

重要養殖魚類生殖調控之研究

郭欽明¹、張月霞²、羅秀婉¹、莊寧寧³、丁雲源⁴、黃火鍊⁵

¹國立台灣大學漁業科學研究所

²中央研究院生物化學研究所 ³中央研究院動物研究所

⁴臺灣省水產試驗所台南分所 ⁵國立台灣大學動物學系

一、前言

鯔魚(*Mugil cephalus* L.)，俗名烏魚或烏仔，是世界分布很廣且具有養殖經濟價值之魚種。牠具有優越的養殖條件，包括草食性、耐溫及耐鹽性廣、成長快速、抗病性強等。同時，鯔魚卵巢之產品（俗稱烏魚仔）及精巢（俗稱魚白）乃是價昂之食品，鯔魚養殖產業甚具發展潛力。

我國鯔魚養殖已有相當久的歷史，大都以粗放混養式為主，惟因種苗之來源，全依賴自沿海撈捕，來源不穩定且數量有限，無法滿足產業之需要，也無法促動鯔魚養殖之集約、產業化，因而，市場所需之鯔魚量，全賴漁業撈捕量之供應。但在80年代，我國鯔魚年產量逐年有明顯減產之趨勢，帶動了鯔魚養殖之復甦，養殖面積也由1988年405.87公頃增加到1991年之857.28公頃，人工大量生產種苗技術亟待突破，得於促動鯔魚養殖之持續發展，以經濟有效的方法，調控種魚成熟、產卵以及建立育苗技術，仍是目前刻不容緩的重要研究課題。

種苗人工繁殖需要充足性成熟的種魚來源，且性成熟度亦須達到成熟階段，即卵黃第三期等，始可依內分泌之操作刺激，獲得有效且可預期之產卵效果，符合其經濟效益。就魚類生殖生理而言，性腺之發育成熟以至於產卵及排卵，除了印度塘虱魚、斑馬魚等外，大都由下視丘分泌性釋素及性抑制素，調控腦下垂體合成分泌促性腺激素，經由血液輸送，並在卵細胞或精細胞膜上之接受器結合，誘導磷化作用及類固醇生成作用。其中雌二醇主導卵細胞的卵黃生成作用（即卵細胞之成熟）， 17α -Hydroxy, 20β -Dihydroprogesterone經由cdc 2 Kinase及Cyclin B之作用，誘導卵細胞之最後成熟以至於排卵及產卵。因此，調控誘導卵細胞之卵黃生成以及最後成熟作用，下視丘之性釋素及腦下垂體促性腺激素扮演著非常重要之角色，因而，一般之調控生殖試驗及人工繁殖之運作，大都依腦下垂體注入法(Hypophysation)，即以促性腺激素處理以獲得預期之產卵結果。

最常用者仍爲人類絨毛促性腺素(Human Chorionic Gonadotropin, HCG)或由魚類腦下垂體中萃取、分離、純化而得到的腦下垂體促性腺激素。此二者之使用，特別是HCG，不論在研究及應用方面，均相當普遍。但這些激素均來自於生物體，且激素含量因生理週期而變異。因而，激素之取受限於生物材料之來源及生理狀況。有關下視丘性釋素及腦下垂體促性腺激素之分子生物學、生理功能以及釋放調控機制，尚需深入探討，以期藉生物技術達到量產，不但可提供魚類生殖生理之基礎研究，並應用於重要養殖魚種性成熟及產卵調控，乃是具發展潛力之研究領域。

在促性腺激素之誘導調節下，卵細胞進入卵黃生成期、最後成熟期、以至於排卵及產卵。在此發育成熟過程中，不但在組織形態、生理及調控機制等均有明顯之變化，爲解析外來刺激處理之對卵細胞之發育成熟之影響效果，其生殖生理、內分泌基礎資料之建立有其必要性。

台灣鯔魚養殖產業之沒落，主要之原因在於種苗來源以及市場需求量之限制，但烏魚仔乃是我國重要之水產品，其來源大都依賴天然撈捕之產卵洄游烏魚群，但其產量，在過去十年來卻有大幅度之減產，因而在供不應求之情況下，烏魚養殖產業在近幾年來已有相當程度之發展，所需種苗仍依賴天然增殖之種苗資源。爲滿足產業之需求，以及產業之持續發展，建立大量生產種苗之技術是目前迫切需要解決的重要課題。

本研究計劃擬就鯔魚生殖生理及內分泌進行有系統的研究，以期建立有效控制產卵和種苗大量生產技術，爲本研究計劃的主要目標。研究的內容包括卵細胞之發育成熟、最後成熟以至於產卵，整個過程之基礎生殖生理、重要內分泌調控功能，包括下視丘及腦下垂體所分泌之激素、控制產卵、以及孵化和幼魚大量培育等項目。就生殖生理之瞭解，建立有效促進性腺成熟及產卵之技術。就性釋素及促性腺激素等分之生物學之研究，期能建立大量生產激素之技術、孵化繁殖技術之建立，以達到種苗大量生產之主要目標。

二、材料與方法

(一)、鯔魚促性腺激素及其單元之純化、分離與化學定性

鯔魚腦下腺收集後立刻置入丙酮中，並保存於 -20°C 。直到腦下腺數量足夠時，即以6%醋酸銨-40%乙醇(pH5.1)研磨，並於 4°C 下萃取醣蛋白4-5小時(Huang and Chang 1980)。萃取液加入乙醇(最終濃度爲80%)，混合均勻後置入 -20°C 沈澱。醣蛋白萃取物經透析及冷凍乾燥後溶於 $5\text{mM}\cdot\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液並導入DEAE-Toyopearl 650 (TOSOH Corp., Tokyo, Japan)離子交換管柱，再以 0.05M , 0.12M , 0.3M , 0.5M 及 $1\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液滌洗，收集各滌洗液，冷凍乾燥保存，並進行生物功能之測定。具有促性腺激素功能之滌洗部分

(0.12M)則再以Sephadex G-75與G-100管柱篩流，進一步純化促性腺激素。

鱈魚促性腺激素 α 與 β 次單元之分離則採用逆相之高壓液相層析法。先將純化之烏魚促性腺激素以20% Acetonitrile - 0.07% Trifluoroacetic acid (TFA)(溶液A)溶解，注入C8之逆向管柱，再以於60分鐘內由溶液A變成40% Acetonitrile - 0.07% TFA(溶液B)之化學定性之方法包括SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Laemmli 1970)與氨基酸序列分析(Hewick et al. 1981)。生物功能測定則依Huang and Chang (1980)之方法，以吳郭魚之精巢或卵巢進行離體培養，再以放射免疫法測定雄性素或雌性素之生成。

(二)、鱈魚促性腺激素 α 與 β 次單元cDNA之選殖與核酸定序

新鮮之鱈魚腦下腺採集後立刻保存於液態氮中。腦下腺RNA之萃取與分離係採用Guanidium CsCl之方法(Ullrich et al. 1977)。Poly (A)-mRNA則是以oligo-dT cellulose管柱分離。之後，以Gubler and Hoffman (1983)之方法合成雙股cDNA，接上EcoRI Adaptor，再與EcoRI處理過之 λ gt 10 DNA 接合(16°C, 12-16hr)，最後，經過*in vitro* packaging後再感染*E. coli*，建立成烏魚腦下腺cDNA基庫。

篩選鱈魚促性腺激素 α 與 β 次單元之基因株時，係以經P³²標示之鱈魚促性腺激素 α 與 β 次單元之cDNA為探針進行plaque hybridization (Benton and Davis, 1977)。經篩選所得之鱈魚促性腺激素 α 與 β 次單元之cDNA經轉殖到質體pUC 19後，即以Sanger等(1977)之方法進行核苷酸序列分析。

(三)、鱈魚生殖週期及生理的研究

鱈魚種魚按月收集，量取體重、肝臟及卵巢重量，推算性腺成熟指標，包括卵巢重—體重比(Gonadosomatic Index, GSI)及肝重—體重比(Hepatosomatic Index, HSI)。同時抽取血液，分析卵黃前質(Vitellogenin, Vg)及雌二醇(Estradiol-17 β , E2)含量。血液經離心、分離血清、分離血清、以乙醚萃取兩次，吹乾後做適量稀釋而以輻射免疫測定法(Radioimmunoassay, RIA)定量。Vg之測定則以Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)方法加以定量。

