

卤虫无节幼体和日本绒螯蟹合浦亚种 蚤状幼体的冷冻保存

刘向宇 陆仁后

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要 本文研究了葡萄糖、蔗糖和甘油三种冷冻保护剂在不同浓度下对卤虫无节幼体的冷冻保护作用。研究表明用20%甘油进行保护,无节幼体在-30℃下耐受9-10分钟,存活率高达86.4%,对照组冷冻至-30℃则全部死亡。本文还研究了浓度为20%的甘油、DMSO和甲醇对日本绒螯蟹合浦亚种蚤状幼体的冷冻保护作用,结果表明用20%甲醇保护的蚤状幼体当冷冻至-24℃时存活率仍有75.3%。

关键词 冷冻保存,冷冻保护剂,卤虫,日本绒螯蟹合浦亚种,无节幼体,蚤状幼体。

目前,水产甲壳类苗种大部分来自野生抱卵雌体和天然幼苗,远远不能满足水产甲壳类养殖业的发展,建立稳定的种质资源迫在眉睫。但是,由于人工繁殖受到技术和资金限制,一个较好的解决方法是成立繁殖中心,建立与哺乳动物精子库、胚胎库和血库类似的冷冻苗种库,常年向各地提供苗种[Baust和Lawrence,1980a,1980b]。甲壳类动物的冷冻保存迄今研究甚少,Baust和Lawrence[1977]曾简单地报道了*Penaeus setiferus*幼体的冷冻保存,后又报道了几种冷冻保护剂在单独和混合状态下对卤虫无节幼体在-1℃下存活率的影响[Baust和Lawrence,1980a,1980b]。

卤虫 *Artemia spp.* 由于休眠卵的存在,取材方便,是一种很好的甲壳类冷冻生物学的实验材料,其无节幼体冷冻保存的研究,可为其它经济水产甲壳类动物冷冻苗种库的建立提供依据和取得经验,同时也具有一定的经济价值。Leger等[1983]曾尝试在0-10℃左右下,短期储存刚孵化出的无节幼体,提供营养更加丰富的无节幼体作为饵料,提高卤虫运输密度,压缩卤虫运输集装箱体积,冷冻保存无节幼体将更方便地解决这些问题。

日本绒螯蟹合浦亚种 *Eriocheir japonicus hepuensis* 分布于广西合浦县地区[戴爱云,1991],在形态、个体和肉质上与中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 非常相似。目前日本绒螯蟹合浦亚种尚无人工养殖,其抱卵期在霜降前后,比中华绒螯蟹要早四个月左右,在育苗上有一定的优势。其蚤状幼体的冷冻保存研究对苗种的保存和运输、种质资源的保护有很大的意义。鉴于以上原因,本文探讨了卤虫无节幼体和日本绒螯蟹合浦亚种蚤状幼体的冷冻保存方法。

一、材 料 和 方 法

1. 卤虫无节幼体的获得 取卤虫休眠卵(美国 Ocean star International Inc. 产品)于人工

半海水(含 NaCl 14 g/L、MgCl₂ 13.5 g/L、MgSO₄ 2.5 g/L、CaCl₂ 0.90 g/L 和 KCl 0.65 g/L)中,28℃培养箱内孵化,20-36小时后陆续有无节幼体孵出。

2. 卤虫无节幼体的冷冻保存 分别以葡萄糖(0.5 M、1.0 M、1.5 M、2.0 M)、蔗糖(0.5 M、1.5 M)、甘油(5%、10%、20%、30%)(V/V)(均用人工半海水配制)为冷冻保存液,每次吸取数十至二百左右刚孵化出的无节幼体放入锥型塑料管中,加1.0 ml 冷冻保存液,4℃下分别平衡10、30、60和90分钟,转入-30℃冰箱冷冻室冷冻30分钟,随后30℃水浴解冻,大量海水冲洗。无节幼体以能活动的为存活标准。

3. 日本绒螯蟹合浦亚种蚤状幼体的冷冻保存 分别以甘油、DMSO 和甲醇(浓度均为20%,V/V.人工半海水配制)为冷冻保存液,每次吸取数十只蚤状幼体放入塑料锥型管中,加1.0 ml 冷冻保存液,4℃下平衡40分钟,转入-25℃冰箱冷冻室分别冷冻20和30分钟,然后30℃水浴解冻,大量海水冲洗。蚤状幼体以能活动为存活标准。

