

# 魚類精液低溫與冷凍保存研究之現況及 展望

趙乃賢、梁溫欣、蔡惠萍、廖一久

臺灣省水產試驗所

## 摘 要

魚類精液之低溫及冷凍保存已經詳為研究，所發展出來的技術在多種冷水及溫水性魚類都已証實可行。本文主要係介紹細胞冷凍保存的原理；前處理、冷凍及解凍引起之冷凍傷害；魚類精液保存時各重要影響因素；短期低溫及長期冷凍保存之成效。同時綜合介紹近年來由農委會補助本實驗室進行之相關研究的成果，至盼藉此帶動此方面更多、更深入的研究。

## 一、前 言

魚貝類配子之冷凍保存已在很多種魚類及少數貝類之精液保存之基礎研究與技術改進方面有了長足的進步和頗為成功的例子(Billard 1978, Mounib 1978, Harvey 1983, Graham et al. 1984, 黑昌壽1987, Leung and Jamieson 1991, Chao 1991)，但是有關卵之研究則歷史較短，效果不彰。低溫保存一般指將供試材料作必需之處裡後置放於4°C上下作短期保存；冷凍保存係採用液態氮為冷媒作長短期之超低溫保存，使擁有魚貝類特有種原，以節省培養種魚貝之人力物力，不僅作為重要養殖種魚貝提供基因之另一供應源亦能預為保存瀕臨滅亡危險之野生種的基因。大多數作為配子保存研究之對象魚種均係具有商業價值並能由繁殖場供應試材(Scott and Baynes 1980)，至於野生種則僅限於為了保存瀕臨危險的少數種。

由魚貝類配子保存預期可達成各種用途之潛力甚多，因此深深值得積極研究發展：

- 1.維持種魚種貝之經濟性、

2. 避免疾病損失之潛力、
3. 供應繁殖場或實驗室適當用途之持續性、
4. 養殖場間運送原種之方便性、
5. 大幅提升種間雜交之可能性、
6. 種魚種貝供試範圍之擴大性。

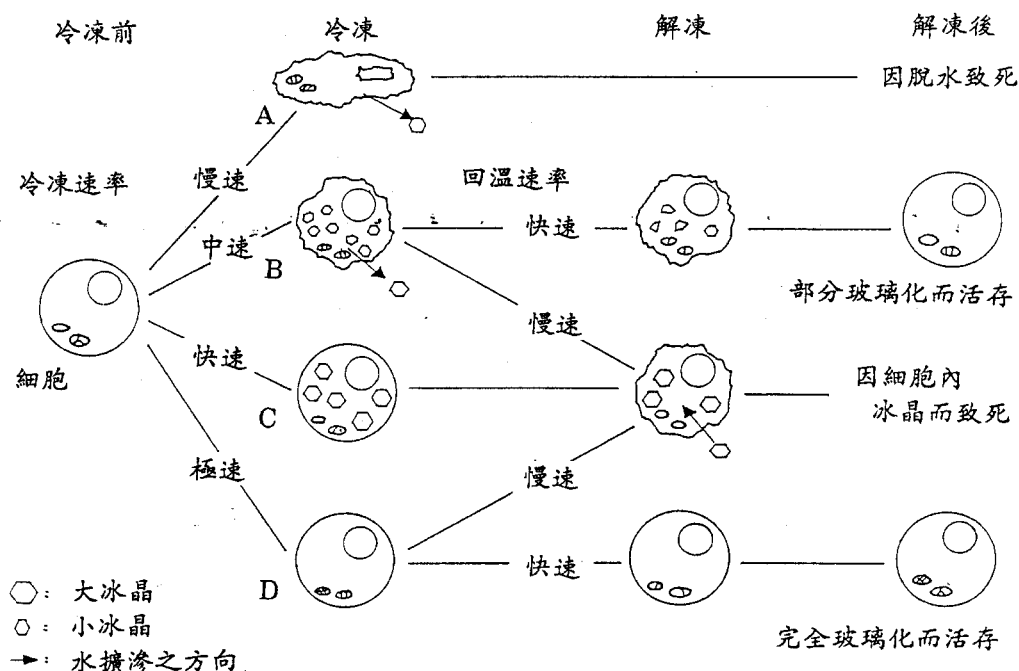
本文將就冷凍保存原理、冷凍傷害、冷凍保存魚類精液之重要影響因素，以及短期或長期保存得以成功的實例作綜合介紹。

## 二、冷凍保存生物體原理

生物質材之冷凍、解凍包含一系列複雜之動力學程序，其中熱量和在細胞及其周遭液體交換時之物理化學程序是冷凍保存中最重要的基本原理及認識，圖一示冷凍保存之基本原理：

### (一)、冷凍

細胞在水溶液中降溫時，細胞及溶液均可能降至極低溫，以至異質核在細胞外之溶液中形成。如果這是在細胞內發生，則核會藉質膜和其它未結冰細胞分開。水一旦結冰則細胞外溶液將會變得更濃，此時較慢的降溫速率，將足以讓細胞逐步失水而維持在和慢慢濃縮的細胞外溶液之滲透壓平衡之狀態；但是長時間曝露在濃縮溶液下勢將致死。



圖一 冷凍保存模式之圖解  
(Leung and Jamieson 1991)

假如降溫速率太快，水由細胞滲出成冰晶的時間不夠。細胞會藉同質或異質冰核所引發之胞內結凍而達成平衡。細胞內結冰一般認為會導致細胞的死亡，如果細胞夠小，譬如微生物，其水份會在結凍時被抽去以致形成乾燥但可活存的狀況。

平衡狀況有助活存，但必須快速降溫以便將溶液濃縮且務必提高濃度使細胞內冰量降至最少。加入某些化學物質會增加胞內冰晶及濃縮液間取得平衡之可能機會，一般稱之為冷凍保護劑或抗凍劑。

如果冷凍模式之因素已知，則可用數學模式來預測此種適當的降溫速率(Ashwood-Smith 1980, Toner and Cravalho 1986, 林1992)。所需因素包括：

- 1.細胞內溶液之黏稠度；
- 2.細胞表面積對體積比；
- 3.水經由細胞膜滲透之速度；
- 4.細胞與最近距離之冰晶間距；
- 5.細胞外溶液之黏稠度；
- 6.所添加抗凍劑之穿透力。

極快之降溫速率配上等快之解凍速率在理論上細胞較易存活。在此等條件下，細胞內冰核雖可成形，但時間不足以使其成長或由於驟冷轉變成玻璃狀而僅具有小核。遺憾的是對生物試材而言，極快速之降溫或升溫一般較不易達成，老鼠肝臟粒腺體膜就須藉助快達510-760°C / 分之降溫及解凍才可活存，談何容易。

## (二)、解凍

解凍時，物化程式正好反向進行，理論上最好是怎麼冷凍就怎麼解凍。即使採用最適降溫速率，仍然會有極少量小冰塊存在細胞內。如此一來，解凍時再結晶之現象將會發生而形成致死的細胞內冰晶。

一般藉採用快速回溫來減少再結晶的程度。但如果解凍太快，時間反而不容許脫過水的細胞吸取和降溫時所損失的同等水量。大多數種類的細胞或組織對快速解凍頗具耐受力，哺乳類胚胎則較例外。Schneider(1986)指出老鼠胚在溶質梯度變化太大時加上快速解凍往往造成細胞膜受損而不易活存。