(四)、誘導卵細胞最後成熟及產卵之研究

種魚之卵巢成熟度經由細管插入法取樣檢查，當卵細胞成熟到卵黃第三期且其平均卵徑在0.6mm以上時，以不同激素注射處理以誘導卵細胞之最後成熟。使用激素包括人類絨毛促性腺激素(Human Chorionic Gonadotropin, HCG)、Ovaprim (每毫升含10mg Domperidone及20 μ g GnRH)、性釋放素類似物(Luteinizing

Hormone-Releasing Hormone Analog, D-[Ala⁶] LHRH ethylamine analog, LHRHA)等。以卵細胞之成熟進展程度及排卵、產卵做為激素效果評定之依據，並在卵細胞最後成熟過程階段，卵細胞經以Sierra fluid透明化，確定其成熟時期，收集卵細胞及血液樣品，進行生理變化之分析。血液以滲透壓測定儀測定外，並以乙醚萃取類固醇，測定種類為雌二醇、17 α Hydroxyprogesterone，以及17 α Hydroxy, 20 β Dihydroprogesterone。其設定分別以不同類固醇製備抗體，以RIA法定量。

卵細胞樣品經110 $^{\circ}$ C處理36hr，再以550 $^{\circ}$ C灰化36hr，量取卵細胞含水量、乾重量（包括有機物及灰分含量）。灰分部分以過氯酸洗滌後，王水溶解後再以含3% LaCl₃之1%鹽酸溶液稀釋，經以原子分光測定儀(Atomic Absorption Spectrophotometer)與標準曲線對照，分別測定鈉、鉀、鈣、鎂等重要生理離子成分。至於陰氯離子則以蒸餾水磨碎，分離萃取液後，以氯測定儀(Chloride titrator)測定氯離子含量。

(五)、種苗大量生產技術之研究

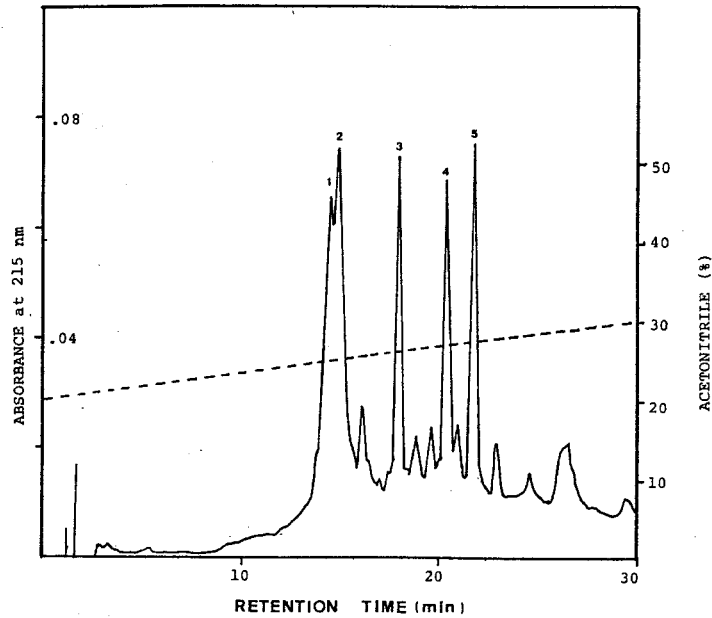
在鯔魚生殖季節，成熟種魚蓄養於4 \times 8 \times 1.2m水泥池中。經以LHRHA (Syndell, 劑量為300-400 μ g/kg, 分兩次注射處理)，雄魚在有需要時，以500 IU HCG/kg或50mg methyltestosterone/kg促進精細胞之成熟度。採用自然產卵及受精方法，將受精卵收集後分別在蓄養池室外土池中孵化，前者孵化後亦移到土池，進行大量育苗之試驗。

育苗乃採用一分地田間池，注入35-36 ppt海水，全池敷設打氣設備，水溫依氣溫而變動，將池水中預先培養天然餌料，以硫安10kg、尿素5kg、過磷酸鈣2kg等化學肥料，並添加黃豆餅碎、酵母菌以及人工鰹粉飼料等，以培養輪蟲、撓腳類等天然生物餌料等。採用的方法為開放式育苗，即藉天然生產力做為幼魚餌料之來源，以降低人力之投入，期能獲得經濟育苗之效果。

三、結果與討論

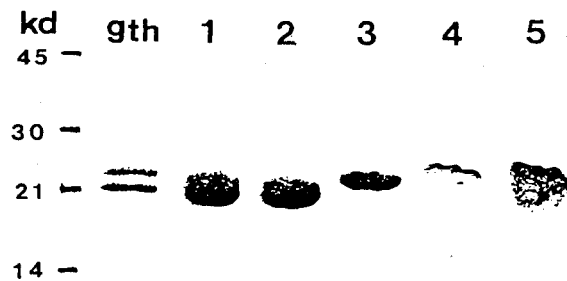
(一)、鯔魚促性腺激素及其單元之純化與定性

鯔魚腦下腺（乾重約5克）經過6%醋酸銨—40%乙醇(pH5.1)研磨萃取後可得醣蛋白890毫克。導入DEAE-Toyopearl 650離子交換管柱後，分別以0.05M, 0.12M, 0.3M, 0.5M及1M NH₄HCO₃溶液滌洗。經由生物活性之測定，顯示0.12M NH₄HCO₃之滌洗物具有促性腺激素之活性。將此部分再經過Sephadex G-75與G-100管柱分離，可得較純化之促性腺激素。



圖一 Reverse-phase HPLC fractionation of the gonadotropin subunits of grey mullet, *Mugil cephalus* L.

將純化之鰻魚促性腺激素注入C8之逆相管柱，經過高壓液相層析，其結果如圖一所示，可得5個主要部分。經由SDS-PAGE與N端氨基酸序列分析之結果，圖二顯示第1, 2成分為促性腺激素之 α 次單元，第3成分為 β 次單元，另外之第4, 5成分則為腦下腺所分泌之另一激素Neurophysin。由SDS-PAGE之結果估計鰻魚促性腺激素 α 與 β 次單元之分子量分別為21 Kd與25 Kd。而 α 次單元之N端氨基酸序列為Y-P-N-I-D-L-S-N-M-G-C-V-E-C-T， β 次單元之N端氨基酸序列為F-S-P-A-A-P-T-P-F-Q-L-S-S-C-Q。



圖二 SDS-PAGE of various gonadotropin fractions of grey mullet, *Mugil cephalus* L., subjected to reverse-phase HPLC.

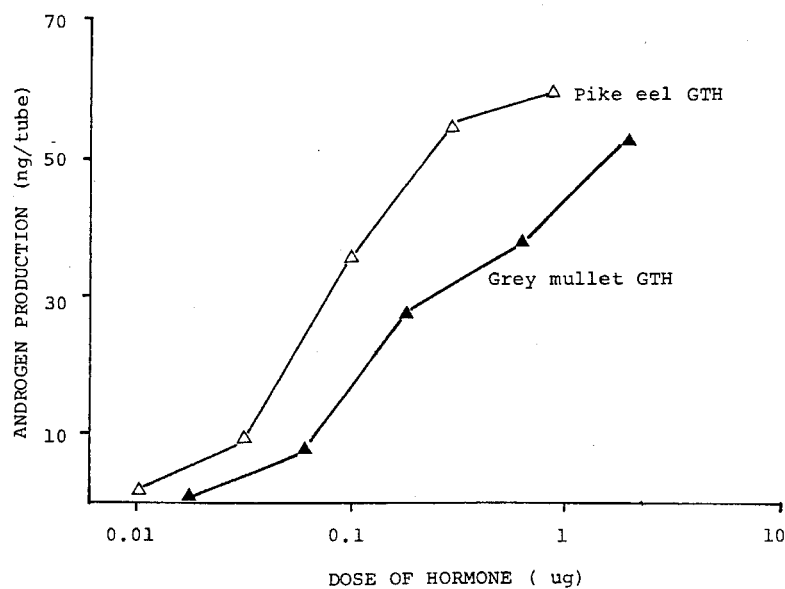
(二)、鰻魚促性腺激素及其次單元之生物功能測定

或由於種間差異性所致，烏魚促性腺激素不能刺激鯉魚精巢組織產生雄性素（結果未示），故以吳郭魚之精巢或卵粒進行生物活性測定。如圖三所示，鰻魚促性腺激素可以刺激吳郭魚卵巢組織產生雄性素，且此促進效應具有劑量—效應相關性。

鰻魚促性腺激素之 α 或 β 次單元之無法促進吳郭魚之生殖腺產生性腺素，但取等量之 α 次單元與 β 次單元在0.1M磷酸緩衝溶液內，於室溫下使其重新組合後，則具有促進性腺素生成之能力。此結果顯示 α 與 β 次單元必須組合才具有促性腺激素之功能。

