

## 4种渗透性抗冻剂对暗色唇鱼精子冷冻保存的影响

王晓爱<sup>1,2</sup>, 杨君兴<sup>1</sup>, 陈小勇<sup>1</sup>, 潘晓赋<sup>1</sup>, 李再云<sup>1</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**4℃冷冻保存条件下,以冷冻精子活力、寿命和细胞膜完整率为指标,检测二甲亚砜(DMSO)、甘油(Glycerol)、乙二醇(EG)和甲醇(MeOH)4种渗透性抗冻剂对暗色唇鱼(*Semilabeo obscurus*)鲜精以及对精子冷冻保存效果的影响。结果显示,4种渗透性抗冻剂对鲜精活力呈负作用,MeOH < EG < DMSO < Glycerol;抗冻剂对鲜精寿命呈负作用,MeOH < EG < DMSO 和 Glycerol;抗冻剂对鲜精细胞膜完整率呈负作用,MeOH < EG < DMSO < Glycerol。在鲜精活力为(36.17 ± 4.06)% ,寿命为(47.5 ± 3.1) s,细胞膜完整率为(86.22 ± 5.29)% 时,经过短期冷冻保存,5% MeOH 和 5% EG 解冻后暗色唇鱼精子活力最高,分别为(18.33 ± 1.70)% 和(17.83 ± 2.67)% ,与鲜精活力差异显著( $P < 0.05$ ) ;5% MeOH 和 5% EG 解冻后精子寿命最长,分别为(44.3 ± 3.6) s 和(42.8 ± 5.5) s,5% MeOH 解冻后精子寿命与鲜精寿命差异不显著( $P > 0.05$ ) ;5% MeOH 解冻后精子细胞膜完整率最高,为(85.67 ± 1.11)% ,与鲜精细胞膜完整率无显著差异( $P > 0.05$ )。研究表明,DMSO 和 Glycerol 并不适合作为暗色唇鱼精子冷冻的抗冻剂,MeOH 和 EG 具有相似的保护作用,是暗色唇鱼精子冷冻保存潜在的渗透性抗冻剂。

**关键词:**渗透性抗冻剂;暗色唇鱼;精子冷冻

**中图分类号:**Q952 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2012)05-0088-06

自从1949年首次用甘油作为抗冻剂冷冻成功保存精子以来(Polge et al, 1949),精子低温冷冻保存的研究取得了很大进展,并逐渐发展成为物种迁地保护和遗传种质资源保存的一个重要手段。抗冻剂是影响精子冷冻保存的重要因素(陈松林, 2007; 王晓爱等, 2012)。渗透性抗冻剂多是小分子物质,渗透速度快,能轻易地渗透到细胞内使其脱水,在溶液中易结合水分子,发生水合作用,使溶液的黏性增加,从而弱化了水的结晶过程,以此达到抗冻剂保护的目( Muchlisin, 2005; 陈松林, 2007)。二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、甘油(Glycerol)、乙二醇(Ethylene glycol, EG)和甲醇(MeOH)是4种常见的渗透性抗冻剂,已在家畜、野生动物和人类精子冷冻中发挥作用(司维等, 2004),亦被广泛应用在鱼类精子冷冻保存中(Cabrita et al, 2010);其中, DMSO 应用最为广泛, Glycerol 主要用于海水鱼类精子冷冻保存(Zhang et al, 2003), EG 和 MeOH 在少数鱼类冷冻保存中也取得了较好的冻存效果(Harvey

et al, 1982; Horvath et al, 2008)。在鱼类遗传管理中,精子低温和超低温冷冻保存能有效地延长个体的繁殖寿命,并在塘养种群的世代数最小化方面显示出很广泛的应用潜力,但该技术仅在少数动物中使用(Frankham et al, 2002)。

