

文章编号: 1004 - 7271(2007)04 - 0351 - 06

虾夷扇贝精子的冷冻保存及其 杂交试验应用研究

杨培民^{1,2}, 杨爱国¹, 刘志鸿¹, 周丽青¹

(1. 中国水产科学院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;
2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:以精子活力和受精率为参数,就收集精子的方法、抗冻剂的种类和浓度及冷冻程序和平衡时间对虾夷扇贝精子超低温保存效果的影响进行了研究,并进行了冻存精子与栉孔扇贝卵子的杂交实验。结果表明,肾管处收集到的精液与海水配的16% DMSO 1:3(v/v)混合,在4℃冰箱内平衡5~10 min,在液氮面上方20 cm、3 cm处分别停留3 min、10 min后浸入液氮保存,冻精活力在40%以上。在液氮中保存1 d、8 d、30 d、90 d后解冻,冷冻精子活力没有显著差异($P > 0.05$),但明显低于新鲜精子的精子活力。虾夷扇贝的冻精可以使栉孔扇贝卵子受精,受精率在20%以上,并能得到正常的D型幼虫。

关键词: 虾夷扇贝; 栉孔扇贝; 精子冷冻; 杂交

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Cryopreservation of *Patinopecten yessoensis* sperm and its application to hybridization

YANG Pei-min^{1,2}, YANG Ai-guo¹, LIU Zhi-hong¹, ZHOU Li-qing¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Using motility and fertilization rates as parameters for evaluating the quality of post-thaw sperm, this paper examined the effects of sperm collection, type and concentration of cryoprotectant, freezing procedure and equilibration time on cryopreservation of *Patinopecten yessoensis* sperm. The higher post-thaw sperm motility (more than 40%) was obtained using sperm (extracted from nephridium) suspended in 16% DMSO at a ratio of 1:3 and equilibrated in 4℃ for 5–10 min, swung at 20 cm above LN₂ for 3 min and then 3 cm above LN₂ for 10 min, transferred into LN₂ for storage. The motility of post-thaw sperm did not show significant differences when storage time ranged from 1 d to 90 d, but the values were significantly lower than those of fresh sperm. In hybridization trail between *Chlamys farreri* egg and *Patinopecten yessoensis* frozen sperm, the post-thaw sperm could fertilize *Chlamys farreri* egg with a fertilization rate of more than 20%, and the D-shaped larvae of cryopreservation group were similar to those of control.

收稿日期: 2006-12-04

基金项目: 国家科技攻关项目(2004BA526B0103); 青岛市科技发展计划资助项目(05-1-HY-79)

作者简介: 杨培民(1979-), 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 专业方向为水产遗传育种。E-mail: haiy301@sohu.com

通讯作者: 杨爱国, Tel: 0532-5811982, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

Key words: *Patinopecten yessoensis*; *Chlamys farreri*; sperm cryopreservation; hybridization

自 Ploge 于 1949 年用甘油成功冷冻保存动物精子以来,精子冻存技术已经在人、畜和少数经济鱼种上取得突破性进展。目前有关贝类精子冷冻保存的研究主要集中在牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[1]、鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*)^[2]、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)^[3]、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[4] 和珍珠贝 (*Pinctada martensii*)^[5] 等少数经济种上,并在冷冻方法和原理的研究上进行了大量的探索,但是尚未有虾夷扇贝冻精杂交应用的报道。虾夷扇贝个体大、经济价值高,但为冷水性贝类,养殖区域仅限在我国北方局部海区;栉孔扇贝是我国北方海区重要的养殖贝类,具有很好的养殖基础,但是自 1996 年以来连续出现大面积死亡,使扇贝养殖产业受到重创。杨爱国等^[6] 研究表明,栉孔扇贝 ♀ × 虾夷扇贝 ♂ 的杂交子一代在生产性能和抗逆能力上相对于栉孔扇贝有显著的提高,具有生产使用价值。虾夷扇贝繁殖时间集中在 3 月下旬至 4 月上旬,而栉孔扇贝集中在 5 月至 7 月繁殖。由于两种扇贝繁殖习性上的差异,操作上需要通过人工控温的方法,使两种扇贝同步产卵排精,这无疑限制了大规模、多批次杂交苗种的生产。精子冷冻保存技术可以克服时间和地域的限制,理论上具有实现栉孔扇贝 ♀ × 虾夷扇贝 ♂ 杂交的可能。笔者对虾夷扇贝精子的冷冻保存和杂交应用进行了探索,以期对虾夷扇贝和栉孔扇贝杂交育种研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 亲贝的来源与蓄养

