

半滑舌鲷精子冷冻保存

田永胜 陈松林* 季相山 孙礼娟 翟介明

(农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 半滑舌鲷精子冷冻保存对于人工繁殖育苗、杂交育种、雌核发育及其性别控制研究具有重要的意义,为此,本文对半滑舌鲷精子冷冻保存方法进行了研究。分别利用 2.8 mol/L 的二甲基亚砜(DMSO)、甘油(Gly)和 1,2-丙二醇(PG)冷冻保存该鱼精子。结果显示,DMSO 冷冻保存精子的活力较高。利用 MPRS+2.8 mol/L DMSO 以 1:0.5、1:1、1:1.5 和 1:2 的比例稀释并冷冻精子,1:1 比例在冻前能够抑制精子的运动,冻后活力可达 $82.50 \pm 3.54\%$,显著高于其他稀释比例($P < 0.05$)。分别利用冷冻保存液 A(MPRS+2.8 mol/L DMSO)和 B(TS-2+2.8 mol/L DMSO)稀释平衡精子,精子在 A 中的冻前快速运动时间、寿命分别为 37.75 ± 6.45 s 和 145.00 ± 78.98 s,与鲜精无显著差异($P > 0.05$)。利用以上两种冷冻稀释液冷冻保存精子,精子在 A 液中的冻后活力和寿命分别可达 $53.50 \pm 6.69\%$ 和 98.00 ± 13.51 s,冷冻效果优于 B 液($P < 0.05$)。冷冻后精子的受精率和孵化率分别为 $55.00 \pm 5.00\%$ 和 $35.00 \pm 13.23\%$,受精率与鲜精无显著性差异($P > 0.05$),因此认为 MPRS+2.8 mol/L DMSO 可用于半滑舌鲷精子的冷冻保存。

关键词 半滑舌鲷 精子 冷冻保存

中图分类号 Q65;Q959.4 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2009)06-0097-06

Cryopreservation of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* sperm

TIAN Yong-sheng CHEN Song-lin* JI Xiang-shan
SUN Li-juan ZHAI Jie-ming

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

ABSTRACT Cryopreservation of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* sperm offers benefits for artificial propagation, hybridization, gynogenesis and sex control. In order to develop a protocol to freeze tongue sole sperm, the effects of cryoprotectants, extenders and dilution ratio on motility, fertilization rate and hatching rate of frozen-thawed sperm were evaluated. Dimethylsulfoxide(DMSO) provided higher protection than glycerol and 1,2-propylene glycol during freezing and thawing. Motion time and life of sperm in A(MPRS + 2.8 mol/L DMSO) and B(TS-2 + 2.8 mol/L DMSO) before freezing were 37.75 ± 6.45 sec and 145.00 ± 78.98 sec, which was not different from that of fresh sperm ($P > 0.05$). The motility and life of frozen-thawed sperm in A

国家自然科学基金项目(30570259)、“国家”863 项目(2006AA10A403)、农业科技成果转化资金项目(2007GB2C600174)和农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室开放课题(实开 2005-03)共同资助

* 通讯作者。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2008-12-18; 接受日期: 2009-04-07

作者简介: 田永胜(1964-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事鱼类低温生物学及遗传育种研究。E-mail: tianys@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85844606

were $53.50 \pm 6.69\%$ and 98.00 ± 13.51 sec, which was significantly higher than that of frozen-thawed sperm in B. When sperm were diluted with A at a ratio of 1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 1.5 and 1 : 2, the highest motility ($82.5 \pm 3.54\%$, 1 : 1 dilution ratio) of frozen-thawed sperm was obtained and which was significantly higher than that of other dilution ratio treatment. According to the results above, tongue sole sperm were cryopreserved successfully with MPRS + 2.8 mol/L DMSO at a dilution ratio of 1 : 1. As a result, the fertilization rate ($55.0 \pm 5.0\%$) and hatching rate ($35 \pm 13.23\%$) of frozen-thawed sperm were obtained, which was not significantly different from that of fresh sperm ($P > 0.05$).

