



长期超低温冷冻保存对鞍带石斑鱼精子超微结构及酶活性的影响

丁小雨^{1,2}, 李振通^{2,3}, 段鹏飞^{2,4}, 邱弈树^{1,2}, 王心怡^{2,4}, 黎琳琳^{2,3},
王林娜^{2,3}, 刘 阳^{2,3}, 李文升⁵, 王清滨⁵, 赵 侠⁵,
田永胜^{2,3*}, 李胜忠^{1*}

(1. 新疆农业大学生命科学学院, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830052;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

4. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

5. 莱州明波水产有限公司, 山东 莱州 261400)

摘要: 为探究长期超低温冷冻保存中鞍带石斑鱼精子质膜、活力、超微结构及酶活性的变化, 阐明影响鞍带石斑鱼精子冷冻保存质量的相关机制。实验采集 2022 年鞍带石斑鱼鲜精及储存时间分别为 23、49 和 61 个月的冷冻保存精液, 用伊红-苯胺黑染色方法检测精子质膜完整性; 用计算机辅助精子分析仪 (CASA) 检测精子运动参数; 测量精浆和精子中琥珀酸脱氢酶 (SDH)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和肌酸激酶 (CK) 共 6 种酶活性的变化及三磷酸腺苷 (ATP) 浓度变化; 用扫描电镜和透射电镜观察鲜精和冻精超微结构。结果显示, 伊红-苯胺黑染色后, 鲜精质膜完整性最高, 为 $83.43\% \pm 2.73\%$, 经过超低温冷冻后, 精子质膜完整性显著降低, 且随着冷冻保存时间的延长而逐渐降低。CASA 结果显示, 鲜精活力最高, 为 $90.47\% \pm 3.34\%$, 经过超低温冷冻后精子活力显著降低, 但长期保存 23~61 个月的精子活力无显著差异, 精子活力保持在 $(63.95\% \pm 3.66\%) \sim (68.58\% \pm 2.73\%)$, 具有稳定的活力, 且鲜精与冻精之间精子平均直线运动速度 (VSL)、平均曲线运动速度 (VCL) 和平均路径速度 (VAP) 均没有显著差异。精子超微结构显示, 鲜精形态结构正常、线粒体排列结构规则、形态大小正常。经过超低温冷冻保存后, 精子形态结构损伤明显, 表现为精子头部质膜破损、细胞质外漏、细胞核膜破损、尾部鞭毛断裂或脱落等。鞍带石斑鱼精浆和精子超低温冷冻前后 6 种酶活性的变化及 ATP 含量结果显示, 经过超低温冷冻后, 精子内 SOD、GSH-Px 和 CAT 及 ATP 含量均显著降低。精浆中酶活性升高, 除 GR 和 CAT 外, 其余酶活性均差异显著。研究表明, 长期超低温冷冻对鞍带石斑鱼精浆和精子酶活性、精子活力及精子超微结构均具有较显著的影响。本研究结果为鱼类精子冷冻损伤机理研究积

收稿日期: 2022-11-16 修回日期: 2022-12-27

资助项目: 山东省泰山产业领军人才工程项目 (LJNY202109); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-47); 山东省重点研发计划项目 (2022LZGC016, 2021LZGC028); 海南省重点研发项目 (ZDYF2022XDNY243); 山东省农业良种工程项目 (2019LZGC020); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020XT06, 2020TD19, 2020TD25)

第一作者: 丁小雨 (照片), 从事鱼类种质冷冻保存及遗传育种研究, E-mail: dingxy0503@163.com

通信作者: 田永胜, 从事鱼类种质冷冻保存及遗传育种研究, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn;

李胜忠, 从事水产动物增殖与繁殖生理学研究, E-mail: xndlihengzhong@sina.cn



累了丰富的数据, 为鱼类精子长期冷冻保存提供了技术参考和评价指标。

关键词: 鞍带石斑鱼; 精子; 超低温冷冻; 超微结构; 酶活性; 计算机辅助精子分析系统

中图分类号: S 965.334

文献标志码: A

鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*) 俗称龙胆石斑, 隶属鲈形目 (Perciformes) 鲷科 (Serranidae) 石斑鱼属 (*Epinephelus*), 是石斑鱼类群中体型最大的鱼类, 因其生长迅速、肉质鲜美、营养价值高, 是我国重要的名贵海水养殖经济鱼类, 具有很好的养殖前景^[1]。但由于石斑鱼雌雄鱼发育不同步, 先雌后雄的特点, 且雄鱼数量稀少, 人工繁殖技术还不完善^[2], 极大限制了鞍带石斑鱼大规模培育。精液冷冻保存是保存优良种质、扩大繁殖周期及突破地理因素限制的最佳方法。目前, 关于鞍带石斑鱼的研究主要集中在遗传育种^[3-4]、生理生化^[5]、分子学^[6]等方面, 关于精子冷冻损伤的研究还可以进一步完善。

超低温冷冻保存技术是长期保存精子的一种方法。在超低温条件下, 被冻存的生物体细胞本身的蛋白质、酶、代谢和生化功能几乎完全停滞, 生命体处于一种静止状态, 如果生物体的机体结构保持完好无损, 则在复温后恢复活力^[7]。在精子冷冻中, 冷冻损伤是几乎不可能避免的, 所以可以利用计算机辅助精子分析技术 (computer assisted sperm analysis system, CASA)、酶活性检测、人工受精、单细胞凝胶电泳技术、伊红 Y 染色、显微镜观察等检测鱼类精子超低温冷冻后质量。计算机辅助精子分析技术采用显微录像技术和图像处理技术等对精子进行全面量化分析, 最早应用于人类精子检测^[8], 随着技术的不断发展和完善, 目前国内外也逐步将计算机辅助精子分析技术应用在鱼类上^[9-11], 是反映精子质量的综合指标。生物体内的酶在经过恶劣环境影响后会发生活性改变, 酶活性直接影响精子能量代谢和抗氧化功能, 其活性检测可以从生化角度反映精子质量, 该方法近几年在西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*)^[12]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[13]等鱼类中广泛应用。而精子的形态结构完整也直接决定了精子的活力, 从而直接影响受精能力, 精子的形态学缺陷可以通过扫描电镜和透射电镜等方法进行观察, 该方法已在条纹鲈 (*Morone saxatilis*)^[14]、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[15]等物种中应用。

本研究通过对鞍带石斑鱼精浆及精子超低温

冷冻前后酶活性的变化、精子质膜完整性、精子运动性能及精子超微结构的变化, 探究超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子的冷冻损伤机制, 对后续冷冻保存工作及实际生产均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验选取山东省莱州市明波水产有限公司编号为 5756 的鞍带石斑鱼, 亲鱼培育在工厂化循环水车间, 于 2022 年 8 月采集鲜精, 于 2020 年 9 月、2018 年 7 月和 2017 年 7 月分别冷冻保存了精液, 冷冻保存时间分别为 0、23、49 及 61 个月。精液采集均在鞍带石斑鱼繁殖季节 (7—9 月), 经人工催产后, 用干净毛巾包裹鱼体并轻轻挤压鱼体腹部, 通过挤腹法采集新鲜精液至 50 mL 离心管中, 采集后的精液呈白色或乳白色, 确保精液中无粪便及尿液, 采集后置于 4 °C 冰箱中冷藏备用。利用显微镜检测精子活力均达到 85% 以上, 存放于 4 °C 冰盒中并立即运回实验室进行冷冻保存。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

精子冷冻时, 先以 1 : 1 (体积比) 的比例在精液中添加稀释液和抗冻剂, 抗冻剂成分参照田永胜等^[16]构建鞍带石斑鱼精子冷冻库的方法。将添加抗冻剂的精液分装在 2 mL 冻存管中, 在液氮罐表面 10 cm 处平衡 10 min, 在液氮罐表面 5 cm 处平衡 5 min, 最后直接投入液氮中保存。冻精解冻时, 迅速从液氮中取出冻存管, 置于 37 °C 水浴锅中, 摇晃解冻至冻存管内冰晶刚融化, 解冻后置于 4 °C 冰箱中冷藏备用。

1.2 精子质膜完整性检测

实验前充分混匀精液样本, 取干净 1.5 mL 离心管, 以 1 : 1 的体积比分别添加鲜精、冻精和精子活体染色液 (伊红-苯胺黑法), 混匀后放置 30~60 s。随后滴加 1 滴混合溶液于载玻片上, 制成涂片。晾干、镜检, 置于光学显微镜下观察, 呈白色的为活精子, 呈红色的为死精子, 背景呈紫黑色。观察视野内 200 个左右的精子, 计算未

着色的精子占 200 个精子的百分率, 每个样本重复检测 3 次。

1.3 计算机辅助检测精子活力

采用 CASA 系统研究鞍带石斑鱼鲜精及冻精活力, 用天然海水激活后, 记录精子活力参数, 包括精子活率 (MOT)、平均直线运动速率 (VSL)、平均曲线运动速率 (VCL)、平均路径运动速率 (VAP)、摆动幅值 (ALH) 等参数, 评价精子质量。检测时, 使用移液枪吸取 1 μ L 精液加入到 0.25 mL 天然海水中并使其均匀混合, 吸取 3 μ L 激活后的精子加入 CASA 专用载玻片中。精子一经激活, 立即开始计时和启动 CASA 检测系统, 同时在显微镜下观测精子运动情况, 每隔 30 s 进行 1 次序列图像采集, 直到激活后 3 min, 最后对每个序列图像分别进行检测和报告输出。

1.4 酶活性检测

采用南京建成生物工程研究所的酶活性检测试剂盒测定鞍带石斑鱼精浆及精子超低温冷冻前后超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、肌酸激酶 (CK)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、琥珀酸脱氢酶 (SDH) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性及三磷酸腺苷 (ATP) 含量, 相应操作参照说明书进行。

1.5 超微结构检测

扫描电镜 取鲜精及刚解冻的冻精, 以 1:10 的体积比加入精液样本及 2.5% 的戊二醛电镜固定液, 在室温下固定 2 h 后转移至 4 $^{\circ}$ C 避光保存。固定好的样品经磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 配制 1% 锇酸溶液 4 $^{\circ}$ C 避光固定 2 h, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。然后将固定好的样品依次放入酒精中梯度脱水, 每次 15 min, 乙酸异戊酯置换 15 min。干燥后的样品紧贴于导电碳膜双面胶上, 放入离子溅射仪样品台上喷金 30 s 左右制成成片。在扫描电子显微镜 (SU8100, HITACHI, 日本) 下观察、拍照。

