

人工培育石斑種魚生殖力之研究

葉信利·丁雲源

Studies on the reproduction for broodstock Establishment of groupers

Shinn-Lih Yeh and Yun-Yuan Ting

This paper is a report of the results of preliminary trials of reproductivity and chilled sperm obtained from sex reversal treated *E. fario* and *E. malabaricus*. The results are summarized as follows:

1. Females (*E. malabaricus*, *E. fario*) over 1-year-old were induced to sex reversal with pellet implantation of 17 α -MT and mixing androgen at a dosage of 8 - 19.6 mg/Kg bw.
2. The degree of actively moving sperm was estimated and the levels of motility were classified as : +++++ (the best fast moving), +++ (fast moving), ++ (slow moving), + (more slow moving), - (no action).
3. The duration of sperm movement after being activated was measured to be 60 minutes, and the initial 10 minutes was the time when the sperm is at its best quality for artificial propagation.
4. Trials on grouper sperm suspended in two different solution containing saline and 5% DMSO, which were chilled at storage (4-8°C; 2.5 hours), revealed that the sperm's best activity after being activated by sea water was for 5 minutes. Sperm suspended in the saline solution were more active after chilled storage than those suspended in 5% DMSO under the same condition.
5. Trials on grouper sperm suspended in several kinds of solution containing saline; 5%, 10% and 50% DMSO; and 10% and 50% glycerin, which were chilled at storage (4-8°C), revealed that the sperm were active in the saline solution, which was chilled for 9 days, and in the solutions containing 5% and 10% DMSO, which were chilled for 4 hours; the sperm in the other solutions were not active.
6. Spawners were induce to mature and ovulate injecting them with HCG at a dosage of 500-1000 IU/Kg body weight . Two or three injections, at an interval of 24 hours, were found to be adequate. The total number of eggs spawned were 97,000-1,840,000.
7. Number of eggs obtained from grouper (*E. fario*) which were stripped for artifi-

cial reproduction were 50,000 to 820,000, and the highest fertilization rate reached 59.87%, and the lowest only 5.34%. The hatching rate ranged from 63.2 to 0%.

Key words: *Epinephelus malabaricus*, *Epinephelus fario*, Sex reversal, Induced gonadal maturation, Implantation, Fertilization, Artificial reproduction.

前 言

瑪拉巴石斑 (*Epinephelus malabaricus* BLOCH&SCHNEIDER) 以往被認為是鑲點石斑 (*Epinephelus amblycephalus* BLEEER)^(1,2,3)或是鮭形石斑 (*Epinephelus salmonoides* LACEPEDE)^(4,5,6), 其與青點石斑 (*Epinephelus fario* THUNBERG) 皆被俗稱為“朱郭魚”或“鱸狸”為臺灣目前石斑魚養殖的主要種類。由於此兩種石斑魚成長快速又易管理, 加上市場售價高, 深受養殖戶垂青, 每年放養季節時需苗亦甚殷。但因受到養殖戶喜愛與天然苗供應來源不定導至供需不平衡, 使得苗之價格高居不下又買不到魚苗為一直無法推廣的主因。也因此對此二種石斑魚之人工繁殖研究亦積極進行中^(4,5,6,7,8)。

因瑪拉巴石斑最小成熟體型雌魚可能為 6 公斤, 魚體長約 60 至 70 公分時開始性轉變, 而轉變為雄魚之年齡至少 5 到 10 年以上, 變成雄魚後之體重超過 19 公斤⁽³⁾, 而青點石斑據葉 (1989)⁽⁹⁾所做催熟及排卵之研究, 在體重 2.2 公斤以上之雌魚就有成熟魚, 然雄魚在 7 齡以下之魚一直未發現, 據推斷亦需 8 至 11 年以上才有可能變為雄魚。所以在此二種石斑魚言, 雌性種魚體型較小, 也較容易處理與得到; 但雄性種魚來源與操作卻是一大問題, 要依靠天然種魚做為親魚行人工繁殖也有困難。

故欲解決魚苗來源之瓶頸, 只有從人工培育種魚及魚苗來著手⁽¹⁰⁾, 在以往人工培育種魚之研究中, 使用甲基翠丸固酮或混合之雄性荷爾蒙對促進石斑魚性轉變效果甚佳, 提供了一種培育雄性種魚簡易之方法⁽¹¹⁾, 又以絨毛性腺激素 (HCG) 促進排卵, 雌性石斑魚經 2 至 3 次注射即可獲得人工促進產卵之結果⁽⁹⁾, 而且這些經由魚塢人工培育出之種魚不僅體型小易操作, 且來源易控制, 培養所需時間短又可大量, 替石斑魚之人工繁殖開拓了一個新領域。

然而對於這些在魚塢所育成之石斑種魚的生殖能力卻沒有確切的說明, 是否跟天然種魚同樣具有繁殖後代的能力一直是個疑問, 所以本試驗就是擬對由人工於魚塢育成之石斑種魚, 探討經由人工促進性轉變後雄魚之精子數量, 活動性與生命力等生物學特性, 並嘗試精子短期性儲存之方式, 再配合促進雌魚排卵技術, 於雌魚經荷爾蒙注射催熟後, 選擇不同採卵時機採卵再進行人工授精, 以了解卵及精子是否具有受精能力, 及受精後受精卵能否順利完成胚胎發育與孵出魚苗, 同時並求出最佳採卵時機, 以期建立最有效可靠之種魚培育技術, 提供養殖業者推廣發展, 從此種魚不虞匱乏, 奠定石斑魚養殖發展之基礎。

