

石斑魚精液冷凍保存及其雜交育種應用研究

蔡惠萍¹、邱沛盛²、陳重元¹、蔡政汶¹、何源興¹

¹ 水產試驗所東部海洋生物研究中心、² 海水繁養殖研究中心



前言

石斑魚屬高經濟價值之魚種，主要分布於熱帶、亞熱帶溫暖海域沿岸的重要食用魚，屬於鮨科 (Serranidae) 石斑亞科 (Epinephelinae) 的魚類。根據 Aldemita C (2013) 調查，全世界有 269 種石斑魚，臺灣有紀錄的約 52 種 (Lee, 1990)。由於石斑魚的肉質細嫩、鮮美，且外形美觀，廣受各地消費者喜愛，已成為名貴的海鮮之一。野生石斑魚的捕獲量因過度捕撈已逐漸下降中，因此透過水產養殖來生產這些野生的珊瑚礁魚類越來越受到重視 (Leong, 1998; Halim, 2001)。石斑魚養殖主要分布在熱帶和亞熱帶地區，且大部分產量來自亞洲，其中中國 (佔總產量的 65%)、臺灣 (17%) 和印度尼西亞 (11%) 估計佔全球石斑魚產量的 92%。目前至少有 47 種石斑魚和 15 種雜交種石斑魚已經過試驗或正在商業化生產中 (Rimmer and Glamuzina, 2019)。

臺灣從 1970 年代開始進行石斑魚養殖，發展至今已有近四十多年的歷史，為臺灣重要的經濟養殖魚種。惟近年來石斑魚養殖產業受到寒流、高溫等極端天氣影響，以及病原菌變異與藥物濫用等因素影響，再加上全球景氣下滑之衝擊，使得石斑價格逐年

降低。考量可能因部分業者為追求生產量能，未考量種魚來源的多樣性，導致近親交配，因此易造成基因窄化。此外，近幾年來中國及東南亞皆已競相投入雜交石斑魚繁養殖，臺灣未來應積極開發新品種石斑之繁殖技術，進而強化石斑產業之競爭力。

石斑魚具有“先雌後雄”的性轉變現象，於生活史的前幾年表現出雌性特徵，隨後有選擇地改變她們的性別為雄性，雖然許多研究人員參與其性別轉變的研究，惟對引發性別變化的因素仍然未知 (Bhandari et al., 2003)。因為此特殊生理機制使其生產繁殖過程中雄魚來源較為困難，且因雌、雄親魚性成熟不同步，限制了大規模種苗的培育，例如鞍帶石斑 (俗稱龍膽 *Epinephelinae lanceolatus*)，成熟雄魚約 34–120 kg，其育成約需 5 年以上時間，因此培養雄性親魚曠日廢時，且因雄魚體型碩大，採集精液進行人工繁殖與雜交工作時，常需勞師動眾搬運及麻醉。近年來隨著水產生物配子保存技術的發展，採用超低溫冷凍保存精液技術是解決上述難題有效的途徑。

魚類冷凍精液的發展

Polge 等 (1949) 成功使用甘油冷凍保存

鳥類的精液。精液低溫及冷凍保存技術的發展，主要於 1950—1960 年代，乳品製造業需要一種能夠長期儲存公牛精液的方法而開啟。在一般畜牧業中，精液的冷凍保存程序對家畜來說非常重要，運用此種技術管理流通的遺傳物質已被證明特別有效益，它有助於儲存有價值遺傳物質的基因組資源 (Bucak et al., 2009; Mart'inez-P'aramo et al., 2009)。Blaxter (1953) 首次將類似的方法用於魚類精液，凍存大西洋鮮魚精液，融解後細胞活力可達約 80%。自此即開始魚類精液的冷凍保存研究，目前已成功應用於 200 多個物種以上 (Benson et al., 2012)。本所東港生技研究中心於 1972 年使用烏魚 (*Mugil cephalus*) 為材料進行其精液冷凍保存試驗 (Chao, 1975)，為臺灣魚類精液冷凍保存研究之濫觴。

