

鹽度對黑鯛生殖腺最後成熟階段之影響

朱永桐* · 葉信利 · 許晉榮 · 丁雲源

行政院農業委員會水產試驗所 海水繁養殖研究中心

摘 要

黑鯛 (*Acanthopagrus schlegeli*) 是台灣重要的海水養殖魚種。屬廣鹽性魚類。本研究旨在究明鹽度對黑鯛生殖腺最後成熟階段之影響，實驗期間係配合黑鯛的自然生殖期，也就是每年的一月到三月。於生殖季前將雌、雄黑鯛分別馴化於 5、15、25、35、45 ppt 五組不同鹽度的水泥池中蓄養，觀察其生殖腺之變化。結果顯示，雌魚的卵徑大小不因馴化鹽度的不同而有所差別，但在 35 ppt 及 45 ppt 下，其排卵率較高、排卵時間較長。至於雄魚方面，馴化鹽度雖未影響精子容積比的多寡，但浸泡在不同鹽度下之精子的活力則明顯受到影響。浸泡鹽度 5、15 及 45 ppt 組者，其精子活力與活動時間均比 35 ppt 者為差。因此，建議達最後成熟階段的黑鯛，應在 35 ppt 附近之鹽度環境下馴化，方可得到較高的受精率。

關鍵詞：黑鯛、性腺發育、鹽度。

前 言

黑鯛 (black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*) 是一種廣見於太平洋西岸的鯛科 (family Sparidae) 魚類 (Jean *et al.*, 1998)，屬廣鹽性，具有很強的滲透壓調節能力 (Woo and Wu, 1982; Wu and Woo, 1983; Kelly *et al.*, 1999a, 1999b)，所以可在淡水、半淡鹹水及海水中存活 (劉, 1978; 湯, 1979; 胡與涂, 1981)。和多種鯛科魚類一樣，黑鯛是一種先雄後雌的變性魚種 (protandrous hermaphrodite)，根據研究顯示，約有 40 ~ 50 % 的雄魚在養殖的第三年開始轉變為雌性，生殖季在每年一月到三月間 (Yogo, 1987; Chang *et al.*, 1997)。

台灣黑鯛養殖集中於西南部一帶 (Leu, 1997)，其養殖環境雖然以 5 ppt 以下之水域為主，但是在此鹽度水域下卻從未有繁殖成功的例子。根據研究發現，雄黑鯛的性腺可於淡水域中發育成熟 (胡等, 1981)，但其精子活動力及存活時間均會受鹽度影響 (Chao *et al.*, 1986; 葉等, 1996; 洪等, 1997; 江等, 2000)。在卵巢發育方面，施 (1996)

認為黑鯛雖能在淡水存活，但其卵巢卻僅能發育至第三卵黃球期 (The third yolk globule stage, YG III)，至於鹽度對卵細胞發育達最後成熟階段之影響等相關研究仍相當欠缺。本實驗挑選卵細胞發育已進入第三卵黃球期之雌魚，與雄魚共置於 5、15、25、35 及 45 ppt 飼育水中，在未注射任何性腺激素情況下，觀察其性腺發育的狀況，追蹤卵粒之卵徑及卵核變化以及精子容積比和活動力，期能究明黑鯛性腺在不同鹽度下達最後成熟之發育情形，作為實際繁殖育苗時之參考。

材料與方法

一、實驗用魚

黑鯛係本所海水繁養殖研究中心自行培育，雌、雄各約 50 尾，以海水 (鹽度 30 ~ 35 ppt) 蓄養於水泥池 (3.5 × 1.8 × 1.1 m)，在自然光照下採流水式養殖，每日上午投餵練餌之鰻魚粉狀飼料。雄魚體長為 26.24 ± 2.35 cm (n = 50, mean ± SEM)，體重為 384.42 ± 78.40 g；雌魚體長為 29.40 ± 1.47 cm (n = 40, mean ± SEM)，平均體重為 580.00 ± 77.05 g。性別篩選方面，雄魚係先以 400 ppm 之 2-phenoxyethanol 麻醉後，藉著輕壓腹部觀

*通訊作者 / 台南縣七股鄉三股村海埔四號，TEL: (06) 788-0461; FAX: (06) 788-1597; e-mail: cjth@ms11.hinet.net

