

應邀參加『水產生物生殖配子及胚體冷凍保存研討會』與會後參觀心得報告

水產養殖系 趙乃賢・許慧文

一、參加會議經過

職等於民國81年 3月28日搭乘華航班機啟程前往巴黎參加“水產生物生殖配子及胚體冷凍保存研討會”，同行者包括東海大學生物系劉主任國鈞、台灣大學農機系林副教授達德，另外海洋大學水產養殖系郭副教授金泉先行前往。一行人於 3月29日下午抵達巴黎，承蒙國科會駐法科技組歐陽組長振羣先生及蔡玲琳小姐協助安排接機及旅館住宿等事宜，使此次行程得以順利開始，在此深致謝意。

3月30日抵達位於巴黎西郊的瑪琍拉。荷城之開會地點，即報到並領取議程相關資料。此次參加會議的國家共21個，包括法國、美國、義大利、烏克蘭、羅馬尼亞、比利時、埃及、蘇維埃、加拿大、德國、日本、澳大利亞、印度、捷克、以色列、英國、匈牙利、芬蘭、南非、大陸及中華民國，發表論文共計54篇之多，我國是除地主國之外，應邀參加人數最多的國家，並發表了 5篇論文。

本次會議由法國自然歷史博物館主辦，主辦人 Dr. R. Billard 為研究魚類精液保存之國際知名學者，於研討會籌備期間負責議程規劃，參加會議人員之聯絡與食宿安排等事務，備極辛勞，但由於他的運籌帷幄，此次研討會堪稱為近年來該研究領域中最多同行專家出席而且層面最深入之學術交流活動，對於從事此方面研究之學者堪稱為一次難能可貴之機會。而對我國而言，參與會議之許多國家，如東歐等，均係首次接觸，平常除由文獻瞭解其所進行之研究外，苦無機會當面討論，此次會議提供了論文發表與交談等各項面對面的管道，對於進一步深入認識目前各國最新之研究現況助益良多。

此次會程共區分為 4大部份，分別為配子生物學(Biology of gametes)、卵和胚體之冷凍保存 (Cryopreservation of eggs and embryos)、精子之短期保存(Short-term

preservation of sperm)及精子之冷凍保存(Cryopreservation of sperm)。3月31日進行配子生物學及卵和胚體之冷凍保存部份，劉主任國鈞發表之論文題目為『介於發眼期與心跳期間的金魚胚體在攝氏零度時的冷凍存活率』(Cryosurvival of Gold Fish Embryos between the Stages of Optical Vesicle and Heart Formation under Subzero Freezing)，對於選擇適當的金魚胚體時期及降溫程式方面提供了基礎研究和實際應用之可行性的寶貴資料。

4月 1日繼續進行卵和胚體之冷凍保存、精子之短期保存及精子之冷凍保存等未完之議程，筆者之一許技師慧文發表了『九孔之卵及胚體對於抗凍劑之耐受力研究』(Studies on the Toxicity Tolerance of Small Abalone Eggs and Embryos to Selected Cryoprotectants)，針對台灣重要的養殖經濟種類之一的九孔之未受精卵及 4個不同時期的胚體對於 4種不同濃度之抗凍劑之耐受程度及其最適之鹽度和酸鹼度範圍做了完整的研究。在水產生物配子冷凍保存之研究中，卵及胚體保存方面起步甚晚，至今仍有待進一步的探討，而本研究收集了供試生物之相關的基本資料，為往後有關卵及胚體之冷凍保存的研究提供了確實的基礎資料及相關數據。

林副教授達德發表了『測量九孔卵對於滲透性及非滲透性溶液之滲透反應』(Measurement of Osmotic Responses of Small Abalone Eggs to Permeating and Nonpermeating Solutes)，受到與會人士的注意及讚賞，他將生物實驗結果經由數學程式模擬推算九孔卵之水滲透係數及活化能之基本參數，再由基本參數，實驗歸納得到理想模式，把實驗設計的範圍有效的縮小，使成功之或然率提高，大幅減低傳統實驗之嘗試錯誤所花費的時間，為以後的研究提供了另一新的進行方向。