(三)、鰻魚促性腺激素 α 與 β 次單元cDNA之選殖與核苷酸定序

以鯉魚促性腺激素 α 與 β 次單元之cDNA為探針，篩選烏魚腦下腺cDNA基因庫，共獲得一株呈 α 次單元之cDNA之陽性反應及10株呈 β 次單元cDNA陽性反應。將此等呈陽性反應之cDNA轉殖至質體pUC 19，再進行核苷酸序列分析，圖四和圖五分別顯示鰻魚促性腺激素 α 與 β 次單元cDNA之核苷酸序列以及由其推導之氨基酸序列。 α 次單元之cDNA為665 base-pair (bp)，其中包含36bp之5'端未轉譯區、351bp之轉譯區與284bp之3'端未轉譯區。而轉譯區所轉譯之蛋白質則包含23個氨基酸之signal peptide與93個氨基酸之 α 次單元。 β 次單元之cDNA較 α 次單元者為小，僅為567bp，包含11bp之5'端未轉譯區、447bp之轉譯區與109bp之3'端未轉譯區。轉譯之蛋白質則含有26個氨基酸之signal peptide與122個氨基酸之 β 次單元。



圖三 The biological activities of grey mullet and pike eel gonadotropin on the stimulation of androgen production in tilapia ovary *in vitro*.

```

AAGTTTCTTTCAACATGGTACCAACCAGG  ATG GGC TTA GTG AAA TCA GCT  51
      M G L V K S A
      -23      -20
GGA GTA TCT TTT CTT GTG TTG TCT TTT CTC CTC TAC GTA GCT GAT  96
G V S F L V L S F L L Y V A D
      -10
TCA TAC CCC AAC ATC GAC TTA TCA AAC ATG GGC TGC GTG GAA TGC  141
S Y P N I D L S N M G C V E C
-1 +1      10
ACG CTG AGG AAG AAC GAA CTT TTC TCA AGG GAT CGT CCA ATC TAC  186
T L R K N E L F S R D R P I Y
      20
CAG TGC AGT GGC TGC TTC TCC AAG GCG TTC CCG ACT CCT CTG AGC  231
Q C S G C F S K A F P T P L S
30      40
ACC ATG GAG ACA ATG AGT ATC CCA AAG AAC ATC ACC TCA GAG GCA  276
T M E T M T I P K N I T S E A
      50
TCA TGC TGC GTC GCA AGG CAC AGC TAT GAG ACA GAG GTA GGT GGC  321
S C C V A R H S Y E T E V G G
60      70
GCC AGG GTG AGA AAC CAC ACA GAT TGC CAC TGC AGC ACC TGC TAT  366
A R V R N H T D C H C S T C Y
      80
TTT CAT AAA ATA TGA CAGATGGGCAATGAAGACATTCTGCGACGTCGGCTTGGC  420
F H K I *
90      93
AACATGTTGTTCTTTTAAATATGCACAGTATGCCGGCTCTGTTTTGAAATTTGTGTCC  479
TTGCATTGCCAAATAATATTTTGAATTGATTAATTGTCTGTGATAGCTGATGAGTTAT  538
GTTACGAGAAATACATTGTTCAAATGTGGGTTTGATACACAGTTAAAGTCTGTATGGT  597
GTGATCATAAACACGTCCTTATATATAAAATCCATGCATGC-Poly A (n=28)  665

```

圖四 The nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence of the cDNA encoding α subunit of grey mullet gonadotropin.

```

CACAGGAGAGG  ATG ATG GCA CAG GTC AGT ACA GCG ACG TCT CCC CTG  47
      M M A Q V S T A T S P L
      -26      -20
ATT TTG AGT TTG TTT TTC GGC ACC TCA TCT TTC ATC TGG GCC TTT  92
I L S L F F G T S S F I W A F
      -10      -1 +1
AGT CCA GCA GCA CCA ACA CCT TTT CAG CTG TCA TCC TGC CAG CTC  137
S P A A P T P F Q L S S C Q L
      10
ATA AAC CAG ACA GTG TTT CTG GAG AAG AAG GGC TGC CCC AGG TGT  182
I N Q T V F L E K K G C P R C
      20      30
CAT CCA GTG GAA ACA ACT ATC TGC AGT GGA CTC TGC CCC ACC AAG  227
H P V E T T I C S G L C P T K
      40
GAC CCT GTC AAG ATA CCG TAC AGA AAC GTG TAC CAG CAT GTG TGC  272
D P V K I P Y R N V Y Q H V C
      50      60
ACA TAC AGG GAA TGG TAC TAC AAG TCG TTT GAG CTT CCT GAC TGT  317
T Y R E W Y Y K S F E L P D C
      70
CTG CAC GGA GTG GAT CCG ATT GTC ACC TAT CCT GCA GCT TTG AGC  362
L H G V D P I V T Y P A A L S
      80      90
TGC CAC TGT GGT CCT TGT ACC ATG GAC ACG TCC GAC TGC ACC TTT  407
C H C G P C T M D T S D C H F
      100
GAG AGC CTG CAG CCA GAC TTC TGC ATG AAT GAC TAT CCT TTC TAC  452
E S L Q P D F C M N D I P F Y
      110      120
TAC TAG TCCGAAGTAACTGGATATTGTTGTAAGTACGAGCAATAATGTGTTTCTGTC  509
Y *
122
CCTTGTGTAATTAAGTCAAGAAATGAC-Poly A (n=30)  567

```

圖五 The complete nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence of β subunit of grey mullet gonadotropin.

由於鱈魚促性腺激素 α 次單元由93個氨基酸組成， β 次單元由122個氨基酸組成，可估計各次單元蛋白質部分之分子量分別為10.2 Kd與13.4 Kd，此數值與由SDS-PAGE所估計之 α 與 β 次單元之分子量相差甚遠，而其間差異即為次單元所含之醣類部分，故顯示各次單元含有高量之醣類。

比較各種魚類與哺乳類促性腺激素之 α 與 β 次單元初級結構，可看出鱈魚促性腺激素 α 次單元與其他魚類和哺乳類者均極相似(圖六和七)，例如與鯉魚者相似性為57%，與鮭魚者為52%，與牛者為53%，此等結果亦顯示 α 次單元在分子演化過程中極為保留，此保留性可能與其重要性有關。至於 β 次單元，鱈魚者與其他魚類之 β 次單元仍有高度之相似(如與鯉魚者有60%相似，與鮭魚者為59%)，與哺乳類之 β 次單元則相似性較低(如與牛LH之 β 次單元之相似性為40%)，此顯示 β 次單元在分子演化過程發生較多之變異，頗符合 β 次單元具有激素特異性與種別特異性之論點。

carp I	Y P R N D M N N F G C E E C K L K E N N I F S K P
carp II	- - - - Y -
silver carp	- - - - I T -
bighead carp	- - - - I T -
grass carp	- - - - T -
pike eel	- - N - E I S R G - - D - - R - - D - K F - - - - -
eel	- - N - E - A R G - - D - - R - Q - - K - - - - -
salmon I	- - Q N S - - T - V - - - - - - - - - - - - - - - - -
salmon II	- - N S - K T - M - - - - - - - - - - - - - - - - -
sea bream	- - N T - L S - M - - - A - T - R K - T V - - R D -
mullet	- - N I - L S - M - - V - - T - R K - E L - - R D -
human LH	- - - - - V Q D - P - - T - Q - - P F - - Q - -
bovine LH	F - D G E F T M Q - - P - - - - - - - - - - - - - -
carp I	G A P V Y Q C M G C C F S R A Y P T P L R S K K T
carp II	- -
silver carp	- -
bighead carp	- -
grass carp	- -
pike eel	S - - I F - - V - - - - - - - - - - - - - - - - -
eel	S - - I F - - V - - - - - - - - - - - - - - - - -
salmon I	- - - - - T -
salmon II	N X X I M - - T - - - - - - - - - - - - - - - - -
sea bream	R X - I -
mullet	R X - I - - S - X - - - K - F - - - S T M E - - -
human LH	- - - I L -
bovine LH	D - - I -
carp I	M L V P K N I T S E A T C C V A K E V K R V L V N
carp II	- -
silver carp	- -
bighead carp	- -
grass carp	- -
pike eel	- - - - - D -
eel	- -
salmon I	- -
salmon II	- -
sea bream	- - T I -
mullet	- - T I - - - - - S - - - - - H - Y E T E - A - - -
human	- - - Q - - - V - - - S - - - - - R H S Y E T E - G -
bovine	- -
carp I	D V K L V X N H T D C H C S T C Y Y H K S
carp II	- -
silver carp	- -
bighead carp	- -
grass carp	- -
pike eel	N M - - - X E - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
eel	N M - - - X E - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
salmon I	- - N I K L T - - - E - W - N - - - H - - - - -
salmon II	- - G F P - T - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
sea bream	G I R V R - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
mullet	G A R V R - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
human	G G F K - E - - - A - - - - - - - - - - - - - -
bovine	G N V R - E - - - E - - - - - - - - - - - - - -