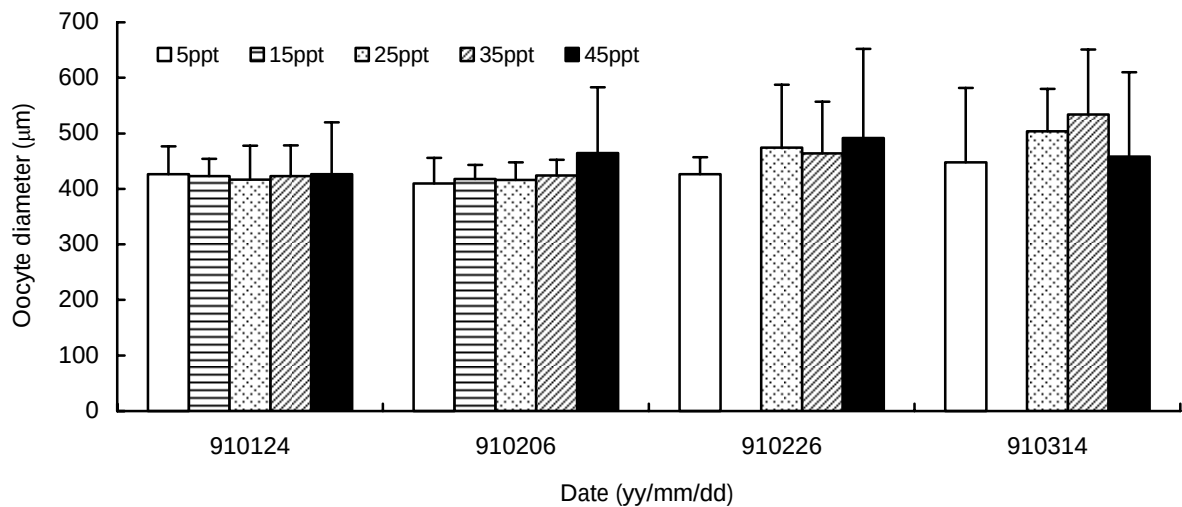


Fig. 1 Changes in oocyte diameters of female black porgy at various salinities.

察精液之排出來判別；雌魚則用 PE 管 (內徑為 0.65 mm，外徑 0.8 mm) 自生殖孔以插管法 (cannulation) 抽取部分卵粒，以光學顯微鏡測微尺測定卵徑，挑選平均卵徑達 400 μm 者 (亦即達第三卵黃球期) 為實驗用魚。

二、實驗方法

將實驗用雌、雄魚分別放養於五個水泥池 (1.7 × 4 × 1.2 m) 中，每池放養雌魚 7-8 隻、雄魚 10 隻，利用自來水及粗鹽，於一星期內將池水漸進調整為 5、15、25、35、45 ppt 等五組不同鹽度組。2 個月的試驗期間，每日投餵鰻魚粉狀飼料，在自然光照及溫度下養殖，試驗期間水溫為 15.4 ~ 22.4 $^{\circ}\text{C}$ ；每日上午用浮游生物網撈取水中卵粒以判斷產卵情形。每 2 星期採樣一次，並參考李等 (1989) 及 Leu (1997) 以流水刺激雄、雌魚排精、產卵之方法，大量更換同鹽度的海水，同時檢查性腺發育狀況。惟實驗進行途中，蓄養於 15 ppt 鹽度下之黑鯛，於第二次採樣後的隔天，即因排水管漏水，而意外於翌日清晨全部死亡，所以該組魚僅進行二次採樣分析即告停止。

採樣時，先以 400 ppm 之 2-phenoxyethanol 將雌魚麻醉，再以插管法抽取卵粒測定卵徑。部份卵粒取出後，另滴加 Serra's 固定液 (ethanol : formalin : acetic acid = 6:3:1) 後，置於光學顯微鏡下觀察生殖核 (germinal vesicle, GV) 變化，由生殖核破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD) 與

