

## 雲紋石斑魚之人工繁殖、初期發育及仔稚魚培育

邱沛盛<sup>1\*</sup> · 黃政軒<sup>1</sup> · 蔡惠萍<sup>2</sup> · 朱永桐<sup>1</sup> · 劉于溶<sup>1</sup> · 葉信利<sup>1</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心

<sup>2</sup>行政院農業委員會水產試驗所東部海洋生物研究中心

### 摘要

本研究目的為記錄雲紋石斑魚 (*Epinephelus moara*) 成功人工繁殖、初期發育及仔稚魚培育之成果。將 5 尾雌魚埋植混合雄性素藥粒 (1 mg/kg body weight, BW)，9 個月後有 3 尾雌魚已性轉變為雄魚並可採集到具活力之精子。注射 2 次 HCG 1,000 IU/kg BW 可在 72 hr 後使雌魚卵徑發育至 900 - 1,000  $\mu\text{m}$ 。透過人工授精共獲得 135,000 粒上浮卵，其中受精率為  $99.67 \pm 0.33\%$ 、孵化率為  $99.00 \pm 0.57\%$ 。受精卵卵徑為  $0.91 \pm 0.01 \text{ mm}$ ，為圓形、透明之浮性卵。在水溫  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$  條件下，歷經 29 hr 28 min 孵化。剛孵化仔魚體全長  $1.77 \pm 0.02 \text{ mm}$ 、肌節數 21 - 22；孵化後第 3 天仔魚體全長  $2.90 \pm 0.02 \text{ mm}$ ，口部已開啟；孵化後第 7 天，體全長達  $3.44 \pm 0.07 \text{ mm}$  時，背鰭第二硬棘及腹鰭硬棘開始發育；孵化後第 21 天，體全長達  $12.95 \pm 0.29 \text{ mm}$  時，延長的硬棘開始縮短；孵化後第 33 天，體全長達  $17.69 \pm 0.09 \text{ mm}$  時，各鰭條數與成魚相同。仔稚魚體全長成長方程式為  $Y = 2.08 + 0.18X + 0.01X^2$ ，Y 代表體全長、X 代表孵化後天數，可解釋體全長成長情形的 97.5% ( $R^2 = 0.975$ ,  $n = 244$ )。仔稚魚培育過程餌料投餵序列依序為牡蠣受精卵、輪蟲及橈足類。

關鍵詞：雲紋石斑魚、人工繁殖、初期發育、仔稚魚培育

### 前言

雲紋石斑魚 (*Epinephelus moara*) 英文俗名為 kelp grouper，分類上屬於鱸形目 (Perciformes)、鮨科 (Serranidae)、石斑魚屬 (*Epinephelus*)，主要分布於西北太平洋，包含日本、韓國、臺灣及中國沿海 (郭等, 2008; Guo *et al.*, 2009)，因其具有生長快速、對環境適應力強、肉質鮮美等特性，使其具有高經濟價值 (陸等, 2011)。早期雲紋石斑魚被認為是褐石斑魚 (*E. bruneus*) 的同種異名 (沈, 1993; Heemstra and Randall, 1993)，直到近十年來中國學者分別以形態學、分子生物學及細胞遺傳學方法 (郭等, 2008; Guo *et al.*, 2009, 2014; Liu *et al.*, 2013) 進行各項分析，確認雲紋石斑魚為有效種。關於雲紋石斑魚的基礎研究已有許多文獻記錄，分別探

討其染色體核型分析 (郭等, 2006)、心臟、腦及腎臟細胞系的培養技術 (劉等, 2015; Liu *et al.*, 2018a, 2018b)、粒線體基因體分析 (Xiao *et al.*, 2016)、冷凍配子保存技術 (祈等, 2014; Tian *et al.*, 2017, 2018; Zhang, 2020) 及低鹽度逆境下之生理反應 (Gao *et al.*, 2018)。此外，在繁養殖方面也有顯著成果，梁等 (2011) 描述規模化人工繁殖技術，張等 (2016) 描述零換水系統之育苗技術，Peng *et al.* (2017) 則評估稚魚投餵低蛋白高脂質飼料的成長表現。

運用不同種類、劑量之生殖激素誘導石斑魚雌性親魚卵成熟之研究已有許多文獻報導 (葉等, 1987; Tucker *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2008)，然而，在雲紋石斑魚還未有詳細描述，雖梁等 (2011) 指出，應用人類絨毛膜促性腺激素 (Human chorionic gonadotropin, HCG) 及促黃體激素釋放激素 (Luteinising-hormone releasing hormone, LHRH) 可誘導雲紋石斑魚雌魚成熟，但有關注射處理次數、

\*通訊作者 / 臺南市七股區三股里海埔 4 號, TEL : (06)7880461 ext. 219; E-mail: pschiu@mail.tfrin.gov.tw

後續卵徑發育及催熟效果則沒有記錄。

魚類的初期發育階段，係指魚類個體發育過程中自受精卵開始到稚魚期結束為止之全部過程 (Kendall *et al.*, 1984)，而透徹的瞭解魚類初期發育過程也是繁養殖工作中重要的步驟 (Tucker, 2012)。梁等 (2011) 及 Song *et al.* (2012) 均已描述雲紋石斑魚的初期發育，但不同培育的環境及養殖條件皆會影響魚類的初期發育過程 (Klimogianni *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010)，因此，在本研究中仍會再一次描述雲紋石斑魚完整的胚胎及仔稚魚發育過程，並與過去的文獻相互比較。

雲紋石斑魚的繁養殖研究在中國已有許多學者投入 (梁等, 2011; Song *et al.*, 2012)，臺灣產業界也曾有成功繁殖的記錄，但國內相關的學術報告仍付之闕如。因此，本研究分別從親魚培育、人工繁殖、初期發育及仔稚魚培育方面描述本所海水繁養殖研究中心繁殖雲紋石斑魚的成果，期望本研究能成為提供國內產業界發展雲紋石斑魚養殖的重要參考資料。

## 材料與方法

### 一、親魚培育

雲紋石斑魚親魚共 32 尾，平均體全長  $62.24 \pm 1.14$  cm (49.30 – 76.50 cm)、平均體重  $5.17 \pm 0.23$  kg (3.28 – 8.90 kg)，蓄養於室外土底魚塢 (42 m × 20 m × 3 m，約 1,600 m<sup>3</sup> 水體)。每日測量水溫、每 2 日投餵生鮮竹筴魚 (*Trachurus* sp.) 及鯖魚 (*Scomber* sp.) 作為餌料，每次投餵量為親魚體重的 1%，每週一補充次維他命以強化親魚營養，方法參考 Ranjan *et al.* (2018)。為獲得繁殖用雄性親魚，在 2019 年 5 月挑選 5 尾雌魚，平均體全長  $62.30 \pm 1.84$  cm (3.60 – 5.29 cm)、平均體重  $4.50 \pm 0.32$  kg (3.60 – 5.29 kg)，檢查卵徑發育情形後，參考葉等 (1989) 的方法，以 Testosterone、17 $\alpha$ -methyltestosterone 及 Testosterone propionate (Sigma, USA) 等比例製作為混合雄性素藥粒 (androgen mixture, AM, 1 mg/kg body weight, BW) 進行背部肌肉埋植，誘導雌魚性轉變，並於隔年生殖季節 (2 月至 4 月) 檢查是否可採集到精液並記錄精子活力，而精子活力的判定參照葉與丁 (1990)。

### 二、以不同生殖激素誘導雲紋石斑魚卵巢發育

挑選 12 尾雌魚，體全長  $51.27 \pm 2.60$  cm (45.50 – 56.30 cm)，體重  $2.98 \pm 0.13$  kg (2.70 – 3.30 kg)，隨機分為 3 組，每組 4 尾雌魚。以 2-phenoxyethanol 300 ppm (Merck KGaA, 99%, Germany) 麻醉後，使用軟管由生殖孔採集卵粒，確認多數卵達到第四卵母細胞發育期 (卵徑 400  $\mu$ m 以上) 後 (判定標準依循葉等, 1987 的描述)，分別以生理食鹽水 (0.9% normal saline) (處理組 A)、HCG (FujiPharma CO., LTD. 10,000 IU, Japan) 1,000 IU/kg BW (處理組 B) 及 HCG 1,000 IU/kg BW + LHRH (Ningbo Sansheng Pharmaceutical CO., LTD., 100  $\mu$ g, China) 10  $\mu$ g/kg BW (處理組 C)，透過胸鰭基部注射，誘導雲紋石斑魚卵巢發育，每 24 hr 採集一次卵粒，觀察 0 – 72 hr 的卵徑變化。

