

# 南美白对虾精子超低温保存前后形态和超微结构的研究

杨春玲, 陈秀荔, 赵永贞, 李咏梅, 彭敏, 杨彦豪, 何莘萍, 陈晓汉

(广西壮族自治区水产研究所, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

**摘要:** 应用光学显微镜和电子显微镜对超低温保存前后南美白对虾精子的形态和超微结构进行了观察。结果发现, 正常精子由圆球形的主体部和棘突组成, 主体部由顶体、亚顶体区、细胞核和环核细胞质带组成。超低温冷冻处理及升温复苏后受损精子棘突脱落, 顶体囊泡化, 精子细胞膜皱缩、肿胀, 膜间腔增大, 损伤严重者, 顶体脱落, 核变形, 核膜破裂, 核出现空泡化。结果表明, 超低温冷冻处理及升温复苏过程主要造成南美白对虾精子的顶体和膜结构的损伤, 致使精子成活率降低。

**关键词:** 南美白对虾; 精子; 超低温保存; 超微结构

**中图分类号:** S917.4   **文献标志码:** A   **文章编号:** 1674-3075(2013)03-0062-05

南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是我国海水养殖的主导品种之一, 南美白对虾养殖业是我国海水养殖的支柱产业。随着对虾养殖业的不断发展, 人们日益认识到种质对产业持续发展的重要作用, 如何保护和开发利用种质资源已成为对虾养殖业研究的重点内容。

精子超低温冷冻保存技术是种质资源保存最有效的方法之一, 在选择育种、优质种质高效利用和濒危物种种质保护等方面具有重要的应用价值。在哺乳动物, 精子超低温冷冻保存技术已进入商业化开发和利用的阶段; 在鱼类, 目前国内学者已建立了淡水鲤科鱼类冷冻精子库和重要海水养殖鱼类冷冻精子库; 在甲壳类动物, 有关超低温保存精子的研究相对滞后, 研究内容主要集中在抗冻剂和稀释液的筛选、降温速率的优化以及解冻方式的选择方面(柯亚夫等, 1996; 廖馨等, 2008; Vuthiphandchai et al, 2007; Diwan & Shoji Joseeph, 1999)。比较超低温冷冻前后精子超微结构的变化是开展精子超低温冷冻研究并以此设计合理的冷冻介质、冷冻和解冻程序的重要研究内容。对于对虾类正常精子超微结构的研究已有报道(张子平, 1991; 许尤厚, 2010; Sirinda Aungsuchawan et al, 2011; Pattira Pongtippatee et al, 2007), 但鲜有开展南美白对虾精子超低温冷冻前

后精子形态和超微结构比较的研究。为完善南美白对虾精子的超低温保存技术, 提高超低温保存的成活率, 本研究利用光学显微镜、扫描电镜和透射电镜对超低温保存前后南美白对虾精子的形态与超微结构进行观察, 通过对比超低温保存前后精子外部形态及超微结构的变化, 了解超低温处理对精子结构的损伤, 为进一步改进南美白对虾精子超低温保存方法, 筛选适于南美白对虾精子长期稳定保存的基础液和抗冻剂奠定研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 精荚的获得 实验所需南美白对虾来自广西水产研究所广西国家级南美白对虾育种中心培育的优良种虾。培育亲虾池水温 27~28℃, 盐度 28~30, 成熟雄虾体长 (12.49 ± 0.42) cm, 体重 (39.57 ± 3.46) g。带有成熟精荚的雄虾精囊发白、饱满, 完整并成熟的精荚通过用拇指轻轻挤压获得, 精荚平均重量 (46.41 ± 7.43) mg, 挤压出的精荚放入 4℃ 的灭菌天然海水中短暂保存。

1.1.2 精液的获得 用 0.1 g/mL 胰蛋白酶 (1:250) (灭菌天然海水配制) 37℃ 水浴消化精荚 5 min, 15% (V:V) 的胎牛血清终止消化反应, 500 r/min 离心 10 min 收集上清, 收集的上清再经 2 000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清, 加入 0.5 mL 灭菌天然海水轻轻混匀沉淀, 并将其置于 4℃ 冰箱备用。

### 1.2 方法

1.2.1 精液的超低温保存及复苏 南美白对虾精子的超低温保存是以二甲亚砜 (DMSO) 和海藻糖作为抗冻剂, 以灭菌天然海水为基础液。在收集的精

收稿日期: 2013-03-14

基金项目: 自治区直属公益性科研基金 (2060302 CXIF-2011-01); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-47)