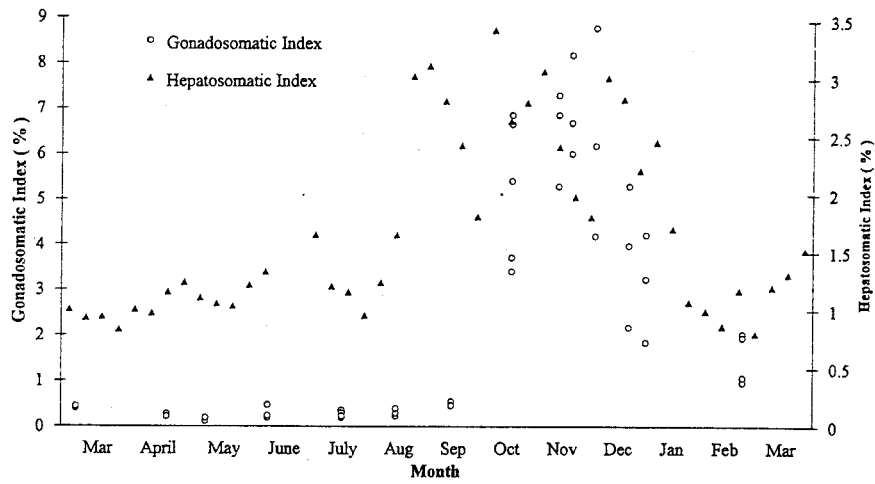
圖六 Comparison of the α subunit of fish and mammalian gonadotropins.

carp	S	Y	L	P	P	C	E	P	V	N	E	T	V	A	V	E	K	E	G	C	P	K	C	L	V	L	Q				
silver carp	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F				
bighead carp	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F				
grass carp	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F				
pile eel	-	V	-	Q	-	-	Q	-	I	-	-	-	I	S	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	F				
eel	-	L	-	L	-	-	-	-	I	-	-	-	I	S	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	F				
salmon	-	L	M	Q	-	-	Q	-	I	-	Q	-	S	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	I				
sea bream	F	Q	-	-	-	Q	L	I	-	Q	-	S	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H				
mullet	F	Q	-	S	S	-	Q	L	I	-	Q	-	S	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H				
blH	S	R	G	P	L	R	-	L	-	Q	-	I	-	A	-	L	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	V				
bFSH	-	-	-	-	-	-	-	-	L	T	-	I	-	I	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I			
carp	T	T	I	C	S	G	H	C	L	T	K	E	P	V	Y	K	S	P	F	S	T	V	Y	Q	H	V	C	T	Y	R	
sc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
gc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
pe	-	S	-	-	-	-	-	I	-	-	D	-	S	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
e	-	S	-	-	-	-	-	I	-	-	D	P	S	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sal	-	P	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sea b	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	D	-	M	-	T	X	X	R	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
mullet	-	-	-	-	-	-	-	L	-	P	-	D	-	X	-	I	-	Y	R	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
blH	-	S	-	-	A	-	Y	-	P	S	M	K	R	-	L	P	V	I	L	P	P	M	P	-	-	-	-	-	-	-	-
bFSH	-	-	-	-	W	-	A	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
carp	D	V	R	Y	E	T	V	R	L	P	D	C	P	P	G	V	D	P	H	I	T	Y	P	V	A	L	S	C	D	C	
sc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
gc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
pe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	F	-	-	-	-	-	-	
sal	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sea b	-	L	H	-	K	-	F	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
mullet	-	E	W	Y	-	K	S	F	E	-	-	-	L	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
blH	-	E	L	-	F	A	S	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bFSH	-	E	L	V	-	-	-	-	-	K	V	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
carp	S	L	C	T	H	D	T	S	D	C	T	I	E	S	L	Q	P	D	F	C	M	S	Q	R	E	D	F	L	-	-	
sc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
gc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
pe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sea b	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
mullet	-	G	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
blH	-	G	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bFSH	-	K	-	D	S	D	S	T	-	-	-	-	V	R	G	-	G	-	S	Y	-	S	F	R	E	I	K	E	-	-	

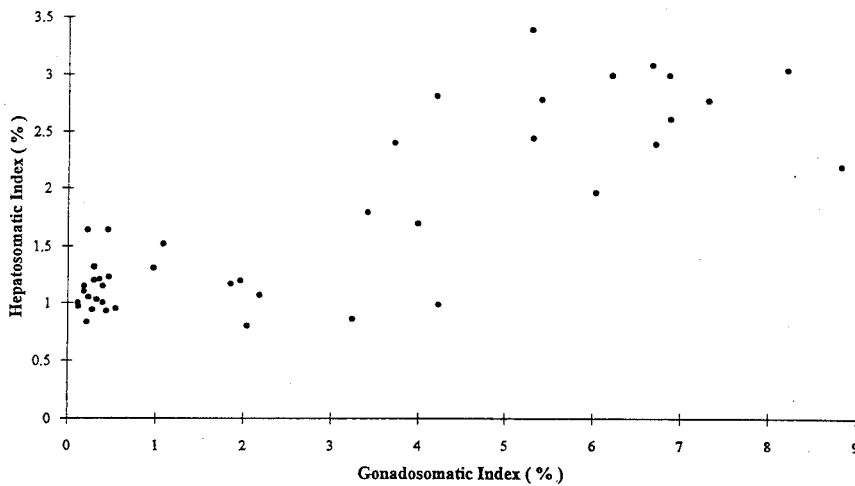
圖七 Comparison of the β Fsubunit of fish and mammalian gonadotropins.

(四)、鯔魚生殖週期及生理

經週年性之採樣、分析性腺—體重比(Gonadosomatic Index, GSI)及肝——體重比(Hepatosomatic Index, HSI)之結果表示於圖八和表一自3月以至於9月底GSI值在於0.12-0.55%間，自10月起GSI值即急速升高，由5.22% (3.42-6.87%)增加到12月中之6.41% (4.2-8.82%)，隨即呈現下降之勢。在2月即下降到1.51% (0.97-2.04%)的程度。3月至9月之GSI值則維持在0.25-0.49%間。至於HSI值的週年變化，亦有相似之變化，即1月至9月底，HSI值均在0.83-1.64%間，每年平均值在於0.89與1.21%，自10月起HSI值增加到2.62%，11月12月間HSI值則在2.57及2.67%。同時，12月底GSI及HSI值均開始有了下降之走向，以至於2月底GSI及HSI值已下降至1.51%及1.21%。由此可判知，台灣鯔魚之產卵盛期在於11月底至12月中旬。至於生殖週期，10月為產卵前期，11月底至元月為產卵期，2月為產卵後期，3月至9月為靜止期。HSI與GSI值之相關性表示於圖九，未發育成熟之GSI在2%以下時，HSI值在於0.8至1.7%範圍內，隨著卵巢之發育成熟，GSI值有了明顯之上升，HSI值亦隨著明顯之升高，表示肝臟合成卵黃前質之徵象。在卵細胞成熟發育期HSI



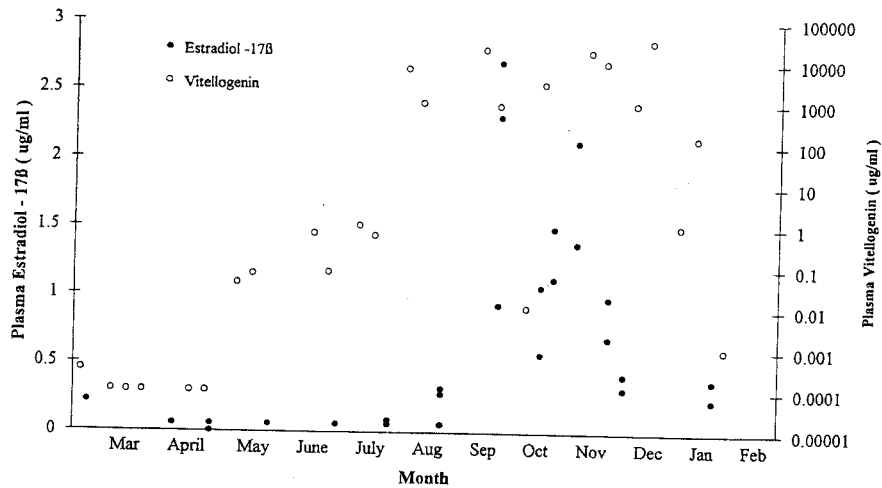
圖八 Annual changes in gonadosomatic and hepatosomatic indices in grey mullet, *Mugil cephalus* L.