### 三、人工授精

挑選 1 尾雄魚 (體全長 76.50 cm、體重 6.78 kg) 並採集精液約 1 ml，置入 1.5 ml 離心管，暫時保存於 4°C 環境。挑選 2 尾成熟雌魚 (平均體全長  $61.00 \pm 1.00$  cm、體重  $4.20 \pm 0.92$  kg)，分別以 HCG 1,000 IU/kg BW 注射胸鰭基部進行催熟，一共注射兩針，每針次間隔 24 hr，等待卵粒達到最後成熟後，透過人工採卵收集成熟卵粒至玻璃燒杯，加入新鮮海水並同時加入雄魚精液進行人工授精，接著靜置 10 – 15 min 後，分離上浮卵粒與下沉卵粒，並且在上浮卵粒中隨機採集 50 粒卵觀察受精率，以觀察到細胞分裂確認為成功受精。在受精卵中再隨機取出 50 粒發育至 19 – 20 肌節期的卵，等待仔魚孵化後計算孵化率。受精率以及孵化率均採樣三重複。

### 四、受精卵發育觀察

收集剛受精的魚卵放置於 1,000 ml 燒杯中，輕微通氣，並將溫度控制於  $23.8 \pm 1.2$ °C，隨機採樣 50 粒卵至正立光學顯微鏡 (MICROTECH C2000-LED, Taiwan) 下觀察胚胎發育情形並拍照紀錄 (Dino-Eye AM4023, Taiwan)，胚胎發育形質特徵描述參照 Leu *et al.* (2005)。

## 五、餌料生物製備及培養

牡蠣 (*Crassostrea angulate*) 受精卵的製備參照 Su *et al.* (1997) 的方法，輪蟲 (*Brachionus sp.*, size 150 – 250  $\mu\text{m}$ ) 及橈足類 (*Apocyclops royi*, size 110 – 100  $\mu\text{m}$ ) 分別以 600  $\text{m}^3$  及 3,000  $\text{m}^3$  室外土池進行大量培養，每日添加一次光合菌 (*Rhodovulum sulfidophilum*) 進行培育與滋養，依照餌料生物的生長情形調整菌液添加量 (約 2,000 – 6,000 L/每日)。以沉水馬達配合浮游生物網收集每日所需的輪蟲 (網目: 60  $\mu\text{m}$ ) 及橈足類 (網目: 120  $\mu\text{m}$ )，投餵前以乾淨海水清洗備用。

## 六、仔稚魚培育與發育觀察

採用 160  $\text{m}^3$  的半室外水泥池進行仔稚魚飼育，採自然光照，每天測量水溫、鹽度及水質管理情形，育苗方法參考 Leu *et al.* (2005)。每日採樣 5-10 尾魚苗，觀察前先以 MS-222 (Sigma, St Louis, MO, USA) 20 mg/L 麻醉，再以解剖顯微鏡 (Olympus SZH10) 觀察並拍照記錄，測量體全長 (total length, TL) 及口徑 (gape height, GH)。觀察完後以 7% 中性福馬林固定 2 天，再置換成 70% 酒精中永久保存，以供日後分析研究用，魚苗形態描述參照 Leu *et al.* (2005)。

口徑的計算公式 (Shirota, 1970)

$$GH = \sqrt{(UJL^2 + LJL^2)}$$

GH：口徑；UJL (uper jaw length)：上顎長；LJL (Lower jaw length)：下顎長。

## 七、統計分析

所有數據以平均值  $\pm$  標準誤 (mean  $\pm$  SEM) 表示，不同生殖激素對雲紋石斑魚卵成熟之探討實驗結果以單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 進行統計分析，並以 Tukey's honestly significant difference test 進行事後檢定，比較各採樣時間點卵徑平均值差異的顯著性，顯著水準  $\alpha = 0.05$ 。

## 結 果

### 一、親魚培育

親魚培育環境整年的水溫範圍為在 18.05 – 32.55°C，2019 年 5 月進行混合雄性素藥粒埋植的雲紋石斑魚雌魚，在 2020 年 3 月發現 5 尾雌魚中有 3 尾採集到精液 (精子活力皆為+++)，性轉變成功率 60%。其餘 27 尾雌魚在 2020 年 3 月檢查發現有 8.5% 的個體卵徑發育達到 30 – 100  $\mu\text{m}$ 、2.8% 的個體卵徑發育達到 200 – 300  $\mu\text{m}$ 、82.8% 個體卵徑發育達到 400  $\mu\text{m}$  以上，適合進行催熟與人工繁殖。

### 二、不同生殖激素誘導雲紋石斑魚卵成熟之探討

以生理食鹽水 (0.9% Normal Saline) (處理組 A)、HCG 1,000 IU/kg BW (處理組 B) 及 HCG 1,000 IU/kg BW + LHRH 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW (處理組 C) 注射雲紋石斑魚，誘導其卵巢發育，並觀察卵粒卵徑在 0 – 72 hr 之變化，結果顯示 A 組在 0、24、48 及 72 hr 的卵徑分別為 553.0  $\pm$  51.5  $\mu\text{m}$ 、497.0  $\pm$  37.1  $\mu\text{m}$ 、479.0  $\pm$  22.6  $\mu\text{m}$  及 462.0  $\pm$  9.3  $\mu\text{m}$ ；B 組卵徑分別為 532.0  $\pm$  22.3  $\mu\text{m}$ 、631.0  $\pm$  11.7  $\mu\text{m}$ 、900.0  $\pm$  100.1  $\mu\text{m}$  及 1014.0  $\pm$  59.0  $\mu\text{m}$ ；C 組卵徑分別為 537.0  $\pm$  6.21  $\mu\text{m}$ 、596.0  $\pm$  29.7  $\mu\text{m}$ 、984.0  $\pm$  23.6  $\mu\text{m}$  及 963.0  $\pm$  26.3  $\mu\text{m}$ 。B 組及 C 組 48 – 72 hr 的卵徑顯著大於 A 組 ( $p < 0.05$ )，但 B、C 組間無顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (Fig. 1)。

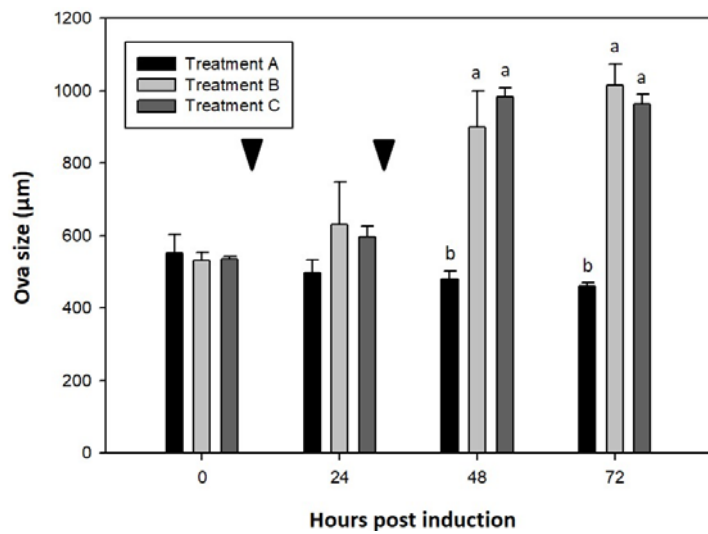
### 三、人工授精

本次試驗採集 2 尾雌魚的卵粒一共 185 g，人工授精後經過沉澱分離，下沉卵粒為 110 g，上浮卵粒為 75 g (約 135,000 粒卵)，其中受精率為 99.67  $\pm$  0.33% (n = 3)、孵化率為 99.00  $\pm$  0.57% (n = 3)。

### 四、胚胎發育

雲紋石斑魚胚胎發育各階段關鍵特徵詳如 Table 1。受精卵為圓形、透明的浮性卵，內有單一油球。受精卵卵徑為 0.91  $\pm$  0.01 mm (0.88 – 0.95 mm, n = 30)、油球徑為 0.20  $\pm$  0.01 mm (0.17 – 0.22 mm,

**Fig. 1** The effects of different hormone induction treatments on ova size development of female broodfish ( $n = 4$ ) over 72 hours. Treatment A (control) = 0.9% Normal Saline; Treatment B = HCG 1,000 IU/kg body weight (BW); Treatment C = HCG 1,000 IU/kg BW + LHRH 10  $\mu$ g/kg BW. The inverted triangles indicate the injection times. Bars sharing the same letter are not significantly different, whereas those with different letters differ at  $p < 0.05$ .