多數作為精液保存研究之對象魚種均具有商業價值並能由繁殖場供應試材，野生種則僅限於為了保存瀕臨危險的少數種，讓瀕臨滅絕的遺傳資源能夠被保存下來 (Brycon and Arias-castellanos, 2004)。水產養殖生物精液的冷凍保存也可以保留具有特定功能性基因的物種 (Labbe et al., 2013)，這對於精液量非常低的物種尤其重要 (Suquet et al., 2016)。

一些季節性產卵魚類，若沒有恆定的精液供應人工授精，則其繁殖計畫則無法順利進行，如果可以使用冷凍保存精液，僅需在產卵季節針對雌性種魚進行生殖調控及採卵即可進行人工授精與孵化育成 (Munkittrick and Moccia 1984; Suquet et al., 2000)。另來自野生魚類的配子或遺傳物質亦可通過人工授精方式應用到繁殖場。魚類精液冷凍保存可

藉由人工擠取等方式，在雄性種魚生殖季節收集活力最佳的精子。通過精液冷凍保存技術配合雌性產卵的靈活性可增強孵化場和水產養殖的營運，更有效率的控制相關育種計畫，以及長期儲存有利基因 (Tiersch and Mazik, 2011)。

精液冷凍保存可以成為維護圈養和野生物種遺傳多樣性的工具 (Critser and Russell, 2000)，作為一種保存遺傳物質的方法。從生產一致性的角度來看，所選的雄性親本基因組可以保存很長一段時間 (Butts et al., 2010)。海水魚養殖業，使用人工授精生產魚苗，可以藉由精液的冷凍保存獲得精液和卵母細胞之間的同步 (Vuthiphandchai et al., 2009)。由於冷凍保存的精液隨時可用，育種者只需要專注維持、培養雌性種魚即可，比同時維護雄性及雌性種魚更具成本效益。冷凍保存的另一個目的是作為種原庫，保護因疾病爆發、自然災害或過度開發而使種原滅失的狀況 (Agarwal, 2011)。冷凍保存設施可以持續供應魚類精液，用於在孵化場藉由人工授精生產魚苗或用於研究目的 (Liu et al., 2017)。

魚類精液冷凍保存的研究—稀釋液與抗凍劑的選擇

魚類精液冷凍保存的研究主要集中在冷凍方法上，魚類精液冷凍保存研究的重要組成部分是稀釋液和抗凍劑的類型，稀釋液和抗凍劑的適用性因品種特性而異，若要使水產養殖產業有效運用這項技術，則需建立各物種的精液冷凍保存之標準化程序與方法。

稀釋液 (extend) 是抑制精子激活的平衡鹽溶液，可以說是魚類精液冷凍保存最重要的化學成分。理想的稀釋液是等滲的，具有良好的緩衝能力，並含有營養物質、穩定膠體、抗氧化劑及抗菌特性 (Agarwal, 2011)。精子需要能量來進行基本的細胞代謝和運動，稀釋液為這些活動保留並提供能量。有很多稀釋劑配方已用於海水魚的精液冷凍保存，許多研究人員使用的包括 NaCl 溶液、NaCl 尿素溶液和林格氏液等。

魚類精液長期冷凍保存，需要使用抗凍劑來保護精子細胞免受冷熱衝擊處理，並防止在冷凍、冷凍和融化後細胞脫水。抗凍劑為不穩定的酶 (例如過氧化氫酶) 提供冷凍保護，並在未冷凍的水溶液中穩定蛋白質，他們還可以防止預凍過程中會形成冰 (Chao, 1991)。

抗凍劑的毒性是成功冷凍魚類精液的主要限制因子。不同物種的精子可能對特定的抗凍劑有不同的反應，應測試幾種不同濃度的抗凍劑和適當的平衡時間。

精液冷凍保存液主要是使用甘油、DMSO (Dimethyl sulfoxide, 二甲基亞砜)、甲醇、乙二醇 (EG)、丙二醇 (PG) 等作為抗凍劑。甘油主要使用於海水魚類的精液冷凍保存，除了可以保護精子頂體之外還可以濃縮細胞內的水分，降低溶液中鹽濃度和冷凍液的滲透壓，而葡萄糖和乳糖在高濃度時可以抵銷甘油的部分負面作用 (陳等, 2008)。丙二醇則為一種滲透性的小分子物質，有做為抗凍劑必須有滲透速度快、毒性較小的特點，主要經過滲入精子的細胞內與水分子結合，增加抗凍液的黏性，弱化結晶的過程保護精