否來判斷其是否已達排卵 (ovulation) 階段。

雄黑鯛以同樣方式麻醉後，採取新鮮精液並以血液微量毛細管 (75 mm × 1.2 mm) 充填八分滿之精液後，於血容比離心機 12,000 rpm 之速度下離心 10 分鐘，判讀其精子容積比 (spermato-crit) (Rakitin *et al.*, 1999)。自試驗開始，每 2 星期採樣一次，共測定三次。鹽度對精子活動力之影響測定，則是於第四次採樣時，將雄魚撈起，在未麻醉下採取新鮮精液，依葉等 (1996) 之方法，取 5 μl 之精液滴於玻片上，加上已經殺菌之粗鹽飽和液、天然海水及蒸餾水配製好之各馴化鹽度 (5、15、25、35、45 ppt) 試水 50 μl 進行活化，並將活化等級分為 6 (0-5) 級，以作為精子活力評估指標。

結 果

一、鹽度對黑鯛卵巢發育之影響

在未經任何激素誘導下，蓄養於不同鹽度下之雌魚的平均卵徑變化，介於 410 ± 46 ~ 504 ± 76 μm 之間，各組間並無明顯差異 (Fig. 1)。但從卵粒發育型態及生殖核變化上，於間隔二週後採樣，發現在第二次採樣時，45 ppt 組已有 12.25 % 的魚開始排卵 (Fig. 2)，卵粒呈半透明狀態，卵徑達 780 ~ 900 μm ，生殖核位置變化已進入 GVBD 階段。在第三次採樣時，鹽度在 25 ppt 以上各組魚均有排卵

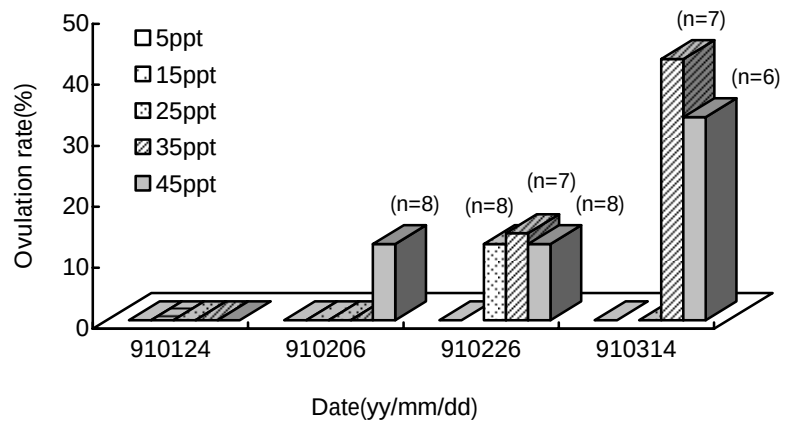


Fig. 2 Changes in ovulation rates of female black porgy at various salinities.

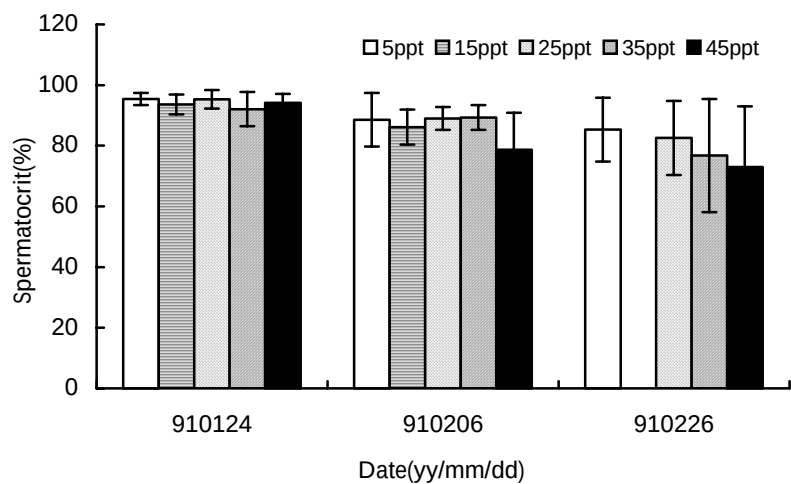


Fig. 3 Spermatocrit of male black porgy at 2 wk after immersion in various salinities.

