

# 黑斑(*Epinephelus malabaricus*)精液的凍結保存

郭金泉

國立台灣海洋大學水產養殖系

## 摘 要

本研究探討賦活黑斑(*Epinephelus malabaricus*)精子之滲透壓和稀釋比率, 及此兩因子所賦活精子的運動持續時間。實驗證明二甲基乙硫(Dimethyl sulfoxide, 簡稱DMSO)抗凍劑的保護效果凌駕於甘油和甲醇之上。黑斑精液的最適凍結速度據推算落於 $-20$ 到 $-150$  °C/min之間。用150 mM氯化鈉當稀釋液並添加20% DMSO抗凍劑, 此溶液再和精液以9比1的稀釋比率混合, 凍結解凍後黑斑精子的平均授精力為56%。

## 一、前 言

石斑魚遍佈台灣、香港及東南亞的沿岸及近海, 是高經濟價值的食用魚種。由於此魚之肉質細嫩味道鮮美, 往往是老饕之最愛, 市價昂貴, 因此台灣養殖石斑魚的產業如雨後春筍應運而生。其中最廣泛養殖的石斑魚種是黑斑。黑斑是雌雄同體先雌後雄的變性魚種。據研究此魚須屆5至10年的魚齡才開始有雄性功能, 此時雄魚往往是體重超過19公斤的龐然大物(1, 2)。由於雄種魚的數目及來源有限, 身價不凡, 培養費時, 可採集到的精液量又極稀少, 精液短缺經常是黑斑人工繁殖產業之一大困擾。凍結魚類精液對養殖產業的貢獻, 文獻中早有記載。而凍結黑斑精液的實際應用價值大致可歸納為: 第一, 雄性種魚蓄養的數目可以減少, 節省養殖成本; 第二, 減少對雄性種魚的壓迫(stress)。由於不必頻繁採精, 對雄魚生理, 肉體及心理上的干擾無形中都減到最低; 第三, 方便人工授精, 作業省時省力。一有成熟的魚卵即可馬上進行人工授精, 確保精卵配子的品質又不浪費每一個配子; 第四, 可以進行遺傳育種的實驗, 達到計劃生產

的目標。因為凍結精液不但可以長久保存而且攜帶輸送簡便，所以可以超越時空的限制使不同生殖期或地理隔離的石斑魚種得以交配。更方便育種方面如：後代試驗(progeny test)，近交，反交，雜交，染色體及基因工程等等學術鑽研暨產業的應用；第五，成立精子銀行確保種原，更可以保存瀕臨絕種魚類之精液，落實自然資源復育工作。據有經驗的漁民指出，爾來台灣近海的石斑種魚早已捕獲不易，由於石斑是位於食物塔上端的掠食魚類，有棲息地特異性，族群數目原本就有限。加上黑斑特殊的性轉變先雌後雄生殖方式，族群成員的性比懸殊，雄種魚更是鳳毛麟角。因此台灣海域的黑斑資源有枯竭之虞。精液凍結保存無疑是黑斑資源保育的一大利器。

雖然諸多研究已經証實，用肉眼觀察解凍後魚類精子的運動情況來判斷其授精能力的方法，誤差極大而且不客觀(3)，但是畢竟在魚卵受精過程中，具有運動活力的精子是不可或缺的一環，而且此檢定方法簡易便捷，因此藉評價魚類精子的運動活力來推測其授精能力，仍是目前最普遍廣泛使用的檢定方法。本研究的目的，首先檢驗賦活黑斑精子的滲透壓及各種離子在精子賦活過程中可能扮演的角色。其次解明成功凍結保存黑斑精液必備的幾個重要因子，並尋求一個簡易、經濟，可靠凍結保存黑斑精液的方法以期可以馬上推廣落實到產業界。

## 二、材料與方法

### (一)、雄種魚

精液採自體重介於30到40公斤，蓄養於澎湖民間養殖場的黑斑種魚。所有精液係在繁殖盛期按摩種魚腹部擠壓而得。採集後的精液暫時置於碎冰上，一旦確定採集的精子具有旺盛的運動活力後，馬上進行精液凍結保存。同時也取微量精液稀釋100倍，滴在血球計數板，置於光學顯微鏡下計算精子濃度。另外也用離心機(4°C, 10,000 rpm)離心精液獲取精漿。