通讯作者: 陈晓汉, 1962年生, 男, 研究员, 硕士, 主要从事水生动物分子遗传育种研究。E-mail: chnxhn@163.com

作者简介: 杨春玲, 1979年生, 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事水产遗传育种研究。E-mail: scsycl@163.com

液中加入终浓度为10% (V: V)的DMSO和0.25 M的海藻糖并轻轻混匀,置于4℃平衡30 min后使用程序降温仪进行进一步的降温。降温程序为:4℃至-20℃, -5℃/min; -20℃平衡5 min; -20℃至-80℃, -10℃/min; -80℃平衡5 min,最后置于液氮中保存。

精液的复苏主要是通过水浴的方法进行,将冷冻管从液氮中取出后立即投入37℃水浴中快速振荡至冻存液全部溶解为止。

1.2.2 光学显微镜观察 分别取超低温保存前后的精液8 μL置于200 μL的离心管中,再加入1 μL 0.5 g/mL的伊红溶液和1 μL 10 g/mL的苯胺黑溶液混匀,取出滴在载玻片上,轻轻盖上盖玻片,置于光学显微镜(NIKON 80i型)下观察精子的主体部和棘突的形态变化。

1.2.3 电镜样品制备及观察 扫描电镜样品的制备方法:同一批次的南美白对虾冻存前后的精液经过3 000 r/min离心10 min,吸弃上清,经3% (V: V)戊二醛固定2 h,0.1 mol/LPBS缓冲液清洗3次,乙醇梯度脱水,乙酸异戊酯置换,置入HCP-2临界点干燥器干燥,粘座,IB3离子溅射仪镀膜后放入VEGA III LMU型扫描电镜观察和拍照。

透射电镜样品的制备方法:同一批次的南美白对虾冻存前后的精液经过3 000 r/min离心10 min,吸弃上清,3% (V: V)戊二醛前固定,1% (V: V)锇酸后固定,乙醇梯度脱水,环氧树脂618包埋,徕卡EM UC7型超薄切片机切片,柠檬酸铅-醋酸铀双重染色,日立H-7650型透射电镜观察和拍照,分析精子超微结构变化。

## 2 结果

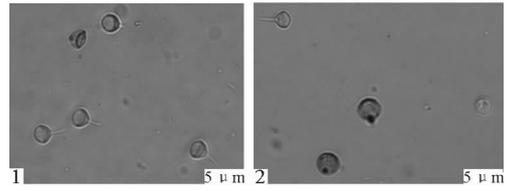
### 2.1 光学显微镜观察结果

10×100倍油镜下观察冷冻前正常精子主体部呈圆球状,成熟的精子带有明显的棘突,无鞭毛,不运动,活精子不被伊红-苯胺黑染色,死精子被染色呈紫红色,但不涨大,南美白对虾精子的成活率为95.78% ± 1.42%。超低温保存后南美白对虾活精子的形态结构没有明显的变化,活精子不被染色,死精子的棘突脱落,精子主体部明显涨大,被染色呈紫红色,精子成活率降低到66.71% ± 5.67%。冻存前后精子形态如图版I。

### 2.2 电子显微镜观察结果

2.2.1 扫描电镜 南美白对虾精子属于单棘型的无鞭毛精子,扫描电镜观察到冻存前正常的成熟精

子由主体部和棘突组成,主体部为圆球形,长径(5.13 ± 0.37) μm,短径(4.09 ± 0.39) μm,成熟的精子棘突长约3.28 μm(图版II-1)。



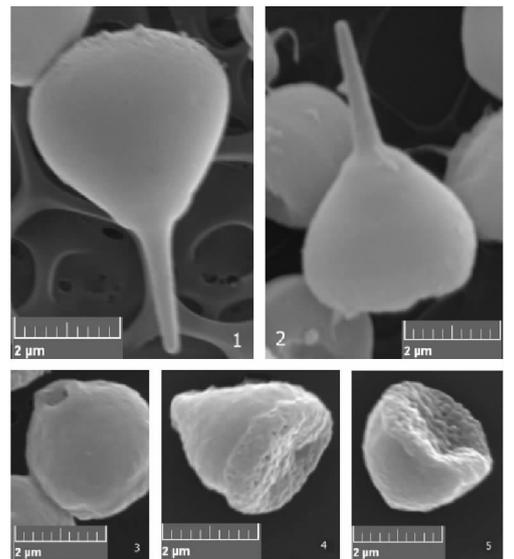
1. 冻存前正常和死亡南美白对虾精子;2. 冻存后正常和死亡南美白对虾精子

图版 I 光学显微镜下冻存前后的南美白对虾精子形态(10×100,伊红-苯胺黑染色)

