

云纹石斑鱼精子冷冻保存

齐文山^{1,2} 姜 静^{1,2} 田永胜^{2*} 翟介明³ 陈 超² 李 波³ 陈松林²

(¹ 上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³ 山东莱州明波水产有限公司, 烟台 261418)

摘 要 以云纹石斑鱼精液为实验材料, 对精子稀释液、抗冻剂种类和适宜浓度、冷冻保存液进行了筛选。结果表明, 利用 9 g/L NaCl、10 g/L KHCO₃ 和 10% 小牛血清配制而成的稀释液 EM1-2 适宜于云纹石斑鱼精子冷冻保存, 以 2ml 冷冻管为精子容器, 在 60L 液氮生物保存罐中冷冻保存精子, 冷冻解冻精子活力可达 56.67%±5.77%, 要优于 TS-2、ES1-3 和其他 EM 系列稀释液冷冻保存精子活力。利用 EM1-2 为基础液对抗冻保护剂进行筛选, 结果显示, 10%~20% 的二甲基亚砜(DMSO) 和 1-2-丙二醇(PG) 冷冻保存后精子活力无显著差异($P>0.05$), 其中 15% 的 DMSO 和 10% PG 冷冻保存精子效果最优, 解冻后精子活力分别可达 54.52%±7.81% 和 57.24%±3.69%。利用冷冻保存 1 年的精液与云纹石斑鱼卵进行受精, 受精率和孵化率均达到 80% 以上, 与新鲜精子无显著性差异($P>0.05$)。本研究表明, 利用 EM1-2 配制 15% 的 DMSO 或 10% 的 PG 可用于冷冻保存云纹石斑鱼精液。在此基础上, 建立了精子冷冻库, 保存精子 130ml, 为人工繁育和杂交育种提供了丰富的精子源。

关键词 云纹石斑鱼; 精子; 冷冻保存; 精子稀释液

中图分类号 S962 **文献标志码** A **文章编号** 1000-7075(2014)01-0026-08

Sperm cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara*

QI Wen-shan^{1,2} JIANG Jing^{1,2} TIAN Yong-sheng^{2*} ZHAI Jie-ming³
CHEN Chao² LI Bo³ CHEN Song-lin²

(¹ College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(³ Mingbo Aquatic Co. Ltd. Laizhou, Yantai 261418)

ABSTRACT To study the cryopreservation of *Epinephelus moara* sperm, mature *E. moara* semen was used as experimental material, and concentration of various semen diluents, and concentration of cryoprotectant were screened. We used 60L liquid nitrogen jars and 2ml freezing tubes to preserve sperms by “three-step cooling procedure”. The result showed that, EM1-2 se-

“863” 高技术研究发展计划(2012AA10A402; 2012AA10A408)、国家自然科学基金项目(30972244)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助

* 通讯作者。E-mail: tianys@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85831605

收稿日期: 2013-01-05; 接受日期: 2013-03-20

作者简介: 齐文山(1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类低温生物学研究。E-mail: qwsh1123@163.com

men diluent prepared with 9g/L NaCl, 10g/L KHCO_3 and 10% FBS(fetal bovine serum) was better than TS-2, ES1-3 and other EM semen diluents, which preserved $56.67\% \pm 5.77\%$ sperm motility after unfrozen. Using EM1-2 as the liquid foundation to prepare cryoprotectant, no significant difference was observed in sperm motility by 10%-20% DMSO and PG cryopreservation($P>0.05$). The best of all is 15% DMSO and 10% PG, which preserved $54.52\% \pm 7.81\%$ and $57.24\% \pm 3.69\%$ sperm motility respectively after unfrozen. Using 1-year cryopreserved semen to fertilize *E. moara* eggs, the rates of fertilization and hatching reached 80% or above, without significant difference with fresh sperms($P>0.05$). Our study showed that 15% DMSO or 10% PG using EM1-2 as the liquid foundation could cryopreserve *E. moara* semen. We established a frozen sperm library based on this study, and it will provide a basis for the artificial breeding and cross breeding.