虾夷扇贝和栉孔扇贝取于青岛志诚水产科技有限公司。虾夷扇贝壳高 9.0 ~ 11.2 cm,栉孔扇贝壳高 5.5 ~ 6.0 cm,雌雄分养于 20 L 的水族箱内,虾夷扇贝和栉孔扇贝暂养温度分别为 4 ~ 8 °C 和 14 ~ 16 °C,投喂螺旋藻 (*Spirulina antimutagenic*) 和金藻 (*Dicrateria inornata*),每天换水两次。

1.2 精子质量的评价

用镊子蘸取精液 (约 5 μL) 于载玻片,滴加少许海水 (约 200 μL) 后,迅速置于 200 倍显微镜下观察,精子活力为一个视野内快速运动精子占全部精子的百分比,颤动或仅尾巴摆动者不统计在内,观测 3 ~ 5 个视野求得平均值,试验所用精子的活力大于 80%。

1.3 抗冻保护液的配制

用滤过消毒 (煮沸) 海水为基础液,分别以二甲亚砜 (DMSO)、甘油 (GLY)、甲醇 (MET) 为抗冻剂配制 8% ~ 20% (v/v) 抗冻液。抗冻液保存于 4 °C 冰箱内预冷备用。

1.4 精子冷冻条件的筛选

1.4.1 精液获取方法和抗冻剂的选择

待雄贝性腺发育成熟后,采用三种不同的方法收集精液。A. 解剖法:把性腺剪切成碎块放于 500 目筛绢上,海水冲洗滤除大的性腺块,同时用小烧杯接取滤液置于冰上预冷备用; B. 吸取法:阴干升温刺激雄贝,观察到排精后,立即从海水中取出,用 200 μL 的移液枪在肾管处吸取精液,存于 EP 管内冰上预冷备用; C. 离心浓缩法:参照 Gwo 等^[2] 用于鲍鱼精液收集的方法,用离心管收集排入海水中的精液,经离心浓缩的精液存于 10 mL 离心管内冰上预冷备用。

为消除扇贝个体间的差异,每种方法收集的精液均来自于同一批扇贝的多个个体。上述方法收集到的精液用预冷上述三种抗冻保护液 1 : 3 稀释,装于 1.8 mL 的冷冻管内,4 °C 冰箱内平衡 5 min 后,液氮罐中保存。3 h 后解冻,镜检统计精子活力,比较冻存效果。

1.4.2 冷冻程序对精子冻存效果的影响

根据 1.4.1 的结果,选择吸取法收集到的精液与 DMSO 配制的抗冻保护液 1 : 3 混合 (v/v)。经 4 °C 平衡 5 min 后,装于 1.8 mL 冷冻管中,按以下降温程序预冷冻后再浸入液氮中, I 组:液氮面上方 3 cm 处停留 10 min; II 组:液氮面上方 20 cm、3 cm 处分别停留 3 min 和 10 min; III 组:液氮面上方 20 cm

处停留 10 min; IV 组: 直接浸入液氮; 同时用 TES1317 温度计(泰仕, 台湾)每隔 30 s 记录一次冷冻精液样品温度, 并用起始和投入液氮前的温度变化除以时间求得降温速率。冷冻后, 解冻统计精子活力。

1.4.3 平衡时间的选择

精液与 16% 的 DMSO 抗冻保护液 1:3 混合, 在 4 °C 下分别平衡 0、5、10、15、20、30 min 后, 按冷冻程序 II 降温后, 浸入液氮保存 3 h 后, 统计精子活力的变化。

1.4.4 解冻

根据预试验的结果, 冻存后的样品在(24 ± 2 °C)的水浴环境中解冻, 为使样品受热均匀, 不时摇动冷冻管。

1.5 杂交试验

据上述试验优化条件, 取 20 mL 栉孔扇贝卵子(400 ~ 600 个/mL)于 100 mL 烧杯内, 逐步加入保存了 1 d、8 d、30 d、90 d 后虾夷扇贝精子, 使精卵比例为(500 ~ 600):1; 作为对照, 取新鲜的虾夷扇贝精子与同一批次的卵子进行杂交。精卵混匀静放 20 min 后 500 目筛绢滤除多余的精子转入 1 000 mL 滤过海水中继续培养。授精后取样观察胚胎发育状况, 并统计授精率, 每次取样个数不低于 200。