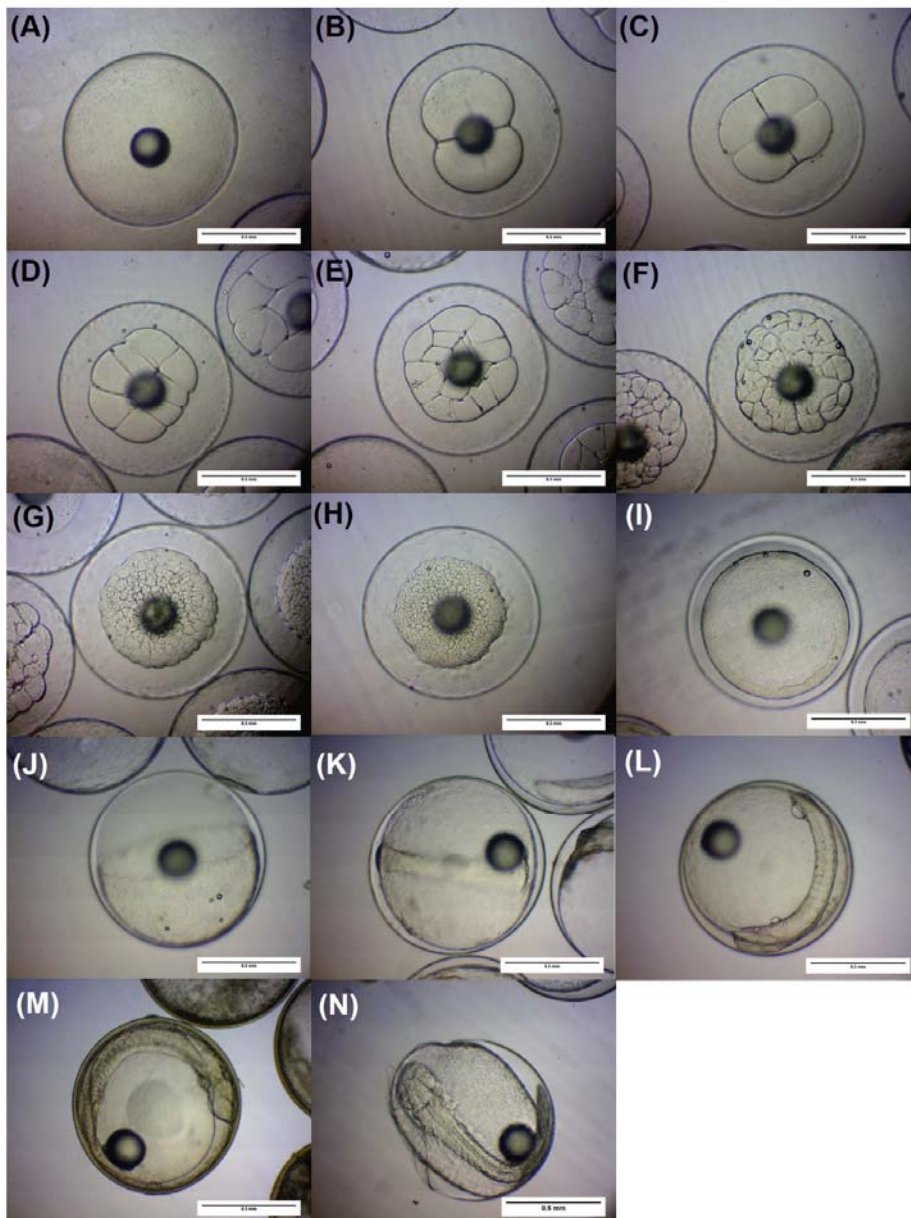
**Table 1** Embryonic development of *Epinephelus moara* at  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$

Developmental stage	Duration time (hr : min pf)	Key morphological characteristic
Fertilized egg	00:00	The fertilized egg was spherical, transparent and buoyant
2-cell	01:16	1 <sup>st</sup> cleavage, dividing the blastodisc into 2 blastomeres
4-cell	01:19	2 <sup>nd</sup> cleavage
8-cell	01:49	3 <sup>rd</sup> cleavage
16-cell	02:12	4 <sup>th</sup> cleavage
32-cell	02:44	5 <sup>th</sup> cleavage
64-cell	03:27	6 <sup>th</sup> cleavage
Morula	04:13	Successive cleavage, blastomeres reduced in size
Blastula	08:07	Beginning of the blastodisc formation
Gastrula	11:35	50-75% of yolk was covered with blastodisc
Neurula	15:24	Embryonic shield appears, blastopore closes
Myomeres appears	18:27	8-9 myomeres appears, Kupffer's vesicle appears
Heart beat	21:34	19-20 myomeres appears, heart beat appears
Hatching	29:28	Larva broke the chorion

pf: post fertilized

$n = 30$ ) (Fig. 2A)。在水溫  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$  條件下，受精後 1 hr 16 min，開始第一次分裂，進入 2 細胞期 (Fig. 2B)；受精後 1 hr 19 min，第二次分裂，進入 4 細胞期 (Fig. 2C)；受精後 1 hr 49 min，第三次分裂，進入 8 細胞期 (Fig. 2D)；受精後 2 hr 12 min，第四次分裂，進入 16 細胞期 (Fig. 2E)；受精後 2 hr 44 min，第五次分裂，進入 32 細胞期 (Fig. 2F)；受精後 3 hr 27 min，第六次分裂，進入 64 細胞期 (Fig. 2G)；受精後 4 hr 13 min，卵裂球體積減少，而細胞分裂的數量已經難以計算，狀如桑椹，進入

桑椹期 (Fig. 2H)；受精後 8 hr 7 min，胚盤形成，進入囊胚期 (Fig. 2I)；受精後 11 hr 35 min，進入原腸期，可觀察到胚盤覆蓋卵黃囊面積達 50 - 75% (Fig. 2J)；受精後 15 hr 24 min，胚孔閉合、胚體形成，此時為神經胚期 (Fig. 2K)；受精後 18 hr 27 min，觀察到 8 - 9 個肌節、眼胞形成、庫氏胞 (Kupffer's vesicle) 出現 (Fig. 2L)；受精後 21 hr 34 min，出現 19 - 20 個肌節、心跳與聽胞出現 (Fig. 2M)；受精後 29 hr 28 min，仔魚突破卵膜孵化 (Fig. 2N)。



**Fig. 2** Embryonic development of *Epinephelus moara* at  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$ . (A) Fertilized eggs; (B) 2-cell stage, 1 hr 16 min post fertilization (pf); (C) 4-cell stage, 1 hr 19 min pf; (D) 8-cell stage, 1 hr 49 min pf; (E) 16-cell stage, 2 hr 12 min pf; (F) 32-cell stage, 2 hr 44 min pf; (G) 64-cell stage, 3 hr 27 min pf; (H) morula stage, 4 hr 13 min pf; (I) blastula stage, 8 hr 7 min pf; (J) gastrula stage, 11 hr 35 min pf; (K) neurula stage, 15 hr 24 min pf; (L) myomeres appeared, 18 hr 27 min pf; (M) heart beat appeared, 21 hr 34 min pf; (N) larva broke the chorion, 29 hr 28 min pf. Scale bars = 0.5 mm.

## 五、仔稚魚發育

雲紋石斑魚仔稚魚發育各階段關鍵特徵詳如 Table 2。在水溫  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$  條件下，剛孵化仔魚體全長  $1.77 \pm 0.02$  mm ( $n = 10$ )，肌節數 21 - 22，帶有一大卵黃囊 (yolk-sac)，油球後位，眼睛、口部及消化道尚未發育完全，游泳能力差，呈現頭下

尾上在水中漂浮 (Fig. 3A)；孵化後第 2 天仔魚，脊索末端上屈前期 (preflexion)，體全長  $2.82 \pm 0.03$  mm ( $n = 12$ )，卵黃囊消耗約 75% 的體積，消化道形成 (Fig. 3B)；孵化後第 3 天仔魚體全長  $2.90 \pm 0.02$  mm ( $n = 19$ )，卵黃囊及油球已消耗殆盡，眼睛發育完全，口部與肛門開啟，消化道上 方軀幹處出現明顯的叢狀黑色素分布，尾柄處也

