)精液在室温下稀释后置低温下平衡;3)稀释后立即冷冻。家畜和人类的精液冷冻保存中,已证明需要一段时间的平衡。在海水鱼类和鲑科鱼类精液冷冻保存的早期研究中,大都采用平衡一段时间的做法。例如,Blaxter J. H. (1953)冷冻太平洋鲱精巢、Mounib M. S. (1968)冷冻鳊鱼精液、Truscott B. (1969)冷冻鲑鱼精液时都平衡 $\frac{1}{2}-2$ 小时。1971 年, Ott A. G. 等在研究大鳞大马哈鱼、虹鳟等鱼的精液冷冻后认为, DMSO 穿透力强,精液稀释后无需造成任何平衡^[26]。此后,许多学者在鲑鱼、褐鳟等的精液冷冻中进一步证实了这一观点。但是,我国一些研究者在冷冻草鱼(*Otenopharyngodon idellus*)、鲢鱼、鳊鱼及鲮鱼精液时,都平衡一段时间,并取得较好效果。Chao, N-H (1975)在冷冻热带的鲮鱼(*Mugil cephalus*)精液时,平衡时间为 1 小时^[9]。平衡的需要与否可能与鱼类的地理分布有关。Ott A. G. 等研究的是冷水性的鲑科鱼类,这些鱼在水温较低的环境中能自然交配繁殖,有可能这类鱼的精子比温水性鱼类精子的耐寒能力强。并且,大多数研究者在处理精液时,是在 4°C 至 8°C 的条件下进行的,实际上起到了降温平衡的作用。对于热带、亚热带的鱼类精液冷冻来说,一定的平衡时间有利于稀释液、抗冻剂等充分渗入到细胞内。同时,使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。

3. 冷冻保存方法 现行的鱼类精液冷冻方法,还处于尚未定型的实验阶段。基本作法有三种:1)麦细管冷冻法;2)安瓿瓶冷冻法;3)小丸颗粒冷冻法。Moczarski M. (1977)、Stein. H. (1979)等采用方法 1);Ott A. G. 等(1969、1971)、Withler F. C. (1974)等采用方法 2);Stoss J. (1978)^[20]、

(1) 杨再等, 1978. 公牛精液冷冻的若干原理. 河南农林科技, 4:39-42.

卢敏德等(1981)则采用方法3)。前两种方法的优点是可避免精液与冷冻剂直接接触。但安瓿瓶法体积较大,降温不易均匀,且瓶口或管端需封口,操作比较复杂。第三种方法是将精液直接滴入干冰(-79°C)孔内,冻成精液小颗粒后转移到液氮中长期保存。近年来,又发展了用液氮蒸气冷冻精液小颗粒的方法,操作更为简便。此法冷冻速度较快,但比较固定。

许多学者对超低温冷冻保存的最适冷冻速度作了大量的研究工作。所采用的材料不同,其最适冷冻速度的大小不一样,且变化范围很大。例如,冷冻小鼠胚胎的最适速度为 $0.3-0.8^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ ^[22],而冷冻保存红细胞则高达 $3000^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ ^[21]。在鱼类精液冷冻保存中,大都采用分步降温法:1)用 $1^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 降温至 -30°C ,再以 $5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 冷冻至 -120°C (Graybill等,1969);2)用 $5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 降温至 -80°C (Hoyle等,1968);3)以 $30^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 冷冻至 -79°C 后,转移到液氮中保存(Ott等,1971;Stein等,1976、1978;Mounib,1978等)。一般来说,精子原生质浓度比介质浓度高,导致原生质冰点比介质低。并且由于细胞膜的存在,精子细胞原生质可保持 $-10-15^{\circ}\text{C}$ 的超冷状态,即使介质开始结冰,原生质仍能以液态状态存在^[17、18]。慢速冷冻时,介质中的水首先结冰,使细胞内水份外渗,细胞失水以维持细胞内外水份的平衡。如果停留在这一阶段的时间太长,将导致细胞严重脱水,精子细胞收缩变形。另外,水份的丧失会引起细胞内电解质浓度升高。反之,冷冻速度过快时,细胞内的水份来不及外渗就被冻结成冰,冰晶的形成会给精子造成严重的机械损伤。同时,冷冻速度过快,还会造成结合热的积累,使精子热休克致死^[21]。因此,精液冷冻时,采用的冷冻速度既要防止精子细胞的过度脱水,又要避免细胞内冰晶的形成和结合热的积累。在鲑科鱼类精液冷冻保存中证明,鱼类精液冷冻采用 $30^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 的冷冻速度比较适当。

