

埋植促進石斑魚性轉變之藥粒製作及操作技術

葉信利·丁雲源·郭欽明

Technique of Pellet Implantation and Preparation for Induced Sex Reversal of the Groupers *Epinephelus salmonoides* and *Epinephelus fario*

Shinn-Lih Yeh, Yun-Yuan Ting, and Ching-Ming Kuo

A technique was successfully developed using hormone implantation to induce sex reversal or accelerate vitellogenesis in commercially important groupers. Repeated injections have caused gonadal atresia and even death in species sensitive to stress, and oral administration usually requires higher dosages to be effective. This problem can be avoided by using pellet implantation. However procedural modifications had to be designed to increase its simplicity and cost-efficiency. This paper provides a detailed description of pellet preparation and implantation and serves as a reference on mature grouper culture.

前 言

石斑魚為台灣甚具發展潛力之經濟海水魚種之一，近年來純海水養殖業日受重視，其地位更顯重要⁽¹⁾⁽²⁾。雖然其人工繁殖之研究成果輝煌⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾，但人工繁殖用親魚缺乏也是石斑魚苗無法大量生產的關鍵，所以一直無法大量推廣養殖。

欲解決石斑魚成熟種魚來源之問題，就是要能在魚塢內大量育成成熟親魚。而想調節魚類的生殖作用，除以環境因素（cue）影響外⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾，使用荷爾蒙加以刺激也是一個方法（Lam, 1982）⁽¹⁰⁾。然以荷爾蒙誘導成熟過程需較長期的刺激，以往常利用多次荷爾蒙注射來達到目的⁽¹¹⁾，但重覆操作形成之壓迫（stress），會使得荷爾蒙效力受影響，若改以藥粒（pellet）方式植入魚體內比注射方式能有較長期效果（Crim, 1985）⁽¹²⁾。所以使緩慢釋出荷爾蒙做為慢性處理減少操作次數亦為另一模式。

埋植 LH-RHa 之藥粒或混有 17 α -methyltestosterone 裝於 silastic capsule 內⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ 植入鮭、鱒、鱧、虱目魚，可以加速這些魚之生殖循環。LH-RHa 之主要功用可以促進腦下腺 GtH 的分泌，進而促進卵黃形成（Vitellogenesis），並誘發成熟與排卵，而且 LH-RHa 且有持續性的功能，適與膽固醇（Cholesterol）製成藥粒（pellet）植入魚體⁽¹⁵⁾。

所以，本試驗也利用荷爾蒙製成藥粒，再以埋植方式將含有不同荷爾蒙成分之藥粒植入石斑魚體內，促進石斑魚成熟。又因石斑魚為雌雄同體之先雌後雄魚類⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾，要得到雄魚困難，故需先促其性轉變為雄魚再加以催熟，而以往促進石斑魚性轉變的方法為口服投餵方式⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾，不僅不方便，不

經濟，效果也不一。所以本研究乃改採埋植法 (Implantation)，進行促進性轉變試驗，從1985年至1987年以青點石斑 (*Epinephelus fario*) 及鮭形石斑 (*Epinephelus salmonoides*) 為對象，試驗結果令人非常滿意，1次的埋植操作，經2個月的時間就可使石斑魚提早性轉變變成雄魚，成功率達100%⁽²⁾。同樣地，在促進雌魚成熟上，從1985年至1988年之試驗期間，亦能使石斑魚性腺發育成熟至卵黃第三期 (tertiary yolk globule stage)，甚具效果⁽²⁾，所以石斑魚之催熟，應用埋植法值得加以考慮。

又Lee (1985)⁽²⁾詳述了LH-RHa藥粒 (pellets) 之製作方法，對於LH-RHa之藥粒製作提供了一個很好方法；而雄性素藥粒之做法，雖Moore (1981)⁽²⁾曾描述含晶固酮 (Crystalline testosterone) 之silastic capsules的製作技巧，Lee (1986)⁽²⁾亦提到含17 α -methyltestosterone之silastic capsules之製作方法，但其使用後催熟效果不一。且本試驗亦曾以含晶固酮 (testosterone) 之silastic tube對石斑魚做促進性轉變實驗，因部分魚於8天後死亡，另部分魚2個月後吸收效果不顯，所以確切功效尚待進一步探討。