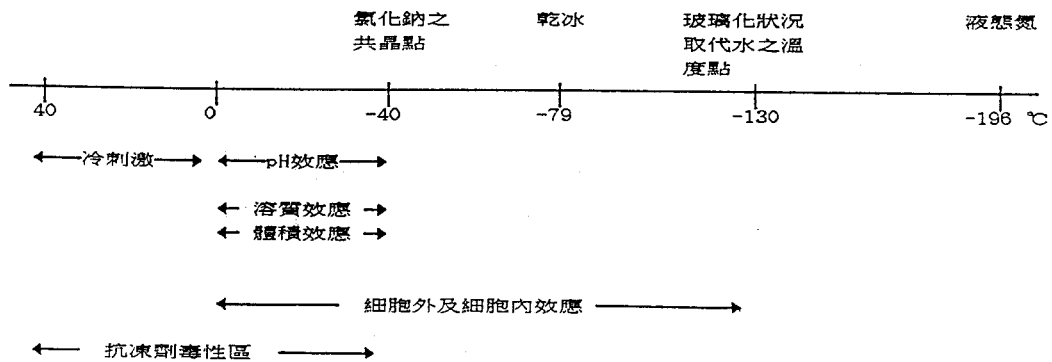
## (三)、保存

保存時應使用-130°C或更低的溫度。最常用的保存溫度是-196°C(即為液態氮的溫度)，因為液態氮是頗為方便的冷媒。在如此低的保存溫度下，生物分子停止活動，因此不能參與任何生化反應，而且在此冷凍低溫下理論上生命物質可無限期保存。然而原子層次的反應仍可在液態氮低溫下發生。其中周遭環境之輻射造成胞核之崩析因為有可能構成突變所以是超低溫冷凍保存頗受關心之事項。經由環境輻射造成之DNA傷害多半會累積，那是由於已知在-196°C下，

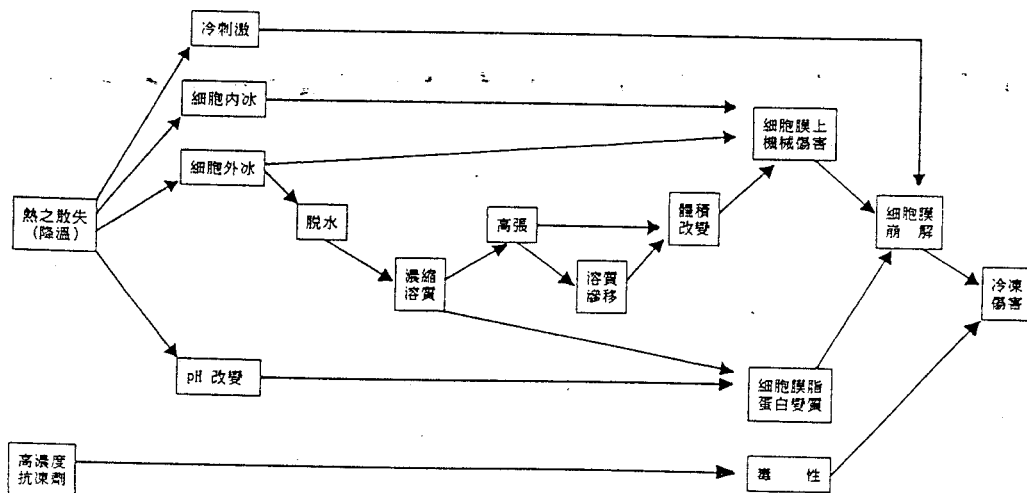
DNA修補可說是絕不可能的。還好事實上環境輻射其量微乎其微，將老鼠胚胎曝露在相當於2000年劑量之環境輻射，並未造成外表可觀察到的傷害，僅有少量之染色體異常 (Glenister and Lyon 1986)，所以超低溫冷凍保存可說是極長期間都仍然有效。

### 三、冷凍傷害

和結凍、解凍有關之傷害統稱為冷凍傷害，通常在冷凍保存程序中各溫度階段各有不同傷害 (圖二)，其中最主要及最多種傷害落在 0 至 -40°C 區間。冷凍傷害主要由於散失溫度及添加抗凍劑引起相串連的影響 (圖三)。



圖二 與溫度範圍相關之不同型冷凍傷害圖解 (Leung and Jamieson 1991)



圖三 在冷凍過程及添加抗凍劑時冷凍傷害之間互相影響之路線圖 (Leung and Jamieson 1991)

### (一)、冷刺激引起之傷害

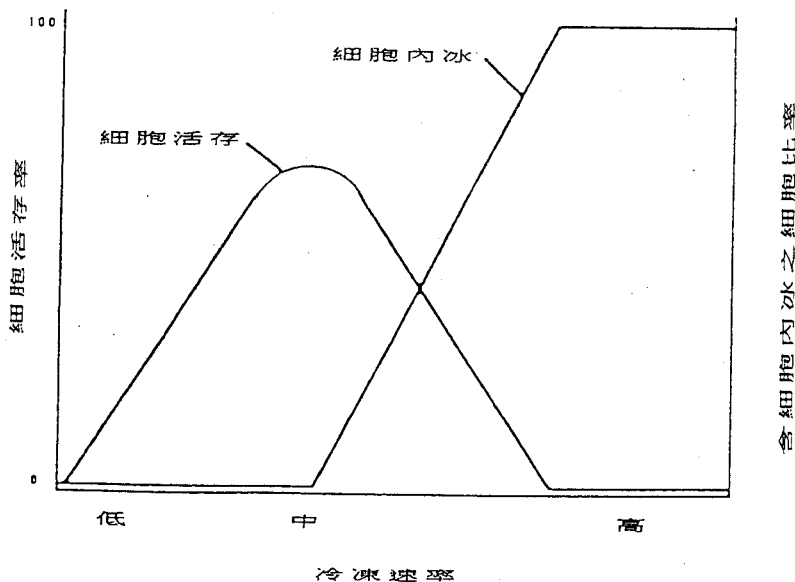
Morris and Watson (1984)在冷刺激引起的傷害之綜述中指出，開始降溫時，細胞膜脂肪由液態變成固態而造成冷刺激傷害，特別是溫度範圍在10-16°C間，又加上快速降溫。僅有低溫對有些膜脂仍不至造成固態，倒是冰晶自然形成，使脂肪脫水，結果經由單層液狀結晶而成爲膠質態。降溫時會增加膜之張力，如紅血球之溶血即爲此現象之結果。精子每每因種別之不同，在16°C以下對鈣之攝入反應不同而對冷刺激之耐受力也有所差異。

### (二)、酸鹼度之影響

生物鹽類最低熔點溫度不盡相同，大約是0~-55°C間。在此溫度內結凍及解凍破壞這些鹽類作爲緩衝液之功能及因而改變生物溶液之pH值。pH值變動係導因自結凍、磷酸鉀之存在或加入抗凍劑，一旦pH值改變超過極限時蛋白質會產生不可逆轉之變性。

