

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

不同品種牡蠣卵與胚體低溫保存程序之比較研究(III)

A Comparative Studies on the Cryopreservation Protocols for Eggs and Embryos from Different Species of Oysters (III)

計畫編號：NSC 88-2313-B-002-104-YF

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：林達德 國立臺灣大學農業機械工程學系

電子郵件信箱：m456@ccms.ntu.edu.tw

一、中文摘要

本計畫以不同品種之牡蠣胚體與卵為對象，建立實用化之低溫保存程序並探討影響保存程序的因子。本年度為三年計畫之最後一年，分別進行了國內與國外牡蠣胚體與卵的低溫保存程序之比較，同時針對冷凍過後存活的胚體與D-larvae進行電子顯微鏡觀察，以探討冷凍過程對於牡蠣胚體的傷害及對於胚體後續培養的影響。總結在此三年計畫中，我們建立了所試驗之牡蠣胚體與卵之低溫凍結特性基本資料，並且比較了由荷蘭、法國、美國與加拿大進口之不同品種牡蠣胚體經低溫保存後之存活率，亦測試了甘油、乙二醇、丙二醇與DMSO等不同種類冷凍保護劑與冷凍速率對於冷凍後存活率之影響。而在本研究中所建立的冷凍保存程序已證實可以適用於多種品種牡蠣胚體的低溫保存。

關鍵字：掃描式電子顯微鏡、低溫保存、牡蠣、胚體與卵

Abstract

Different species of oyster were selected to establish practical cryopreservation protocols for their embryos and eggs. The time span of this project was planned for three years. The specific research objectives

for this third-year project was to compare cryopreservation protocols, and to examine effects of cryopreservation on the further development of thawed embryos and D-larvae using scanning electron microscope. In this three-year project, we have measured and analyzed the intracellular ice formation (IIF) characteristics of selected oyster eggs or embryos. We have also compared the efficacy of the cryopreservation protocol on oyster embryos of different species imported from Netherlands, France, U.S.A. and Canada. Effects of using different types of cryoprotectants and cooling rates were also tested. Finally, an optimized cryopreservation protocol suitable for oyster embryos was successfully established.

Keywords: SEM, Cryopreservation, Oyster, Embryo and egg

二、緣由與目的

低溫生物學(Cryobiology)為探討生物系統於低溫狀態下之反應與變化的基礎科學[6]。由於此領域與農學、醫學與食品工業等方面無論在學理與應用上，均有密切之關係。最顯著的應用研究如鼠胚、牛胚與豬胚等哺乳類胚體的保存[2,3,13]，以及最近的果蠅胚體低溫保存[11]等。

魚貝類胚體或精子之低溫保存在水產養殖上具有實質之義意，從建立基因庫的觀點而言，低溫保存可以使瀕臨絕種之

魚貝類得以妥善保護，亦有利相關於魚貝類遺傳工程之研究；從養殖生產的觀點而言，則建立低溫保存程序有助於魚貝類之品種改良、繁殖調節與養殖管理[7]。有關魚貝類之低溫保存研究在精子保存方面已有許多成功的例子[1,10,12]，在貝類胚體或卵之低溫保存方面則有關之低溫保存研究較少，但近來亦有初步成功之報告[4,5,8,9]。牡蠣為我國重要的養殖貝類，主要的養殖品種為巨牡蠣(*Crassostrea gigas*)，為因應未來牡蠣養殖產業的發展，積極進行養殖技術的改進是必要的工作。由於法國在牡蠣的養殖技術與研究工作均有相當之水準，透過國際合作的方式將可以加強養殖技術的交流，同時對於我國養殖牡蠣的品種改良將可以提供良好的管道。本中法合作計畫的主要目標為建立實用的牡蠣低溫保存程序並進行不同品種間低溫保存程序的比較分析，同時配合臺灣省水產試驗所養殖系趙乃賢博士之「歐美亞品種之三倍體牡蠣比較研究」計畫與臺灣省水產試驗所東港分所鄭金華博士之「中法牡蠣之雜交育種實驗」計畫，建立試驗研究之相互支援。