KEY WORDS *Epinephelus moara*; Sperm; Cryopreservation; Diluents

云纹石斑鱼 *Epinephelus moara* 属鲈形目 Perciformes、鲷科 Serranidae、石斑鱼亚科 Epinephelinae、石斑鱼属 *Epinephelus*, 俗称油斑, 是一种暖水性底层鱼类, 在我国主要分布在东海和南海, 是我国南方海水养殖重要品种之一(郭明兰等 2008)。近年来随着养殖技术的不断进步, 养殖品种南北方交流增多, 云纹石斑鱼在我国北方地区也开始养殖(梁友等 2011)。云纹石斑鱼和大部分石斑鱼一样都属于雌雄同体、雌性先熟鱼类(吕明毅 1989), 在实际养殖过程中, 常出现雄鱼数量少和雌雄鱼发育不同步的现象(林浩然 2012), 极大地限制了云纹石斑鱼人工繁殖、苗种大量培育和大规模养殖推广。

鱼类精子冷冻保存技术研究起始于二十世纪 50 年代初期(Blaxter 1953), 该技术在鱼类人工繁育、杂交育种、选择育种、雌核发育诱导等方面均表现出巨大的应用潜力。近年来在海水鱼类精子冷冻保存研究方面, 主要对真鲷 *Pagrosomus major* (区又君等 1998)、黑鲷 *Sparus macrocephalus* (江世贵等 1999)、大菱鲆 *Scophthalmus maximus* (Dreanno et al. 1997; Chen et al. 2004)、美洲黄盖鲽 *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson et al. 1999)、日本鳗鲡 *Anguilla japonica* (Tanaka et al. 2002)、舌齿鲈 *Dicentrarchus labrax* (Sansone et al. 2002)、鲈鱼 *Lateolabrax japonicus* (Ji et al. 2004)、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (Zhang et al. 2003)、圆斑星鲽 *Verasper variegatus* (Tian et al. 2003)、半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* (田永胜等 2009) 等鱼类的精子进行了冷冻保存研究。在石斑鱼精子冷冻保存研究方面, 目前报道的主要有点带石斑鱼 *Epinephelus malabaricus* (Chao 1992; Gwo 1993)、七带石斑鱼 *Epinephelus septemfasciatus* (Koh et al. 2010; 区又君等 2010) 等。另外中国水产科学研究院黄海水产研究所水产基因组与细胞工程实验室还进行了七带石斑鱼、赤点石斑鱼和鞍带石斑鱼的精子冷冻保存研究工作, 均获得了较好的冷冻保存效果。Miyaki 等(2005)以海藻糖作为精子保存液, 采用麦管冷冻保存了云纹石斑鱼精子, 虽然获得了较高的受精率, 但由于冷冻量较小, 在生产中应用并不广泛。为此, 为解决云纹石斑鱼人工繁殖育苗中精子严重不足的问题, 对云纹石斑鱼精子冷冻保存进行研究, 以期对云纹石斑鱼的人工授精、杂交育种、品种选育、雌核发育及海水鱼类精子库的建立等研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 精液和卵的采集

本研究于 2011 年 6~7 月, 2012 年 6 月在山东莱州明波水产有限公司进行。挑选发育良好的云纹石斑鱼亲鱼注射催产激素, 雄鱼使用绒毛膜促性腺激素(HCG)200 IU/kg、促排卵激素类似物(LHRH-A3)20 μ g/kg, 在亲鱼胸鳍基部注射, 雌鱼注射剂量加倍。催产 2d 后, 采用人工挤压的方法采集成熟精卵, 利用 10 mg/L 的 MS-222(间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐)麻醉亲鱼, 用纸巾擦干亲鱼腹部和生殖孔区域, 向后轻压腹部生殖腺部

位,精液用吸管收集后,注入干燥的冷冻管(2ml)中,卵用 1 000ml 的量杯收集,之后进行冷冻保存和受精实验。

1.2 精子稀释液和冷冻保存液的配制

利用葡萄糖(Glu)、蔗糖(Suc)、NaCl、KCl、NaHCO₃、KHCO₃、小牛血清、Tris 碱配制精子稀释液,配方见表 1。

表 1 实验用精子稀释液组成
Table 1 Composition of the sperm diluent in the experiment

溶液组成 Solution composition(g/L)	Glu	Suc	NaCl	KCl	NaHCO ₃	KHCO ₃	Tris	FBS(v/v)(%)
TS-2		37.6				10	2.1	10
ES1-3	60		10		0.5			
EM1	40		9			10		
EM2			5.9	7.5			2.4	
EM1-1	40		10	1				
EM1-2			9			10		10
EM1-3	40		6	8			2.4	
EM1-4			10	1				10
EM1-5			6	8				10
EM1-6	40		8			5		

