

Theory and Techniques of Fish Spermatozoa and
Embryos Cryopreservation

鱼类精子和胚胎冷冻保存 理论与技术

陈松林 主著

Theory and Techniques of Fish Spermatozoa and
——Embryos Cryopreservation——

鱼类精子和胚胎冷冻保存 理论与技术

陈松林 主著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术 / 陈松林等

著. —北京: 中国农业出版社, 2007. 4

ISBN 978-7-109-11587-3

I. 鱼… II. 陈… III. ①鱼类-精子-低温保藏②鱼类-胚胎-低温保藏 IV. Q959.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 045351 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

责任编辑 林珠英

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2007 年 5 月第 1 版 2007 年 5 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 28.25 插页: 8

字数: 670 千字 印数: 1~2 000 册

定价: 86.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

【内容简介】

本书是我国在水产动物种质低温保存领域的第一部专著，全面系统地介绍了鱼类低温生物学的理论、鱼类精子和胚胎的生理特性、冷冻保存的原理和技术方法以及鱼类冷冻精子库的建立、维持和应用技术等内容。其中，重点介绍了著者20年来在鱼类精子和胚胎冷冻保存方面所取得的主要成就，包括20多种鱼类精子冷冻保存技术方法、淡水和海水鱼类胚胎冷冻保存的技术方法和最新成果。本书共分四篇15章：第一篇为概论，含第一章，介绍了鱼类精子和胚胎冷冻保存的历史、现状和未来；第二篇为低温生物学原理，含第二章到第六章，主要介绍了低温生物学的基本原理和冷冻保存技术；第三篇为鱼类精子冷冻保存，含第七章到第十一章，主要介绍了鱼类精子的生理特性、鱼类精子冷冻保存的技术方法和冷冻精子的应用；第四篇为鱼类胚胎冷冻保存，含第十二章到第十五章，主要介绍了鱼类胚胎冷冻保存的技术方法和结果。

本书可供从事水产低温生物学研究、水产动物种质资源保存、遗传育种和水产养殖等工作的科研、技术人员阅读，也可作为高校和科研院所相关学科师生以及渔业生产单位的工作人员教学和科研参考用书。

□□□□□□

主 著 陈松林

主要编著人员

陈松林

中国水产科学研究院黄海水产研究所

田永胜

中国水产科学研究院黄海水产研究所

李 军

中国科学院海洋研究所

章龙珍

中国水产科学研究院东海水产研究所

柳 凌

中国水产科学研究院长江水产研究所

季相山

山东农业大学

序

[鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术]

鱼类养殖是水产养殖业的重要领域，鱼类种质资源是进行优良苗种培育、遗传改良和水产养殖业可持续发展的重要物质基础。保护鱼类种质资源和生物多样性，是保护鱼类物种、进行有效开发和利用的前提条件，也是我国政府部门和水产科技工作者面临的重要课题。

精子和胚胎冷冻保存，在鱼类种质保存、遗传育种和苗种生产上具有重要意义和应用价值。如通过精子冷冻保存和精子库建立，可将优良和珍稀濒危鱼类种质长期保存下来，可以解决雌雄鱼成熟不同步、地理隔离导致某些鱼类之间难以交配的难题，还可以为鱼类雌核发育等研究不间断地提供精子材料，大大方便遗传育种的研究工作。胚胎冷冻保存在鱼类种质资源长期保存上具有特别重要的意义。因此，国际上非常重视鱼类精子和胚胎冷冻保存的研究。国外从20世纪80年代初开始了鲑鳟鱼类精子低温保存的研究工作，随后扩展到其他鱼类。目前，鱼类精子和胚胎冷冻保存成为国际上非常活跃的研究领域之一。