1.6 数据分析

每个实验重复 3 次, 所有数据均用均数 ± 标准差的方式表示。对精子的活力和受精率进行方差分析(One Way-ANOVA), 当差异显著时, 用 LSD(Least-Significant-Difference)和 Turkey 进行比较, $P < 0.05$ 时为差异显著, 所有数据处理由软件 SPSS11.5 完成。

2 结果

2.1 精液收集方法对精子活力的影响

三种不同方法收集精液用于冷冻保存, 其冻存效果见图 1。三种不同方法收集的精液冷冻前精子的活力差异不显著, 但冷冻后由 B 方法收集到的精液冷冻效果最好, 解冻后精子活力为 49.3% ± 6.1%, 而 A 和 C 所得的冻精活力分别为 25.7% ± 4.0%、28.7% ± 1.5%, 与 B 的结果相比差异显著($P < 0.05$)。

2.2 抗冻剂的选择

三种抗冻剂中, DMSO 对精子保护效果最好(表 1), 当 DMSO 浓度低于 16% 时, 冷冻后精子活力随浓度上升而增加, 在 16% 时获得最佳冻精活力, 大于 16% 冷冻后精子活力下降。而 GLY 和 MET 对精子保护作用很差。在 GLY 和 MET 取得最高冻精活力分别为 8.0% ± 4.0% 和 7.7% ± 2.5%, 与 8% DMSO 保护作用相当, 与 DMSO 其它浓度的保护效果相比差异显著($P < 0.05$)。

2.3 降温程序对精子活力的影响

精液与 16% DMSO 1:3 混合后, 经 4 °C 平衡 5 min, 按不同降温程序预冷冻, 精子冻存效果见表 2。结果表明, 首先在 20 cm(-60 °C 左右)处停留 3 min, 然后在 3 cm(-190 °C 左右)处停留 10 min 冻

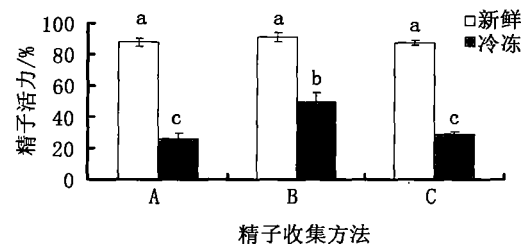


图 1 精液的收集方法对冷冻后精子活力的影响
Fig. 1 Effect of methods of sperm collection on post-thaw motility (n = 5)
柱形图上不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

表 1 抗冻剂种类和浓度对冷冻后精子活力的影响
Tab. 1 Effect of type and concentration of cryoprotectant on post-thaw sperm motility

抗冻剂	浓度 (%)	精子活力 (%)
DMSO	8	9.3 ± 3.1 ^d
	12	23.7 ± 6.7 ^c
	16	47.0 ± 4.4 ^a
	20	35.0 ± 4.6 ^b
GLY	8	8.0 ± 4.0 ^d
	12	0.0 ± 0.0 ^e
	16	0.0 ± 0.0 ^e
	20	0.0 ± 0.0 ^e
MET	8	0.0 ± 0.0 ^e
	12	0.0 ± 0.0 ^e
	16	7.7 ± 2.5 ^d
	20	0.0 ± 0.0 ^e

注: 相同字母上标表示所得结果差异不显著 ($P > 0.05$) (n = 3)

存效果最好,其对应的降温速率为 $-18.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,3 cm处停留10 min效果次之,直接浸入液氮效果最差。

表2 不同降温程序对精子活力的影响

Tab. 2 Effect of 3 different freezing procedures on post-thaw sperm motility

降温程序	温度变化($^{\circ}\text{C}$)	平均降温速率($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	精子活力(%)
I ;3 cm/10 min	14.7 ~ -190*	26.5	33.0 \pm 4.6 ^b
II ;20 cm/3 min +3 cm/10 min	14.7 ~ -8.9 ~ -190**	18.5	43.7 \pm 5.7 ^a
III ;20 cm/10 min	14.7 ~ -62.3	7.7	12.3 \pm 3.5 ^c
IV ;直接浸入液氮	-	-***	0.0 \pm 0.0 ^d