4. 各冷冻液在-30℃和-25℃冰箱中的温度变化测量 锥型塑料管中盛放1.0 ml 冷冻保存液,将铜-康铜热电偶探头插入冷冻保存液中,放入-30℃和-25℃冰箱中,测量冷冻保存液温度变化。

二、结果与分析

1. -30℃冰箱冷冻保存卤虫无节幼体(表1) 用海水直接保存的对照组个体在-30℃冰箱中放置30分钟全部死亡,保护剂对卤虫无节幼体有一定的冷冻保护作用。低浓度葡萄糖(0.5 M、1.0 M)冷冻保护作用与平衡时间关系不大,蔗糖(0.5 M、1.5 M)和较高浓度的葡萄糖

表1 卤虫无节幼体以葡萄糖、蔗糖和甘油为保护剂在-30℃冰箱中保存30分钟后的存活率

Table 1 Post-thaw survival of *Artemia* spp. nauplii after stored at -30℃ for 30 minutes respectively with glucose, sucrose and glycerol as cryoprotectant

| 保护剂 | 平衡10分钟 | | 平衡30分钟 | | 平衡60分钟 | | 平衡90分钟 | | 最终温度(℃) | 终温持续时间(分钟) |
|------------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|---------|------------|
| | 存活率 | 无节幼体 | 存活率 | 无节幼体 | 存活率 | 无节幼体 | 存活率 | 无节幼体 | | |
| 葡萄糖 (0.5M) | 76.5±16.0 | 442 | 68.5±11.6 | 550 | 76.7±16.8 | 286 | — | — | -26 | 1-2 |
| 葡萄糖 (1.0M) | 74.8±14.3 | 198 | 73.9±14.3 | 374 | 66.4±15.3 | 193 | 70.5± 5.8 | 142 | -28 | 1-2 |
| 葡萄糖 (1.5M) | 42.4±22.0 | 470 | 37.1±11.6 | 834 | 14.4±11.6 | 266 | 8.5± 2.5 | 443 | -28 | 1-2 |
| 葡萄糖 (2.0M) | 59.1±12.3 | 256 | 3.4± 6.8 | 335 | 4.0± 7.2 | 295 | 5.1± 6.3 | 207 | -28 | 3-4 |
| 蔗糖 (0.5M) | 81.5± 9.5 | 374 | 62.9±28.9 | 340 | 73.1±15.7 | 327 | 7.8± 5.8 | 248 | -27 | 2-3 |
| 蔗糖 (1.5M) | 72.4± 9.3 | 370 | 4.0± 2.0 | 254 | 0.6± 0.7 | 306 | 0.9± 1.1 | 248 | -26 | 1-2 |
| 甘油 (5%) | 0.0 | 289 | 0.0 | 341 | 0.0 | 369 | 0.0 | 248 | -30 | 5-6 |
| 甘油 (10%) | 0.0 | 290 | 0.0 | 348 | 0.0 | 331 | 0.0 | 389 | -30 | 7-8 |
| 甘油 (20%) | — | — | 0.0 | 356 | 0.3± 0.6 | 368 | 86.4± 1.1 | 386 | -30 | 9-10 |
| 甘油 (30%) | 65.6± 4.5 | 459 | 65.8± 6.2 | 374 | 61.0±16.0 | 360 | 83.2±12.8 | 317 | -30 | 1-2 |
| 对照组 | 0.0 | 305 | — | — | — | — | — | — | — | 1-2 |

注:1.对照组用海水直接保存; 2.最终温度指保护剂溶液的最终温度; 3.终温持续时间指保护剂溶液处于最终温度持续的时间; 4.“平衡60分钟”栏内保护剂葡萄糖(0.5 M)中的无节幼体及存活率,其试验重复二次;“平衡30分钟”栏内保护剂葡萄糖(0.5 M)和“平衡10分钟,60分钟,90分钟”三栏内葡萄糖(1.0 M)中重复试验都为三次;其余所有结试验均重复四次。