#### 1. 評鑑新鮮精子的運動活力

配製滲透壓為150, 300, 450, 600, 1,100 mOsm / kg的氯化鈉，氯化鉀，葡萄糖溶液及人工海水(ASW)。人工海水的配方是：溶30公克氯化鈉，0.8公克氯化鉀，1.3公克氯化鈣(CaCl<sub>2</sub>)，6.6公克硫酸鎂於1公升的蒸溜水，再加入0.18公克碳酸氫鈉(NaHCO<sub>3</sub>)把此滲透壓為1,100 mOsm / kg的人工海水調成pH值為8.2的緩衝液。精液依次和上述不同滲透壓的溶液混合(稀釋倍率100)，觀察精子被賦活與否。另外，為了解精液稀釋比率對精子運動持續時間的影響，取1微升(μl)的精液分別和550 mM氯化鈉，氯化鉀及1,100 mM葡萄糖溶液混合，稀釋比率依序為10, 20, 100，再計時精子運

動的持續時間。所有的觀察都在室溫(25°C)下進行。精液直接稀釋置於光學顯微鏡鏡架上的表玻璃。觀察時顯微鏡的放大倍率是200倍。一俟精液和溶液充分攪拌混合後，馬上開始計時並評鑑精子運動活力的指數。運動活力指數以0代表完全看不到具有激烈運動能力的精子，1表示有精子但其比率最多為25%具有激烈運動能力，2表示多於25%但不超過50%的精子具有激烈運動能力(亦即>25% to 50%)，依此類推，3表>50%到75%的精子具有激烈運動能力，4表>75%的精子具有激烈運動能力。每個處理有三次重覆。本研究以凝固點下降式滲透壓計測量滲透壓。每次測量前，滲透壓計必先用標準溶液檢定並校正。所有化學藥品都是試藥級(reagent-grade)購自美國Sigma公司。蒸溜水係自來水先去離子後再放在玻璃瓶中煮沸凝結的再蒸溜水。

## 2. 評鑑凍結解凍後精子的運動活力暨授精力

凍結精液的步驟如下：首先以抗凍劑及稀釋液稀釋新鮮精液，再分裝此混合物於0.25 cc的麥管(Instruments de Medecine Veterinaire-IMV, L, Aigle, France)。然後把麥管懸於不同高度(1或8公分)的液態氮蒸氣中或把整支麥管埋在乾冰裡，逐漸冷卻直到精液混合物完全凝固為止(約10分鐘)。最後把麥管儲存在液態氮桶內。隔天，逢機取出一支麥管樣本，放在20°C水浴中解凍，檢查並評鑑解凍後精子的運動活力。其餘的麥管繼續保存在液態氮桶中，直到採到品質良好的魚卵時才即刻解凍，進行凍結精液授精力的檢定。

本實驗共比較了五種稀釋液，分別是150mM氯化鈉(3)，300 mM葡萄糖(3, 4)，海水魚生理食鹽水(5)，150 mM枸橼酸鈉(3, 6)及蒸溜水。根據初步預備試驗之結果，本實驗挑選20% DMSO為單一抗凍劑，精液的稀釋比率固定為10，進行稀釋液的比較。其次，以150 mM氯化鈉為稀釋液進行兩種精液稀釋比率(10或100)和兩個平衡時間(5或60分鐘)複因子的試驗。此外，亦以150 mM氯化鈉為稀釋液，混合三種不同濃度(10, 20和30%)的抗凍劑(DMSO，甘油及甲醇)靜置五分鐘後再凍結保存，藉以尋找最適抗凍劑和濃度的組合。

用軟管插入雌魚之卵巢抽取魚卵。逢機取100個卵計算其平均卵徑。當卵徑大於0.4公厘時，注射每公斤魚體重0.5 IU比率劑量之人類絨毛促性腺激素(簡稱hCG，哥娜針劑中國化學製藥公司)催熟並催產種魚。一般在25°C水溫，雌魚在單次hCG注射後的24到30小時之間會產卵。擠出魚卵並儘快於20分鐘內完成授精實驗。用一支麥管(0.25cc)的凍結精液或0.25 cc的新鮮精液(業已用150 mM氯化鈉稀釋10倍，其精子濃度大約和凍結精液相等)去授精1及2公克

的魚卵。一公克的黑斑卵大約為數 2 千。

凍結精液一解凍後馬上灑在魚卵上，隨後添加 10 cc 的天然海水混合精卵。受精率的計算係依郭等(3)之方法，亦即以受精卵有否發育達孵化直前的胚胎期為標準，判定受精與否。視情況，有時須以  $\sin^{-1}\sqrt{\quad}$  方式轉換以 % 表示的受精率以利統計分析。本研究採用 Tukey 多變距測驗以  $\alpha=0.05$  當顯著水準，比較分析各處理間的差異(7)。