材料與方法

材料:

試驗用之石斑魚, 雌魚魚齡為 4 至 8 十齡間, 係 1988 年催熟試驗後所留下之青點石斑, 以 20 尾當

材料進行雌親魚相關研究，以體重5.1至6.0公斤，體長69.9至72.2公分，魚齡4十至5十的9尾最多；其次為體重4.1至5.0公斤，體長64.8至67.8公分，魚齡4至5齡3尾；體重9.1至10.0公斤，體長83.2至86公分，魚齡8齡3尾；再其次為體重6.1至7.0公斤，體長71.8至72公分，魚齡5十至6者2尾；體重7.1至8.0公斤，體長75.5至76.5公分，魚齡7及7十亦2尾；另只有1尾體重10.9公斤，體長88公分魚齡8十。

雄魚來源一為瑪拉巴石斑5尾，體重3.0至8.12公斤，體長59.0至76.5公分，魚齡為4至7齡。另一為魚齡1十至2齡之青點石斑3尾，平均體重 1.57 ± 0.38 公斤，平均體長 48.3 ± 3.3 公分；瑪拉巴石斑11尾，平均體重為 1.79 ± 0.10 公斤，平均體長 49.3 ± 0.9 公分，乃1988年10月購自臺南地區養殖戶魚塢內所養之石斑魚。

方法：

首先培育出雄性種魚，再配合雌魚之排卵，以行人工授精達成繁殖之目的。

一、促進性轉變：

將欲培育成雄魚之石斑魚，依葉（1988）埋植法促進性轉變之技術⁽¹¹⁾，以2-phenoxyethanol 300ppm麻醉後，再以含有荷爾蒙之藥粒（pellet）行肌肉植入方式（Intramuscular implantation），將藥粒植入魚體。所使用荷爾蒙種類為甲基睪丸固酮（17 α -methyltestosterone）及混合雄性素（Mixing androgen），其配方及製法則參照葉（1989）⁽¹²⁾，埋植劑量以魚體中每5 mg/kg至20 mg/kg等不同劑量，埋植時以魚體單邊植入為主。

性轉變結果之觀察，依從生殖腺是否能採到精子及生殖腺發育狀態判斷，對性腺發育之分級，I至V為卵巢發育級，VI至VIII為性轉變級，IX至XI為精巢發育級，若直接能採得精子視其為第X級^(13,14,15)。

二、精子活化：

精子採出後以過濾海水活化或置於稀釋液（medium）中保存一段時間，溫度為4至8°C，稀釋液為生理食鹽水，Dimethyl sulfoxide（DMSO）及甘油（Glycerin），再以海水活化以探討其被活化後之活動力及活存時間。

三、促進排卵與成熟

於石斑魚繁殖季節，選捕成熟雌性石斑魚，依其卵徑及卵黃蓄積程度為準，在卵粒大多數發育達到第三卵黃球期（Tertiary yolk stage）或卵徑在400 μ m以上時，以胎盤性腺激素（Human chorionic gonadotropin, HCG）行背肌注射，來促進卵巢最後成熟（Final maturation）達到排卵之目的。雄魚則在雌魚注射第2針時，注射第1針以增強其精子活力，通常雌魚在注射3針後若無反應即予放棄。

四、人工授精：

經催熟之雌魚腹部凸出柔軟且生殖孔泛紅擴大，魚於麻醉後以塑膠軟管吸取卵粒進行鏡檢，並分三種時機採卵，一為遇透明成熟卵時即進行採卵；另一為等魚自行於蕃養桶中排出卵粒時或麻醉後卵粒自行排出時即刻進行採卵；第三為讓魚於桶中首次自行產卵後，再經HCG注射1針後於隔天採卵，並分別計算自行產卵數及採卵數。

精子之採得係將性轉變後之雄魚施以催熟後，預估雌魚將採卵之時間，將雄魚解剖取出精巢，取少許精液置顯微鏡下觀察精子之活力與數目。

在卵與精子俱存下，行乾導法將精子加在成熟卵上，充分攪拌並加入適當海水繼續攪拌完成授精過程，之後以乾淨海水充分洗卵並以容積法計數採卵數，爾後置卵於玻璃缸內讓壞卵或未受精卵沉底，再用虹吸法抽出壞卵並加以計數。最後將浮於上層的受精卵分置於290升之FRP與500升容積之塑膠桶內，以止水打氣方式進行孵化，並估算其受精率與孵化率，受精率%（Fertilization rate%

) = (浮性卵 (Pelagic eggs) / 採卵數 (Total eggs)) * 100% ; 孵化率為任意撈取少許浮性卵，分置於 5 個 1 升燒杯中，俟 24 小時後分別計算死卵數及魚苗數，孵化率% (Hatching rate%) = (魚苗數 / (死卵數 + 魚苗數)) * 100%。

結 果

一、雄魚培育：

於 1989 年元月對 16 尾瑪拉巴石斑及 3 尾青點石斑施以埋植變性手術，至 4 月其性轉變結果如表 1 所示，其中 10 尾經採樣觀察性轉變，全部已變為雄魚，且有 7 尾可採到精子，未能採得精子之 3 尾魚中有 2 尾為青點石斑，1 尾為瑪拉巴石斑。

荷爾蒙之吸收程度，以 17α -methyltestosterone 較佳全為 100%；但藥效則以混合雄性素較好，使用 cellulose 當粘劑的藥粒 (A+C) 其效果亦同，皆能使石斑魚產生精子。魚齡 (1+ 以上) 對性轉變之結果無影響，埋植劑量對性轉變之影響為單位埋植量 8.0 至 19.6mg/kg 魚體重皆有效。

表 1 埋植促進性轉變培育雄性石斑魚試驗

Table 1 Summary of hormonal implantation for induced sex reversal trials on grouper in 1989.