暗色唇鱼(*Semilabeo obscurus* Lin)隶属于鲤科(Cyprinidae)、野鲮亚科(Labeoninae)、唇鱼属(*Semilabeo*)。随着鱼类资源的利用强度加大和捕捞技术的更新,鱼类生物多样性呈下降趋势,暗色唇鱼已成为李仙江流域珍稀濒危物种(杨剑等, 2010; 杨永宏等, 2011); 1989年被列入云南省Ⅱ级保护动物, 1998年被列入《中国濒危动物红皮书》(乐佩琦和陈宜瑜, 1998)。开展暗色唇鱼的精子冷冻保存研究,建立精子库长期保存精子,是种质资源保护的有效途径之一,也能为遗传育种提供优良的种质材料。迄今为止,关于暗色唇鱼精子的冷冻保存尚未见研究报道。本研究以D-15溶液为稀释液,二甲亚砜、甘油、乙二醇和甲醇为抗冻剂,精子活力、寿命和细胞膜完整率为指标,进行暗色唇鱼精子短期冷冻保存实验,探讨抗冻剂种类及浓度对精子冷冻效果的影响,旨在初步了解其精子的生物学特性,同时为暗色唇鱼的超低温冷冻保存研究中寻找合适的抗冻剂和稀释液提供参考,确定超低温冷冻保存的最适条件,监测异地保育精子品质的变化,最终达到保存暗色唇鱼种质资源之目的。

收稿日期:2012-04-11

基金项目:云南大唐国际李仙江流域水电开发有限公司委托项目。

通讯作者:杨君兴。E-mail: yangjx@mail.kiz.ac.cn; 陈小勇。E-mail: chenxy@mail.kiz.ac.cn

作者简介:王晓爱, 1986年生,女,博士研究生,主要从事鱼类细胞培养、精子冷冻保存研究。E-mail: xueaiw@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与方法

1.1.1 亲本来源 实验用雄鱼于2008年5月采集自云南李仙江流域,饲养在中国科学院昆明动物研究所珍稀特有鱼类保育研究基地。养殖池塘面积100 m<sup>2</sup>,水深1.2 m,养殖密度<3 kg/m<sup>3</sup>,雌雄比1:1.5。水温16~25℃,10月到第二年3月光周期(光照:黑暗)为10:14,4-9月为12:12。

1.1.2 饲养方案 暗色唇鱼为杂食性鱼类,使用通威股份有限公司昆明分公司生产的111鲤鱼种饲料,颗粒直径2.0 mm。1 d投喂2次,上午和下午各1次。日粮为亲鱼体重的3%左右,每次的投喂量以15~30 min吃完为度。

1.1.3 精液收集 随机选取20尾性腺成熟的雄鱼[体长(161.9±20.7) mm,体重(97.78±41.9) g]用于精液收集,用100 mg/L的MS-222(Tricaine, C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>S)麻醉5 min,用毛巾擦干鱼类,然后轻轻挤压腹部,使精液自然流出到1.5 mL离心管中。

1.1.4 冷冻保存 所选取的20尾雄鱼精子密度为(31.96±9.43)×10<sup>9</sup>个/mL,鲜精平均活力为(36.17±4.06)%,精子膜完整性为(86.22±5.29)%,精子寿命为(47.5±3.1)s;经检验,个体间鲜精活力差异不显著。不同个体的精液,分别用含抗冻保护剂的稀释液D-15(0.8% NaCl,0.05% KCl,1.5% Glucose)稀释(陈松林等,1992),使精子终密度为2.5×10<sup>8</sup>个/mL(Rana,1995),装入1.8 mL冻存管中,4℃保存;24 h后,取出样品,37℃水浴解冻30 s。

### 1.2 实验方法

1.2.1 不同抗冻剂对鲜精活力的影响 用含5% DMSO、5% Glycerol、5% EG和5% MeOH的D-15以及不含抗冻剂的D-15,分别将鲜精稀释100倍后常温放置,每隔60 min在显微镜下观察各样品精子活力、寿命和膜完整率。

1.2.2 不同抗冻剂及浓度对精子冷冻的影响 选取抗冻剂DMSO、Glycerol、EG和MeOH,浓度梯度分别为5%和10%。冻存体积为100 μL,4℃保存24 h后,37℃水浴解冻30 s,检测冻精活力、寿命和膜完整率。

### 1.3 数据处理

精子密度(sperm density):用稀释液将精液稀释200倍,在光学显微镜下放大400倍,用血球计数板计数精子数量,再计算其密度(Rakitin et al,

