

扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究^{*}

杨爱国 王清印 孔杰 刘志鸿 刘萍 王如才[†]

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

[†](青岛海洋大学水产学院 青岛 266003)

摘要 于1997年3月—1997年5月,取山东长岛和青岛太平角海区的虾夷扇贝和栉孔扇贝。采用自然排放法和解剖法取精液,用自然海水作基础溶液,采用不同的抗冻保护剂、冷冻速度、平衡时间,对精子的存活率、受精率和孵化率进行了研究。结果表明,两种扇贝的精子以自然海水为基础溶液,加8%—10%的DMSO作为抗冻保护剂,距液氮表面25cm、20cm、10cm各停留8min,移入液氮中保存;解冻时,距液氮表面10cm、15cm、20cm各停留6min,7—11℃流水解冻,置4℃20min,精子存活率为80%—90%,受精率为85%—95%,孵化率为70%—85%。

关键词 虾夷扇贝 栉孔扇贝 精子 超低温保存

学科分类号 S968.31

海洋动物精液冷冻保存研究从50年代开始以来,主要集中在鱼类方面,并取得很大成绩(张轩杰,1987)。而在贝类方面研究较少,只有牡蛎、杂色鲍等(陈章波等,1989; Kurokura *et al*, 1990)。近年来,为了提高中国海水养殖贝类的产量和质量,迫切需要为遗传育种的研究工作不间断地提供配子材料,或克服不同种类因繁殖期不同不能自然杂交和地理隔离造成的困难。目前,虾夷扇贝和栉孔扇贝精液冷冻保存技术的研究尚未见有关报道。本文就扇贝精液超低温冷冻保存进行研究,拟建立一套虾夷扇贝和栉孔扇贝精液的超低温冷冻保存方法,以期为扇贝繁殖生物学、遗传育种、种质资源保护等提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)于1997年3月23日—4月10日取自山东长岛县海区,壳高10—12cm;栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)于1997年5月10日—15日取自青岛太平角海区,壳高6—7cm。材料取回后在本所小麦岛实验场5m³水池内暂养,投喂三角褐指藻,每天换水二次,每次1/2。虾夷扇贝暂养5—15d;栉孔扇贝暂养3—5d,培养温度分别为4—8℃和14—16℃。精子保存容器为5ml的加盖塑料管,最终保存体积为3—4ml。

1.2 方法

1.2.1 精液收集与稀释 亲贝采用自然排放法和解剖法取精液。以二甲基亚砷

^{*} 国家海洋“863”计划资助项目,8638190102号。杨爱国,男,出生于1957年11月,副研究员,E-mail:biogene@ns.qd.sd.cn

收稿日期:1997-08-29,收修改稿日期:1998-06-18

(DMSO)和甘油为抗冻保护剂。以自然海水为基础溶液,分别配制 2%—20% 的二甲基亚砜和 1%—10% 的甘油,置于冰箱(4℃)预冷,然后与精液按 2.3:1—2.4:1混合成精液稀释液,置于冰箱(4℃)平衡 5min、10min、20min、25min、30min 或不经平衡直接冷冻。

1.2.2 冷冻与解冻 将精液稀释液分别距液氮(LN₂)表面 25cm、20cm、10cm 各停留 2min、4min、6min、8min、10min 的冷冻速度预冷后浸入 LN₂中保存,解冻时分别距 LN₂表面 10cm、15cm、20cm 各停留 2min、4min、6min、8min、10min 的解冻速度下解冻,然后用自来水(7—11℃)流水解冻至刚融化时置冷箱(4℃)放置 5min、10min、15min、20min、30min 或直接经显微镜观察。精子存活率用视野中运动精子的百分率表示,精子持续活动时间为精子开始运动至 90% 精子停止运动所经历的时间。

1.2.3 授精 将虾夷扇贝和栉孔扇贝刚产出的卵子分别置于 5 只 200ml 容量的烧杯中,密度均为 30ind / ml,分别加入不同密度的冷冻精液,1h 后计算受精率,至担轮幼虫期计算孵化率。