透射电镜 取鲜精及刚解冻的冻精, 以 1:10 的体积比加入精液样本及 2.5% 的戊二醛电镜固定液, 在室温下固定 2 h 后转移至 4 $^{\circ}$ C 避光保存。固定好的样品经磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 配制 1% 锇酸溶液, 4 $^{\circ}$ C 避光固定 2 h, 用磷酸盐

缓冲液 (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。然后将固定好的样品依次放入酒精中梯度脱水, 每次 20 min。Epon-812 渗透包埋, 包埋板放置于 60 $^{\circ}$ C 烤箱中聚合 48 h 切片。用醋酸铀和柠檬酸铅避光双重染色后制片。在透射电子显微镜 (HT7800, HITACHI, 日本) 下观察、拍照。

1.6 数据分析

每组实验设 3 个重复, 数据用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 得到的数据用 Excel 2010 软件进行初步整理, 用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件进行分析, 利用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 对数据进行差异显著性比较, 显著性水平为 $P < 0.05$, 用 GraphPad Prism 8 软件作图。

2 结果

2.1 长期超低温冷冻保存对鞍带石斑鱼精子质膜完整性影响的检测

用伊红-苯胺黑活体染色液处理, 分析鞍带石斑鱼鲜精和冻融精子质膜完整性, 结果显示, 随着冷冻保存时间的延长, 精子活率逐渐降低 (图 1)。鲜精的活率为 83.43% \pm 2.73%, 经过超低温冷冻处理后的精子活率均显著降低 ($P < 0.05$), 但三组冻精之间无显著差异 ($P > 0.05$)。储存时间为 23 个月

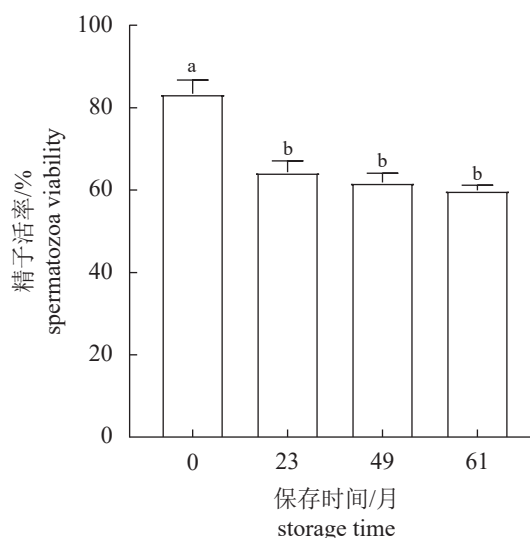


图 1 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子质膜的影响
不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effects of cryopreservation on sperm plasmalemma of *E. lanceolatus*

There is a significant difference ($P < 0.05$) between groups with different letters.

的冻精活率为 64.38%±2.21%，储存时间为 49 个月的冻精活率为 61.87%±1.81%，储存时间为 61 个月的冻精活率为 59.96%±1.00%。

2.2 计算机辅助精子运动参数的检测

超低温冷冻前后鞍带石斑鱼精子运动参数的比较 鲜精和冻精解冻后进行活力检测，鲜

精的活力最高为 90.47%±3.34%，储存 23 个月的冻精活力为 68.58%±2.73%，储存 49 个月的冻精活力为 65.28%±11.44%，储存 61 个月的冻精活力为 63.95%±3.66%，鲜精与冻精比较均具有显著差异 ($P<0.05$)，但三组冻精之间无显著差异 ($P>0.05$)，其余运动参数的变化数值结果如表 1 所示。

表 1 超低温冷冻前后鞍带石斑鱼精子运动参数比较

Tab. 1 Comparison of sperm motility parameters between fresh sperm and cryopreserved sperm of *E. lanceolatus*

保存时间/月 storage time	MOT/%	VCL/($\mu\text{m/s}$)	VSL/($\mu\text{m/s}$)	VAP/($\mu\text{m/s}$)	LIN/%	ALH/($\mu\text{m/s}$)	BCF/(鞭打次数/s)
0/鲜精 fresh sperm	90.47±3.34 ^a	42.12±7.71 ^a	29.38±6.41 ^a	34.20±6.97 ^a	62.63±1.53 ^a	1.00±0.08 ^a	6.92±2.32 ^a
23	68.58±2.73 ^b	45.06±7.29 ^a	32.05±8.17 ^a	36.83±8.35 ^a	55.32±5.32 ^a	0.96±0.02 ^a	7.53±0.71 ^a
49	65.28±11.44 ^b	46.03±7.02 ^a	32.03±7.95 ^a	36.99±8.15 ^a	52.12±8.37 ^a	0.96±0.04 ^a	7.43±0.80 ^a
61	63.95±3.66 ^b	30.23±2.20 ^a	18.11±0.76 ^a	22.02±1.16 ^a	51.55±2.69 ^a	0.90±0.03 ^a	4.70±0.82 ^a

注：同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。MOT. 精子活率；VCL. 平均曲线运动速率；VSL. 平均直线运动速率；VAP. 平均路径运动速率；LIN. 精子运动路线曲折程度；ALH. 摆动幅度；BCF. 鞭打频率。

Notes: In the same column, values with different lowercase letters superscripts mean significant difference ($P<0.05$). MOT. percentage of motile, VCL. curvilinear velocity, VSL. a straight line velocity, VAP. average path velocity, LIN. linearity, ALH. amplitude of lateral head displacement, BCF. beat cross frequency.

超低温冷冻前后鞍带石斑鱼精子运动状态的比较 鲜精在激活后，快速运动精子占 38.67%±15.66%，储存 23 个月的冻精为 30.41%±5.53%，储存 49 个月的冻精为 30.70%±8.00%，储存 61 个月的冻精为 16.28%±4.36%，鲜精与冻精之间差异不显著 ($P>0.05$)，但整体呈下降趋势 (图 2)。鲜精在激活后中速运动精子占 41.03%±8.40%，储存 23 个月的冻精为 21.87%±2.27%，储存 49 个月的冻精为 19.48%±3.13%，储存 61 个月的冻精为 20.96%±2.12%，鲜精与冻精之间差异显著 ($P<0.05$)。鲜精在激活后，慢速运动精子占 10.78%±3.92%，储存 23 个月的冻精为 16.30%±1.95%，储存 49 个月的冻精为 15.05%±0.33%，储存 61 个月的冻精为 26.71%±1.43%，鲜精与 23、49 个月冻精之间差异不显著 ($P>0.05$)，但与 61 个月冻精之间差异显著 ($P<0.05$)。

2.3 超低温冷冻前后精子及精浆酶活性的影响

超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆内 ATP 含量的影响 鞍带石斑鱼鲜精中，精子 ATP 含量为 (787.89±61.80) $\mu\text{mol/g prot}$ ，经过超低温冷冻后，储存 23 个月的冻精为 (593.95±61.81) $\mu\text{mol/g prot}$ ，储存 49 个月的冻精为 (400.01±59.38) $\mu\text{mol/g prot}$ ，储存 61 个月的冻精为 (121.21±45.35) $\mu\text{mol/g prot}$ ，经超低温冷冻前后及 3 组冻精

之间的 ATP 含量都有显著差异 ($P<0.05$)，且整体呈下降趋势。

鞍带石斑鱼鲜精精浆中 ATP 含量为 (78.42±21.39) $\mu\text{mol/g prot}$ ，经超低温冷冻后，储存 23 个月的冻精 ATP 含量为 (218.63±93.38) $\mu\text{mol/g prot}$ ，储存 49 个月的冻精为 (432.52±48.47) $\mu\text{mol/g prot}$ ，储存 61 个月的冻精为 (451.53±124.49) $\mu\text{mol/g prot}$ ，经超低温冷冻后，鲜精和储存时间为 23 个月的冻精精浆中 ATP 含量差异不显著 ($P>0.05$)，与其余 2 组冻精相比显著升高 ($P<0.05$)，且整体呈上升趋势 (图 3)。

超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆内 SOD 活性的影响 鞍带石斑鱼鲜精中精子 SOD 活性为 (779.99±37.79) U/mL，经过超低温冷冻后，储存 23 个月的冻精为 (531.44±12.59) U/mL，储存 49 个月的冻精为 (456.60±11.76) U/mL，储存 61 个月的冻精为 (329.92±11.23) U/mL，鲜精与 3 组冻精精子之间的 SOD 活性都有显著差异 ($P<0.05$)，且整体呈下降趋势。

鞍带石斑鱼鲜精精浆中 SOD 活性为 (190.65±16.49) U/mL，经超低温冷冻后，储存 23 个月的冻精为 (223.8±2.14) U/mL，储存 49 个月的冻精为 (240.99±6.12) U/mL，储存 61 个月的冻精为 (283.86±5.99) U/mL，经超低温冷冻后，鲜精和冻精精浆中 SOD 活性差异显著 ($P<0.05$)，但是 23 和 49 个

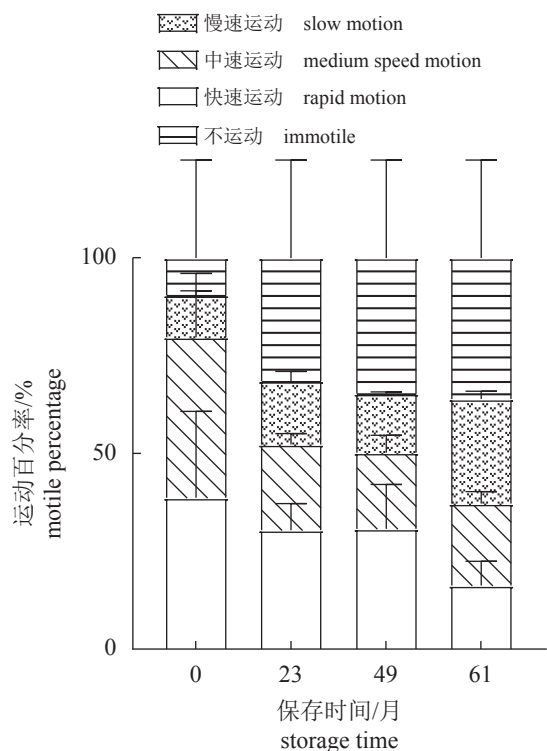


图 2 超低温冷冻前后鞍带石斑鱼精子不同运动状态的百分率变化

Fig. 2 Percentual change of fresh sperm and cryopreserved sperm of *E. lanceolatus* in different motor states