注:冻存样品体积0.8 mL,液氮面距罐口距离为34 cm;不同字母上表表示结果差异显著($P < 0.05$);*样品在7 min 42 s时温度达到温度计量程的下限;**样品在11 min时温度达到温度计量程的下限;***超出温度计量程降温速率未测得

2.4 平衡时间对冷冻精子活力的影响

6个时间梯度对冻精活力影响效果见图2。当平衡时间不超过10 min时,冻精活力差异不显著($P > 0.05$),精子在不经平衡的情况下,仍可得到 $32.3\% \pm 9.1\%$ 的冻精活力,与平衡20 min的冻存效果($36.0\% \pm 7.2\%$)差异不显著,而平衡5 min和10 min的冻存效果最好,冻精活力均在40%以上,明显好于其它组。

2.5 杂交试验

解冻后精子活力和受精率见表3。精子保存1 d至90 d,冻精活力和受精率变化均不显著($P > 0.05$),但明显低于新鲜精子。冻精活力最低值为 $36.7\% \pm 8.3\%$,最高可达 $44.6\% \pm 6.5\%$;冻精受精率超过20%。

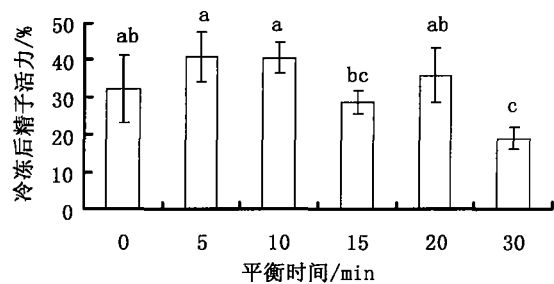


图2 4°C平衡时间对精子冻存效果的影响

Fig. 2 Effect of equilibration time at 4°C on post-thaw sperm motility (n = 4)

柱形图上不同字母代表差异显著($P < 0.05$)

表3 冻存时间对精子活力和受精率的影响

Tab. 3 Effect of storage time in liquid nitrogen on post-thaw sperm motility and fertilization rate

保存时间(d)	精子	精子活力(%)	受精率(%)
1	冷冻	42.0 \pm 4.0 ^b	25.3 \pm 3.2 ^c
	对照	86.3 \pm 6.7 ^a	69.0 \pm 3.0 ^a
8	冷冻	44.6 \pm 6.5 ^b	26.0 \pm 3.5 ^c
	对照	84.7 \pm 7.0 ^a	64.3 \pm 6.8 ^a
30	冷冻	39.8 \pm 4.2 ^b	22.7 \pm 3.1 ^c
	对照	90.3 \pm 4.7 ^a	71.3 \pm 3.7 ^a
90	冷冻	36.7 \pm 8.3 ^b	24.0 \pm 1.0 ^b
	对照	89.6 \pm 4.9 ^a	75.0 \pm 3.0 ^a

注:培育水体温度为18~20 $^{\circ}\text{C}$,重复次数n=4;同一列中数据上标字母相同者表示差异不显著($P > 0.05$)

对受精卵继续培育发现,冻精组和鲜精组都可以得到发育正常的D型幼虫(图3-1,2),但是冻精组中胚胎发育的同步性略差,畸形胚胎比例上升(图3-3)。

3 讨论

精液的收集方法对精子能量损失和成熟程度有所影响。扇贝由于繁殖习性的特殊性,不能象鱼类那样通过挤压获取高质量的精液,收集扇贝精液大多采用解剖法、自然排放法,但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。在其它贝类精子冻存的研究中,解剖法获取精液已经成功用于牡蛎精子的冷冻保存研究,而鲍鱼精液的收集常采用离心浓缩产至水中的精子。本实验