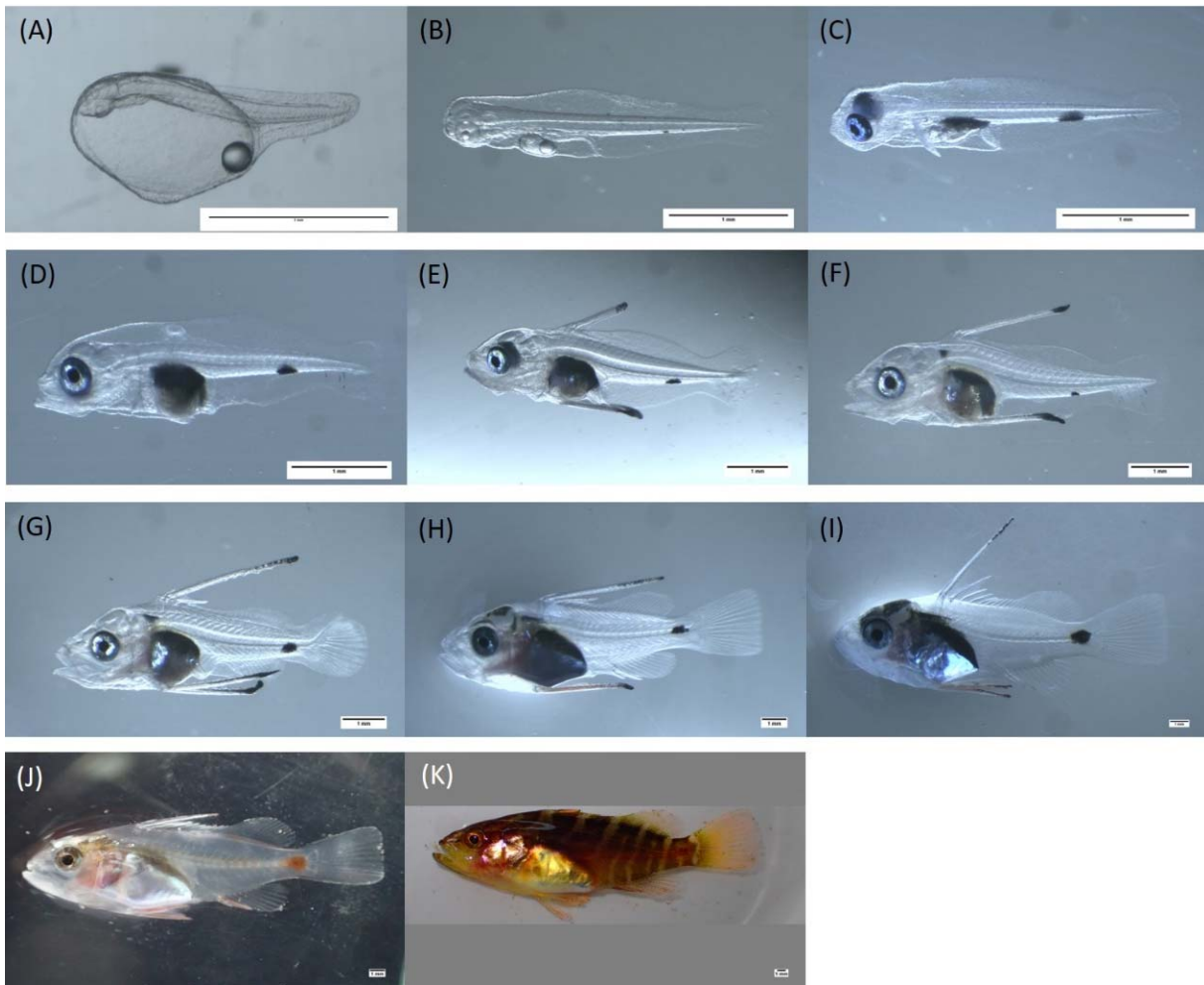
**Table 2** Key morphological characteristics at each developmental stage of *Epinephelus moara* larvae and juveniles cultured at temperature  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$ 

Developmental stage	Duration time	Key morphological characteristic
Larval		
Yolk-sac	29 hr 28 min pf	Larva is free from the membrane; 21-22 myomeres; one big yolk-sac; $1.77 \pm 0.02$ mm Total length (TL)
Preflexion	2 dph	Digestive tract appeared; yolk-sac reduced 75% in size; $2.82 \pm 0.03$ mm TL
	3 dph	Mouth and anus opened; yolk-sac completely absorbed; $2.90 \pm 0.02$ mm TL
	7 dph	The buds of the 2nd dorsal and pelvic fin spines appeared; $3.44 \pm 0.07$ mm TL
	10 dph	The 2nd dorsal and pelvic spines become more elongated; $4.62 \pm 0.07$ mm TL
Flexion	12 dph	The hyprualia bones appeared; $5.82 \pm 0.04$ mm TL
Postflexion	15 dph	The hyprualia bones assuming a vertical position; $7.40 \pm 0.05$ mm TL
	21 dph	The 2nd dorsal and pelvic spine length have decreased; $12.95 \pm 0.29$ mm TL
Juvenile		
	33 dph	The fin ray counts attain an adult complement; $17.69 \pm 0.09$ mm TL
	41 dph	Major spines disappear; the orange color can visible on the 2nd dorsal and pelvic spine; one obvious orange spot appeared on the caudal peduncle
	46 dph	Five to nine oblique and brown bars visible on the body; the transformation was complete

Pf: post fertilized; dph: days post hatching

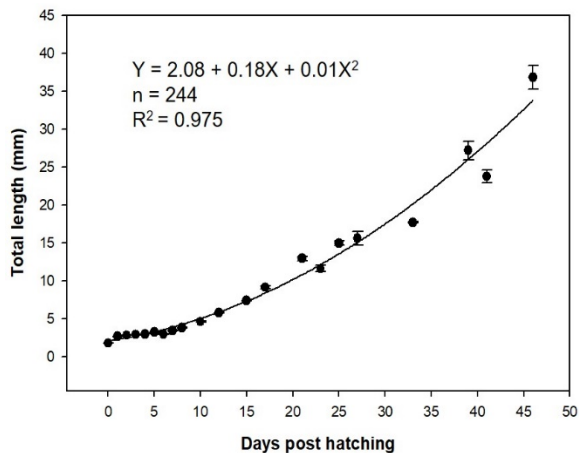
出現一叢狀黑色素斑點，此時仔魚開始攝食餌料生物 (Fig. 3C)；孵化後第 7 天仔魚體全長  $3.44 \pm 0.07$  mm ( $n = 16$ )，背鰭第二硬棘及腹鰭硬棘開始發育，尾柄下方有一黑色素斑 (Fig. 3D)；孵化後第 10 天仔魚體全長  $4.62 \pm 0.07$  mm ( $n = 10$ )，口部發育完全，背鰭第二硬棘及腹鰭硬棘延長，長度約體全長的 30%，背鰭第二硬棘及腹鰭硬棘的末端有黑色素堆積 (Fig. 3E)；孵化後第 12 天仔魚體全長  $5.82 \pm 0.04$  mm ( $n = 15$ )，脊索末端上屈中期 (flexion)，尾下骨開始發育 (Fig. 3F)；孵化後第 15 天仔魚體全長  $7.40 \pm 0.05$  mm ( $n = 8$ )，背鰭鰭條數為 III/8 - 9，臀鰭鰭條數為 8、尾鰭鰭條數為 16 - 17，背鰭第二硬棘及腹鰭硬棘長度延長約為體全長的 50%，脊索末端上屈完成 (postflexion) (Fig. 3G)；孵化後第 21 天仔魚體全長  $12.95 \pm 0.29$  mm

( $n = 15$ )，背鰭鰭條數為 X/15 - 16，臀鰭鰭條數為 III/8、尾鰭鰭條數為 18 - 19，頭部出現黑色斑塊，延長的背鰭第二硬棘及腹鰭硬棘開始縮短 (Fig. 3H)；孵化後第 33 天，體全長  $17.69 \pm 0.09$  mm ( $n = 8$ )，背鰭鰭條數為 XI/15 - 16，腹鰭鰭條數為腹鰭 I/5，臀鰭鰭條數為 III/8、尾鰭鰭條數為 18 - 19，胸鰭 17 - 18，各鰭條數與成魚相同，進入稚魚期 (Fig. 3I)；孵化後第 41 天，體全長為  $23.77 \pm 0.83$  mm ( $n = 5$ )，延長的硬棘已完全縮短，背鰭第二硬棘末端、腹鰭硬棘及臀鰭硬棘呈現橘紅色，尾柄處的黑色斑點也轉變為橘紅色斑點 (Fig. 3J)；孵化後第 46 天，體全長為  $36.81 \pm 1.56$  mm ( $n = 7$ )，稚魚體側出現 5 至 9 條褐色條紋，此時所有稚魚均沉降底棲生活，並會在水池底部躲避，可觀察到群聚特性 (Fig. 3K)。雲紋石斑魚仔稚魚孵化後至



**Fig. 3** Larval and juvenile development of *Epinephelus moara* at  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$ . (A) Newly hatched larva; (B) 2 days post hatching (dph) larva; (C) 3 dph larva; (D) 7 dph larva; (E) 10 dph larva; (F) 12 dph larva; (G) 15 dph larva; (H) 21 dph larva; (I) 33 dph juvenile; (J) 41 dph juvenile; (K) 46 dph juvenile. Scale bars = 1.0 mm.

