

凍結保存精子を用いて発生させたアコヤガイ幼生の 成長, 生残と摂餌能力

青木秀夫・林 政博・磯和 潔・川元貴由・太田博巳・成田光好・古丸 明

Growth, Mortality and Feed Intake of Japanese Pearl Oyster
Pinctada fucata martensii Larvae Produced by Cryopreserved Sperm

Hideo AOKI, Masahiro HAYASHI, Kiyoshi ISOWA, Takayuki KAWAMOTO,
Hiromi OHTA, Teruyoshi NARITA, and Akira KOMARU

三重県科学技術振興センター
水 産 研 究 部

第 15 号

平成 19 年 12 月

別 冊

凍結保存精子を用いて発生させたアコヤガイ幼生の 成長, 生残と摂餌能力

青木秀夫・林 政博・磯和 潔^{*1}・川元貴由^{*2}・太田博巳^{*2}・成田光好^{*3}・古丸 明^{*3}

Growth, Mortality and Feed Intake of Japanese Pearl Oyster
Pinctada fucata martensii Larvae Produced by Cryopreserved Sperm

Hideo AOKI, Masahiro HAYASHI, Kiyoshi ISOWA^{*1}, Takayuki KAWAMOTO^{*2},
Hiromi OHTA^{*2}, Teruyoshi NARITA^{*3}, and Akira KOMARU^{*3}

キーワード：アコヤガイ, 精子, 凍結保存, 幼生, 成長

Abstract

Growth, mortality and feeding performance of larvae of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* produced with cryopreserved sperm were evaluated in relation to control larvae produced with fresh semen. Sperm was frozen in a 250 μ L cryopreservation straw, with an extender containing 10% methanol, 18% fetal bovine serum and 72% seawater, at a cooling rate of 17.6 /min until reaching 50 , and then immersed in liquid nitrogen. A total of 7 male and female Japanese pearl oysters, mean weight 58 g, were used for the fertilization. Larvae were reared in beakers in 2 L seawater at a water temperature of 25 for 22 days and fed with the plankton *Pavlova lutheri*. The fertility rate of both fresh and cryopreserved spermatozoa was similar, while post thaw motility of cryopreserved sperm was significantly decreased compared to fresh sperm. No significant differences in growth, mortality, or feed intake were observed between the two groups. The results suggest that larvae produced with cryopreserved sperm were in good physiological condition and comparable to larvae fertilized with fresh semen. Thus, the present study demonstrates that growth and survival responses of pearl oyster larvae produced with cryopreserved spermatozoa are not jeopardized by the cryopreservation process. Cryopreservation is, therefore, recommended as a technique with limited harmful effects for routine seedling propagation.

近年、真珠養殖業では赤変病や有害なプランクトンによるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の大量へい死、真珠の品質の低下（黒川ら 1999, 森実 1999, 松山 2003）が問題となっており、養殖経営は不安定な状態となっている。真珠養殖業における生産性の向上および真珠品質の改善をはかる対策として、耐病性（高生残性）や真珠の品質に関する育種技術を開発することは重要である（和田 1984, 2005）。アコヤガイにおいて、貝殻形態、真珠の色調・真珠物質分泌（巻き）、耐病性に関する選抜効果が明らかにされており、実際に選抜育種によ

り優良形質を有する家系も作出されている（Wada and Komaru 1996, 林 1999, 林・青木 2001, 内村ら 2005）。

育種技術により改良したアコヤガイを養殖現場に普及させるためには、改良した形質を有する種苗を事業規模で大量に生産する必要がある。そのため、アコヤガイ種苗生産施設では親となる個体（家系）を継代飼育して、種苗の生産と形質の安定化を図っている^{*4}。また、効率的な育種を進める観点からも、育種素材として地方集団や特性の評価されたアコヤガイを継代飼育している^{*4}。海面での継代飼育は特殊な技術を必要としない一方で、

