

2018 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號** 050011
- 參展科別** 動物學
- 作品名稱** Novel holdfast marking behavior found in
Seahorse
- 得獎獎項** 大會獎：一等獎
荷蘭 INESPO 正選代表
- 就讀學校** 國立科學工業園區實驗高級中學
- 指導教師** 揭維邦
- 作者姓名** 王子維、林政孚、孫志朋
- 關鍵詞** Seahorse、Holdfast marker、Site fidelity

作者簡介



我是王子維(右二)，就讀國立科園實中。在求學路上，生物研究是我的興趣。每個生物對我來說就像是一台設計精良的獨立機器，而生物間互相碰撞所交織的故事更是令人感到興奮與神奇。這個世界充滿了這樣的美好，我願意用我的人生去擁抱他們，並揭開更多大自然中不為人知的秘密。

我是林政孚(右一)，在高中求學生涯中，我很幸運地擁有研究這新奇的生物現象的機會。自生物的養護與照顧、實驗的設計到和其他研究者的討論交流，無一不拓展了我的視野。雖然在過程中，不少次曾遇上瓶頸，但感謝一路上組員和指導老師扶持與提攜，我們竟能度過重重關卡，來到國際科展的殿堂。擁有探索未知的勇氣與熱情，我相信我們將開拓動物行為學的新研究方向。

我叫孫志朋(左二)，就讀國立科園實中高三。從小到大，我就喜歡嘗試各種新事物，無論是實驗，運動，興趣等等，而我也從其中學到不少東西，不斷充實自我。這次的生物專題研究，從高二一開始的摸索，到現在這個階段，皆是組員們與我不斷的嘗試新的方法以及新想法，才能殺出重圍到今天的舞台。因此，我很期待這次國際科展能帶給我的新挑戰，以及其他學員的指教。

摘要

棘海馬 (*Hippocampus spinosissimus*) 經飼養觀察首次發現排放標示物行為。標示物標記偏好的棲枝，為海洋珊瑚礁魚類中類似的標示的新發現行為。觀察棘海馬會由泄殖腔孔排放一種白色的標示物，其成分鏡檢證明與棘海馬的排遺無關，且其更容易在水中漂流並黏附在棲枝上。棘海馬利用嗅覺幫助尋找含標示物的棲枝 (卡方值: 24.183, $P < 0.001$)。棘海馬不會傾向攀附有其他海馬標示物的棲枝，無論相同性別間或異性間，均未達顯著水準。標示物中有效成分為水溶性物質，其效能在室溫下可維持約 7 天，且冷藏可延長其標示效能。經由解剖觀察，證實標示物的分泌器官為泄殖腔中的生殖腺，但生殖腺切片中證明標示物分泌與棘海馬繁殖無關。

Abstract

Holdfast marking behavior of Hedgehog Seahorse is first discovered in tank observation. The marker releasing by Hedgehog Seahorse for marking their preferring holdfast is also a new discovery in marine coral reef fish. The markers are in white color and discharged from the opening of cloaca, which are not related to its feces proved by microscopic observation. Meanwhile, the markers are more likely to drift in the water and stick to their holdfast than their feces. By the sense of olfactory, Hedgehog Seahorse preferred the holdfast contained with its own markers (χ^2 : 24.183, $P < 0.001$). On the contrary, Hedgehog Seahorse will not tend to use the holdfast where contained with other's markers. There is no significantly different tendency between the individuals of same or opposite sex. The effective ingredient in the markers are water-soluble substance. Its effect can significantly last for about 7 days at room temperature, and can be well preserved in refrigerator. In the dissection of cloaca cavity, the excretory organs of the markers are their gonads, but since there are no gamete cells found inside the gonads, it implies that the holdfast marking behavior is not relevant to reproduction.

前言

在熱帶珊瑚礁中，有些海洋魚類對棲息地(Habitat)常具有特定的領域性(Territory)，特定的出沒於地點(Home)，一段時期之內持續出現(Site fidelity)等的行為 (Sale, 1978)。例如，野外標示天竺鯛 (Cardinalfish)後移出自然的棲息地，學者發現他們能在約一周左右，返回(Homing)半公里外的原始棲息地，甚至在最極端的例子中，學者記錄到橫跨多種地形與長達五公里遠的返家行為 (Gardiner & Jones, 2016)。目前研究員並不知道珊瑚礁魚類是如何成功的辨認家的位置，但大多數的學者都提出氣味的假說，例如 Doving *et al*, 2006 實驗證明，五線巨齒天竺鯛 (*Cheilodipterus quinquelineatus*) 對同種個體棲息的人工巢穴，具有明顯的偏好性 (Preference) (Doving *et al*, 2006)，但研究員仍無法證明其標示人工巢穴氣味的由來。