### (三)、細胞內冰之影響

隨著降溫速率不同，細胞內冰有容易或不容易形成之差異（圖一）。細胞內冰之影響一般在解凍時更甚於結凍。冰晶大，傷害亦隨之增加，小冰晶在快速結凍時產生但可能不至致死；唯一旦有機會再結晶，不論在胞內或胞外都形成大而有害的大冰晶，以至造成對細胞膜構造之機械性傷害。細胞膜傷害大多易於辨認。細胞內冰之形成，細胞活存及降溫速率三者間關係圖四可以解明。



圖四 冷凍速率、細胞內冰之形成及細胞活存間關係之理論模式 (Ashwood-Smith 1986)

#### (四)、細胞外冰之影響

細胞外冰造成機械壓力及膜之傷害在極慢速之降溫模式可以充分說明之。細胞皺縮、結冰範圍擴增，由於物理性變化而導致之細胞傷害屬於此類。在一般使用之降溫速率，細胞外冰不至致死。

#### (五)、溶質之影響

冷凍過程中，隨著水結冰，細胞內外之溶液愈發濃縮。不論快或慢速之冷凍均可能產生相同之最終濃度。其中慢速冷凍使細胞暴露在高濃度之溶質太久而較易致死。濃縮溶液連帶產生之胞膜傷害可能是鹽類變性，或胞膜脂蛋白變性，或是直接產生濃縮溶液使得胞膜發生滲透障礙。

#### (六)、體積之影響

體積縮小也像濃縮溶液之滲透影響一樣，均會導至細胞膜壓力增加。溶液影響下產生之體積變化一般有些忍受力之極限，植物細胞體積縮小至40-50%就致死。哺乳類卵或胚可容忍體積作50%之縮小或200%之增大且持續30分仍不至於影響胚胎發育，但解凍後則忍受體積變化之耐力大減。

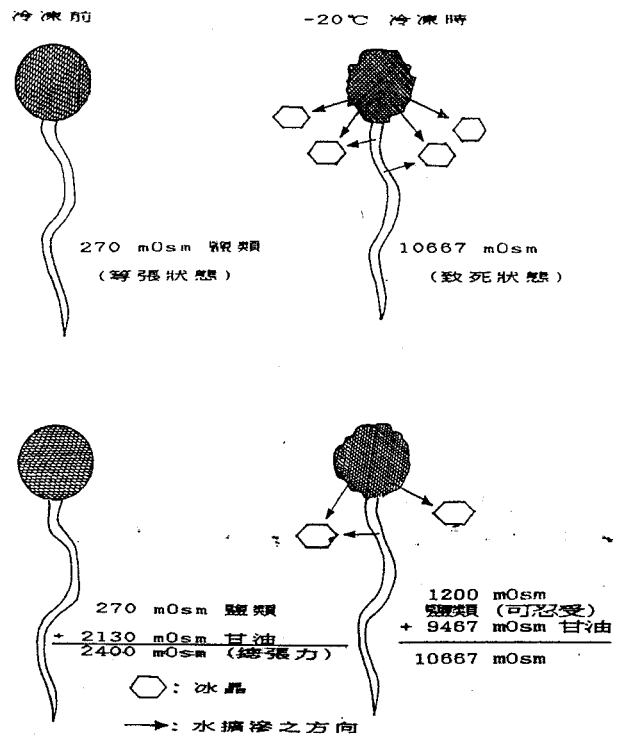
#### (七)、抗凍劑毒性

抗凍劑有助通過大多數之冷凍傷害，雖然較高濃度之抗凍劑較有效，但也因此對生物有毒。常用的數種抗凍劑都已經過實驗證實其具有毒性。譬如DMSO(Dimethyl sulphoxide)在5%濃度時有保護作用，使魚類精液在冷凍解凍後仍可維持活力長達430 sec；若增為10%或15%，則只剩300 sec，20%則更減短為250 sec。

DMSO抑制過氧化氫酵素及過氧化物之活力。ethylene glycol改變細胞膜和外界嗜水分子之分配及降低其極性，結果磷脂雙層構造脫水而導致細胞膜傷害。DMSO及polyethylene glycol複合使用更加危險、易導致膜之融合。methanol之毒性則使心跳在降溫至-30℃又回溫後不能復原。然而高濃度之DMSO加上amides可減少毒性。抗凍劑間毒性之比較今後頗值得多作對供試魚種種別性及抗凍劑複合效果之探討，其保護原理於示圖五。

### 四、保存魚類精液的重要影響因素：

一般硬骨魚類精子的頭部缺頭冠頂體，中片含數個粒線體，尾部約為頭長之20倍上下，橫切觀察時具有典型的9+2型微管構造，其醣解酵素活性很弱，大都依靠氧化代謝獲得活動所需能量。當精子在精漿中是不活動的，但能以淡水或海水之滲透或K<sup>+</sup>離子之降低激活之。精子的活動係消耗其本身所保有的能量，因此保存時，務必減少或降低精子的能量消耗，降低溫度就是有效方法之一，但牽涉之條件甚多。為論及實際應注意之各



圖五 滲透性抗凍劑有助冷凍時減低鹽類之濃度。在 $-20^{\circ}\text{C}$ 時平衡滲透壓為 $10667\text{ mOsm}$ ，若不加抗凍劑，鹽類濃度在冷凍至 $-20^{\circ}\text{C}$ 時會導致精子死亡。添加抗凍劑，則其鹽類濃度可耐受(Lovelock, 1953, *Biochimica et. Biophysica Acta* 11: 28-36.)

項影響冷凍保存精液成效之因素，特以國內各種重要經濟魚種如烏魚(*Mugil cephalus*)、黑鯛(*Acanthopagrus schlegeli*)、吳郭魚(*Oreochromis aureus*)、鯉魚(*Cyprinus capio*)及石斑(*Epinephelus malabaricus*)舉例說明。

#### (一)、種魚的年齡及採精季節

實驗證實魚體內過熟或老化的精子，在 $4^{\circ}\text{C}$ 的保存期間較短。通常在繁殖初期較不易取得成熟的卵，但確是理想的採精季節。但俟繁殖旺季一過，卵質依舊良好而此時精液卻不適合作冷凍保存之用。將建議國內數種淡水魚種適合採精的季節如下：鯉魚3~5月，吳郭魚2~7月，黑鯛12~2月，烏魚12-1月，虱目魚5、9和10月，石斑4~7月。

採精的方式除直接擠取外，亦可切碎剛死亡(10小時以內)魚的精巢泡在生理食鹽水以取得精子懸浮液。而如石斑精液量較少的魚種，可以毛細管插入生殖孔的方式取得精液。

## (二)、精液品質的維持

1. 精液收集時不宜有血液、鱗片、糞便及水的汙染或摻入。
2. 提供空氣以利收集之精液行呼吸作用及保持在最佳狀況，例如：收集瓶裝入1/3的精液，另2/3空間注入潮濕的空氣。
3. 收集時及運送途中應保持在4°C的環境中以降低其新陳代謝速率，提供隨後冷凍時之最佳品質材料。

## (三)、稀釋液(Extender)

儘管以卵黃做為稀釋液的成份可成功的保存牛的精子，但卻不見得適用於魚類精液的保存。在現場及實驗室中發現以0.5%的glucose或honey (溶於生理食鹽水中)可成功地保存虱目魚及黑鯛的精液。吳郭魚精液因具黏性，所以以牛奶、甲醇及生理食鹽水組成的稀釋液可作為其理想的冷凍介質，鯉魚精液稀釋液則添加尿素為佳。