現象，排卵率在 12.50 ~ 14.29 % 之間 (Fig. 2)，卵徑達 700 ~ 900 μm 。第四次採樣時 35 與 45 ppt 組則分別有 42.86 及 33.33 % 排卵 (Fig. 2)，卵粒大部份呈透明狀態，生殖核已進入 GVBD 階段，卵徑分別達 800 ~ 900 μm 與 780 ~ 850 μm 。

二、鹽度刺激對雄魚精巢發育的影響

不同馴化鹽度對雄魚精巢發育的影響不大，在三次採樣中，其精子容積比沒有顯著差異 (Fig. 3)。但在活動力方面，則出現明顯差異。五種不同鹽度馴化後之黑鯛精液，再以相同鹽度之試水加以活化；其中，5 ppt 組之精子活動力為零，15 ppt 組為 2 ~ 3 級，活動時間 12 ~ 25 min。25 及 35 ppt 組之精子活動力均達 5 級，但活動時間以 35 ppt 者較長，約為 35 ~ 43 min；25 ppt 組則略遜，為 27 ~ 40 min。至於 45 ppt 組者，其精子活動力雖可達 4 ~ 5

級，但其活動時間明顯下降，僅為 16 ~ 21 min (Table 1)。

討 論

根據過去的研究結果發現，不論注射激素與否，黑鯛必需在海水中，其卵巢才能達到成熟排卵階段 (湯等, 1979; 林等, 1987; 李等, 1989; Leu, 1997; 江等, 2000)。Hirano (1969) 認為，雖然黑鯛可以馴養在低至 10 ppt 以下的環境中，但要受精、孵化時的鹽度必需高於 15 ppt。本試驗雖然因意外漏失 15 ppt 組第二次採樣後的數據，但由實驗結果 (Fig. 2) 顯示，僅 25、35、45 ppt 組的魚隻卵細胞可發育至成熟達排卵階段，其中以 35 ppt 組最佳，45 ppt 次之，25 ppt 僅有一次成熟記錄 (02/26)；而 5 ppt 組之黑鯛，其卵細胞僅發育至 YG III，而無法進一步成熟排卵，且 35 及 45 ppt 組雌黑鯛卵細胞

Table 1 Motility scores and motility time of black porgy sperm at various salinities

Salinity (ppt)	5	15	25	35	45
Motility score (degree)	0	2-3	5	5	4-5
Motility time (min)	—*	12-25	27-40	35-43	16-21

*Sperm of fish placed in 5 ppt exhibited no swimming activity so we did not record their motility time.

達排卵階段的比率遠高於 25 ppt 以下各組。另外，筆者等在其他試驗中亦發現，即使將注射過 HCG 的 YG III 雌黑鯛，蓄養於 15 ppt 以下的海水中，其卵細胞仍然無法成熟到生殖核破裂之排卵階段（未發表）。由此可推知，15 ppt 以下之鹽度會明顯抑制卵細胞進入最後成熟階段。

關於雄魚方面，實驗結果顯示，鹽度對精子之活動力有很大的影響。抽取馴養於 5 及 15 ppt 之低鹽度海水之黑鯛精液，再以該馴化鹽度海水活化，發現其精子要不是失去活動力，就是活動力很低。胡等（1981）發現黑鯛雄魚性腺在淡水中雖然可以發育，甚至可以經擠壓而排精，但其精子在 10 ppt 以下之低鹽度中卻無法存活太久亦無活動力（Chao *et al.*, 1986; 葉等, 1996; 洪等, 1997; 江等, 2000）。綜上可知，馴化於低鹽度環境下之黑鯛精子改置於高鹽度環境下或許仍然具有活動力，但是低鹽度環境下產出之黑鯛精子的活動力是極低甚或不具活動力。決定黑鯛精子之活動力主要與高張海水中的鈣、鎂有關，精子中的鈣離子升高、氫離子下降，對於海水魚精子的活動力有決定性的影響，在低張環境下的黑鯛精子會變形、萎縮（施等, 1995; Gwo, 1995），使精子受損，亦可能會影響精子的活動力。

太高鹽度如 45 ppt 對黑鯛精子活動力亦有不良影響。洪等（1997）及江等（2000）之實驗顯示，黑鯛精子活動力以 25 ~ 30 ppt 環境下最佳；葉等（1996）實驗所得的範圍則較寬，約在 20 ~ 40 ppt 之間。過高的鹽度常會抑制精液的活化力（葉等, 1996），且影響魚類精子活動力的最適鹽度也隨魚種不同而略有差異（洪等, 1997; 江等, 2000）。以同屬鯛科的魚類而言，比起黑鯛，黃鰭鯛（*Acanthopagrus latus*）精子活化的最適鹽度可低至 21 ppt（江等, 2000），此或許與魚類生殖時之環境有關。又以能量觀點來看，生物處於高張環境下，其為了維持體內的恆定，必須消耗部份能量作為滲透壓調節之用（朱, 1999）。