SPECIES	BODY WEIGHT (Kg)	BODY LENGTH (cm)	AGE	ANDROGEN	IMPLANTED DOSE (mg/Kg BW)	ABSORBENT DOSE (%)	GONADAL DEVELOPMENT
E. m.	1.3	45.0	1+	A.	19.3	100.00	X
E. m.	1.7	47.8	1+	A.	11.4	93.16	X
E. m.	1.8	50.0	1+	A.	19.6	44.47	X
E. m.	2.2	52.0	2	A.	10.9		
E. m.	3.0	59.0	2+	A.	21.3		
E. m.	4.4	64.5	4	A.	14.8		
E. m.	4.5	67.8	4	A.	9.7		
E. m.	6.5	70.8	4+	A.	5.1		
E. m.	8.2	76.5	7	A.	5.0		
E. m.	1.5	47.5	1+	MT.	12.0	100.00	X
E. m.	1.9	51.2	1+	MT.	13.5		
E. m.	1.9	49.0	1+	MT.	10.0		
E. m.	1.9	49.8	1+	MT.	10.2		
E. m.	2.4	54.5	2	MT.	8.1	100.00	IX
E. m.	1.7	48.8	1+	A.+C.	12.5	100.00	X
E. m.	1.4	45.0	1+	A.+C.	14.3	80.00	X
E. f.	1.4	47.1	1+	A.+C.	15.5	61.36	X
E. f.	1.0	43.2	1+	MT.	19.0	100.00	IX
E. f.	2.3	54.5	2+	MT.	8.7	100.00	IX

E. m.: *Epinephelus malabaricus*

E. f.: *Epinephelus fario*

A. : MIXING ANDROGEN (TESTOSTERONE, TESTOSTERONE PROPIONATE, MT.)

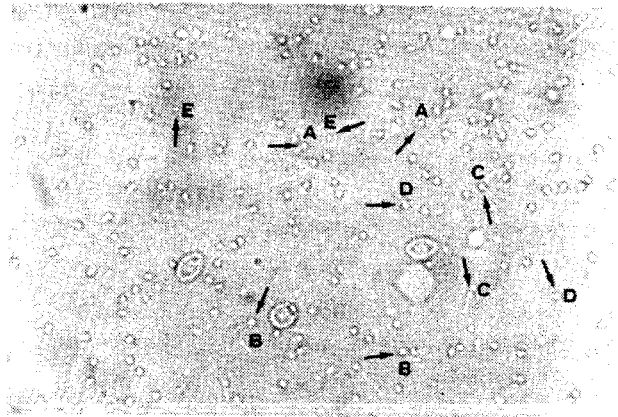
MT. : 17α -METHYLTESTOSTERONE

A.+C. : MIXING ANDROGEN (CELLULOSE)

二、精子活化特性：

(一)、精子活化之活動力：

精子採出後直接以海水活化，其活動性由Olympus BH-2型附PM-10AK自動照像，以10X40（400倍），亮度一定及自動快門控制對其記錄，由其在顯微鏡下移動的快慢及距離約分為5個等級，非常活潑（++++）；很活潑（+++）；活潑（++）；不活潑（+）；不動（-），如相片1中所示。



照片1 精子之活動力（400倍）

Plate 1 The motile of sperm
(400X)

- A :++++ (THE BEST FAST MOVING)
 B : +++ (FAST MOVING)
 C : ++ (SLOW MOVING)
 D : + (MORE SLOW MOVING)
 E : - (NO ACTION)

++++：開始將海水加入精液中，精子立即變的非常活潑，移動非常迅速，距離約為頭部長度的5至7倍，在相片中清楚的拖了一條很長的移動痕跡。

+++：精子仍然很活潑，但在移動速度不若剛開始時迅速，距離約只有2至5倍，且在照相下移動痕跡只有++++的一半。

++：精子移動速度減緩，約頭部2倍以內距離，在照相下移動痕跡更短，但仍是往前移動。

++：精子移動更緩，感覺上是左右震動，偶而稍向前動一下，約頭部1倍以下，在照相下影像延長，而移動痕跡沒有或很小。

-：精子不再動，在照相下顆粒變的清析，此時表示精子已死亡。

(二)活存時間與活化力：

經海水活化後其活化力判斷乃依據精子活動等級與所佔比例多寡，表2為其活存時間及活化力，精子從接觸海水起至停止活動全部時間約1小時，活動程度由++++逐漸降至一級。若以約每10分鐘觀察1次，則在30分內之活力尚可在+++內，超過30分鐘後則活動變差以++為主。若以精子在各時間內活動程度之分配及所佔比例，在10分鐘內，75%以上為++++；在35分時+++為75%以上；在45分以後則75%以上為++以下之活動力，至1小時後則全為一級已為死亡，因此可知精子在被活化後10分內為活力最佳的狀況。

表2 石斑魚精子直接以海水活化之活化力
Table 2 The activity of sperm activated by sea water.