第 46 天，體全

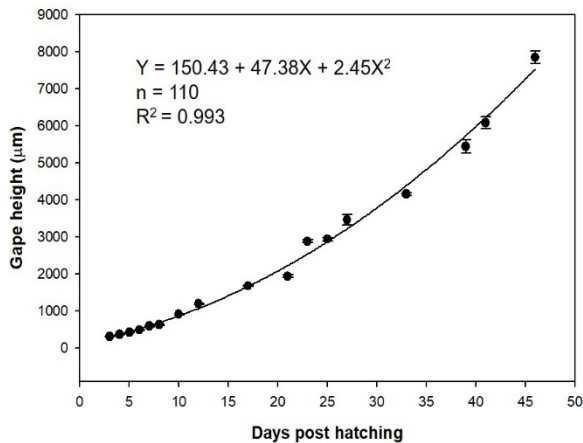


**Fig. 4** Development of total length of *Epinephelus moara* from newly hatched to 46 days post hatching in culture. All data were expressed as means  $\pm$  SEM.

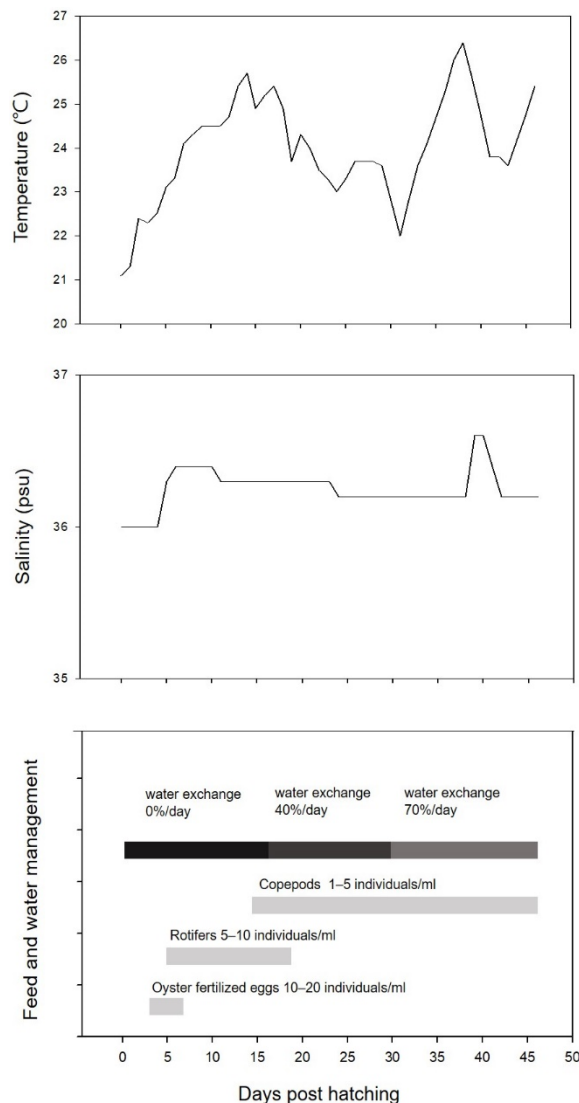
長之二次函數迴歸公式為  $Y = 2.08 + 0.17X + 0.01X^2$ ,  $R^2 = 0.975$ ,  $n = 244$ , 其中  $Y$  為體全長,  $X$  為孵化後天數 (Fig. 4)。雲紋石斑魚仔稚魚孵化後第 3 天至第 46 天, 口徑之二次函數回歸公式為  $Y = 150.43 + 47.38X + 2.45X^2$ ,  $R^2 = 0.993$ ,  $n = 110$ , 其中  $Y$  為口徑,  $X$  為孵化後天數 (Fig. 5)。

## 六、仔稚魚培育過程記錄

在 46 天的仔稚魚培育過程中, 水溫範圍為  $21.1 - 26.4^\circ\text{C}$ 、鹽度為 36.0 psu, 孵化後第 3 - 6 天投餵牡蠣受精卵, 密度至少維持 10 - 20 粒/ml; 孵化後第 5 - 18 天投餵輪蟲, 密度至少維持 5 - 10 隻/ml; 孵化後第 15 - 46 天投餵橈足類, 密度



**Fig. 5** Development of gape height of *Epinephelus moara* from 3 to 46 days post hatching in culture. All data were expressed as means  $\pm$  SEM.



**Fig. 6** Temperature, salinity, feeding schedule, and water management protocol developed for larval rearing of *Epinephelus moara*.

至少維持 1 - 5 隻/ml。育苗開始至孵化後第 15 天採用止水式養殖，孵化後第 16 - 27 天每日換水 40%，孵化後 28 - 46 天每日換水 70%。最終收成約 200 尾稚魚，活存率為 0.14%，育苗過程與定期採樣並未發現畸形仔魚，養殖餌料投餵情形及水質管理如 Fig. 6。

## 討 論

梁等 (2011) 在面積 40 m<sup>2</sup>，水深 1.5 - 2.0 m 的水泥池以循環水培育雲紋石斑魚親魚，培育水溫控制在 16 - 20°C，而 Song *et al.* (2012) 則沒有描述親魚培育之細節。本研究所使用之雲紋石斑魚親魚蓄養在室外土底魚塢，至今已超過 5 年，在戶外環境而沒有特別調控水質情況下，親魚仍然可以適應魚塢環境，並在生殖季節時卵徑發育達到 400 µm 以上，足以進行催熟及後續的人工繁殖，因此在室外土底魚塢培育雲紋石斑魚親魚是可行的。先前有許多研究探討給予不同種類的外源雄性素對雌性石斑魚性轉變的效果，在藍身大斑石斑魚 (*E. tukula*) (Yeh *et al.*, 2003)、網紋石斑魚 (*E. merra*) (Bhandari *et al.*, 2004)、赤點石斑魚 (*E. akaara*) (Li *et al.*, 2006)、七帶下美鮨 (*Hyporthodus septemfasciatus*) (Kline *et al.*, 2008)、瑪拉巴石斑魚 (*E. malabaricus*) (Murata *et al.*, 2010) 及鱸滑石斑魚 (*E. tauvina*) (Ranjan *et al.*, 2015) 的研究中呈現顯著成效，我們也透過埋植混合雄性素藥粒促進雲紋石斑魚雌魚性轉變，同樣可採集到精液，而所採集到的精液也可成功讓卵粒受精、進一步獲得受精卵，而梁等 (2011) 則是透過埋植 17 $\alpha$ -methyltestosterone 進行誘導性轉變，但他並沒有記錄埋植劑量、成功率轉變為雄魚的比例、採集到精液的時間以及精子活力。

Tucker (1999) 指出，誘導石斑魚類雌魚卵發育通常使用的 HCG 劑量為 500 - 1,000 IU/kg BW、LHRH 劑量為 10 - 50 µg/kg BW，注射 1 - 3 針後，可在 36 - 50 hr 達到最後成熟。雲紋石斑魚經過 HCG 1,000 IU/kg BW、2 針次注射後，其卵徑可於 72 hr 達到 900 - 1,000 µm，此時進行人工採卵，約 90% 的卵粒都能順利受精，而同時注射 HCG 1,000 IU/kg BW 與 LHRH 10 µg/kg BW 也可以達到相同效果。梁等 (2011) 則採用 400 - 500 IU/kg



**Table 3** Comparison of the eggs and larvae of Epinephaline species (modified from Leu *et al.*, 2005)

Species	Diameter of egg (mm)	Incubation temperature (°C)	Hatching time (hr)	TL at newly hatched (mm)	Yolk-sac absorbed (day)	TL at yolk-sac absorbed (mm)	Reference
<i>Epinephelus akaara</i>	0.70-0.77	25.1-27.0	23-25	1.45-1.56	4	2.25	Ukawa <i>et al.</i> , 1966
<i>E. bruneus</i>	0.84-0.96	23.4-25.8	32-36	1.8-2.2	5	2.86	Manabe and Kasuga, 1989; Sawada <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coioides</i>	0.74-0.85	24.9-28.0	19-21	1.33-1.86	3	2.69	Doi <i>et al.</i> , 1991; Zou <i>et al.</i> , 2003
<i>E. fasciatus</i>	0.77	23.1-25.9	35	1.62-2.1	3	2.6	Murai <i>et al.</i> , 1984; Kawabe, 2000
<i>E. fuscoguttatus</i>	0.87-0.92	28-30	18-19	1.48-1.9	3	2.78	Kohno <i>et al.</i> , 1990; Lim <i>et al.</i> , 1990
<i>E. lanceolatus</i>	0.80-0.89	28-29	19-20	1.65	3	2.91	Ho <i>et al.</i> , 1997
<i>E. longispinis</i>	0.84-0.88	24.8-26.2	26	1.49-1.57	5	2.66	Tsujigado and Lin, 1982
<i>E. malabaricus</i>	0.87-0.93	25.5	26-29	1.88-1.98	3	2.76	Leu <i>et al.</i> , 2005
<i>E. marginatus</i>	0.74-0.94	23	30-33	1.40-1.67	4	2.55	Glamuzina <i>et al.</i> , 1998
<i>E. moara</i>	0.87	22-24	40-41	1.61-1.86	5	2.57	Song <i>et al.</i> , 2012
<i>E. moara</i>	0.91	23.8	29	1.77	3	2.90	present study
<i>E. striatus</i>	0.86-0.97	25-28	23-29	1.8	3	2.9	Powell and Tucker, 1992
<i>E. tauvina</i>	0.9	27	23-25	1.7-2.4	3	2.68	Chen <i>et al.</i> , 1978; Hussain <i>et al.</i> , 1980

