

鬼頭刀精液冷凍保存條件初探

邱俊豪¹、蔡惠萍²、何源興¹

¹ 水產試驗所東部漁業生物研究中心、² 技術服務組

前言

鬼頭刀 (*Coryphaena hippurus*) 為臺灣東部大宗海洋漁獲物。據 2020 年漁業統計年報，鬼頭刀產量為 6,566 公噸，產值達 427,584 千元，但相較自 2015 年以來的 9,206–13,424 公噸之產量，下降了 28.68–51.09%。因捕獲量下降及永續漁業意識抬頭，在臺東新港區漁會及相關加工、冷凍廠商以鬼頭刀加入了漁業改進計畫 (Fishery Improvement Project, FIP) 後，蘇澳、東港等區之漁船亦相繼投入行列，以保育其漁業資源。為能永續利用漁業資源，其方式有設立漁業資源保護區、降低漁獲努力量等，另外，資源培育亦攸關重要，除魚苗放流外，種原細胞之保存也是方法之一。

魚類的精液冷凍研究自 1953 年 Blaxter 對鯪魚的報告發表之後有了漸進式的增加 (Liu et al., 2012)，因不同物種，精液冷凍條件亦有所不同 (Niu et al., 2022)，故後續更多魚種及更為精進的凍存條件仍持續研發中。精液凍存不僅可挑選出品質優良之精子並將其長期保存外，有攜帶方便且空間需求小等優點，可藉由此技術使人工授精更為便利。以鞍帶石斑 (*Epinephelus lanceolatus*) 為例，雄性種魚體積龐大，在麻醉、運輸上極其不便且有操作之危險性，又雌雄種魚在性腺成熟度上因不同步而有繁殖上的困擾，本所已

成功利用凍存精液繁殖出石斑魚的子代。

鑑於鬼頭刀有高成長率及較長之繁殖期等優勢，係為一具潛力之養植物種，在美國邁阿密大學，鬼頭刀的養殖研究也行之有年 (Stieglitz et al., 2017)，從孵化至蓄養 9.5 個月之鬼頭刀魚體，其體重增至 4.93 kg、體長為 75.8 cm，換算日成長率為 $19.18 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ 及 $0.227 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ (Hagood et al., 1981 Benetti et al., 1995)，Uchiyama 等人於 1986 年的研究中也呈現出良好的成長率。鬼頭刀之飼料轉換率 (feed conversion ratio, FCR) 為 1.6，和蝦、鮭鱒魚、鯰魚及吳郭魚等全球常見養植物種之平均值 (Fry et al., 2018) 略同。藉由快速的成長率以減少養殖時程，可以降低養殖的風險，良好的換肉率也可以減少飼料的成本投入。雖然鬼頭刀具有養殖的潛力，但在雌雄魚混養情況下，雄魚的攻擊性高，是目前發展商業養殖需解決之問題。

2020 年由 Kawamura 等人發表，利用乾式液態氮桶進行圓舵鯉 (*Auxis rochei*) 精液冷凍條件之試驗，鑑於此，配合鬼頭刀漁期 (4–6 月、10–12 月)，以藉由研究鬼頭刀之精液冷凍技術，期未來能應用於人工繁養殖，例如隨船出海，在野外立即採集新鮮精液並凍存備用，俟雌魚排卵再進行混合受精，將取得之優質受精卵帶回試驗場所進行養殖研究，俟成長至可生態放流體型時進行放流，以增裕臺灣東部海域鬼頭刀資源量。



樣本採集

本研究自臺東基翬漁港及新港魚市場取得雄性鬼頭刀(圖 1) 並攜回中心實驗室進行解剖, 取出其生殖腺後以 Hank's solution 清洗並用吸水紙吸乾表面液體後開始取精, 以拇指擠壓的方式將精液收集於離心瓶中, 盡量避免血液及其他液體的流入。



圖 1 魚市場待估鬼頭刀

A: 雄性鬼頭刀頭部有隆起特徵; B: 雌性鬼頭刀頭部較尖銳

取乾淨的 1.5 ml 離心瓶, 加入 500 μ l 海水及 50 μ l 精液進行精子活化, 以微量吸管均

勻混合後取 50 μ l 活化精子進行鏡檢, 快速運動的精子記錄為活精子。精子活力 = 活精子數/全部精子數 \times 100%。

凍存條件測試

一、稀釋劑比例

在大多數的硬骨魚中, 精細胞在精漿中呈現靜止態, 但釋放於水體中會因滲透壓或離子環境之改變, 或其他繁殖模式因子而激活 (Yang et al., 2016; Marc et al., 2016)。稀釋劑作為一個緩衝溶液, 不僅提供保持精細胞靜止態之介質環境, 也提供了精子必需營養與適當之 pH、稀釋精子濃度、抗凍劑載體介質、滲透壓濃度及保護精子受到冷或熱之休克傷害等功能以延長精子壽命 (Chao, 1991; Muchlisin, 2005; Yang et al., 2016)。但稀釋劑之種類及稀釋比例也會對精液保存之品質造成不同影響, 非比例越高越好。