況且，不利用silastic capsule或tube直接將雄性素做成藥粒之製法，不僅做法簡單、經濟，而且於試驗後成功率很高⁽²⁾，故乃將促進石斑魚性轉變及成熟之藥粒製法及操作技巧做一說明，以供參考推廣之應用。

結 果

一藥粒 (pellets) 之組成：

各種埋植用荷爾蒙其成份如表1所示。

(一) 17 α -MT藥粒 (pellet)：

雄性素17 α -methyltestosterone 300mg，添加0.25ml，75%酒精液 (15ml絕對酒精 + 10ml蒸餾水)，再加18mg cocoa butter製成藥粒，每個藥粒直徑2.2mm，通常每1cm長，重量在25至27mg間，所含荷爾蒙成分為93.6至95.9%之純度，亦即cocoa butter之含量約佔5%，依製造藥粒之經驗及預備試驗，若低於此含量17 α -methyltestosterone形成粒狀粘結力弱，擠壓後易碎，不易成型，但若高於10%之含量，若製造過程經過乾燥則不易擠壓出藥粒，且擠壓出後之藥粒過硬，造成石斑魚不易吸收。

(二) 混合雄性素 (Androgen mixture) 之藥粒：

使用1:1:1之比例，以Testosterone，Testosterone propionate，17 α -methyltestosterone三種雄性素各100mg，及0.25ml，75%酒精溶液溶解，再加cocoa butter少於18mg製成藥粒，直徑為2.2mm，每公分長約有30.6mg重左右，所含荷爾蒙劑量濃度95%，亦即每種雄性素成分約佔32%，也即cocoa butter之含量低於總劑量之5%，因Testosterone本身就稍具粘性，所以粘結劑需量不必太高。

(三) V.E (α -Tocopherol) 藥粒：

α -Tocopherol 201mg，加上0.2ml，75%酒精溶液溶解，再加10mg cocoa butter，混合均勻後製粒。每個藥粒直徑約2.2mm，長1cm重約25.5mg，含 α -Tocopherol成分為95.3%。

(四) HCG藥粒：

以 α -Tocopherol 100mg為主，加5000 IU之HCG (Puberogen日本製)，再加0.5ml，50%之酒精溶液 (10ml絕對酒精 + 10ml生理食鹽水)，不加粘結劑，製成之藥粒直徑2.2mm，每1cm長約重29.5mg，所含HCG成分，約每mg重之藥粒有50 IU之HCG。

(五) 17 α -MT + HCG藥粒：

表1 荷爾蒙藥粒 (pellets) 之種類與組成

Table 1 The hormonal composition of pellets for induced sex reversal and maturation by implantation.

Pellet type	Hormone	Composition Dosage(mg)	Cocoa butter (mg)	Alcohol % (ml)	Remarks
17 α -MT	17 α -MT	300	18	75 0.25	Pellet diameter 2.2 mm, length 1 cm weight 26.7mg
A. M.	17- α -MT Testosterone T. P.	100 100 100	18	75 0.25	Pellet diameter 2.2 mm, length 1 cm weight 30.6mg
V. E.	α -Tocopherol	201	10	75 0.20	Pellet 25.5 mg/cm.
HCG	Puberogen α -Tocopherol	5000(iu) 100		50 0.50	Pellet 29.5mg/cm diameter 2.2 mm
17 α -MT + HCG	17 α -MT Puberogen	300 6000(iu)		50 0.60	Pellet 31.6mg/cm diameter 2.2 mm
Testosterone	Testosterone	300	18	75 0.25	Pellet 27.9mg/cm diameter 2.2 mm
T. P.	T. P.	300	18	75 0.25	Pellet 27.5mg/cm
Silastic tube	Testosterone silastic tube	12.9 27.2	5.9		Length of pellet is 1.8 cm and diameter is 2 mm
β -E2	β -Estradiol α -Tocopherol	50 200		75 0.20	Pellet 28.5mg/cm diameter 2.2 mm
β -E2 + HCG	β -Estradiol α -Tocopherol Puberogen	100 150 5000(iu)		50 0.50	Pellet diameter 2.2 mm, length 1 cm weight 29.5mg
	β -Estradiol α -Tocopherol Peamex	100 150 5000(iu)		50 0.50	Pellet diameter 2.2 mm, Length 1 cm weight 32.1mg
A. M. + HCG	A. M. HCG				The component rate is 1:1
LH-RHa	LH-RHa Cholesterol	2 190	10	50 0.30	Reference: Lee (1986) Pellet 30.5mg/cm