子結凍過程減少損傷 (韓等, 2014)。DMSO 因其具備有高滲透性和與精子膜上磷脂層作用而廣泛的應用在多種精液保存的抗凍劑中 (王等, 2012)。

在淡水魚類的精液冷凍保存應用較廣泛的是甲醇。淡水魚如吳郭魚和香魚等之精液使用 DMSO 或甘油等抗凍劑，則精液立呈凝膠狀，未見保護作用 (Chao, 1991)。一般而言，海水魚冷凍精液保存技術與淡水魚相比更簡單，這更支持其在水產養殖中的應用 (Suquet et al., 2000)。

國外魚類精液冷凍保存研究初期之研究重點多在於鮭科魚類，其冷凍保存後之受精率相當高，大都和新鮮精液可相比美。目前魚類精液保存在液態氮中最長時間的記錄是 *Sparus sarba* 在凍存 11 年後仍可供繁殖使用 (Kumai et al., 1998; Chao and Liao, 2001)。

石斑魚精液冷凍保存研究

石斑魚精液的冷凍保存在人工育種、魚苗生產中已取得重要地位，石斑魚的自然繁殖有時是由於雌雄魚繁殖期無法同步而難以成功 (He et al., 2011)。特別是對於圈養的魚，親魚不能自然產卵，因為雄魚和雌魚性腺不會同時達到成熟時間。至今已有多種類型石斑魚藉由冷凍保存精液可以在全年中成功進行人工繁殖。

許多研究者針對石斑魚精液進行冷凍保存研究 (Gwo, 1993; Cabrita et al., 2009; Sean et al., 2009; Koh et al., 2010; Peatpisut and Bart, 2010; He et al., 2011; Fan et al., 2013; Lim and Le, 2013)。石斑魚的精液冷凍保存方

案已確定可行，表 1 為綜整目前針對不同種石斑魚精液冷凍保存最佳的稀釋液和抗凍劑等之冷凍保存方案相關研究報告。

石斑魚精液冷凍保存在雜交育種之應用研究

遺傳學 (genetics) 的應用是一種提高農業效率的方法，在農業上已被廣泛應用，並越來越多地用於水產養殖。然而，利用遺傳提高生產效率的改進方法在水產養殖業普遍落後於畜牧業跟農業 (Gjedrem et al., 2012)。運用遺傳改良養殖品種可以通過長期和短期策略。長期策略需持續數次歷時幾十年，基於不同的選擇方法和品系雜交育種，因此，它們一般需要非常長期的投資、成本高且困難。對於海水魚類，據報導有長期選擇計畫僅適用於三種：金頭鯛 (*Sparus aurata*)，歐洲鱸魚 (*Dicentrarchus labrax*) 和

大菱鯪 (*Scophthalmus maximus*) (Teletchea, 2015)。

短期策略，例如基因組操作和雜交，通常用於物種培育的早期階段，因為它們成本低且效果立竿見影。種間雜交經常用於水產養殖，以提高生長速度，在物種之間轉移所需的特性，將兩個物種的所需特性組合成一個單一的魚群，通過生產不育魚或單性後代減少不必要的繁殖，利用兩性異形 (sexual dimorphism) 優勢，提高收穫能力，提高環境耐受性，並提高培養條件下的整體抗寒性 (Bartley et al., 2001)。以石斑魚育種來說，大部分是透過雜交培育期望能產生具有雜交優勢的子代。

首次發表的石斑魚雜交試驗以赤點石斑 (*E. akaara*) 和鑲點石斑 (*E. amblycephalus*) 為目標，試圖產生具有紅色體色和更快生長速度的雜交種 (曾與潘, 1979; Tseng and Poon, 1983)。宋與許 (1987) 以鱸滑石斑 (*E.*