最适冷冻速度的确定是一个十分复杂的问题。它受稀输液和抗冻剂的浓度、细胞膜的透性、以及细胞体积和表面积的大小等因素的影响。例如,在过氧化物酶的冷冻保存中,当NaCl浓度为 10mM 时,最适冷冻速度为 $0.5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$;NaCl浓度升高到 81mM 时,最适冷冻速度为 $20^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ ^[33]。同样,以5%的甘油作抗冻剂保存红细胞,其最适冷冻速度为 $1000^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$,当甘油浓度升高到20%时,最适冷冻速度为 $10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ ^[31]。此外,细胞膜渗透能力越强,细胞表面积越大,所要求的最适冷冻速度越大,红细胞的冷冻就是如此。反之,细胞膜渗透性越差,细胞体积越大,则最适冷冻速度越小,如动物卵子和胚胎的冷冻。鱼类精液冷冻保存最适冷冻速度的确定,需要对鱼类精子细胞的生物学特性如细胞膜的透性、细胞体积与表面积之间的关系等进行更深入的研究。

4. 冷冻精液的解冻 解冻是将冰态的精子升温融解,使精子复苏的过程。对于精液冷冻后如何融化,以期获得最高复苏率的问题,所做的工作不多。解冻的关键因素是解冻液和解冻速度。鲑鱼、黑鲟等海水鱼类的冷冻精液一般用海水就可解冻,而淡水鱼类冷冻精液解冻液的使用则比较混乱。Stein H.等(1978)、卢敏德等(1981)应用0.7%的NaCl作解冻液;有的则用鱼用任氏液(Brian等,1932)和 NaHCO_3 (Stein等,1980)解冻。许多用安瓿瓶冷冻法和麦细管冷冻法保存精液的学音,不用解冻液而直接将小瓶(或小管)浸入水浴中解冻(Kurokura等,1980;Ott等,1971;Mounib,1978)。Stoss J. W.和Holtz W.(1981)比较了 NaHCO_3 、NaCl、KCl、体液、精浆及无DMSO的稀释液的解冻效果。结果表明,体液、 119mM NaHCO_3 和 120mM NaCl 的解冻效果最好^[29]。

解冻速度是一个复杂的因素。它与解冻液的初始温度、冻精与解冻液的比例、冻精的体积和水浴的温度均有密切关系,故解冻速度难以准确测定和控制。在鲑科鱼类的精液冷冻保存中,大都采用 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的温度解冻(Truseott,1969;Stein等,1978)。Pullin(1972)则在 10°C 的水浴中解冻黑鲟精液;而Mounib M. S.(1978)、卢敏德等(1981)分别采用 33°C 、 $24-40^{\circ}\text{C}$ 的解冻温度。Kebby J. H.(1983)在条纹狼鲈的冻精解冻试验中认为,快速($50-60^{\circ}\text{C}$)解冻与慢速($15-18^{\circ}\text{C}$)解冻的受精率无显著差异。而Ott A. G.(1975)^[26]则认为快速解冻要比慢速解冻好。Horton等(1976)主张,在冻精中加 $0.5\text{ml } 7-8^{\circ}\text{C}$ 的水后,将安瓿瓶置 $50-60^{\circ}\text{C}$ 的水浴中摇匀,待只剩一点冰屑时,立即取出与卵子受精。目前比较一致的看法是,鱼类冻精要采用较快的速度解冻,使精子迅速通过 $0-60^{\circ}\text{C}$ 的冰晶形成区。在 $30-40^{\circ}\text{C}$ 的水浴中解冻可达到快速解冻的目的。