2 结果

2.1 自然海水作基础溶液的冷冻保存效果

以自然海水作基础溶液,添加 10% DMSO 配制成稀释液,冷冻速度为距 LN₂表面 25cm、20cm、10cm 各停留 8min,解冻速度为距 LN₂表面 10cm、20cm、25cm 各停留 6min,精液的冷冻保存时间为 24h。结果表明,虾夷扇贝冻精存活率平均为 80%—85%,游动时间平均达 2.5h;栉孔扇贝冻精存活率平均为 85%—90%,游动时间达 3.7h。

2.2 不同抗冻保护剂对精子的保护作用

在常温下(15℃)测试了两种扇贝精子对不同浓度抗冻保护剂的毒性反应,结果表明,20% 以上 DMSO 和 10% 以上甘油均可对两种扇贝精子的存活率和持续活动时间造成明显的不良影响。

以自然海水为基础溶液,采用 20% 以下的 DMSO、10% 以下甘油作抗冻保护剂,冷冻速度为距 LN₂表面 25cm、20cm、10cm 各停留 8min,冷冻保存精液 24h,解冻速度为距 LN₂表面 10cm、20cm、25cm 各停留 6min,解冻后精子存活率和游动时间见表 1。

虾夷扇贝,当 DMSO 浓度为 10% 和 12% 时,精子存活率最高,达 85%,DMSO 浓度为

表1 不同浓度的DMSO和甘油对精子的保护作用

Tab.1 The effects of different DMSO and glycerol concentrations on spermatozoa

DMSO浓度(%)		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
存活率(%)	虾夷扇贝	20	34	60	80	85	85	80	75	55	48
	栉孔扇贝	20	40	70	85	90	90	80	58	42	26
游动时间(h)	虾夷扇贝	0.7	1.6	1.8	2.5	2.3	2.0	2.0	1.4	1.2	0.8
	栉孔扇贝	0.3	1.3	2	3.5	3.0	2.7	2.0	1.0	0.8	0.6
甘油浓度(%)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
存活率(%)	虾夷扇贝	10	25	40	55	50	45	20	20	16	—
	栉孔扇贝	40	45	60	65	70	60	60	55	30	20
游动时间(h)	虾夷扇贝	20	40	48	40	35	35	25	20	10	—
	栉孔扇贝	15	25	35	30	25	15	15	10	8	5

8%时精子游动时间最长,达2.5h;当甘油浓度为4%时,精子存活率最高,为55%,甘油浓度为3%时,精子游动时间最长,为48min。栉孔扇贝,当DMSO浓度为10%和12%时,精子存活率最高,达90%,DMSO浓度为8%时,精子游动时间最长,达3.5h;当甘油浓度为5%时,精子存活率最高,为70%,甘油浓度为3%时,精子游动时间最长,为35min。

2.3 不同冷冻速度对精子存活率的影响

以10%的DMSO作抗冻保护剂,自然海水为稀释溶液,采用不同的冷冻速度冷冻精液3h,精子存活率见表2。结果表明,两种扇贝的精液直接浸入LN₂中,解冻后均不能成活;虾夷扇贝精子距LN₂表面25cm、20cm、10cm各8—10min后再浸入LN₂中,解冻后精子存活率最高,为80%;栉孔扇贝精子距LN₂表面25cm、20cm、10cm各8min后再浸入LN₂中,解冻后精子存活率最高,为85%。

2.4 不同解冻速度对精子存活率的影响

以10%的DMSO作抗冻保护剂,自然海水为稀释溶液,采用距LN₂表面25cm、20cm、10cm各8min后再浸入LN₂中的冷冻速度,解冻速度见表2。结果表明,将冷冻精液直接从液罐中移出其存活率均很低,两种扇贝均以第4组的存活率为最高,即移出LN₂后,在距其表面10cm、15cm、20cm处各停留6min,自来水流水解冻后置冰箱(4℃)维持一定时间,虾夷扇贝需15—20min;栉孔扇贝所需时间稍长,为20—30min。

2.5 降温平衡时间对精子存活率的影响

将虾夷扇贝和栉孔扇贝精液各分两组,采用相同的稀释液、冷冻速度和解冻速度,在

表2 冷冻速度和解冻速度对扇贝精子存活率(%)的影响

Tab.2 The effects of freezing and thawing velocity on spermatozoa survival rates (%) of scallops

