

## 紅尾蝦精莖、輸精管的低溫保存

丁雲源·林明男·曾寶順·李建東

### Studies on the cryopreservation of spermatophore and vas deferens of red-tail

shrimp, *Penaeus Penicillatus*

Yun-Yuan Ting, Min-Nan Lin  
Bao-Shuenn Tzeng and Chien-Dong Li

In this study glycerol, DMSO, and paraffin oil, all were used as cryoprotectants for the cryopreservation of spermatophore and vas deferens in *Penaeus penicillatus*, and *P. monodon*.

For diluting glycerol and DMSO to 5% and 10% (v/v), two types of basic media were used: Type A, sterilized sea water (35ppt) which contained penicillin (0.01g/100 ml) and streptomycin (0.1mg/ml) and Type B, a kind of modified *Carcinus* saline (Lin, 1989). Stored spermatophore and vas deferens were transformed into spermatid fluid by artificial copulatory fluid which contained 62.5mg/ml of trypsin (Lin, 1989). The morphology of spermatozoa which was contained in the spermatid fluid was observed by phase contrast microscopy.

In the preservation tests of  $-85^{\circ}\text{C}$ , DMSO got better results. The suitable immersing time was 5 minutes for vas deferens, while for spermatophore 10 minutes. At 5% DMSO, using Type A basic media, better results were obtained. In the preservation tests of  $4.0-6.4^{\circ}\text{C}$ , spermatophores or vas deferens which were kept in 5% DMSO for 30 days, and 5% DMSO or glycerol for 60 days resulted in much higher percentage of morphologically normal spermatozoa. Spermatophores stored in paraffin oil or 10% glycerol did not provide better results than those unimmersed spermatophores indicating that the sac of spermatophore, dried by cooled air were still beneficial in protecting sperm cells to a certain extent. Spermatophores and vas deferens which were kept in 10% DMSO at  $2-4^{\circ}\text{C}$  for 5 days could still function normally in the artificial insemination, with hatching rates of 14 to 48%.

**Key words:** Dimethyl sulfoxide, Glycerol, Paraffin oil, Spermatophore, Vas deferens, Cryopreservation, Spermatid fluid, Trypsin, Artificial insemination, Hatching rate.

## 前 言

始自1959年，Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 已成功地被利用於雞、小老鼠 (mouse)，及人類的組織培養，又其與甘油被發現在冷凍保存的期間及退冰溶化過程 (thawing) 對某些細胞如兔子及人類的精子有保護作用 Sherman (1964)。彼等亦被利用於魚介類、爬蟲類的冷凍精液保存上 (Chao et al. 1975, 1987 Stoss and Holtz 1981及1983, Stoss and Refstie 1983, Larsen et al 1984, Bougrier & Rabenomanana 1986)。在 0°C~4°C，鱒魚的精子可活存 1~數日，較高的溫度 (10°C) 中却僅能活存數小數 (原著作者省略: Billard 1981)。

甲殼類的精英之低溫保存的知識，目前尚不充足，僅在蟹 horseshoe crab、淡水長臂大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*)、美洲龍蝦 (*Homarus*) 有些研究。經 10% 甘油浸漬 10~15 分鐘之後經液態氮保存的精英所含的部分精子尚保有受精能力 (Chow 1982)。Ishida et al. (1986) 用石蠟油浸漬美洲龍蝦 (*Homarus*) 的精英，在 4-7°C 中保存 289 日，所含的精子形態不僅正常，且可進行先體反應 (acrosome reaction)。

本試驗，就前面述及之甘油，DMSO、石蠟油在蝦類精英及輸精管的冷藏及冷凍保存的效果加以調查。又以 5% 及 10% 甘油或 DMSO 浸漬的紅尾蝦精英及輸精管，比用 3% 或 15% 的浸漬液有比較顯著的高孵化率 (未發表)，故浸漬液的濃度採用 5% 及 10% (v/v) 進行試驗。