1.3 精子冷冻保存液的筛选

首先利用 TS-2(Chen *et al.* 2004)、ES1-3、EM1 和 EM2 几种稀释液,分别加入 20%二甲基亚砷(DMSO)配制成精子冷冻保存液。将采集的云纹石斑鱼精液 0.5ml 加入冷冻管中,再加入以上几种冷冻保存液 0.5ml,以 1:1 比例稀释精液,平衡(1~2)min,将精子冷冻管盛入小布袋中,采用“三步冷冻法”(Ji *et al.* 2004)将其放入液氮中冷冻保存,冷冻(9~12)h。

解冻前将精子冷冻管从液氮中取出,38℃水浴解冻,解冻时需摇动。解冻后用牙签蘸取少许精液涂抹在载玻片上,滴加 100 μ l 海水激活,利用 Nikon E200 显微镜观察和记录精子活力、快速运动时间和寿命,重复 3 次。精子活力为随机视野中运动精子占该视野全部精子的百分数。快速运动时间为精子激活到转入慢速运动的时间(sec)。精子寿命为从精子激活开始运动到 99%精子停止运动的时间(sec)。

再利用筛选的稀释液 EM1 为基础,配制 EM1-1、EM1-2、EM1-3、EM1-4、EM1-5、EM1-6 共 6 种稀释液,在稀释液中分别配制 20%DMSO,利用相同方法冷冻、解冻和观察精子运动,重复 3 次。筛选出冷冻后精子活力高、快速运动时间和寿命长的稀释液配方。

1.4 适宜抗冻剂的筛选

利用筛选到的适宜精子稀释液 EM1-2 分别配制 20%的 DMSO、二甲基乙酰胺(DMAC)、1,2-丙二醇(PG)和甘油(Gly),采用 1:1 比例稀释精液,按照相同方法冷冻、解冻、观察精子活力、测定快速运动时间和寿命,筛选出适宜冷冻精子的抗冻剂。

利用筛选到的精子稀释液 EM1-2 分别配制 10%、15%和 20%的 DMSO 或 PG,采用 1:1 比例稀释精液,按照 1.3 中方法冷冻保存 9h,在 38℃水浴中解冻,在显微镜下观察精子活力,依据精子活力筛选出适宜冷冻精子的抗冻剂浓度。

1.5 冷冻精子受精实验

用以上筛选的最优抗冻保护液冷冻保存云纹石斑鱼精液,冷冻保存 1 年。将采集的云纹石斑鱼未受精卵

分别盛于3个1 000ml烧杯中,每份50ml,从液氮罐中分别提取用两种抗冻保护液冷冻保存的云纹石斑鱼精液各1管(1ml)。用相同方法解冻后,分别将解冻后的精液注入其中一个烧杯的卵中,加入22℃海水后摇动,使精卵混合、受精。同时采集0.5ml云纹石斑鱼新鲜精液,注入另一烧杯的卵中,用同样的方法受精。然后将受精卵分别放入0.5m³的网箱中孵化,孵化水温保持在(20~22)℃。受精约6h后,发育至囊胚期,取不少于100粒卵在显微镜下观察统计受精率。另分别取鲜精和冻精受精的受精卵100粒于烧杯中,各3份,在同样的孵化环境下孵化,出苗后统计鱼苗数量比例,计算孵化率。

1.6 云纹石斑鱼精子库的建立及其应用

以筛选到的EM1-2为稀释液,利用60L大型液氮生物保存罐、2ml冷冻管和冻存盒等材料,进行云纹石斑鱼精子冷冻库的建立。并在云纹石斑鱼和七带石斑鱼繁殖季节,在38℃水浴中解冻保存的精子,以体积比为1:500的精卵比例,分别与云纹石斑鱼卵和七带石斑鱼鱼卵进行人工育苗和杂交育种试验。

1.7 数据处理

利用SPSS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法进行多重比较和差异显著性分析,显著性水平为 $P=0.05$ 。所得数据利用Excel软件作图。

2 结果

2.1 云纹石斑鱼精子稀释液筛选

分别利用TS-2、ES1-3、EM1和EM2几种稀释液冷冻保存云纹石斑鱼精子,解冻后精子活力分别达到 $51.56\% \pm 4.69\%$ 、 $48.44\% \pm 2.71\%$ 、 $54.69\% \pm 7.16\%$ 和 $50.00\% \pm 2.71\%$,各组间无显著性差异($P>0.05$),且均与鲜精(FS)有显著性差异($P<0.05$),但利用EM1冷冻保存的效果要好于其他4种稀释液(图1)。