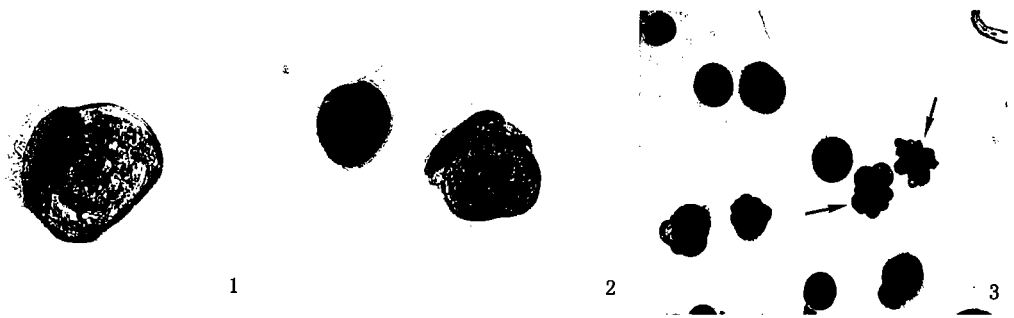


图3 冻精组和新鲜精子组胚胎发育的比较

Fig.3 Comparison of embryo development between frozen sperm group and control

1. 鲜精组的 D 型幼虫; 2. 冻精组的 D 型幼虫; 3. 冻精组的畸形囊胚

中,解剖收集到的精子,尽管被海水激活能得到较高的精子活力,但可能在成熟度、抗逆能力方面与正常排放的精子存在差距;离心浓缩所得精子,因为长时间与海水接触,能量损失相对较多;肾管处收集的精子其外围环境更接近生理状态,比较高的精子密度 $[(0.2 \sim 1.6) \times 10^9 \text{ 个/mL}]$ 限制了精子活动,使冻前精子能量保存较好,因而其冻存效果最佳。

Anchordoguy 等^[7]认为 DMSO 具有比较好的保护作用是与较快的渗透速率和可以与细胞膜上的磷脂反应有关。本研究发现, DMSO 对虾夷扇贝精子的保护作用明显高于 GLY 和 MET。不同浓度的 DMSO 对精子的保护效果也有差异, 16% DMSO 效果明显好于其它浓度与欧洲牡蛎 (*Crassostrea tulipa*) 和僧帽牡蛎 (*Saccostrea cucullata*) 的研究结果相近^[8]。而李纯等^[4]在栉孔扇贝上的研究表明,以 5% DMSO + 5% 蔗糖为抗冻保护剂在程序冷冻仪控制降温速率的情况下,精子冻存效果较好; Liliana 等^[9]认为用 10% GLY 冻存红鲍 (*Haliotis rufescens*) 精子,冻精活力和受精率要高于 10% DMSO。这说明最适抗冻剂及其浓度的选择要考虑物种、冷冻方法和添加非渗透性抗冻剂与否等多种因素影响。

在低温条件下,精子细胞在抗冻保护液中平衡适当的时间,可以使抗冻剂渗入胞内从而起到降低冰点作用^[10],这在冷冻保存中是必要的。不同物种的精子对抗冻剂的耐受性存在差异,其冻前的平衡时间也不尽相同。Bougrier 和 Rabenomanana^[11]认为牡蛎精子在抗冻保护液平衡时间不宜超过 3 min,否则精子受精率就会下降; Basavaraja 等^[12]研究结果表明冻前平衡 10 ~ 30 min 对印度鲃 (*Tor khudree*) 精子冻存效果没有影响。本研究的结果显示,虾夷扇贝精子在 DMSO 抗冻保护液中平衡时间 0 min、5 min 和 10 min 冻存效果没有差异,这说明 DMSO 比较容易透过虾夷扇贝精子外膜,其毒性作用在短时间内变化不大,但是平衡时间超过 15 min 时,冻精活力有所下降,这是否与一定的平衡时间和抗冻剂浓度可使胞内蛋白变性有关需进一步研究^[13]。

过快或过慢的冷却速率都会导致细胞的损伤^[14],不同物种之间精子膜的渗透性、精子大小和抗逆能力有所不同,针对某一物种选择适宜的降温速率一直是精子冷冻保存研究的重点。精子冷冻过程中降温速率通常通过程序冷冻仪或者改变冷冻样品在液氮面上方的高度来控制,前者温控较为精确但是投入费用较高;后者使用方便但是不能获取确切的降温参数,数据间的可比性较差。本实验中,我们用低温温度计来测量精液样品在不同预冷高度时的温度变化,筛选适宜的降温速率来克服上述问题。所得数据表明,当降温速率在 $-18.5 \text{ }^\circ\text{C/min}$ 时,冻精活力最高,而过快(直接投入液氮)和过慢(在液氮面上方 20 cm 处停留 10 min)冷冻速度对精子保存是不利的,这在栉孔扇贝^[3]和马氏珠母贝^[4]精子冻存研究中有相似报道。