陈松林等同志从20世纪80年代开始，相继承担了国家科技攻关计划和863计划中有关淡、海水鱼类精子和胚胎冷冻保存的研究任务，对我国淡、海水鱼类精子和胚胎冷冻保存技术和精子库建立进行了系统研究，他们先后建立了四大家鱼和大菱鲆等30多种淡、海水鱼类精子冷冻保存技术和冷冻精子库，将鱼类冷冻精子技术进行了产业化推广应用，同时开展了鱼类胚胎冷冻保存的系统研究，建立了鱼类胚胎玻璃化冷冻保存技术，首次获得了冷冻复活的牙鲆等海水鱼类胚胎，并孵化出鱼苗。由他主持编著的《鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术》一书，为我国第一部有关鱼类精子和胚胎冷冻保存的专著，系统介绍了我国鱼类精子

和胚胎冷冻保存的原理、技术和结果。

该书的特点是既有理论上的阐述,又有具体的技术方法,其学术性、实用性强,可操作性也强。相信这本书的出版,将对我国鱼类种质资源保护、遗传育种和渔业生产起到积极的推动作用。

中国工程院院士

中山大学教授

林浩然

2007年4月18日

前言

[鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术]

种质资源是物种保存、优良品种培育及水产养殖业可持续发展的重要物质基础。我国是一个水生生物种质资源较为丰富的国家,丰富多样的水生生物种质资源和遗传多样性,对于我国水产养殖业的快速发展起到了非常重要的作用。但近年来,由于过度捕捞、生态破坏、环境污染等导致鱼类天然资源减少,有些鱼类甚至濒临灭绝,如长江鲟、松江鲈、白鲟等鱼类已达灭绝的边缘。如果不及时采取保护措施,若干年后,在自然界中将难以找到许多鱼类原良种的遗传资源。另外,由于忽视鱼类种质保护及品种选育的工作,养殖鱼类近亲交配越来越严重,造成种质退化,遗传多样性减少,生长速度减缓,品质下降,对病害和环境胁迫的防御能力降低,病害发生日趋严重,造成巨大的经济损失。因此,鱼类种质保存及遗传多样性保护,已成为水产养殖业中亟待攻克的重要科技问题,也是我国水产科技工作者面临的一项迫切任务。

低温生物学是探索低温条件下生命现象的特征和规律,以及生物体保存的一门科学。它是随着生物学、物理学和工程技术的深入发展,相互渗透而产生的一门新兴的边缘学科。由于生物细胞、组织、器官、胚胎甚至个体在超低温(-196°C)状态下代谢完全停止,生命以静止的形式可以在这种状态下得以长期保存。因此,低温生物学技术在鱼类种质保存、遗传多样性保护和遗传改良等方面具有重要意义和应用价值,主要表现在三个方面:首先,低温冷冻技术在鱼类种质保存上意义重大,通过建立优良养殖鱼类或濒临灭绝鱼类的冷冻精子库、细胞库或胚胎库,可将优良鱼类的原良种长期保存起来,从而避免由于捕捞过度、生态破坏或环境污染而造成的鱼类物种灭绝或因长期养殖、近亲交配而造成的种质退化和遗传变异现象,这一点在珍稀濒危鱼类物种保护上显得特别重要;其次,通过精子的冷冻保存可以使不同生殖期或地理间隔的鱼类得以交配,解决雌、雄鱼成熟不同步的问题,也可以使性转换的个体得以自交,使鱼类的人工授精和远缘杂交更加方便可行;第三,通过精子冷冻保存,可为鱼类性别控制和遗传育种等研究不间断地提供精子材料,有利于提高研究效率、加快鱼类遗传育种的研究进程。

我国政府历来非常重视鱼类种质低温冷冻保存的研究。从1986年开始,在国家“七五”、“八五”和“九五”科技攻关计划中,连续15年立项支持淡水鱼类精子和胚胎冷冻保存的研究,“十五”期间,又在海洋863计划中立项支持海水鱼类精子和胚胎冷冻保存的研究。笔者等始终承担着这些国家项目的研究任务,20年来,对我国淡、海水鱼类精子和胚胎冷冻保存技术和精子库建立进行了系统研究,先后建立了20多种淡、海水鱼类精子冷冻保存技术和冷冻精子库,并在种质保存、苗种繁育、杂交育种和雌核发育等方面进行了推广应用。同时,我们还开展了鱼类胚胎冷冻保存的系