表 1 石斑魚冷凍精液相關研究報告

作者	物種	最佳稀釋液	最佳抗凍劑	精液： 稀釋液比例	冷凍方法	解凍方法
Chao et al., 1992	<i>Epinephelus malabaricus</i>	MFR	10% DMSO + 5% glucos	1 : 20	-100°C LNV or -75°C dry ice	
Gwo, 1993	<i>E. malabaricus</i>	150 mM NaCl	20% DMSO	-	Buried in dry ice or hanging at 1-8 cm from LN surface for 10 min	water bath 20°C
Sanches et al., 2008	<i>E. marginatus</i>	pH 7.8	5% DMSO	1 : 3	-60°C/min	
Cabrita et al., 2009	<i>E. marginatus</i>	1% NaCl	10% DMSO + 10 mg/ml BSA	1 : 9	3 cm above liquid nitrogen 10 min	25°C/30s
Sean et al., 2009	<i>Cromileptes altivelis</i>	Marine Fish Ringer (MFR), Extender 251, Extender 189,	5% DMSO	No sig. different among 1 : 1, 1 : 4 and 1 : 9		

		0.1 M Sodium Citrate (CT) and 0.9% NaCl (NaCl)				
Miyaki et al., 2007	<i>E. septemfasciatus</i>	-	13% trehalose in distilled water	-	-	-
Koh et al., 2010	<i>E. septemfasciatus</i>	NaCl, KCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ NaHCO ₃	-	1 : 49	LN vapour, 2.5-10 cm above the LN (max temp = 50°C)	Water bath 20°C/30s
Tian et al., 2013	<i>E. septemfasciatus</i>	ES1-3 (60 g/L glucose + 10 g/L NaCl + 0.5 g/L NaHCO ₃)	10% DMSO or 10% 1, 2-propylene glycol (PG)	1 : 1	10 cm under the surface of LN	Water bath 38°C/70-80s
Tvan et al., 2013	<i>E. septemfasciatus</i>	FBS	5% DMSO	1 : 49	-	-
Hyogun et al., 2019	<i>E. septemfasciatus</i>	300mM glucose	15% DMSO	1 : 3	-	20°C
Chiahshin et al., 2010	<i>E. lanceolatus</i>	9.2 g NaCl + 0.6 g KCl + 0.25 g CaCl ₂ + 0.35 g MgCl ₂ + 0.2 g NaHCO ₃ /L	20% DMSO	1 : 9	4°C 10 min 3 cm above LN 10 min	-
Fan et al., 2013	<i>E. lanceolatus</i>	MPRS and TS-19	12% DMSO	1 : 1 and 1 : 2	6 cm above LN for 10 min, 5 min on surface	37°C in 1.5 min
Sudrojut et al., 2019	<i>E. lanceolatus</i>	Fish Ringer extender	6% glycerol + 20% Skim milk	1 : 9	4°C 10 min -20°C 48 hrs	45°C/30s
Taweessin et al., 2010	<i>E. coioides</i>	150 mmol NaCl pH 7.5-8	15-20% trehalose	1 : 9	-10°C/min from 25~ -80°C	40°C/15s
Lim and Le, 2013	<i>E. bruneus</i>	LG-ASP2	10% Gly		Frozen in liquid nitrogen vapour (76°C for 3 min)	
Qi et al., 2014	<i>E. moara</i>	EM 1-2	15% DMSO or 10% PG	1 : 1		
Cheng et al., 2013	<i>E. akaara</i>	Fish Ringer extender	30 g/L trehalose + 10% DMSO		7 cm above LN	
He et al., 2011	<i>E. akaara</i>	1% NaCl and 150 mM NaCl	10% DMSO, 10 mg/ml BSA and 20% DMSO	1 : 9	3.4 cm above liquid nitrogen for 10 min	25°C/30s, 40°C/7s and 20°C/30s, 40°C/7s
Maisarah et al., 2018	<i>E. fuscoguttatus</i>	FBS	10-15% PG	-	-17.6°C/min (7 cm above LN)	27°C/15s
Sen et al., 2020	<i>E. fuscoguttatus</i>	0.3 M glucose	10% DMSO	4 : 1-1 : 3	1-5 cm above LN	30-40°C/7s