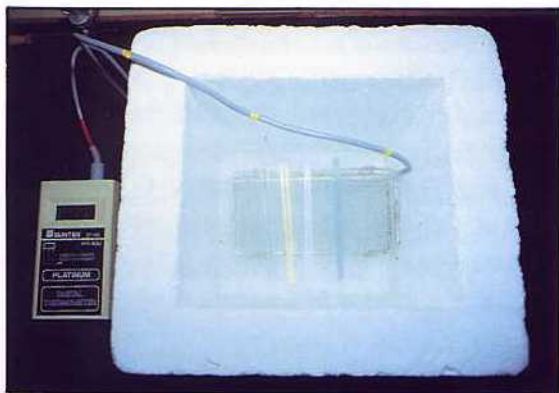
筆者之一趙技正乃賢則發表了『牡蠣胚體的毒性耐受力及抗凍劑之玻璃化特性』(Toxicity Tolerance of Oyster Embryos and Vitrification Characteristics of Selected Cryoprotectants),此與上兩篇同為國科會專題研究計畫項下,由台灣省水產試驗所邀請台大農機所共同合作之部份研究成果。由生物比較測試及數學歸納模式二大方向同時進行,期藉由科技整合及集思廣義之科學化策略來推動困難度較高之生物卵及胚體之冷凍保存研究。此係國際上水產冷凍生物界之創舉,雖然是師法康乃爾大學農學院的做法,但確實付諸實行,也初步產生理想結果,可謂解決前一天大會討論中所提出問題之良方,勢將帶動今後研究方法之進步。

4月1日下午開始進入有關魚類精子冷凍保存之議題,郭副教授金泉以『石首魚精子之冷凍保存—最佳程序之建立、形態變化之評估與活力之檢定』(Cryopreservation of atlantic croaker spermatozoa: optimization of procedures, evaluation of morphological

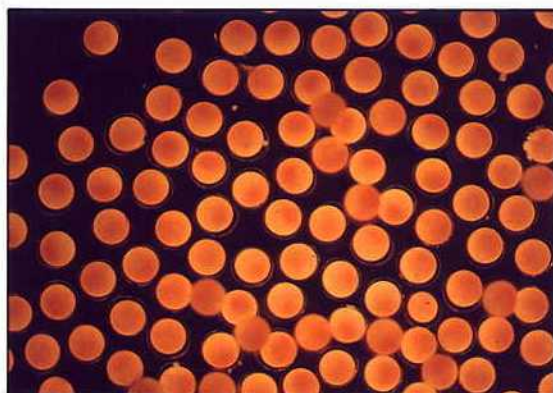
changes, and assesments of motility)為題發表論文,論文中分別以電子顯微鏡與電腦化分析方法比較石首魚精子在不同冷凍保存程式時,經解凍後之活力,進而探討各種影響冷凍保存後活力之因子及其影響程度。此項議題延續至4月2日上午結束,緊接著為綜合討論,由Dr. R. Billard主持,分別對研討會中之4項議題廣泛交換意見,同時亦對於未來應有之研究導向,及國際間相關研究之推動作成結論,最後研討會在與會學者互道珍重再見中圓滿結束。

二、與會心得

此次研討會為國際生物學聯盟於民國80年4月在台北中央研究院舉辦之『國際水產養殖生殖生物學研討會』後所成立之"Reproductive Biology in Aquaculture" (RBA)的系列學術活動之一,該聯盟對於RBA的成員參與其他研究領域,學習新的技術或提供新的建議、RBA成員籌辦相關性質的研習會或研討會、鼓勵年輕科學研究人員參加國際性的研討會、不定期的訪問RBA之研究機關,進行演說及技術的傳授



魚類精液可採簡易降溫法供冷凍保存之前處理



九孔受精卵為冷凍降溫模式推衍之最佳供試材料



冷凍精液保存儀器



牡蠣受精卵對各種抗凍劑之耐性頗強

、對於養殖新興資料的相互間交換傳達、統籌RBA之會議議程及有關事項等皆鼎力支持。

此次研討會期間各議題結束前有綜合討論，針對議題內所發表之論文及相關問題提出討論，大會結束前亦有對於整個研討會之主題進行綜合討論。4月1日晚間，研討會主辦人Dr. Billard亦邀請對於國際學術交流有興趣之各國與會學者們召開討論會，期望能藉由此研討會建立有關水產養殖配子與胚體保存方面研究之國際學術交流網路，利用學術資訊交換，學者互訪與人才訓練來推動研究工作。以下謹就前述討論中之內容歸納個人之與會心得如下：