(1.5 M、2.0 M)平衡时间越长, 卤虫冷冻存活率越低。葡萄糖和蔗糖均为非渗透性保护剂, 它们对卤虫无节幼体冷冻保护作用与浓度和平衡时间的关系是否与渗透压有关还有待进一步研究。低浓度(5%、10%)甘油无冷冻保护作用, 20%和30%甘油的冷冻保护作用与平衡时间有关, 20%甘油平衡30、60分钟后冷冻存活率为0和0.3%, 而平衡90分钟的存活率有86.4%; 30%甘油平衡90分钟的存活率有83.2%。甘油是一种渗透性保护剂, 因此浓度越高, 平衡时间越长, 甘油渗入细胞内的可能性越大, 保护作用也越强。

在-30℃冰箱中, 冷冻保存液先液相冷却, 冷却至一定温度后, 温度回升至该溶液冰点, 然后固相冷却, 液相冷却速率较快, 约为3-5℃/分钟, 固相冷却速率较慢, 约为1-1.3℃/分钟。

2. -25℃冰箱冷冻保存日本绒螯蟹合浦亚种蚤状幼体(表2) 用海水直接保存的幼体冷冻至-23℃全部死亡, 冷冻保护剂对蚤状幼体的冷冻保存有一定的保护作用。用20%甘油保护冷冻至-24℃有24.6%的存活率。用20%DMSO为保护剂的冷冻至-22℃, 存活率为35.2%, 用20%的甲醇保护作用最佳, 冷冻至-24℃持续8-9分钟, 存活率仍高达75.3%, 且存活的蚤状幼体的活动能力最强。

在-25℃冰箱中, 各保护剂液相冷却速率为3-4℃/分钟, 固相冷却速率为0.3-0.5℃/分钟。

表2 甘油、甲醇和DMSO对日本绒螯蟹合浦亚种蚤状幼体的冷冻保护作用

Table 2 Post-thaw survival of *Eriocheir japonicus hepuensis* zoea after stored at -25℃ for 20 and 30 minutes respectively with glycerol, DMSO and methanol as cryoprotectant

| 保护剂 | 保存20分钟 | | | | 保存30分钟 | | | |
|------------|-----------|------|------|---------|-----------|------|------|---------|
| | 存活率 | 重复次数 | 蚤状幼体 | 最终温度(℃) | 存活率 | 重复次数 | 蚤状幼体 | 最终温度(℃) |
| 甘油 (20%) | 53.8 | 1 | 26 | -19 | 24.6±10 | 4 | 110 | -24℃ |
| DMSO (20%) | 84.8±12.1 | 2 | 57 | -18 | 35.2±22.2 | 4 | 92 | -22℃ |
| 甲醇 (20%) | 93.2±9.6 | 2 | 41 | -20 | 75.3±5.4 | 4 | 85 | -24℃ |
| 对照组 | — | | | | 0.0 | 4 | 80 | -23℃ |

注: 1. 对照组用海水直接保存; 2. 最终温度指保护剂溶液的最终温度。

三、讨 论

1. 冷冻生物学目前已取得很大进展, 但关于无脊椎动物冷冻保存研究不多, 报道甚少, 且基本上是关于胚胎的保存。Asahina 和 Takahashi[1978]以 DMSO 为保护剂发现海胆后期胚胎在-196℃下能忍受1分钟。Toledo 等[1989]通过两步降温法, 能短期液氮保存紫贻贝胚胎, 但解冻后, 有很多不正常胚胎存在。其后, Toledo 和 Kurokura[1990]用 DMSO 液氮保存轮虫胚胎30天, 获得60%左右的存活率。Renard[1991]报道以甲醇和蔗糖冷冻大西洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的2-4胞期胚胎至-20℃仍有少量存活, 至液氮中15分钟也有少数发育。而关于幼体的冷冻保存报道甚少, Baust 和 Lawrence[1977]报道 *Penaeus setiferus* 幼体冷冻至-30℃持续5分钟后, 存活率达90%以上, 并认为快速冷冻(>500℃/分钟)是成功保存的关键。在本实验中, 卤虫无节幼体在-30℃冰箱中降温速率要慢得多, 平均降温速率不到5℃/分钟, 也达到

了很好的效果。其中,用20%甘油作冷冻保护剂,无节幼体在-30℃下耐受9-10分钟,存活率仍高达86.4%,这可能是由于所用材料和保护剂不同的原因。

卤虫无节幼体在自然环境中耐受力较强,能抵抗较恶劣的环境。而日本绒螯蟹合浦亚种的蚤状幼体比较娇嫩,容易死亡。生物材料对生物冷冻保存影响很大,在本实验中我们也相应地发现卤虫无节幼体较日本绒螯蟹合浦亚种蚤状幼体抗冻性强。