统研究,建立了海水鱼类胚胎冷冻保存技术,首次获得了在液氮中冷冻复活的海水鱼类胚胎,并孵化出鱼苗。

为了尽快在渔业生产、遗传育种和水产种质资源保护上应用这一先进技术,我们联合国内参与该项目研究的相关专家学者,总结了20年来我国在鱼类精子和胚胎冷冻保存方面取得的研究成果,同时少量参阅了国内外有关资料,编著成《鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术》一书,奉献给从事鱼类低温生物学、种质保存、遗传育种、濒危物种保护和渔业生产的朋友。希望此书能对我国鱼类种质资源保护、遗传育种研究、良种培育和鱼苗繁育等有所帮助,并起到促进作用。

本书共分四篇,包括15章。第一篇为概论,含第一章;第二篇为低温生物学理论,含第二章到第六章;第三篇为鱼类精子冷冻保存,含第七章到第十一章;第四篇为鱼类胚胎冷冻保存,含第十二章到第十五章。主要编写人员为陈松林、田永胜、李军、章龙珍、柳凌、季相山。另外,参加编写的人员还有张永忠、葛家春、于过才、赵燕、王春花、丁淑燕、刘本伟、徐西长、丁福红、肖志忠、刘清华、陈艳翠、刘云国、黄晓荣、陈超、黄亚红。上述作者的名字列在每章或节的结尾处。由于笔者水平有限,书中难免有疏漏和不妥之处,敬请读者批评指正。

陈松林

2007年4月



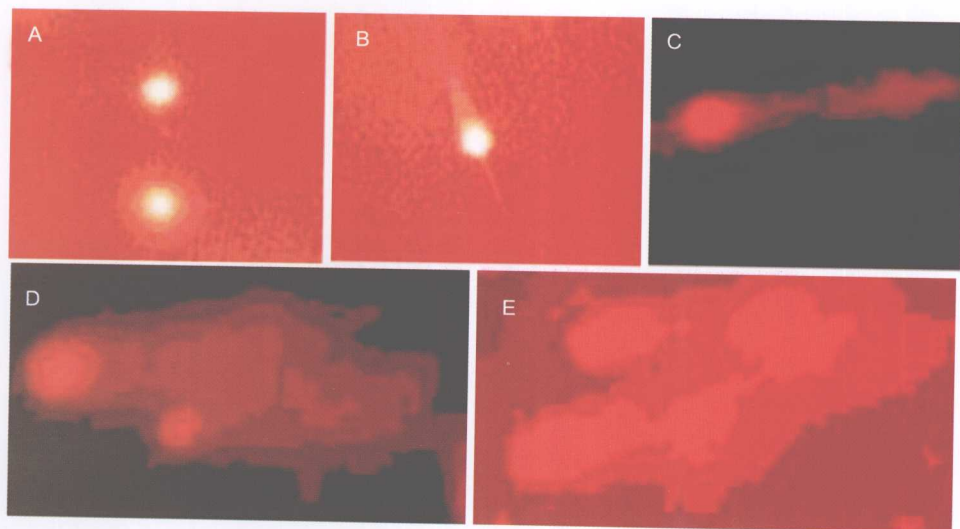
陈松林

1960年10月生于湖北黄陂。博士，研究员，博士生导师。现任中国水产科学研究院黄海水产研究所研究员，农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室常务副主任，中国水产科学研究院水产生物技术领域首席科学家。为中国海洋大学、中国科学院海洋研究所以及上海水产大学博士生导师。兼任中国动物学会动物生物技术分会常务理事、中国动物学会比较内分泌分会理事，动物学报、中国水产科学和海洋水产研究等学报编委。