TIME		ACTIVITY	PROPORTION OF
HOUR	MINUTE	DEGREE	SPERM (%)
10	53	++++	100
11	00	++++	75
		+++	25
11	10	++++	25
		+++	75
11	28	+++	75
		++	25
11	38	+++	12.5
		++	75
		+	12.5
11	50	+	10
		-	90
11	55	-	100

++++ : BEGINNING OF ACTIVITY
(THE BEST FAST MOVING OF SPERM)
+++ : FAST MOVING SPERM
++ : SLOW MOVING
+ : MORE SLOW MOVING
- : NO ACTION (DEAD SPERM)

(三)短期保存之活化力：

精子在經生理食鹽水或5%之DMSO (Dimethyl sulfoxide) 於4至8°C, 2.5小時保存後, 再以海水活化其活化力如表3所示, 活化後5分鐘內90%以上為++++; 15分鐘時生理食鹽水尚保持50%以上為++++, DMSO則降至+++級; 至30分時生理食鹽水組有75%為十級, 而DMSO則已有75%為一級; 在60分以後生理食鹽水組有85%已死亡, 而DMSO組也達95%以上, 在100分鐘後則全部死亡, 由此可知精子在生理食鹽水內及5%濃度之DMSO, 4至8°C保存下經活化後5分鐘內之活化力佳, 又經一段時間後以生理食鹽水內之精子活動力較5%之DMSO要好。

表3 石斑魚精子以生理食鹽水及5%DMSO於4~8°C;2.5小時保存後之活化力
 Table 3 The activity of sperm after storage with treatment of saline and 5% dms0 (2.5 hours;4~8°C) .

TIME HOUR : MINUTE	SALINE		DMSO (5%)	
	ACTIVITY DEGREE	PROPORTION OF SPERM (%)	ACTIVITY DEGREE	PROPORTION OF SPERM (%)
13 20	++++	100	++++	100
13 25	++++	90	++++	90
	+++	10	+++	10
13 34	++++	50	+++	50
	+++	50	++	50
13 40	+++	50	++	50
	++	50	+	50
13 45	++	50	++	25
	+	50	+	75
13 50	++	25	+	25
	+	75	-	75
14 30	+	45	+	5
	-	85	-	95
15 00	-	100	-	100

++++ :BEGINNING OF ACTIVITY (THE BEST FAST MOVING OF SPERM)
 +++ :FAST MOVING SPERM
 ++ :SLOW MOVING
 + :MORE SLOW MOVING
 - :NO ACTION (DEAD SPERM)

對於不同稀釋液 (medium) 之保存精子的活化力比較如表 4，在 4 至 8°C 下以 4 小時及每隔 1 天觀察，使用生理食鹽水，DMSO 及甘油配成不同濃度。在 4 小時生理食鹽水及 DMSO 濃度 5% 與 10% 組，使用海水皆可以使精子活化，而 DMSO 濃度 50% 及甘油組皆已死亡。經 1 天後只剩生理食鹽水組能可再使精子活化，餘其他組皆死亡，經過 9 天後生理食鹽水組亦死亡，可知欲較長時間之保存仍以生理食鹽水做稀釋液較佳。

表 4 石斑魚精子於不同稀釋液 (4~8°C) 保存之活化力

Table 4 The activity of sperm treated under different media for short-term preservation (4~8°C) .

TIME (DAYS)	SALINE	DMSO	5% DMSO	10% DMSO	50% DMSO	GLY.10%	GLY.50%
0.17	+	+		+	-	-	-
1	+	-		-			
3	+						
5	+						
6	+						
7	+						
8	+						
9	+						
10	-						

+ : SPERM HAD ACTIVITY
 - : NO ACTION (DIED OF SPERM)
 DMSO : DIMETHYL SUPFOXIDE
 GLY. : GLYCERIN

三、親魚催熟：

石斑種魚於成熟季節時施以HCG注射，促進最後成熟，在雌魚方面（表5），共催熟8尾其體重皆在5.0公斤以上，魚齡4十以上，荷爾蒙劑量由500IU/Kg至1000IU/Kg，注射2至3針，依卵之卵徑大小及成熟度而定。結果8尾中有6尾產卵，1尾過熟及1尾卵退化萎縮。產卵數以184萬粒最多，最少9萬7千粒，而產卵或採卵次數有2至3次，通常注射第1針後48至72小時魚開始排卵，與最初之卵徑有很大關係，如第8尾魚由於卵徑較小只有0.36至0.38mm，雖經3針注射最後後卵還是退化掉。而卵徑大於0.46mm以上則都可促成最後成熟，且以卵徑越大越佳；0.60mm以上只要注射2針即可，0.60mm以下通常需3針，若注射4針後未產卵則卵已退化或過熟。對於產卵數除第6尾以人工採卵法稍多於自然產卵數外，餘皆自然產卵數皆多於人工採卵數。

表5 一九八九年青點石斑荷爾蒙催熟及產卵試驗。

Table 5 Summary of hormonal treatments for induced ovulation trials on *Epinephelus fario* in 1989.