KEY WORDS *Cynoglossus semilaevis* Semen Cryopreservation

半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* Gunther 属于鲽形目 Pleuronectiformes, 鳎亚目 Soleoidei, 舌鳎科 Cynoglossidae, 舌鳎属 *Cynoglossus*, 三线舌鳎亚属 *Areliscus*, 在我国沿海均有分布, 主要分布在渤海、黄海, 是一种温水性底层鱼类。经过近年来的开发, 半滑舌鳎已成为国内海水鱼类工厂化养殖开发的主要品种之一。半滑舌鳎与其他鲽鳎鱼类相比, 雌、雄个体差异大, 雌鱼生长速度远大于雄鱼, 人工养殖条件下 2 龄半滑舌鳎雌鱼可达 617.86 g, 而雄鱼仅为 150.71 g, 相差 3 倍以上, 雌鱼经济价值也远高于雄鱼。因此, 利用雌核发育(田永胜等 2008)、伪雄鱼诱导培育等技术途径对半滑舌鳎进行性别控制, 繁育培育雌性化苗种, 对于提高养殖经济效益具有重要意义。从事以上技术研究及生产利用需要有充足的精子源, 而半滑舌鳎雄性个体较小、产精量低, 最大产精量在 1 ml 左右/尾, 因此利用冷冻保存技术将半滑舌鳎精子冷冻保存, 建立其精子冷冻库, 是半滑舌鳎性别控制技术研究及应用中的重要技术环节。近年来国内外学者研究了大菱鲆 *Scophthalmus maximus* (Chen *et al.* 2004)、鲈鱼 *Lateolabrax japonicus* (Ji *et al.* 2004)、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (Zhang *et al.* 2004)、大西洋牙鲆 *Paralichthys dentatus* (田永胜等 2006)、圆斑星鲽 *Verasper variegatus* (Tian *et al.* 2008) 和大西洋鲟 *Acipenser sturio* (Kopeika *et al.* 2000) 等鱼类的精子冷冻技术, 并建立了相应的精子冷冻库, 在鱼类育种中发挥了重要的作用, 而半滑舌鳎精子冷冻保存至今还未见报导。本文将对抗冻剂种类、冷冻保存液配方和精子稀释比例进行筛选, 对冷冻前后精子活力和寿命、冷冻精子受精率和孵化率进行比较研究, 以期建立半滑舌鳎精子冷冻保存技术, 为半滑舌鳎人工繁殖育苗、杂交育种、雌核发育和性别控制研究提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 半滑舌鳎亲鱼来源及精液的采集

使用山东莱州明波水产有限公司培育的半滑舌鳎, 自人工控光、控温的亲鱼培育池中选取达到性成熟的半滑舌鳎雄鱼 20 尾, 体重在 300~500 g, 采用腹部挤压法采集精液, 事先将雄鱼泄殖孔周围腹部的水分用纸巾擦干, 用玻璃吸管吸取乳白的精液, 注意不要吸取排出的黄色尿液。将所采集精液盛入干燥的 10 ml 玻璃瓶中(玻璃瓶置于冰上), 避免光线直射精液。由于雄鱼个体的成熟度不同, 每次采集精子的活力差异较大。

1.2 抗冻剂的选择

首先配制的稀释液 MPRS (NaCl 60.35 mmol/L, NaH_2PO_4 1.8 mmol/L, NaHCO_3 3.00 mmol/L, KCl 5.23 mmol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.13 mmol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.13 mmol/L, D-Glucose 55.55 mmol/L) (Ji *et al.* 2004), 再利用 MPRS 分别配制 2.8 mol/L 二甲基亚砜(DMSO)、甘油(Gly)和 1,2-丙二醇(PG), 然后分别以 1 : 1 的比例稀释半滑舌鳎精液, 利用 3 步冷冻法将稀释精液在液氮中冷冻(Chen *et al.* 2004), 冷冻 24 h 后将精子在 37 °C 水浴中解冻, 解冻后精子在显微镜下利用 23 °C 海水激活并观察其活力和寿命, 实验重复 3 次。