鱼类精液超低温冷冻保存的研究成就

保存鱼类精液的尝试早在十九世纪就开始了。早期的研究都是零度以上的短期低温保存。从本世纪五十年代开始,人们开始进行精液冷冻保存的研究,以便达到长期保存的目的。但当时这项技术的研究应用仅限于家畜精液的冷冻保存,鱼类精液的冷冻保存没有受到人们的重视。这一时期的工作开展不多。Blaxter J. H. (1953)首次作了冰冻保存太平洋鲱精巢的试验,并获得成功。用于冰(-79°C)保存6个月的精巢解冻授精,获得80%的受精率。Sneed K. E.等(1956)用蛙以任氏液在-73°C保存鲤鱼精液60小时,冻精复苏率为20%,但未进行授精试验^[15]。六十年代后,由于鱼类养殖业的迅速发展,杂交育种、优良品种的选育利用与提纯复壮等工作的开展,迫切需要有长期保存鱼类精液的可靠方法。于是,鱼类精液冷冻保存研究逐步开展起来。Horton H. F.等(1967)首次用冷冻保存的鲑鱼(*Salmonid*)精液授精获得受精率。Hoyle R. J.等(1968)冷冻大西洋鲑精液至-25°C,解冻授精获得12%的受精率。Mounib M. S. (1968)用冷冻保存7天(-79°C)和保存30天(-196°C)的鳟鱼精液授精,分别获得60—65%和80—89%的受精率^[29]。Pullin R. S. (1972)液氮保存黑鲷精液315天,冻精受精率为20—39%^[63]。七十年代后,鱼类精液冷冻的重点已从海水鱼类转移到鲑科鱼类。Ott A. G.等(1971)对大鳞大马哈鱼、银大马哈鱼和虹鳟精液进行了冷冻保存研究,液氮保存7天后,受精率分别为16—38%,1%和59%。1975年,他们用改进的OII-235、OH-210和OH-275号稀释液继续进行冷冻保存马哈鱼精液的研究,5种马哈鱼冻精受精率达29—83%。Withler F. C. (1974)用这几种稀释液保存驼背马哈鱼、褐鳟(*Salmo trutta*)等4种鱼的精液亦获得成功,冻精受精率达44—85%^[15]。随后,Stein, H.等(1976)冷冻虹鳟精液,获得78%的受精率;冷冻褐鳟和河鳟(*Salvelinus fontinalis*)精液(1978)^[27],获得的受精率分别为41%和27%。Mounib M. S. (1978)冷冻保存大西洋鲑精液,液氮保存一年后,受精率为80%。Frdahl D. H.等(1978)冷冻鲑鱼精液,获得大于90%的受精率。1982年Brian, II.^[61]等以甲醇作抗冻剂,冷冻保存斑马鱼(*Brachydanio rerio*)精液,获51%的受精率。Hara, S.等(1982)冷冻遮目鱼(*Chanos chanos*)精液,冻精受精率达67.9%^[12]。现将一些海水鱼类和鲑科鱼类精液冷冻的主要结果列入表1。

由上可知,海水鱼和鲑科鱼的精液冷冻保存已取得较大成功。但其他淡水鱼类的精液冷冻保存的研究资料不多。Sin (1974)^[65]冷冻鳊鱼精液,获2.7—5.7%的受精率。Moczarski M. (1977)液氮保存鲤鱼精液,冻精受精率为47.9%。岩桥正雄(1980)冷冻锦鲤精液,解冻授精获45.1%受精率。Hisashi-K. (1984)^[14]液氮保存鲤鱼精液342天,冻精受精率为25.5—31.5%。近年来我国在家鱼精液冷冻保存中开展了一些工作,取得初步成效。卢敏德等(1981)^[13]冷冻保存草、鲢、鳙三种鱼的精液,冻精受精率分别为23.9%、50%、80.5%,孵化率为9.8—13.7%、40%和11.7—25%。王祖昆等(1984)^[21]用液氮保存60—90天的草、鲢、鳙、鲮四种鱼的冷冻精液授精,分别获得44.2%、32.6%、16.5%和31%的受精率。除上述外,尚未见到其他淡水鱼类精液冷冻保存研究的报道。现将一些淡水鱼类精液冷冻保存的主要研究结果列入表2。