BW 之 HCG 混合 30 - 50 µg/kg BW 之 LHRH 進行催熟，注射針次不明，但於 36 - 40 hr 卵粒達到最後成熟。我們的研究發現，在生殖季節卵徑達到 400 µm 以上的雲紋石斑魚雌魚，單獨使用 HCG 1,000 IU/kg BW、2 針次注射，卵徑可於 72 hr 達到 900 - 1,000 µm，而 HCG 的使用劑量若少於 1,000 IU/kg BW 是否對卵粒成熟有不同效果？另外，單獨注射 LHRH 是否也能使雲紋石斑魚卵粒達最後成熟階段？在本研究中沒有探討，仍有待後續深入研究。我們透過人工授精獲得雲紋石斑魚受精卵之受精率為 99.67 ± 0.33%、孵化率為 99.00 ± 0.57%，相對高於梁等 (2011) (受精率 68.5 - 83.2%、孵化率 76 - 91%) 的研究，而 Song *et al.* (2012) 則沒有描述受精率與孵化率。

雲紋石斑魚的受精卵及初期仔魚可與另外 11 種石斑魚屬魚類相互比較 (Table 3)，雲紋石斑魚受精卵卵徑為 0.91 mm，相對大於赤點石斑魚 (0.70 - 0.77 mm) (Ukawa *et al.*, 1966)、點帶石斑魚 (*E. coioides*) (0.74 - 0.85 mm) (Doi *et al.*, 1991; Zou *et al.*, 2003)、橫帶石斑魚 (*E. fasciatus*)

(0.77 mm) (Murai *et al.*, 1984; Kawabe, 2000)、鞍帶石斑魚 (*E. lanceolatus*) (0.80 - 0.89 mm) (Ho *et al.*, 1997) 以及長棘石斑魚 (*E. longispinis*) (0.84 - 0.88 mm) (Tsujigado and Lin, 1982)，與褐石斑魚 (0.84 - 0.96 mm) (Manabe and Kasuga, 1989; Sawada *et al.*, 1999)、棕點石斑魚 (*E. fuscoguttatu*) (0.87 - 0.92 mm) (Kohno *et al.*, 1990; Lim *et al.*, 1990)、瑪拉巴石斑魚 (0.87 - 0.93 mm) (Leu *et al.*, 2005)、烏鰭石斑魚 (*E. marginatus*) (0.74 - 0.94 mm) (Glamuzina *et al.*, 1998)、拿騷石斑魚 (*E. striatus*) (0.86 - 0.97 mm, Powell and Tucker, 1992)、鱸滑石斑魚 (0.9 mm) (Chen *et al.*, 1977; Hussain *et al.*, 1980) 相似。

雲紋石斑魚剛孵化的仔魚體全長為 1.77 mm，相對大於赤點石斑魚 (1.45 - 1.56 mm) (Ukawa *et al.*, 1966)、鞍帶石斑魚 (1.65 mm) (Ho *et al.*, 1997)、長棘石斑魚 (1.49 - 1.57 mm) (Tsujigado and Lin, 1982) 及烏鰭石斑魚 (1.40 - 1.67 mm) (Glamuzina *et al.*, 1998)，而至卵黃囊消耗殆盡之後，仔魚體全長 (2.90 mm) 與鞍帶石斑魚 (2.91 mm)

(Ho *et al.*, 1997) 及拿騷石斑魚 (2.9 mm) (Powell and Tucker, 1992) 相似，並大於另外 9 種石斑魚類 (2.25 - 2.86 mm) (Table 3)。

值得一提的是在相似的水溫 (22 - 24°C) 條件下，我們的研究發現雲紋石斑魚卵徑 (0.91 mm) 相對大於 Song *et al.* (2012) 的描述 (0.87 mm) 而仔魚在受精後 29 hr 孵化，也明顯快於先前的研究 (40 - 44 hr) (梁等, 2011; Song *et al.*, 2012)。此外，在卵黃囊消耗殆盡的時間 (3 天)、卵黃囊消耗殆盡時仔魚體全長 (2.90 mm) 同樣與過去的研究不同 (5 天及 2.57 mm) (Song *et al.*, 2012)。Song *et al.* (2012) 描述雲紋石斑魚的初期發育過程並與 Manabe and Kasuga (1989) 的研究結果相互比較，但事實上，Manabe and Kasuga (1989) 描述的物種是褐石斑魚，而比對 Manabe and Kasuga (1989)、Sawada *et al.* (1999) 與 Song *et al.* (2012) 的研究結果，發現在相似的水溫條件下，孵化時間及卵黃囊消耗殆盡時間較為相近，但均異於本研究 (Table 3)。因此，我們懷疑有可能在 Song *et al.* (2012) 的研究中所描述的魚種是褐石斑魚而不是雲紋石斑魚，因為他並沒有親自飼養親魚，受精卵來自於民間繁殖業者，誤鑑親魚種別，但也有可能是 Song *et al.* (2012) 實驗用的受精卵來源之雲紋石斑魚親魚成熟度與本研究使用之親魚不同，使得受精卵品質也不同，進而導致上述各項差異，但詳細原因還有待更多證據才能釐清。過去有學者將雲紋石斑魚及褐石斑魚鑑定為同種 (沈, 1993; Heemstra and Randall, 1993)，而隨後區分雲紋石斑魚及褐石斑魚的研究 (郭等, 2008, 2009, 2014; Liu *et al.*, 2013) 多半以成魚作為材料，因此現今難以區分早期的仔稚魚發育之研究 (Manabe and Kasuga, 1989; Sawada *et al.*, 1999) 到底是描述褐石斑魚或者是雲紋石斑魚？我們認為針對兩者之受精卵及初期仔魚階段的形態學輔以分子生物學分類鑑定的研究有必要深入探討與比較。

雲紋石斑魚的仔稚魚形態發育與其它石斑魚類相似，在發育過程中，背鰭及腹鰭硬棘都會先延長，並隨著成長過程再度縮短 (Leis and Rennis, 1984; Leis, 1987)，而 Song *et al.* (2012) 同樣描述了雲紋石斑魚背鰭及腹鰭硬棘先延長再縮短的特性。本研究觀察到雲紋石斑魚在孵化後第 41 天左右，硬棘末端的顏色開始由黑色轉為橘紅色，尾柄

上的黑色斑點也會轉變為橘紅色，但這個明顯的變化在 Song *et al.* (2012) 的研究中卻沒有被描述，或許再次顯示 Song *et al.* (2012) 實驗魚種不是雲紋石斑魚的可能性。

我們透過二次函數回歸公式描述了仔稚魚 46 天內的體全長成長情形，張等 (2016) 則描述孵化後 41 天內的體全長成長情形，另本研究首次描述雲紋石斑魚仔稚魚孵化後第 3 天至第 46 天口徑成長之二次函數回歸公式，首次攝食的開口口徑為  $307.18 \pm 9.29 \mu\text{m}$ ，各階段口徑的成長情形可作為仔稚魚培育過程中餌料投餵種類的重要參考資料。在仔稚魚培育過程中，我們使用牡蠣受精卵作為初期餌料，並接著投餵輪蟲及橈足類，梁等 (2011) 及 Song *et al.* (2012) 均在輪蟲之後使用豐年蝦投餵，但梁等 (2011) 在仔稚魚發育過程的描述並不如 Song *et al.* (2012) 詳細，我們的研究發現，在孵化後第 46 天開始，稚魚體色已轉為不透明並出現褐色條帶、稚魚全數沉降行底棲生活，但在 Song *et al.* (2012) 的描述中卻是到孵化後第 100 天才出現褐色條帶，成長速度明顯較慢，可能是在育苗後期投餵豐年蝦所致。與豐年蝦相比，橈足類的營養成分較接近海水仔魚的需求 (Bell *et al.*, 2003; Avella *et al.*, 2007; van der Meeren *et al.*, 2008)，本研究使用橈足類取代豐年蝦作為餌料，可提供較為充足的營養使仔稚魚成長速度較快，而 Song *et al.* (2012) 培育魚苗的水溫約為 22°C，本研究則約為 24°C，較高的水溫也可能是成長快速的原因之一。