## 材料與方法

### 摘取精英、輸精管

在無菌箱中，解剖精英達 E 級 (Lin 1989) 之場紅尾蝦。精英取出後，將其交尾栓切除，移入經高壓殺菌的試管中。輸精管取出後，則保持完整並移入試管中。

### Basic media

A 液：35ppt 殺菌海水中加入 penicillin (0.01g/100ml) 及 Streptomycin (0.1mg/ml)。

B 液：Carcinus 鹽類溶液的修正液 (Lin 1989)。

浸漬濃度 (v/v) 及時間。冷凍 (-85°C) 及退冰 (30°C 中) 在 A 液所泡製 5% 的 DMSO、甘油及石蠟油原液 (聯工化學株式會社、日本，粘度 125/135)，中各浸漬 5、10、15、20、30 分後移入 -85°C 的超低溫冷凍櫃中。凍結 24 小時後取出，速投入 30°C 的流水浴中退冰。退冰後的精英及輸精管在含有 62.5mg/ml 的 Trypsin 之人工交尾液中轉化為精液。再以位相差顯微鏡做精子形態的觀察 (Lin and Hanyu 1989)。並計測正常精子的比率。為比較 A 液及 B 液的滲透效果，將之各別泡型成 5% DMSO 溶液。浸漬 10 分後，在 -85°C 中凍結 30 分，如前述退冰後，比較正常精子的比率。

### 4.0~6.4°C 的冷藏效果：

浸漬液為前述 A 液所泡製 5% 及 10% 的甘油與 DMSO，及石蠟油原液。在 10 支試管中各注入 4 ml。並在無菌箱內將精英及輸精管移入之。在 4.0~6.4°C 的培育箱中保存。另 10 支試管無浸漬液以為比較。冷藏後經 30 日及 60 日，分別取出精英及輸精管，並如前法退冰。轉化後，計算出正常形態的精子數。

### 2~4°C 冷藏保存精英、輸精管之人工授精效果：

2~4°C 冷藏 5 日後植入草蝦及紅尾蝦之 *Thelycum* 中，產卵時觀察孵化率。所用母蝦為卵巢已發育為凸角成熟階段之硬殼者。

## 結果與討論

表1 浸漬時間對精莖、輸精管之低溫保存的影響

Table 1 Effects of time of equilibrium on the cryopreservation\* of spermatophores and vas deferens of *Penaeus penicillatus*. 5% DMSO solu. (v/v)

Time (min)	Percentage of normal Spermatophores	Spermatozoa contained Vas deferens
5	1.55 — 1.01	1.51 — 1.36
10	9.69 — 1.79	0
15	0.43 — 0.21	0
20	0.3 — 0.04	0
30	0	0

\* -85°C, basic media: 35ppt sea water

#### -85°C冷凍保存

甘油及石蠟油浸漬的精莖及輸精管，退水後，經由人工交尾液轉化後的精液其精子大部分都已破裂。Chow et al (1985) 指出無予冷處理 (pre-freezing) 的淡水蝦精莖，無受精能力，此可能是理由之一。另，精莖的外套 (sac) 及間質，或是輸精管內的間質，將精子包圍著 (Lin 1989)。5~30分的浸漬，可能尚無法使之充分浸透而達平衡 (equilibrate)，又，-85°C的急速冷凍效果，通過最大結冰帶的時間比液態氮可能較長而破壞精子的細胞。DMSO的浸漬效果比甘油及石蠟油為佳 (Table 1)。輸精管的浸漬時間以5分鐘的比10~30為佳。在精莖方面以5分鐘及10分鐘的浸漬比15及20分鐘的為佳，而以10分鐘最適當。精莖與輸精管的最大差異為前者有sac存在，而使DMSO的浸透緩慢而需要較長的浸漬時間。但，一旦達到平衡後，若不即刻移出冷凍，則因為吸收過量，在凍結，退冰 (freeze-thaw) 的過程會使精子的細胞造成較大的機械損傷。Shawada and Chang (Sherman 1964) 認為DMSO的凍結、退冰的過程中之保護作用比甘油及石蠟油為佳，本試驗結果與之一致。