* 1 三重県栽培漁業センター

* 2 近畿大学大学院農学研究所

* 3 三重大学大学院生物資源学研究所

飼育施設や労力、費用が必要となり、また飼育中における疾病や赤潮等の発生により家系の維持が困難になるという不安定な面もある。

筆者らは、アコヤガイ種苗の形質の安定化を図るとともに、種苗生産業務の効率化を促進するため、液体窒素を用いた配偶子および受精卵の凍結保存技術の開発に取り組んでおり、これまでに精子の凍結保存に係る最適な条件を明らかにした (Kawamoto *et al.* 2007)。また、凍結精子を用いて異なる精子密度および卵密度での媒精後の受精率を調べて、その受精能力についても検討した*⁵。これらの研究の結果、凍結精子を用いた場合の適切な受精条件が明らかとなった。配偶子の凍結保存技術は本種の育苗や種苗生産作業を効率化する方法として極めて有効と考えられるが、今後、この技術を実際の種苗生産事業で利用する前に、凍結保存精子を用いて発生させた幼生の健全性についても評価する必要がある。

そこで本研究では、凍結保存精子を用いて人工授精し、通常の方法で飼育管理したアコヤガイ幼生の成長、生残、摂餌能力について調べ、それらの結果をもとに凍結保存技術の有効性について検討した。

材料および方法

試験貝

精子や卵を採取するための試験貝には、三重県栽培漁業センター（三重県志摩市）で定法（林・瀬古 1986）により生産されたアコヤガイ3年貝（日本産貝）を雌雄7個体ずつ用いた。試験貝の平均湿重量は、雌が57.2±2.6 g、雄が58.9±2.3 gであった。

採精および精子の凍結保存

雄個体から摘出した生殖巣をメスで切開して精液を40 μL採取し、新鮮精子用および凍結保存用として各20 μLずつ使用した。凍結前に精子を希釈する保存液の組成は、10%メタノール+18%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, Sigma Aldrich Co.) +72%海水とした（いずれもV/V）。精液（20 μL）を保存液で50倍に希釈し、直ちに250 μL容ストローに分注して家畜人工授精用ストローパウダー（富士平工業株式会社）で封入した。ステンレスデュワー瓶（内径185mm、高さ300mm、容量6L）に深さ5 cm程度の液体窒素を入れ、その液面上に浮かべた発

泡スチロール製のフロートにストローを液面と水平に配置して冷却した。フロートの高さは10cmとし（冷却速度は-17.6±0.4℃/分）、-50℃まで冷却した時点で液体窒素中に浸漬して凍結した。凍結過程でのストロー内溶液の温度変化は、熱電対（ET 1, 株式会社チノー）を挿入して封入した同型のストローをサンプルと並置して、温度記録計（AL3000, 株式会社チノー）によりモニタリングした。なお、新鮮精子については受精に用いるまで氷冷した。

人工授精

人工授精実験の概要をFig.1に示した。試験貝の雌雄の組み合わせ7組について、それぞれ新鮮精子と凍結精子の受精区を設けた（7組×2＝計14試験区）。

精液が封入されたストローを液体窒素中で1時間以上浸漬させた後に取り上げ、直ちに室温の淡水中に15秒間浸漬して解凍した。新鮮精子については、凍結精子溶液と精子密度を揃えるため、受精させる直前に海水で50倍に希釈した。

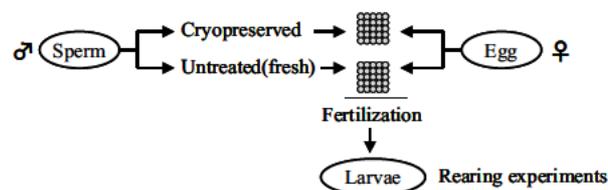


Fig.1 Experimental design.