总 结

综上所述,超低温冷冻保存鱼类精液,冻精受精率达到或接近常精受精的水平是完全可能的。目前,鳊鱼、鲢鱼、马哈鱼和虹鳟等海水鱼和鲑科鱼类的冻精受精率达70—80%,有的甚至超过90%。除此之外,其他淡水鱼类包括鲤鱼、草鱼、鲢鱼和鳊鱼等的精液冷冻保存,也取得一定进展。但是,与海水鱼类和鲑科鱼类的研究成果相比还有很大差距。冷冻保存技术尚未完全过关,冻精受精率、孵化率都较低,还没有达到生产实践应用的水平。

表1 海水鱼和鲑科鱼的精液冷冻保存
Table 1. Cryopreservation of marine and salmonid fish sperm.

种类 Species	稀释比 Dilution ratio	冷冻方法 Technique	平衡时间 (分) Equil. time	冷冻速度 Freezing rate	保存温度 Storage temp.	保存时间 Storage time	受精率 Fert. rate of F.S.	对照 Control	作者 Authors
太平洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	1:4	V*	30	干冰冷冻	-79°C	6个月	85%	—	Blaxter, 1953.
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	1:1	V	60	0.1—0.3°C min ⁻¹	-25°C	数小时	12%	—	Lloyde etc. 1966
鲑鱼 <i>Gadus morhua</i>	—	V	5	5°C min ⁻¹ 至 -27°C	-196°C	30天	80—89%	96%	Mounib, 1968.
黑鲷 <i>Pleuronectes platessa</i>	1:3	V	0	5°C min ⁻¹ 至 -79°C	-196°C	315天	20—39%	25—41%	Pullin, 1972.
虹鳟 <i>Salmo gairdneri</i>	1:9	V	0	30°C min ⁻¹	-196°C	7天	78%	88%	Ott etc. 1971b
马哈鱼 <i>Oncorhynchus</i> (four species)	1:4或1:9	V	0	30°C min ⁻¹	-196°C	—	44—85%	—	Wichler etc. 1974
虹鳟 <i>Salmo gairdneri</i>	1:3	P	0	30°C min ⁻¹	-196°C	7天	82%	88%	Stein etc. 1976
虹鳟 <i>Salmo gairdneri</i>	1:3	P	0	30°C min ⁻¹	-196°C	3—4个月	12—45%	53—95%	Stoss, 1978
褐鳟 <i>Salmo trutta</i>	1:3	P	0	30°C min ⁻¹	-196°C	7天	77%	99%	Stein etc. 1978
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	1:3	V	0	干冰冷冻	-196°C	—	80%	83%	Mounib, 1978
河鲈 <i>Salvelinus fontinalis</i>	1:3	P	0	30°C min ⁻¹ 至 -79°C	-166°C	7天	27%	—	Stein etc. 1978
褐鳟 <i>Salmo trutta</i>	1:3	P或S	—	10°—30°C min ⁻¹	-196°C	—	71	82%	Stein etc. 1979
鲑鱼 <i>Salmonid</i>	—	S	—	80°C min ⁻¹	-196°C	—	>90%	—	Erdahl etc. 1978
鳟目鱼 <i>Chanos chanos</i>	1:4	V	120	30°C min ⁻¹	-196°C	4—5天	67.9%	—	Hara S. 1982
斑马鱼 <i>Brachydanio rerio</i>	1:5	S	0	16°C min ⁻¹	-196°C	1—26天	61%	—	Brian H. 1982

注：“V”为安瓿瓶(小管)冷冻法；“P”为小丸颗粒冷冻法；“S”为麦根管冷冻法；“西”为西。

表 2 几种淡水鱼的精液冷冻保存
Table 2. Cryopreservation of some fresh-water fishes.