#### A及B液當basic media的差異

Basic media為Carcinus塩類溶液 (B液) 的5%DMSO中浸漬10分鐘的精莖，其精子經凍結後皆破裂。而A液者尚保持0.8%正常精子，即以海水為Basic media為佳。Chow et al (1985) 由吸水後相對的增重為準所定出的滲透壓的差值觀之，生理食塩水為basic media者明顯低下。雖然本試驗用的是DMSO而非甘油，但由吸水增重率比較之，與Chow之觀察結果一致。亦即5%DMSO在10分鐘中，以A液為basic media有較佳之浸透效果，反之B液則較差。

#### 4.0~6.4°C的冷藏效果

經30日的冷藏，浸漬石蠟油的輸精管及精莖的形狀及色澤均無變化。浸漬10%甘油、5%及10%DMSO的精莖呈出膨脹狀，輸精管的交尾栓先驅物質STP (Lin 1989) 由乳白色轉變成土黃色。無浸漬的對照組，精莖色澤已稍起變化，大部分的輸精管變為土黃色。冷藏達60日時，無浸漬的精莖因水分蒸發而縮小，變硬，變色。輸精管壁已開始腐爛。有浸漬的精莖大致與前回觀察相同，但輸精管

表2 精英及輸精管在4.0°C~4.6°C之保存結果

Table 2 Results of 4.0°C~4.6°C preservation of spermatophore and vas deferens of *Penaeus penicillatus*. Data indicate Mean  $\pm$  SE (range) of morphological normal spermatozoa ( $\times 10^6$ ).

*	Spermatophore		Vas deferens	
	30 days	60 days	30 days	60 days
5 % G	32.75 $\pm$ 6.78 (48-17)	42.66 $\pm$ 9.31 (88-25)	95.50 $\pm$ 18.62 (136-46)	42.00 $\pm$ 16.94 (100-0)
10 % G	37.50 $\pm$ 7.12 (51-20)	29.75 $\pm$ 2.01 (34-25)	101.25 $\pm$ 12.31 (128-77)	22.50 $\pm$ 9.81 (40-5)
5 % D	39.75 $\pm$ 2.35 (44-33)	46.5 $\pm$ 8.70 (64-27)	63.87 $\pm$ 13.35 (80-15.5)	38.67 $\pm$ 19.43 (84-9)
10 % D	53.75 $\pm$ 17.37 (104-30)	22.75 $\pm$ 9.35 (50-8)	133 $\pm$ 8.54 (152-112)	62.00 $\pm$ 12.48 (92-36)
PO	40.75 $\pm$ 6.62 (60-32)	29.67 $\pm$ 10.20 (46-2.7)	147.75 $\pm$ 36.60 (224-59)	11.33 $\pm$ 6.49 (27-0)
Control	0.50 $\pm$ 0.5 (20-0)	0	49.75 $\pm$ 19.15 (92-0)	21.50 $\pm$ 17.03 (72-0)

G:Glycerol D:Dimethylsulfoxid PO:paraffin oil

Basic media:35ppt sea water.

Control:Contained no equilibrium media.