TRIAL NO.	BODY WEIGHT (Kg)	AGE	INJECTION DATE	DOSE (IU/Kg BW)	IOD (mm)	NO. EGGS SPAWNED (1000)	REMARKS
1*	8.00	5+	05/09	500PU	.58-.67	1020 825	G.V. migration GVBD Naturally spawned and stripped OD:.90
			05/10	1000PU	.67		
			05/11		.90		
			05/12				
2	7.15	6+	05/09	979PU	.60-.63	117 33 71	Eggs partially GVBD Over-ripe
			05/10	420PU	.60-.63		
			05/11	979PU	.56-.60		
			05/15	560PU	.75		
			05/18				
3*	10.00	8+	05/17	500PU	.60	600 336	Naturally spawned and stripped OD:.90
			05/18	1000PU	.60		
			05/19	1000PU	.85-.90		
			05/20				
4	6.40	5+	05/22	938PU	.60-.65	117 33 71	Naturally spawned Stripped OD:.90 Naturally spawned OD:.90
			05/23	1016PU	.60-.70		
			05/24				
			05/25				
			05/28				
5	5.00	4+	05/22	800PU	.60	728 51 119	GVBD Naturally spawned OD:.90 Stripped OD:.90 Naturally spawned
			05/23	1000PU	.63-.70		
			05/24				
			05/25				
6*	5.10	4+	05/28			230 343	Naturally spawned and stripped OD:.95
			05/30	588PU	.46-.48		
			05/31	980PU	.42-.52		
			06/01	980PU	.58		
			06/02				
7	5.50	4+	05/30	545PU	.47-.48	13 84	Naturally spawned and stripped OD:.95
			05/31	909PU	.42-.52		
			06/01	909PU	.58		
			06/03				
8	5.10	4+	06/27	980PU	.36-.38	Eggs partially GVBD Eggs degenerated	
			06/28	980PU	.38		
			06/29	980PU	.42-.48		
			06/30		.74-.82		
			07/01				

* : SPAWNED LAST YEAR (1988)

PU : PUBEROGEN (TRADE NAME)

IOD: INITIAL OOCYTE DIAMTER; OD: OOCYTE DIAMTER IN mm

雄魚催熟仍以HCG注射來增加精子量(表6),使用促進性轉變之雄魚年齡約20至40共11尾,以HCG每隔24小時注射1針,荷爾蒙劑量由每公斤魚體重513IU至1250IU,注射後隔天採精共採得7尾石斑魚之精子,其中瑪拉巴石斑6尾及青點石斑1尾。採精時機以注射最後一針後24小時內最佳,否則如第2尾魚雖同樣可採得精子,但因已隔3天之久,所採出之精子濃度低而應用於人工繁殖效果亦差。因此使用HCG促進雄魚精子量,1至3針注射皆有效,但作用之效果則不能持久。

表6 一九八九年雄性石斑魚荷爾蒙催熟試驗。

Table 6 Summary of hormonal treatments for induced maturation on male groupers in 1989.

TRIAL NO.	SPECIES	BODY WEIGHT (Kg)	AGE	INJECTION DATE	DOSE IU/Kg BW.	SPERM (+/-)	IMPLANTATION
1	E. m.	3.90	3+	05/10	513PU*		01/13 64.4 mg A.
				05/11	513PU		
2	E. m.	1.45	2+	05/10	1034PU		01/18 24.7 mg A.
				05/11	1034PU		
				05/15	1034PU		
				05/18		+	
3	E. m.	2.00	2+	05/10	750PU		01/13 35.3 mg A.
				05/11	750PU		
				05/19	750PU		
				05/20		+	
4	E. m.	1.95	2+	05/10	1026PU		01/18 21 mg A.+C.
				05/11	1026PU		
				05/12		+	
5	E. m.	3.80	3	05/18	921PU		05/03(1988) 22.6 mg MT.
				05/19	921PU		
6	E. m.	1.50	2+	05/23	1000PU		01/18 20 mg A.+C.
				05/24	1000PU		
				05/25		+	
7	E. m.	2.45	2+	05/24	816PU		01/18 64.33 mg A.
8	E. m.	2.40	2+	05/24	833PU		01/18 19.38 mg A.
				05/25		+	
9	E. m.	1.60	2+	06/01	1250PU		01/18 18 mg MT.
				06/02		+	
10	E. f.	1.35	2+	05/18	1111PU		01/18 22 mg A.+C.
				05/19	1111PU		
				05/20		+	
11	E. f.	5.60	4+	05/31	893PU		
				06/01	893PU		

*PU : PUBEROGEN (TRADE NAME)
 A. : MIXING ANDROGEN
 MT. : 17 α -METHYLTESTOSTERONE
 A.+C. : MIXING ANDROGEN (CELLULOSE)
 E. m. : *Epinephelus malabaricus*
 E. f. : *Epinephelus fario*

四、繁殖力：

石斑魚經促進性轉變及催熟排卵後試行人工授精，以了解人工育成之石斑種魚所具繁衍下一代能力，其結果如表7所示，由5月至6月共試了6次，雄魚完全使用當年培育性轉變之魚。雌魚則

青點石斑係魚塢培育去年成熟或產過卵之魚，但二者間以產過卵再成熟之魚可採得之卵數較多。卵以採卵方式取得，採卵數由5萬至82萬粒，經乾導法人工授精，受精率最低5.34%；最高59.87%；孵化率最高為63.2%，最低為0。其中以第4及第5次之受精率與孵化率最佳，第2及第6組最差，孵化率皆為0，青點石斑與瑪拉巴石斑雜交魚苗的胚胎發育至孵化，於水溫28°C時需20小時左右⁽¹⁶⁾。

表7 石斑魚繁殖力試驗

Table 7 The fertility test of groupers in 1989.

