



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103891661 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201410164003. 9

(22) 申请日 2014. 04. 23

(71) 申请人 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址 266071 山东省青岛市市南区南京路
106 号

(72) 发明人 杨爱国 周丽青 杨培民 刘志鸿
吴彪 孙秀俊

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 李素红

(51) Int. Cl.

A01K 61/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

高品质虾夷扇贝精液的采集方法

(57) 摘要

一种高品质虾夷扇贝精液的采集方法,属于海洋生物技术领域,它包括:1) 优质雄贝的挑选、暂养和促熟;2) 雄性虾夷扇贝精液的多次诱导排放与采集;3) 检测收集精子的品质;本发明收集方法简单,易于操作,不会对亲贝造成伤害,可重复多次采集精液,所采集的精液可长期保存。只需了解扇贝的生殖腺及排泄器官的解剖结构,精确辨别出肾管和肾孔便可进行精液的采集。一般雄性虾夷扇贝通过该方法一次可收集精液 0.5 ~ 1.5ml/只。在控温和保证充足营养的条件下,能促进性腺多次成熟排放,每个扇贝能重复采集 2-4 次直至三四月份。

1. 一种高品质虾夷扇贝精液的采集方法,其特征在于它包括:1) 优质雄贝的挑选、暂养和促熟;2) 雄性虾夷扇贝精液的多次诱导排放与采集;3) 检测收集精子的品质;

所述的雄性虾夷扇贝精液的多次诱导排放与采集:待雄贝性腺第一次充分发育成熟、个别出现排精现象时,将雄贝从水体中取出,控干外套腔中的水分,置于空气温度 8-16℃ 通风阴凉处阴干 30min ~ 1hr,当雄贝双壳开启时,在不伤害亲贝的情况下,维持双壳开启状态,用脱脂棉吸尽外套腔中残留的海水和外套腔液,静置片刻,有些雄贝的肾孔处会有白色精液自然流出,能够直接采集;有些雄贝性腺虽然充分发育成熟但对阴干刺激不敏感,将阴干 1hr 后仍不排放精液者重新放入 10-12℃ 海水中使用水槽流水催产,当贝出现排精状态时,立即从海水中取出,置于空气温度 8-16℃ 通风阴凉处阴干 30min ~ 1hr,待亲贝自然张开双壳,维持虾夷扇贝双壳自然开启状态,然后迅速将其外套腔中残余的海水及外套腔液吸尽,等待精液从肾孔处自动流出,从而采集精液;采集好的精液放入冰上预冷的 Eppendorf 管中备用;采集完精液后的亲贝移养至 6 ~ 8℃ 低温海水中开始下一轮的促熟、诱导排精和精液采集,根据虾夷扇贝雄贝状态和研究需要安排亲贝促熟、诱导排精和精液采集的次数。

2. 根据权利要求 1 所述的所述的方法,其特征在于所述的检测所收集精子的品质是指用海水稀释精液 40 倍,置于显微镜下观察精子活动情况。

高品质虾夷扇贝精液的采集方法

技术领域

[0001] 本发明属于海洋生物技术领域,系贝类遗传育种研究中的技术改进,具体地涉及一种高品质虾夷扇贝精液的采集方法。

背景技术

[0002] 水产动物精液的采集一般是指良种培育和人工育苗时人工授精研究或在生殖隔离研究中以获取精液为研究对象的技术方法。

[0003] 雄性虾夷扇贝的生殖器官是位于腹面的一只半弯月形的性腺,排泄器官为一对肾脏,肾脏各由一海绵状腺体及一具纤毛的薄壁短管状体构成,前者的肾口开口于围心腔;后者的肾孔(泄殖孔)开口于外套腔中,附于闭壳肌的前方,界于性腺及左右两鳃之间,呈长囊形。代谢废物和生殖产物都由肾孔排出。肾孔位于肾脏的末端腹面。性腺的前端内侧与贝柱靠近部位的上下两侧各有一个约1毫米长的裂孔,与肾脏相通,称肾生殖孔。在繁殖季节,成熟个体的性腺极为饱满,成熟的精子或卵子通过左右两侧的肾生殖孔进入肾脏,扇贝静置阴干后精液从左右肾孔流出到外套腔中;扇贝在海水中,通过双壳的开启和闭合运动,把排放在肾管中的精液从肾孔处喷射到海水中。

[0004] 目前收集贝类精液大多采用解剖法和自然排放法,前者不能保证所得到的精子完全成熟,后者不能避免精子过早被海水激活。如鲍鱼精液的收集通常采用阴干和升温相结合诱导亲鲍排精,再离心浓缩产至海水中的精子[Liliana Salinas-Flores等, Journal of shellfish, 2005, 24(2):415-420; Gwo Jin-Chywan等, Theriogenology, 2002, 58:1563-1578], 所得到精子因长时间与海水接触,能量损失相对较多; Hughes (Cryobiology, 1973, 10:342-344) 和 Zell等 (Cryobiology, 1979, 16:448-460) 研究表明这种海水—精子混合物用于牡蛎精子冷冻效果并不理想,尽管采用解剖性腺组织的方法获得精液浓度较高,但不能保证所获得的精子完全成熟,且精液中残留不少其它的组织细胞,亲贝只能取精一次。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种高品质虾夷扇贝精液的采集方法,利用本发明方法能够多批次收集到高浓度、高成熟率和低激活率的虾夷扇贝精子,以适用于精子冷冻保存和杂交授精试验的研究,能克服扇贝育种过程中远缘杂交生殖隔离以及不同地域不同时间开展品种改良的难题。在培育出生长快、抗逆能力强的优质亲贝的基础上,多批次收集浓度高且品质佳的扇贝精液,用于培育优质苗种,可有效遏制目前存在的品质下降,大面积死亡问题,确保扇贝养殖业的持续稳定发展。