雌個体からの採卵は切開法で行った。雌個体から卵20万粒を採取し、新鮮精子区および凍結精子区として10万粒ずつを30mL容ガラス瓶中の0.75mMアンモニア添加海水9 mLに収容して成熟を促進させた。卵の一部を抽出して、光学顕微鏡により卵核胞の消失を確認した後、新鮮精子または解凍した凍結精子の溶液1 mL（精液量は20 μL）を添加して最終液量を10mLとし、ガラス瓶を緩やかに攪拌させて媒精した。媒精5分後に受精卵をろ過海水で洗浄し、2Lのビーカーへ収容して25℃に設定したウォーターバス内に設置した。

受精2時間以上が経過した卵（4細胞期以降）を検鏡して受精率を測定した。光学顕微鏡下で無作為に50個以上の卵を抽出し、そのうち正常に卵割している卵の割合

* 4 林 政博, 青木秀夫 (2006) : 高品質アコヤガイ育成強化事業—Ⅷ 耐病性試作品「浜島3号」の飼育結果. 平成17年度三重県科学技術振興センター水産研究部事業報告, 1-2.

* 5 成田光好, 川元貴由, 磯和 潔, 林 政博, 青木秀夫, 古丸 明, 太田博巳 (2005) : アコヤガイ凍結保存精子の受精能力の検討. 日本水産増殖学会第4回大会講演要旨集, 水産増殖 53, 463.

を受精率とした。各媒精処理について同様に3回繰り返して測定し、その平均値を個体の受精率とした。

精子の運動活性

採精した精液あるいは解凍した精子溶液を1 μ L取り、2 mMアンモニア添加海水 (Ohta *et al.* 2007) で最終希釈比が500倍となるように希釈し、試験管ミキサーで攪拌した。その一部 (8 μ L) をスライドグラスに移して、海水で希釈30秒後の精子の運動性を光学顕微鏡に接続したビデオテープレコーダーで録画した。画像をコマ送りで再生し、無作為に抽出した50個以上の精子のうち、前進運動しているものの比率 (運動精子比) を測定した。1個体について同様に2回繰り返して運動精子比を測定し、その平均値を個体の測定値とした。

幼生の飼育

新鮮精子区と凍結精子区の各7試験区において、受精24時間後に浮上したベリジャー幼生を2Lビーカーに収容し、25℃に設定したウォーターバス内に設置した。飼育開始時の幼生の密度は、新鮮精子区では3.2~12.1個体/mL (平均9.3個体/mL)、凍結精子区では7.8~18.1個体/mL (平均10.9個体/mL) で、飼育期間中に幼生の成長に応じて適宜密度を調整した。飼育期間は2005年6月24日から7月15日までの22日間とした。飼育水にはろ過海水を用いた。餌料はハプト藻綱の植物プランクトンである *Pavlova lutheri* とし、1日1回午前中に給餌した。飼育開始時の給餌密度は5,000 cells/mLとし、以後の給餌量は幼生の摂餌状況によって調整した。幼生の摂餌量は、前日に給餌した量から当日の残餌量を差し引いて推定した。飼育水中の *P. lutheri* の数 (残餌量) は、粒度分布測定機 (マルチサイザー, ベックマン・コールター株式会社) によって測定した。

幼生の成長と形態の測定

飼育開始1, 8, 15, 22日目に各試験区から幼生を30個体ずつ無作為に採取し、万能投影機 (V 12A, 日本光学工業株式会社) を用いて殻長と殻高を測定した。また、幼生の形態的特徴を示す指標として、殻長比 = [殻長 / (殻長 + 殻高)] を算出した。

統計学的処理

運動精子比, 受精率および幼生の飼育に関する測定値は、全て平均値 \pm 標準誤差で示した。運動精子比と受精率については、測定値を逆正弦変換した後、対応のある

t検定により、また殻長と殻長比についてはWelchのt検定により新鮮精子区と凍結精子区の平均値に有意な差があるかどうか検定した。へい死率については²検定により有意差を検定した。有意水準は5%とした。