三、研究設備與方法

實驗使用打過氣、照過紫外線並經過過濾(0.2 μ m)之海水。活體解剖採取剛開牡蠣之卵及精子，兩者分開放入裝有過濾海水之燒杯中，俟其於海水中達成滲透壓平衡，並以22~23 $^{\circ}$ C室內溫度培養。一小時後分別採取卵及精子一起放入裝有過濾海水之燒杯中。人工取精、取卵與受精之方法，請參見第一年度之計畫報告。卵受精約一小時後，過篩更換海水後繼續培養。

於受精後10小時均勻取燒杯中授精後

培養中之囊胚期牡蠣胚體，放入2.5% Glutaraldehy/過濾海水之固定液中，低溫固定與保存；另外取一滴於滴有2.5% Glutaraldehy/過濾海水固定液之載玻片上，於光學顯微鏡下觀察胚體與拍照。為比較冷凍保護劑的影響，亦均勻採取燒杯中受精後10小時進入液態氮前以2M DMSO冷凍保護劑處理(10min)過之胚體以相同之程序進行實驗與比較分析。

經過低溫冷凍進入液態氮後再解凍者(降溫速率分別為:-1.0 $^{\circ}$ C/min與-16.0 $^{\circ}$ C/min)，亦放入2.5% Glutaraldehy/過濾海水之固定液中，低溫固定與保存並進行光學顯微鏡下觀察與拍照。

成長至D-Larva之試樣，以及入液態氮再解凍後成長至D-Larva之試樣，亦以平行之程序進行處理。各時期固定之胚胎或D-Larvae，接續以一般二段固定與脫水之流程，以供進一步之電子顯微鏡觀察。

四、結果與討論

(一)胚體品質之影響：

控制組胚體之品質對後續之成長具有影響；以經過2M DMSO處理、只經一段前固定液、經過後固定液之胚體形態變化來看，能夠耐受二段固定液者，其後續之成長亦較良好，所得控制組D-Larvae與大小也較正常。品質較差的胚體，在經過2M DMSO處理時、鐵酸後固定處理時，控制組胚體即產生胚體凸起，控制組胚體通常未能通過冷凍試驗或解凍後也未能成長為D-larvae。降溫速率為-1.0 $^{\circ}$ C/min時，冷凍過胚體平均存活率為32%，成長為D-型幼生之比例則可達22%。降溫速率為-16.0 $^{\circ}$ C/min時，解凍後之胚體完整者少。

(二)電子顯微鏡之觀察：

正常胚體與D-Larva：

1.正常囊胚(圖1,2)，其鞭毛量多、形狀完整、胚體被膜形質良好。

2. 正常胚體成長至 D-Larva (圖 3)，其鞭毛量多、形狀完整、殼質與殼上紋路良好。
經冷凍後之胚體與 D-Larvae (-1.0°C/min)：

1. 經冷凍解凍後之胚體有許多破裂而致內容物外露，其被膜亦不完整、被膜之孔隙亦不均勻或較大。而大多數的胚體均在破裂後成為絲團狀物質。(圖 4,5)
2. 經冷凍解凍後之胚體繼續成長為 D-Larva 者，其外型較不完整、外殼孔隙量大、外殼邊緣較不完整。(圖 6)

經冷凍後之胚體與 D-Larvae (-16°C/min)：

1. 經過 2M DMSO 冷凍保護劑處理者，較之未經 DMSO 處理者，其胚體之被膜易產生較大之孔隙，因此認為 2M DMSO 冷凍保護劑處理仍有一定程度之影響。(圖 7)
2. 降溫速率由 -1.0°C/min 增為 -16°C/min 時，胚體受到的傷害較小，雖然就存活率而言，-16°C/min 較 -1.0°C/min 為低，但是未破裂或較完整之胚體，其胚體被膜之巨幅破裂較少、或形質較完整；較之正常胚體，其被膜孔隙網狀較多，而形質仍屬均勻。(圖 8)
3. 就 D-Larvae 成長之觀察結果而言，降溫速率由 -1.0°C/min 增為 -16°C/min 時，則 D-Larvae 之外形易呈畸形、外殼之殼質仍呈孔隙多而大的脆裂狀