17 α -MT: 17 α -methyltestosterone ; A. M. : Androgen mixture; T. P. : Testosterone propionate;
HCG: Human chorionic gonadotropin

17 α -methyltestosterone 300 mg 及 6000 IU 之 HCG，加上 0.6 ml 之 50 % 酒精溶劑，每 cm 長之藥粒約重 31.6 mg，直徑 2.2 mm。每 mg 藥粒含 HCG 之成分為 20 IU。

(六) Testosterone 藥粒：

取 300 mg Testosterone 加上 75 % 酒精 0.25 ml，與 18 mg cocoa butter，製成之藥粒，每 cm 長重約 27.9 mg，直徑 2.2 mm，所含荷爾蒙成份為 95 %，粘結劑因 Testosterone 本身稍具粘性，似可降低使用量。

(七) T.P. 藥粒：

藥粒為 300 mg Testosterone Propionate 及 75 % 之酒精 0.25 ml 與 18 mg cocoa butter 組成。每 cm 長藥粒約重 27.5 mg，直徑 2.2 mm。荷爾蒙成份為 95 %。

(八) Silastic tube 藥粒：

Silastic tube 長 1.8 cm，重 27.2 mg，內徑 2 mm，內裝 Crystalline Testosterone 12.9 mg，另以 5.9 mg 之 cocoa butter 將兩頭封口。

(九) β -E₂ 藥粒：

β -Estradiol (雌二醇) 50 mg 加上 α -Tocopherol 200 mg，再加 75 % 酒精 0.2 ml。藥粒為每公分長重約 28.5 mg，成分為每 mg 藥粒中有 80 % α -Tocopherol 與 20 % β -Estradiol。

(十) β -E₂ + HCG 藥粒：

此種藥粒有兩種，第一種為 β -Estradiol 100 mg， α -Tocopherol 150 mg，HCG (Puberogen) 6000 IU，50 % 酒精溶液 0.5 ml。製成之藥粒直徑 2.2 mm 長 1 cm 重約 29.5 mg。成分為 α -Tocopherol 60 %， β -Estradiol 40 %，及每 mg 藥粒含 20 IU 之 HCG。另一種為 β -Estradiol 100 mg， α -Tocopherol 150 mg，Peamex 5000 IU 及 0.5 ml 之 50 % 酒精溶液，製成之藥粒直徑 2.2 mm，每 cm 長約重 32.1 mg，成份為 β -Estradiol 佔 40 %，與含 20 IU 之 Peamex。

(十一) 混合雄性素加 HCG 之藥粒 (A.M. + HCG)：

此藥粒 (A.M. + HCG)，乃混合雄性素之藥粒，加上 HCG 之藥粒一起使用，其比例為 1 : 1，即 A.M. + HCG 每 mg 表示其中有 0.5 mg 為 A.M.，0.5 mg 為 α -Tocopherol 與 25 IU 之 Pubengen。

(十二) LH-RHa 藥粒：

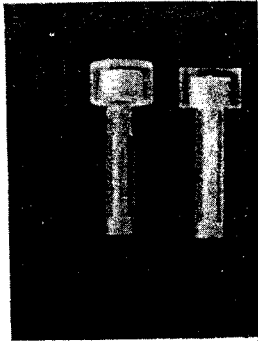
LH-RHa 2 mg，Cholestérol 190 mg 加上 10 mg cocoa butter，與 50 % 酒精 0.3 ml。製成之藥粒每公分長重約 30.5 mg/cm。

