

水生物種的凍存活用之發展現況

陳建彰、張格銓、白志年、楊順德

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

種質冷凍保存為一種較為簡單的種原管理方式，透過凍存物種的遺傳物質，並結合生殖生物技術，應用於遺傳選育、生物多樣性保存、水生生物的培育及繁殖。依據世界自然保育聯盟 (IUCN) 2015 年的紅色名錄，世界各地的水生生物包括魚類、軟體動物、甲殼類及珊瑚蟲等，已有 5,161 種的存續受到威脅，因此冷凍保存這些生物的遺傳物質，將有機會重建其原生品系與恢復族群豐度。

冷凍基因種原庫的建立需以遺傳學、生殖生理學、低溫生物學及數據管理等為基礎，對每一種生物及其細胞，包括精細胞、卵細胞、胚胎及體細胞等進行研究，以下將介紹淡水、海水及無脊椎生物的凍存發展現況。

冷凍保存研究發展現況

一、魚類精子凍存

目前相關的凍存研究主要聚焦於溫帶及季節性繁殖的物種，其中以鮭科及鯉科之研究最廣泛，種質冷凍的型式包括多種細胞類型，而精子由於尺寸小及耐急冷能力佳，因此相關技術相對成熟。表 1 為近年進行精子保存研究之種類。在淡水魚種精子冷凍方面，已有不少研發成果，包括冷凍速率、冷凍保護劑、精液稀釋液以及解凍後精子活動力、細胞膜及粒線體狀態、染色體的完整性與抗氧化劑的使用等之評估。而蛋白質體學的興起，更有助於深入探討細胞膜的組成、運輸、代謝及訊息傳導，從而瞭解冷凍造成的改變及傷害，人工授精的成功率及其子代的發展，所以相對於海水魚，淡水魚種的精子冷凍研究已相當完善。

表 1 近年研究的精子保存種類

凍存型態	棲息水域	保 存 物 種
精 子	淡 水	大西洋鮭(<i>Salmo salar</i>)、白鱒(<i>Psephurus gladius</i>)、西伯利亞鱒(<i>Acipenser baerii</i>)、河鱸(<i>Perca fluviatilis</i>)、大蓋巨脂鯉(<i>Colossoma macropomum</i>)、虹鱒(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)、大理石鱒(<i>Salmo marmoratus</i>)、鯉魚(<i>Cyprinus spp.</i>)
	海 水	大比目魚(<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)、大菱鮃(<i>Scophthalmus maxima</i>)、塞內加爾鰽(<i>Solea senegalensis</i>)、大西洋牙鮃(<i>Paralichthys dentatus</i>)、笛鯛(<i>Lutjanus spp.</i>)、石斑魚(<i>Epinephelus spp.</i>)、大西洋鱈(<i>Gadus morhua</i>)、歐洲海鱸(<i>Dicentrarchus labrax</i>)、金頭鯛(<i>Sparus aurata</i>)

與淡水魚種的精子凍存研究成果相較，海水魚種相關研究則少得多，主要是因為商業養殖的海水魚種多半在養殖槽中進行自然配對繁殖，較無人工授精的需求。目前以比目魚科 (Pleuronectiformes) 有較多的研究，此乃因為單一雄魚就可產出 5–100 ml 的精液進行凍存，可解決公母非同步產出良好品質配子的問題，並從中優化基因資源及限制疾病因子的水平傳播。笛鯛屬 (*Lutjanus*) 的部分種類，因有商業養殖的需求，且面臨漁業資源過度開發的問題，其中雙色笛鯛 (*Lutjanus analis*) 更被列入 IUCN 紅色名錄，因此也發展了相關的精子凍存研究，以解決種魚供應問題。亞洲國家則對石斑魚精子凍存有相當多的著墨，由於其雌性先熟及雌雄同體的特性，加上以優先撈捕大體型魚而有過漁問題，導致雄魚顯著減少，難以獲得野生雄性種魚進行繁殖，其中烏鰭石斑 (*Epinephelus marginatus*) 及赤點石斑 (*E. akaara*) 已被列入 IUCN 紅色名錄，石斑魚精子凍存即是為了解決該些問題，並可以進行雜交研究，例如鞍帶石斑 (*E. lanceolatus*) 具有成長快速、點帶石斑 (*E. coioides*) 對高密度耐受性佳等優點。