本研究使用 Hank's solution 作為稀釋劑使用, 並與精液以 1:1、1:3、1:5、1:10、1:20、1:50、1:100 及 1:200 等稀釋比例下, 再以二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 作為抗凍劑進行 10% 之混合 (v/v), 並參考蔡等 (2016) 使用階段性降溫, 以 500 μ l 麥管吸取 400 μ l 預凍精液後, 置放於 4°C 10 分鐘, 液態氮表面上 3-6 cm 處 20 分鐘, 液態氮表面 20 分鐘結束後投入液態氮中保存, 24 小時後解凍, 以海水激活精液並鏡檢觀察記錄。

圖 2 所示, 以 1:1-1:10 之保存效果為佳, 與凍存前之精子活力 (61.57 \pm 9.57%) 比較下, 仍保有 75% 之相對激活率, 稀釋比例高過 1:10 後隨稀釋比例增加, 精子活力下

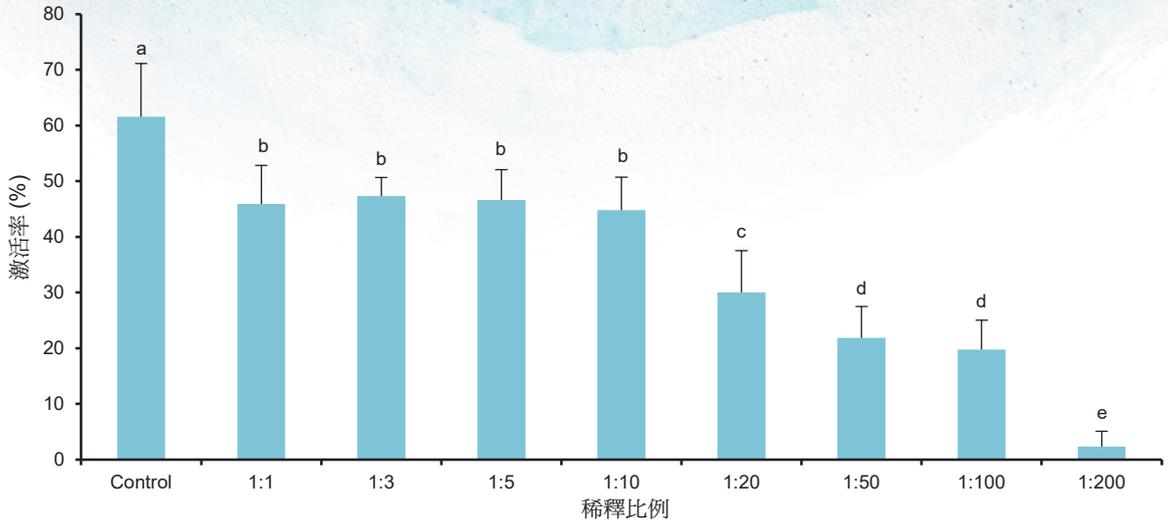


圖 2 以不同比例之稀釋劑探討其對鬼頭刀精液凍存之影響

降。除 1:200 外，其他凍存組之精子皆可持續活動至少 40 分鐘以上。

據前人研究，鮭科魚類採用 1:2 之稀釋比例 (Parodi et al., 2017)；鱸科用 1:9–1:10 (Wayman et al., 1998; Sarosiek et al., 2014)，但在星點東方魮 (*Takifugu niphobles*)、歐洲鰻 (*Anguilla anguilla*) 是使用 1:50、1:100 等之高比例進行精液稀釋 (Gallego et al., 2013; Peñaranda et al., 2009)，不過大部分魚類實驗研究仍採用低稀釋比例者居多。

二、抗凍劑種類及濃度

低溫儲存最主要的目的為保存精子的完整性及品質，且降低或停止活性以限制其能量消耗 (Kopeika et al., 2007)。但在低於 0°C 時會因冰晶產生 (ice crystallization) 而破壞精細胞本身，因此藉由添加抗凍劑以減少水與晶體結構結合並建構均勻晶體及電解質之連結，以上特徵使凝固點降低並保持精子細胞膜的完整性，維持精子之品質 (Linhart et al., 2000; Gallego and Asturiano, 2019)。

抗凍劑可分為可滲透性 (permeating) 及非可滲透性 (non-permeating) 兩種類。可滲透性抗凍劑由於是均勻地分布於細胞內外中，在混合時會因初始滲透壓不平衡與收縮而造成滲透壓力，直到細胞內外抗凍劑均勻之分布而穩定。前者有甲醇 (methanol)、甘油 (glycerol)、二甲基亞砷 (DMSO) 及丙二醇 (propylene glycol) 等種類，其中最常使用者為甘油與 DMSO。非可滲透性抗凍劑包含了滲透活性分子及無滲透活性分子，前者為雙糖類 (如蔗糖)；後者為多糖類和蛋白質，蔗糖等化合物因不會通過細胞膜而增加細胞外之滲透壓，故會導致細胞脫水，但有研究報告指出，增加糖類於抗凍劑中，對精液冷凍的保存是助益的。