二藥粒 (Pellet) 配製：

首先將荷爾蒙置於玻璃小鉢中，將酒精溶液以適當濃度調配好，加入荷爾蒙內，將荷爾蒙溶解，並攪拌成糊狀，再加入粘結劑 (cocoa butter)，約 5 % 量，經充分均勻攪拌後，置於室溫 30 分鐘乾燥，若不加粘結劑或以酒精 50 % 溶解之荷爾蒙則置於 37°C 之烤箱 (oven) 乾燥 1 小時。將經去除部分液體或溶劑之荷爾蒙，均勻混合後，分批塞入擠粒管 (照片 1)，內徑為 2.2 mm。一邊以螺絲帽鎖住，一邊以圓柱銅棒將荷爾蒙擠壓，每次以塞滿擠粒管 3 cm 長左右之荷爾蒙量於管內，經施壓後為 1.5 cm 至 2.0 cm 之長度的藥粒為準，之後再將螺絲帽放鬆，由另一邊將荷爾蒙推出即成粒狀 (pellet)，並藥粒成型乾燥後，分別稱重加以記錄重量，做為試驗用之藥粒 (pellets) (照片 2)。

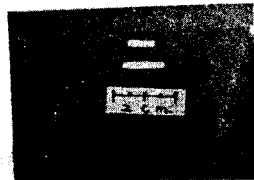
三藥粒 (pellets) 植入方法：

植入器 (照片 3) 內徑 2.5 mm，用以將藥粒或 silastic tube 植入魚體內，先將所欲植入之



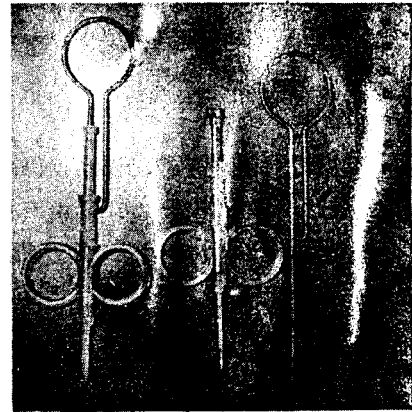
照片1 擠粒管

Plate 1 Pellet mold



照片2 荷爾蒙藥粒

Plate 2 Pellet



照片3 植入器

Plate 3 Implanter

劑量裝於植入器 (Implanter) 內。再將石斑魚以 300 ppm 之 2-phenoxyethanol 麻醉後，於魚體背側部分，用解剖刀在所欲植入之部位的鱗片下輕畫一切口，長度約 0.5 至 0.8 公分，再將植入器對準切口推入，之後用拇指施力推進荷爾蒙，並緩慢抽出植入器，則可將荷爾蒙藥粒植入。

討 論

使用荷爾蒙調節魚類內分泌系統，來改變魚類生殖作用有許多方式⁽²⁾，如口服投餵、注射、埋植等，但基本考慮因素為有效、經濟、方便與減少傷害等 (Crim, 1985)，埋植法一般使用於腹腔埋植，後經 Lee (1985)⁽²⁾ 改應用於肌肉埋植，效果一樣，而可減少傷害。本研究亦曾發生同樣情形，在使用腹腔操作時，較以肌肉埋植傷口較難痊癒，而且容易死亡⁽²⁾，並行肌肉埋植之吸收荷爾蒙效果良好。

藥粒 (pellets) 製作後之長度、直徑、密度等都會影響到荷爾蒙之釋放率，Kent et al, 1980⁽²⁾ 指出藥粒的表面積會影響到 LH-RHa 之釋放率。Lee (1986)⁽²⁾ 也提到荷爾蒙相同，但藥粒之形狀、密度不同，其效果亦不同，所以藥粒製作後之長度、直徑、重量都應記錄，以測出劑量、表面積、密度對荷爾蒙釋放率及生物活性之影響。雖然本研究利用同一擠粒管製造出相同直徑之藥粒，但由於各種荷爾蒙藥粒之配方不盡相同，致所製造出之藥粒其每公分長度之重量皆不相同，其重約在 25 mg 至 32 mg 間，而同一荷爾蒙成分的藥粒之差也在 ± 0.5 mg 間。雖在進行試驗時都有針對每個藥粒分別稱重，但長度却未分別記錄，所以表面積對釋放率之影響無法進行比較，為今後應加強之重點。