五、計畫成果自評

本年度計畫中除了繼續改善不同品種牡蠣胚體的低溫保存程序外，亦同時針對牡蠣胚體或 D-Larvae 進行電子顯微鏡觀察，以進一步了解低溫保存程序過程中對於解凍後存活之牡蠣胚體後續培養之影響。總結在此三年計畫中，我們已依原定目標建立了不同品種牡蠣胚體的低溫特性資料，同時建立了最佳化的低溫保存程序，目前使用 2M 甘油為冷凍保護劑，以

-1°C/min 之速率進行低溫保存，可穩定得到 75% 以上之存活率，顯示所發展的低溫保存程序已具有實用性，此成果甚獲合作單位法國國家海洋研究院(IFREMER)之肯定。

六、參考文獻

- [1] Chao, N.H., Chao, W.C., Liu, K.C. and Liao, I.C. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.* 30:107-118.
- [2] Hayashi, S., Kobayashi, K., Mizuno, J. Saitoh K. and Hirano, S. 1989. Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Record* 125:43-44.
- [3] Leibo, S.P. 1977. Preservation of mammalian cells and embryos by freezing. In: *Cryoimmunology*. 311-334, INSERM, Paris.
- [4] Li, T.T., Tung, H.T. and Chao, N.H. 1993. Cryopreservation of oyster embryos with conventional freezing procedure and vitrification. *Cryobiology* 30:Abstract.
- [5] Li, T.T., Chao, N.H. and Tung, H.T. 1999. Factors affecting survival of cryopreserved oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Cryobiology* 39:192-195.
- [6] Mazur, P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 168:939-949.
- [7] Mounib, M.S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 53 13-18.
- [8] Naidenko, T. 1997. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* oocytes, embryos and larvae using antioxidant echinochrome A and antifreeze protein AFP1. *Cryo-Letters* 18:375-382.
- [9] Paniagua-Chavez, C.G., Buchman, J.T., Supan, J.E. and Tiersch, T.R. 1998. Settlement and growth of Eastern oysters produced from cryopreserved larvae. *Cryo-Lett.* 19:283-292.
- [10] Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17:707-739.
- [11] Steponkus, P.L., Myers, S.P., Lynch, D.V., Gardner, L., Bronshteyn, V., Leibo, S.P., Rall, W.F., Pitt, R.E., Lin, T.T. and MacIntyre, R.J. 1990. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, Vol. 345, No. 6271:170-172.
- [12] Toledo, J.D., Kurokura, H. and Kasahara, S., 1989. Preliminary studies on the Cryopreservation of the blue mussel embryos. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(9):1661.
- [13] Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -296°C. *Science* 178:411-414.

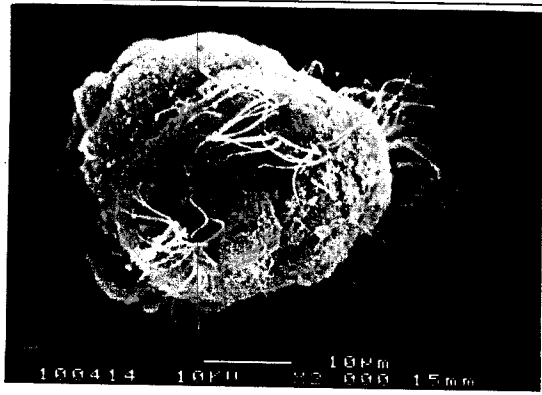


圖 1 正常之牡蠣囊胚期胚體(2000x)



圖 5 -1.0°C/min 降溫速率冷凍後胚體被膜 (10000x)

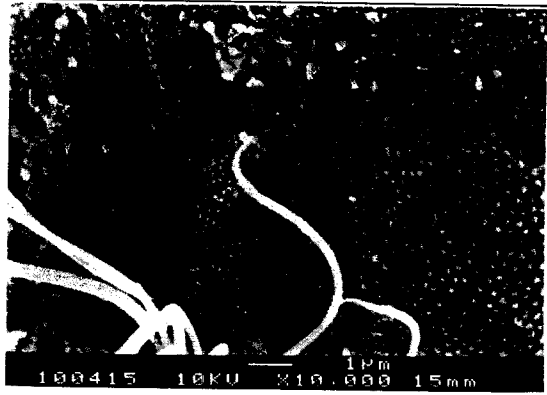


圖 2 正常之牡蠣囊胚期胚體被膜之形質(10000x)