[0006] 本发明是按照以下操作方法完成的:

[0007] 一种高品质虾夷扇贝精液的采集方法,它包括:1) 优质雄贝的挑选、暂养和促熟; 2) 雄性虾夷扇贝精液的多次诱导排放与采集; 3) 检测收集精子的品质;

[0008] 所述的雄性虾夷扇贝精液的多次诱导排放与采集:待雄贝性腺第一次充分发育

成熟、个别出现排精现象时,将雄贝从水体中取出,控干外套腔中的水分,置于空气温度 8-16℃通风阴凉处阴干 30min ~ 1hr,当雄贝双壳开启时,在不伤害亲贝的情况下,维持双壳开启状态,用脱脂棉吸尽外套腔中残留的海水和外套腔液,静置片刻,有些雄贝的肾孔处会有白色精液自然流出,能够直接采集;有些雄贝性腺虽然充分发育成熟但对阴干刺激不敏感,将阴干 1hr 后仍不排放精液者重新放入 10-12℃海水中使用水槽流水催产,当雄贝出现排精状态时,立即从海水中取出,置于空气温度 8-16℃通风阴凉处阴干 30min ~ 1hr,等待亲贝自然张开双壳,维持虾夷扇贝双壳自然开启状态,然后迅速将其外套腔中残余的海水及外套腔液吸尽,等待精液从肾孔处自动流出,从而采集精液;采集好的精液放入冰上预冷的 Eppendorf 管中备用;采集完精液后的亲贝移养至 6 ~ 8℃低温海水中开始下一轮的促熟、诱导排精和精液采集,根据虾夷扇贝雄贝状态和研究需要安排亲贝促熟、诱导排精和精液采集的次数。

[0009] 所述的检测所收集精子的品质是指用海水稀释精液 40 倍,置于显微镜下观察精子活动情况。

[0010] 本发明与已有技术相比的有益效果:

[0011] 1. 本发明收集方法简单,易于操作,不会对亲贝造成伤害,可重复多次采集精液。只需了解扇贝的生殖腺及排泄器官的解剖结构,精确辨别出肾管和肾孔便可进行精液的采集。一般雄性虾夷扇贝通过该方法一次可收集精液 0.5 ~ 1.5ml/ 只。在控温和保证充足营养的条件下,能促进性腺多次成熟排放,每个扇贝能重复采集 2-4 次直至三四月份。

[0012] 2. 采用本方法获得的精液品质好、浓度高,为 $0.2-1.6 \times 10^9$ 个 /ml;成熟度也高,高达 100%,因为精子只有充分成熟以后才能连同精液一起自然排放到肾管中,再从肾孔排出至体外,所收集的精子几乎没有接触到海水,处于未激活状态,因而便于保存。

具体实施方式

[0013] 下面通过具体实施例对本发明进行详细说明:

[0014] 最佳实施例具体操作工艺过程:

[0015] 2012 年 1-4 月份,选择壳高 9 ~ 11cm、2 ~ 3 龄、健康活泼的雄性虾夷扇贝暂养,建立优质亲贝群体;从此群体中挑选性腺充分成熟的个体,通过阴干和升温流水方式诱导雄贝排精,用质量好的一次性吸管在肾孔附近吸取自动排出的精液。通过精子活力检测、超低温冷冻保存及授精试验,证明本方法所获得的精液具有浓度高、成熟度高和激活率低的品质。

[0016] 完成上述操作过程具体操作如下:

[0017] 一种高品质虾夷扇贝精液的采集方法,其步骤包括:1) 优质亲贝的挑选、暂养和促熟;2) 雄性虾夷扇贝精液的多次诱导排放与采集;3) 检测收集精子的品质;

[0018] 1) 优质亲贝的挑选、暂养和促熟:

[0019] 一月份,从养殖海区挑选壳高 9 ~ 11cm、2 ~ 3 龄、健康活力强的虾夷扇贝雄贝 40 只,移入室内进行暂养,暂养密度每立方米水体 20 只,暂养水温由开始的 3-4℃,每天升温 0.5℃至 6℃恒温培育。暂养过程中每天倒池一次,投喂培育的单细胞藻硅藻 3 ~ 4 万个 /ml 或金藻 5 ~ 6 万个 /ml 或扁藻 1 ~ 2 万个 /ml,三种单细胞藻混合投喂效果更好,饵料不足时补充鲜酵母、食母生及螺旋藻等人工饵料;待个别扇贝出现少量精液排放现象时,恒温