表一所列為本實驗室提供參考之數種國內魚種精液用稀釋液的組成。

另外，以15% Menez B2 Medium INRA加入Glucose和生理食鹽水溶液中，可明顯增進冷凍前、後的石斑魚精子活力。

各魚種其精液稀釋比例(精液：稀釋液)建議如下：吳郭魚、黑鯛、烏魚為1：1，鯉魚1：3，虱目魚1：4，石斑1：20。

## (四)、抗凍劑(Cryoprotective Agents, CPAs)

低溫保存時不必添加抗凍劑，但冷凍保存時，則非藉助抗凍劑之保護無以竟其功。抗凍劑具有提供不安定酵素冷凍保護、在非冷凍水溶液中穩定蛋白質的作用。許多化學物質都可作為抗凍劑，但在我們的研究中，主要使用ethylene glycerol、methanol和DMSO此三種藥品作為抗凍劑。

抗凍劑在高溫時會使蛋白質變性，因此對細胞具有毒性，然而高濃度的抗凍劑可抑止冰晶的形成，減少冷凍及解凍時對細胞的傷害。在沒有抗凍劑的情形下，只有極少數的精子在冷凍後能存活下來，但加入冷凍劑後便可大幅增加其忍受範圍。在黑鯛、烏魚精液加入5-15% glycerol，吳郭魚加入15%牛奶和5% methanol，鯉魚、虱目魚、石斑加入10% DMSO都可有效保有其精子的活力及受精率(表二)。

許多研究者指出使用3.3~15%(v/v) glycerol或DMSO為最適用於精液冷凍的抗凍劑，而過高的濃度(20%以上)容易刺激RNA的合成。國內實驗時發現methanol只適用在吳郭魚的精液冷凍保存上。

## (五)、平衡時間(Equilibrium time)

精液儲存在0°C以上一段時間，會使得精子的細胞膜變厚，可增加對冷凍及解凍時的抵抗力，在我們的研究中，精子在glycerol或DMSO中不需很久時間即可讓具穿透性之抗凍劑進入細胞內而達到平衡。

表一 Composition of several diluents (extenders) (g/l).

| Kind                   | NaCl | KCl  | CaCl <sub>2</sub> | MgCl <sub>2</sub> | NaHCO <sub>3</sub> | Taps    | Caps    | Glucose | Yolk | Honey | Milk   | Species                  |
|------------------------|------|------|-------------------|-------------------|--------------------|---------|---------|---------|------|-------|--------|--------------------------|
| Marine fish ringer     | 13.5 | 0.60 | 0.25              | 0.35              | 0.2                | -       | -       | -       | -    | -     | -      | marine fish              |
| Freshwater fish ringer | 7.5  | 0.2  | 0.20              | -                 | 0.2                | -       | -       | -       | -    | -     | -      | freshwater fish          |
| Taps                   | 2.9  | 3.20 | 0.07              | 0.03              | -                  | 15 mmol | -       | -       | -    | -     | -      | tilapia                  |
| Caps                   | 2.9  | 3.20 | 0.07              | 0.03              | -                  | -       | 15 mmol | -       | -    | -     | -      | tilapia                  |
| Milk in ringer         | 7.5  | 0.20 | 0.20              | -                 | 0.2                | -       | -       | -       | -    | -     | 150 ml | tilapia                  |
| V <sub>2e</sub>        | 7.5  | 0.38 | -                 | -                 | 2.0                | -       | -       | 1.0     | 0.2  | -     | -      | tilapia                  |
| V <sub>2f</sub>        | 7.5  | -    | -                 | -                 | 2.0                | -       | -       | 1.0     | 0.2  | -     | -      | tilapia                  |
| Honey in ringer        | 13.5 | 0.60 | 0.60              | 0.35              | 0.2                | -       | -       | -       | -    | 10 ml | -      | black porgy;<br>milkfish |

表二 Composition of cryopreservation procedures of fish sperm.

| Species           | Extender                       | Cryoprotective agents | Dilution ratio | Equilibration time (min) | Freezing medium                                                                                                                                                   |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grey mullet       | Glu-Mar*                       | 10% Gly; 10% DMSO     | 1:1            | 15, 30 or 45             | LN vapor followed by LN                                                                                                                                           |
| Black porgy       | Glu-Mar                        | 20% Gly               | 1:1            | 10                       | Dry ice + isopropanol at $-10^{\circ}\text{C}$ followed by $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ or LN vapor at $-100^{\circ}\text{C}$ for 10 min followed by LN         |
| Grouper           | Glu-Mar                        | 10% DMSO              | 1:20           | 10                       | Dry ice + isopropanol at $-20^{\circ}\text{C}$ for 5 min followed by $-70^{\circ}\text{C}$ and LN; LN vapor at $-100^{\circ}\text{C}$ for 5-10 min followed by LN |
| Tilapia           | Milk in freshwater fish saline | 5% Methanol           | 1:1            | 0                        | Dry ice + isopropanol at $-35^{\circ}\text{C}$ followed by $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then LN                                                             |
| Milkfish          | Milkfish serum/honey           | 10% DMSO              | 1:4            | 10                       | LN vapor followed by LN                                                                                                                                           |
| Spine foot fish   | Glu-mar                        | 10% Methanol          | 1:1            | 10                       |                                                                                                                                                                   |
| Ayu               | V <sub>2</sub> f               | 10% DMSO              | 1:1            | 5                        |                                                                                                                                                                   |
| Japanese sea bass | Glu-mar                        | 20% Gly               | 1:1            | 10                       |                                                                                                                                                                   |

\*Glu-mar; Glucose in marine fish saline

魚類精子在glycerol或DMSO中經一段平衡時間，例如烏魚不宜超過一個小時，吳郭魚、黑鯛、石斑不超過10分鐘，時間能縮短至3分鐘以內，其活力和細胞形狀不變且在冷凍前後均可有良好的受精率。

#### (六)、冷凍速率(Freezing rate)

冷凍速率在冷凍保存過程中具有重大的決定性。當冷凍速率太快，則會形成細胞內冰晶，為防止細胞內冰晶形成，則必須調適冷凍速率。某些種類的魚類精液在某些抗凍劑中會形成一重要的零下溫度帶(subzero temperature zone)，在這範圍內，細胞會增加溶質的濃度，因此，必須儘快地通過此一溫度帶。但是，也必須使其有足夠的時間讓細胞去除水分，以避免冰晶形成。

冷凍方式除可直接由室溫經一中間溫，再投入液態氮中保存外，亦可用分段降溫方式來進行。烏魚、黑鯛、石斑以兩段降溫方式來操作，首先降溫至 $-100^{\circ}\text{C}$ ，再降至 $-196^{\circ}\text{C}$ ，鯉魚則以 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率，從 $2^{\circ}\text{C}$ 降至 $-7^{\circ}\text{C}$ ，再以 $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率，從 $-7^{\circ}\text{C}$ 降至 $-70^{\circ}\text{C}$ 。而吳郭魚則以 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降至 $-35^{\circ}\text{C}$ ，再以 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率，從 $-35^{\circ}\text{C}$ 降至 $-75^{\circ}\text{C}$ ，最後均入液態氮之 $-196^{\circ}\text{C}$ 。