长期从事鱼类种质冷冻保存、鱼类细胞培养、鱼类功能基因组、分子标记和分子育种以及鱼类性别控制等水产种质资源和生物技术领域的研究工作。主持和参加国家和省、部级项目30多项。获国家技术发明奖二等奖1项，获省、部级科技进步奖二等奖3项；发表学术论文130余篇，其中SCI论文30多篇；获得国家发明专利3项；主编专著1部。1992年获第三届中国青年科技奖；1993年享受国务院政府特殊津贴；1997年被授予农业部有突出贡献中青年专家；1997年入选国家百千万人才工程第一、二层次人选；2004年获青岛市专业技术拔尖人才称号，并入选青岛市首批科技将才计划；2005年获山东省有突出贡献中青年专家称号，2006年被遴选为山东省“泰山学者”特聘专家。



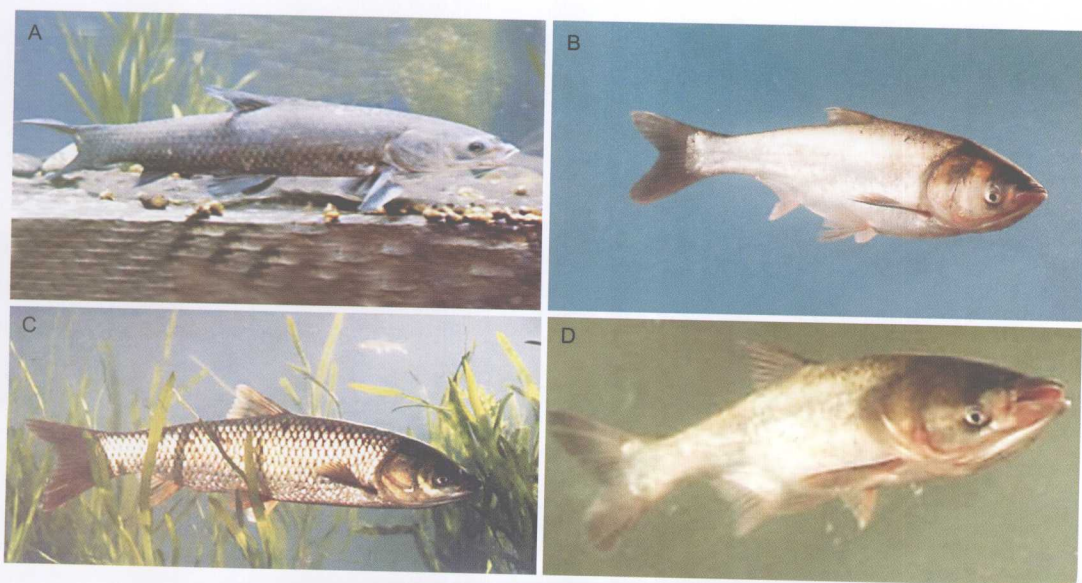
长吻鲇
Leiocassis longirostris



冷冻解冻精子的 SCEG 分析

The patterns of SCEG assay for frozen-thawed sperm with various degree damage

A. G0 B. G1 C. G2 D. G3 E. G4



青鱼 (A)、草鱼 (B)、鲢 (C)、鳙 (D)

Mylopharyngodon piceus (A), *Ctenopharyngodon idellus* (B),
Hypophthalmichthys molitrix (C), *Aristichthys nobilis* (D)