1.3 精子稀释比例的选择

利用 MPRS 配制 2.8 mol/L DMSO 做为精子冷冻保存液,利用该保存液分别将半滑舌鳎精子以 1:0.5、1:1、1:1.5 和 1:2 的比例稀释,稀释后在显微镜下观察精子在保存液中的状态,判断是否被抑制,在显微镜下利用细胞计数板统计活动精子数量,计算百分率。平衡 5 min 后吸取少量精子在细胞计数板上,滴加养殖用海水(盐度为 28)激活精子,并在镜下统计精子的活力(Tian *et al.* 2008)。将以上各稀释比例的精子用 3 步法冷冻保存 24 h,解冻后观察精子的活力。

1.4 精子在不同冷冻保存液中的冻前活力比较

利用 MPRS 和 TS-2(Ji *et al.* 2004;Chen *et al.* 2004)两种稀释液分别配制冷冻保存液 A:MPRS+2.8 mol/L DMSO,B:TS-2+2.8 mol/L DMSO,做为精子冷冻保存液,将其置于 4 °C 预冷。

将以上精子冷冻保存液与精子以 1:1 的比例稀释,在室温下静置,用解剖针蘸取稀释的精液在镜下用海水激活,同时用秒表记录时间并观察精子的运动情况。记录精子快速运动时间,精子寿命,评估运动精子的百分数。

原精活力的观察方法:在载玻片上加一滴海水,在显微镜下调节好焦距,用解剖针蘸取精液溶入水中,同时用秒表计时,并立即在镜下观察精子的运动情况。记录精子快速运动时间,精子寿命,评估精子活力。

精子的快速运动时间为精子进入海水至精子由快速旋转变为慢速游走时的时间。精子寿命为精子进入海水被激活到只有少数精子做摆动运动的时间。精子活力为快速运动精子占全部精子的百分数。

1.5 精子在不同冷冻保存稀释液中冻后活力比较

利用以上两种精子冷冻保存液 A 和 B 分别与精液以 1:1 的比例稀释,分别盛入 1.8 ml 的冷冻管中,采用“精子冷冻三步法”在液氮中冷冻保存(Chen *et al.* 2004)。保存 24 h 后在 37~38 °C 的水浴中解冻,采用上述方法观察精子的快速运动时间、寿命和活力。

1.6 冷冻精子受精实验

利用冷冻保存液 A 冷冻保存 26 个月(2005 年 8 月~2007 年 10 月)的半滑舌鳎精子在 37 °C 水浴中解冻后,与人工采集的半滑舌鳎卵干法受精,精卵体积比例为 1:100;同时利用等量的新鲜精液与新鲜卵授精作为对照。23 °C 海水中孵化受精卵,受精 8 h 后发育至囊胚期统计受精率,出膜后 2 h 统计孵化率。