本研究精液以 Hank's solution 1:3 比例稀釋，再分別以甲醇、甘油、DMSO 及丙二醇等四種抗凍劑，於 5、10 及 15% (v/v) 濃度下進行前述之階段性降溫凍存，24 小時後解凍，以海水激活精液並鏡檢觀察記錄。



實驗結果以 DMSO 10% 效果最好，且鬼頭刀精液除甘油組以 5% 效果較佳外，其他處理組適合保存於含有 10% 抗凍劑中，甲醇組效果最差，活力皆低於 25%，相較新鮮精液活力 $76.58 \pm 4.56\%$ 只有 33% 的保存率 (圖 3)。Magdy 等人 (2021) 於歐洲海鱸 (*Dicentrarchus labrax*) 精液凍存試驗中，亦使用濃度 10% 之 DMSO 及甲醇做為抗凍劑。DMSO 因為有快速滲透及可和精子磷脂層相互作用之特性，因此廣為使用 (Suquet et al., 2000; Gwo, 2011)。甘油多用於海水魚類的精液冷凍保存，因可濃縮細胞內水分，降低溶液及抗凍劑之滲透壓。甲醇則較廣泛應用於淡水魚類之精液冷凍保存中 (蔡等, 2022)。一般抗凍劑使用濃度介於 5–15% (Victor and Asturiano, 2019)，濃度過高 (20% 以上) 易刺激 RNA 之合成 (蔡, 2016)。更高濃度的抗凍劑雖可提供更好的細胞防禦，

但也必須注意其毒性影響 (Stoss, 1983)。

結語

此次鬼頭刀試驗先以常見之稀釋劑及抗凍劑做精液凍存之初探，未來將再針對前述因子，精進其技術以提升凍存精液之品質。建議使用 Hank's solution 為稀釋劑時，應在 1:10 的稀釋率內有較好的凍存效果，抗凍劑建議使用 DMSO 且其濃度為 10%。

因受到氣候變遷、漁業資源減少等因子，種原的保存逐漸重要，囿於受精卵或胚胎凍存之技術尚未成熟，精液保存仍為主要之種原保存方式之一，期未來藉由冷凍精液技術應用於繁養殖技術，培育新興水產養殖生物並增加養殖物種多樣性外，亦可減少對捕撈漁業之需求，降低對環境生態之破壞，為永續漁業獻出貢獻。

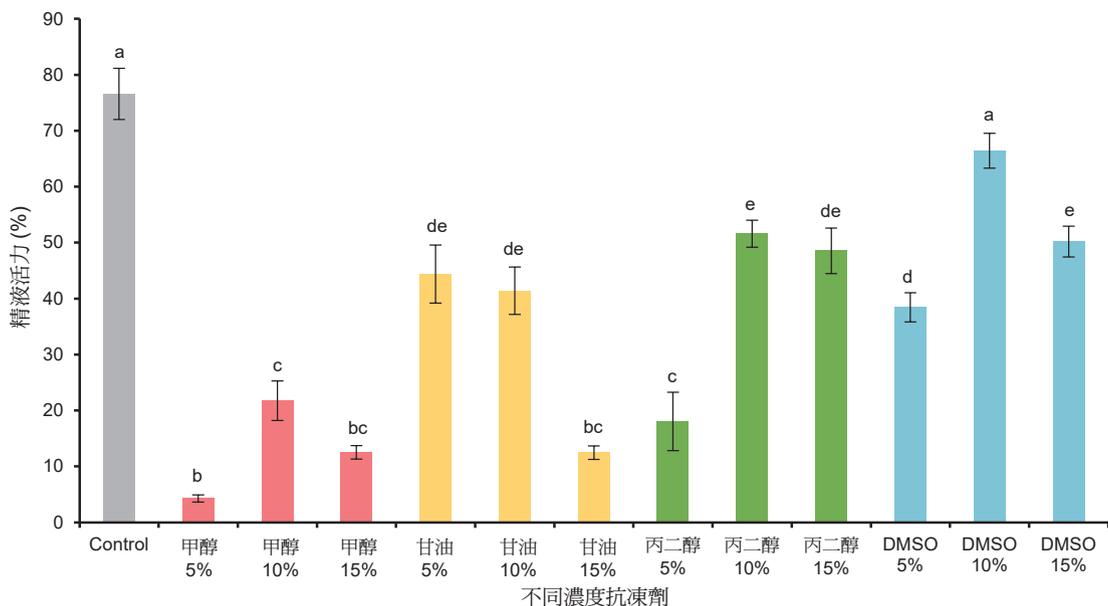


圖 3 以四種抗凍劑於三種不同濃度下探討其對鬼頭刀精液凍存之影響