結 果

運動精子比および受精率

新鮮精子区と凍結精子区における運動精子比と受精率をFig.2に示した。運動精子比は、新鮮精子区では80.8 \pm 2.9%, 凍結精子区では27.1 \pm 1.9%で、両者には有意差が認められた。また、受精率は、新鮮精子区では75.1 \pm 2.0%, 凍結精子区では75.3 \pm 2.2%で、有意差は認められなかった。

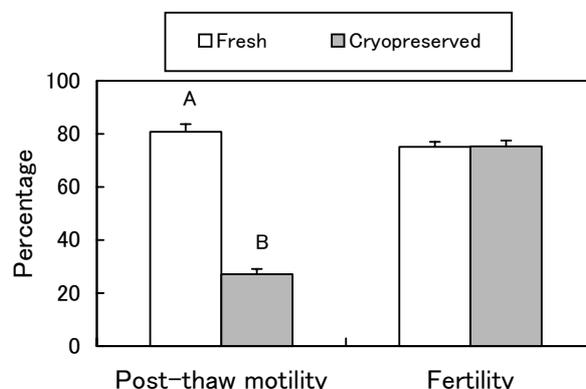


Fig.2 Post-thaw motility of spermatozoa and fertilization rates of eggs inseminated with cryopreserved or untreated (fresh) Japanese pearl oyster sperm. Data are shown as mean \pm SE ($n = 7$). Means with different letters indicate significantly difference (paired t-test, $P < 0.05$).

成長および殻長比

幼生の殻長の測定結果をFig.3に示した。飼育期間中において、新鮮精子区および凍結精子区とも幼生に成長停滞等の異常はみられなかった。ふ化後1日目の幼生の殻長は、新鮮精子区では74.2 \pm 0.4 μ m, 凍結精子区では74.7 \pm 0.6 μ mであった。その後、両区の幼生は順調に成長し、ふ化後22日目 (飼育終了日) における殻長は、新鮮精子区では219.7 \pm 6.2 μ m, 凍結精子区では216.4 \pm 7.0 μ mであった。各測定日において、幼生の殻長には凍結精子区と新鮮精子区との間に有意差は認められなかった。

幼生の殻長比の測定結果をFig.4に示した。ふ化後1日目の幼生の殻長比は、新鮮精子区では54.0 \pm 0.2, 凍結精子区では54.2 \pm 0.1であった。その後、殻長比は両区とも低下し、ふ化後22日目の値は、新鮮精子区では52.0 \pm 0.2, 凍結精子区では52.0 \pm 0.1であった。各測定日において、幼生の殻長比には両区との間に有意差は認められなかった。

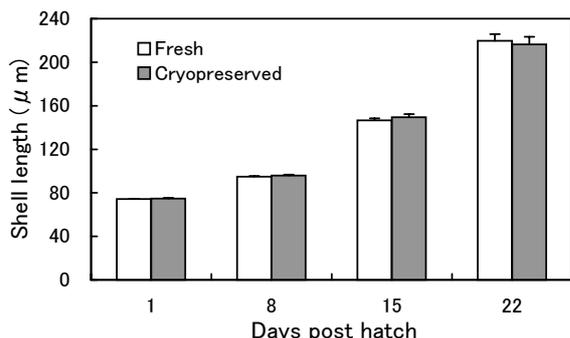


Fig.3 Growth performance of Japanese pearl oyster larvae produced by cryopreserved or untreated (fresh) sperm. Data are shown as mean \pm SE ($n = 7$).

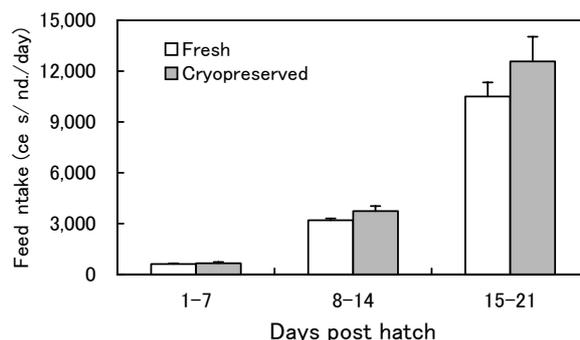


Fig.5 Feed intake estimations of Japanese pearl oyster larvae produced by cryopreserved or untreated (fresh) sperm. Data are shown as mean \pm SE ($n = 7$).