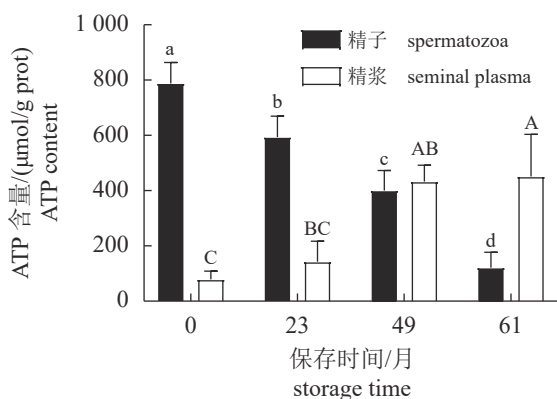


图 3 超低温冷冻前后鞍带石斑鱼精子及精浆 ATP 含量的变化

小写字母表示精子间差异显著, 大写字母表示精浆间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 3 Effects of cryopreservation on ATP of *E. lanceolatus* spermatozoa and seminal plasma

Lower case letters indicate significant differences between sperm, capital letters indicate significant differences between seminal plasma ($P < 0.05$), the same below.

月冻精精浆中 SOD 活性差异不显著 ($P > 0.05$), 与 61 个月冻精精浆差异显著 ($P < 0.05$), 且整体呈上升趋势 (图 4)。

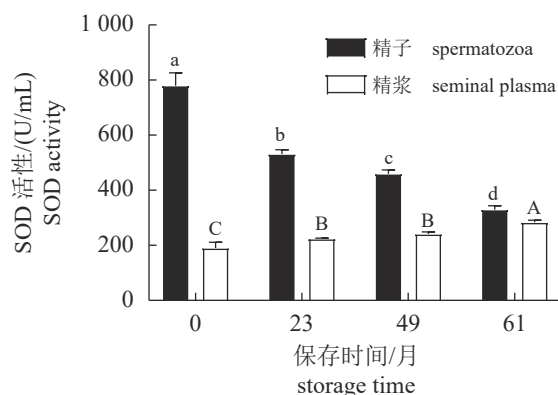


图 4 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effects of cryopreservation on SOD enzymatic activity of *E. lanceolatus* spermatozoa and seminal plasma

超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆内 SDH 活性的影响 鞍带石斑鱼鲜精中, 精子 SDH 活性为 (53.19 ± 3.06) U/mL, 经过超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (45.83 ± 4.17) U/mL, 储存 49 个月的冻精为 (40.10 ± 6.12) U/mL, 储存 61 个月的冻精为 (25.37 ± 13.35) U/mL, 虽然整体呈下降趋势, 但鲜精与储存 23 和 49 个月的冻精差异不显著 ($P > 0.05$), 与储存 61 个月的冻精差异显著 ($P < 0.05$)。

鞍带石斑鱼鲜精精浆中 SDH 活性为 (16.04 ± 4.54) U/mL, 经超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (86.62 ± 7.86) U/mL, 储存 49 个月的冻精为 (44.91 ± 19.78) U/mL, 储存 61 个月的冻精为 (38.50 ± 7.86) U/mL, SDH 活性 3 组冻精均比鲜精高, 且呈现先升高后降低的趋势 (图 5)。

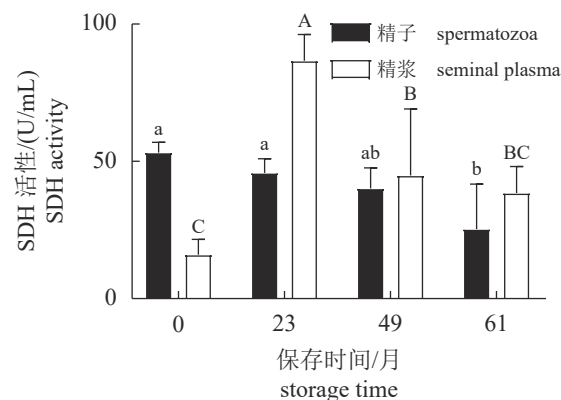


图 5 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆 SDH 活性的影响

Fig. 5 Effects of cryopreservation on SDH enzymatic activity of *E. lanceolatus* spermatozoa and seminal plasma

超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆内 GSH-Px 活性的影响 鞍带石斑鱼鲜精中 GSH-Px 精子活性为 (119.19 ± 8.43) U/(min·mL), 经过超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (23.46 ± 5.71) U/(min·mL), 储存 49 个月的冻精为 (22.71 ± 8.80) U/(min·mL), 储存 61 个月的冻精为 (13.89 ± 2.07) U/(min·mL), 鲜精和冻精之间相比差异显著 ($P < 0.05$), 但 3 组冻精之间无显著差异 ($P > 0.05$), 整体呈下降趋势。

鞍带石斑鱼鲜精精浆中 GSH-Px 活性为 (9.27 ± 3.31) U/(min·mL), 经超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (24.43 ± 7.41) U/(min·mL), 储存 49 个月的冻精为 (37.38 ± 5.79) U/(min·mL), 储存 61 个月的冻精为 (58.13 ± 3.07) U/(min·mL)。经超低温冷冻后, 冻精活力均比鲜精高, 4 组之间差异显著 ($P < 0.05$), 且整体呈上升趋势 (图 6)。

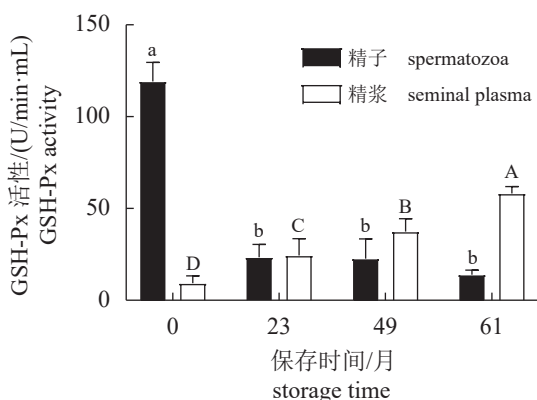


图 6 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆 GSH-Px 活性的影响

Fig. 6 Effects of cryopreservation on GSH-Px enzymatic activity of *E. lanceolatus* spermatozoa and seminal plasma

超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆内 GR 活性的影响 鞍带石斑鱼鲜精中, 精子 GR 活性为 (0.24 ± 0.08) U/L, 经超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (0.34 ± 0.14) U/L, 储存 49 个月的冻精为 (0.47 ± 0.15) U/L, 储存 61 个月的冻精为 (0.82 ± 0.19) U/L, GR 活性呈上升趋势。

鞍带石斑鱼鲜精精浆中, GR 活性为 (0.04 ± 0.02) U/L, 经超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (0.07 ± 0.02) U/L, 储存 49 个月的冻精为 (0.07 ± 0.03) U/L, 储存 61 个月的冻精为 (0.09 ± 0.04) U/L, 4 组之间虽无显著差异 ($P > 0.05$), 但整体呈上升趋势 (图 7)。

超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆内 CAT 活性的影响 鞍带石斑鱼鲜精中, 精子

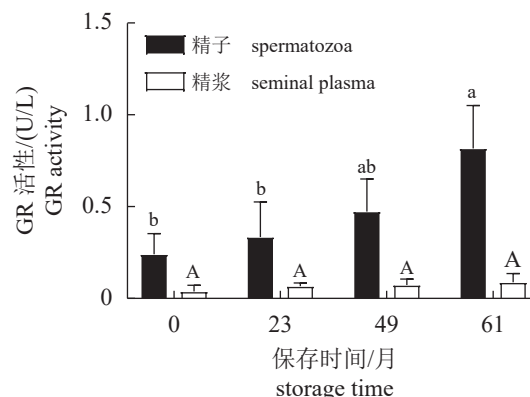


图 7 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆 GR 活性的影响

Fig. 7 Effects of cryopreservation on GR enzymatic activity of *E. lanceolatus* spermatozoa and seminal plasma

CAT 活性为 (182.87 ± 37.17) U/mL, 经过超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (95.06 ± 7.02) U/mL, 储存 49 个月的冻精为 (65.36 ± 7.49) U/mL, 储存 61 个月的冻精为 (33.78 ± 8.88) U/mL, 鲜精与三组冻精之间差异显著 ($P < 0.05$), 且整体呈下降趋势 (图 8)。

鞍带石斑鱼鲜精精浆中, CAT 活性为 (31.30 ± 13.69) U/mL, 经超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (37.23 ± 9.87) U/mL, 储存 49 个月的冻精为 (49.27 ± 6.90) U/mL, 储存 61 个月的冻精为 (90.42 ± 19.32) U/mL, 鲜精和储存 23、49 个月的两组冻精精浆之间无显著差异 ($P > 0.05$), 但与储存 61 个月的冻精精浆差异显著 ($P < 0.05$), 且整体呈上升趋势。

超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆内 CK 活性的影响 鞍带石斑鱼鲜精中, 精子

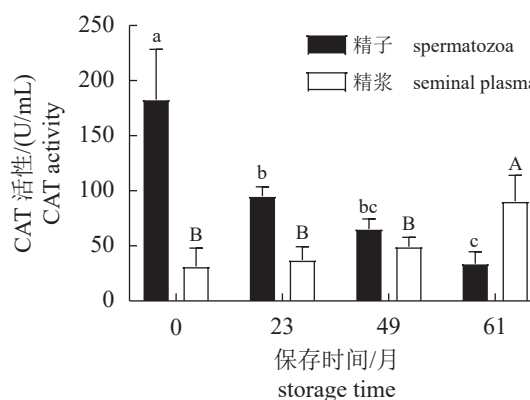


图 8 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆 CAT 活性的影响

Fig. 8 Effects of cryopreservation on CAT enzymatic activity of *E. lanceolatus* spermatozoa and seminal plasma