1999)。

精子活力(sperm motility):用淡水激活精子后,立即在显微镜下观察运动精子占全部精子的百分数(Mann,1964;Mounib,1978)。

精子寿命(sperm life):精子从被激活至视野中90%以上的精子基本不动为止所持续的时间(黄晓荣等,2007)。

精子细胞膜完整率(sperm membrane integrity):精液稀释100倍后,用0.4%台盼蓝染色3 min。细胞膜破损的精子头部被染成蓝色,而细胞膜完整的精子头部不被染色(Freshney,2010)。显微镜下计算未染色精子数占总精子数的百分比。

先用方差分析(ANOVA)测验每个实验的总体各组之间差异是否显著。若显著,再用LSD多重比较检验处理组之间差异显著性。实验数据均为平均值±标准差。

## 2 结果

### 2.1 不同抗冻剂对鲜精的影响

2.1.1 对鲜精活力的影响 常温下,不同抗冻剂对鲜精( $n=20$ )活力的影响见图1。加入抗冻剂的各种样品精子活力均比对照组低,随着作用时间延长,精子活力逐渐降低。总体来看,随着作用时间的延长,对照组精子活力从22%缓慢下降至15%;MeOH作用时,前60 min,精子活力下降缓慢,60 min后,精子活力迅速下降;EG和Glycerol作用时,精子活力几乎呈直线下降,分别从20%和15%下降至8%和3%;DMSO作用时,精子活力在60 min前迅速下降,60 min后,下降缓慢。各时间点上,精子活力按高低排序结果基本一致,MeOH>EG>DMSO>Glycerol。

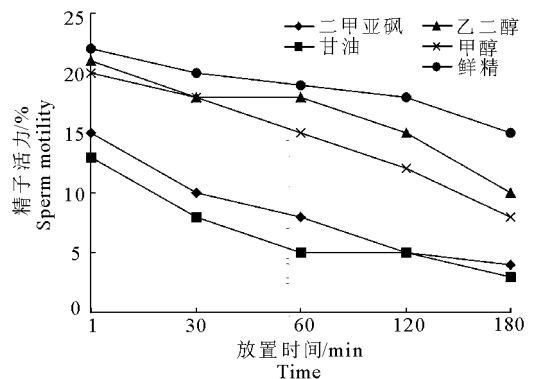


图1 常温下不同抗冻剂对暗色唇鱼精子活力的影响  
Fig.1 Effects of different cryoprotectants on sperm motility in *S. obscurus* at room temperature

2.1.2 对精子寿命的影响 不同抗冻剂对精子 ( $n=20$ ) 寿命的影响见图2。抗冻剂对精子寿命有负作用,抗冻剂作用曲线均在对照组以下。从变化趋势来看,对照组精子寿命在60 min前下降缓慢,60 min后从60 s迅速下降至43 s;MeOH作用时,精子寿命在60 min前从55 s迅速下降至44 s,60 min后,趋于平缓;EG和DMSO作用时,精子寿命分别从49 s和45 s缓慢下降至36 s和35 s;Glycerol作用时,精子寿命在60 min前下降迅速,从45 s下降至32 s,60 min后,精子寿命下降缓慢。各时间点上,按精子寿命长短排序,1~30 min时,MeOH > EG > DMSO > Glycerol;在其他各时间点上顺序基本一致,MeOH > EG > DMSO > Glycerol。

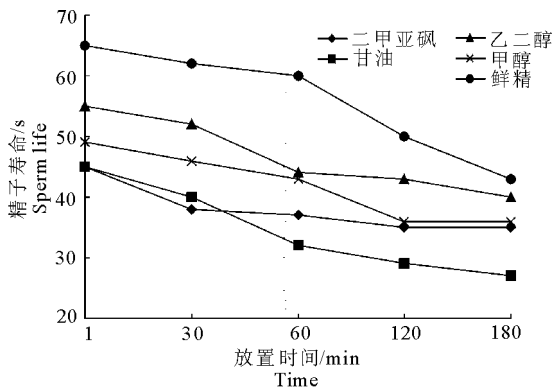


图2 常温下抗冻剂对暗色唇鱼精子寿命的影响

Fig.2 Effects of different cryoprotectants on sperm life in *S. obscurus* at room temperature