另外，在本次試驗中，雖然受精卵孵化率高，但最終僅收成約 200 尾稚魚，存活率為 0.14%，明顯低於張等 (2016) (16.8%) 及梁等 (2011) (1.5%) 的研究。在育苗過程中於孵化後 24 天時，發現大部分的魚苗虛弱在水表層旋轉並大量死亡，透過檢測發現魚苗感染神經壞死病毒 (NNV)，這可能是造成本次育苗活存率低的原因之一，因此，具抗病優勢親魚的篩選以及育苗過程中病毒感染的預防技術是日後需要深入研究的重點。

綜合本研究結果，我們的研究發現雲紋石斑魚親魚可以適應土底魚塢，應用混合雄性素藥粒埋植可成功使雌魚性轉變為雄魚，雌魚單獨使用 HCG 1,000 IU/kg BW、2 針次注射可成功使卵粒在 72 小時後達最後成熟。胚胎發育時間與仔稚魚發

育之部分特徵與過去的研究 (Song *et al.* 2012) 存在差異，而仔稚魚培育過程使用橈足類取代豐年蝦，稚魚相較於先前的研究提早出現褐色條帶並沉降行底棲生活。

## 謝 辭

本研究由行政院農業委員會科技計畫：石斑魚育種研究與養殖評估 (109 農科-9.3.2-水-A1) 經費支持，並承蒙何信緯、黃建維、張丁仁及吳承憬先生協助現場實驗與魚隻搬運，使本研究得以順利完成，特此致謝。

## 參考文獻

- 沈世傑 (1993) 臺灣魚類誌. 國立台灣大學動物系, 960 pp.
- 祈文山, 姜靜, 田永勝, 翟介明, 陳超, 李波, 陳松林 (2014) 雲紋石斑魚精子冷凍保存. 漁業科學進展, 35: 26-33.
- 陸麗君, 陳超, 馬愛軍, 翟介明, 王新安, 李偉業 (2011) 雲紋石斑魚早期發育階段的攝食與生長特性. 海洋與湖沼, 42: 822-829.
- 郭明蘭, 蘇永全, 陳曉峰, 丁少雄, 王軍 (2008) 雲紋石斑魚與褐石斑魚形態比較研究. 海洋學報, 30: 106-114.
- 郭豐, 王軍, 蘇永全, 王德祥, 許麗娜 (2006) 雲紋石斑魚染色體核型研究. 實驗與技術, 30: 1-3.
- 張春祿, 陳超, 王魯, 黃蓉, 邵彥翔, 張夢淇, 張廷廷 (2016) 雲紋石斑魚封閉式苗種培育技術研究. 水產科技情報, 43: 291-297.
- 梁友, 倪琦, 王印庚, 劉志偉, 陳君, 龐尊方, 孫芳芳, 馬文輝 (2011) 雲紋石斑魚規模化人工繁育技術研究. 漁業現代化, 38: 31-41.
- 葉信利, 丁雲源 (1990) 人工培育石斑種魚生殖力之研究. 臺灣省水產試驗所試驗報告. 49: 167-182.
- 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.
- 葉信利, 丁雲源, 郭欽明 (1989) 埋植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: 213-220.
- 劉肖峰, 陳松林, 沙珍霞, 吳姪紅, 于洋, 王娜, 修旺珊 (2015) 雲紋石斑魚心臟細胞系的建立與鑑定. 農業生物技術學報, 23: 1394-1400.
- Avella, M. A., I. Olivotto, G. Gioacchini, F. Maradonna and O. Carnevali (2007) The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, 273: 87-95.
- Bell, J. G., L. A. McEvoy, A. Estevez, R. J. Shields and J. R. Sargent (2003) Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227: 211-220.
- Bhandari, R. K., H. Komuro, M. Higa and M. Nakamura (2004) Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zool. Sci.*, 21: 305-310.
- Chen, F. Y., M. Chow, T. M. Chao and R. Lim (1977) Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) in Singapore. *Singapore J. Primary. Ind.*, 5: 1-21.
- Doi, M., M. N. Munir, N. L. Nik Razali and T. ZulkiĒi (1991) Artificial propagation of the grouper, *Epinephelus suillus* at the marine finfish hatchery in Tanjong Demong, Terengganu, Malaysia. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture, Malaysia, 41 pp.
- Gao, Q., Y. Yue, M. Min, S. Peng, Z. Shi, J. Wang and T. Zhang (2018) Time-series transcriptomic analysis of the kelp grouper *Epinephelus moara* in response to low salinity stress. *Anim. Cells Syst.*, 22: 234-242.
- Glamuzina, B., B. Skaramuca, N. Glavic, V. Kozul, J. Dulcic and M. Kraljevic (1998) Egg and early larval development of laboratory reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae). *Sci. Mar.*, 62: 373-378.
- Guo, M., Y. Su, Z. Zhang, S. Ding and J. Wang (2009) Differentiation of *Epinephelus moara* from *E. bruneus* by improved nest-tetra-primer-specific PCR. *Prog. Nat. Sci.*, 19: 1221-1226.
- Guo, M., S. Wang, Y. Su, Y. Zhou, M. Liu and J. Wang (2014) Molecular cytogenetic analyses of *Epinephelus bruneus* and *Epinephelus moara* (Perciformes, Epinephelidae). *PeerJ*, 2, e412.
- Heemstra, P. C. and J. E. Randall (1993) Groupers of the world. *FAO Species Catalogue*, Rome, p. 119-120.
- Ho, Y. S., W. Y. Chen and I. C. Liao (1997) Experiments on the artificial propagation of giant grouper *Epinephelus lanceolatus*. *J. Taiwan Fish. Res.*, 5: 129-139 (in Chinese).
- Hussain, N. A. and M. Higuchi (1980) Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Aquaculture*, 19: 339-350.
- Kawabe, K. (2000) Fin development and squamation of blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*, reared

- artificially in the tank. *Suisanzoshoku*, 48: 39-46 (in Japanese).
- Kendall Jr, A. W., E. H. Ahlstrom and H. G. Moser (1984) Early life history stages of fishes and their characters. *In* *Ontogeny and Systematics of Fishes* (H. G. Moser eds.), Allen Press Inc, Lawrence, USA, 11-22.
- Kim, B. H., K. M. Kim, Y. D. Lee, C. B. Song and S. Rho (1997) Reproductive Biology of the Sevenband Grouper, *Epinephelus septemfasciatus* I. The Effect of HCG on Ovulation Induction. *J. Aquac.*, 10: 55-61. [in Korean]
- Klimogianni, A., G. Koumoundouros, P. Kaspiris, M. Kentouri (2004) Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common pandora, *Pagellus erythrinus*. *Mar. Biol.* 145: 1015–1022.
- Kline, R. J., I. A., Khan, K., Soyano and M. Takushima (2008) Role of follicle-stimulating hormone and androgens on the sexual inversion of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *N. Am. J. Aquac.*, 70: 266-272.
- Kohno, H., P. I. Imanto, S. Diani, B. Slamet and P. Sunyoto (1990) Reproductive performance and early life history of the grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. *Bull. Penelitian perikanan*, 1: 27-35.
- Leis, J. M. (1987) Review of the early life history of tropical groupers (Serranidae) and snappers (Lutjanidae). *In* *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management* (J. J. Polovina and S. Ralston eds.), Westview Press, Boulder, U. S. A., 189-237.
- Leis, J. M. and D. S. Rennis (1984) The larvae of Indo-Pacific coral reef fishes. University of Hawaii Press. Honolulu, U.S.A., 280 pp.
- Leu, M. Y., C. H. Liou and L. S. Fang (2005) Embryonic and larval development of the malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* (Pisces: Serranidae). Marine Biological Association of the United Kingdom. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.*, 85: 1249-1254.
- Li, G. L., X. C. Liu, Y. Zhang and H. R. Lin (2006) Gonadal development, aromatase activity and P450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red - spotted grouper *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor, fadrozole. *Aquac. Res.*, 37: 484-491.
- Lim, L. C., T. M. Chao and L.T., Khoo (1990) Observations on the breeding of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal). *Singapore J. Primary. Ind.*, 18: 66-84.
- Liu, M., J. L. Li, S. X. Ding and Z. Q. Liu (2013) *Epinephelus moara*: a valid species of the family Epinephelidae (Pisces: Perciformes). *J. Fish Biol.*, 82: 1684-1699.
- Liu, X. F., Y. H., Wu, S. N., Wei, N., Wang, Y. Z., Li, N. W., Zhang, P. F. Li, Q. W. Qin and S. L. Chen (2018a) Establishment and characterization of a brain - cell line from kelp grouper *Epinephelus moara*. *J. Fish Biol.*, 92: 298-307.
- Liu, X. F., Y. H., Wu, S. N., Wei, N., Wang, P. F., Li, Y. Z., Li, N. W. Zhang, Q. W. Qin and S. L. Chen (2018b) Establishment and characterization of a kidney cell line from kelp grouper *Epinephelus moara*. *Fish Physiol. Biochem.*, 44: 87-93.
- Manabe, S. and A. Kasuga (1989) Spawning behavior and early life history of *Epinephelus moara* in an aquarium. *Dōbutsuen suizokukan zasshi*, 30: 16-24 (in Japanese).
- Murai, M., Y. Aoki and K. Nishimura (1984) On the egg collection of *Epinephelus fasciatus*. *Tech. Rep. Farm. Fish.*, 13: 63-67 (in Japanese).
- Murata, R., H. Karimata, M. A. Alam and M. Nakamura (2010) Precocious sex change and spermatogenesis in the underyearling Malabar grouper *Epinephelus malabaricus* by androgen treatment. *Aquac. Res.*, 41: 303-308.
- Peng, S. M., C. J. Zhang, Q. X. Gao, Z. H. Shi, C. Chen and J. G. Wang (2017) Growth performance and metabolic response of juvenile grouper *Epinephelus moara* (Temminck & Schlegel, 1842) fed low dietary protein and high lipid levels. *J. Appl. Ichthyol.*, 33: 790-796.
- Powell, A. B. and J. W. Tucker Jr (1992) Egg and larval development of laboratory-reared Nassau grouper, *Epinephelus striatus* (Pisces, Serranidae). *Bull. Mar. Sci.*, 50: 171-185.
- Ranjan, R., S. Megarajan, B. Xavier, S. Ghosh, B. Santhosh and A. Gopalakrishnan (2018) Broodstock development, induced breeding and larval rearing of Indian pompano, *Trachinotus mookalee* (Cuvier, 1832)—A new candidate species for aquaculture. *Aquaculture*, 495: 550-557.
- Ranjan, R., B. Xavier, B. Dash, L. L. Edward, R. D. Suresh and P. S. Kumar (2015) Efficacy of 17  $\alpha$ -methyl testosterone and letrozole on sex reversal of protogynous grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk., 1775) and spawning performance of sex-reversed males. *Aquac. Res.*, 46: 2065-2072.
- Sawada, Y., K. Kato, T. Okada, M. Kurata, Y. Mukai, S.