1.7 数据处理方法

使用 SPSS 软件进行单因子方差分析(One way ANOVA),使用 Excel 对分析所得数据做柱状图。

2 结果

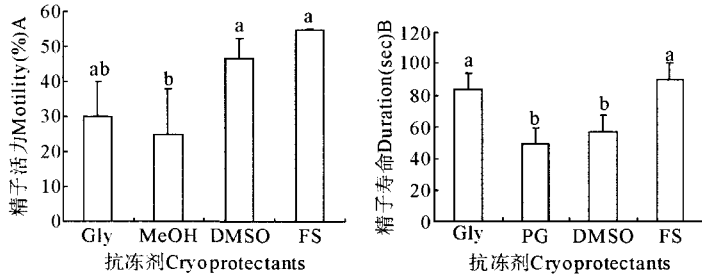
2.1 适宜抗冻剂的选择

半滑舌鳎精子分别利用 Gly、PG 和 DMSO 3 种抗冻剂冷冻保存(图 1),其精子活力分别为 30.00±10.00%、25.00±12.91% 和 46.67±5.77%,鲜精活力为 55.00±0.12%,精子在 DMSO 中的活力明显较其他两种高($P<0.05$),与鲜精无显著性差异($P>0.05$)。精子在 3 种抗冻剂中的寿命分别为 84.00±13.45 s、49.33±11.15 s 和 57.33±7.51 s,鲜精寿命为 90.00±7.40 s,精子在甘油中的寿命明显较其他两种长($P<0.05$),与鲜精无显著性差异($P>0.05$)。从实验结果可以看出 DMSO 可有效的保护精子的活力,而甘油对延长精子寿命有一定的作用。

2.2 精子稀释比例选择

利用抗冻液 A 将精子以 1:0.5、1:1、1:1.5 和 1:2 的比例稀释,只有在 1:1 的稀释比中精子的活力

可被冷冻保存液完全抑制,在其他3种比例中都不能被完全抑制(图2)。将不同比例稀释的精液冷冻保存后观察活力,精子活力分别为:67.50±3.54%、82.50±3.54%、80.00±7.07%和47.50±3.54%,以1:1和1:1.5稀释冷冻的精子活力明显高于其他稀释比($P<0.05$)。



注:FS新鲜精子 fresh sperm

图1 半滑舌鲷精子在不同抗冻剂中的活力(A)和寿命(B)($n=3$)

Fig. 1 Motility(A)and life(B)of *C. semilaevis* sperm in different cryoprotectants

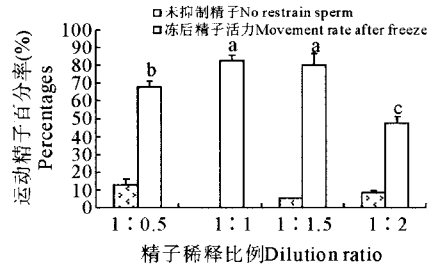


图2 半滑舌鲷精子在冷冻保存液 A(MPRS+2.8 mol/L DMSO)中以不同比例稀释及冻前和冻后活力($n=3$)

Fig. 2 Motility of pre-freezing and post-thaw sperm of *C. semilaevis* in A(MPRS+2.8 mol/L DMSO) at different dilution ratio

2.3 精子在不同冷冻保存稀释液中平衡及冻前活力

图3显示了半滑舌鲷鲜精及精子在冷冻保存液A和B中平衡5 min后的快速运动时间、寿命和活力。半滑舌鲷鲜精、A和B中平衡精子用海水激活后的快速运动时间分别为:24.68±2.88 s、37.75±6.45 s和24.67±5.69s,精子在A液中平衡后快速运动时间较长,与其他两种情况下相比较有显著性差异($P<0.05$)。精子的寿命分别为48.50±13.99 s、145.00±78.98 s和105.00±15.59 s,同样精子在A液中平衡后精子的寿命较长,而未经处理精子的寿命最短,相互之间具有显著性差异($P<0.05$)。精子活力分别为50.00±10.00%、38.75±6.29%和31.67±10.40%,鲜精活力最高,A中次之,B中最低,鲜精与A中平衡精子无显著性差异($P>0.05$),而与B中平衡精子有显著性差异($P<0.05$)。综合以上3种情况,可以看出半滑舌鲷精子较适合于在冷冻保存稀释液A中冷冻保存。

2.4 精子在不同冷冻保存液中冷冻保存及解冻后活力

分别利用冷冻保存液A和B冷冻保存半滑舌鲷精液,冷冻保存24 h,解冻后其精子快速运动时间分别为33.3±6.75和38.00±6.45 s,无显著性差异($P>0.05$);冷冻解冻精子寿命分别为79.70±10.99 s和98.00±13.51 s,具有显著性差异($P<0.05$);冷冻解冻精子活力分别为45.00±4.71%和53.50±6.69%,具有显著性差异($P<0.05$)。结果显示,利用冷冻保存液A冷冻保存半滑舌鲷精子的效果较B好(图4)。