种 类 Species	稀释比 Dilution ratio	冷冻方法 Technique	平衡时间 Equil. time	冷冻速度 Freezing rate	保存温度 Temp. of storage	保存时间 Storage time	冻精受精率 Fert. rate of FS	作 者 Author
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	—	V	30分钟	—	-73℃	60小时	—	Sneed etc. 1956
鳙鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>	1:3	V	—	干冰/丙酮 冷冻	-79℃	30—60分钟	2.6—5.7%	Sin, 1974.
鲤鱼 <i>Cyprinus Carpio</i>	1:2	V	5秒	—	-196℃	—	47.9%	Moczarski, 1977.
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	1:2 或 1:4	P	一段时间	干冰孔 内冷冻	-196℃	—	23.9% 50% 80.5%	卢敏德等, 1981.
锦鲤 <i>Cyprinus carpio</i> (variety)	1:4	V	30分钟	干冰/甲醇 冷冻	-196℃	—	45.1%	岩桥正雄, 1980
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	1:2—4	P	一段时间	液氮蒸 气冷冻	-196℃	60—90天	44.2% 32.6% 16.5% 31%	王祖昆等, 1984.
鳊鱼 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	—	S	—	干冰/甲醇 冷冻	-196℃	342天	25.5—31.5%	Iisashi K etc. 1984
鳊鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
鳊鱼 <i>Carrhina molitorcella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	1:4	S	—	干冰/甲醇 冷冻	-196℃	342天	25.5—31.5%	Iisashi K etc. 1984

鱼类精液超低温冷冻保存已有了一套基本一致的操作程序。大多数学者都认为,稀液成份应尽可能简单些;冷冻和解冻都要以较快的速度进行,使精子安全越过0—60°C的冰晶形成区。但冷冻过程中还存在一些急需解决的问题。例如,稀液配方、冷冻速度的控制、解液和解冻温度等尚无十分可靠的选择方法和稳妥的操作程序;冷冻后精子复苏率不高、精子寿命缩短;冷冻过程中会造成精子形态结构的损伤等。这些问题有待今后进一步研究解决。

鱼类精液超低温冷冻保存技术有很大的应用价值。鱼类精子库的建立,对于鱼类种质资源的保存,克服杂交育种不能自然交配的困难,以及扩大杂交组合的选择范围等都有重要作用。另外,近年来,我国一些养殖单位都提出了由于长期人工繁殖、近亲交配而引起的家鱼品种优良性状退化问题。应用精液冷冻保存技术,将不同水域的野生家鱼交配受精,有可能达到提纯复壮的目的。精液经冷冻后,由于冰冻的打击,质量差的精子被冻死,复苏的精子平均质量得到提高。例如,王洪等(1983)报导,冻精受精的鲢鱼鱼苗生长速度比对照组快11.4%⁽¹⁾。尽管这一研究是初步的,但已展示出它的发展前景。总之,鱼类精液超低温冷冻保存技术的进一步完善和生产应用,将对鱼类养殖业的发展产生重要影响。