TRIAL NO.	DATE	MALE		FEMALE		EGGS OF STRIPPED (1000)	FERTILIZATION RATE (%)	HATCHING RATE (%)
		SPECIES	BW. (Kg)	SPECIES	BW. (Kg)			
1	05/12	E. m.	1.95	E. f.*	6.0	825	12.12	8.75
2	05/20	E. f.	1.35	E. f.*	10.0	336	5.34	---
3	05/25	E. m.	1.50	E. f.	6.4	33	23.50	3.70
4	05/25	E. m.	2.40	E. f.	5.0	51	45.64	63.20
5	06/02	E. m.	1.60	E. f.*	5.1	343	59.87	33.36
6	06/03	E. m.	1.60	E. f.	5.5	84	6.70	---

* : SPAWNED LAST YEAR (1988)

BW. : BODY WEIGHT

E. m. : *Epinephelus malabaricus*

E. f. : *Epinephelus fario*

討 論

石斑魚人工繁殖之重點在於雄魚之取得困難又不易操作，所以能短期內培育雄魚成功之方法為最可行之途徑，現經幾年之促進性轉變研究^(7,11,15)，埋植法實為一種簡便經濟又有效之方法，本試驗植入藥物之種類與劑量仍和葉等 (1988)⁽¹¹⁾所用類似，以 17α -methyltestosterone及Mixing androgen (Testosterone:Testosterone propionate:17 α -methyltestosterone) 為主，劑量由5.0mg/kg至20mg/kg魚體重。但此次所用藥粒之粘著劑有3尾不同，係使用cellulose取代原來之Cocoa butter。據葉 (1988)⁽¹¹⁾研究，Cocoa butter之比例不同，則促進性轉變效果亦有異，又Carosfeld et al. (1988)⁽¹⁷⁾在使用LH-RHa藥粒埋植時，亦提到以Cellulose取代部分膽固醇成分，有加速藥粒 (pellet) 之釋放作用，所以本試驗嘗試以Cellulose來取代Cocoa butter看不同粘著劑之功用，有無同樣效果。由於使用Cellulose來製作藥粒 (pellet)，其成型較易而且由試驗結果知促進性轉變之效果並無影響，所以在缺乏Cocoa butter時可用來取代。另在荷爾蒙種類之藥效上，還是以混合雄性素藥粒較佳，使用之魚全可採到精子，與1988年研究相同，混合雄性素大於甲基巯丸固酮藥效，故荷爾蒙之使用，建議以混合雄性素之配方作為促進性轉變之荷爾蒙。

精子活化力之表示，主要在於客觀及主觀之程度是否具有一定的可被接受標準，能不失客觀而又越容易判斷的就越具代表性。一般表示活化力都是看精子在活化後，能活動的所佔比例。如依活動力 (active) 所佔比例分一至+++級，每級以25%為等級 (Withler & Lim, 1982) ⁽¹⁸⁾，或以自動力 (motile) 所佔比例分0至4級，每級亦差25% (Goodall et al. 1989) ⁽¹⁹⁾，但其活動力或自動力之認同標準卻沒有，易引起判定差異。所以本試驗在探討精子之活化力前，先嘗試利用精子瞬間移動之距離定其活動力之等級，做為以後活化力之判斷依據。

由活動力等級所定出之活化力其特點有(1)可區分出活化力之優劣等級(2)從移動距離及所佔比例定出精子整體之活化力比較有判斷依據(3)在定活動力等級標準時，同時也進行人工授精，從孵化出子魚來反證等級標準定的確實(4)精子之活動力是隨時間而遞減，從何種活動等級所佔比例多寡，可了解精子活化後約處於何種狀態，可當人工授精應用時之參考(5)有些精子成熟度不夠，雖能被活化，但活化力卻不佳，由此等級標準可篩選一些劣級精子，對提高受精率與孵化率有很大助益。

石斑魚精子被活化後之活存時間，據粟等 (1988) ⁽¹¹⁾觀察有90分鐘，以前10分鐘之活化力最佳，然本試驗精子活化後活存時間為60分鐘左右比較短些，而活動情形亦以10分鐘內佳，在許多動物繁殖力與精子活動性及時間有很大相關⁽¹⁹⁾，增加精子活動時間及改進精子保存之稀釋液 (medium) 可提高繁殖力。據Withler and Lim (1982) ⁽¹⁸⁾研究，石斑魚精子置於低溫之DMSO濃度10%下可有2天的保存能力，鈴木敬二等 (1989) ⁽²⁰⁾亦指出石斑魚精巢切片釋出之精子懸浮液在4°C下置於生理食鹽水，DMSO及甘油中可做較長時間之保存；另Saad et al. (1988) ⁽²¹⁾對鯉魚 (*Cyprinus carpio*)，Chao et al. (1975) ⁽²²⁾對鱸魚；吳郭魚 (Chao et al. 1987) ⁽²³⁾；Baynes & Scott (1987) ⁽²⁴⁾對trout；Leung (1987) ⁽²⁵⁾對鱸魚及Rana & McAndrew (1989) ⁽²⁶⁾對吳郭魚等皆提到精子之短期保存方法，從7個小時至數週不等。而本試驗此次嘗試低溫冷藏保存，除了生理食鹽水可保存9天，DMSO之濃度5%及10%可保存4小時外，餘皆失敗。究其原因可能是稀釋液 (medium) 配製不妥，未添加抗生素及調整其滲透壓之故，因據Goodall et al. (1989) ⁽¹⁸⁾研究Summer whiting (*Sillago ciliata*) 指出滲透壓為控制精子活化最主要因子，另溫度，陽離子及代謝物質都會影響活動力。而抗生素之添加對於石斑魚精子之保存，據鈴木敬二等⁽¹⁹⁾研究，Streptomycin及Neomycin比Penicillin佳又比未添加組更佳。Saad et al. (1988) ⁽²¹⁾亦指出Antibiotic之添加可延長保存精子由原來2天變成6—8天之活動力。對Salmonides亦有同樣效果，能保持活存更久 (Stoss et al. 1983) ^(27,28)。