CK 活性为 (24.30±2.94) U/mL, 经过超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (22.00±8.65) U/mL, 储存 49 个月的冻精为 (12.90±1.55) U/mL, 储存 61 个月的冻精为 (6.52±0.23) U/mL, 鲜精活力最好, 经过超低温冷冻后, 鲜精与储存时间为 23 个月的冻精差异不显著 ($P>0.05$), 与其余两组冻精差异显著 ($P<0.05$), 且精子活性呈下降趋势。

鞍带石斑鱼鲜精精浆中, CK 活性为 (2.90±0.64) U/mL, 经超低温冷冻后, 储存 23 个月的冻精为 (9.90±1.89) U/mL, 储存 49 个月的冻精为 (11.40±0.23) U/mL, 储存 61 个月的冻精为 (26.63±2.74) U/mL, 鲜精的精浆活性最低, 与冻精之间差异显著 ($P<0.05$), 但储存 23、49 个月的两组冻精之间无显著差异 ($P>0.05$), 整体呈上升趋势 (图 9)。

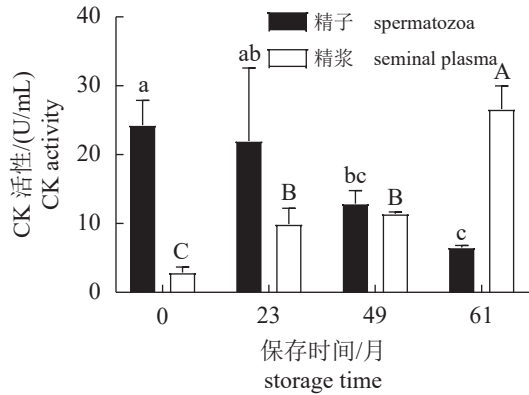


图 9 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆 CK 活性的影响

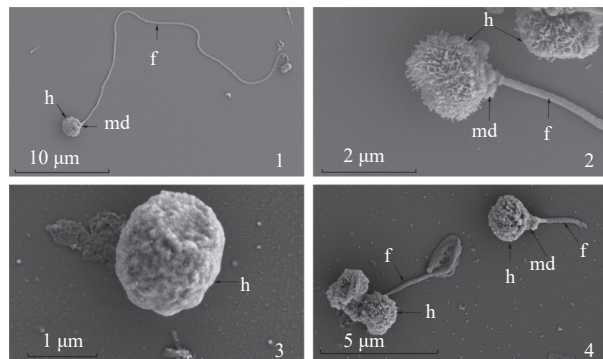
Fig. 9 Effects of cryopreservation on CK enzymatic activity of *E. lanceolatus* spermatozoa and seminal plasma

2.4 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子超微结构的影响

扫描电镜观察超低温冷冻对精子超微结构的影响 用扫描电镜观察超低温冷冻前后鞍带石斑鱼精子超微结构 (图版 I)。与大多数硬骨鱼类精子一样, 鞍带石斑鱼正常精子结构属于鞭毛型, 由头部、中段和尾部 3 部分组成, 全长约 37 μm。精子头部呈圆球形或近圆形, 头部未见顶体, 细胞核膜与质膜表面不光滑, 直径约 1.7 μm。精子中段是附着在头基部的一个小球形结构, 与精子尾部鞭毛相连, 中段不明显。尾部鞭毛细长, 是精子运动的主要器官, 直径约 0.2 μm, 长度约 34 μm。

经过超低温冷冻后, 与正常的鞍带石斑鱼精子形态结构相比, 其冷冻损伤主要表现在: 精子形态不完整及变形严重, 但整体未发生膨胀。精子头部破裂、中段脱落、尾部鞭毛断裂或脱落等。

透射电镜观察超低温冷冻对精子超微结构的影响 利用透射电镜进一步观察超低温冷冻前后鞍带石斑鱼精子超微结构 (图版 II)。正常的鞍带石斑鱼精子头部的主要结构是细胞核, 占据精子头部绝大部分空间, 核染色质密集, 细胞膜与核膜表面不平整, 呈波浪状。细胞核后端有一个明显的凹陷, 从核端中央陷入核中, 称为植入窝, 与中段相连, 细胞质相对较少, 质膜与核膜中间有较大的空隙存在。中心粒复合体包括近端中心粒和基体两个部分, 近端中心粒位于核小窝前端, 由基体与轴丝相连发出微管结构, 是精子尾部的起始点。精子中段位于核后端, 呈筒状,

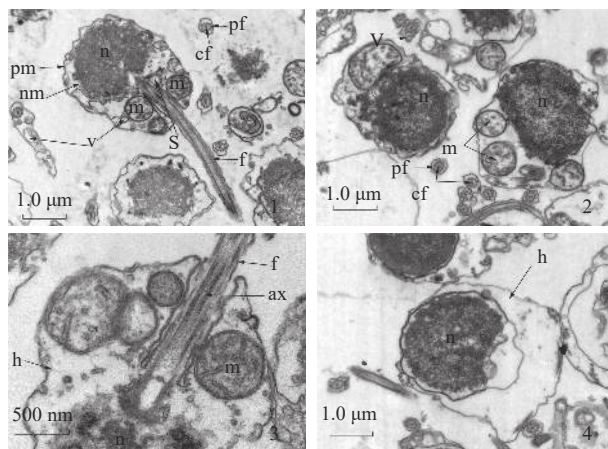


图版 I 扫描电镜观察鞍带石斑鱼超低温冷冻前后精子超微结构

1. 单个鲜精整体扫描电镜 (SEM) 图片; 2. 新鲜精子; 3. 超低温冷冻后精子, 鞭毛脱落, 中段脱落, 头部质膜皱缩; 4. 超低温冷冻后精子, 鞭毛断裂。h. 精子头部, md. 精子中段, f. 鞭毛, 下同。

Plate I SEM observation of ultrastructure of *E. lanceolatus* spermatozoa

1. single fresh sperm of SEM; 2. fresh sperm of SEM; 3. frozen sperm, flagellum fall off, sleevelet part fall off, plasmalemma collapse; 4. frozen sperm, flagellum bend. h. head, md. sleevelet part of middle, f. flagellum, the same below.



图版 II 透射电镜观察鞍带石斑鱼超低温冷冻前后精子超微结构

1. 鲜精精子; 2. 超低温冷冻后精子; 3. 超低温冷冻后精子, 可见头部核膜皱缩, 质膜与核膜之间间隙变大; 4. 超低温冷冻后精子, 可见线粒体脱落, 细胞质流失。n. 细胞核; m. 线粒体; S. 袖套腔; cf. 中央纤维; pf. 外周纤维; v. 囊泡; pm. 精子细胞质膜; nm. 核膜。

Plate II TEM observation of ultrastructure of *E. lanceolatus* spermatozoa

1. fresh sperm of TEM; 2. frozen sperm; 3. frozen sperm, the nuclear membrane of the head was wrinkled, the space between the nucleus and plasma membrane was enlarged; 4. frozen sperm, mitochondrion lost, cytoplasmic loss. n. nucleus; m. mitochondrion; S. sleeve space; cf. central fiber; pf. peripheral fiber; v. vesicle; pm. plasma membrane; nm. nucleus membrane.

围绕轴丝形成的空腔被称为袖套腔, 袖套两侧不对称, 同时分布着大小、数量不等的线粒体和囊泡, 线粒体是精子能量的储存场所, 为精子运动提供能量。线粒体呈圆形或者卵圆形, 双层膜明显, 内膜与外膜之间有明显空隙存在。精子尾部鞭毛起始点位于核小窝的基体并且通过袖套腔, 有 9 对微管排列在鞭毛的外层, 1 对中心微管位于中央, 是典型的“9+2”结构, 尾部除轴丝外, 未见明显的其他结构存在, 但部分鞭毛中发现有囊泡, 尾部横切面近似圆形。

经过超低温冷冻后, 部分精子发生了不同程度的损伤, 主要表现在: 质膜破损变形, 细胞质流失, 细胞器分散, 细胞核与质膜之间空隙变大。线粒体膨大破损, 结构变化明显。精子鞭毛与头部及中段脱离现象明显, 但微管结构基本完好。

3 讨论

目前, 有关精子的研究主要涉及精子的发生发育、形态结构、活力、精子和精浆的生化反应等方面。精液冷冻保存是鱼类种质资源保护的重要途径之一, 它可以通过建立鱼类的冷冻精子库, 将优良鱼类的原良种长期保存, 也可以使处在不同生殖期或地理隔离的鱼类进行交配, 解决雌、雄鱼发育不同步的问题, 同时也为遗传育种工作提供材料。经过多年的理论更新及技术应用, 已为许多鱼类建立了精子库^[17], 有些淡水鱼类冷冻

精子在解冻后的活力甚至能达到 95%^[18]。Tian 等^[19]建立了鞍带石斑鱼精子冷冻保存技术和冷冻库, 保存精子达到 4 000 mL 以上, 在石斑鱼远缘杂交育种中发挥了关键性的作用。但是冷冻后避免不了冷冻损伤, 因此, 在实际生产过程中, 需要对冻精进行定期检查, 从而确保冻精质量。

3.1 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子质膜及运动性能的影响

质膜完整性是检测精子质量的一项重要评估手段。其完整性不仅对精子正常代谢、精子运动能力有着重要作用, 也是雌、雄配子结合成功的前提条件, 是精子受精潜力的重要指标^[20]。其功能是维持精子细胞内外环境稳定, 是外界进行物质和信息交换的屏障, 对精子 DNA 等遗传物质起着保护作用^[21]。目前检测精子质膜完整性的方法有本实验中的伊红-苯胺黑法, 还有低渗肿胀-伊红拒染 (HOS-EY) 法, 碘化丙锭 (PI)、溴化乙锭 (EB) 荧光染色法等。其原理都是当精子发生质膜破损时, 染色剂能够进入精子内部, 而活精子不能, 这样就能在显微镜下分辨活精子和死精子。其次, 还有活精子染色剂羧基荧光素双醋酸盐 (CFDA) 等, 原理是通过膜的通透性让荧光染料进入精子内部, 在酶的催化反应下, 活精子发出绿色的荧光^[22]。这些方法在斜带石斑鱼 (*E. coioides*)^[23]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[24]、黄鳝 (*Monopterus albus*)^[25]、