以EM1为基础的系列稀释液冷冻保存云纹石斑鱼精子的结果显示,利用EM1-2冷冻保存效果要好于其他几种系列稀释液,解冻后精子活力达到 $56.67\% \pm 5.77\%$ ($P>0.05$),鲜精活力为 $75.00\% \pm 5.00\%$,与鲜精有显著性差异($P<0.05$)(图2)。EM1-4冷冻保存精子的活力最低,为 $33.33\% \pm 2.89\%$,其他几种稀释液冷冻保存精子活力为 $45.00\% \sim 54.68\%$,无显著性差异($P>0.05$)。但从解冻激活后精子快速运动时间上,EM1-2冷冻保存后精子快速运动时间达 (490.33 ± 48.99) s,要显著高于其他配方和鲜精($P<0.05$),并且精子寿命与鲜精无显著性差异($P>0.05$)。

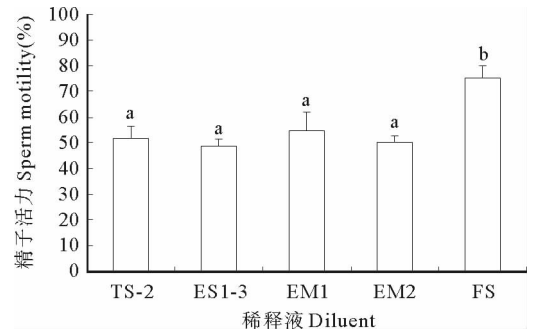


图1 云纹石斑鱼精子在不同稀释液中冷冻保存解冻后活力($n=3, P<0.05$)

Fig.1 Motility of frozen-thawed sperm of *E. moara* with different diluent

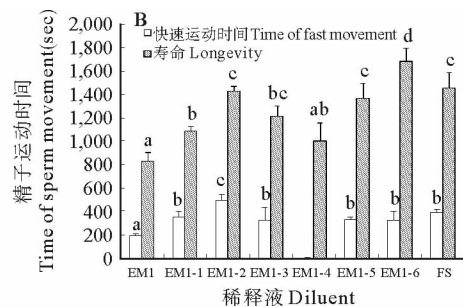
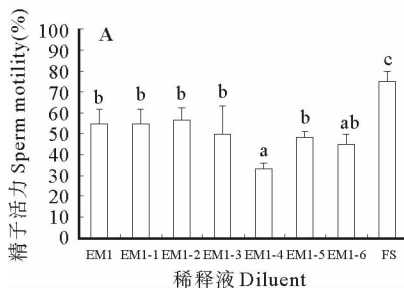


图2 精子在不同EM1系列稀释液中冷冻后活力(A)、快速运动时间和寿命(B)($n=3, P<0.05$)

Fig.2 Motility (A), fast movement and longevity (B) of fresh and frozen-thawed *E. moara* sperm with different EM1 diluent

2.2 抗冻剂种类的筛选

以 EM1-2 为稀释液,不同种类抗冻剂冷冻保存云纹石斑鱼精子的实验结果显示,PG 和 DMSO 冷冻保存精子的活力最高,分别达到 $62.50\% \pm 7.16\%$ 和 $48.44\% \pm 2.71\%$,与 DMAC 和 Gly 两种抗冻剂的冷冻活力有显著性差异($P < 0.05$),精子在甘油中冷冻没有活力(图 3)。

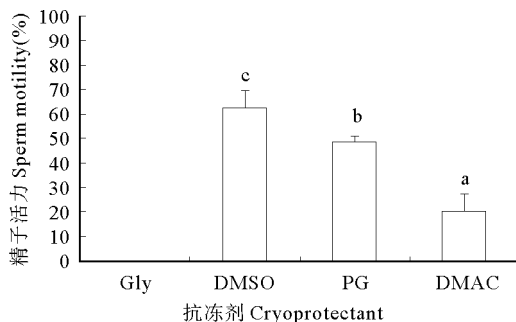


图 3 不同抗冻剂冷冻保存云纹石斑鱼精子活力 ($n=3, P < 0.05$)