為短時間內催熟種魚之目的或增加精子量，一般採用注射法，使用之荷爾蒙有HCG, LH, FSH及LH-RHa等；或以埋植法植入荷爾蒙所製之藥粒，但欲極短時間內促使石斑魚排卵還是以HCG注射效果佳⁽⁹⁾。本試驗亦只用HCG來促進雌魚產卵及增加雄魚精子量，結果對促進產卵及增加精子量有效。但雄魚經荷爾蒙處理後，產生精子之效用期間短，無法維持較長時間，本試驗在注射完24小時後所採得之精子與隔3天後所採得之精子量的結果差異就很大。Saad & Billard (1987) ⁽²⁹⁾對鯉魚之精液收集，從注射後12小時開始，最少量在24小時處，較少量在48至96小時，俟第8天時已採不到。且越晚採到之精子使卵受精之能力越差。同樣若保存越久之精子其活力有減弱現象，如*Epinephelus tauvina*之精子經保存6天後，只剩下5%之活化力使卵受精⁽¹⁷⁾。

此次所選用雌親魚係這幾年來由魚塢培育出之成熟魚，有些在去年雖成熟但未產卵，由連續幾次促進產卵，可知石斑魚在魚塢中可以連續成熟及產卵，林等 (1987, 1988) ^(6,30)亦指出捕自天然海域之石斑種魚於魚塢人工蕃養於隔年同樣會成熟產卵，而且從本試驗知以前產過卵者，在本年度之採卵數皆比未產過卵者多，因此石斑魚重覆做為種魚其效果更佳。

由第一尾石斑苗孵出，意謂著石斑魚人工繁殖又邁入另一領域，完全由魚塢短期內培育成之種魚同樣具有生殖能力，不需再完全依賴天然巨大或多齡之石斑種魚，雖本次試驗6次人工授精中，有2

次並無孵出魚苗，究其原因可能是此次繁殖之卵係完全為人工採卵，自然產卵者皆未用，而採卵時機則關係著卵過熟或未熟導至影響受精率及孵化率。而且每種魚之最適採卵時間不同⁽³¹⁾，如Bass (*Morone saxatilis*) 需在排卵 (Ovulation) 1小時內⁽³²⁾；*Clarias macrocephalus* 10小時 (Mollah and Tan 1983)⁽³³⁾；*Salmo gairdneri* 6天內 (Bry, 1981)⁽³⁴⁾進行。由本試驗知第2次人工授精就是太早採卵，雖採卵數多但油球尚存在2至3個，卵尚未完全成熟（油球單一時為完全成熟），導至受精率差孵化率更差。而第6次人工授精之採卵則太晚，在魚已將大部分卵產出後，採其剩餘之卵，所以採卵數亦少，而因卵已過熟對於受精率及孵化率皆不好；反之餘4次皆於油球單一時所採之卵進行人工授精，其受精率皆有12%以上。

此次人工育成石斑種魚之生殖力探討，雖然最後只孵化出青點石斑（雌）與瑪拉巴石斑（雄）之雜交仔魚，青點石斑之單一種未孵化出，但究其因可能在於採卵時機之故，並非該魚不具生殖能力，因其雄魚之精子活力亦非常佳，經活化時皆呈++++級。而瑪拉巴石斑成熟雌魚未捕捉到，所以亦無魚苗孵出，故青點石斑及瑪拉巴石斑與彼此間雌雄之雜交繁殖比較為今後研究重點，藉以尋找出更佳之新品種。

摘 要

如何在短時間內育成大量成熟石斑種魚與所育成之種魚能繁衍下一代為石斑魚人工繁殖成功及大量推廣之重要關鍵。本試驗即以埋植荷爾蒙促進性轉變之技術，再配合親魚催熟方法，探討由性轉變產生之精子活化後的特性，以及試行人工繁殖，來驗證培育技術可行性與人工所培育之石斑種魚同樣具有生殖能力，實驗經施行後其結果如下：

- 一、以雄性素之甲基睪丸固酮及混合雄性素（甲基睪丸固酮+睪丸固酮+丙酸睪丸固酮）為藥粒，埋植劑量8至19.6mg/kg魚體重來促進性轉變為短時間內培育雄性種魚有效又簡便之方法。
- 二、精子活化後之活動力，依其瞬間移動距離約可分為非常活潑，很活潑，活潑，不活潑及不動5個等級。
- 三、精子以海水活化後，從開始動至停止約60分鐘，以前10分鐘非常活潑，適合做為人工授精之用。
- 四、精子經生理食鹽水或5%DMSO稀釋液保存2.5小時後，經海水活化，其活化力以5分鐘內之活化力佳，又經一段時間後，生理食鹽水內之精子活動力較5%之DMSO佳。
- 五、置4至8°C下，不同稀釋液對精子之短期保存效果，以生理食鹽水內9天最佳，DMSO濃度5%及10%中4個小時次之。
- 六、雌雄種魚皆可以HCG催熟，劑量為500至1000IU/Kg魚體重，注射2至3針即可，產卵數最高184萬粒，最差9萬7千粒。
- 七、雌青點石斑與雄青點石斑或瑪拉巴石斑人工授精，採卵數由5萬至82萬粒，受精率最高59.87%，最低5.34%，孵化率最高63.20%，最低0%。

謝 辭

本試驗工作得以完成，非常感謝臺灣大學漁科所所長郭欽明博士指導，及分所同仁慨借器材提供意見，王村藤先生之鼎力協助，謹此致以最深的謝忱，並感謝農委會之經費補助，本計劃編號為78農建--7.1--漁--31。