tauvina) 雌魚及赤點石斑雄魚進行雜交，其子代生長速度比赤點石斑快 50% 以上，並有較佳的抗病力。James 等 (1999) 將棕點石斑 (*E. fuscoguttatus*) 與清水石斑 (*E. polyphkadion*) 雜交，由此產生的雜交種表現出的增長率等於或略高於棕點石斑。Ch'ng and Senoo (2008) 發表棕點石斑及鞍帶石斑雜交試驗結果，其雜交種在國內稱為龍虎斑或珍珠龍膽，也具有生長與抗病優勢。

雜交種石斑的主要吸引力在於它們可增加增長率。最近對棕點石斑魚與清水石斑雜交種的評估得出結論，雜交子代生長率與純親本後代相比分別大 46% 和 67% (Sugama et al., 2014)。另一個主要的雜交石斑魚研究的重點是利用鞍帶石斑雄魚與其他雌性石斑魚雜交，因為鞍帶石斑的生長優勢，通常表現在其雜交子代上 (Fan et al., 2014)。

目前許多其他雜交石斑魚品種已經過試驗或開發，但大部分仍尚未廣泛生產 (表 2)。

結論

就水產養殖而言，透過建立重要經濟魚種或瀕臨滅絕魚類的精液的冷凍保存技術，可將魚類精液長期保存起來，可維持長期人工繁養殖水產生物的種原遺傳多樣性、物種多樣性及種群多樣性，同時亦可提供魚類遺傳育種材料，加速其遺傳育種研究。另，魚類不同種間各見優缺點，藉由進行雜交育種時，常有不同種間無法自行交配、繁殖季節不同或地域隔離等困難，因此需以冷凍精液進行人工授精及其雜交育種之相關研究。由於養殖魚種的多樣性，若要使水產養殖產業

表 2 利用石斑魚冷凍精液進行雜交育種之相關研究報告

物種 (♀ × ♂)	作者
<i>Epinephelus coioides</i> × <i>E. lanceolatus</i>	kiriyakit et al., 2011
<i>E. akaara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	Tian et al., 2015
<i>E. coioides</i> × <i>E. lanceolatus</i>	Liu et al., 2016
<i>E. bruneus</i> × <i>E. lanceolatus</i>	Murata et al., 2017
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	Chen et al., 2018
<i>E. fuscoguttatus</i> × <i>E. tukula</i>	Tian et al., 2019
<i>E. fuscoguttatus</i> × <i>E. lanceolatus</i>	Fan et al., 2020
<i>E. fuscoguttatus</i> × <i>E. lanceolatus</i>	Che-Zulkifli et al., 2020
<i>E. moara</i> × <i>E. tukula</i>	Chen et al., 2021
<i>E. fuscoguttatus</i> × <i>E. lanceolatus</i>	Widyamingsih et al., 2021

有效運用這項技術，則需依魚種特性，建立適當冷凍保存之標準化程序與方法。

石斑魚為臺灣的重要經濟養殖魚種，石斑魚養殖產業要能夠保持永續發展，質量的提升是非常重要的環節。隨著精液冷凍保存技術的發展，採用超低温冷凍保存精液技術可解決上述難題，目前本所已針對臺灣主要幾種養殖石斑魚如鞍帶石斑、棕點石斑、點帶石斑、雲紋石斑 (*E. moara*) 及藍身大石斑 (*E. tukula*) 建立精液超低温冷凍保存技術，冷凍精液解凍後活力與新鮮精液無差異，配合運用在雜交育種試驗上，其受精率可達 90.32%，孵化率可達 87.35%。未來將協助繁殖業者建立臺灣重要經濟魚類精液之長期供應管道，以期為種原保存、生產繁殖應用等提供相關之基礎重要技術。