鞍带石斑鱼^[26]等鱼类精子冷冻保存中成功应用。本实验也检测出, 经过超低温冷冻后的鞍带石斑鱼精子质膜完整性要显著低于鲜精。这些方法有着操作简单便捷的优点, 只需要普通光学显微镜就可以操作, 能客观反映超低温冷冻保存后的精液质量, 结果较为可靠。

CASA 系统可以抓拍单个精子活动轨迹, 能准确测定 MOT、VCL、VSL、BCF、VAP、直线性、PR 及 ALH 等参数, 所测结果有较高的准确度^[27]。一般认为, VSL、VCL 和 VAP 在精子运动中有很重要的作用, 并且间接反映了精子与受精率的关系^[28]。本实验中, 鞍带石斑鱼精子激活率会随着冷冻时间的延长而降低, 这点与 Park 等^[29]和 Kim 等^[30]的研究结果一致。同时, 鞍带石斑鱼精子在经过超低温冷冻后的 VSL、VCL 和 VAP 的几项数值中, 保存时间为 23 和 49 个月的冻精比鲜精高, 但是保存时间为 61 个月的冻精数值比鲜精低, 且数值随着冷冻时间的延长而降低, 说明添加的冷冻保存液可以适当提高鞍带石斑鱼精子的运动速度, 也同时反映了超低温冷冻对精子的损伤程度。柳凌等^[9]通过该方法对 4 种鲟冻精激活液比较也发现了这一特点, 4 种鲟在添加不同浓度的抗冻剂后, 精子运动数值均高于对照组。圆口铜鱼 (*Coreius guichenoti*) 精子在经过超低温冷冻后, 几项数值都有所降低, 且精子运动性能全部减弱, 趋向静止^[31]。牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的鲜精与冻精相比, 直线运动和曲线运动的精子数量逐渐减少, 不运动和左右摆动的精子数量逐渐增加^[32]。不同物种的精子在激活后, 其 VSL、VCL 和 VAP 也有很大差异, 如小黄鱼 (*L. polyactis*) 精子的 VCL 为 25.38 $\mu\text{m/s}$, 鲑科 (Tetraodontidae) 为 183 $\mu\text{m/s}$ 、海鞘为 (*Pyrosomella verticillata*) 296 $\mu\text{m/s}$ 、钝吻黄盖鲽为 (*Pseudopleuronectes yokohamae*) 65.9 $\mu\text{m/s}$ 、公羊为 140 $\mu\text{m/s}$ ^[33-36], 本研究中鞍带石斑鱼为 42.12 $\mu\text{m/s}$ 。通过上述物种对比发现, 就精子运动速度而言, VCL 值都明显高于 VSL 值, 同时与 VAP 值接近, VSL 值较小, 说明这些物种精子多呈曲线运动, 本研究中鞍带石斑鱼精子 VCL 为 42.12 $\mu\text{m/s}$ 、VAP 为 34.2 $\mu\text{m/s}$ 、VSL 为 29.38 $\mu\text{m/s}$, 与上述结论一致, 说明鞍带石斑鱼精子也多呈曲线式运动。同时本实验注意到, 经过超低温冷冻后, 鞍带石斑鱼快速运动的精子逐渐减少, 而中速运动和慢速运动的精子逐渐增加, 这也能从侧面反映出超低温冷冻对精子运动性能的影响。综上, 该方法在检测精

子质量时排除了人为主观因素, 具有速度快、准确性高和重复性好的优点^[37], 但受到精子浓度和稀释度、图像清晰度、软件设置、不同载玻片的使用及分析区域数量等的影响, 因而仍存在一定局限性和标准化, 所以还要结合其他方法综合分析精液质量, 以确保实验结果更具有说服力。

3.2 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子超微结构的影响

除了运动参数之外, 精子形态也是一种被广泛应用于区分物种的一个特征, 如软体动物的精子可以分为原生型和修饰型^[38], 哺乳动物精子都属于鞭毛型, 主要是由头部、中段(袖套)和尾部(鞭毛)三部分组成, 其区别主要在于头部, 猪、羊、马的精子头部呈卵圆形, 人的精子呈犁状, 大熊猫的精子呈豆瓣形, 有顶体^[39]。硬骨鱼类的精子形态也属于鞭毛型, 但随着鱼种类不同, 精子各部分的占比和精子大小也有所不同, 除几种鲟外, 头部基本无顶体^[40-42]。本研究中通过扫描电镜和透射电镜观察, 鞍带石斑鱼精子与大多数硬骨鱼类的精子一样: 首先, 头部无顶体, 其形状呈圆形或卵圆形, 内部主要结构是细胞核, 细胞核为圆球形, 由核膜将细胞核与细胞质分开, 头部前段细胞核和质膜紧贴, 细胞核后端有植入窝, 植入窝从细胞核后端往前凹陷。其次, 中段袖套结构位于细胞核的后端, 呈圆筒状, 中间的腔被称为袖套腔, 袖套内主要有线粒体、囊泡和细胞质等细胞器, 是精子内部能量储存的主要场所, 其储存条件也依赖线粒体结构的完整性, 如果线粒体结构受损, 将直接影响 ATP 的合成。与七带石斑鱼 (*E. septemfasciatus*)^[43] 和点带石斑鱼 (*E. malabaricus*)^[44] 一样, 鞍带石斑鱼精子中段结构中的近端中心粒和中心粒间体大部分在核内, 因此也可以将中段袖套结构归入头部。最后, 尾部鞭毛是通过摆动从而驱动精子运动的结构, 内部主要为轴丝, 由基体延伸而成, 是典型的“9+2”微管结构, 无主段、末段之分, 无侧鳍, 该结构与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[42]、兰州鲇 (*Silurus lanzhouensis*)^[45]、太平洋鳕 (*Gadus macrocephalus*)^[46]、大麻哈鱼 (*O. keta*)^[47] 等大多数鱼类结构一致, 但本研究在尾部轴丝外围发现极少数囊泡, 这点与斜带石斑鱼^[48]一致。同时也发现, 同为硬骨鱼类的香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)^[49] 和鞍带石斑鱼不同, 其头部精子核的形态呈倒 U 字形、线粒体数量只有 1 个, 尾部鞭毛有侧鳍, 这些特点在

硬骨鱼类中比较少见。但是上述这些结构与同属赤点石斑鱼 (*E. akaara*)^[50]、条纹石斑鱼 (*E. fasciatus*)^[51] 和褐石斑鱼 (*E. bruneus*)^[52] 结构类似, 说明同科或亚科之间鱼类精子结构分布具有很高的相似性, 可以为物种分类提供一定的依据。

本研究发现, 精子经过超低温冷冻后, 主要造成鞍带石斑鱼精子质膜破损、线粒体脱落、鞭毛断裂或脱落, 这些损伤与大多数硬骨鱼类精子经过超低温冷冻后的损伤一样, 属于机械损伤, 为不可逆损伤。并且在其他鱼类形态异常的精子中均有发现, 例如本研究中精子尾部鞭毛脱落与西伯利亚鲟精子的损伤^[41] 结果一致、精子膜结构破损与兰州鲇精子的损伤^[45] 结果一致。造成这些损伤的原因可能是因为温度的改变, 若降温速率过快, 细胞外溶液冰晶大量形成, 溶质浓度急速升高, 细胞内外产生浓度差, 导致细胞脱水, 但是由于细胞膜的渗透性有限, 水分子来不及排除胞外, 造成胞内形成大量冰晶, 从而破坏细胞膜及细胞器等结构, 从而导致细胞死亡^[53]。以蓝贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 为例, 即使是同一物种, 使用不同的降温速率, 得到的精子激活率也不同^[54], 本实验中发现精子的结构损伤也证明了这一点。

3.3 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆能量代谢酶活性的影响

ATP 作为最重要的能量分子, 在细胞的各种生理过程中起着重要的作用, 其水平改变也会影响许多细胞的功能, 通常细胞在凋亡、坏死的情况下 ATP 水平会下降^[55]。琥珀酸脱氢酶 (SDH) 是三羧酸循环中唯一一个整合于膜上的多亚基酶, 是存在于线粒体中的一种标志酶, 其活性一般作为评价三羧酸循环运行程度的指标^[56], 其活性的强弱可以反映精子能量代谢的活跃程度, 也可以用来评价超低温冷冻前后精子线粒体功能^[13]。肌酸激酶主要存在于骨骼肌、脑的细胞浆和线粒体中, 与细胞内能量运转和 ATP 再生有直接关系^[57]。因此, 与能量代谢相关的酶活性高低也可以在一定程度上反映出精子活力的高低, 且可以作为精子冷冻损伤评价的重要参考指标。黄晓荣等^[13] 对大黄鱼精子超低温冷冻前后, 精子中的几种能量代谢酶的研究表明, 大黄鱼冻精中的能量代谢酶活性均显著低于鲜精。如果细胞内线粒体功能受损, 必将导致 ATP 合成受阻, 从而进一步影响 ATP 酶活性。Iaffaldano 等^[58] 检测公羊精子中 ATP 酶

活性时也发现, 精子活力与 ATP 含量呈正相关, 更重要的是与运动能力也呈正相关。观察黄姑鱼的精浆和精子在超低温冷冻前后酶活性的变化发现, 经过超低温冷冻后, 精浆能量代谢酶活性升高, 精子能量代谢酶活性降低^[59]。在日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 精浆和精子中也有同样发现^[60]。本研究中, 鞍带石斑鱼精子在超低温冷冻后, 精子内 ATP 含量显著下降, 且随着冷冻时间的延长而显著降低, SDH 和 CK 两种酶活性也有明显的降低。与之相反, 在经过超低温冷冻后, 精浆中 ATP 含量及 SDH 和 CK 两种酶活性会随着冷冻时间的延长而显著升高, 研究结果与黄姑鱼^[59] 和日本鳗鲡^[60] 的结果一致。造成精子在超低温冷冻后能量代谢酶活性降低的原因, 可能是因为精子在冻融过程中所经历的生理结构的改变, 如质膜破损、线粒体破损或其他结构的改变, 导致精子中酶类物质释放, 这也是精液在经过超低温冷冻后精子中酶活性会降低, 而精浆中酶活性反而会升高的原因, 电镜结果也反映了这一点。同时这些酶活性与精子活力之间存在紧密联系, 酶活性的下降势必会导致精子活力的下降, 因此这些酶活性的高低可以作为精子质量评价的参考依据。