Fig. 3 Motility of frozen-thawed sperm of *E. moara* in different cryoprotectant

2.3 二甲基亚砜(DMSO)和 1,2-丙二醇(PG)浓度筛选

以 EM1-2 为稀释液,DMSO 和 PG 在不同浓度梯度的冷冻保存研究表明,解冻后精子活力均无显著性差异($P > 0.05$),这表明 EM1-2 与这两种抗冻剂组合,对云纹石斑鱼的精子冷冻保存具有较好的适用性。但 15%DM-SO 和 10%PG 冷冻保存后精子活力最高,20% PG 冷冻保存后精子快速运动时间较长,与其他浓度梯度有显著性差异($P < 0.05$)(图 4)。

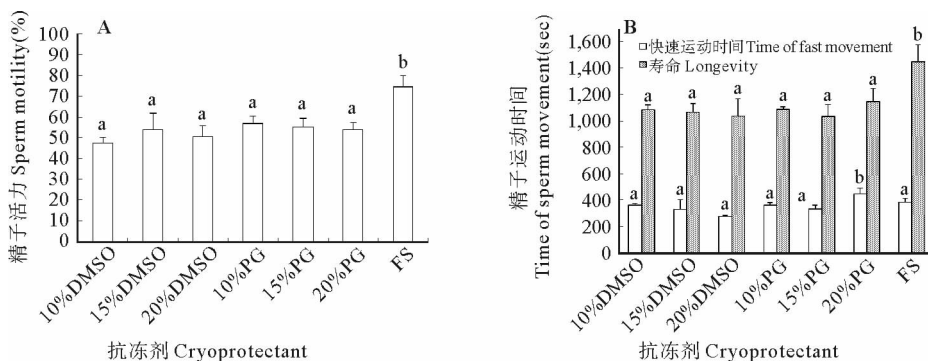


图 4 不同浓度二甲基亚砜(DMSO)和 1,2-丙二醇(PG)对精子活力(A)、快速运动时间及寿命(B)的影响 ($n=3, P < 0.05$)

Fig. 4 Motility(A), fast movement and longevity(B) of fresh and frozen-thawed sperm with different concentration of DMSO and PG

2.4 冷冻精子与云纹石斑鱼卵受精结果

利用冷冻保存 1 年的云纹石斑鱼精子与云纹石斑鱼卵进行受精,同时利用鲜精进行受精,对比结果显示,冷冻精子的受精率和孵化率均达到 80% 以上,与鲜精无显著性差异($P > 0.05$)(图 5)。

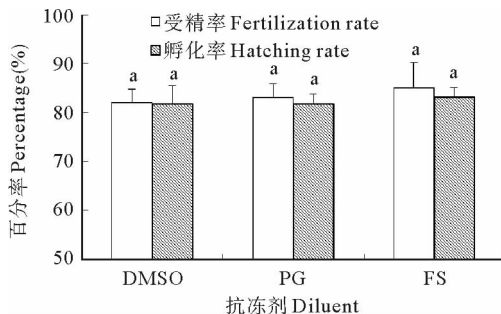


图 5 云纹石斑鱼冷冻精子和鲜精的受精率与孵化率比较 ($n=3, P < 0.05$)

Fig. 5 Fertilization rate and hatching rate of frozen-thawed sperm and fresh sperm of *E. moara*

2.5 云纹石斑鱼精子冷冻库的建立和应用

2010 年从福建省东山岛冷冻保存云纹石斑鱼精液 40ml,经过长途运输至山东省莱波水产有限公司,2011 年与 2012 年连续两年在该公司冷冻保存云纹石斑鱼精液达 80ml,建立了云纹石斑鱼精子冷冻库(表 2)。经过检测,精子活力达到 50%~80%。用冷冻精子与云纹石斑鱼卵受精培育出鱼苗 52 万尾,利用云纹石斑鱼冷冻精子与七带石斑鱼卵进行杂交受精,培育出杂交鱼苗 31 万尾。

表 2 云纹石斑鱼精子冷冻库信息表

Table 2 Information of the *E. moara* sperm bank

时间(年) Time (year)	保存量 Storage volume (ml)	稀释液 Diluent	解冻后活力 Motility after unfrozen (%)	地点 Location
2010	50	EM1-2	60~70	福建省东山市
2011	40	EM1-2	50~75	山东省莱州市
2012	40	EM1-2	50~80	山东省莱州市
总计 Total	130		50~80	