有的變為褐色(甘油組)，且除了浸石蠟油外，他者因膨脹而破裂，內容物sperm mass流出。

觀察轉化的精液，無浸漬對照組的精英所含的正常精子含量比有浸漬各組為低(Table 2)。30日時含量最高者為5%DMSO。其次為石蠟油，5%DMSO，10%甘油，5%甘油。60日時則以5%DMSO及甘油浸漬者有較高的精子含量。在輸精管方面，30日的結果與前述的精英一致，但在60日時石蠟油(平均11.33 $\times 10^6$ )，及10%甘油(22.5 $\times 10^6$ )並不比無浸漬的對照組(21.5 $\times 10^6$ )為高。且後者之最高含量尚有72 $\times 10^6$ ，為30日時最高含量92 $\times 10^6$ 之78.3%。可見表層被風乾至某一程度，對於精子尚有保護作用。在其他的甲殼類方面，sesarmid crab *Sesarma intermedia*的雌蟹，經1回交尾，在無脫皮下可產卵3次(Kyomo 1986)，mud crab *Rhithropanopeus harrisi*交尾後，在47日間產卵4次，都可獲得受精卵(Morgan et al 1983)，tanner crab *Chionoecetes bairdi*，其97%雌蟹在交尾1年後及71%在交尾2年後尚可獲得受精卵(Paul 1984)。在龍蝦方面，轉移到thelycum的精子有可能活存數年，包圍著精子的非細胞性分泌物(acellular secretions)有保護作用(Kooda-cisco & Talbot 1982)。對蝦類的輸精管及精英亦有上述的分泌物，為粘性的間質(

表3 浸漬DMST，保存於2～4°C之精莢及輸精管之移植效果  
 Table3 Results of transplantations of spermatophores (SP) and vas deferens (VS) pre-treated with 10% Dimethylsulfoxid, then stored at 2-4°C.

Eggs obtained ( $\times 10^3$ )*	Hatching rate (%)
<i>Penaeus monodon</i> **	
650	0 (SP)
600	33.33 (SP)
500	24.62 (SP)
<i>Penaeus penicillatus</i> **	
3.3	48.48 (SP)
91	0 (SP)
17	0 (SP)
8.3	19.27 (VS)
35	14.28 (VS)

\* Oviposit at the same night of transplantation.

\*\* Unilateral-eyestalk-ablated "Ponka"\*\*\*gravid females were used for transplantation.

\*\*\* Ready to spawn

Malek and Bawab 1974, Hong 1977, Lin 1989) 因此若能施以適當的消毒、殺菌、封瓶的處理，在低溫下長時間保存諒必可行，唯輸精管由於管壁並非是粘性間質組織（林1989）較不易保存，故保存前之除去，而僅擠出sperm mass來保存可能會獲得較滿意的結果。此外，雖然與浸漬液一起保存雖可防止風乾，但60日的浸漬比僅浸漬30日差，故長期浸漬可能不利精子的保存。

10%DMSO浸漬、低溫冷藏精莢及輸精管之移植效果

2～4°C冷藏5日後植入草蝦及紅尾蝦之thelycum中。在精莢移植方面，草蝦3次中成功2次，孵化率33%及25%，紅尾蝦3次中成功1次，孵化率48%。在輸精管方面，紅尾蝦移植2次皆成功，唯孵化率僅為14%及19%（Table3）。上述的孵化率雖比無浸漬，新鮮的精莢或輸精管為低（林1989），但可見10%DMSO浸漬及低溫冷藏的精子不僅形態正常，且尚保有受精能力。前述以-85°C之低溫冷凍保存之精子有些許形態尚保存正常，故其可能亦有受精能力。今後在技術面上加以改良後，蝦類精子的長期保存，即精子庫的建立是有其可能性的。

## 摘 要

本試驗就甘油，DMSO，石蠟油在蝦類精莢及輸精管的冷藏（4.0～6.4°C）及冷凍（-85°C）保存進行試驗。石蠟油採用原液，甘油及DMSO為5%及10%（v/v），其basic media分A、B二種，A液為35ppt殺菌海水中加入penicillin（0.01g/100ml）及streptomycin（0.1mg/ml），B液為Carcinus鹽類溶液的修正液（Lin and Hanyu 1989）。經試驗處理的精莢及輸精管，以62.5mg/ml