3.4 超低温冷冻对鞍带石斑鱼精子及精浆抗氧化酶活性的影响

当生物体受到外界环境刺激时, 会产生大量活性氧 (ROS), 如果不能及时清除, 可能会对细胞结构造成严重损伤, 如 DNA 损伤、酶失活、脂质过氧化等一系列氧化损伤, 被称为氧化应激^[60]。生物体在长期进化中也形成了一套完整的抗氧化系统来清除体内多余的活性氧, 保护细胞免受氧化损伤作用, 与精子活力密切相关^[56]。抗氧化物分为两大类, 一种是内源性抗氧化物, 主要包括 SOD、CAT、GSH-Px、维生素 E、维生素 C、褪黑素 (MT) 等, 另一种是外源性抗氧化物, 主要包括氢气 (H₂)、茶多酚 (GTP) 等^[22]。总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 是降解活性氧自由基的第一道防线, 其活性水平是判断外界环境胁迫或氧化损伤的重要参数^[61-62]。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种催化过氧化氢分解的酶, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用, 具有清除脂质过氧化物的能力^[63]。CAT 是催化过氧化氢分解成氧和水的酶, 其活性也可以反映精子活力。Castro 等^[64] 研究了荷斯坦公牛精子低温保存前后 SOD 和 GSH 两种酶活性的变化, 发现两种酶活性没有显著差异。

花鲈 (*Lateolabrax maculatus*)^[56] 精子在经过超低温冷冻后 SOD 活性也没有显著差异, 仅靠生物体内的抗氧化酶不能修复由低温保存引起的损伤。长鳍篮子鱼 (*Siganus canaliculatus*)^[63] 精子经过超低温冷冻后, SOD 和 GSH 两种酶活性均显著下降。本研究中, 鞍带石斑鱼精子 SOD、CAT 和 GSH 三种酶在经过超低温冷冻后活性均显著下降, 随着冷冻时间延长活性降低, 精浆中 SOD 和 GSH 这两种酶活性在经过超低温冷冻后显著上升, CAT 活性上升虽不显著, 但也有上升趋势。此外, Thuwanut 等^[65] 在猫精子冷冻保存的研究中发现, 在抗冻剂中添加 SOD、GSH 和 CAT 抗氧化酶, 可以在一定程度上提高精子活力和质膜完整性, 也从反面证明了超低温冷冻会造成精子氧化应激。GR 是一种黄素酶, 是生物机体氧化还原系统内最为重要的酶之一, 可以维持细胞中还原性谷胱甘肽 (GSH) 含量。本研究中发现, 鞍带石斑鱼精子在经过超低温冷冻后, GR 活性反而会升高, 精浆内酶活性没有显著差异, 该研究结果与西伯利亚鲟^[12]、日本鳗鲡^[60]、长鳍篮子鱼^[63]、脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)^[66]、太平洋鲑^[67] 等的研究结果一致。精浆的作用是为精子提供最佳环境, 而对精子的抗氧化保护的主要来源也是精浆^[64], 在鱼类精子冷冻保存中需要配制合适的稀释液和抗冻剂, 其原理也是给精子提供良好的环境, 防止精子被激活。有的鱼类精子具有顶体, 顶体也被证明与精子活力、受精能力有直接关系^[68], 在鱼类冻精工作中都要考虑。

利用石斑鱼冷冻精子技术, 已经建立了鞍带石斑鱼、云纹石斑鱼、七带石斑鱼等 12 种石斑鱼精子冷冻库^[69], 实现了石斑鱼种质资源长期保存并广泛应用于石斑鱼杂交育种和优良苗种大量培育。田永胜等^[16] 利用鞍带石斑鱼冻精与云纹石斑鱼杂交培育出杂交新品种“云龙石斑鱼”。利用蓝身大斑石斑鱼 [*E. tuluca* (♂)] 冻精与棕点石斑鱼 [*E. fuscoguttatus* (♀)] 杂交培育出“金虎石斑鱼”^[70], 杂交新品种已经在我国南北方沿海规模化养殖。李振通等^[71] 发现, 利用蓝身大斑石斑鱼冻精与驼背鲈 (*Chromileptes altivelis*) 进行远缘杂交育种是可行的, 且杂交后代具有杂种优势。吴玉萍等^[4] 也利用鞍带石斑鱼冻精完成与褐石斑鱼、云纹石斑鱼的杂交, 说明冷冻精子在石斑鱼育种和苗种培育中已经得到了成功应用。本实验中, 鞍带石斑鱼亲鱼为 6~8 龄, 正处于繁育盛期, 在每次进

行精子冷冻保存工作前均会对精子质量进行现场检测评估, 镜检活力保持在 90% 以上, 年龄对精子活力产生的影响并不显著。以上实验结果显示, 长期冷冻会对精子运动、细胞结构和生理代谢产生不可避免的影响, 但并不影响冷冻精子在遗传育种、人工繁殖中的应用。同时实验结果提示, 为了有效降低长期冷冻对鞍带石斑鱼精子的损伤, 鞍带石斑鱼精子冷冻保存技术和种质库的建立方法等仍然需要进一步优化和完善。

4 结论

综上所述, 对鞍带石斑鱼精浆及精子在超低温冷冻后的生理、生化反应研究分析表明, 超低温冷冻会对精子产生一定的影响, 包括精子头部质膜破裂、中段脱落、鞭毛断裂或脱落、细胞死亡等。同时冷冻损伤造成的精子膜破损会使精子中大量的酶和蛋白质进入精浆中, 使精子内酶活性降低, 精浆内酶活性增高, 且冷冻损伤的情况会随着冷冻时间的增加而增加。其次, 通过计算机辅助精子分析系统 CASA 对精子运动情况进行分析, 发现超低温冷冻会使精子运动能力下降。因此, 冷冻后精液质量很难达到鲜精水平。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 陈晓婷, 林瑜, 路海霞, 等. 4种石斑鱼肌肉中营养成分分析与评价[J]. 渔业研究, 2020, 42(5): 463-472.
Chen X T, Lin Y, Lu H X, et al. Analysis and evaluation of nutritional components in the muscle of four grouper species[J]. Journal of Fisheries Research, 2020, 42(5): 463-472 (in Chinese).
- [2] 吕雪娇. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 和鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*) 生长特性以及骨骼发育与畸形研究 [D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2018.
Lü X J. Growth characteristic, osteological ontogeny and deformity in larval and juvenile *Scophthalmus maximus* and *Epinephelus lanceolatus*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, University of Chinese Academy of Sciences, 2018 (in Chinese).
- [3] 李子奇, 成美玲, 吴玉萍, 等. 鞍带石斑鱼(♀)×云纹石

- 斑鱼(♂)杂交后代早期发育及正反交后代生长特性[J]. 水产学报, 2020, 44(3): 436-446.
- Li Z Q, Cheng M L, Wu Y P, *et al.* Early development of hybrids of *Epinephelus lanceolatus* (♀)×*Epinephelus moara*(♂) and growth characteristics of reciprocal crosses[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(3): 436-446 (in Chinese).
- [4] 吴玉萍, 田永胜, 成美玲, 等. 鞍带石斑鱼(♂)与褐石斑鱼(♀)、云纹石斑鱼(♀)杂交后代变态发育和生长比较[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 23-32.
- Wu Y P, Tian Y S, Cheng M L, *et al.* Comparison of metamorphosis development and growth of hybrid offspring of *Epinephelus lanceolatus*(♂) and *E. bruneus*(♀) or *E. moara*(♀)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 23-32 (in Chinese).
- [5] Cai Q X, Wu X Y, Gatlin D M III, *et al.* Dietary vitamin C affects growth, antioxidant status and serum immune parameter of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) fed low fishmeal diets[J]. Aquaculture, 2022, 556: 738285.
- [6] 江东旭, 李香, 徐承旭. 黄海水产研究所等单位完成鞍带石斑鱼基因图谱绘制[J]. 水产科技情报, 2019, 46(5): 296.
- Jiang D X, Li X, Xu C X. The Yellow Sea Fisheries Research Institute and other units completed the *Epinephelus lanceolatus* gene map[J]. Fisheries Science and Technology Information, 2019, 46(5): 296 (in Chinese).
- [7] Chao N H, Liao I C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos[M]//Lee C S, Donaldson E M. Reproductive biotechnology in finfish aquaculture. Amsterdam: Elsevier, 2001: 161-189.
- [8] Davis R O, Katz D F. Standardization and comparability of CASA instruments[J]. Journal of Andrology, 1992, 13(1): 81-86.
- [9] 柳凌, Otomar L, 危起伟, 等. 计算机辅助对几种鲟鱼冻精激活液的比较[J]. 水产学报, 2007, 31(6): 711-720.
- Liu L, Otomar L, Wei Q W, *et al.* Comparative study of activating mediums for the cryopreserved sperm of several sturgeons using CASA[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(6): 711-720 (in Chinese).
- [10] Kolek L, Szczygieł J, Napora-Rutkowski Ł, *et al.* Effect of *Trypanoplasma borreli* infection on sperm quality and reproductive success of common carp (*Cyprinus carpio* L.) males[J]. Aquaculture, 2021, 539: 736623.
- [11] Koh I C C, Yokoi K I, Tsuji M, *et al.* Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Cryobiology, 2010, 61(3): 263-267.
- [12] 周洲, 李世凯, 赵飞, 等. 超低温冷冻保存对西伯利亚鲟精子酶活性的影响[J]. 贵州农业科学, 2020, 48(1): 77-80.
- Zhou Z, Li S K, Zhao F, *et al.* Effect of cryopreservation on enzymatic activity of *Acipenser baerii* spermatozoa[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2020, 48(1): 77-80 (in Chinese).
- [13] 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 超低温冷冻保存对大黄鱼精子酶活性的影响[J]. 海洋渔业, 2012, 34(4): 438-443.
- Huang X R, Zhang L Z, Zhuang P, *et al.* Effects of cryopreservation on enzyme activity of spermatozoa in *Pseudosciaena crocea*[J]. Marine Fisheries, 2012, 34(4): 438-443 (in Chinese).
- [14] He S Y, Woods L C. Changes in motility, ultrastructure, and fertilization capacity of striped bass *Morone saxatilis* spermatozoa following cryopreservation[J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 677-686.
- [15] 韩龙江, 刘清华, 许飞, 等. 长牡蛎精子超低温冷冻后超微结构损伤研究[J]. 水生生物学报, 2017, 41(1): 220-227.
- Han L J, Liu Q H, Xu F, *et al.* Study on ultrastructure observation of fresh and cryopreserved sperm in *Crassostrea gigas*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(1): 220-227 (in Chinese).
- [16] 田永胜, 陈张帆, 段会敏, 等. 鞍带石斑鱼冷冻精子与云纹石斑鱼杂交家系建立及遗传效应[J]. 水产学报, 2017, 41(12): 1817-1828.
- Tian Y S, Chen Z F, Duan H M, *et al.* The family line establishment of the hybrid *Epinephelus moara*(♀) × *E. lanceolatus*(♂) by using cryopreserved sperm and the related genetic effect analysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(12): 1817-1828 (in Chinese).
- [17] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161-168.
- Chen S L. Progress and prospect of cryopreservation of