3 讨论

由于过度捕捞、无序利用等因素,造成了天然云纹石斑鱼资源紧缺,售价较为昂贵(梁友等 2011)。为此,在经济利益的驱动下,广东、福建等沿海地区近些年相继开展了网箱养殖(王大鹏等 2012),但由于野生苗种相对稀少,加大对云纹石斑鱼的人工繁殖势在必行。日本在云纹石斑鱼的人工培育技术上已取得较大的进展,而我国在石斑鱼人工繁殖和苗种培育方面仍存在诸多技术瓶颈(梁友等 2011; 黄进光等 2010; 宋振鑫等 2012)。在实际生产中,常常采用人工方法,促使雌鱼提早转化为雄鱼,但是转化的雄鱼精子产量并不稳定。因此进行云纹石斑鱼精子冷冻保存研究,对于提高精子的利用率,推进其产业的发展具有重要意义。

精子冷冻保存液主要由稀释液和抗冻剂组成,为精子提供适宜的生理环境,通过渗透压的调节脱出细胞中多余的水份,防止细胞中大的冰晶形成,保护精子细胞膜结构,尽可能减少精子的冷冻损伤,使精子经冷冻保存后,获得高的成活率(陈松林 2007)。不同鱼类的精子对环境的渗透压、离子和 pH 值等因素的适应机制并不相同(邓岳松等 1999),为此不同的鱼类精子冷冻保存需要不同的稀释液,如 MPRS(Ji *et al.* 2004)、TS-2(Chen *et al.* 2004)、D15(陈松林等 1992)等。抗冻剂是精子冷冻保存液中不可缺少的成分,适宜的抗冻剂对精子冷冻成功与否影响较大,目前精子冷冻保存中主要是使用甘油、二甲亚砷、甲醇、乙二醇、丙二醇和二甲基甲酰胺等抗冻剂(华泽钊等 1994)。

在石斑鱼的精子冷冻保存方面,Miyak 等(2005)利用 13%~15% 的海藻糖以 1:2 或 1:4 的比例稀释精液,将稀释精液注入到 0.5ml 的麦管中冷冻保存了云纹石斑鱼精子。Cabrita 等(2009)利用 1% NaCl+10% DMSO+10mg/ml BSA 作为稀释液,以 1:9 的比例稀释精液后,采用麦管冷冻保存了东大西洋石斑鱼 *E. marginatus* 精子。Gwo(1993)利用 150mmol/L 的 NaCl 溶液+20% DMSO 和鲜精以 10 倍体积的比率稀释后,采用麦管冷冻法冷冻保存了点带石斑鱼的精子。Imaizumi 等(2005)利用 5% DMSO+93% 葡萄糖(300mmol/L)作为抗冻保护液,冷冻保存了褐石斑鱼 *E. bruneus* 的精子。由于 Miyaki 等(2005)在云纹石斑鱼的精子冷冻保存研究中,采用的是麦管冷冻法,故在生产中限制较多,保存量较小,制约了其应用。为此本研究筛选了适宜于云纹石斑鱼精子冷冻保存的稀释液配方,并在此基础上筛选出了适宜种类及浓度抗冻剂。本研究筛选出一种精子稀释液 EM1-2,在其中加入 15% 的 DMSO 或 10% 的 PG,再与云纹石斑鱼精液以 1:1 的比例混合,用“三步冷冻法”冷冻保存,可有效地在超低温下冷冻保存精子,在不同的实验中冷冻精子成活率达到 45%~61%。并且利用“三步冷冻法”和 2ml 冷冻管来冷冻保存精子,该方法简单易行,在实际生产中具有广阔的应用前景。

K^+ 和 Na^+ 是鱼类精浆的重要组成成分,并对渗透压维持起到重要作用。因此在稀释液的配制中,这两种离子对稀释液配方的优劣具有较大的影响。 K^+ 和 Na^+ 在不同鱼类的研究中,对精子的抑制或激活机制也是不同的。在虹鳟 *Salmo gairdnerii* (Baynes *et al.* 1981)、鲑鱼 (Morisawa *et al.* 1983)、西伯利亚鲟 *Acipenser baerii* (刘鹏等 2007) 等的精子研究中,认为 K^+ 能抑制精子的活动,而 Na^+ 则能促进精子的活动。而在鲤鱼 *Cyprinus carpio*、团头鲂 *Megalobrama amblycephala* (严安生等 1993)、白斑狗鱼 *Esox lucius* (苏德学等 2004) 等的精子研究结果却表明,适当浓度的 K^+ 能提高精子运动速度,延长精子的寿命。只有在合理的配比下才能有效抑制精子的运动而不对其造成损伤。在本研究中,精子的寿命和活力与 K^+ 和 Na^+ 浓