1. The fresh and dead sperm of *litopenaeus vannamei* observed before cryopreservation ;2. The normal and dead sperm of *litopenaeus vannamei* observed after cryopreservation

Fig. 1 Morphology of fresh and frozen sperm in *litopenaeus vannamei* with light microscope (10×100, stained by eosin-nigrosin)

扫描电镜观察冻存复苏精子的形态结构发现,活精子与冻存前相比基本没有变化(图版II-2),而死精子的结构发生明显变化,部分精子棘突脱落,棘突处出现1个近似圆形的洞(图版II-3),精子细胞膜表面出现不同程度的皱缩,圆球体的底端凹陷和外翻(图版II-4,5)。



1. 正常精子;2. 冻存后的活精子;3. 冻存后死精子的棘突脱落,顶体出现空洞;4,5. 冻存后死精子细胞膜表面出现不同程度的皱缩,圆球体的底端凹陷、外翻

图版 II 扫描电镜观察冻存前后的南美白对虾精子的形态结构(×3000)

1. Fresh sperm; 2. Live frozen sperm; 3. Spike of dead frozen sperm lost, and acrosome appeared a hole; 4 & 5. Membrane of dead frozen sperm folded to different extent, and bottom of frozen sperm hollowed and evverted

Fig. II Morphology of fresh and frozen sperm of *litopenaeus vannamei* in SEM(×3000)

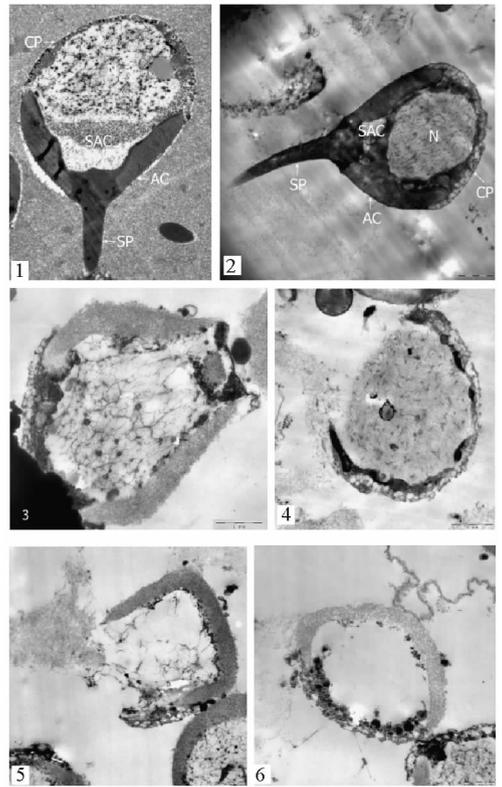
2.2.2 透射电镜 透射电镜观察到南美白对虾的精子主要由顶体、亚顶体区、细胞核和细胞质带组成,成熟的精子顶体中部突出形成棘突,棘突位于顶体的前段,电子密度和顶体的非常相似,两者的电子密度明显高于亚顶体区、细胞核和细胞质带。亚顶体区位于顶体和细胞核之间,亚顶体区由2部分组成,一部分为电子密度极低的亚顶体腔,靠近顶体区;另一部分为电子密度较高的亚顶体区颗粒,靠近细胞核。细胞核占据精子主体部的大部分,核内含非浓缩凝絮状染色质,核外无完整核膜包裹。细胞质带包围在细胞核外部,电子密度与亚顶体区颗粒接近(图版Ⅲ-1)。

南美白对虾精子经液氮保存并复苏后,活精子的形态结构与冻存前相比基本没有变化(图版Ⅲ-2),而死精子由于受损伤,精子的棘突脱落,顶体区囊泡化,双层膜肿胀,膜间腔增大(图版Ⅲ-3);损伤严重者,顶体脱落(图版Ⅲ-4),核变形,核膜破裂(图版Ⅲ-5),核出现空泡化(图版Ⅲ-6)。