荷爾蒙之種類不同，被製成 pellet 之方式亦異，Moore (1981)⁽²⁾ 以 Silastic capsules 含 Crystalline testosterone 能有效釋出荷爾蒙一年或更久時間。但若欲增快釋出率，則 L.W. Crim 建議將 17 α -methyltestosterone 溶於蓖麻油 (castor oil) 中，再裝入 Silastic capsules；但此方法會因減少荷爾蒙劑量濃度，而可能減低荷爾蒙其效力 (Lee et al 1986)⁽²⁾，所以必需間隔一段時間重新植入，在虱目魚同樣亦需 2 至 3 個月重新植入 (Lee 1986)。而本試驗是直接將雄性素製成藥粒再植入魚體中，發現是否需再植入荷爾蒙與植入荷爾蒙種類與劑量多寡有很大關係，通常以 Testosterone 及 Testosterone propionate 製成之藥粒被吸收較快，但效力也弱，若在埋植量 10 mg/Kg BW 以下時，2 至 3 個月後需再植入 1 次，而 17 α -MT 及 A.M. 效力強，在 5 mg/Kg BW 以下之埋植量時，若能 2 至 3 個月間再補植入 1 次，其效果會更佳⁽²⁾。至於與用 Silastic tube

內裝 testosterone 之藥粒效果比較，因埋植 Silastic tube 試驗魚於實施埋植 8 天後死亡，效果未能看出，故是否對石斑魚促進性轉變之確實效果，則有待進一步探討。

摘 要

埋植法應用於促進石斑魚性轉變，是培育石斑種魚及人工促進石斑魚性轉變的一大改革，不僅操作簡單，劑量易控制，成本低，最重要的是對魚類所造成之壓迫 (stress) 低，並可減少處理次數，促進性轉變成功率極高。本報告就是將埋植法促進成功性轉變之藥粒製作法與埋植操作方法做一說明。

謝 辭

本研究工作得以完成，非常感謝王村籐先生之鼎力協助，及分所同仁慨借器材，提供意見，謹此致以最深的謝忱。

參考文獻

1. 梁志達 (1976). 鑲點石斑養殖之初步試驗。中國水產，279，2 - 24.
2. 曾文陽 (1984). 石斑魚養殖學。香港，48 - 53.
3. 湯弘吉、涂嘉猷、蘇偉成 (1972). 老鼠斑人工繁殖試驗。中國水產，324，19 - 24.
4. 曾文陽、何光錫 (1979). 香港紅斑之人工繁殖 (胚胎及魚花期之發育)。漁牧科學雜誌，6，9 - 20.
5. 黃丁士、林金榮、顏枝麟、劉繼源、陳其林 (1986). 鮭形石斑魚之人工繁殖 - I，種魚的催熟、採卵及胚胎的發育。台灣省水產試驗所試驗報告，40，241 - 258.
6. 林金榮、顏枝麟、黃丁士、劉繼源、陳其林 (1986). 鮭形石斑魚之人工繁殖 - II，仔魚培育試驗及形態變化，台灣省水產試驗所試驗報告，40，219 - 240.
7. Crim L. W. and Evans, D. M., (1982). Positive testosterone feedback on gonadotropin hormone in the rainbow trout, In, C.J.J. Richter and H. J. Th. Goos (Editors), Proc. Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish, Pudoc, Wageningen, 23.
8. Lam, T. J. (1983). Environmental influences on gonadal activity in fish, In, W. S. B Horar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (Editors), Fish physiology, Vol, IX, Part B, Academic Press, New York, Ny, 65 - 116.
9. Stacey, N. E. (1984). Control of the timing of ovulation by exogenous factors, In, G. W. Potts and R. J. Wooten (Editors), Fish Reproduction, Strategy and Tactics, Academic Press, London 207 - 222.
10. Lam, T. J. (1982). Applications of endocrinology to fish culture, *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 39, 111 - 137.
11. Yamamoto, K., Morioka, T., Hiroi, O. and Omori, M., (1974). Artificial maturation of female Japanese eels by the injection of salmon pituitary, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 40, 1 - 7.
12. Crim, L. W. and Glebe, B. D., (1985). Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LH-RH-analog, *Aquaculture*, 43, 47 - 56.
13. Harvey, B., Nacario, J., Crim, L. W., Juario, J. V. and Marte, C. L. (1985). Induced spawning of sea bass, *Late calcarifer*, and rabbitfish, *Siganus guttatus*, after implantation of pellet LH-RH analogue, *Aquaculture*, 47, 53 - 59.
14. Lee, C. S. Tamaru, C. S., Banno, J. E., Kelley, C. D. Bocek, A. and Wyban, J. A.