度的不同配比呈一定相关性,但是具体变化还有待进一步研究。

不同的种类和浓度的抗冻剂对不同种鱼的精液抗冻保护效果差异较大。其中 DMSO 在鱼类的精液超低温冷冻保存中应用效果较为理想,如在台湾大马哈鱼 *Oncorhynchus masou formosanus* (Gwo *et al.*, 1999)、狗鱼 (Babiak *et al.*, 1999)、半滑舌鳎 (田永胜等 2009)、褐牙鲂 (章龙珍等 2009) 等多种鱼类的精子冷冻保存中都取得了令人满意的效果,除 DMSO, DMAC、PG 和 Gly 由于对细胞膜的通透性强且毒性较低,也常常被用来作为精液超低温保存的抗冻保护剂。目前,在其他石斑鱼的精子冷冻保存中均用 DMSO 做抗冻剂,本研究中发现云纹石斑鱼对抗冻剂的适应性较广泛,10%~20% 的 DMSO 和 PG 冷冻保存后精子活力无显著差异 ($P>0.05$),只在经过多次重复试验后,认为 15% DMSO 或 10% 1,2-丙二醇更适宜于云纹石斑鱼精子冷冻保存。另外对于 Gly 组,冷冻保存后,加入海水并未见任何激活现象,在其他鱼类的精子冷冻保存中未见有报道该现象,因此推断这可能与云纹石斑鱼的精液的特性有关。

冷冻精子在鱼类杂交育种方面有重要的应用价值,可以使不同生殖期或地理间隔的鱼类品种得以交配,解决雌雄鱼发育不同步的问题,使人工受精和远缘杂交更容易得以实现。在石斑鱼类中,目前人们已经成功地进行了云纹石斑鱼 ♀ × 七带石斑鱼 ♂ (李炎璐等 2012)、巨石斑鱼 *E. tauvina* ♀ × 赤点石斑鱼 *E. akaara* ♂ (宋盛宪等 1987)、镶点石斑鱼 *E. amblycephalus* × 赤点石斑鱼 (曾文阳等 1979)、斜带石斑鱼 *E. coioides* ♀ × 赤点石斑鱼 ♂ (刘付永忠等 2007)、地中海石斑鱼 *E. costae* × 东大西洋石斑鱼 (Glamuzina *et al.*, 2001) 等多种石斑鱼种间杂交实验。石斑鱼精子冷冻保存技术可以克服石斑鱼人工繁殖中雄鱼数量不足、精液量不足的问题,同时能够使不同生殖期或有地理间隔的不同品种的石斑鱼之间进行杂交育种,为石斑鱼的品种改良和新品种的培育打下了基础。因此云纹石斑鱼精子冷冻保存技术的研究具有重要的生产和应用价值。