- Miyashita, O. Murata and H. Kumai (1999) Growth and morphological development of larval and juvenile *Epinephelus bruneus* (Perciformes: Serranidae). *Ichthyol. Res.*, 46: 245-257.
- Shirota, A. (1970) Studies on the mouth size of fish larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 36: 353-367 (in Japanese).
- Song, Y. B., H. J. Baek, H. B. Kim, K. Soyano, S. J. Kim and Y. D. Lee (2008) Induction of maturation and ovulation with hCG treatment in the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *J. Aquac.*, 21: 96-101 (in Korean).
- Song, Z. X., C. Chen, J. M. Zhai, Y. Li, W. Ma, L. Wang and L. Wu (2012) Embryonic development and morphological characteristics of larval, juvenile and young kelp bass, *Epinephelus moara*. *Yuye Kexue Jinzhan*, 33: 26-34 (in Chinese).
- Su, H. M., M. S. Su and I. C. Liao (1997) Preliminary results of providing various combinations of live foods to grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. *Hydrobiologia*, 358: 301-304.
- Tian, Y., Z. Chen, J. Tang, H. Duan, J. Zhai, B. Li, W. Ma, J. Liu, Y. Hou and Z. Sun (2017) Effects of cryopreservation at various temperatures on the survival of kelp grouper (*Epinephelus moara*) embryos from fertilization with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 75: 37-44.
- Tian, Y., J. Zhang, Z. Li, J. Tang, M. Cheng, Y. Wu, W. Ma, Z. Pang, W. Li, J. Zhai and B. Li (2018) Effect of vitrification solutions on survival rate of cryopreserved *Epinephelus moara* embryos. *Theriogenology*, 113: 183-191.
- Tsujigado, A. and W. T. Lin (1982) Spawning ecology, egg development and larvae of *Epinephelus fario* (Thunberg). *Bull. Mie-Owase Fish. Exp. Stat.*, 1980: 29-34.
- Tucker Jr, J. W. (1999) Grouper aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center Publication, 721: 1-11.
- Tucker Jr, J. W. (2012) *Marine Fish Culture*. Springer Science & Business Media, Berlin, 750 pp.
- Tucker Jr, J. W., J. E. Parsons, G. C. Ebanks and P. G. Bush (1991) Induced spawning of Nassau grouper *Epinephelus striatus*. *J. World. Aquac. Soc.*, 22: 187-191.
- Ukawa, M., Higuchi, M. & Mito, S., 1966. Spawning habits and early life history of a serranid fish, *Epinephelus akaara* (Temminck et Schlegel). *Jpn. J. Ichthyol.*, 13: 156-161 (in Japanese).
- van der Meer, T., R. E. Olsen, K. Hamre and H. J. Fyhn (2008) Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 274: 375-397.
- Watanabe, W. O., S. C. Ellis, E. P. Ellis, W. D. Head, C. D. Kelley, A. Moriwake, C. S. Lee and P. K. Bienfang (1995) Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. *Aquaculture*, 138: 205-219.
- Xiao, L., X. Yang, Z. Xie, Z. Tang, Y. Li, H. Chen, S. Li, Y. Zhang and H. Lin (2016) The complete mitochondrial genome of the *Epinephelus moara* (Osteichthyes: Ephippidae). *Mitochondrial DNA*, 27A: 2174-2175.
- Yeh, S. L., Q. C. Dai, Y. T. Chu, C. M. Kuo, Y. Y. Ting and C. F. Chang (2003) Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. *Aquaculture*, 228: 371-381.
- Zhang, G., Y. Shi, Y. Zhu, J. Liu and W. Zang (2010) Effects of salinity on embryos and larvae of tawny puffer *Takifugu flavidus*. *Aquaculture*, 302: 71-75.
- Zhang, J., Y. Tian, Z. Li, Y. Wu, Z. Li, M. Cheng, L. Wang, W. Ma and J. Zhai (2020) Optimization of vitrification factors for embryo cryopreservation of kelp grouper (*Epinephelus moara*). *Theriogenology*, 142: 390-399.
- Zou, J. X., L. Chang, W. Z. Xiang, C. Q. Hu and J. S. Lin (2003) Parent grouper rearing, spawning, fertilization and embryonic development of *Epinephelus malabaricus* (Bloch & Schneider). *Acta Hydrobiol. Sinica*, 27: 378-384 (in Chinese).

## Captive Breeding, Early Development and Larval Rearing of Kelp Grouper (*Epinephelus moara*)

Pei-Sheng Chiu<sup>1\*</sup>, Cheng-Hsan Huang<sup>1</sup>, Hui-Ping Tsai<sup>2</sup>, Yeong-Torng Chu<sup>1</sup>,  
Yu-Jung Liu<sup>1</sup> and Shinn-Lih Yeh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Eastern Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

### ABSTRACT

This study aimed to report the successful results of captive breeding, early development, and larval rearing of kelp grouper *Epinephelus moara*. Five females were implanted with an androgen mixture (1 mg/kg body weight, BW) to induce sex change, and active sperm was obtained from three that transformed into males after nine months. The ova size of females was increased to 900-1,000  $\mu\text{m}$  at 72 hr after two HCG (1,000 IU/kg BW) injections. A total of 135,000 floating eggs were obtained through artificial insemination, with those eggs having a  $99.67 \pm 0.33\%$  fertilization rate and  $99.00 \pm 0.57\%$  hatching rate. The fertilized eggs, with a mean diameter of  $0.91 \pm 0.01$  mm, were spherical, transparent, and buoyant. Embryonic development lasted 29 h 28 min at  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$ . Newly hatched larvae were  $1.77 \pm 0.02$  mm in total length (TL) with 21-22 myomeres. At three days post hatching (dph), the TL was  $2.90 \pm 0.02$  mm, and the mouth opened. At 7 dph, the TL was  $3.44 \pm 0.07$  mm, and the buds of the second dorsal and pelvic fin spines had appeared. At 21 dph, the TL was  $12.95 \pm 0.29$  mm, and the second dorsal and pelvic fin spine lengths had decreased. At 33 dph, the TL was  $17.69 \pm 0.09$  mm, and the fin ray count was that of an adult fish. A statistical model for the growth of the larvae and juveniles is  $Y = 2.08 + 0.17X + 0.01X^2$ , where Y is the mean TL (mm) and X represents dph, which explained 97.5% of variation in growth ( $R^2 = 0.975$ ,  $n = 244$ ). The larval rearing feeding scheme used was as follows: fertilized oyster egg, rotifers, and copepods.

Key words: *Epinephelus moara*, captive breeding, early development, larval rearing

---

\*Correspondence: 4, Haipu, Sangu, Qigu Dist., Tainan, Taiwan. TEL: (06) 788-0461 ext. 219; Fax: (06) 788-1597; E-mail: pschiu@mail.tfrin.gov.tw