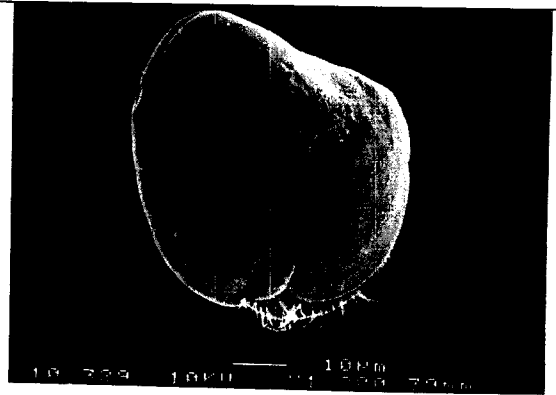


圖 6 以-1.0°C/min 冷凍後培養之 D-Larva (1200x)

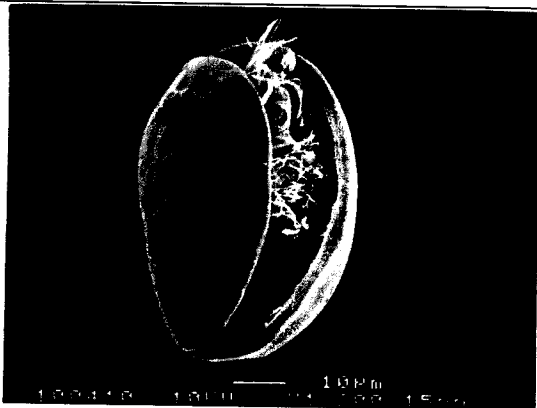


圖 3 正常牡蠣胚體成長至 D-Larva (1200x)

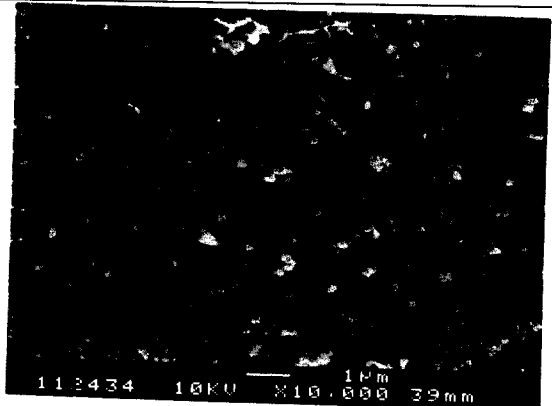


圖 7 2M DMSO 處理對牡蠣胚體之影響 (10000x)

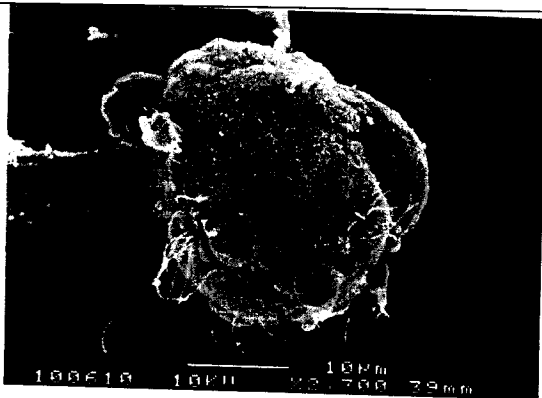


圖 4 -1.0°C/min 降溫速率冷凍後牡蠣胚體 (2300x)

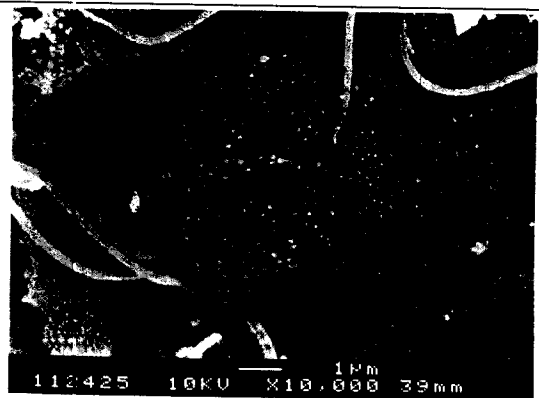


圖 8 -16.0°C/min 降溫速率冷凍後胚體被膜 (10000x)