參考文獻

1. 陳兼善 (1969). 臺灣脊椎動物誌 (上), 臺北, 357.
2. 梁志達 (1976). 鑲點石斑養殖之初步試驗, 中國水產, 279, 2-24.
3. 湯弘吉、涂嘉猷、蘇偉成 (1979). 鑲點石斑人工繁殖報告, 臺灣省水產試驗所試驗報告, 31, 511-517.
4. 黃丁士、林金榮、顏枝麟、劉繼源、陳其林 (1986). 鮭形石斑之人工繁殖-I, 種魚的催熱, 採卵及胚胎的發育, 臺灣省水產試驗所試驗報告, 40, 241-258.
5. 林金榮、顏枝麟、黃丁士、劉繼源、陳其林 (1986). 鮭形石斑之人工繁殖-II, 仔魚培育試驗及形態變化, 臺灣省水產試驗所試驗報告, 40, 219-240.
6. 黃丁士、顏枝麟、劉繼源, (1987). 鮭形石斑之人工繁殖-III, 種魚的培育, 催熱, 產卵, 臺灣省水產試驗所試驗報告, 42, 317-335.
7. 葉信利、丁雲源、郭欽明 (1987). 促進石斑魚性轉變及產卵之研究。臺灣省水產試驗所試驗報告, 43, 143-152.
8. 丁雲源、郭欽明、葉信利 (1987). 青點石斑魚促進性轉變及產卵之研究。魚類生殖與內分泌之基礎及應用研討論文專集, 162-187.
9. 葉信利、丁雲源、郭欽明 (1989). 荷爾蒙促進石斑魚成熟及排卵之研究。臺灣省水產試驗所試驗報告, 47, 221-242.
10. Chen, F. Y. M. Chow, T. M. Chan and R. Lim (1977). Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* in Singapore J. Pre. Ind. 5(1), 1-21.
11. 葉信利、丁雲源、郭欽明 (1988). 雄性素埋植法促進石斑魚性轉變之研究, 臺灣省水產試驗所試驗報告, 45, 103-114.
12. 葉信利、丁雲源、郭欽明 (1989). 埋植法促進石斑魚性轉變之藥粒製作及操作技術, 臺灣省水產試驗所試驗報告, 47, 215-219.
13. Tan. S. M. and K. S. Tan (1974). Biology of tropical grouper *Epinephelus tauvinal* A. Preliminary study on hermaphroditism in *E. tauvina*. Singapore J. pri., Ind., 2(2), 123-133.
14. 曾文陽 (1984). 石斑魚養殖學, 香港, 48-53.
15. 葉信利、羅武雄、丁雲源 (1986). 人工促進石斑魚性轉變研究, 臺灣省水產試驗所試驗報告, 41, 241-258.
16. 葉信利、丁雲源、郭欽明, 青點石斑與瑪拉巴石斑之雜交繁殖試驗—胚胎之發育。臺灣省水產試驗所試驗報告, 發表中。
17. Carolsfeld, J., Sherwood, N. M., Kreiberg, H. and Sower, S. A., (1988). Induced sexual maturation of herring using GnRH "quick-release" cholesterol pellets. *Aquaculture*, 70, 169-181.
18. Withler F. C. and Lim. L. C., (1982). Preliminary observations of chilled and deep frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture*, 27, 389-392.
19. Goodall. J. A., Blackshaw, A. W. and Capra, M. F., (1989). Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting (*Sillago ciliata*) *Aquaculture*, 77, 247-250.
20. 鈴木敬二、黑倉壽、趙乃賢, (1989). 石斑魚精巢切片釋出之精子懸浮液及冷凍保存。亞洲水產學

- 會學術研討會論文 (中文摘要) , 中國水產, 436, 38-39.
21. Saad, A., and Billard, R., Theron, M. C. and Hollebecq, M. C., (1988). Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71, 133-150.
 22. Chao, N-H., Chen, H-P. and Liao, I-C., (1975). Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture*, 5, 389-406.
 23. 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.
 24. Baynes, S. M. and Scott, A. P., (1987). Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw oocyte fertility. *Aquaculture*, 66, 53-67.
 25. Leung, L. K. P., (1987). Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae), *Aquaculture*, 64, 243-247.
 26. Rana, K. J. and McAndrew, B. J., (1989). The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture*, 76, 335-345.
 27. Stoss, J. and Refstie, T., (1983). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30, 229-236.
 28. Stoss, J. and Holtz, W., (1983). Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32, 321-330.
 29. Saad, A., and Billard, R., (1987). Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 65, 67-77.
 30. 林金榮、張仁謀、劉繼源、陳其林、方玉昆、莊成意、徐明星 (1988). 鮭形石斑繁殖及育苗試驗, 臺灣省水產試驗所試驗報告, 44, 253-266.
 31. Rowland, S. J., (1988). Hormone-induced spawning of the Australian freshwater fish Murray cod, *Maccullochella peelii* (Mitchell) Percichthyidae). *Aquaculture*, 70, 371-378.
 32. Stevens, R. E., (1966). Hormone-induced spawning of striped bass for reservoir stocking. *Prog. Fish-Cult.*, 28, 19-28.
 33. Mollah, M. F. A. and Tan, E. S. P., (1983), Viability of catfish (*Clarias macrocephalus*, Gunther) eggs fertilized at varying post-ovulation times. *J. Fish Biol.*, 22, 563-566.
 34. Bry, C., (1981). Temporal aspects of macroscopic changes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) oocytes before ovulation and of ova fertility during the post-ovulation period; effect of treatment with 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogesterone. *Aquaculture*, 24, 153-160.