2.1.3 对精子细胞膜完整率的影响 常温下,不同抗冻剂对精子 ( $n=20$ ) 细胞膜完整率的影响见图3。各种抗冻剂对精子膜的完整率均有影响,抗冻剂作用曲线均在对照组下方。从精子膜完整率的总体变化趋势看,对照组在120 min前,细胞膜的完整率从92%缓慢下降至85%,此后快速下降至180 min的75%;MeOH的作用曲线几乎与对照组重合;EG的作用曲线基本呈直线下降,细胞膜完整率从90%下降至70%;DMSO作用时,膜完整率在120 min前从85%缓慢下降至75%,到180 min时迅速下降至60%;Glycerol作用时,细胞膜完整率在60 min前,迅速从85%下降至65%,60 min后缓慢下降。从细胞膜完整率在各时间点的高低顺序看基本一致,MeOH > EG > DMSO > Glycerol。

## 2.2 抗冻剂种类及浓度对精子冷冻的影响

2.2.1 对冻精活力的影响 4℃保存条件下,不同抗冻剂及浓度冷冻保存的精子 ( $n=20$ ) 复苏后活力均低于鲜精 ( $36.17 \pm 4.06$ )% (图4)。在几种抗冻

剂及浓度的组合中,5% MeOH和5% EG冷冻效果最好,解冻后精子活力最高,分别为 ( $18.33 \pm 1.70$ )% 和 ( $17.83 \pm 2.67$ )%,两者间无显著差异 ( $P > 0.05$ ),但这两种处理方式与其他各组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。4种抗冻剂作用时,冻精活力均随着抗冻剂浓度的增加而降低。

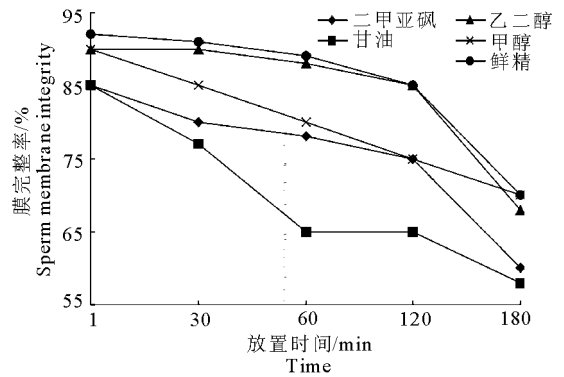


图3 常温下抗冻剂对暗色唇鱼精子细胞膜完整率的影响

Fig.3 Effects of different cryoprotectants on sperm membrane integrity in *S. obscurus* at room temperature

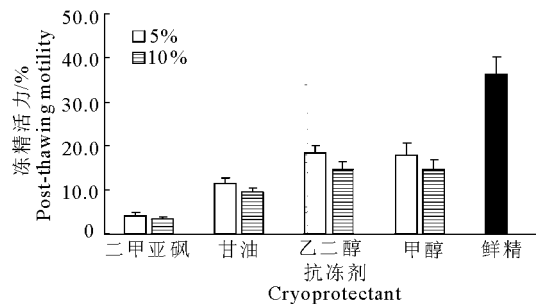


图4 4℃时抗冻剂及其浓度对冻精活力的影响

Fig.4 Effects of cryoprotectants with different concentrations on frozen-thawed sperm motility at 4°C

2.2.2 对冻精寿命的影响 4℃保存条件下,不同抗冻剂及其浓度保存的精子 ( $n=20$ ) 解冻后精子寿命如图5。结果显示,冻精中精子的寿命均比鲜精短,在几种抗冻剂及浓度的组合中,5% MeOH和5% EG解冻后精子寿命最长,分别为 ( $44.3 \pm 3.6$ ) s 和 ( $42.8 \pm 5.5$ ) s;两者无显著差异 ( $P > 0.05$ ),5% MeOH作用的冻精寿命与鲜精寿命 ( $47.5 \pm 3.1$ ) s 间亦无显著差异 ( $P > 0.05$ ),5% EG和10% EG ( $39.2 \pm 7.2$ ) s 间冻精寿命差异也不显著 ( $P > 0.05$ )。4种抗冻剂作用时,冻精寿命均随着抗冻剂浓度的增加而缩短。