扇贝种类	冷冻速度 ¹⁾ (min)					解冻速度 ¹⁾ (min)					
	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8
虾夷扇贝	0	15	30	55	80	80	25	50	65	80	75
栉孔扇贝	0	20	40	70	85	80	18	40	70	90	80

1) 冷冻速度和解冻速度为距LN₂表面25cm、20cm、10cm分别停留的时间

冷冻之前分别在冰箱(4℃)内经过0—30min的平衡时间,以比较不同平衡时间对冷冻精子存活率的影响。结果表明,不经平衡和分别经5min、10min、15min、20min、25min、30min的平衡时间,解冻后虾夷扇贝的精子存活率均为80%—85%;栉孔扇贝的精子存活率均为

85%—90%,效果基本相同。

表3 扇贝冷冻精液受精实验结果

Tab.3 The fertilization tests results of cryopreservation spermatozoa

精子密度 ¹⁾	虾夷扇贝		栉孔扇贝	
	受精率	孵化率	受精率	孵化率
1—3	68	85	65	91
3—5	85	75	90	85
5—7	90	70	95	80
7—9	90	64	95	73
10—15	93	51	97	40

1) 以视野中每个卵子周围的精子数目表示

2.6 冷冻精液授精实验

取经LN₂冷冻保存第3天的虾夷扇贝精子及保存第8天的栉孔扇贝精子,与各自刚产出的卵子进行受精,结果见表3。随着两种扇贝卵子周围精子数目的增加,受精率提高,但孵化率下降,从生产角度考虑,以每个卵子周围的精子数目控制在每一视野中能見到3—5个为宜,可获得较高的受精率和孵化率,如超出

此范围,畸形胚胎数量明显增加。

3 讨论与结论

3.1 稀释液

鱼类精子超低温冷冻保存研究起步较早,对扇贝精子的超低温冷冻保存技术研究有一定的借鉴作用。与扇贝相比,鱼类精子分化程度较高,在超低温条件下,需添加适当的稀释液以保护精子免受低温造成的损伤,否则难以获得存活的精子(Withler *et al.*, 1967)。鱼用稀释液包括基础溶液和抗冻保护剂两部分,其基础溶液的配方较复杂(Ott *et al.*, 1971)。在本实验中,虾夷扇贝和栉孔扇贝使用自然海水就获得了良好的冷冻效果。目前,普遍采用的抗冻保护剂为 DMSO 和甘油,DMSO 是淡水鱼类精子冷冻最有效的抗冻保护剂(王祖昆等, 1984; 章龙珍等, 1994),甘油被广泛应用于海水鱼类精子的冷冻保存(Scott *et al.*, 1980)。DMSO 作为虾夷扇贝和栉孔扇贝精子的抗冻保护剂,效果优于甘油的抗冻效果。但是,DMSO 浓度如超过 20%,对扇贝精子本身会起到伤害作用。实验证明,10% 的 DMSO 是一个高度有效浓度,不会因浓度过高而导致精子中毒,又能起到良好的抗冻作用。

3.2 冷冻与解冻速度

适宜的冷冻速度和解冻速度是一个十分复杂的问题。一般说来,精子原生质浓度比介质高,冷冻速度过快,细胞内水分来不及外渗就被冻结成冰,在解冻时因细胞内冰晶的存在造成细胞膜破裂而死亡;冷冻速度过慢,胞外介质中的水首先结冰,细胞会因过度脱水而造成伤害。在一定的冷冻速度下,精子细胞不形成细胞内冰晶又不过度脱水,解冻后精子才有可能存活。解冻速度对精子存活率的影响与冷冻速度同样重要,只有在一定的解冻速度之下,精子才能存活。在本实验中,解冻速度对精子存活率的影响突出的表现在 0—4℃ 的温度阶段,所有的实验组合,在自来水流水解冻时,若快速通过 0—4℃,镜检精子结构均不完整,未见成活的精子,必须待精液刚刚开始融化时再于 4℃ 冰箱中保存一定时间。这与以往所报道的牡蛎、鲍等的解冻方法有所不同,不经此步骤也能达到 80%—90% 的冻精成活率(张轩杰, 1987)。本实验结果表明,两种扇贝精子需要基本相同的冷冻速度和解冻速度,说明这两种扇贝精子细胞膜的通透性及对保护剂的毒性反应也大致相同。对于最适冷冻速度和解冻速度的确定,尚需对两种扇贝精子细胞的生物学特性进行更深入的研究。