#### (七)、冷凍設備(Freezing facilities)

冷凍保存過程中可選擇的設備有：

1. 抽風櫃：可藉抽風之快慢使櫃底液態氮揮發成氣體之量增減而控制冷凍速率。
2. 生物冷凍器BF5(Biological freezer BF5)：裝置在液態氮桶中可調整與液態氮液面的距離。
3. 保溫桶或杯：在異丙醇或乙醇內逐步依時適量加入乾冰，亦可達成粗略的降溫模式。
4. 可程式冷凍儀(Programmable freezer)：可事先設定冷凍速率步驟快慢有別之多程式降溫，因為由微電腦控制電磁閥之開啓，十分精確且再現性高。
5. 保麗龍盒(Styrofoam box)：加入液態氮並放入一PE網片，使其距液態氮面2公分，然後將裝有精液之麥管放在網上，蓋上盒蓋，將其溫度維持在 $-90^{\circ}\text{C}\sim-100^{\circ}\text{C}$ ，此乃方便、有效且花費少的方法，本研究小組並已成功地運用在烏魚、黑鯛、石斑的精液冷凍保存上。

#### (八)、解凍速率(Thawing rate)

一般而言，將已冷凍之麥管投入室溫水中解凍，對於精子的存活並無很大的影響。以吳郭魚為例，30公升的水在 $25\sim 29^{\circ}\text{C}$ ，30秒即可使0.5ml麥管內精液完成解凍。另外亦可利用微波爐解凍，0.5ml淺色

質軟的麥管，以40%功率解凍30~35秒，而深色質硬的麥管需解凍70秒。

#### (九)、活力鑑定(Motility determination)

不論低溫或冷凍保存之精液，在提供使用之前均需鑑定其活力。一般利用顯微鏡來鑑定精子的活力。表三所列為傳統的鑑定標準，依精子活力由不動、非常微弱、微弱、中等、強烈到非常強烈共可區分為0~5等級(表三)。因海水魚的新鮮精液一般可達5，而淡水魚只可達2或3，所以游動的精子數目的比例有時也可作為輔佐判定的標準。

最近，有一種應用於醫學上的活力分析儀(Motility analyzer)，亦可用於精子的活力分析，它除可分析精子的游走及前進速度外，亦可計算出精子的總數、濃度及具不同活動力精子之分類及所佔比率，對於評比冷凍前、中、後及保存不同期間之精子活力，頗具客觀性。

#### (十)、受精率評估(Fertility evaluation)

保存後之精液在受精時間點在於很難決定所需精、卵的最適比例，但仍需多加探討，以吳郭魚為例，事先依50精液：15牛奶：10 methanol：25海水混合的冷凍精液，其0.3：1和0.4：1(ml：g)之精、卵比例皆可得到超過90%的受精率。而石斑，其0.01~0.08：1(ml：g)之精、卵比例可得到超過80%的受精率，相對於對照組的92%。

## 五、在0°C或近乎0°C之短期保存

不少研究短期保存者皆係以鮭鱒類精子為對象；如虹鱒(*Salmo gairdneri*)之精液已可保存在0°C上下達一個月(Stoss and Holtz 1983a)。Moore(1987)將鼓眼魚(*Stizostedion vitreum vitreum*)精液以四種含有DMSO及其他成份之稀釋液處理並保存在0°C，以32.1或21.1°C水浴解凍，最高可得83.2%受精率(對照之新鮮精液96.6%)。影響短期保存之成功率有下列因素：

#### (一)、保存溫度：

溫度影響低溫保存時之細胞新陳代謝至鉅。Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*精液保存在3~15°C可得90%至50%受精率。對冷水性魚種，精子在短期保存時結凍點以上之低溫均不至致死。因此不少短期保存均採用0°C。虹鱒精液在4°C又充氧狀況下，保存5天之後完全和新鮮精液一般好，甚至14天仍得高成效(Billard 1981)。另外大西洋鮭(*Salmo salar*)，以2mm厚精液樣品在0°C充氧狀況下再加125 µg streptomycin/ml可保存10天，6天時授精力仍達100%(Stoss and Refstie 1983)。對溫水性魚種而言，0°C以上有一適溫可供保存精液。吳郭魚中之*Sarotherodon mossambicus*精液在0°C時的

表三 Categorization of fish sperm motility under microscope reading (after Guest *et al.*, 1976).

|         | Value        | Observation                                                                               |
|---------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Maximum | 5/ + + + + + | All sperm moving vigorously; almost impossible to fix vision on any one spermatozoa       |
|         | 4/ + + + + + | Some sperm moving slowly enough to see easily; most still whirling or swimming vigorously |
|         | 3/ + + + +   | Some sperm still; some sperm slowly swimming; some fast                                   |
|         | 2/ + + +     | Very few fast swimmer; many still; some slow "lazy-looking" sperm.                        |
|         | 1/ +         | Only one or two sperm swimming in each field                                              |
| Minimum | 0/ -         | No sperm moving; Brownian movement the only detectable motion                             |

活力比5°C更急遽下降。但若以egg yolk-citrate稀釋液作1:1稀釋可助延長活力至18天(Harvey and Kelley 1984)。本文作者在黑鯛精液短期保存時，若將樣品瓶放在4°C水浴比直接放在冰箱中之4°C空氣中為佳，可維持至10天(Chao et al., 1986)。

#### (二)、氣體交換：

一般精子可行有氧新陳代謝，保存期間有氧供應呼吸作用時，精子授精力可能延長。Billard (1981)指出虹鱒精液保存5天頗成功之例，即因為在有氧狀況下大有助益。若有penicillin及streptomycine，再加上經常以純氧送入保存桶，可延長至34天(Stoss and Holtz 1983a)。一般言之，氧氣對精比卵重要，在偏高溫比低溫之冷凍保存時氧氣也較為重要。

#### (三)、稀釋液和配子活力抑制的關係

短期保存最重視抑制精子活力的對策，否則其授精力很快就降低。精子在精漿內最穩定可不必稀釋，必須稀釋時可參考Scott and Baynes(1980)之綜述。

對某些魚種之精液，稀釋是必要的。因為在擠精時其活力上升，短期保存所使用之低溫不足以抑制其活力，所以一般建議以稀釋液補充保存期間所需之能量。石斑精液加鹽類溶液及10% DMSO有助在5~10°C之短期保存(Withler and Lim 1982)。吳郭魚精液則藉含有glucose, glycine及sucrose之稀釋液，而使保存期由5天延至18天(Harvey and Kelley 1984)。

#### (四)、抗生素

因為一般處理步驟難免有細菌、黴菌之污染，抗生素之使用對低溫保存有效。如大西洋鮭類精液不加或加penicillin及streptomycine，其授精力在未降低至0%前的時效分別為6天及24天，顯然大有差別(Stoss and Refstie 1983)。鼓眼魚精液加ampicillin可冷藏在1°C達14天，不同含量有不同效果，180  $\mu\text{g}$  ampicillin / ml得90.8%之受精率，3,325  $\mu\text{g}$  ampicillin / ml得86.4%，而新鮮精液則為93.2% (Moore 1987)。