在鹽度對雄黑鯛精子容積比的影響方面，經三次之測定發現，各組間並沒有顯著差異。鄭（1996）亦指出鹽度（3 ~ 33 ppt）對黃鰭鯛產精量及精子濃度影響不大，與本實驗結果一致。

綜合本研究之結果可知，在 5、15、25、35、45 ppt 鹽度環境下，黑鯛之排卵率以 35、45 ppt 者較佳，馴化於 15 ppt 以下者，其卵巢無法發育至成熟排卵階段；而精巢的排精量雖不受馴化鹽度的影響，但在太高或太低的環境下，精子的活動力不佳，導致受精率受到影響。林等（1987）及 Chu *et al.*（1999）的研究顯示，黑鯛魚卵及仔魚滲透壓調節能力遠不及成魚，馴化鹽度過低，會造成較高的死亡率，Hirano（1969）亦提出類似的結果。因此，建議在整個繁殖及初期育苗過程，鹽度應維持在 35 ppt 左右為宜。

謝 辭

本實驗承蒙梁貴龍、黃國彰及胡益順等三位同仁協助養殖，特此致謝。

參考文獻

- 江世貴，李加兒，區又君，鄭運通（2000）四種鯛科魚類的精子激活條件與其生態習性的關係。生態學報，20: 468-473。
- 朱永桐（1999）鹽度刺激對點帶石斑稚魚滲透壓調節及能量代謝影響之研究國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文，110pp。
- 李榮涼，張嘉鑫，丁雲源（1989）養殖漁業技術推廣改進-確立黑鯛種苗生產技術。台灣省水產試驗所試驗報告，47: 254-257。
- 林金榮，陳其林，莊成意，劉繼源，顏枝麟（1987）黑鯛種苗大量生產和鹽份濃度對仔魚生長及存活率之影響。台灣省水產試驗所試驗報告，42: 345-356。
- 施兆鴻（1996）鹽度對黑鯛卵巢發育的影響。水產學報，20: 357-360。