的trypsin人工交尾液中轉化為精液 (Lin 1989) 後，觀察並計算正常精子的比率。在 $-85^{\circ}\text{C}$ 冷凍存中，DMSO有較佳的結果，輸精管浸漬5分鐘，精莖浸漬10分鐘適當。5%DMSO以A液為bas media有較佳之效果。在冷藏保存方面，經30日，5%DMSO及經60日，5%DMSO及甘油浸漬有較高的正常精子含量，另無浸漬對照的精莖，經60日冷藏，其正常精子含量並不比浸漬石蠟油或%甘油為低，可見表面風乾的精莖，對精莖冷藏有正面的效果。10%DMSO浸漬， $2\sim 4^{\circ}\text{C}$ 冷藏日後的精莖及輸精管植入草蝦及紅尾蝦之thelycum中，曾獲14~48%的孵化率。

## 謝 辭

承蒙陽明醫學院劉國鈞教授指導得以完成此項研究，由衷感激。計畫經費為農委會78農建-7. 漁-06補助。

## 參考文獻

1. Billard, R. (1981). Short-term preservation of spermatophore under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 23,287-293.
2. Bougrier, S and L. D. Rabenomoanana (1986). Cryopreservation of Spermatozoa of the Japanese Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 58,277-280.
3. Chao, N. H., H. P. Chen, and I. C. Liao (1975). Study on cryogenic preservation of grass mullet sperm. *Aquaculture*, 5,389-406.
4. Chow S., Y. Taki, and Ogasawara (1985). Cryopreservation of spermatophore of the freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.* 168,471-475.
5. Chao, N. H. W. C. Chao, K. C. Liu and I. C. Liao (1987). The Properties of tilapia sperm and its cryopreservation. Reprinted from *J. Fish Biol* 30,107-118.
6. Hong, T. J. (1977). D. Agricul. Dissertation submitted to the University of Tokyo, Japan. 164p. (In Japanese)
7. Ishida T., P. Talbot, and M. Kooda-Cisco (1986). Technique for the long-term storage of lobster (*Homarus*) spermatophores. *Gamete Research* 14,183-195.
8. Kooda-Cisco M. J., and P. Talbot (1982). A structural analysis of the freshly extruded spermatophore from the lobster, *Homarus americanus*. *J. of Morphology*, 172,193-207.
9. Kyomo J. (1986). Reproductive activities in the sesamid crab *Sesarma intermedia* in the coastal and estuarine habits of Hakata, Japan. *Marine Biology*, 91,319-329.
10. Larsen, R. E., P. T. Cardeilhac, and T. Lane (1984). Semen extenders for artificial insemination in the American alligator. *Aquaculture*, 42,141-149.
11. Lin, M. N. (1989). Studies on artificial insemination by transplanting spermatophore to vas deferens in penaeid shrimps. D. Agricul. Dissertation submitted to the University of Tokyo, Japan, 94P. (In Japanese)
12. Lin, M. N. and I. Hanyu (1989). Improvements on artificial insemination in gravid female of close-thelycum *Penaeus penicillatus* (In press, the Second Asian Fisheries Forum Tokyo, Japan, 17-22 April 1989)

13. Malek, S. R. A. and F. M. Bawab (1974). The formation of the spermatophore in *Penaeus Kerathurus* (Forsk., 1775) (Decapoda, Penaeidae) .the Initial formation of a sperm mass. E. J. Brill, Leiden, *Crustaceana*, 26(3), 273-285.
14. Morgan, S. G., J. W. Goy, and J. D. Costlow, Jr. (1983). Multiple ovipositions from single matings in the mud crab *Rhithropanopeus harrisii*. *J. of Crustacean Biology*, 3(4), 542-547.
15. Paul, A. J. (1984). Mating frequency and viability of stored sperm in tanner crab *Chionoecetes bairdi*. *J. of Crustacean Biology*, 4(3), 375-381.
16. Sherman, J. K. (1964). Dimethyl Sulfoxide as a protective agent during freezing and thawing of human spermatozoa. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 117, 261-264.
17. Stoss, J. and W. Holtz (1981). Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. *Aquaculture*, 25, 217-222.
18. Stoss, E. and W. Holtz (1983). Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. *Aquaculture*, 32, 321-330.
19. Stoss, J. and T. Refstie (1983). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30, 229-236.