圖九 A correlation between gonadosomatic index and hepatosomatic index in grey mullet, *Mugil cephalus*.

值之升高，亦因GSI值之增加而有明顯之相關性。

血清中雌二醇含量自9月即出現升高之徵象(圖十)。由8月之69 ng/ml升高到9月之220 ng/ml, 10月時達到最高峰, 平均含量為1977 ng/ml, 產卵盛期仍維持在1060-1750 ng/ml之濃度(表一)。產卵末期(12月底)雌二醇之含量即有下降之勢。至於血清中卵黃前質含量, 其週年性變化亦與生殖週期極為吻合, 即產卵前期Vg含量由0.1-850



圖十 Annual changes in plasma estradiol-17 β and vitellogenin in grey mullet, *Mugil cephalus* L.

ng/ml serum 急速增加到 4.035 mg/ml serum (10月下旬)。在產卵盛期維持在 6.18-16.80 mg/ml 之高濃度範圍，進行產卵後期亦明顯，減少到 1.06 ng/ml serum。

由上述之數據，血清中雌二醇含量之升高與卵黃生成作用息息相關，俟至產卵盛期即明顯下降，顯示與卵細胞進入最後成熟以至於排卵、產卵有關。同時，血清中卵黃前質含量之升高，早於雌二醇含量之變化，但兩者之週年變化與生殖週期極為一致。就 GSI, HSI, 血清中雌二醇及卵黃前質含量之變化(表一)，充分確定台灣鯔魚群之生殖週年，且發現產卵期仍因地區而異(Nash and Shehadeh 1980)。

本研究所得的結果，顯示台灣鯔魚產卵期在於 11 月至 12 月，此與 Tang (1964) 所報告本島鯔魚產卵期在於 11 月至 2 月間頗有差異。鯔魚產卵洄游乃順著 20-21°C 水流面沿台灣沿岸南下；但近幾年來台灣冬季水溫變化相當大，寒冷天候來襲時日已不很長，再著，鯔魚成熟卵細胞乃隨著水溫變化之幅動及上升而進入退化階段，由此推論，因台灣冬季天候之變動，促成產卵期縮短是可能的。

(五)、促進產卵之試驗

種魚卵細胞發育成熟卵黃第三期且平均卵徑大於 0.6mm，即以人類絨毛促性腺激素(Human Chorionic Gonadotropin, HCG)、Ovaprim (Syndell, 20 μ g GnRHA + 10 mg Domperidone/ml)、性釋素類似物(Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analog, LHRHA, Syndell, Canada 或中國寧波出品)注射處理，其結果綜合於表二。

以 HCG 催熟均能誘導卵黃第三期卵細胞進入最後成熟階段以至

表一 Annual changes in gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI), plasma estradiol-17 β , and vitellogenin in grey mullet.

MONTH	DATE	GSI(%) Mean \pm SEM(N)	HSI(%) Mean \pm SEM(N)	Estradiol (Ug/ml) Mean \pm SEM(N)	Vitellogenin (ug/ml) Mean \pm SEM(N)
March	08-Mar	0.420 \pm 0.020 (2)	0.9650 \pm 0.035 (2)	0.220 (1)	0.0003 \pm (1)
April	25-Apr	0.250 \pm 0.030 (2)	0.8850 \pm 0.055 (2)	0.060 (1)	0.0001 \pm 1.5E-06 (2)
May	16-May	0.144 \pm 0.023 (3)	1.0400 \pm 0.056 (3)	0.033 \pm 0.03 (2)	0.0001 \pm (1)
June	18-Jun	0.300 \pm 0.086 (3)	1.1270 \pm 0.054 (3)	0.060 (2)	0.0001 \pm 0 (2)
July	27-Jul	0.284 \pm 0.030 (5)	1.1870 \pm 0.085 (3)	0.060 (2)	0.0571 \pm 0.01 (2)
August	25-Aug	0.310 \pm 0.049 (3)	1.3300 \pm 0.156 (3)	0.069 \pm 0.009 (3)	0.3849 \pm 0.31 (2)
September	24-Sep	0.493 \pm 0.028 (3)	1.2730 \pm 0.200 (3)	0.220 \pm 0.081 (3)	0.8500 \pm 0.23 (2)
October	26-Oct	5.216 \pm 0.721 (5)	2.6180 \pm 0.236 (5)	1.977 \pm 0.536 (3)	4035.0000 \pm 2985.00 (2)
November	20-Nov	6.742 \pm 0.412 (6)	2.5740 \pm 0.215 (7)	1.060 \pm 0.189 (4)	6182.7527 \pm 4913.65 (4)
December	10-Dec	6.410 \pm 1.337 (3)	2.6730 \pm 0.242 (3)	1.750 \pm 0.370 (2)	14300.0000 \pm 4200.00 (2)
December	28-Dec	3.827 \pm 0.907 (3)	1.7400 \pm 0.399 (3)	0.835 \pm 0.145 (2)	16795.0000 \pm 15805.00 (2)
January	06-Jan	3.107 \pm 0.690 (3)	1.0070 \pm 0.090 (3)	0.370 \pm 0.050 (2)	74.5100 \pm 73.49 (2)
February	26-Feb	1.513 \pm 0.283 (4)	1.2080 \pm 0.151 (4)	0.310 \pm 0.070 (2)	0.0011 \pm (1)

表二 Injection dose and response of grey mullet females.

Body Wt. (kg)	Initial oocyte diameter (mm)	Injection dose		Total Injection Dose	Response
		Priming (unit/g BW)	Spawning (unit/g BW)		
		HCG¹	HCG	Total	
		(IU/g)	(IU/g)	(IU/g)	
2.35	0.644	14.04	28.51	42.55	++
1.70	0.613	19.41	39.41	58.82	++
2.55	0.655	12.94	36.27	49.21	++
2.27	0.623	14.54	29.52	44.02	++
1.85	0.632	17.84	36.22	54.06	++
1.98	0.616	16.67	33.84	50.51	++
2.05	0.629	16.10	32.68	48.78	++
2.30	0.639	14.35	29.13	43.48	++
1.85	0.637	17.84	36.22	54.06	++
1.80	0.652	18.33	37.22	55.55	++
2.05	0.640	16.68	40.00	56.68	++
1.90	0.612	16.68	40.53	57.21	++
2.10	0.620	16.67	40.00	56.67	---
1.52	0.610	16.64	40.13	56.77	++
1.65	0.602	22.72	54.55	77.27	++
2.10	0.630	16.67	40.00	56.67	++
1.80	0.630	16.67	40.00	56.67	++
2.30	0.610	16.65	40.00	56.65	++
		Ovaprim²		Total	
		(ml/kg)	(ml/kg)	(ml/kg)	
1.47	0.603	0.735	1.470	2.205	---
1.95	0.625	0.975	1.950	2.925	---
2.10	0.610	1.050	2.100	3.150	---
		LHRHA³		Total	
		(μ g/kg)	(μ g/kg)	(μ g/kg)	
2.40	0.641	116.67	233.33	350.00	++
1.85	0.610	125.41	250.81	376.23	++
		LHRHA* + Ovaprim			
		(μ g/kg + ml/kg)	(μ g/kg + ml/kg)		
1.80	0.645	133.33 + 0.33	266.67 + 0.67		++
2.00	0.620	133.50 + 0.33	267.00 + 0.67		---
1.25	0.641	128.00 + 0.32	256.00 + 0.64		---

Remarks: ¹. Human chorionic gonadotropin (Lingpo, China);
². Ovaprim (220 μ g GnRH + 10 mg Domperidone, Syndell, Canada)
³. LHRHA (D-ALA) LHRH ethylamine analog (Syndell, Canada);
* LHRHA (Lingpo, China)
++: Response positive, and ---: response negative