- 施兆鴻, 黃旭雄, 姜存年 (1995) 海水中 Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} 含量對黑鯛胚胎及早期仔魚發育的影響. 海洋科學, 1995(5): 33-38.
- 洪萬樹, 張其永, 周東晨 (1997) 四種海產經濟魚類精子的生理特性和環境因子的關係. 海洋科學, 1997(3): 64-66.
- 胡興華, 涂嘉猷 (1981) 黑鯛 *Acanthopagrus schlegeli* 淡水養殖試驗. 台灣省水產試驗所試驗報告, 33: 723-731.
- 胡興華, 顏枝麟, 林金榮, 涂嘉猷 (1981) 養殖黑鯛 *Acanthopagrus schlegeli* 之性轉換與自然產卵. 台灣省水產試驗所試驗報告, 33: 715-722.
- 湯弘吉, 涂嘉猷 (1979) 黑鯛養殖試驗. 中國水產, 319: 3-8.
- 湯弘吉, 涂嘉猷, 蘇偉成 (1979) 黑鯛人工繁殖試驗-(I). 種魚催熟與採卵. 中國水產, 319: 9-14.
- 葉信利, 朱永桐, 陳萬生, 丁雲源 (1996) 鹽度變化對黑鯛精子活化力之影響. 台灣省水產試驗所台南分所研究報告, 1: 73-88.
- 劉振鄉 (1978) 黑鯛生態調查及實驗. 中國水產, 311: 3-6.
- 鄭永昇 (1996) 鹽度對黃鰭鯛滲透壓調節、生殖內分泌與生長激素之影響. 國立台灣海洋大學水產養殖研究所 碩士論文, 95pp.
- Chang, C. F., B. Y. Lin, E. L. Lau, M. F. Lee, W. S. Yuh, Y. H. Lee, C. N. Chang, J. D. Huang, P. Tacon, F. Y. Lee, J. L. Du and L. T. Sun (1997) The endocrine mechanism of sex reversal in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: A review. Chinese J. Physiol., 40: 197-205.
- Chao, N. H., W. C. Chao, K. C. Liu and I. C. Liao (1986) The biological properties of black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) sperm and its cryopreservation. Proc. Natl. Sci. Council. B. ROC., 10: 145-149.
- Chu, Y. T., S. L. Yeh, J. R. Hseu and Y. Y. Ting (1999) Effect of salinity on egg development of black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. J. Fish. Soc. Taiwan, 26: 35-41.
- Gwo, J. C. (1995) Ultrastructural study of osmolarity effect on spermatozoa of three marine teleosts. Tissue & Cell, 27: 491-497.
- Hirano, R. (1969) Rearing of black bream larva. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 35: 567-569, 603. (in Japanese with English abstract)
- Jean, C. T., S. C. Lee, C. T. Chen and C. F. Hui (1998) Variation in mitochondrial DNA sequences of black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*, in coastal waters of Taiwan. Zool. Stud., 37: 22-30.
- Kelly, S. P., I. N. K. Chow and N. Y. S. Woo (1999a) Alternations in $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{-ATPase}$ activity and gill chloride morphometrics of juvenile black sea bream (*Mylio macrocephalus*) in response to salinity and ration size. Aquaculture, 172: 351-367.
- Kelly, S. P., I. N. K. Chow and N. Y. S. Woo (1999b) Haloplasticity of black seabream (*Mylio macrocephalus*): Hypersaline to freshwater acclimation. J. Exp. Zool., 283: 226-241.
- Leu, M. Y. (1997) Natural spawning and mass larviculture of black porgy *Acanthopagrus schlegeli* in captivity in Taiwan. J. World Aquacult. Soc., 28: 180-187.
- Rakitin, A., M. M. Ferguson and E. A. Trippel (1999) Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. Aquaculture, 170: 349-358.
- Woo, N. Y. S. and R. S. S. Wu (1982) Metabolic and osmoregulatory changes in response to reduced salinities in the red grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel), and the black sea bream, *Mylio macrocephalus* (Basilewsky). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 65: 139-161.
- Wu, R. S. S. and N. Y. S. Woo (1983) Tolerance of hypo-osmotic salinities in thirteen species of adult marine fish: Implications for estuarine fish culture. Aquaculture, 32: 175-181.
- Yogo, Y. (1987) Hermaphroditism and the evolutionary aspects of its occurrences in fishes. In Sex change in fishes (A. Nakazono and T. Kuwamura eds.). Tokai University Press, Tokyo, Japan, 1-47.

Influence of Salinity on Gonadal Development of Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*, during Final Maturation

Yeong-Torng Chu*, Shinn-Lih Yeh, Jinn-Rong Hseu and Yun-Yuan Ting

Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

Abstract

Black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*, is one of the most important aquaculture species in Taiwan. It is a euryhaline species, but its reproduction only occurs in marine environments. That is, lower salinities do not hamper the survival of black porgy, but seriously interfere with its reproduction. The aim of this study was to investigate the influence of salinity conditions on the final maturation of gonads in black porgy. The experiment was carried out in the natural spawning season of black porgy, i.e., from January to March. The fish, caught from our field ponds, were acclimated to 5 salinities of 5, 15, 25, 35, and 45 ppt, for at least 2 mo. The results showed that acclimation salinity did not influence the size of oocyte diameter in female porgy. However, the female black porgy which was placed in 35 and 45 ppt had higher ovulation rates and longer ovulation times than did ones in lower salinities. The acclimation salinity did not result in different spermatocrit values of male black porgy, but it did influence sperm motility. Sperm of fish incubated in 35 ppt had significantly higher motility activity and longer motility time than did ones in < 15 and 45 ppt. Based on these results, the study suggested that in order to promote fertilization rates, black porgy during final maturation should be reared in a salinity of around 35 ppt.

Key words: *Acanthopagrus schlegeli*, gonadal development, salinity.

*Correspondence: Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute, Chigu, Tainan, Taiwan. TEL: (06) 788-0461; FAX: (06) 788-1597; e-mail: cjth@ms11.hinet.net