在保育及魚苗放流方面，已應用於鱒魚、鮭魚、鯉科魚類等。保育目的主要針對罕見、瀕臨絕種及面臨威脅的魚種進行凍存，在養殖方面，則是藉以增加遺傳多樣性，減少近親繁殖及馴養造成的影響。此外，精子冷凍保存技術還有其他方面的應用，像是雄魚跟雌魚生產精卵的時間點不同步，如歐洲鰻 (*Anguilla anguilla*)，或是同時捕獲雄雌魚機率很低的魚種，例如歐洲鱒 (*Acipenser*

sturio)。在斯洛維尼亞的精子凍存保育計畫中，野外的大理石鱒 (*Salmo marmoratus*) 因與逃逸的養殖棕鱒 (*S. trutta*) 雜交，已鮮少有純種，目前只有少數蓄養在特定環境中的，仍保有純品系的大理石鱒。若能將雄魚精子在母魚繁殖季節前進行凍存，俟母魚產卵時經由人工授精後，再將發眼卵放到原生河流，則有助於恢復該魚種的族群。

在生物醫學領域中，魚類同為脊椎動物，也已應用於動物模式的相關研究，斑馬魚 (*Danio rerio*) 是最廣為研究的物種之一，青鱗魚 (*Oryzias latipes*) 及劍尾魚 (*Xiphophorus hellerii*) 亦為主要的生物醫學模式魚。斑馬魚基因已完全解碼，用於遺傳學或發育生物學等研究，美國的斑馬魚國際資源中心 (Zebrafish International Resource Center) 已保存超過 9,000 種品系，包括轉基因株 (transgenic strains)、基因敲除株 (knockout strains) 及突變株 (mutant strains) 等，並持續增加中，因此，以活體形式保存這些研究資源的難度亦不斷提升，需要以大規模精子冷凍保存的型式來保存這些遺傳資源，使其管理、維護及運輸更加安全與容易。

二、魚類卵母細胞凍存

卵母細胞及卵巢濾泡的尺寸較小，具有較高的膜通透性，對低溫的敏感性較低，其膜系統也相對不複雜，因此近年也有學者針對卵母細胞及卵巢濾泡的冷凍保存進行研究，主要以斑馬魚等模式生物為對象，還有金頭鯛及一些南美淡水魚種。研究範疇包括冷凍保護劑毒性、冷凍敏感性、細胞膜通透性、卵母細胞與濾泡於不同發育階段的凍存探討、慢速冷凍 (slow freezing) 或玻璃化冷

凍 (vitrification) 技術的比較等。

三、魚類胚胎凍存

從保育的觀點來看，魚類胚胎凍存可以確保父系與母系的基因組能獲得保存；而從養殖的觀點來看，魚類胚胎凍存可以簡化養殖場的育種及管理。然而，魚類胚胎凍存技術迄今仍未確立，主要有四個原因：(1)魚類胚胎表面積與體積比率 (surface-to-volume ratio) 較低；(2)大尺寸的卵黃；(3)膜的通透性低；(4)對低溫的高敏感性等，影響冷凍保護劑的滲透速率，不利於細胞表面及內部均勻升降溫，低溫則易導致細胞受損，使其冷凍保存的難度相當高。過去已探討 20 種以上的硬骨魚胚胎凍存研究，然而存活率均偏低。魚類的胚胎凍存研究課題涵蓋：(1)冷凍過程的變因探討，包括冷凍保護劑的毒性、冷凍與解凍的速率、物種的選擇及胚胎發育階段的凍存選擇；(2)膜的通透性及冷凍保護劑滲入的影響；(3)評估冷凍與解凍後之胚胎的發育及存活；(4)改善胚胎被凍存的能力等，均有待進一步的加強與突破。

四、精原細胞和原始生殖細胞冷凍保存

精子凍存的技術已臻成熟，使得父系的基因組能完善保存，相對的，卵母細胞及胚胎冷凍技術仍遭遇瓶頸。因此，已有部分研究轉向原始生殖細胞 (primordial germ cells)、精原細胞 (spermatogonia) 及卵原細胞 (oogonia) 的凍存，希望能作為保存父系與母系基因組的替代方式，並應用於繁殖研究。

五、體細胞冷凍保存

體細胞為二倍體，其優勢在於同時保有父系及母系的基因組，通常採樣其皮膚或

鱗，因為這兩種組織可以再生，對於瀕臨絕種的魚種或獨特的樣本來說顯得相當重要。採樣後，可以選擇進行細胞培養，直到其細胞數量增殖到足夠凍存或是逕行凍存魚體組織，其冷凍保存並無難度。體細胞的應用可以透過核轉移技術使魚再生，也被稱為克隆 (cloning)，將細胞核以顯微注射的方式，送入已預先去核的卵母細胞中，卵母細胞將重新編程注入的染色質並發育成胚胎，因此其後代帶有供應者的核 DNA，但是不一定有其粒線體 DNA，缺乏供應者的粒線體 DNA 是否會造成影響尚未研究透徹。目前已知體細胞冷凍保存在青鱗魚及斑馬魚上已獲得成功。