### 3 讨论

自从1949年Ploge等发现利用甘油能很好的保护精子后,人们开始在精子低温保存中使用抗冻剂。柯亚夫等(1996)使用含有10% DMSO和5%~10%甘油的稀释液保存中国对虾精子,存活率可达60%以上;廖馨等(2008)使用8% DMSO作为抗冻保护剂保存青虾精子,28 d后复苏精子能维持58%的存活率;Diwan & Shoji Joseeph(1999)使用5% DMSO和0.25 M海藻糖作为抗冻保护剂保存印度对虾精子,60 d后精子存活率达到69.97%。现已发现,不同物种超低温保存所用抗冻剂种类和浓度不同,但一般联合抗冻剂效果优于单一抗冻剂。DMSO、甘油和甲醇等作为渗透性抗冻剂可以透过细胞膜进入细胞,与细胞内水分互溶,在冷冻过程中能有效起到防止细胞脱水和冰晶形成的作用。蔗糖和海藻糖等糖类及甘氨酸和肌氨酸等氨基酸作为非渗透性抗冻剂与渗透性的抗冻剂相互作用在细胞外起到辅助作用,能显著提高冷冻效果。本研究采用10% DMSO和0.25 M海藻糖超低温冷冻保存南美白对虾精子取得了较好的保存效果,冷冻保存30d后复苏精子成活率达到66.71%±5.67%。

超低温冷冻保存引起精子超微结构的异常以及对精子头部质膜与核膜的损伤是普遍的(He S&Woods L C,2004)。关于南美白对虾精子超低温冷冻处理及复苏后结构的损伤,通过光学显微镜及



1. 正常精子;2. 冻存后的活精子;3. 冻存后死精子的棘突脱落,顶体囊泡化,双层膜肿胀,膜间腔增大;4. 冻存后死精子的顶体脱落,双层膜肿胀,膜间腔增大;5. 冻存后死精子的细胞核变形,核膜破裂;6. 冷冻精子的核出现空泡化 SP:棘突,AC:顶体,SAC:亚顶体区,N:细胞核,CP:环状细胞质带

图版Ⅲ 透射电镜观察冻存前后南美白对虾精子的超微结构(×2000)

1. Fresh sperm;2. Live frozen sperm; 3. Spike of dead frozen sperm lost, outer or inner acrosomal vesiculated, membrane swelled, and intermembrane space augmented; 4. Acrosome of dead frozen sperm lost, membrane swelled, and intermembrane space augmented; 5. Cell nucleus of dead frozen sperm deformed, and the membrane of nucleus cracked; 6. Cell nucleus of dead frozen sperm appeared vacuolated

SP, spike; AC, acrosome; SAC, sub-acrosome; N, nucleus; CP, hemispherical rim of cytoplasmic particles

Fig. III Ultrastructure of fresh and frozen sperm of *Litopenaeus vannamei* in TEM(×2000)

电子显微镜观察主要表现在:受损精子棘突脱落,顶体囊泡化,精子细胞膜皱缩、肿胀,膜间腔增大,损伤严重者,顶体脱落,核变形,核膜破裂,核出现空泡化。这一研究结果与在鱼类(赵维信等,1992;张轩杰等,1991)和贝类(李赞等,2002)上的研究结果相似。已有的文献(赵维信等,1992;李赞等,2002;张轩杰等,1991;李广武等,1997)表明,细胞虽然在液氮(-196℃)中长期保存是安全和有效的,但在其冷冻和复苏过程由于冰晶的增长、盐溶液浓缩和机械性作用损伤了精子的原生质膜,从而对精子产生致死性的伤害。研究者们(李喜龙等,2000;李广武

等,1997;张轩杰,1991)一致认为,由于细胞内微晶体的形成,对细胞或多或少产生机械性损伤,破坏细胞原生质和改变细胞的结构;细胞外冰晶形成引起渗透压改变和挤压作用,使得细胞发生脱水皱缩;而在复温解冻过程中冰块融化,由于渗透压梯度作用,液体渗透细胞膜进入细胞内,细胞因此而转为肿胀状态。这些方面的共同作用造成精子膜蛋白变形,通透性改变,稳定性降低,最后导致精子膜的肿胀或破损,一些形态正常的精子也可能发生了不可见的膜损伤。因此在精子的超低温冷冻保存过程中要获得更高的精子成活率以及受精率,必须保护细胞膜的完整和通透性的稳定,这可能是防止冷冻损伤的重要环节。

本研究利用光学显微镜、扫描电镜和透射电镜观察了超低温保存前后南美白对虾精子的形态及结构,分析了超低温冷冻保存对精子形态及结构的损伤机理,为南美白对虾精子超低温保存技术的进一步完善提供了基本依据。

#### 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.

柯亚夫,蔡难儿. 1996. 中国对虾精子超低温保存的研究[J]. 海洋与湖沼, 27(2): 187 - 193.