## 六、長期超低溫冷凍保存

#### (一)、受精率與保存時間的關係

魚類精液使用超低溫冷凍保存方式已證明可作近乎無限期的保存。Steyn and Van Vuren (1987)在鯰魚*Clarias gariepinus*之實驗以0.3ml精 / 20ml卵(約7600個卵)證實，冷凍保存14天達51%，16個月難免又降低至41%。國內經濟魚種之一黑鯛精液經保存後，其授精力亦隨時間有降低之趨勢。1、7、7及342天者各為99.0、93.2、91.9及

91.5% (Chao et al. 1986)。目前常質疑的是因時間拉長而降低之受精率是因爲精子真的已漸漸喪失授精力，還是所使用供受精之卵的品質有所差異，迄今未有定論。

## (二)、冷水性魚類的精液保存研究現況

鮭、鱒魚方面精液冷凍保存成功之例甚多 (Mounib 1978, Stoss and Holtz 1981, 1983 a, b, Stoss and Refstie 1983, Harvey 1983)，無法一一詳述；僅列舉數例以和國內魚種相關研究比較之。

太平洋鮭及海鱒 (*Salmo trutta*) 以簡單之稀釋液 (0.3 M glucose + 10% DMSO) 很成功地冷凍保存其精液，前者得 36.0-91.3% 發眼卵，後者 38.4-54.8% 發眼卵 (Stoss and Refstie 1983)。

Erdahl and Graham (1980)，將 brown trout (*Salmo trutta fario*)，虹鱒精液冷凍保存在  $-79^{\circ}\text{C}$  及  $-196^{\circ}\text{C}$ ，均得到大於 80% 之受精率。Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) 則得到平均 54% (範圍在 3-98%) 之受精率。

Stoss and Holtz (1983 b) 以極短平衡時間 (1 分) 及 10-20% DMSO 處理虹鱒精液得 77%，使用  $\text{NaHCO}_3$  當解凍液，滲透壓 249 mOsm 時，得到 85% 之受精率，365 mOsm 時得 61% 受精率。比同作者 Stoss and Holtz (1981) 早先比較解凍液中卵腔液 119 mmol  $\text{NaHCO}_3$  及 120 mmol  $\text{NaCl}$  效果時所得 78.9, 75.3 及 60.0% 受精率有些許進步。同時也得知此一魚種之冷凍精液若要得到滿意的受精率，至少應維持  $3 \times 10^6$  精 / 卵之精卵比。世界各地近來有更多種類冷水性魚類之精液冷凍保存成功之例，可參見 Leung and Jamieson (1991) 之綜述報告。

## (三)、溫水性魚類的精液保存研究現況

鯉魚精液取材容易，所以在很多國家均進行冷凍保存實驗，目前較佳的方法是以 10% DMSO 爲抗凍劑，採  $5^{\circ}\text{C} / \text{min}$  由  $2^{\circ}\text{C}$  降至  $-7^{\circ}\text{C}$ ，再以  $25^{\circ}\text{C} / \text{min}$  續降至  $-70^{\circ}\text{C}$ 。可得 80% 之活力及 40% 之受精率 (Cognie et al. 1989)。近年中國大陸上將草、鱧、鱖、鯪四種淡水魚精液在液態氮中保存 60-90 天後，分別獲得 44.2, 32.6, 16.5, 及 31.0% 的受精率 (陳、劉, 1991)。國內四種重要經濟魚類：烏魚、黑鯛、吳郭魚及石斑之精液經多年研究，已能成功地冷凍保存在  $-196^{\circ}\text{C}$ ，並有令人滿意的結果，各魚種最高受精率分別爲 64.9, 99.0, 93.4 及 95.7% (Chao 1983, Chao et al. 1975 1986 1987 and 1992) 例如表四至表七，其中尤以石斑精液迭有佳績，因係變性種魚，四、五齡的雄性種魚不易培養，而且平均每尾擠得到的精液量僅數毫升，民間繁殖場因此藉助精子銀行而大有收獲，迄今推廣戶已達十四家，被譽爲近年來國際間首見魚類精液冷凍保存技術由實驗規模推廣至民間繁殖場實際運用的成功例子。以往配合開發技術之產官學各界，今後自應繼續

表四 Results of fertility tests using cryopreserved and fresh grey mullet sperm to fertilize fresh eggs of same female in each test.

| Test No.<br>Year | Sperm preserved duration<br>(days) | Cryoprotective agents    | F.R.<br>% | H.R.<br>% | Remarks              |
|------------------|------------------------------------|--------------------------|-----------|-----------|----------------------|
| I<br>1972        | 39                                 | 5% glucose + 5% glycerol | 15.6      | 61.3      | in 3 liters          |
|                  | 39                                 | 5% glucose + 5% DMSO     | 2.9       | 55.0      | in 3 liters          |
|                  | 0                                  |                          | 11.4      | 50.3      | in 3 liters, control |
| II<br>1981       | 11                                 | 5% glucose + 10% DMSO    | 28.6      | 62.2      | in 3 liters          |
|                  | 11                                 | 5% glucose + 10% DMSO    | 7.6       | 42.7      | in 3 liters          |
|                  | 0                                  |                          | 45.2      | 100.0     | in 3 liters, control |
| III<br>1983      | 351                                | 5% glucose + 10% DMSO    | 38.2      | 92.0      | in 3 liters          |
|                  | 0                                  |                          | 35.8      | 93.5      | in 3 liters, control |

表五 Results of fertility tests using cryopreserved and fresh black porgy sperm to fertilize fresh eggs.

| Test No.<br>(Year, month, day) | Sperm source | Sperm preserved duration<br>(days) | Sperm volume<br>(ml) | Egg weight<br>(g) | Fertility<br>(%) | Remark                                      |
|--------------------------------|--------------|------------------------------------|----------------------|-------------------|------------------|---------------------------------------------|
| I<br>(1984, Dec. 7)            | F            | 0                                  | 1:4                  |                   | 96.0             |                                             |
|                                | P            | 342                                | 5:5                  |                   | 91.5             |                                             |
|                                | P            | 692                                | 2:5                  |                   | 5.9              |                                             |
| II<br>(1985, Jan. 12)          | F            | 0                                  | 2:10                 |                   | 3.3              |                                             |
|                                | P            | 718                                | 1:1.3                |                   | 23.8             |                                             |
| III<br>(1985, Feb. 6)          | F            | 0                                  | 5:25                 |                   | 62.3             |                                             |
|                                | P            | 34                                 | 7:25                 |                   | 77.4             |                                             |
|                                | P            | 3                                  | 6:25                 |                   | 60.0             |                                             |
| IV<br>(1985, Feb. 8)           | F            | 0                                  | 5:25                 |                   | 62.3             |                                             |
|                                | P            | 1                                  | 9:25                 |                   | 99.0             |                                             |
| V<br>(1985, Feb. 13)           | F            | 0                                  | -                    |                   | 84.5             | Fertilization done by<br>farmer at midnight |
|                                | P            | 6                                  | -                    |                   | 71.4             |                                             |
| VI<br>(1985, Feb. 14)          | F            | 0                                  | 6:30                 |                   | 30.7             |                                             |
|                                | P            | 7                                  | 5:30                 |                   | 91.9             |                                             |
|                                | P            | 7                                  | 10:30                |                   | 93.2             |                                             |
|                                | P            | 7                                  | 5:30                 |                   | 53.9             |                                             |
|                                | P            | 7                                  | 10:30                |                   | 42.9             |                                             |