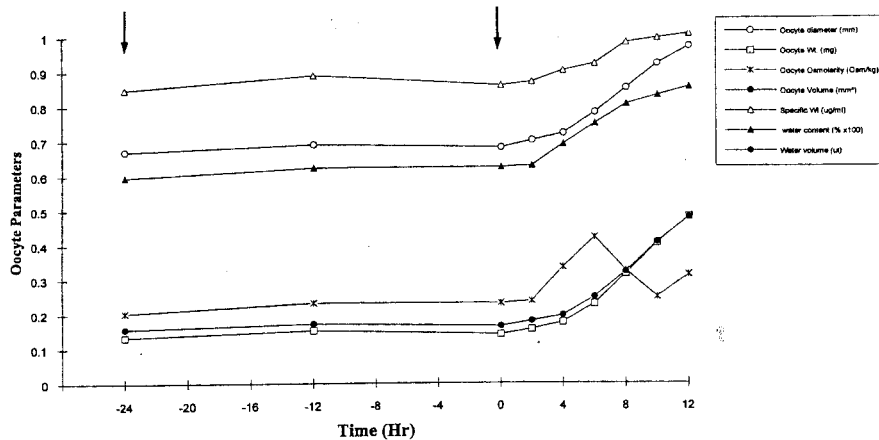
於排卵，惟其所需時間乃因種魚成熟度、生理狀況以及HCG製備純度而異，諸如Puberogen（日本）、Chorulon（荷蘭）以及HCG（中國）等產品間，藥劑純度確有不同之處。Puberogen為醫藥用劑，Chorulon為畜牧用劑，HCG為水產養殖用劑。至於Ovaprim之應用於催熟，未能獲得預期效果。其應用依據乃為下視丘分泌性釋素(Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH)及性抑制素(Gonadotropin Inhibiting Hormone, GnIH)拮抗物，即Dopamine之拮抗物(Domperidone)，藉此等處理以增加GnRH之促進最後成熟之效果。在本試驗未能得到排卵效果，推測其主要原因在於GnRHA處理劑量過低所致。

合成LHRHA (Syndell, Canada)總劑量350-376 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，分兩次注射處理，間隔24 hr，均能誘導排卵，但使用384-400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LHRHA (寧波，中國)以同方法處理三尾種魚，結果僅有一尾達到排卵以至於產卵之效果。由此顯示，LHRHA之應用於催熟乃是可行，惟其效果也因製備純度而有相當程度之差異性。Lee and Tamara (1988)曾報導LHRHA (Sigma, USA)及LHRHA (寧波，中國)對促進鯿魚成熟之效果分別為66.7%及28.6%，證實藥劑純度對催熟效果之差異性。因此，催熟上，除了種魚成熟度及生理狀況之重要性外，激素種類及其純度之選擇，以及劑量之決定乃是決定催熟成功與否之關鍵所在。

(六)、卵細胞最後成熟過程中之生理研究

經由促性腺激素誘導卵細胞進入最後成熟以至於排卵、產卵，其生理之主要變化在於卵細胞滲透壓之調節、類固醇生成轉變(Steroidogenesis)以及卵細胞成分之代謝及轉換等。在類固醇之生成過程，經由Pregnelone, Progesterone, 17α Hydroxyprogesterone (17OHP)而形成成熟類固醇(17α Hydroxy, 20β Dihydroprogesterone, 17α OH, 20β DP)，活化成熟促動因子(Cyclin B及cdc 2 Kinase等)，促導卵細胞進入最後成熟，再加上血清雌二醇含量之降低，促進腦下垂體促性腺激素，導致血清促性腺激素之激增(plasma Gonadotropin Surge)促成了卵細胞之排卵作用。茲將卵細胞之滲透壓調節有關成分及類固醇型態變化所得之結果簡述於下。

成熟卵細胞（即卵黃第三期）經由HCG誘發注射(priming injection)，並於24 hr後另以產卵注射(spawning injection)處理，圖十一及表三中分別以-24 hr及0 hr表示。卵細胞隨即進入最後成熟過程，於8 hr時達到排卵階段，在此過程中，即由0.6-0.7 mm增加到排卵及產卵時之0.85mm及0.97mm，即卵重及卵細胞體積亦有相同之增加，至於水分之增加由卵黃居中期之62.36%（水分含量為87.3 nl）明顯地增加到排卵及產卵時之80.42%及85.33%（水分含量分別為



圖十一 Changes in oocyte components in grey mullet, *Mugil cephalus* L. during oocyte final maturation. The arrows indicate the time of priming and spawning injection of HCG, respectively.

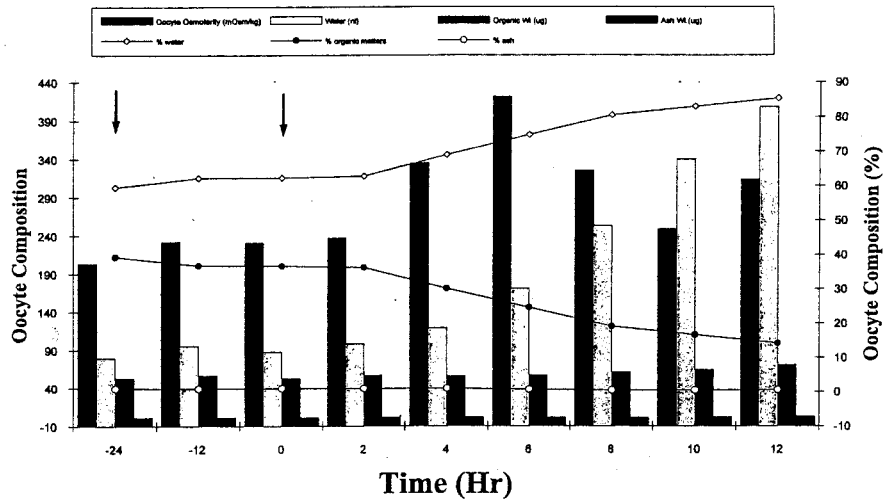
252.8及407.7 nl)。卵細胞滲透壓在卵黃第三期為203.4 mOsm / kg，自卵黃居中期即由231.1 mOsm / kg 急速增加到卵核移動期時之421.3 mOsm/kg。由此可見，卵細胞進入排卵及產卵之際，水分之吸入增加遠大於卵細胞中離子含量之增加，致使相對滲透壓稍於下降之勢。

卵細胞中有機物質及灰份含量，自卵核居中期之52.9 μ g 及1.3 μ g 增加到排卵期之61.2 μ g及1.4 μ g以及產卵時之70.5 μ g及2.6 μ g，含量確有增加之趨勢，但其含量百分比乃因水分之顯著增加，反而呈現下降之勢，即在卵核居中期分別為36.74%及0.988%，排卵期為19.13%及0.45%以及產卵期之14.14%及0.528%（圖十二）。卵細胞最後成熟過程中卵細胞主要離子成分之變化如圖十三和圖十四所示，單位卵細胞水分中，鈉離子自卵核居中期的93.45 μ eq/ml water下降到排卵期及產卵期之49.62及29.91 μ eq/ml water，鉀離子在卵細胞最後成熟過程中亦有相似之變化，惟其含量變化較為緩和。鈣鎂離子亦同，分別由16.25及14.57 μ eq / ml water（圖十四）。在同一過程中，氯離子含量則由卵核居中期之96.31 μ eq / ml water顯顯增加到排卵時之119.75 μ eq/ml water，隨即下降到產卵時之69.24 μ eq/ml water。

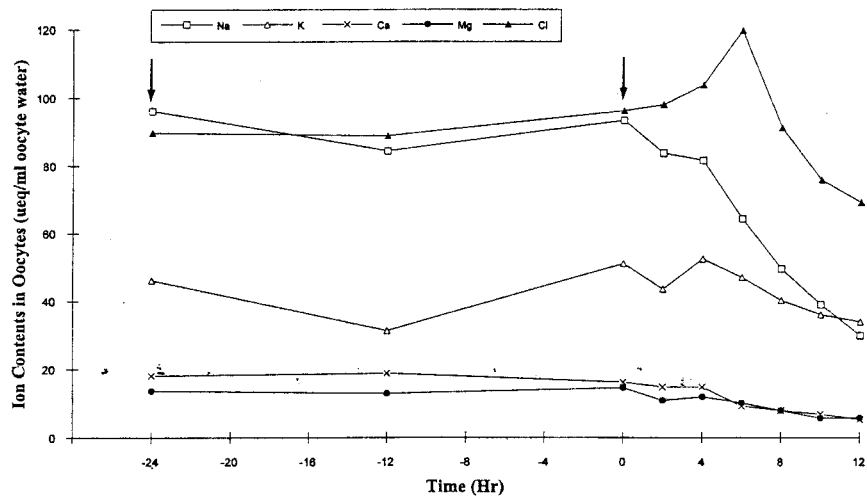
卵細胞中離子含量以單位乾重來表示（圖十五），鈣鎂離子含量自卵核居中期分別由26.43及24.20 μ eq/g dry wt.增加到排卵期的31.55及32.56 μ eq/g dry wt.，雖然增加幅度不很明顯，但增加鈣鎂離子含量是可確定的。其他鈉、鉀及氯離子含量之變化更為明顯，特別是氯離子由卵核居中期159.30 μ eq/g dry wt.增加到排卵時之373.32 μ eq/g dry wt.及產卵期之393.67 μ eq/g dry wt.。由此可見，鰻魚卵細胞進入最後成熟以至於排卵及產卵過程中，離子淨重均有增加之現象，其中以氯離子淨重增最為明顯，但由於在同一階段

表三 The changes in oocyte components in grey mullet during oocyte final maturation.