2.2.3 对冻精膜完整率的影响 4℃保存条件下 ( $n=20$ ),不同抗冻剂及浓度保存的精子解冻后精子膜完整率见图6。5% MeOH作为抗冻剂时,冷冻保存的精子复苏后膜完整率最高,为 ( $85.67 \pm$

1.11)% , 其与鲜精 ( $86.22 \pm 5.29$ )%、10% MeOH ( $81.83 \pm 2.27$ )%、10% EG ( $83.33 \pm 3.73$ )% 之间无显著差异 ( $P > 0.05$ ) , 与 5% MeOH ( $81.17 \pm 2.32$ )% 差异显著 ( $P < 0.05$ ) , 与其他各处理组间差异极显著 ( $P < 0.01$ )。DMSO、Glycerol 和 MeOH 作为抗冻剂时,随着抗冻剂浓度的升高,冻精膜完整率下降,EG 作为抗冻剂时,冻精膜完整率则随着浓度升高而升高。

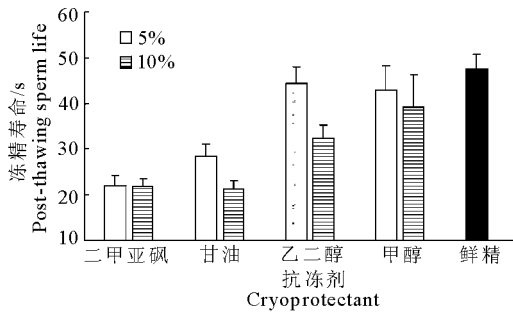


图5 4°C时抗冻剂及其浓度对冻精寿命的影响

Fig. 5 Effects of cryoprotectants with different concentrations on frozen-thawed sperm life at 4°C

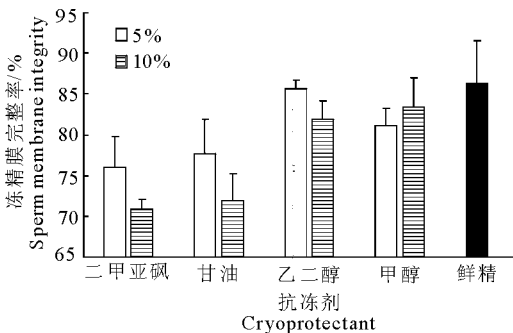


图6 4°C时抗冻剂及其浓度对冻精膜完整率的影响

Fig. 6 Effects of cryoprotectants with different concentrations on frozen-thawed sperm membrane integrity at 4°C

## 3 讨论

### 3.1 抗冻剂对精子的毒性作用

由于不同鱼类精子的生理特性差异很大,对抗冻剂的响应也不同,而精子的冷冻效率在一定程度上取决于所选抗冻剂对精子的毒性作用 (Rana, 1995),因为它可以导致精子质膜结构改变、降低精子的运动能力、影响精子的授精功能 (陈松林, 2007);因此有必要探讨抗冻剂对鲜精的影响,以判断抗冻剂的毒性作用。在4种抗冻剂中,DMSO 一直被认为对人体细胞有较高的毒性作用 (陈松林等,1992;Cabrita et al,2010);MeOH 因其对细胞的低毒作用而被应用于一些哺乳动物细胞、眼虫和血

吸虫的冷冻保存中 (Ashwood & Lough,1975;Harvey et al,1982)。本次研究结果表明,Glycerol 和 DMSO 对暗色唇鱼精子的活力、寿命和膜完整性的负作用要比 MeOH 和 EG 高,且在作用时间为 1 min 时,Glycerol 和 DMSO 对应的各指标值都比 MeOH 和 EG 低。笔者推测,对于暗色唇鱼精子,MeOH 和 EG 的毒性作用要比 Glycerol 和 DMSO 低。从4种抗冻剂对精子活力、寿命和膜完整率的影响来看,在 180 min 时,活力和寿命已降到最低水平,分别不超过 12% 和 45 s,而膜完整率还维持在相对较高的水平,均在 55% 以上,可能是抗冻剂的毒性作用主要影响了精子的运动和授精能力,而在膜完整性上的表现并不明显。