杨爱国等^[6]研究结果表明,栉孔扇贝和虾夷扇贝反交和正交均能正常受精、胚胎发育。在我们的杂交实验中,冷冻 90 d 内虾夷扇贝精子活力没有发生显著变化,冷冻时间上可以满足两种扇贝杂交的需要,冷冻后虾夷扇贝精子也能使栉孔扇贝卵子受精,并能得到发育正常的 D 型幼虫,但其活力和受精能力与新鲜精子相比明显下降。运用电镜技术对冷冻后精子形态和超微结构进行观察发现,部分冻精

有顶体破裂、尾巴丢失和线粒体脱落的现象(数据待发表),这些变化可能导致了精子运动能力和受精能力的下降。冷冻保存是否会对精子的多样性和遗传结构有影响一直是人们非常关心的问题^[15],陈松林等^[16]用微卫星技术对冻精大菱鲂后代遗传结构进行了分析,发现冻精和新鲜精子大菱鲂后代的等位基因数和基因型数均相等,杂合度也无显著差异;Gwo等^[17]认为牡蛎冻精DNA的损伤与冻精胚胎死亡率的增加有关。本实验结果表明,尽管冻精组和新鲜精子组的受精卵均能发育至D型幼虫,但冻精组的胚胎发育同步性差,畸形胚胎的比例增加,这是否与精子DNA的损伤有关需进一步研究。

总之,作者对影响虾夷扇贝精子冻存效果的一些因素进行了筛选和优化,首次把冷冻的虾夷扇贝精子用于杂交实验,并获得了发育正常的D型幼虫。但是,相对于鱼类和其它经济贝类精子冷冻保存研究,扇贝在此领域的研究仍很薄弱。获得稳定可靠的精子冻存方法,提高冻精活力和受精率并进行育苗生产实践应是今后研究的重点。

参考文献:

- [1] Bougrier S, Rabenomanana L D. Cryopreservation of spermatozoa of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1986, 58: 277 - 280.
- [2] Gwo Jin-Chywan, Chen Chuan-Wen, Cheng Hsien-Yu. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) [J]. Theriogenology, 2002, 58: 1563 - 1578.
- [3] 杨爱国,王清印,孔杰,等.扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究[J].海洋与湖沼,1999,30(6):624 - 628.
- [4] 李纯,李军,薛钦昭.栉孔扇贝精子超低温保存研究[J].海洋水产研究,2000,21(1):57 - 61.
- [5] 王梅芳,余祥勇,刘永,等.马氏珠母贝精子的超低温保存[J].水产学报,2006,30(2):170 - 174.
- [6] 杨爱国,王清印,刘志鸿,等.栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交及子一代的遗传性状[J].海洋水产研究,2004,25(5):1 - 5.
- [7] Anchordoguy T J, Rudolph A S, Carpenter J F, et al. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing [J]. Cryobiology, 1987, 34: 324 - 331.
- [8] Kobina Y, John M. Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other oysters [J]. Aquaculture, 1991, 97: 259 - 267.
- [9] Liliana S F, Carmeng P C, Jilla J, et al. Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotis rufescens*) [J]. Journal of Shellfish Research, 2005, 24(2): 415 - 420.
- [10] Bhavanishankar S, Subramoniam T. Cryopreservation of the spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. Journal of Experiment Zoology, 1997, 277: 326 - 336.
- [11] Bougrier S, Rabenomanana L D. Cryopreservation of the spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1986, 58: 377 - 380.
- [12] Basavaraja N, Hegde S N, Akash N, et al. The fertility of cryopreserved Deccan Mahseer, *Tor khudree* (Sykes) spermatozoa [J]. Asian Fisheries Science, 2002, 15: 193 - 202.
- [13] Baxter S J, Lathe G H. Biochemical effects on kidney of exposure to high concentrations of dimethyl sulfoxide [J]. Biochem. Pharmacol, 1971, 30: 1079 - 1091.
- [14] 李广武,郑从义,唐冰.低温生物学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1998:42.
- [15] 黄东晖,熊成良.冷冻对人精子遗传物质的影响[J].中国男科学杂志,2002,18(3):218 - 220.
- [16] 陈松林,刘云国,季相山.精子冷冻保存对大菱鲂后代遗传结构影响的微卫星分析[J].高技术通讯,2005,15(6):87 - 91.
- [17] Gwo Jin-Chywan, Chen Chuan-Wen, Cheng Hsien-Yu, et al. Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation of using comet assay [J]. Cryoletters, 2003, 24: 171 - 180.