F = fresh sperm; P = cryopreserved sperm

表六 Results of fertility tests using cryopreserved and fresh tilapia sperm to fertilize fresh eggs of same female in each test.

| Test No.<br>Date           | Species                                | Sperm | Preserved duration (days) | Egg                 | F.R.<br>% | H.R.<br>% | Remark  |
|----------------------------|----------------------------------------|-------|---------------------------|---------------------|-----------|-----------|---------|
| I<br>16 July 1983          | <i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i> |       | 22                        | <i>O. hornorum</i>  | 72.7      | 100       |         |
|                            | <i>O. hornorum</i>                     |       | 0                         | <i>O. hornorum</i>  | 85.7      | 100       | control |
| II<br>12 September<br>1984 | <i>O. sp.</i>                          |       | 32                        | <i>O. sp.</i>       | 75.5      | —         |         |
|                            | <i>O. sp.</i>                          |       | 0                         | <i>O. sp.</i>       | 80.2      | —         | control |
| III<br>8 July 1985         | <i>O. sp.</i>                          |       | 304                       | <i>O. sp.</i>       | 79.3      | 100       |         |
|                            | <i>O. sp.</i>                          |       | 304                       | <i>O. sp.</i>       | 87.1      | 100       |         |
|                            | <i>O. sp.</i>                          |       | 304                       | <i>O. sp.</i>       | 93.4      | 100       |         |
|                            | <i>O. sp.</i>                          |       | 304                       | <i>O. sp.</i>       | 90.1      | 100       |         |
|                            | <i>O. sp.</i>                          |       | 304                       | <i>O. sp.</i>       | 81.5      | 100       |         |
|                            | <i>O. sp.</i>                          |       | 304                       | <i>O. sp.</i>       | 90.0      | 100       | control |
| IV<br>17 July 1985         | <i>O. niloticus</i>                    |       | 592                       | <i>O. niloticus</i> | 90.2      | 97        |         |
|                            | <i>O. niloticus</i>                    |       | 0                         | <i>O. niloticus</i> | 94.6      | 95        | control |
| V<br>25 July 1985          | <i>O. sp.</i>                          |       | 455                       | <i>O. sp.</i>       | 30.0      | 100       |         |
|                            | <i>O. aureus</i>                       |       | 8                         | <i>O. sp.</i>       | 90.5      | 100       |         |
|                            | <i>O. niloticus</i>                    |       | 8                         | <i>O. sp.</i>       | 88.2      | 100       |         |
|                            | <i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i> |       | 335                       | <i>O. sp.</i>       | 75.8      | 92        |         |
| <i>O. sp.</i>              |                                        | 0     | <i>O. sp.</i>             | 50.0                | 90        | control   |         |

表七 Results of fertility tests using cryopreserved and fresh grouper sperm to fertilize fresh eggs of same female in each test.

| Test No.<br>Date<br>Time        | Sperm                        |                | Eggs<br>(g) | F.R.<br>(%) | Milt source<br>and remarks |
|---------------------------------|------------------------------|----------------|-------------|-------------|----------------------------|
|                                 | Preserved duration<br>(days) | Volume<br>(ml) |             |             |                            |
| I<br>26 August 1990<br>1700 h   | 1                            | 1.0            | 3           | 83.33       | male 1                     |
|                                 | 1                            | 0.5            | 3           | 67.39       | male 1                     |
|                                 | 1                            | 1.0            | 3           | 93.02       | male 1                     |
|                                 | 1                            | 0.5            | 3           | 8.60        | male 1                     |
|                                 | 17                           | 1.0            | 3           | 79.62       | male 2                     |
|                                 | 17                           | 0.5            | 3           | 85.00       | male 2                     |
|                                 | 128                          | 1.0            | 3           | 14.55       | male 3                     |
|                                 | 128                          | 0.5            | 3           | 12.12       | male 3                     |
|                                 | 0                            | 1.0            | 3           | 65.58       | control                    |
|                                 | 0                            | 0.5            | 300         | 80.95       | control <sup>1</sup>       |
| II<br>26 August 1990<br>1830 h  | 1                            | 1.0            | 3           | 80.00       | male 1                     |
|                                 | 1                            | 0.5            | 3           | 70.00       | male 1                     |
|                                 | 1                            | 1.0            | 3           | 60.71       | male 1                     |
|                                 | 1                            | 0.5            | 3           | 96.72       | male 1                     |
|                                 | 0                            | 0.1            | 3           | 91.76       | control                    |
| III<br>26 August 1990<br>1830 h | 17                           | 2.5            | 15          | 83.61       | male 2 <sup>2</sup>        |
|                                 | 1                            | 1.5            | 9           | 91.43       | male 1 <sup>3</sup>        |
|                                 | 0                            | 0.1            | 3           | 91.76       | control                    |
| IV<br>26 August 1990<br>1830 h  | 1                            | 0.5            | 30          | 8.26        | male 1 <sup>3</sup>        |
|                                 | 1                            | 0.5            | 60          | 0.00        | male 1 <sup>3</sup>        |
|                                 | 1                            | 0.5            | 120         | 1.57        | male 1 <sup>3</sup>        |
|                                 | 1                            | 0.5            | 180         | 0.00        | male 1 <sup>3</sup>        |
|                                 | 1                            | 0.5            | 240         | 3.07        | male 1 <sup>3</sup>        |
|                                 | 0                            | 0.1            | 30          | 10.42       | control                    |
|                                 | 41                           | 4.0            | 450         | 95.00       | male 4 <sup>1</sup>        |
| V<br>30 May 1991                | 278                          | 3.0            | 200         | 95.00       | male 5 <sup>1</sup>        |

continued...

表七 ...continuation

| Test No.<br>Date<br>Time     | Sperm                        |                | Eggs<br>(g) | F.R.<br>(%) | Milt source<br>and remarks |
|------------------------------|------------------------------|----------------|-------------|-------------|----------------------------|
|                              | Preserved duration<br>(days) | Volume<br>(ml) |             |             |                            |
| VI<br>12 June 1991<br>1700 h | .54                          | 0.01           | 3           | 21.99       | male 4                     |
|                              | .54                          | 0.02           | 3           | 48.75       | male 4                     |
|                              | .54                          | 0.03           | 3           | 47.70       | male 4                     |
|                              | .54                          | 0.04           | 3           | 69.30       | male 4                     |
|                              | .54                          | 0.05           | 3           | 78.60       | male 4                     |
|                              | .54                          | 0.10           | 3           | 82.03       | male 4                     |
|                              | .54                          | 0.15           | 3           | 86.24       | male 4                     |
|                              | .54                          | 0.20           | 3           | 83.55       | male 4                     |
|                              | .54                          | 0.25           | 3           | 82.95       | male 4                     |
| VII<br>12 June 1991          | 291                          | 0.01           | 3           | 49.54       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.02           | 3           | 68.80       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.03           | 3           | 67.48       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.04           | 3           | 62.14       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.05           | 3           | 69.22       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.10           | 3           | 64.60       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.15           | 3           | 72.54       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.20           | 3           | 61.50       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.25           | 3           | 78.68       | male 5                     |
|                              | 291                          | 0.04           | 3           | 91.92       | male 5                     |

1. Mass fertilization done by aquafarmer in large-scale tank.

2. Medium scale using frozen-thawed sperm.

3. Trail to increase egg volume to be fertilized by frozen-thawed sperm resulted in poor fertility due to poor quality of eggs.