2. Harvey 和 Ashwood-Smith[1982]冷冻保存虹鳟卵子时发现,虽然虹鳟卵子内含物冰点为-1.7℃,但在-16℃下可保持数小时的过冷状态,他们推测 Zell[1978]报道的用 DMSO 冷冻虹鳟卵子至-20℃,卵子仅只处于过冷状态,内部并未形成冰晶。本冷冻保存实验由于冷冻保存时间短,并有保护剂的存在,保存溶液的冰点较低,实验材料处于外部冰晶的时间更短,因此“冷冻”的卤虫无节幼体和日本绒螯蟹合浦亚种蚤状幼体可能也仅仅只是处于一种过冷状态,没有形成或很少形成胞内冰晶。

3. 冷冻保存是一个很复杂的过程,受冷冻保护剂的种类、降温速率和复温速率等很多因素的影响。对生物个体的冷冻保存更是一个富有挑战性的课题,对卤虫无节幼体和日本绒螯蟹合浦亚种蚤状幼体的冷冻保存尚需进行大量的工作。

参 考 文 献

- [1] 戴爱云,1991.绒螯蟹属亚种分化的研究(十足目:短尾派).系统进化动物学重点实验室论文集第1集,P61-71.中国科学技术出版社(京)。
- [2] Asahina, E. and Takahashi, T., 1978 Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of sea urchin. *Cryobiology*, **15**:122-127.
- [3] Baust, J. G. and A L. Lawrence. 1977. Rapid freezing. An essential criterion for the successful cryopresevation of immature larval shrimp. *Cryobiology*, **14**:705.
- [4] ——, 1980a. Ontogenetic variability of chill tolerance in larval *Artemia salina*, Single type cryoprotectants. *Aquaculture*, **20**:305-311.
- [5] ——, 1980b. Ontogenetic variability of chill tolerance in larval *Artemia salina*, Dual cryoprotectants. *Aquaculture*, **20**:313-321.
- [6] Harvey, B. and J. M., Ashwood-Smith, Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology*, **19**:29-40.
- [7] Leger, PH. *et al.*, 1983. International study on *Artemia* XXIV. Cold storge of live *Artemia nauplii* from various geographical sources; Potentials and limits in aquaculture. *Aquaculture Eng.*, **2**:69-78.
- [8] Renard, P., 1991. Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*; methanol and sucrose effects. *Aquaculture*, **92**:43-57.
- [9] Toledao, J. D., 1989. Preliminary studies on the Cryopresevation of the Blus Mussel Embryos. *Nippon Suisan Gakkaish*, **55**(9):1661.
- [10] Toledo, J. D. and H., Kurokura, 1990. Cryopresevation of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* embryos. *Aquaculture*, **91**:385-394.
- [11] Zell, S. R., 1978. Cryopresevation of gametes and embryos of salmonid fishes. *Ann. Biol. Anima. Biochim. Biophys.*, **18**:1089-1099.

CRYOPRESERVATION OF NAUPLII *ARTEMIA* SPP. AND ZOEAE *ERIOCHEIR JAPONICUS HEPUENSIS*

Liu Xiangyu and Lu Renhou

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072*)

ABSTRACT Chill tolerance of nauplii of *Artemia* spp. put into freezer at -30°C for 30 minutes with and without the addition of glucose, sucrose and glycerol at various concentrations was determined. The average liquid cooling rate was $3-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and the average solid cooling rate was $1-1.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. All of the control without the addition of the cryoprotective agent died, the addition of the cryoprotective agent enhances the cooling tolerance of nauplii, and the survival varied according to the kind of cryoprotective agent, concentration and balance time, the highest survival of nauplii reached 86.4% in 20% glycerol when frozen to -30°C for 9-10 minutes. Chill tolerance of zoea of *Eriocheir japonicus hepuensis* at -25°C was also studied with 20% glycerol, DMSO and methanol. The average liquid cooling rate was $3-4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, the average solid cooling rate was $0.3-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. All of the control died when frozen to -23°C , the best result was 75.3% survived in 20% methanol when frozen to -24°C . Besides, the significance of these results for the development of cryogenic larval banking techniques was discussed.

KEYWORDS cryopreservation, cryoprotective agent, *Artemia* spp., *Eriocheir japonicus hepuensis*, nauplii, zoea