1、加強影響水產生物生殖配子及胚體品質因子之基礎研究：

此次研討會中對於配子與胚體品質之穩定性與影響因子等有數篇相關論文提出，目前已知魚類配子與胚體之品質受到時間、飼養溫度與環境及光照等因子影響而有變化，且常因種類或個體不同而有相當之差異性，這些差異性的產生除上述因子外，是否還有其他未知因子？而其影響程度如何？類似此類問題仍有待將來全面性的深入研究，從而建立一個好的取材方法。

2、水產生物生殖配子及胚體品質藉人工授精鑑定法之確立：

目前檢定水產生物生殖配子及胚體經冷凍保存後品質之常用指標之一為其經過人工授精之成功率，此檢定方式基本上與人工授精方法與品質檢定技術之確立是直接相關的，而對水產生物而言，此方面仍有相當大之研究空間，也亟待研究者去完成。有關此點，Dr. Billard在其論文中之一段文字即是最好的例子："A well defined medium valid for sperm or ova should be established for artificial fertilization or preservation for each species or group of species ..."

3、玻璃化冷凍保存法之應用：

近年來玻璃化冷凍保存法之應用已逐漸成熟。1960年代經B. J. Luyet等人深入研究之此種冷凍保存方法，曾經由於誤認為玻璃化惟有在極高之冷凍速率下方能達成，因此其於生物系統冷凍保存之實用性研究有將近20年時間沒有突破性之發展，直至1980年代，由於G. M. Fahy與P. Boutron等人對於水溶液玻璃化之

物理特性有了較深入之研究，W. F. Rall亦成功的應用玻璃化法冷凍保存了鼠胚，玻璃化冷凍保存法之研究與應用便如雨後春筍般蓬勃發展起來。在水產生物配子與胚體之冷凍保存應用上，玻璃化法之研究尚在萌芽階段，有待繼續推動，並進一步嘗試此種保存法之應用。此次研討會中來自義大利之Dr. A. Arva於討論中即積極說明玻璃化冷凍保存方法應是水產生物冷凍保存方法之另一新方向，我們嘗試在牡蠣胚體之玻璃化研究正可應證此說。

4、魚類胚體之冷凍保存技術有待突破：

相對於魚類精子之冷凍保存研究與已成功建立之保存方法而言，魚類胚體之冷凍保存研究是不成比例的。其原因主要在於魚類胚體體積與部份魚類外殼之不透水性為影響成功冷凍保存法建立之主要障礙，此外由於魚類卵之滲透壓特性、對抗凍劑之耐受程度、外殼特性等基本資料均相當有限，難以據之設計較具可行性之冷凍保存程序，而僅能以嘗試錯誤之實驗方法找尋可能之方法，因此往往事倍功半，甚至徒勞無功。筆者認為魚類胚體之冷凍保存技術上雖然難度較高，但理論上仍是大有可能成功的，惟首要之務應由基本資料之建立著手。

5、建立冷凍保存程序方法之系統化研究：

此次研討會中曾多次提到目前許多研究單位進行配子或胚體冷凍保存研究時仍是直接依賴“經驗”與“嘗試”，期望能建立起冷凍保存程序，此種研究策略對於短時間內急需奏效之情形，或可一試，但成功之機率通常甚低，尤其是對於胚體而言。筆者認為理想之策略應可從兩方面著手：(1).建立冷凍保存程序設計所需之基本資料，如滲透壓特性、冷凍保護劑耐受性、胚體內凍結溫度等。(2).加強科技整合，統籌與低溫生物學有關多方面專家之技術與知識，由生物、物理、數學、電腦等同時考量各問題點之突破。

6、國際學術交流：

此次研討會中一項附加之成果，為透過4月1日晚間之討論會，部份參與研討會之學者們成立了學術研究與交流的網路，此跨國性之學術交流管道經討論後，主要分為水產生物配子與胚體兩大部份；有關配子部份由英國之Dr. J. Rana負責規劃，有關胚體之研究部份，趙技正乃賢榮膺規劃負責人。此一學術交流網路

初期將以研究者之互訪與學習為始。相信對於未來相關研究之提升與技術交流必有一定程度之助益。回國後已採取行動，先行寄送調查表格給遍佈世界各地二十多個相關主題之研究室。資料回收後預備整理成冊以便彼此瞭解各研究室之人力、設備、研究動向及接受互訪學習之條件與意願，確實組成有意義之交流網路。