六、無脊椎動物的種質(germplasm)凍存

無脊椎動物的種質凍存，對於瀕危物種的復育有相當程度的助益，像是珊瑚礁的退化日益嚴重，種質凍存將確保其基因型能完善保存，直到棲息地完全恢復。對養殖產業也有幫助，可以降低親種的成本等。其保存形式有精英 (含精細胞)、卵母細胞、胚胎及幼蟲。

精子凍存的物種主要聚焦在牡蠣，包括珠母貝 (*Pinctada margaritifera*)、福克多真珠蛤 (*P. fucata martensii*)、太平洋牡蠣 (*Crassostrea gigas*)、維吉尼亞牡蠣 (*C. virginica*) 及葡萄牙牡蠣 (*C. angulata*)。此外，地中海貽貝 (*Mytilus galloprovincialis*)、綠唇鮑 (*Haliotis laevis*)、玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*) 及單肢蝦 (*Sicyonia ingentis*) 也被視為精子凍存的研究目標，探討凍存後之精子的活存率及活動力、相對應的冷凍保護劑及冷凍速率、細胞膜的完整性

及 DNA 損傷評估等。

精莢冷凍保存亦應用於部分無脊椎動物中，如草蝦 (*Penaeus monodon*) 已可凍存至 210 天，大西洋魷 (*Illex coindetii*) 則發現最適冷凍保護劑，提高其解凍後活存率。

相較於魚類難以凍存胚胎，無脊椎動物在凍存胚胎或幼苗 (larvae) 是相對成功的。因其胚胎較小，有利於水分與冷凍保護劑的交換，而卵母細胞的卵黃含量較低，使得冷凍保護劑較易滲入，這些生物特性使得其凍存研究有所進展。目前因太平洋牡蠣較具商業價值，所以多以此為凍存目標，研究其冷凍保護劑及最適濃度、冷凍與解凍速率與冷凍管內的胚胎數量，在幼生階段，擔輪子幼蟲 (trochophore stage) 為最適合凍存的標的，將有助於選拔育種及產出特殊品系如四倍體等。

七、低溫保存相關產業

哺乳動物的配子與胚胎凍存技術已相當成熟，並已發展成有商業利益的模式，像是人類的生殖輔助治療需求不斷增長，也促進了卵子及精子凍存需求，隨著幹細胞的研究進步，使得人們為了醫療用途而開始儲存臍帶血幹細胞。在畜產方面，已有一些公司凍存精子，廣泛的應用於選拔育種，使其帶有特定的遺傳性狀。然而，水生物種在這方面

仍達不到相同水平。提高產量一直是水產養殖的目標，以選拔育種的方式以改善產量仍具有相當的吸引力，因此有生技公司願意提供凍存服務來獲利，分別為 Cryogenetics 及 IMV Technologies 兩家公司，其凍存型式及提供的服務彙整於表 2。因此，考量到冷凍保存技術對於育種的重要性，預期未來會出現更大的市場與商機。

結語

生殖細胞的冷凍保存有著巨大的潛力，可以協助水產生物的繁殖量產，基因改良育種計劃、物種的保護及種原的管理。種質冷凍庫的設立保存了多種細胞類型，包括精子、卵母細胞、體細胞、精原細胞和原始生殖細胞、無脊椎生物的胚胎及幼苗。目前僅有精子冷凍技術成熟，卵母細胞與胚胎凍存仍具備相當的難度，其冷凍程序尚在持續最佳化中，近期的精原細胞和原始生殖細胞凍存研究則期望可以作為其替代品，而以體細胞應用於核轉移技術的發展則尚在研究階段中。水生生物冷凍技術的精進需要不同學門專家的合作，致力於冷凍程序的優化，以期能早日完成目標物種的保存。

表 2 商業生技公司之凍存服務

公 司	凍存型式	凍 存 服 務
Cryogenetics	精 子	大西洋鮭(<i>Salmo salar</i>)、虹鱒、銀鮭(<i>Oncorhynchus kisutch</i>)、國王鮭(<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)、紅點鮭(<i>Salvelinus alpinus</i>)、紅鮭(<i>Oncorhynchus nerka</i>)、棕鱒、河鱒(<i>Salvelinus fontinalis</i>)、銀鱈(<i>Anoplopoma fimbria</i>)、斑馬魚、圓鰭魚(<i>Cyclopterus lumpus</i>)
IMV Technologies	配 子	客製化服務