- fish gametes and embryos[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(2): 161-168 (in Chinese).
- [18] Irawan H, Vuthiphandchai V, Nimrat S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm[J]. *Animal Reproduction Science*, 2010, 122(3-4): 236-243.
- [19] Tian Y S, Jiang J, Wang N, *et al.* Sperm of the giant grouper: cryopreservation, physiological and morphological analysis and application in hybridizations with red-spotted grouper[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2015, 61(4): 333-339.
- [20] 赵建清. 超长时间低温保存绵羊精液对精子遗传物质的影响 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2021.
Zhao J Q. Effects of long-term low temperature storage of sheep semen on sperm genetic substance[D]. Alaer: Tarim University, 2021 (in Chinese).
- [21] 段元彬. 番鸭精液液态保存研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
Duan Y B. Study on liquid preservation of Muscovy duck semen[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2020 (in Chinese).
- [22] 任尚. 氢气对猪精液保存效果的影响 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2021.
Ren S. Effect of hydrogen on the preservation effects of boar semen[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [23] Peatpisut T, Bart A N. Cryopreservation of sperm from natural and sex-reversed orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 42(1): 22-30.
- [24] 王建福, 李洁, 邵淑娟, 等. 鲤鱼精子染色方法学研究 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2013, 48(3): 19-23.
Wang J F, Li J, Shao S J, *et al.* A study on different staining methods to *Cyprinus carpio* spermatozoon[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2013, 48(3): 19-23 (in Chinese).
- [25] 闫秀明, 张小雪, 王露媛. 四种常见染料对黄鳍鲷、冻精子染色效果的比较[J]. *水产科技情报*, 2011, 38(5): 268-272.
Yan X M, Zhang X X, Wang L Y. Comparison of the dyeing effect of four common dyes on *Monopterus albus* fresh and frozen sperm[J]. *Fisheries Science and Technology Information*, 2011, 38(5): 268-272 (in Chinese).
- [26] Lin J X, Liu W J, Cai S J. An efficient approach for cryopreservation of the king grouper (*Epinephelus lanceolatus*) spermatozoa[J]. *Platax*, 2010, 2010(7): 57-66.
- [27] 胡庭溪, 朱化彬, 杜卫华. 计算机辅助精子分析系统的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2014, 50(21): 73-77.
Hu T X, Zhu H B, Du W H. The research progress on computer-assisted sperm analysis system[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2014, 50(21): 73-77 (in Chinese).
- [28] 林秋敏, 赖宝色. 精子运动性能对精子质量影响的研究进展[J]. *畜禽业*, 2022, 33(9): 1-5.
Lin Q M, Lai B S. Research progress on the effect of sperm motility on sperm quality[J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2022, 33(9): 1-5 (in Chinese).
- [29] Park J Y, Zidni I, Lee Y H, *et al.* Effect of long-term storage on the quality of cryopreserved sperm of the giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*[J]. *Aquaculture*, 2022, 555: 738154.
- [30] Kim S C, Hossen S, Kho K H. Effects of 3 years of cryopreservation on sperm quality of seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(7): 3050-3053.
- [31] 刘光霞, 吴兴兵, 何勇凤, 等. 圆口铜鱼精子超低温冷冻保存[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(1): 44-52.
Liu G X, Wu X B, He Y F, *et al.* Cryopreservation and its effects on spermatozoa quality of *Coreius guichenoti*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(1): 44-52 (in Chinese).
- [32] 黄晓荣, 冯广朋, 刘鉴毅, 等. 计算机辅助分析冷冻前后褐牙鲈精子运动特征[J]. *海洋渔业*, 2019, 41(1): 73-81.
Huang X R, Feng G P, Liu J Y, *et al.* Motility characteristics of fresh and frozen sperm of *Paralichthys olivaceus* using computer-assisted sperm analysis[J]. *Marine Fisheries*, 2019, 41(1): 73-81 (in Chinese).
- [33] 郑学斌, 杜晨, 王景倩, 等. 小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 精子的生理特性及超低温冷冻保存研究[J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(1): 193-205.

- Zheng X B, Du C, Wang J Q, *et al.* Physiological characteristics and cryopreservation effect of *Larimichthys polyactis* sperm[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(1): 193-205 (in Chinese).
- [34] Gallego V, Pérez L, Asturiano J F, *et al.* Sperm motility parameters and spermatozoa morphometric characterization in marine species: a study of swimmer and sessile species[J]. *Theriogenology*, 2014, 82(5): 668-676.
- [35] Palacín I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, *et al.* Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram[J]. *Small Ruminant Research*, 2013, 112(1-3): 128-135.
- [36] 宋莉妮, 田永胜, 李祥孔, 等. 钝吻黄盖鲈精子冷冻保存及生理特性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(4): 584-592.
- Song L N, Tian Y S, Li X K, *et al.* Cryopreservation of marbled flounder (*Pseudopleuronectes yokohamae*) sperm and analysis of its physiological characteristics[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(4): 584-592 (in Chinese).
- [37] 陈亚静, 付雪林, 伍曼婷, 等. 种猪常温精液新旧标准检测方法的比较研究[J]. *标准科学*, 2022(6): 117-123.
- Chen Y J, Fu X L, Wu M T, *et al.* Comparative study on boar liquid semen quality detection with different methods[J]. *Standard Science*, 2022(6): 117-123 (in Chinese).
- [38] 黄瑞, 黄标武, 李林春, 等. 近江蛭精子超微形态结构观察及与缙蛭精子的比较[J]. *水产学报*, 2011, 35(1): 58-65.
- Huang R, Huang B W, Li L C, *et al.* Comparative ultrastructure of spermatozoa of *Sinonovacula rivularis* sp. nov. and *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(1): 58-65 (in Chinese).
- [39] 曾玉峰, 阎萍, 林金杏, 等. 哺乳动物精子超微结构研究进展[J]. *江西农业学报*, 2010, 22(9): 107-109.
- Zeng Y F, Yan P, Lin J X, *et al.* Research progress in ultrastructure of spermatozoa in mammals[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(9): 107-109 (in Chinese).
- [40] 黄晓荣, 张涛, 冯广朋, 等. 超低温冷冻对俄罗斯鲟精子形态结构的影响[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(6): 640-648.
- Huang X R, Zhang T, Feng G P, *et al.* Effects of cryopreservation on morphology and ultrastructure of *Acipenser gueldenstaedti* spermatozoa[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(6): 640-648 (in Chinese).
- [41] 章龙珍, 刘鹏, 庄平, 等. 超低温冷冻对西伯利亚鲟精子形态结构损伤的观察[J]. *水产学报*, 2008, 32(4): 558-565.
- Zhang L Z, Liu P, Zhuang P, *et al.* Observation on cryo-damage of spermatozoa of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(4): 558-565 (in Chinese).
- [42] 谷伟, 张永泉, 户国, 等. 虹鳟精子的扫描和透射电镜观察[J]. *水产学杂志*, 2014, 27(5): 24-27.
- Gu W, Zhang Y Q, Hu G, *et al.* Scanning and transmission electron microscopic observation of spermatozoon in rainbow trout[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2014, 27(5): 24-27 (in Chinese).
- [43] 廖光勇, 区又君, 李加儿, 等. 七带石斑鱼精子的超微结构[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(1): 71-75.
- Liao G Y, Qu Y J, Li J E, *et al.* Ultrastructure of spermatozoa in *Epinephelus septemfasciatus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(1): 71-75 (in Chinese).
- [44] 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[J]. *海洋科学*, 2013, 37(2): 70-75.
- 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 (in Chinese).
- [45] 邢露梅, 肖伟, 李兰兰, 等. 兰州鲇精液超低温冷冻保存技术研究及细胞损伤检测[J]. *水生生物学报*, 2021, 45(3): 547-556.
- Xing L M, Xiao W, Li L L, *et al.* Study of sperm cryopreservation in *Silurus lanzhouensis* and detection of cell damages after cryopreservation[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(3): 547-556 (in Chinese).
- [46] 韩龙江, 刘清华, 于道德, 等. 太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)精液超低温冷冻方法的建立及精子超微结构分析[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(4): 789-797.
- Han L J, Liu Q H, Yu D D, *et al.* Cryopreservation and ultrastructure of *Gadus macrocephalus* sperm[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(4): 789-797