三、考察參觀活動

4月3日到法國國立自然歷史博物館所屬魚類研究室參觀，該室主任即為本次大會主辦人之Dr. Billard，其係魚類精液冷凍保存研究之泰斗，對於提攜後進及推動國際合作一向不遺餘力。館內設有圖書室，保存了許多關於人類有史以來從事捕撈行為、漁具漁法及漁獲物處理方式的書籍，有些書冊是於西元14世紀時所繪製成，至今已有7百多年之歷史，其內容詳細、文圖精緻，使人留下深刻印象。除了進行魚類傳統分類之研究外，亦有採用分子生物技術、蛋白質分析及酵素分析等方法，可說是集傳統和現代化於一家。

4月4日與5日適逢週末休息，分別參觀了巴黎市郊之非洲文物館及水族館、楓丹白露法國國王狩獵行宮及法國巴黎第一大學，對於法國之風土文化、學校環境與大眾教育設施多了一分認識。水族館位於非洲館之地下室，分有海水觀賞魚類、淡水觀賞魚類、爬蟲類及稀有水生保護動物等4個大項，每一個展示缸都有其個別的生態習性說明及產地介紹，一目了然，使參觀者很容易得到希望知道的資訊。

4月6日搭乘電車至市郊的法國國立農業研究所(INRA)參觀，此研究所包含了有關農業、畜產、林業及水產等方面的研究項目，其所址廣闊，環境幽雅。Dr. D. Chourrout主持之魚類遺傳研究室是目前唯一成功的繁殖出4倍體魚類的研究室，在魚類之遺傳育種、品種改良及新興方法之開發皆有很傑出的表現。實驗室中經常有數位不同國家之研究人員來作長短期研究，對於研究方法與心得之交流頗有助益。

4月7日經由Dr. Chourrout之介紹，參觀法國從事有關生物技術研究方面之民間公司—CHEMUNEX公司，該公司研究開發代理及有關生物技術應用所需之儀器與相關設備，同時也與法國之國家研究單位如INRA有合作試驗研究的經驗，公司本身亦有一組專業研究人員負責精密實驗之進行，另外還有機械、化學、藥理及應用軟體等方面的人員，公司本身不大，卻可謂“麻雀雖小，五臟俱全”。經由民間公司與政府之研究單位共同合作開發新的研究技術，一



筆者之一(左2)與會議主辦人
Dr. Billard(中)及以色列學者們合影



筆者(左1、右2)與美國學者 Dr. Ciereszko(中)及英國學者
合影於會場一角



筆者(右1、2)與法國學者 Dr. Maisse(中)及台灣大學農機系林副教授
達德(左1)合影於會場外

方面可提昇民間企業之研究開發水準，還可使該項技術真正落實到應用推廣之方向，實為一良好的合作範例。

4月8日上午搭機，於4月9日返抵國門。

四、建議事項：

- (一)承國科會生物處與國合處支持出國申請者來回機票，法方主辦單位提供與會期間之食宿，鼓勵了共5人出席同一國際會議，放寬了出席人員人數的限制。建議今後重要會議視需要而因應比照之。
- (二)研究年資淺但具有潛力者宜多鼓勵接受參加國際會議之發表與討論之歷練，以加速開拓見聞及發展專長，庶幾有利國內研究者在國際交流事務上之薪火相傳。
- (三)我國於水產生物配子與胚體保存方面之研究，在國際上已具有良好之學術地位，同時亦具極佳之水產養殖條件與技術，因此，建議繼續重視我國此方面之研究發展，透過國際會議之舉辦、持續性的支持相關研究及人才的延攬，以強化我國在水產生物配子及胚體冷凍保存方面之先導地位。
- (四)法國主辦人員組織能力強，與國內外同行交流意願高，對年青一代提携有加的作為，在在值得借鏡。

五、攜回資料：

- 1、Arva A., G. L. Fletcher, B. Rubinsky

, M. Mattioli and D. Shehuz (1992) Hypothermic protection-a fundamental property of antifreeze proteins. (in press).

- 2、Rubinsky, B., A. Arva and A. L. Devries (1992) The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. Cryobiol. 29: (in press).
- 3、Ben-Amotz A. and A. Gilboa (1980) Cryopreservation of marine unicellular algae, II. induction of freezing tolerance. Mar. Ecol. Prog. Ser., 2: 221-224.
- 4、Stenzinger W., L. Suter and J. Schumann (1984) DNA aneuploidy in congenital melanocytic nevi: suggestive evidence for premalignant changes. J. Invest. Derma., 8: 569-572.
- 5、Billard R. (1992) Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organisms. (Program, Abstracts and list of participants), Institut National de la Jeunesse et de l'Education populaire Parc du Val Flory, 11 rue Paul Leplat. 58pp.