2.5 冷冻精子受精率孵化率比较

利用冷冻保存的半滑舌鲷精子与鲜卵授精,其受精率和孵化率分别为55.00±5.00%和35.00±13.23%,利用鲜精进行授精的受精率和孵化率分别为77.67±12.67%和65.00±5.00%,冷冻精子与鲜精的受精率无显著性差异($P>0.05$),但孵化率存在显著性差异($P<0.05$)(图5)。

3 讨论

半滑舌鲷能够成为海水工厂化养殖的主要鱼类之一,而且能为诸多养殖公司创造极大的经济效益,科研工作者在半滑舌鲷品种驯化、生殖调控、人工繁殖、苗种培育、成鱼养殖及疾病防治等方面做了大量研究工作。但是如何提高半滑舌鲷养殖群体中雌性化率,提高养殖品种的品质,培育适合于市场发展需求的养殖新品种,是目前急需解决的课题之一。半滑舌鲷精子冷冻保存对于野生种质资源及优良遗传性状保存,对养殖品种遗传改良,新品种研制和培育都具有重要的意义。

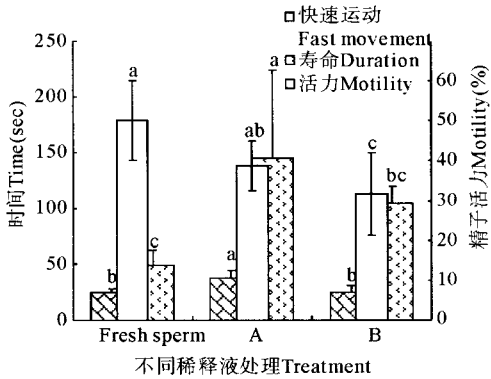


图 3 半滑舌鳎精子在不同冷冻保存稀释液中的冻前活力比较(n=3~6)

Fig. 3 Motility of pre-freezing sperm of *C. semilaevis* in different cryoprotectants

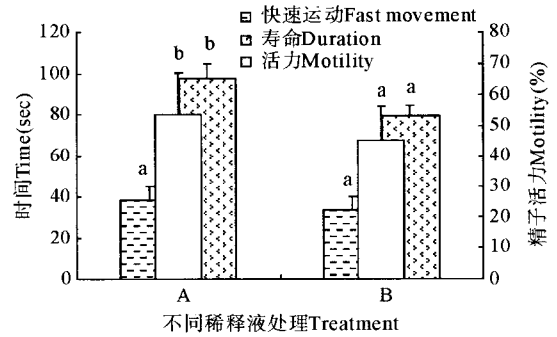


图 4 半滑舌鳎精子在不同抗冻稀释液中的冻后活力比较(n=10)

Fig. 4 Motility of post-thaw sperm of *C. semilaevis* in different cryoprotectants

抗冻剂在精子的冷冻中具有保护精子细胞免受冰晶损伤和调节精子渗透压的作用。在鲈鱼 *Lateolabrax japonicus*、大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 和大西洋鲟 *Acipenser sturio* 等鱼的精子冷冻保存中对 6 种抗冻剂: DMSO、PG、乙二醇(EG)、甘油(Gly)、MeOH 和二甲基甲酰胺(DMF)的冷冻效果进行了研究,认为 DMSO 较适合于以上鱼类精子的冷冻保存(Ji *et al.* 2004; Chen *et al.* 1992, 2004; Kopeika *et al.* 2000)。本实验对甘油、1,2-丙二醇和二甲基亚砷冷冻保存半滑舌鳎精子的效果进行比较,发现 DMSO 冷冻保存的半滑舌鳎精子解冻后活力较高,这一点与在其他鱼类精子冷冻保存时抗冻剂的选择结果一致,可以说明 DMSO 在鱼类精子的冷冻保存上具有一定的广泛性。