	Hour											
	-24	-12	0	2	4	6	8	10	12			
Oocyte diameter (mm)	0.670	0.690	0.680	0.700	0.720	0.780	0.850	0.920	0.970			
Oocyte Wt. (mg)	0.134	0.153	0.141	0.156	0.176	0.229	0.316	0.405	0.481			
Oocyte Volume (mm ³)	0.157	0.172	0.615	0.180	0.195	0.248	0.322	0.408	0.478			
Specific Wt (ug/ml)	0.848	0.889	0.858	0.868	0.900	0.920	0.981	0.994	1.006			
Water Content (%)	59.603	62.300	62.358	62.800	68.988	74.804	80.419	82.919	85.330			
Water Content (ml)	79.300	95.200	87.300	97.900	118.600	170.400	252.800	339.300	407.700			
Organic matters (%)	39.427	36.871	36.739	36.27	30.081	24.566	19.131	16.603	14.142			
Organic Wt (ug)	52.900	56.400	52.800	56.500	55.600	56.700	61.200	64.100	70.500			
Ash Wt. (%)	0.97	0.897	0.988	0.93	0.93	0.63	0.45	0.478	0.528			
Ash Wt. (ug)	1.3	1.3	1.3	1.5	1.7	1.5	1.4	1.9	2.6			
Oocyte Osmolarity (mOsm/kg)	203.4	232.4	231.1	237.2	334.8	421.3	325.3	248.6	313.3			



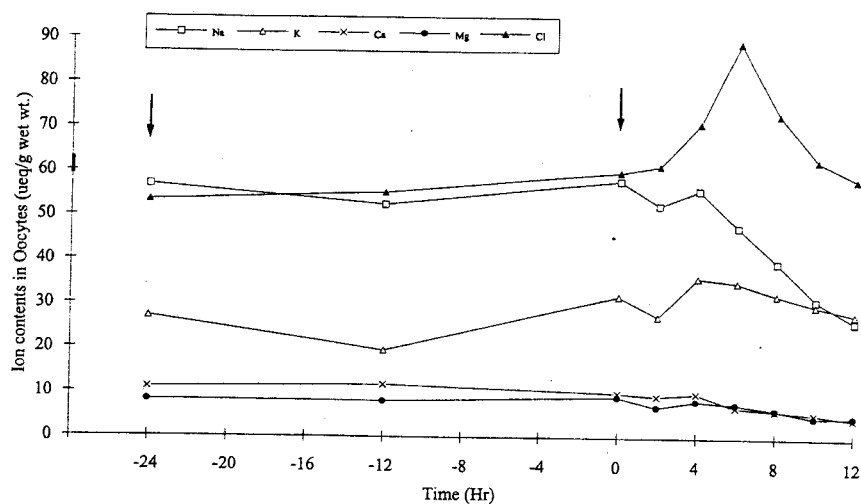
圖十二 The changes in oocyte composition and somalinity in grey mullet, *Mugil cephalus* L. during oocyte final maturation. The arrows indicate the time of priming and spawning injection of HCG, respectively.



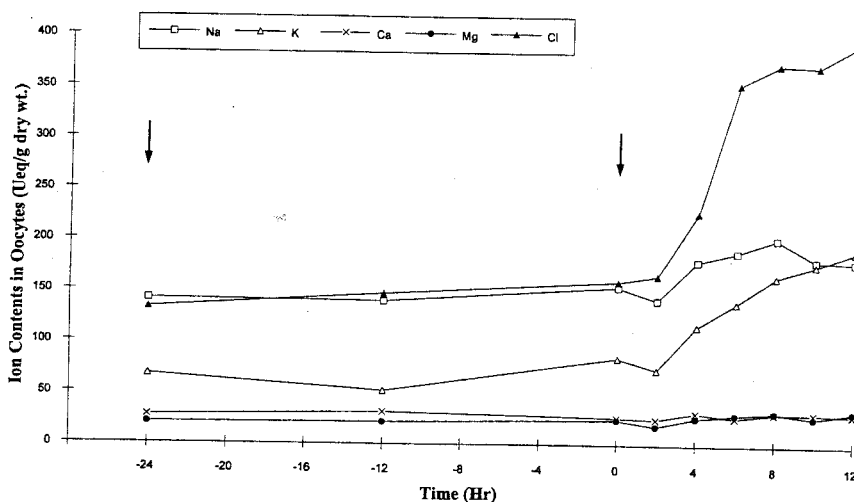
圖十三 Changes in cations and anion composition in grey mullet oocytes, during the final maturation. The arrows indicate the time of priming and spawning injection of HCG, respectively.

中，卵細胞水分增加量遠大於離子增加量，因而單位卵細胞水分中之離子含量，均顯現下降之勢。惟有氯離子在卵核居中期至排卵期間，其增加率大於水分增加程度，因而出現氯離子之增加現象。

圖十六表示卵細胞中主要離子總量與卵細胞滲透壓的比較，在卵黃第三期(-24 hr)一直到卵核居中期(0-2 hr)兩者幾為相近，隨即兩

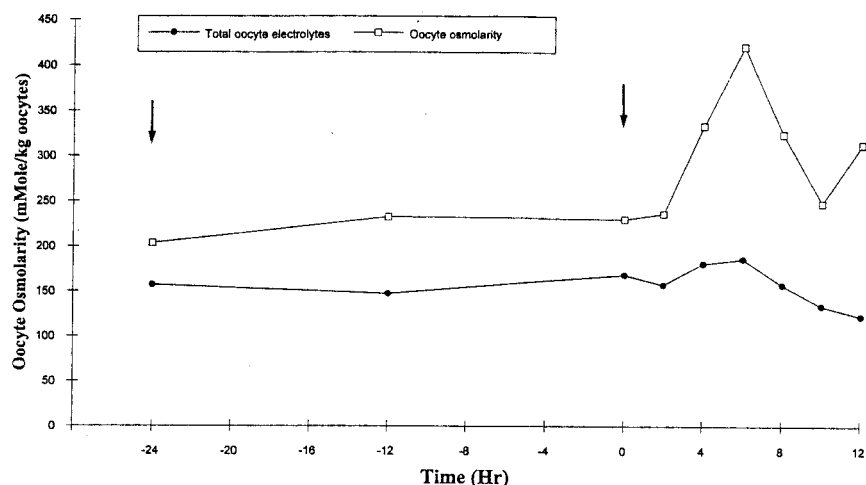


圖十四 Changes in cations and anion composition in grey mullet oocytes, during the final maturation. The arrows indicate the time of priming and spawning injection of HCG, respectively.



圖十五 Changes in cations and anion composition in grey mullet oocytes, during the final maturation. The arrows indicate the time of priming and spawning injection of HCG, respectively.

者之差值增加，在卵核移動期(6 hr)及排卵期(8 hr)時差值最大，由此可推知，卵細胞滲透壓之升高，並非全來自於離子含量之增加，其他有機物質參與滲透壓平衡或有存在之可能，在此階段蛋白質之分解代謝，因而游離氨基酸含量確有明顯得增加，它不但扮演滲透壓平衡外，將有助於供應卵及胚胎發育所需能量來源。



圖十六 Comparison on the total oocyte electrolytes and oocyte osmolarity in grey mullet, *Mugil cephalus*. The arrows indicate the time of priming and spawning injection of HCG, respectively.

血清中雌二醇， 17α OHP及 17α OH， 20β DP含量變化如表四所示。雌二醇是促進卵黃生成作用之重要類固醇，在卵核居中期達到最高點，其含量為2355.98 pg/ml，隨著卵細胞進入最後成熟過程，血清雌二醇含量即顯著下降，卵核移動期為217.16 pg/ml，排卵期為34.59 pg/ml。至於 17α Hydroxyprogesterone，乃由progesterone轉變，且轉換成誘導成熟類固醇(Maturation Inducing Steroid, MIS，即 17α Hydroxy, 20β Dihydroprogesterone)。經分析結果， 17α Hydroxyprogesterone含量由卵核居中期的0.94 ng/ml濃度稍增至卵核

表四 Steroid concentrations in the serum of grey mullet, *Mugil cephalus* L. during oocyte final maturation.