抗冻剂对细胞的毒性作用会随着其浓度升高而增强 (Lahnsteiner & Mansour,2008)。在暗色唇鱼精子冷冻过程中,随着抗冻剂浓度的增加,冻精的活力、寿命和膜完整率均呈下降趋势;笔者推测,在此过程中抗冻剂的毒性起了主要作用。

### 3.2 抗冻剂对精子的保护作用

不同抗冻剂对细胞的通透性存在差异,一般认为采用渗透性大的抗冻剂保存精子能获得较高的存活率 (Gilmore et al,1997)。DMSO 因其高渗透性和易与精子膜上磷脂层发生相互作用而被广泛应用于多种鱼类的精子冷冻,MeOH 也能快速进出细胞 (Harvey et al,1982;王晓爱等,2012);很多研究也表明,Glycerol 的冷冻效果次于 DMSO、MeOH 和 EG (Rana,1995;Fox & Burdick,1963)。暗色唇鱼精子冷冻过程中,DMSO 和 Glycerol 作为抗冻剂时,冷冻效果不佳,除了与其毒性作用有关外,可能是这两种抗冻剂对其精子细胞的渗透性较低,不能满足冷冻保存的需要;但其细胞膜完整率还维持在较高水平,说明除了少量精子细胞膜损伤外,DMSO 和 Glycerol 对暗色唇鱼精子的其他结构造成了严重损伤;而且 DMSO 和 Glycerol 往往会造成精子尾部凝聚现象,这与斑马鱼精子冷冻结果相似 (Harvey et al,1982)。在哺乳动物精子冷冻中,稀释液中加入卵黄可以降低凝集发生 (Polge,1980)。

MeOH 和 EG 作为抗冻剂时,暗色唇鱼冷冻复苏后的精子寿命和细胞膜完整率与鲜精差异不显著,但其冻精活力不到鲜精的 50%;笔者推测,MeOH 和 EG 在暗色唇鱼精子冷冻复苏过程中对细胞膜起到了良好的保护作用,但可能干扰了精子能量代谢的平衡 (Hammerstedt et al,1990;Watson,1995)。

志谢:中国科学院昆明动物研究所珍稀特有鱼类保育研究基地的杨世论、倪仰居、施丛永和施茂在实验过程中给予诸多帮助,在此一并表示感谢!

#### 参考文献

- 陈松林,刘宪亭,鲁大椿,等.1992.鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究[J]. 动物学报, 38(4):413-424.
- 陈松林.2007.鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 北京:中国农业出版社.
- 黄晓荣,章龙珍,乔振国,等.2007.抗冻剂对日本鳗鲡精子活力及运动时间的影响[J]. 海洋渔业, 29(3):193-199.
- 乐佩琦,陈宜瑜.1998.中国濒危动物红皮书·鱼类[M]. 北京:科学出版社.
- 司维,李亚辉,关沫,等.2004.四种渗透性防冻剂在猕猴精子低温冷冻保存中对精子功能状态的影响[J]. 动物学研究, 25(1):32-36.
- 王晓爱,杨君兴,陈小勇,等.2012.软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存[J]. 动物学研究, 33(3):283-289.
- 杨剑,潘晓赋,陈小勇,等.2010.李仙江鱼类资源的现状与保护对策[J]. 水生态学杂志, 3(2):54-60.
- 杨永宏,杨君兴,潘晓赋,等.2011.云南李仙江流域水电开发中的鱼类资源保护[J]. 动物学研究, 32(2):188-195.
- Ashwood-Smith M J, Lough P. 1975. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with methanol[J]. Cryobiology, 12(5): 517-518.
- Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Púramo S, et al. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives[J]. Journal of Applied Ichthyology, 26(5): 623-635.
- Fox R R, Burdick J F. 1963. Preservation of Rabbit Spermatozoa-Ethylene Glycol Vs Glycerol for Frozen Semen[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 113(4): 853-856.
- Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. 2002. Introduction to Conservation Genetics [M]. 2nd Ed. Cambridge UK: Cambridge University Press.
- Freshney R I. 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications (6<sup>th</sup> ed)[M]. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey:365-382.
- Gilmore J A, Liu J, Gao D Y, et al. 1997. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa[J]. Human Reproduction, 12(1): 112-118.
- Hammerstedt R H, Graham J K, Nolan J P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive [J]. Journal of Andrology, 11(1):73-87.
- Harvey B, Kelley N R, Ashwood-Smith M J. 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol[J]. Canadian Journal of Zoology, 60(8): 1867-1870.
- Horvath A, Wayman W R, Dean J C, et al. 2008. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study [J]. Journal of Applied Ichthyology, 24(4): 443-449.
- Lahnsteiner F, Mansour N. 2008. Protocols for the cryopreservation of Salmonidae semen, *Lota lota* (Gadidae) and *Esox lucius* (Esocidae) Northerpike (Livro). In: Cabrita E, Robles V, Herraes MP (eds.). Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species Biology Series [M]. CRC Press (Taylor and Francis group):373-384.
- Mann T. 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract [M]. 2nd Ed. Methuen, London: Wiley, 493.
- Mounib M. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa[J]. Reproduction, 53(1): 13.
- Muchlisin Z A. 2005. Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation[J]. Biodiversitas, 6(1): 66-69.
- Polge C, Smith A U, Parkes A S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures[J]. Nature, 164: 666-668.
- Polge C. 1980. Freezing of spermatozoa. In Low-temperature preservation in medicine and biology[M]. Edited by Ashwood-Smith M J and Farrant J. Pitman Medical, Tunbridge Wells:45-65.
- Rakitin A, Ferguson M M, Trippel E A. 1999. Spermocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season[J]. Aquaculture, 170(3-4): 349-358.
- Rana K J. 1995. Cryopreservation of Fish Spermatozoa [J]. Methods in Molecular Biology, 38(5):151-165
- Watson P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function[J]. Reproduction, Fertility and Development, 7(4): 871-891.
- Zhang Y Z, Zhang S C, Liu X Z, et al. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology[J]. Theriogenology, 60(5): 989-996.