### 三、結 果

#### (一)、評鑑新鮮精子的運動活力

三尾黑石斑精子濃度的範圍為  $4.2 \sim 8.6 \times 10^9 / \text{cc}$ 。精漿的平均滲透壓為 340 mOsm / kg。黑斑精子縱使稀釋於滲透壓為 300 mOsm / kg 的電解質溶液(氯化鈉，氯化鉀，人工海水)或非電解質的葡萄糖溶液中，也不被賦活(表一)。只有當稀釋液的滲透壓高於 600 mOsm / kg 時，不論電解或非電解質溶液皆可賦活黑斑精子(表一)。雖然賦活精子的運動活力指數在精液稀釋比率為 10, 20, 和 100 皆相同，可是精子運動的持續時間卻隨著稀釋比率的增加而急遽下降(表二)。

#### (二)、評鑑凍結解凍後精子的運動活力暨授精力

以蒸溜水為稀釋液解凍後的精子完全喪失運動能力(表三)。150 mM 氯化鈉和海水魚生理食鹽水的效果同屬最優(表三)。由於 150 mM 氯化鈉配製容易價錢便宜，本研究以後的實驗都採用其當稀釋液。精液採高稀釋比率，解凍後精子的運動活力遠遜於採用低稀釋比率。短時間(5 分鐘)的平衡效果比長時間(60 分鐘)卓越。根據以上的結果，下述實驗都採用低稀釋比率(10)及短的平衡時間(5 分鐘)。甘油及甲醇在實驗濃度範圍(10, 20, 30 %)，凍結解凍後精子完全喪失運動活力，只有 DMSO 顯示保護抗凍效果，其最適濃度為 20 %(表四)。以 150

表一 The effect of NaCl, KCl, ASW and glucose on spermatozoan motility of black grouper at a semen dilution ration of 100.

Chemical	Osmolality (mOsm/kg)				
	150	300	450	600	1,100
NaCl KCl ASW glucose	0	0	0	4	4

Motility score 0: no spermatozoa were motile.

Motility score 1: > 0-25% of spermatozoa with progressive movement.

Motility score 2: > 25-50% of spermatozoa with progressive movement.

Motility score 3: > 50-75% of spermatozoa with progressive movement.

Motility score 4: > 75% of spermatozoa with progressive movement.

表二 The effect of semen dilution ratio on sperm motility in NaCl, KCl, artificial sea water (ASW), sea water and glucose solutions.

	Semen dilution ratio	Duration (minutes) of motility	Motility score
NaCl, KCl, ASW,	10	40 <sup>a</sup>	4
sea water	20	10 <sup>b</sup>	4
and glucose	100	2	4

Motility Score 0: no motile spermatozoa.

Motility Score 1 >0–25% of spermatozoa with progressive movement.

Motility Score 2 >25–50% of spermatozoa with progressive movement.

Motility Score 3 >50–75% of spermatozoa with progressive movement.

Motility Score 4 >75% of spermatozoa with progressive movement.

Column values with different superscripts differ significantly (P5 0.05).

表三 Comparison among the effects of various extenders on post-thaw spermatozoan motility of black grouper.

Extender	Motility Score
150mM NaCl	4
Marine teleost Ringer	4
300mM glucose	2
150mM sodium citrate	1
distilled water	0

See Table 1 for key.

表四 The effect of different concentrations of DMSO, glycerol and methanol on post-thaw black grouper spermatozoan motility.

Cryoprotectant	Concentration(%)	Motility score
DMSO	10	3
	20	4
	30	1
Glycerol and Methanol	10	0
	20	0
	30	0

See Table 1 for key.

mM氯化鈉添加20%DMSO 並和精液以9比1的比率混合後分注於0.25 cc麥管，三種凍結方法(懸於不同高度的液態氮蒸氣中或把整支麥管埋在乾冰裡)凍結解凍後精子的運動活力不分軒輊(表五)。當卵重為1公克時，凍結精液的授精力和新鮮精液的授精結果並沒有顯著( $P < 0.05$ )差異(表六)。然而當卵重增為2公克時，凍結精液的授精能力就顯著( $P < 0.05$ )的比新鮮精液遜色(表六)。此授精實驗中精液的凍結速度約為 $-85^{\circ}\text{C} / \text{min}$ 。

#### 四、討 論

一般卵生硬骨魚類的精子在精液中靜止不動(8, 9)。只有當添加適當的稀釋液後精子才被賦活。由於魚類精子一旦賦活就會耗盡運動能源，因此在凍結前及解凍過程必須盡量防止並抑制精子的運動。賦活魚類精子的原因包括精子脫離精巢的束縛，抑制精子賦活之因子被稀釋，氧氣或滲透壓的濃度改變等等(9-12)。然而各種魚類精子的賦活機制顯然不同。

表五 Comparison among the effect of freezing method on the post-thaw black grouper spermatozoan motility.