戮力合作，希能再創佳績，落實生物技術在水產養殖上的應用。

## 七、展 望

低溫可以保存生命是近數十年的新興研究方向，而且已在醫學、微生物、農業等方面開始運用。水產生物配子的低溫或冷凍保存有助繁殖和種源庫的方便性及胚胎學和低溫生物學的實質發展，均已逐漸為科學家一一證明。今後繼續厚植有關之理論基礎，改善其技術細節，開拓其應用範圍，預期國內魚貝介類配子之保存及低溫生物學之研究的未來展望如下：

### (一)、對水產業界而言

利用精液冷凍保存技術，協助繁殖業者建立重要經濟魚貝介類精液之長期供需管道。如此一來，進行自種人工繁殖時，所遭遇雄魚精液欠缺，種魚成熟時段甚或季節不一致等問題，或進行異種雜交或引進野外強勢基因之要求皆可迎刃而解。同時減少蓄養雄種魚之人力，空間與經費，對水產繁殖場不啻是降低生產成本之良策。

### (二)、對研究單位而言

在魚類遺傳育種研究方面，擴大各種組合的選擇範圍；提供性狀完全相同，已確知受精力之多批次精液，以確保實驗設計之起始點一致；至於在魚類雌核生殖預先經適量紫外線照射過之精液或獲得變性後假雌魚之精液，均可以適當低溫或冷凍法加以保存，以發揮生物技術連線作用。

### (三)、對水產生物種原庫而言

可藉由保存水產生物之精子、卵子或胚胎，有計畫的保有我國固有水產生物之種原，以長期冷凍保存法確保珍貴及多樣化基因資產，採最經濟方法防止其流失。從選種觀點來看，本土水產種原之種種特質已符合國人需要，將之融入今後之水產生物體系，更可強化其利點。

### (四)、對低溫生物學之資訊與人力而言

目前國內有關低溫生物學之基礎並不厚實，正需要借重各不同研究方向獲得之點滴資訊加以累積，水產生物具有種別豐富，配子數量多，生活史短，實驗操作易等優點，近來以之作爲實驗動物之模式已漸受矚目，因此可以繼續提供研究心得，以促進低溫生物學加速發展，同時培訓相關之基礎與實際之低溫生物研究人力。未來發揮低溫生物學之潛力應是無可限量。

## 謝 辭

國內精液冷凍保存研究早期承本所公務預算及國科會專題研究補助款之助，奠下基礎。近年則在農委會77-7.1-漁-06 (5)、78-7.1-漁-06 (4)、80農建-7.1-糧-121 (77)、81農建-12.1-糧-67 (58)、82科技-1.1-糧-56 (67-1)補助下繼續擴增研究對象魚種，改善並簡化步驟，推廣及輔導繁殖業者使用此項技術，特此誌之，並申謝忱。本稿撰寫時許紅玉、張淑敏、朱益中協助打字、畫圖及編排，有助提早完成，一併在此誌謝。

## 參考文獻

- Ashwood-Smith MJ. 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. *In* Low temperature preservation in medicine and biology (MJ Ashwood-Smith and J. Farrant, eds) 19-44. Pitman Medical, Tunbridge Wells.
- Billard R. 1978. Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. *Actes de Colloques du Centre Nationale de l'Exploitation des Oceans (CNEXO)* 8, 59-73.
- Billard R. 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 23: 287-293.
- Chao NH. 1983. New approaches for cryopreservation of sperm of grey mullet, *Mugil cephalus*. *In* Proceedings of the International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Wageningen, The Netherlands, August 1982. (HJTh Goos, JJ Richter, eds) 132-133. Pudoc, Wageningen.
- Chao NH. 1991. Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology and advancement and extension efforts. *Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica, Monograph* 16: 263-283.
- Chao NH, Chen HP, Liao IC. 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture*, 5: 389-406.
- Chao NH, Chao WC, Liu KC, Liao IC. 1986. The biological properties of black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) sperm and its cryopreservation. *Proc. Natl. Sci. Council. B. ROC* 10(2): 145-149.
- Chao NH, Chao WC, Liu KC, Liao IC. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.* 30: 107-118.
- Chao NH, Tsai HP, Liao IC. 1992. Short- and Long- term Cryopreservation

- of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). Asian Fish. Sci. 5: 103-116.
- Cognie PF, Billard R, Chao NH. 1989. La cryoconservation de la laitance de la carpe, *Cyprinus carpio*. J. Appl. Ichthyol. 5: 165-176. (In French with English summary).
- Erdahl DA, Graham EF. 1980. Preservation of gametes of freshwater fish. 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Madrid. 2: 317-326.
- Glenister PH, Lyon MF. 1986. Long term storage of eight-cell mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$ . J. in Vitro Fert. Embr. Transf. 3: 20-27.
- Graham EF, Schmel ML, Deyo RCM. 1984. Cryopreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa. In Proceedings of the Tenth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, Milwaukee, Apr. 1984, 4-29.
- Harvey B. 1983. Cryobiology and the storage of teleost gametes. In Proceedings of the International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Wageningen, The Netherlands, August 1982. (HJ Th Goos and JJ Richter, eds) 123-127. Pudoc, Wageningen.
- Harvey B, Kelley RN. 1984. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. Aquaculture 36: 85-95.
- Leung LKP, Jamieson BGM. 1991. Live preservation of fish gametes. In Fish Evolution and Systematics: Evidence from spermatozoa. (BGM Jamieson, ed.) Cambridge University Press, Cambridge. 245-269.
- Moore AA. 1987. Short-term storage and cryopreservation of Walleye semen. The Prog. Fish-Cult. 49: 40-43.
- Morris GJ, Watson PF. 1984. Cold shock injure-a comprehensive bibliography. Cryoletters 5: 352-372.
- Mounib MS. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. J. Repro. and Ferti. 53: 13-18.
- Schneider U. 1986. Cryobiological principles of embryo freezing. Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 3, 3-9.
- Scott AP, Baynes SM. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. J. Fish Bio. 17: 707-739.
- Steyn GJ, Van Vuren JHJ. 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. Aquaculture 63: 187-193.
- Stoss J, Holtz W. 1981. Cryopreservation of Rainbow Trout (*Salmo*

- gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture* 22: 97-104.
- Stoss J, Holtz W. 1983a Successful storage of chilled Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture* 31: 269-274.
- Stoss J, Holtz W. 1983b. Cryopreservation of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture* 32: 321-330.
- Stoss J, Refstie, T. 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic Salmon and Sea Trout. *Aquaculture* 30: 229-236.
- Toner M, Cravalho EG. 1986. Solution of water transport equation with constant rate of temperature change. *Cryobiology* 23: 545.
- Withler FC, Lim LC. 1982. Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of Grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture* 27: 389-392.
- 黑倉壽。1987。動物精液的凍結保存—魚類凍結保存(酒井昭編)。朝倉書店。152-155。
- 陳松林、劉憲亭。1991。魚類精液超低溫冷凍保存的基本原理、研究現狀和應用前景。淡水漁業 5: 43-46。
- 林達德。1992。生物細胞內凍結現象之機率模式與分析。農業機械學刊 1 (4): 10-21。