在 6℃ 暂养, 等待诱导排精, 此时换水投饵动作要轻, 防止诱发亲贝直接排放精液到海水中。

[0020] 2) 雄性虾夷扇贝精液的多次诱导排放与采集

[0021] 从暂养的雄贝群体中, 挑选生殖腺饱满、已出现少量排精的雄贝 10 只, 控干外套腔中海水后放置室温 10℃ 阴凉干燥处阴干约 30min, 当扇贝双壳自然开启时, 在不损伤扇贝闭壳肌的情况下, 维持扇贝壳的开启状态, 用脱脂棉迅速吸干外套腔中的海水及外套腔液, 静置片刻, 有些扇贝肾孔处有白色精液流出, 能够直接采集。有些雄贝性腺虽然充分发育成熟但对阴干刺激不敏感, 在阴干 1hr 后, 仍不排放精液, 便把所述的雄性虾夷扇贝放入到 12℃ 流动海水中诱导其排放精液。当观察到流水中雄性虾夷扇贝出现排精时, 立刻从海水中取出, 置于空气温度 10℃ 通风阴凉处阴干 30min ~ 1hr 等待亲贝自然张开双壳, 在不伤害亲贝的情况下, 维持双壳开启状态, 用脱脂棉迅速吸干外套腔中的海水及外套腔液, 静置片刻, 虾夷扇贝肾孔处有白色精液流出, 用一次性吸管在肾孔附近吸取精液。采集后的精液放入冰上预冷的 Eppendorf 管中备用。一次性吸管和 Eppendorf 管是经密闭高温高压消毒的。已排放精液的雄贝移养至 6 ~ 8℃ 低温海水中, 通过加强亲贝营养来促使整个性腺再发育, 达到再次成熟排放精液的目的。本实施例中的虾夷扇贝共采精 3 次, 采集精液 24ml。

[0022] 3) 检测收集精子的品质: 取 5 μ L 精液, 用 195 μ L 海水稀释 40 倍, 将擦洗干净的血球计数板放于显微镜的载物台上, 盖上盖玻片。迅速取一滴稀释的精液于血球计数板盖玻片的边缘使精液自动渗进计数室。置于 200 倍或 400 倍暗视野显微镜下观察精子活动情况, 借助计数板上的标准网格进行目测计数, 估计精子浓度, 观察活动与不活动的精子数目。数出计数室的四角及中央共五个大方格即 80 个小方格内的精子数。计数每小格内的精子, 只数格内及压在左线和上线者。前进运动精子数占全部精子数的百分比为精子活力, 所测精子的活力各批次有不同, 但都大于 80%。

[0023] 实施例 2

[0024] 在使用本发明方法进行采集虾夷扇贝雄贝精子的同时, 另外采用 2 种不同的方法收集精液: A. 解剖法: 将性腺剪切成碎块放于 500 目筛绢上, 海水冲洗滤出精液至冰上预冷的小烧杯中; B. 离心浓缩法: 用离心管收集排入海水中的精液, 经冷冻离心, 浓缩的精液存于 10ml 离心管内冰上预冷备用。为消除虾夷扇贝个体间的差异, 本实施例的 2 种方法与实施例 1 收集的精液均来源于同一批虾夷扇贝的多个个体。

[0025] 使用与实施例 1 步骤 3) 同样的方法检测所述解剖法和离心浓缩法所采集的精子活力, 结果表明两种方法的精子的活力均大于 80%。

[0026] 实施例 3 验证检测后 3 种方法所采集的精液品质:

[0027] 通过精子超低温冷冻保存和授精试验, 以验证精液收集方式与所采集精液质量的关系。结果表明, 三种方法(实施例 1 的方法和实施例 2 的两种方法) 收集的精液冷冻前精子的活力差异不显著, 但冷冻后实施例 1 方法收集到的精液冷冻效果最好, 解冻后精子活力为 $49.3 \pm 6.1\%$, 而 A 和 B 所得的冻精活力分别为 $25.7 \pm 4.0\%$ 、 $28.7 \pm 1.5\%$, 与实施例 1 的结果相比差异显著 ($p < 0.05$)。因为肾孔处自然排放的精子其外围环境更接近生理状态, 且较高的精子密度限制了精子活动, 使精子能量保存较好, 适合用于精子冷冻保存。由实施例 1 方法收集到的精液受精能力亦强, 在与同一批卵子受精时, 其受精率高达 95%, 明显高于 A(约为 80%) 和 B(约为 90%) 方法, 实施例 1 方法收集到的精液放置在 4℃ 冰箱中保存一周之内仍具备一定的受精能力, 但 A 方法采集的精液只能保存 24hr 左右, B 方法

采集的精液只能保存 1hr 左右,之后受精能力丧失。

[0028] 通过我们发明的这种精液收集方法所采集的精液除了可用于精子低温冷冻保存和受精试验外,还可考虑用于基于精子为载体的转基因研究或以精子为原材料的雌核发育、雄核发育等的研究。