冷冻保存液与精液的稀释比例对精子的脱水平衡和冷冻存在着明显的影响。大西洋鲟精子以 1:1 的比例在 56.0%~76.0% Tris-HCl(pH 8.0)、14.4%~24.0% DMSO 和 9.6%~20.0% 卵黄中稀释并冷冻保存,解冻后精子活力为 10%~15%(Kopeika *et al.* 2000)。尼罗罗非鱼精子以 1:5 的比例在 15% 牛奶、5% 甲醇和 0.6 mol/L 蔗糖配制而成的冷冻保存液中冷冻保存,以麦管冷冻精子的受精率可达 85%(Altunok *et al.* 2004)。本实验利用 MPRS+2.8 mol/L DMSO 以 1:0.5~2 的不同比例稀释半滑舌鳎精液,发现 1:1 和 1:1.5 的比例稀释精子后冷冻保存的精子活力较高,但 1:1 的比例稀释可完全抑制精子的运动,而其他比例在冷冻前不能完全抑制精子的运动,所以选用 1:1 比例进行半滑舌鳎精子冷冻保存较好。不同鱼类精液的浓度不同,而且采用的稀释液成分和浓度也不同,因此在鱼类精子的冷冻保存中对精液的稀释比例进行筛选,对于平衡精子的渗透压,提高精子的冷冻成活率具有重要的作用。

精子的活力、寿命和受精能力是评价精子质量的主要指标,精子冷冻保存前后其相应指标会发生一定的变化,目前还没有任何一种冷冻方法能够保证鱼类精子在冷冻后生理指标不变。Ergun 等(2004)利用 3 种冷冻稀释液对鲤鱼 *Cyprinus carpio* L. 精子进行冷冻保存,并对其活力、寿命和受精能力进行研究,以 DMA 冷冻稀释液冷冻保存的精子其最高受精率为 25.9%。Tian 等(2008)对圆斑星鲽精子进行了冷冻保存,并对不同盐度和不同温度下激活对冷冻精子活力和寿命的影响进行了研究,提出了冷冻精子适宜和激活条件。本文利用两种适合于鲆鲽鱼类精子冷冻保存的稀释液 MPRS+2.8 mol/L DMSO 和 TS-2+2.8 mol/L DMSO 冷冻保存半滑舌鳎精子,发现 MPRS+2.8 mol/L DMSO 表现出了较好的保存效果,但冷冻后精子与鲜精相比较,其活力、寿命、受精率和孵化率都有所降低,在牙鲆(Zhang *et al.* 2004)、鲈鱼(Ji *et al.* 2004)和圆斑星鲽(Liu

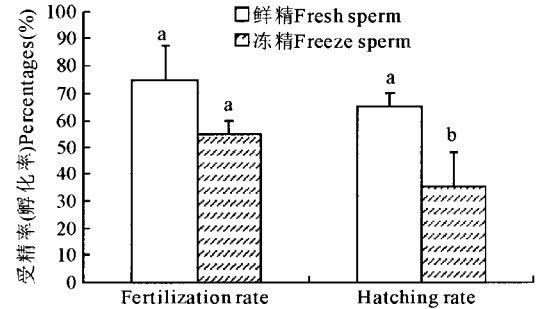


图 5 冷冻精子和鲜精的受精率与孵化率(n=3)

Fig. 5 Fertilization and hatching rate of post-thaw sperm and fresh sperm of *C. semilaevis*

et al. 2006)等鱼类精子冷冻保存中也有相似的情况。一方面是由于半滑舌鲷精子量少,采集困难,利用挤压腹部法采集精子时很难避免尿液的混入,影响了保存精子的质量;另一方面在冷冻和解冻过程中对精子细胞膜造成损伤,从而降低精子的活力。不同个体半滑舌鲷精子的活力差别很大,本实验中采集的鲜精活力在50%~90%;因此在每一个实验中半滑舌鲷精子的活力不同,给冷冻精子条件的选择造成了一定的困难。