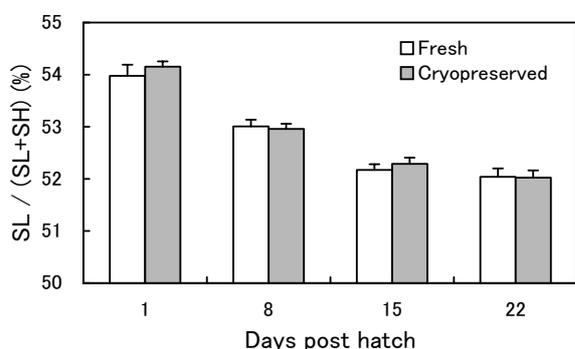


Fig.4 Shell length / (shell length + shell height) as a morphological characteristic of Japanese pearl oyster larvae produced by cryopreserved or untreated (fresh) sperm. Data are shown as mean \pm SE ($n = 7$).
SL: Shell length; SH: Shell height.

摂餌量

飼育期間中における1週間毎の幼生の摂餌量の測定結果をFig.5に示した。ふ化後1日目から7日目の摂餌量は、新鮮精子区では 611 ± 43 cells / 個体 / 日、凍結精子区では 657 ± 74 cells / 個体 / 日であった。ふ化後8日から14日目の摂餌量は、新鮮精子区では $3,198 \pm 103$ cells / 個体 / 日、凍結精子区では $3,738 \pm 294$ cells / 個体 / 日、ふ化後15日から21日目の摂餌量は、新鮮精子区では $10,504 \pm 828$ cells / 個体 / 日、凍結精子区では $12,572 \pm 1,462$ cells / 個体 / 日であった。全ての試験期間において摂餌量は凍結精子区の方が新鮮精子区に比べて高い傾向を示したが、両区間に有意な差は認められなかった。

へい死率

飼育期間中に、新鮮精子区および凍結精子区とも各7試験区のうち3試験区でへい死がみられた。へい死がみられた3試験区のうち、2試験区については雌雄が同じ試験員の組合せの区であった。へい死率は新鮮精子区では $26.9 \pm 15.5\%$ 、凍結精子区では $18.3 \pm 9.4\%$ で、新鮮精

子区の方が高い傾向を示したものの、両区間に有意差は認められなかった。

考 察

飼育期間中における凍結精子区の幼生の殻長は、新鮮精子区との間に有意差は認められず、正常に成長したと推察された。また摂餌量およびへい死率にも凍結精子区と新鮮精子区との間に有意差はみられなかった。へい死した幼生について光学顕微鏡で観察したところ、凍結精子区のみには特異的な症状は確認されなかったことから、へい死の原因は精子の凍結処理に起因するものではないと考えられた。また、幼生の形態を問わず殻長比にも、両区間に有意差はみられなかったことから、凍結精子区の幼生に形態的な異常はないと考えられた。以上のことから、本研究において凍結精子を用いて媒精して発生させた幼生は、いずれも正常な生理的能力を有しており、健全性に問題はないと評価された。

これまでに、二枚貝において凍結保存した精子を用いて発生させた幼生の成長、生残を調査した研究として、薄ら (1997) はマガキ *Crassostrea gigas* における媒精後の正常D型幼生率と殻長、生残率を調べ、これらの項目に新鮮精子区と差がないことを報告している。また、魚類では淡水魚のコイ *Cyprinus carpio* (黒倉ら 1984, Babiak *et al.* 1997) やニジマス *Oncorhynchus mykiss* (Babiak *et al.* 2001) 等において、また海産魚ではタラ (Monib 1978)、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (Tabata and Mizuta 1997)、barammudi *Lates calcarifer* (Palmer *et al.* 1993) 等において、凍結精子により発生させた仔魚の成長、生残、奇形率は、新鮮精子を用いた場合と同程度であったことが報告されている。これらの研究結果は、凍結精子の実用性を示すものであるが、一方で凍結精子により発生させた仔魚では高率で奇形がみられる例や