## Effects of Four Penetrating Cryoprotectants on Cryopreservation of *Semilabeo obscurus* Sperm

WANG Xiao-ai<sup>1,2</sup>, YANG Jun-xing<sup>1</sup>, CHEN Xiao-yong<sup>1</sup>, PAN Xiao-fu<sup>1</sup>, LI Zai-yun<sup>1</sup>

- (1. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, P. R. China;
2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

**Abstract:** The present study aimed to examine effects of four penetrating cryoprotectants (dimethyl sulfoxide, glycerol, ethylene glycol and methanol) on fresh and frozen-thawed (freezing temperature was 4°C) sperms of *Semilabeo obscurus*. The function of fresh and frozen-thawed sperms was evaluated by sperm motility, sperm life and sperm membrane integrity. Results obtained here showed that: four penetrating cryoprotectants presented different negative effects on fresh sperm motility and membrane integrity, methanol < ethylene glycol < dimethyl sulfoxide < glycerol; negative effects on fresh sperm life were also observed, methanol < ethylene glycol < glycerol and dimethyl sulfoxide; fresh sperms of *S. obscurus* [with (36.17 ± 4.06)% for motility, (47.5 ± 3.1)s for life, and (86.22 ± 5.29)% for membrane integrity] were frozen for a short-term; the post-thawing motility of frozen sperms treated with 5% methanol or 5% ethylene glycol were respectively (18.33 ± 1.70)% and (17.83 ± 2.67)%, which were significant different with the fresh sperm motility and higher than those frozen sperms with other treatments; the post-thawing life of frozen sperms treated with 5% methanol or 5% ethylene glycol were respectively (44.3 ± 3.6) s and (42.8 ± 5.5) s, which were longer than those frozen sperms with other treatments; there was no significant difference between post-thawing life of frozen sperms treated with 5% methanol and fresh sperm life; In terms of sperm membrane integrity, 5% methanol was the optimal cryoprotectants, which had no significant differences with fresh sperm membrane integrity. These results indicated that: 1) dimethyl sulfoxide and glycerol were not the suitable cryoprotectants for *S. obscurus* sperm cryopreservation; 2) methanol and ethylene glycol had similar effects, which were potential penetrating cryoprotectants for *S. obscurus* sperm cryopreservation.

**Key words:** penetrating cryoprotectants; *Semilabeo obscurus*; sperm cryopreservation