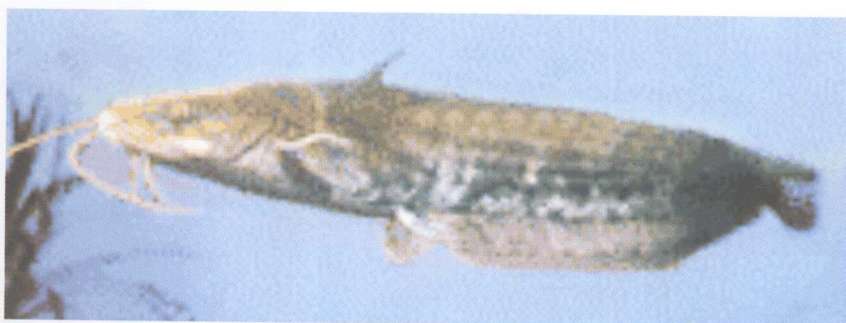


鲤鱼
Cyprinus carpio

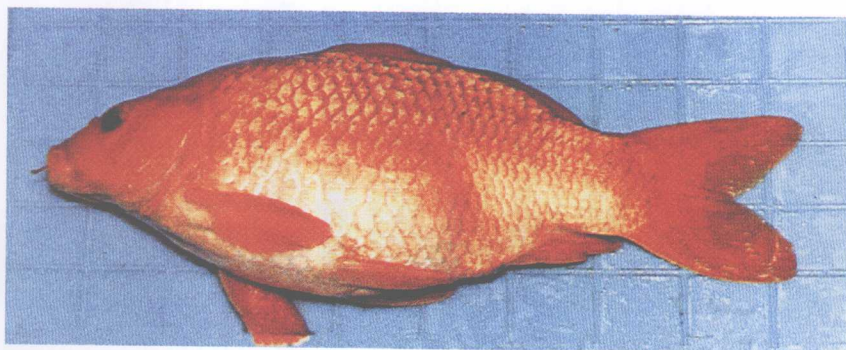


团头鲂
Megalobrama amblycephala

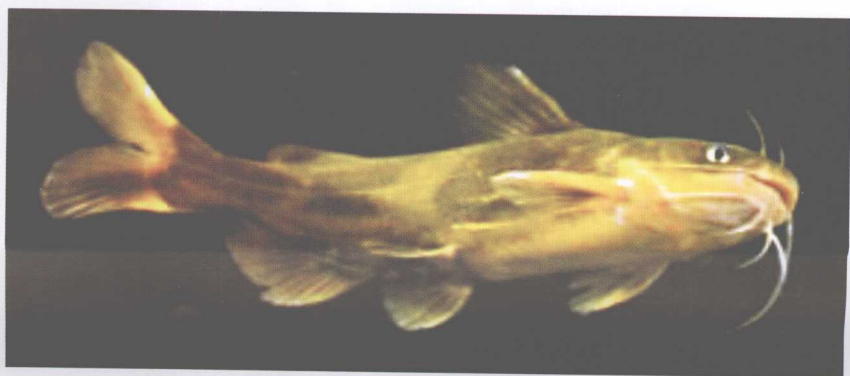
大口鲶
Silurus meriaionalis

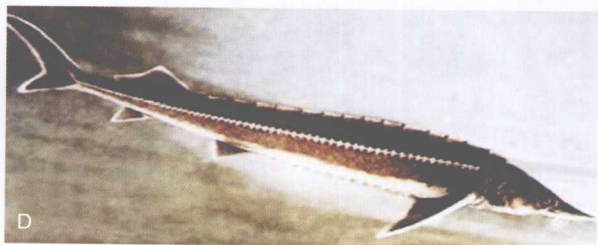
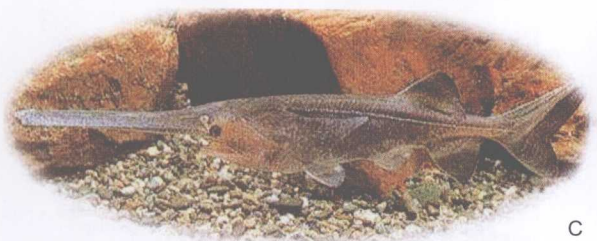