- (1986). Induced maturation and spawning of milkfish, *Chanos chanos* Forsskal by hormone implantation, *Aquaculture*, 52: 199 - 205.
15. Kent, J.S., Vickery, B.H. and McRae, G.I., 1980. The use of a cholesterol matrix pellet implant for early studies on the prolonged release in animals of agonist analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. 7th Int. Symp. Controlled Release of Bioactive Materials, Fort Lauderdale, FL, U.S.A.
 16. Smith C.L. (1965). The patterns of sexuality and the classification of Serranid fishes, *Amer. Mus. Nov.* (2207), 1 - 20.
 17. Tan. S.M. and K.S. Tan (1974). Biology of tropical grouper *Epinephelus tauvina*. A. Preliminary study on hermaphroditism in *E. tauvina*, *Singapore J. Pri, Ind* 2(2), 123 - 133.
 18. Chang-Po Chen, Hwev-Lian Hsieh, and Kun-Hsiung Chang (1980). Some aspects of the sex change and reproductive biology of the grouper *Epinephelus diacanthus* (CUVIER ET VALENCIENSIS), *Bull, Inst, Zool. Academia Sinica* 19(1), 11 - 17.
 19. Chen, F.Y.M. Chow, T.M. Chao and R. Lim (1977). Artificial and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* in Singapore *J. Pri, Ind*, 5(1), 1 - 21.
 20. 葉信利、羅武雄、丁雲源 (1986). 人工促進石斑魚性轉變研究, 台灣省水產試驗所試驗報告, 41, 241 - 258.
 21. 葉信利、丁雲源、郭欽明 (1987). 促進石斑魚性轉變及產卵之研究, 台灣省水產試驗所試驗報告, 43, 143 - 152.
 22. 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, 台灣省水產試驗所試驗報告, 45, 103 - 114.
 23. 葉信利、丁雲源、郭欽明 (1988). 荷爾蒙促進石斑魚成熟之研究。台灣省水產試驗所試驗報告, 發表中。
 24. Lee, C-S, Tamaru, C. S. and Crim, L. W., (1985). Preparation of a luteinizing hormone-releasing hormone cholesterol pellet and its implantation in the milkfish (*Chanos chanos* Forsskal), In, C. S. Lee and I. C. Liao (Editors), *Reproduction and Culture of Milkfish*, Oceanic Institute, Hawaii and Tungkang Marine Laboratory, Taiwan 215 - 216.
 25. Moore, F.L. (1981). Technique for making small hormone-filled capsules. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 43, 409.
 26. Lee, C.-S., Tamaru, C.S. and Kelley, C.D., (1986). Technique for making chronic-release LHRHa and 17α -methyltestosterone pellets for intramuscular implantation in fishes, *Aquaculture*, 59, 161 - 168.
 27. Crim, L. W. (1985). Methods for acute and chronic hormone administration in fish, In, C-S, Lee and I. C. Liao (Editors), *Reproduction and Culture of Milkfish* Oceanic Institute, Hawaii and Tungkang Marine Laboratory, Taiwan, 1 - 13.