(Horvath and Urbanyi 2000, Miskolczi *et al.* 2005), 精子頭部内のDNAが損傷を受けることも報告され (Labbe *et al.* 2001, Zilli *et al.* 2003, Cabrita *et al.* 2005), 発生過程に異常をきたす可能性が指摘されている。これら相反する結果は、凍結保存処理による仔魚への影響は魚種や凍結方法によって異なることを示唆している。本研究においては、凍結・解凍したアコヤガイ精子におけるDNAの損傷の状況については明らかではない。しかし、凍結精子区の幼生の成長および生残、形態は、いずれも新鮮精子区と差がなかったことから、DNAが損傷を受けていたとしても、それにより成長が遅滞したり、発生率が低下するほど大きいものではないことが推察された。

本研究では、凍結精子区と新鮮精子区の運動精子比は、新鮮精子区が80.3%であったのに対して凍結精子区では27.1%と、相対比で33.8%にまで低下していた。筆者らが行ったこれまでの研究でも、凍結・解凍後のアコヤガイ精子の運動精子比は、凍結前に比べておよそ30%に低下していた (Kawamoto *et al.* 2007)。このように運動精子比が低下した凍結精子区でも、受精率は新鮮精子区と差が認められなかった。本研究では、10万粒の卵に対し凍結解凍した精子を精液量で20 μ L分媒精したが、このような卵と精子の割合では運動率が30%程度に低下しても新鮮精子と同等の受精率が得られるものと推察された。

以上のように、凍結保存精子を用いて発生させたアコヤガイ幼生の成長や摂餌能力は、新鮮精子で受精した幼生と差がなく、正常であると評価された。したがって、本研究において実施した凍結保存方法は、種苗生産現場においても有効に活用できるものであると考えられた。今後は、稚貝から成貝の段階における試験員の養殖特性や生理状態、貝殻形態、再生産能力についても調査し、凍結保存技術の有効性を実用面からさらに検討する必要があると考えられる。

要 約

アコヤガイ精子の凍結保存技術を開発する研究の一環として、凍結保存精子を用いて発生させた浮遊幼生の成長、生残、摂餌能力について、新鮮 (非凍結) 精子の成績と比較して評価した。雄個体の精巢から精液を採取し、保存液 (10%メタノール+18%ウシ胎児血清+72%海水) で希釈して凍結した精子と凍結保存せず海水で希釈した新鮮精子を用いて人工授精を行った。発生した幼生を2Lビーカー (水量2L, 25 $^{\circ}$ C) に収容して、餌料プランクトン (*Pavlova lutheri*) を与えて22日間飼育した。幼

生のふ化後1, 8, 15, 22日目に殻長を測定するとともに、へい死率および摂餌したプランクトン数を測定した。その結果、凍結精子区の幼生の成長および摂餌量は、いずれも新鮮精子区との間に有意差は認められず、正常に推移した。へい死率にも凍結精子区と新鮮精子区の間には有意差はみられず、また、へい死した個体については凍結処理に起因すると考えられる異常所見は観察されなかった。以上のことから、本研究において凍結精子を媒精して発生させた幼生は、正常な生理的能力を有し、健全性に問題はないと評価された。