3.3 精子密度

虾夷扇贝和栉孔扇贝的生产实践表明,精卵在受精过程中,每个卵子周围可见到 1—3 个精子时,受精率和孵化率可达 90% 以上,防止精子过多是生产上的一项重要技术措施。冷冻精子受精的实验结果表明,比正常条件下需要精子相对较多,这说明精子经过超低温冷冻保存,对部分精子产生了伤害作用,虽然可以保持较高的精子存活率,但是,受精能力有所下降。扇贝精子冷冻保存成果的取得,是多项因子综合的结果,其中任一步骤的改变都会影响到其它步骤的有效性。今后尚需对各冷冻保存步骤进行详细的综合研究,使冻精在受精率和孵化率方面达到生产实践应用的水平。

参 考 文 献

- 王祖昆,邱麟翔,陈魁候等,1984. 草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲮鱼冷冻精液受精试验. 水产学报,8(3):255—257
张轩杰,1987. 鱼类精液超低温冷冻保存研究进展. 水产学报,11(3):259—267

- 陈章波, 张建华, 雷淑芬等, 1989. 配子冷冻的原理及其在水产界的应用. 中国水产, 443: 7—17
- 章龙珍, 刘宪亭, 陈松林等, 1994. 二甲亚砜对几种淡水鱼精子渗透压及成活率影响的研究. 水生生物学报, 18(4): 298—302
- Kurokura H, Namba K, Ishikawa T, 1990. Lesions of spermatozoa by cryopreservation in oyster *Crassostrea gigas*. Nippon Suisan Gakkaishi, 56: 1 803—1 806
- Ott A G, Horton H F, 1971. Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs with cryopreserved sperm. J Fish Res Bd Can, 28: 1 915—1 918
- Scott A P, Baynes S M, 1980. A review of biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. J Fish Biol, 17: 707—739
- Withler F C, Humphreys R M, 1967. Duratin of fertility of ova and sperm of sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and pink (*O. gorbuscha*) salmon. J Fish Res Bd Can, 24: 1 573—1 578

STUDIES ON SPERMATOOZA CRYOPRESERVATION OF SCALLOPS, *PATINOPECTEN YESSONESIS* AND *CHLAMYS FARRERI*

YANG Ai-guo, WANG Qing-yin, KONG Jie,
LIU Zhi-hong, LIU Ping, WANG Ru-cai[†]

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

[†] (College of Fisheries, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

Abstract Spermatozoa cryopreservation of scallops *Patinopecten yessoensis* and *Chlamys farreri* from Changdao and Qingdao in Shandong Province was studied in 1997. Spermatozoa were collected from mature scallops by natural spawning and artificial dissecting. A series of tests were conducted to develop a suitable freezing and thawing technique for the cryopreservation of the scallop spermatozoa. The effects of diluent compositions on spermatozoa survival rate and time after thawing showed that natural sea water was the best diluent and the average survival rate of thawed spermatozoa was 80%—90% and the survival time was more than 2h. DMSO was better than glycerin in cryopreservation of spermatozoa of scallops and the spermatozoa survival rate and time were 85%—90% and 2.5—3.5h respectively. The results of freezing and thawing tests showed that the survival rate of the spermatozoa could be as high as 80%—85% when spermatozoa were maintained at 25cm, 20cm or 10cm above LN₂ surface for 8—10min. The thawing test showed that the highest survival rate of LN₂ frozen-thawed spermatozoa could be obtained when the spermatozoa were maintained at 10cm, 15cm or 20cm above LN₂ for 15—30min and then immersed in tap water (7—11℃) till melting. The survival rate and time were 80%—90% and approximately 3h, respectively. Fresh eggs could be fertilized by cryopreserved spermatozoa and the fertilization rate and hatchery rate were 85%—95% and 70%—85%, respectively.

Key words *Patinopecten yessoensis* *Chlamys farreri* Spermatozoa Cryopreservation

Subject classification number S968.31