兴国红鲤
Cyprinus carpio var.
singuonesis

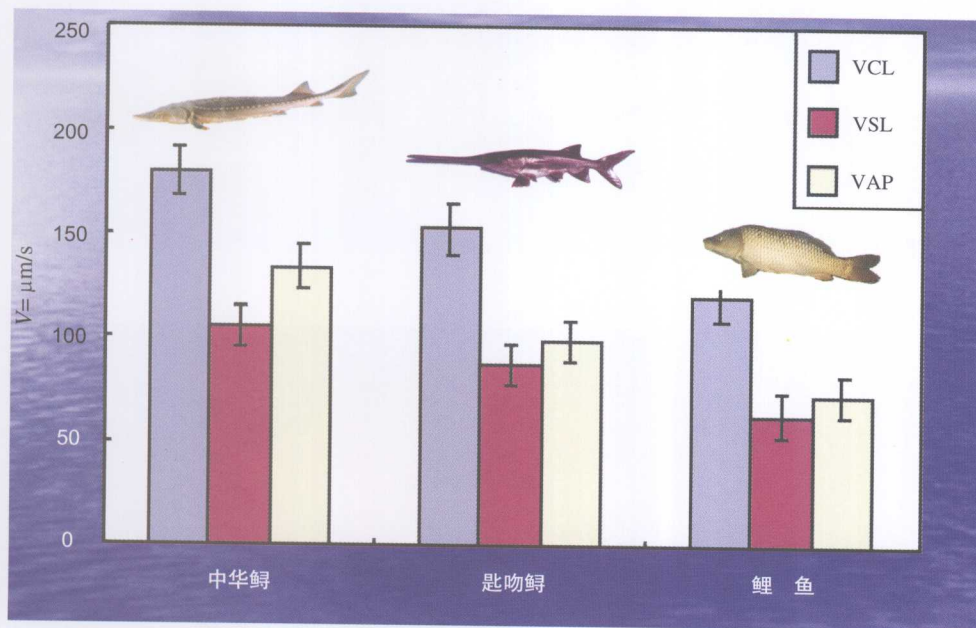


黄颡鱼
Pelteobagrus fulvidraco





中华鲟 (A)、史氏鲟 (B)、匙吻鲟 (C) 和西伯利亚鲟 (D)
Acipenser sinensis (A), *Acipenser schrenckii* (B), *P.spathula* (C), and *Acipenser baeri* (D)



几种鱼类精子的运动速度
 Swimming velocities of sperm from several fishes



大菱鲆
Scophthalmus maximus



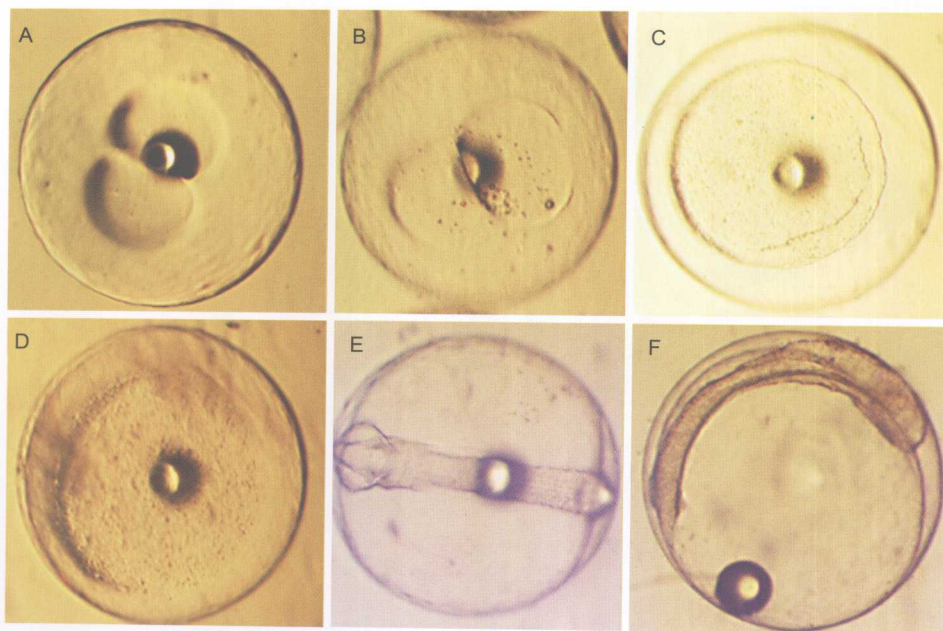
花 鲈
Lateolabrax japonicus



暗纹东方鲀
Takifugu obscurus
(图片来自 Akira Kato 等)