文 献

- Babiak I., Glogowski J., Brzuska E., Szumiec J., and Adamek J. (1997) : Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquacult. Res* 28, 567-571.
- Babiak I., Glogowski J., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H., Strzezek J., and Demianowicz W. (2001) : Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 56, 177-192.
- Cabrita E., Robles V., Rebordinos L., Sarasquete C., and Herraez M. P. (2005) : Evaluation DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50, 144-153.
- 林 政博, 瀬古慶子 (1986) : アコヤガイの種苗生産について. 三重水技研報 1, 39-68.
- 林 政博 (1999) : アコヤガイの殻体真珠層色の改良について. 全真連技術研究会報 14, 1-15.
- 林 政博, 青木秀夫 (2001) : アコヤガイ母貝の選抜育種による真珠の巻きの改良について. 全真連技術研究会報 15, 1-7.
- Horvath A. and Urbanyi B. (2000) : The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) sperm. *Aquacult. Res* 31, 317-324.
- Kawamoto T., Narita T., Isowa K., Aoki H., Hayashi M., Komaru A., and Ohta H. (2007) : Effects of cryopreservation methods on post thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 54, 19-26.
- 黒川忠英, 鈴木 徹, 岡内正典, 三輪 理, 永井清仁, 中村弘二, 本城凡夫, 中島員洋, 芦田勝朗, 船越将二

- (1999) : 外套膜片移植および同居飼育によるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻筋の赤変化を伴う疾病の人為的感染. 日水誌 65, 241-251.
- 黒倉 寿, 富田政勝, 岩橋正雄, 宮尾 誠, 岩田仲弘, 平野礼次郎 (1984) : ニシキゴイ精液の長期保存. 水産増殖 32, 148-152.
- Labbe C., Martoriati A., Devaux A., and Maisse G. (2001) : Effect of sperm Cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Devl* 60, 397-404.
- 松山幸彦 (2003) . 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama*に関する生理生態学的研究 - *H. circularisquama* の毒性および貝類斃死機構の解明. 水研センター研報 9, 13-117
- Miskolczi E., Mihalfy S., Varkonyi E.P., Urbanyi B., and Horvath A. (2005) : Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 247, 119-125.
- Monib M.S. (1978) : Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 53, 13-18.
- 森実庸男, 滝本真一, 西川 智, 松山紀彦, 蝶野一徳, 植村作治郎, 藤田慶之, 山下浩史, 川上秀昌, 小泉喜嗣, 内村祐之, 市川 衛 (2001) : 愛媛県宇和海における軟体部の赤変化を伴うアコヤガイの大量へい死. 魚病研究 36, 207-216.
- Ohta H., Kawamoto T., Isowa K., Aoki H., Hayashi M., Narita T., and Komaru A. (2007) : Motility of spermatozoa obtained from testis of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Fish.Sci.* 73, 107-111.
- Palmer P. J., Blackshaw A. W., and Garrett R. N. (1993) : Successful fertility experiments with cryopreserved spermatozoa of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using dimethylsulfoxide and glycerol as cryoprotectants. *Reprod Fertil Develop* 5, 285-293.
- Tabata K. and Mizuta A. (1997) : Cryopreservation of sex reversed gynogenetic females sperm in hirame. *Fish Sci* 63, 482-483.
- 内村祐之, 西川 智, 浜田耕示, 兵藤勝也, 広瀬琢磨, 石原浩二, 杉本 学, 中島伸佳 (2005) : 感染症の症状を軽減した耐病性アコヤガイ系統の開発. 水産育種 34, 91-97.
- 薄 浩則, 浜口昌巳, 石岡宏子 (1997) : マガキ精液の長期凍結保存. 南西水研報 30, 115-123.
- 和田克彦 (1984) : アコヤガイ *Pinctada fucata* の改良に関する研究. 養殖研報 6, 79-157.
- Wada K. T. and Komaru A. (1996) : Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker). *Aquaculture* 142, 25-32.
- 和田克彦 (2005) : 水産無脊椎動物の育種研究の現状と展望. 動物遺伝育種研究 33, 27-38.
- Zilli L., Schiavone R., Zonno V., Storelli C., and Vilella S. (2003) : Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 47, 227-235.