Freezing method	Motility Score
Above liquid nitrogen surface 1 cm	4
Above liquid nitrogen surface 8 cm	4
Buried in dry ice	4

See Table 1 for key.

表六 The effect of egg quantity of black grouper on fertilization capacity using 0.25 ml of a mixture of 9 parts of 1% NaCl solution plus 1 part of either frozen-thawed or fresh semen.

Egg quantity (gram)	Semen type (0.25 ml)	Fertilization rate (%)
1	fresh	$60.8 \pm 2.4^a$
1	frozen-thawed	$56.7 \pm 3.3^a$
2	fresh	$55.4 \pm 4.2^a$
2	frozen-thawed	$33.1 \pm 2.3^b$

Values are mean  $\pm$  standard deviation. N=6 in all experiments.

a, b Values with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

鉀離子會抑制鮭鱒魚類精子的運動，卻會延長鯉科魚類精子的運動持續時間。對海水魚類精子，鉀離子純粹只具滲透壓的作用既不抑制也不促進其運動活力(12, 13)。一般滲透壓高於300 mOsm / kg 的溶液能賦活海水魚類的精子(13)。然而本實驗卻發現賦活黑斑精子的最低滲透壓(600 mOsm/kg)遠比一些海水魚更高(9, 13, 14)。此間的差異頗富趣味值得進一步探討。

增加精液稀釋比率會縮短黑斑精子的運動持續時間，此現象可能歸咎於稀釋作用。維持精漿裏某些必要未知成分的最低濃度(閾值)是魚類精子能否運動的關鍵(3, 8, 9, 15)。過分稀釋精液會造成這些必要未知成分的濃度低於閾值，因而不能賦活精子。此稀釋作用或許也可以解釋為何高度稀釋精液，解凍後其精子的運動活力指數會遠遜於以低度稀釋精液，精子的運動活力指數。Withler和Lin (16)也報導低倍稀釋*E. tauvina*精液，解凍後精子的運動活力指數遠比高倍稀釋精液更優良。

一般魚類精子運動的持續時間會隨著稀釋比率的增加而驟然縮短。察諸文獻，對於魚類精子運動持續時間的記載往往令人困惑。這些矛盾可能肇因於賦活精液的稀釋比率不同，賦活精液的稀釋液或稀釋液的溫度不一，採精的季節或時候相異，雄魚的個體差，或每位實驗觀察者的偏好。標準化計時魚類精子運動持續時間的方法，以方便未來比較魚種間之異同實在有其迫切性。郭(17)研究大西洋鮫精液的凍結保存，指出只要解凍後大西洋鮫精子的細胞核仍然安然無恙，解凍後此魚精子的運動活力和其平均授精率的相關高達0.739。根據筆者初步電子顯微鏡的觀察，解凍後90%黑斑精子的細胞核並無明顯受損的跡象(未發表)，因此解凍後黑斑精子的運動活力指數在某個程度似乎可以代表其授精力。

本研究支持抗凍劑和稀釋液的須求因魚種而不同(species-specific)的說法。譬如本研究發現甘油及甲醇兩抗凍劑不適用於保護黑斑精子，對斑馬魚及吳郭魚精子而言，甲醇卻頗有抗凍保護功能(18, 19)。其他報告也證實甘油不能保護*E. tauvina*精子(11)，甲醇不利於barramundi及大西洋鮫精子的凍結保存(3, 20)。枸橼酸鈉是鯛類(6)及河豚(21)精液理想的稀釋液，卻完全不適合於稀釋黑斑及大西洋鮫之精子(3)。

本研究所用的三種凍結方法(懸麥管於液態氮液面1或8公分上方的蒸氣中或把整支麥管埋在乾冰裡)，解凍後精子的運動活力指數皆大同小異。三種方法的凍結速度據推測分別為-154, -20, -85°C/min (6, 22)。所以大西洋鮫(3)，鯛(6)及鮭鱒類(23)精液最適凍結速度都非常相似。