牙 鲆
Paralichthys olivaceus



大菱鲆卵和牙鲆冻精杂交胚形态与对照组的比较

Comparison of morphology of hybridized embryos (turbot ♀ × Japanese flounder ♂) and control (turbot)

A. 2 细胞期 (对照) B. 2 细胞期 (杂交组) C. 原肠期 (对照) D. 原肠期 (杂交组)
E. 尾芽期 (对照) F. 尾芽期 (杂交组)



杂交 (大菱鲆 ♀ × 牙鲆 ♂) 鱼苗和对照 (大菱鲆) 形态比较

Comparison of morphology of hybridized fry
(turbot ♀ × Japanese flounder ♂) and control (turbot)

A. 杂交 (大菱鲆 ♀ × 牙鲆 ♂) 鱼苗 B. 无法孵出的杂交胚胎 C. 正常大菱鲆苗

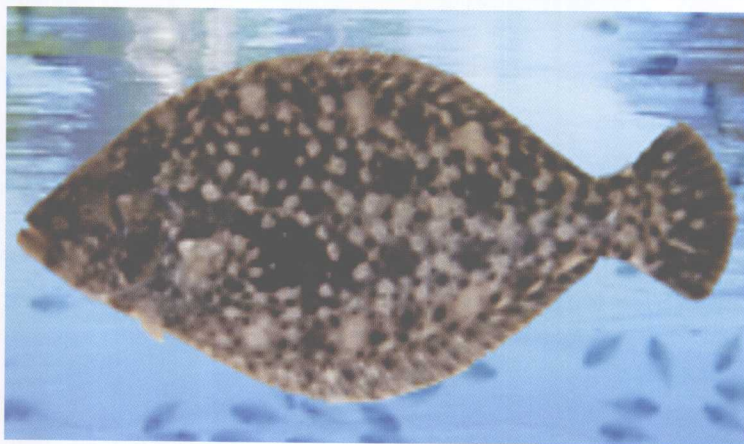
圓斑星鰈
Verasper variegatus



半滑舌鰈
Cynoglossus semilaevis



大西洋牙鰈
Paralichthys dentatus



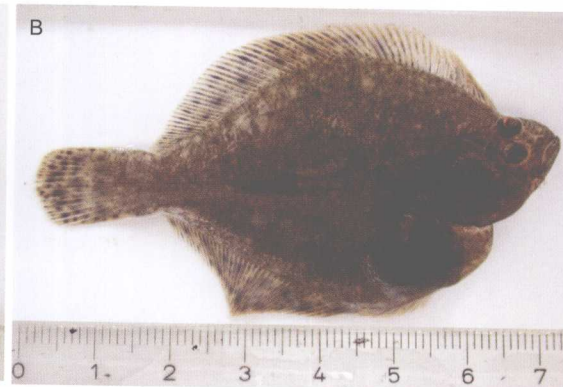
石 鰈
Platichthys bicoloratus



杂交鱼苗（牙鲆♀ × 石鲆♂）变态前后形态

Morphology of hybridized fry

A. 变态前杂交鱼苗 B. 变态后杂交鱼苗



杂交鱼苗变态后（牙鲆♀ × 石鲆♂）形态比较

Comparison of hybridization fry (Japanese flounder ♀ × stone flounder ♂) shape after conversion

A. 眼睛左偏（像牙鲆） B. 眼睛右偏（像石鲆）



真 鲷

Pagrus major



黑 鲷

Sparus macrocephalus