参 考 文 献

- 王大鹏,曹占旺,谢达祥,甘西. 2012. 石斑鱼的研究进展. 南方农业学报, 43(7): 1058-1065
- 区又君,李加儿,江世贵. 1998. 保存和激活对真鲷精子生理特性的影响. 热带海洋, 17(3): 65-74
- 区又君,廖光勇,陈超,李加儿,庄志猛,柳学周,杨志,孙涛. 2011. 七带石斑鱼精子活力及其与环境的关系. 海洋环境科学, 30(4): 516-519
- 田永胜,陈松林,季相山,孙礼娟,翟介明. 2009. 半滑舌鳎精子冷冻保存. 渔业科学进展, 30(6): 96-102
- 吕明毅. 1989. 石斑鱼类的生殖生物学. 中国水产(台), 437: 41-52
- 华泽钊,任禾盛. 1994. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社
- 刘鹏,庄平,章龙珍,王斌,闫文罡. 2007. 人工养殖西伯利亚鲟精子超低温冷冻保存研究. 海洋渔业, 29(2): 120-127
- 刘付永忠,赵会宏,刘晓春,林浩然,黄国光,张海发,王云新. 2007. 赤点石斑鱼 ♂ 与斜带石斑鱼 ♀ 杂交初步研究. 中山大学学报(自然科学版), 46(3): 72-75
- 江世贵,区又君,李加儿. 1999. 不同温度保存对黑鲷精子生理特性的影响. 热带海洋, 18(4): 81-85
- 严安生,王其和,李诗模. 1993. 渗透压和钾对鲤鱼、团头鲂精子活力的影响. 淡水渔业, 23(3): 19-21
- 苏德学,严安生,田永胜,宋全德,胡金波,杜劲松,陈莉. 2004. 钠、钾、钙和葡萄糖对白斑狗鱼精子活力的影响. 动物学杂志, 39(1): 16-20
- 李炎璐,王清印,陈超,翟介明,吴雷明,马文辉,宋振鑫,孙芳芳. 2012. 云纹石斑鱼(♀) × 七带石斑鱼(♂) 杂交子一代胚胎发育及仔稚幼鱼形态学观察. 中国水产科学, 19(5): 821-832
- 宋振鑫,陈超,翟介明,马文辉,庞尊方. 2012. 云纹石斑鱼生物学特性及人工繁育技术研究进展. 渔业信息与战略, 27(1): 47-53
- 宋盛宪,许波涛. 1987. 石斑鱼杂交新品种“青红斑”获得成功. 海洋渔业, 9(6): 271
- 陈松林,刘宪亭,鲁大椿,章龙珍,方建平. 1992. 鲤、鲢、鳙精子低温短期保存研究. 淡水渔业, (3): 3-7
- 陈松林. 2007. 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
- 林浩然. 2012. 石斑鱼类养殖技术体系的创建和石斑鱼养殖产业持续发展的思考. 福建水产, 34(1): 1-10
- 郭明兰,苏永全,陈晓峰,丁少雄,王军. 2008. 云纹石斑鱼与褐石斑鱼形态比较研究. 海洋学报, 30(6): 106-114
- 黄进光,谢恩义. 2010. 云纹石斑鱼工厂化健康育苗技术初探. 水产养殖, (4): 8-9
- 章龙珍,闫文罡,庄平,黄晓荣,徐滨,江琪. 2009. 褐牙鲂精子生理特性及超低温冷冻保存. 上海海洋大学学报, 18(1): 21-27
- 梁友,倪琦,王印庚,刘志伟,陈君,庞尊方,孙芳芳,马文辉. 2011. 云纹石斑鱼规模化人工繁育技术研究. 渔业现代化, 38(5): 31-34
- 曾文阳,潘敬端. 1979. 红斑和镶点青斑之杂交繁殖试验. 中国水产(台刊), 324: 19-24
- Babiak I, Glogowski J, Luczynski MJ and 2 others. 1999. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization dilu-

- ent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenol* 52(3): 473-479
- Baynes SM, Scott AP, Dawson AP. 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *J Fish Biol* 19(3): 259-267
- Blaxter JHS. 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172: 1189-1190
- Cabrita E, Engrola S, Conceição LEC and 2 others. 2009. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture* 287(1-2): 152-157
- Chao NH, Tsai HP, Liao IC. 1992. Short and long-term cryopreservation and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Asian Fish Sci* 5: 103-116
- Chen SL, Ji XS, Yu GC and 2 others. 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture* 236(1-4): 547-556
- Dreanno C, Sequet M, Quemener L and 4 others. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenol* 48(4): 589-603
- Glamuzina B, Glavic N, Skaramuca B and 2 others. 2001. Early development of the hybrid *Epinephelus costae* ♀ × *E. marginatus* ♂. *Aquaculture* 198(2): 55-61
- Gwo JC, Ohta H, Okuzawa K. 1999. Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenol* 51(3): 569-582
- Gwo JC. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenol* 39(6): 1331-1342
- Imazumi H, Hotta T, Ohta H. 2005. Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus bruneus* sperm and comparison of fertility of fresh and cryopreserved sperm. *Aquaculture Sci* 53(4): 405-411
- Ji XS, Chen SL, Tian YS and 4 others. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. *Aquaculture* 241(1-4): 517-528
- Koh IC, Yokoi K, Tsuji M and 2 others. 2010. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiol* 61(3): 263-267
- Morisawa M, Suzuki K, Morisawa S. 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J Exp Biol* 107: 105-113
- Miyaki K, Nakano S, Ohta H and 1 other. 2005. Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara* sperm using only a trehalose solution. *Fish Sci* 71(2): 457-458
- Richardson GF, Wilson CE, Crim LW and 1 other. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture* 174(1-2): 89-94
- Sansone G, Fabbrocini A, Ieropoli S and 3 others. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiol* 44(3): 229-239
- Tanaka S, Zhang H, Horie N and 6 others. 2002. Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *J Fish Biol* 60(1): 139-146
- Tian YS, Chen SL, Ji XS and 4 others. 2008. Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. *Aquaculture* 284(1-4): 268-271
- Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ and 5 others. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenol* 60(5): 989-996