一般延長平衡時間對魚類精子都是有害無利(3, 8, 9)。本研究結果也支持此論點。可是Rana等(24)冷凍吳郭魚精液，認為稀釋液和平衡時間有互涉關係，平衡時間的長短須要依稀釋液的種類做適當調整。此論點有待進一步驗實。

總之本研究成功的凍結保存了黑斑精液，且其授精力可媲美新鮮精液。

## 謝 辭

感謝澎湖帝廈養殖場張國宏先生，澎湖成龍養殖場林金成先生，澎湖洪保國先生，屏東鼎台興業公司曾煥仁先生的鼎力合作提供本研究所需的精卵，並貢獻多年寶貴的現場經驗。本研究的經費來自農委會計劃CA80-AD-7.1-F30-17在此一併誌謝。

## 參考文獻

1. Tan SM, Tan KS. 1974. Biology of tropical grouper, *Epinephalus tauvinal*. a preliminary study on hermaphroditism in *E. tauvina*. Singapore J. Pri. Ind. 2: 123-133.
2. Yeh SL, Ting YY. 1990. Studies on the reproduction for broodstock establishment of groupers. Bull. Taiwan Fish. Res. Inst. 49: 167-181.
3. Gwo JC, Strawn K, Longnecker MT, Arnold CR. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture 94: 355-375.
4. Gwo JC. 1982. Studies on the Freezing-Thawing Damages of Fish Sperm, Especially on the Morphological Changes and Major Cation Flux of Spermatozoa. M.Sc. Thesis, The University of Tokyo, Japan.
5. Hara S, Canto JT, Almendras JME. 1982. A comparative study of various extenders for milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) sperm preservation. Aquaculture 28: 339-346.
6. Kurokura H, Kumai H, Nakamura M. 1986. Hybridization between female red sea bream and male crimson sea bream by means of sperm cryopreservation. In: Maclean, JL, Dizon, LB, and Hosillos LV. (eds.), The First Asian Fisheries Forum, Manila, The Philippines, pp.113-116.
7. SAS User's Guide: Statistics, Version 5. SAS Institute Inc., Cary NC. 1985.
8. Stoss J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: Hoar, WS, Randall DJ, Donaldson, EM. (eds.) Fish Physiology, Vol. 9B. Academic Press, New York, pp.305-350.
9. Morisawa M, Morisawa S. 1990. Acquisition, initiation of sperm motility. In: Gagon C. (ed) Controls of Sperm Motility: biological and clinical aspects. CRC Press, FL., pp.137-151.
10. Ginsberg AS. 1972. Fertilization in fishes and the problem of

- polyspermy. Insrael Program Scientific Translation, Jerusalem, pp.366.
11. Gibbons IR. 1982. Sperm motility: mechanisms and control. *In*: Andre J. (ed) *The Sperm Cell*. Martinus Nijhoff publishers, the Netherlands, pp. 304-314.
  12. Morisawa M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* 2:605-615.
  13. Morisawa M, Suzuki K. 1980. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 210: 1145-1147.
  14. Goodall JA, Blackshaw AW, Capra MF. 1989. Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting (*Sillago ciliata*). *Aquaculture* 77: 247-250.
  15. Billard R. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Reprod. Fert.* 68: 77-84.
  16. Withler FC, Lim LC. 1982. Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture* 27: 389-392.
  17. Gwo JC. 1989. Cryopreservation of Atlantic Croaker Spermatozoa: Optimization of Procedures, Evaluation of Morphological Changes, and Assessment of Motility. Ph.D. Dissertation, Texas A and M University, USA.
  18. Harvey B, Kelley RN, Ashwood-Smith MJ. 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. *Can. J. Zool.* 60: 1867-1870.
  19. Harvey B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture* 32: 313-320.
  20. Leung LKP. 1987. Cryopreservation of spermatozoa of barramundi, *Lates calacriker* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture* 64: 243-247.
  21. Miyaki K, Dotsu Y. 1987. A scanning microscopical observation of the cryopreserved spermatozoa of the swellfishes. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 62: 17-21.
  22. Erdahl AW, Erdahl DA, Graham EF. 1984. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. *Aquaculture* 43: 341-350.
  23. Scott AP, Baynes SM. 1980 A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17: 707-739.
  24. Rana KJ, Muiruri RM, McAndrew BJ, Gilmour A. 1990. The influence of diluents, equilibration time and prefreezing storage time on the viability of cryopreserved *Oreochromis niloticus* (L.) spermatozoa. *Aquaculture and Fisheries Management* 21: 25-30.