李赞,贺桂珍,王品红. 2002. 超低温保存前后太平洋牡蛎精子(*Crassostrea gigas* (Thunberg))超微结构观察[J]. 青岛海洋大学学报, 32(4): 526 - 532.

李喜龙,季维智. 2000. 动物种质细胞的超低温冷冻保存[J]. 动物学研究, 21(5): 407 - 411.

李广武,郑从义. 1997. 低温生物学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社.

廖馨,葛家春,丁淑燕,等. 2008. 青虾精子超低温冷冻保存技术的研究[J]. 南京大学学报:自然科学, 44(4): 421 - 426.

许尤厚,刘学东,张吕平,等. 2010. 凡纳滨对虾精子发生的超微结构研究[J]. 热带海洋学报, 29(4): 89 - 93.

张子平,王艺磊. 1991. 对虾精子的研究 I - 成熟精子的形态与超微结构[J]. 厦门水产学院学报, 13(2): 1 - 9.

张轩杰,张良平,沈晓琴. 1991. 鱼类冷冻精子结构变异的电子显微镜研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 14(2): 160 - 164.

赵连翠,蔡生力. 2005. 对虾精荚和精子的研究进展[J]. 科学视野, 29(2): 73 - 77.

赵维信,姜仁良. 1992. 几种鲤科鱼类精子和胚胎冷冻损伤的扫描电镜研究[J]. 淡水渔业, (5): 3 - 5.

Diwan A D, Shoji Joseeph. 1999. Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards[J]. Indian J Fish, 46(2): 159 - 166.

He S, Woods L C. 2004. Effects of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm[J]. Cryobiology, 48(3): 254 - 262.

Magda Lezcano, Clarissa Granja, Marcela Salazar. 2004. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Cryobiology, 48: 349 - 356.

Memon A J, Talpur A D, Khan M I, et al. 2012. Morphology of fresh and cryopreserved sperms of banana shrimp *Penaeus merguensis* (De Man, 1888) [J]. Research Journal of Applied Sciences, 7(1): 54 - 59.

Pattira Pongtipatee, Rapeepan Vanichviriyakit, Jittipan Chavadej, et al. 2007. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae) [J]. Aquaculture Research, 38: 1635 - 1644.

Sirinda Aungsuchawan, Craig L Browdy, Boonsirm Withyachumnarnkul. 2011. Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Aquaculture Research, 42: 188 - 195.

Vuthiphandchai V, Nimrat S, Kotcharat S, et al. 2007. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*penaeus monodon*) spermatophores [J]. Theriogenology, 68: 1192 - 1199.

(责任编辑 张俊友)

## Study on Morphology and Ultrastructure of Spermatozoa Before and After Cryopreservation in the *Litopenaeus vannamei*

YANG Chun-ling, CHEN Xiu-li, ZHAO Yong-zhen, LI Yong-mei,  
PENG Min, YANG Yan-hao, HE Ping-ping, CHEN Xiao-han

(Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture,  
Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, P. R. China)

**Abstract:** The variation of morphology and ultrastructure between fresh and frozen-thawed *Litopenaeus vannamei* spermatozoa were observed under light and electronic microscope. The results showed that *Litopenaeus vannamei* sperm was composed of spherosome and spike, and the spherosome was composed of acrosome, sub-acrosome, cell nucleus and hemispherical rim of cytoplasmic particles in the normal sperm. However, the spike of injured sperm lost and appeared a hole, outer or inner acrosomal vesiculated, membrane of sperm swelled and fold to different extent, and intermembrane space augmented in the frozen-thawed sperm, and the acrosome lost, cell nucleus deformed and appeared vacuolate, and the nuclear membrane cracked in the serious injured sperm. These results implied that the damage to the sperm came from mainly the variation of acrosome and membrane structure, the sperm survival rate declined.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; spermatozoa; cryopreservation; ultrastructure