冷冻精子在鱼类杂交育种方面可突破地理、时间隔离等因素的限制,实现不同繁殖时间、不同地理分布的远缘鱼类之间的杂交,为养殖鱼类优良遗传性状的组合提供技术渠道。目前利用鱼类冷冻精子进行人工繁殖鱼苗及人工杂交育种的例子并不多,但是利用不同种属鱼类冷冻精子进行杂交育种已初获成功,例如利用石鲮冷冻精子与牙鲆卵远缘杂交,获得了102尾成功变态的鱼苗(季相山等 2005)。大西洋牙鲆冷冻精子与褐牙鲆卵杂交,获得了40 000尾鱼苗,实验显示杂交鱼苗具有耐高温的性能(田永胜等 2006)。另外利用冷冻保存的鲑鱼精子成功诱导了半滑舌鲷雌核发育,建立了相应的雌核发育技术(田永胜等 2008)。以上研究结果说明,鱼类冷冻精子技术及冷冻精子库的建立,在鱼类杂交育种、雌核发育诱导方面具有突破地理和时间隔离的优点,为鱼类品种改良和新品种的培育开辟了新的技术渠道。半滑舌鲷精子冷冻保存技术的建立,为开展同源精子诱导半滑舌鲷雌核发育研究及雌性化苗种的培育打下了基础。

参 考 文 献

- 田永胜,陈松林,刘本伟,王 波. 2006. 大西洋牙鲆冷冻精子×褐牙鲆卵杂交胚胎的发育及胚后发育. 水产学报, 30(4): 1~11
- 田永胜,陈松林,邵长伟,刘本伟,庄志猛. 2008. 鲑鱼冷冻精子诱导半滑舌鲷胚胎发育. 海洋水产研究, 29(2): 1~9
- 季相山,陈松林,赵 燕,邓 寒. 2005. 石鲮、牙鲆精子冷冻保存研究及其在人工杂交中的应用. 海洋水产研究, 26(1): 14~16
- Altunok, M., Müller-Belecke, A., and HÖrstgen-Schwark, G. 2004. Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Sperm. Deutscher Tropentag, October 5~7, Berlin, "Rural Poverty Reduction Through Research for Development"
- Chen, S. L., Liu, X. T., Lu, D. C., Zhang, L. Z., Fu, C. J., and Fang, J. P. 1992. Cryopreservation of spermatozoa of silver carp, common carp, blunt snout bream and grass carp. Acta Zool. Sinica, 38: 413~424
- Chen, S. L., Ji, X. S., Yu, G. C., Tian, Y. S., and Sha, Z. X. 2004. Cryopreservation of spermatozoa from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large scale fertilization. Aquaculture, 236: 547~556
- Ergun, A., Yusuf, B., Selçuk, S., and Necmettin, T. 2004. Cryopreservation of mirror carp semen. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28: 837~843
- Ji, X. S., Chen, S. L., Tian, Y. S., Yu, G. C., Shan, Z. X., Xu, M. Y., and Zhang, S. C. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. Aquaculture, 241: 517~528
- Kopeika, E. F., Williot, P., and Goncharov, B. F. 2000. Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 16(1~4): 167~173
- Liu, X. Z., Zhang, S. C., Zhang, Y. Z., and Xu, Y. J. 2006. Cryopreservation of the sperm of spotted halibut *Verasper variegates* (Pleuronectiformes, Pleuronectidae). Ind. J. Mar. Sci. 35(1): 24~28
- Tian, Y. S., Chen, S. L., Ji, X. S., Zhai, J. M., Sun, L. J., Chen, C., and Su, P. Z. 2008. Cryopreservation, of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. Aquaculture, 284: 268~271
- Zhang, Y. Z., Zhang, S. C., Liu, X. Z., Xu, Y. Y., Wang, C. L., Sawant, M. S., Li, J., and Chen, S. L. 2003. Cryopresevation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. Theriogenol. 60: 989~996