Stage	Fstradiol- 17β (pg/ml)	17α OHP (ng/ml)	17α OH, 20β DP (ng/ml)
Tertiary Yolk Globule	247.73 ± 134.9	1.58 ± 0.56	0.063 ± 0.002
Subperipheral	2355.98 ± 246.8	0.94 ± 0.29	0.126 ± 0.078
Germinal Vesicle	217.16 ± 81.91	1.45 ± 0.09	17.54 ± 1.280
Migration			
Germinal Vesicle	40.98 ± 4.19	1.21 ± 0.32	
Breakdown			
Ovulation	34.59 ± 5.59	1.16 ± 0.12	0.274 ± 0.097

Remarks: 17α OHP, 17α Hydroxyprogesterone
 17α OH, 20β DP, 17α Hydroxy, 20β Dihydroprogesterone

移動期之1.45 ng/ml，即下降到排卵期之1.16 ng/ml。血清中 17α Hydroxy, 20β Dihydroprogesterone之含量在卵黃第三期時為0.063 ng/ml，卵核居中期為0.126 ng/ml。在卵核移動期即顯現劇增，達到17.54 ng/ml之濃度，排卵期則明顯下降到0.274 ng/ml。由此可推論鮭魚雌二醇參與卵黃生成作用之重要性，隨著進入卵細胞最後成熟明顯下降，將有助於血清促性腺激素之劇增，至於 17α Hydroprogesterone及 17α Hydroxy, 20β Dihydroprogesterone兩者均在卵核移動期明顯增加，與促進卵細胞最後成熟以至於排卵有關，此現象與鮭魚、鯉魚等一致(Kagawa and Asahina 1991)。

(七)、鮭魚種苗大量生產技術之開發研究

於產卵季節選擇種魚，每一產卵池($5 \times 3 \times 1.2 \text{ m}^3$)畜養雌雄魚各三十尾。雌魚以卵細胞成熟度(卵黃第三期)為選擇依據，雄魚則在腹部輕壓，流出白色精液為成熟度判斷之依據。前者每公斤注射 $300\mu\text{g}$ LHRHA，分兩次處理，間隔24 hr，雄魚則以5000 IU HCG/尾或50 mg methyltestosterone/尾以促進排精作用。經激素處理，採用自然產卵方法，處理兩天後以採卵網收集受精卵，移到室外土池中孵化，或在原水池中孵化後移出。

土池($50 \times 20 \times 1 \text{ m}^3$)預先培養綠藻，接種輪蟲。池水以化學肥料(硫安10 kg、尿素5 kg、過磷酸鈣2kg)及有機肥料(黃豆餅碎片8kg分裝兩裝懸吊於池角)，培養單細胞綠藻及其他微生物，待綠水培養到綠藻 10^5 cells/ml以上時接種輪蟲。在必要時添加酵母粉及鰻飼料，養輪蟲及撓腳類，使用量每池總量為2-5 kg。

育苗土池，全池敷設打氣裝置，池水鹽度為千分之35-36，水溫大致在 $20-27^\circ\text{C}$ ，但在寒流來襲亦有下降到 12°C 之可能。將受精卵或孵化後2-3天稚魚移入該土池中，主要依賴池中培育之天然餌料，當稚魚卵黃囊消失，開始覓餌時，每池投入5-10斤牡蠣收集到的受精卵，或補充人工餌料(B.P等)，持續7-12天，隨後以豐年蝦補充，一直到40-50天即可育成種苗。經初步之試驗，獲得近10萬尾種苗，證明了開放式育苗技術以達到鮭魚苗量產之可行性，且可應用於其它海水魚種。

採用自然產卵，遠較人工產卵為佳，不但受精率明顯改進外，種魚乃可保留繼續進行繁殖工作，受精卵之取得更能掌握。至於育苗之關鍵在於餌料生物之培養供應，為了達到魚苗量產之目標，大規模餌料生物培養模式亟待建立，且在人工初期餌料尚未開發成功前，輪蟲、撓蟲類等乃是相當重要之餌料生物，但以純綠藻培養輪蟲，時有產量不繼，品質及持續時日上也常造成困擾，經以無機化學肥料及有機物質，並補充酵母菌、有機碎片等培養輪蟲及其他撓腳類等，明顯地增加了餌料生物產量，且持續數日之結果更是值以仿用簡便又實用

之育苗方法。育苗期間再以人工飼料諸如鰻粉BP隨時補充，育苗操作上相當簡便，育成率亦相當理想，更重要的是，運作上所需勞力大可減少，育苗成本也因而大幅度之改進，始可符合經濟效益之要求。

參考文獻

- Benton WD, RW Davis. 1977. Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science*, 196: 180-182.
- Chang YS, CJ Huang, FL Huang, TB Lo. 1988. Primary structure of carp gonadotropin subunits deduced from cDNA nucleotide sequences. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 32: 556-564.
- Esch FS, AJ Mason, K Cooksey, M Nercads, S Shimasazi. 1986. Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the β chain of bovine follicle stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6618-6621.
- Fiddes JC, K Talmadge. 1984. Structure, expression and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Prog. Hormone Res.*, 40: 43-78.
- Gubler U, BJ Hoffman. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA library. *Gene*, 25: 263-269.
- Hewick RM, MW Hunkapiller, LE Hood, WJ Dreyer. 1981. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.*, 256: 7990-7997.
- Huang FL, YS Chang. 1980. The gonadotropic stimulation of androgen production on cary testis *in vitro*. *Proc. Natl. Sci. Council, ROC* 4: 392-400.
- Huang FL, YS Chang, TB Lo. 1989. The molecular biology of fish gonadotropin. *Natl. Sci. Council Monthly*, 17: 661-679.
- Huang FL, YS Chang, LC Yu, TB Lo. 1990. Puification, characterization and molecular cloning of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) gonadotropin and its subunits. *J. Chinese Biochem. Soc.* 19: 10-24.
- Kagawa H, K Asahina. 1991. *Reproduction and Hormone: steroid hormone*, 85: 0-65.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lee CS, CS Tamaru. 1988. Advances and future prospects of controlled maturation and spawning of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) in captivity. *Aquaculture*, 74: 63-73.

- Liu CS, FL Huang, YS Chang, TB Lo. 1989. Pike eel (*Muraenesox cinereus*) gonadotropin: amino acid sequences of both α and β subunits. *Europ. J. Biochem.*, 186: 105-114.
- Maurer RA, ML Croyle, JE Donelson. 1984. The sequence of a cloned cDNA for β subunit of bovine thyrotropin predicts a protein containing both NH₂-and COOH-terminal extensions., *J. Biol. Chem.* 259: 5024-5027.
- Nagahama Y. 1991. Roles of endocrine system in fish maturation. In "Reproductive Rhythm in Marine Fish", edited by K. Hirose, Fisheries Series 85, 9-26.
- Nagahama Y. 1993. Regulation of oocyte maturation in aquatic animals: The comparative and geney aspects. *Biol. Internat.* (28): 27-32.
- Nash CE, ZH Shehadeh. 1980. Review of breeding and propagation techniques for grey mullet, *Mugil cephalus* L. ICLARM Studies and Review, No.3, 87pp.
- Querat B, M Moumni, M Jutisz, YA Fontaine, R Counis. 1990. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for the putative β subunit of the type-II gonadotropin from the European eel. *J. Mol. Endocrinol.*, 4: 257-264.
- Sanger F, S Nicklen, AR Coulson. 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Swanson P, M Bernard, M Nozaki, K Suzuki, H Kawauchi, WW Dickhoff. 1989. Gonadotropins I and II in jnvenile coho salmon. *Fish physilo. Biochem.*, 7: 169-176.
- Tang YA. 1964. Induced spawning of striped mullet by hormone injection. *Jap. J. Ichthyol.*, 12 (1/2): 23-28.
- Ullrich A, J Schine, J Chirgukin, R Pictet, E Tischer, WJ. Rutter, HM Goodman. 1977. Rat insulin genes: construction of plasmids contining the coding segments. *Science*, 196: 1313-1919.
- Yoshikuni M, Y Nagahama. 1991. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Bull. Inst. Zool., Acad. Sini. Monogr.*, 16: 139-172.