参 考 文 献

- [1] 长江水产研究所, 1984. 家鱼人工繁殖技术, 134—139. 农业出版社。
- [2] 王祖昆等, 1984. 草鱼、鲢鱼、鳙鱼和鳊鱼冷冻精液授精试验. 水产学报, 8(3):255—257.
- [3] 卢敏德等, 1981. 家鱼精液冷冻技术续报. 新疆农业科学, 4:46—48.
- [4] 岩桥正雄(张厚贤译), 1981. 锦鲤精液冷冻保存技术. 淡水渔业译文, 83—86.
- [5] 哈维 B. J. 等著(林浩然等译), 1984. 鱼类人工诱导繁殖的理论与实践, 55—64. 农业出版社。
- [6] 董蓓亚译(原作者佚) 1980. 关于鱼类精液的冷冻保存. 淡水渔业, 4:31—35.
- [7] Blaxter, J. H., 1953. Sperm Storage and Cross-Fertilization of Spring and Autumn Spawning Herring. *Nature*, 172: 1189—1190., Lond.
- [8] Brian, H., 1982. Cryopreservation of Zebra Fish Spermatozoa Using Methanol. *Can. J. Zool.*, 60: 1867—1870.
- [9] Chao, N-H., 1975. Study on Cryogenic Preservation of Mullet Sperm. *Aquaculture*, 5: 389—406.
- [10] Erdahl, D. H. et al., 1978. Cryopreservation of Salmonid Spermatozoa. *Cryobiology*, 15: 362—364.
- [11] Graybill, J. R. et al., 1969. Limited Fertilization of Steelhead Trout Eggs with Cryopreserved Sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26: 1400—1404.
- [12] Ilars, S., 1982. A Comparative Study of Various Extenders for Milkfish, *Chanos chanos*, Sperm Preservation. *Aquaculture*, 28: 239—246.
- [13] Hisashi, K. et al., 1980. Cryopreservation of Rainbow Trout Sperm. *Bull. Jan. Soci. Sci. Fish.*, 46: 1493—1495.
- [14] Hisashi, K., 1984. Cryopreservation of Carp Sperm. *Aquaculture*, 7: 267—273.
- [15] Horton, H. F. et al., 1976. Cryopreservation of Fish Spermatozoa and Ova. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 33: 995—1000.
- [16] Kebby, J. H., 1983. Cryogenic Preservation of Sperm from Striped Bass. *Trans. Amer. Fish. Soci.*, 112: 86—94.
- [17] Leibo, S. P. et al., 1978. Microscopic Observation of Intracellular Ice Formation in Unfertilized Mouse Ova as a Function of Cooling Rate. *Cryobiology*, 15: 257—271.
- [18] Mazur, P., 1970. Cryobiology: the Freezing of Biological Systems. *Science*, 168: 939—949, N. Y.
- [19] McGann, H., 1979. Optical Temperature Ranges for Control of Cooling Rates. *Cryobiology*, 16: 211—216.
- [20] McGann, H., 1978. Differing Actions of Penetrating and Nonpenetrating Cryoprotective Agents. *Cryobiology*, 15: 362—364.

(1) 王洪等, 1983, 白鲢冻精后代的生长观察. 广西水产科技, 2:19—22.

- [21] Meryman, H. T., 1966. *Cryobiology*, 112—139, Academic Press Incorporation.
- [22] Miyamoto, H. et al., 1983. Survival of Mouse Embryos Frozen-thawed Slowly or Rapidly in the Presence of Various Cryoprotectants. *J. Exp. Zoo.*, **26**: 123—127.
- [23] Moczarski, M., 1977. Deep Freezing of Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **25**: 187—190.
- [24] Mounib, M. S., 1978. Cryogenic Preservation of Fish and Mammalian Spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **53**: 13—18.
- [25] Ott, A. G. et al., 1971. Fertilization of Steelhead Trout (*Salmo gairdneri*) Eggs with Cryopreserved Sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **28**: 1915—1918.
- [26] Ott, A. G., 1975. Cryopreservation of Pacific Salmon and Steelhead Trout Sperm. Ph. D. Thesis. Oregon State University, Corvallis, Oregon, 1—145.
- [27] Stein, H. et al., 1978. Cryopreservation of the Sperm of Some Freshwater Teleosts. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **18**(4): 1073—1076.
- [28] Stoss, J. et al., 1981. Cryopreservation of Rainbow Trout. *Aquaculture*, **22**: 97—104.
- [29] Scott, A. P. et al., 1980. A Review of biology, Handling and Storage of Salmonid Spermatozoa. *J. Fish. Biol.*, **17**: 707—739.
- [30] Stoss, J. et al., 1978. Short-term and Cryopreservation of Rainbow Sperm. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **18**: 1077—1082.
- [31] Tokio, N., 1981. Mechanism of Freezing Injury to Erythrocytes. *Cryobiology*, **18**: 229—237.
- [32] Truscott, B. et al., 1969. An Improved Extender for Freezing Atlantic Salmon Spermatozoa. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **26**: 3254—3258.
- [33] William, N. F. et al., 1978. Parameter of Biological Freezing Damage in Simple Solution. *Cryobiology*, **15**: 168—177.
- [34] Withler, F. C. et al., 1967. Duratin of Fertility of Ova and Sperm of *O. nerka* and *O. gorbuscha* Salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **24**: 1573—1578.