- (in Chinese).
- [47] 尹洪滨, 孙中武, 潘伟志, 等. 大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 精子超微结构的研究 [C]//中国农学会. 2005 年全国学术年会农业分会场论文专集. 中国农学通报期刊社, 2005: 26-28.
Yin H B, Sun Z W, Pan W Z, *et al.* Ultrastructure of can-nabis salmon (*Oncorhynchus keta*) spermatozoa[C]// Chinese Association of Agricultural Science Societies. 2005 National Academic Annual Conference Agriculture Sub-Conference Paper Collection. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005: 26-28 (in Chinese).
- [48] 赵会宏, 刘晓春, 林浩然, 等. 斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、温度、pH对精子活力及寿命的影响[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(4): 286-292.
Zhao H H, Liu X C, Lin H R, *et al.* Ultrastructure of spermatozoa and effects of salinity, temperature and pH on spermatozoa motility in *Epiniphelus coioides*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(4): 286-292 (in Chinese).
- [49] 郑学斌, 张清科, 乐韵, 等. 香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 精子的超微结构及其与鲤形目及鲑形目其他鱼类精子结构的比较研究[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(4): 866-872.
Zheng X B, Zhang Q K, Yue Y, *et al.* Scanning and transmission electron microscopic observation of spermatozoon in *Plecoglossus altivelis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(4): 866-872 (in Chinese).
- [50] 舒琥, 刘晓春, 张勇, 等. 赤点石斑鱼精子发生和形成的超微结构研究[J]. *中山大学学报 (自然科学版)*, 2005, 44(4): 103-106.
Shu H, Liu X C, Zhang Y, *et al.* Ultrastructure of spermatogenesis and spermiogenesis in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*)[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(4): 103-106 (in Chinese).
- [51] Kim S H, Lee C H, Song Y B, *et al.* Ultrastructure of blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus* spermatozoa[J]. *Applied Microscopy*, 2012, 42(2): 61-66.
- [52] Kim S H, Lee C H, Song Y B, *et al.* Ultrastructure of late spermatids and spermatozoa during spermiogenesis in longtooth grouper *Epinephelus bruneus* from Jeju, Korea[J]. *Tissue and Cell*, 2013, 45(4): 261-268.
- [53] 蒋沛, 火晓越, 刘宝林, 等. 细胞低温保存过程中冰晶成核的研究进展[J]. *制冷学报*, 2020, 41(2): 159-166.
Jiang P, Huo X Y, Liu B L, *et al.* Ice nucleation during cell cryopreservation: a review[J]. *Journal of Refrigeration*, 2020, 41(2): 159-166 (in Chinese).
- [54] Liu Y B, Liu S W, Liu B L, *et al.* Cryopreservation of strip spawned sperm using programmable freezing technique in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, 36(6): 2351-2357.
- [55] Kommisrud E, Myromslien F D, Stenseth E B, *et al.* Viability, motility, ATP content and fertilizing potential of sperm from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in milt stored before cryopreservation[J]. *Theriogenology*, 2020, 151: 58-65.
- [56] 史应学, 程顺, 竺俊全, 等. 中国花鲈精子的超低温冷冻保存及酶活性检测[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(6): 1241-1247.
Shi Y X, Cheng S, Zhu J Q, *et al.* Sperm cryopreservation and enzyme activity detection in *Lateolabrax maculatus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(6): 1241-1247 (in Chinese).
- [57] Jia P Y, Guo H Y, Liu B S, *et al.* Effects of cryopreservation on the physiological characteristics and enzyme activities of yellowfin seabream sperm, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn 1782)[J]. *Aquaculture*, 2022, 549: 737739.
- [58] Iaffaldano N, Paventi G, Pizzuto R, *et al.* Helium-neon laser irradiation of cryopreserved ram sperm enhances cytochrome c oxidase activity and ATP levels improving semen quality[J]. *Theriogenology*, 2016, 86(3): 778-784.
- [59] Huang X R, Zhuang P, Zhang L Z, *et al.* Effects of cryopreservation on motility characteristics and enzyme activity of sperm in a Chinese fish *Nibea albiflora*[J]. *Cryo Letters*, 2014, 35(4): 267-276.
- [60] 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 超低温冷冻对日本鳎精子酶活性的影响[J]. *海洋渔业*, 2008, 30(4): 297-302.
Huang X R, Zhang L Z, Zhuang P, *et al.* Cryopreservational effects on the spermatid enzyme's activities of

- Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. *Marine Fisheries*, 2008, 30(4): 297-302 (in Chinese).
- [61] 段鹏飞, 田永胜, 李振通, 等. 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与棕点石斑鱼低氧耐受能力初步研究[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(2): 220-233.
- Duan P F, Tian Y S, Li Z T, *et al.* Hypoxia tolerance of *Epinephelus fuscoguttatus*(♀) × *E. tukula*(♂) hybrids and *E. fuscoguttatus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(2): 220-233 (in Chinese).
- [62] 姜静, 田永胜, 翟介明, 等. 超低温冷冻保存对七带石斑鱼胚胎酶活性的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(4): 476-485.
- Jiang J, Tian Y S, Zhai J M, *et al.* Effects of cryopreservation on enzyme activity in seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* embryos[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(4): 476-485 (in Chinese).
- [63] 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子中几种酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2009, 33(7): 16-22.
- Huang X R, Zhang L Z, Zhuang P, *et al.* Effects of cryopreservation on enzyme activity of *Siganus canaliculatus* spermatozoa[J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(7): 16-22 (in Chinese).
- [64] Castro L S, Hamilton T R S, Mendes C M, *et al.* Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7(1): 17.
- [65] Thuwanut P, Chatdarong K, Johannisson A, *et al.* Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of *in vitro* antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction[J]. *Theriogenology*, 2010, 73(8): 1076-1087.
- [66] 浦蕴惠, 许星鸿, 高焕, 等. 超低温冷冻对脊尾白虾精子几种酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(1): 101-108.
- Pu Y H, Xu X H, Gao H, *et al.* Effects of cryopreservation on enzyme activity of *Exopalaemon carinicauda* spermatozoa[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(1): 101-108 (in Chinese).
- [67] Wang X Y, Shi X H, Liu Y F, *et al.* Effects of chilled storage and cryopreservation on sperm characteristics, antioxidant enzyme activities, and lipid peroxidation in Pacific cod *Gadus microcephalus*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, 34(4): 763-771.
- [68] 黄晓荣, 张涛, 冯广朋, 等. 超低温冷冻对俄罗斯鲟精子顶体酶活性及DNA损伤的影响[J]. *海洋渔业*, 2016, 38(5): 487-494.
- Huang X R, Zhang T, Feng G P, *et al.* Effects of cryopreservation on acrosin activity and DNA damage of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) semen[J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(5): 487-494 (in Chinese).
- [69] 田永胜. 石斑鱼杂交育种理论与技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Tian Y S. Hybridization breeding theory and technology of groupers[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [70] 田永胜, 唐江, 马文辉, 等. 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀)杂交后代发育及生长特征分析[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 36-47.
- Tian Y S, Tang J, Ma W H, *et al.* Development and growth of hybrid offspring of brown grouper *Epinephelus fuscoguttatus*(♀) × blue speckled grouper *Epinephelus tukula*(♂) using cryopreserved sperm[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 36-47 (in Chinese).
- [71] 李振通, 田永胜, 成美玲, 等. 驼背鲈(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交子代发育及生长比较[J]. *南方水产科学*, 2020, 16(1): 17-26.
- Li Z T, Tian Y S, Cheng M L, *et al.* Comparison of development and growth of hybrid *Chromileptes altivelis*(♀) × *Epinephelus tukula*(♂)[J]. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(1): 17-26 (in Chinese).

Effects of long-term cryopreservation on ultrastructure and enzyme activity of *Epinephelus lanceolatus* sperm

DING Xiaoyu^{1,2}, LI Zhentong^{2,3}, DUAN Pengfei^{2,4}, QIU Yishu^{1,2}, WANG Xinyi^{2,4}, LI Linlin^{2,3},
WANG Linna^{2,3}, LIU Yang^{2,3}, LI Wensheng⁵, WANG Qingbin⁵, ZHAO Xia⁵,
TIAN Yongsheng^{2,3*}, LI Shengzhong^{1*}

(1. College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;

4. College of Fishers and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

5. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Laizhou 261400, China)

Abstract: This paper aims to explore the changes in plasma membrane, vitality, ultrastructure and enzyme activity of giant grouper sperm in cryopreservation, and provides a theoretical basis for elucidating the relevant mechanisms affecting the cryopreservation quality of sperm. The semen of giant grouper was collected and stored for 0, 23, 49 and 61 months. Plasma membrane integrity was assessed in fresh sperm and cryopreserved sperm by Y-aniline black staining. The motion parameters of giant grouper sperm before and after cryopreservation were analyzed using computer assisted sperm analysis system. Changes in the activity of six enzymes (SDH, CAT, GR, T-SOD, GSH-Px and CK) ATP content were measured for seminal plasma and sperm. The ultrastructure of fresh and cryopreserved sperm was observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. Fresh sperm had the highest plasma membrane integrity of 83.43%±2.73%, and sperm plasma membrane integrity was significantly reduced after cryopreservation ($P<0.05$). CASA results showed that the highest mobility was 90.47%±3.34%. Sperm motility was significantly reduced after cryopreservation ($P<0.05$), but its value stayed within the range of 63.95%±3.66%-68.58%±2.73% after 23-61 months of storage. The VSL VCL and VAP value of cryopreserved sperm had no significant difference compared to fresh sperm ($P>0.05$). The ultrastructure of fresh sperm showed that the sperm morphology and structure were normal, the mitochondria were arranged regularly, with normal morphology and size. After cryopreservation, the sperm morphology and structural damage was obvious. The damage is manifested as sperm head plasma membrane damage, cytoplasmic leakage, cell nuclear membrane damage, flagella fracture or shedding of the tail. The results of changes in the activities of six enzymes and ATP contents of seminal plasma and spermatozoa before and after cryopreservation freezing of giant grouper sperm showed that after cryopreservation, three enzymes, SOD, GSH-Px and CAT, and ATP contents in spermatozoa were significantly reduced. The enzyme activities in seminal plasma were increased, and all the enzyme activities were significantly different except for GR and CAT. Cryopreservation had a great effect on the enzyme's activities, ultrastructure and spermatozoa energy of fish. The results have accumulated rich data for the mechanism of frozen fish sperm damage, and provided a technical reference and evaluation index for the long-term cryopreservation of fish sperm.

Key words: *Epinephelus lanceolatus*; sperm; cryopreservation; ultrastructure; enzyme activities; computer assisted sperm analysis system (CASA)

Corresponding authors: TIAN Yongsheng. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn;

LI Shengzhong. E-mail: xndlishengzhong@sina.cn

Funding projects: Program of Shandong Leading Talent (LJNY202109); China Agricultural Research System (CARS-47); Key Research and Development Project of Shandong Province (2022LZGC016, 2021LZGC028); Key Research and Development Project of Hainan Province (ZDYF2022XDNY243); Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2019LZGC020); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020XT06, 2020TD19, 2020TD25)