澳洲學者長期觀察野外懷氏海馬 (*Hippocampus whitei*) 並證明其具有棲地忠誠性 (Harasti *et al*. 2014)。海馬會利用尾巴纏繞住棲地中的枝條並固定自己的身體，而這些枝條稱為棲枝 (Holdfast)。母懷氏海馬可以停留在同一個棲枝長達 10 個月，而公懷氏海馬更可以停留長達 17 個月。成年的懷氏海馬棲枝選擇偏好海綿及軟珊瑚，幼年的則偏好柳珊瑚(Harasti *et al*. 2014)。海馬的活動範圍與海馬體長與居住密度無關，且海馬並不會捍衛自己的棲地(Vincent *et al*. 2005)。

為了瞭解台灣海馬的種類與行為，訪談了國內的數名資深潛水員，初步得知棘海馬、花海馬、庫達海馬、豆丁海馬、長棘海馬等之出沒海域與地點，並大約了解其野外可能的棲地與其忠誠性 (Home & Site fidelity)等行為 (表 10-1)。海馬因游泳能力弱，所以習慣棲息於固定環境，故本研究選用台灣產棘海馬(*Hippocampus spinosissimus*)，其分布於印度洋以及太平洋等海域 (Shao, 2017)，希望能進一步了解海馬的棲地忠誠性行為與其原因。

在觀察實驗室中養殖的棘海馬後，意外地發現在海馬的棲枝上，發現了一些疑似排遺物的東西，所以如同類似天竺鯛魚類的返家行為中，是否就是由排遺物標示 (Marker) 人工巢穴所造成的呢，引起我們研究的興趣。

研究過程與方法



研究過程：

- (一) **標示物的探究**：了解棘海馬標示棲枝的方式【實驗一】，以及區別標示物和排遺物的差異【實驗二】。
- (二) **標示的行為觀察**：
 1. 棘海馬的標示的行為：證明標示物具有標示效能，並找出海馬感知標示物的感官，標示物是否具有視覺標示效能【實驗三】，嗅覺標示效能【實驗四】，排遺物是否具視覺標示效能【實驗五】，排遺物是否具嗅覺標示效能【實驗六】等。
 2. 證明棘海馬標示物持續時間：探討標示物的標示效能持續時間【實驗七】，標示物中有效物質之成分分析【實驗八】，探討標示物的標示效能【實驗九】。
 3. 標示物對不同個體間效能的差異：標示物的效能對於同性別、不同性別海馬間的差異【實驗十】。
- (三) **標示物的分泌器官**：解剖自然死亡之棘海馬【實驗十一】，分泌標示物之器官連續切片【實驗十二】。

研究方法：

【實驗一】棘海馬標示棲枝的方式

1. 目的：了解標示物如何附著於棲枝上。
2. 器材：錄影機、三腳架。

3. 步驟：架設錄影機於水族缸前，每日錄影約十小時，並擷取影片中棘海馬排出標示物和排遺物的畫面。

【實驗二】標示物和排遺物的差異

1. 目的：藉由鏡檢、分析漂流軌跡以及比較在改變餵食頻率下，海馬排放標示物及排遺物的頻率差異，證實標示物與排遺物是兩種不同的分泌物。
2. 器材：玻片、顯微鏡、MicroCap 軟體、ImageJ、錄影機。
3. 步驟：
 - 2-1 鏡檢：將棘海馬和三斑海馬的排遺物與標示物製成樣本，使用 MicroCap 顯微鏡檢視樣本，並以 MicroCap v3.0 記錄影像，更換餵食海馬的餌料後再次鏡檢標示物與排遺物，並與之前的照片比較結果。
 - 2-2 漂流軌跡的分析：將 1000mL 燒杯裝滿海水，將棘海馬和三斑海馬分別以黑殼蝦、豐年蝦餵食後排出的標示物與排遺物吸起，於水面上緩緩滴下，以 ImageJ 記錄三者在水中的漂流軌跡。
 - 2-3 排放頻率的記錄：記錄每天棘海馬排放的排遺物與標示物的數量，分析棘海馬的排遺物與標示物在高餵食頻率與低餵食頻率的情況下排放週期是否有差異。

【實驗三】標示物是否具有視覺標示效能

1. 目的：探討棘海馬是否會以視覺感知標示物，並確認標示物是否有標示效能。
2. 器材：水缸、水管、珊瑚砂、生化棉、小試管、燒杯。
3. 步驟：

實驗組

- (1)準備兩支長約 5 公分的透明試管。其中一支裝入棘海馬的標示物，另一支則沒有。把兩支試管都注滿水，並栓緊蓋子，使管內水體與缸內無法流通。

- (2)準備兩段長度約 60 公分的水管，作為棘海馬的棲枝。將兩段長約 2 公分的生化棉，分別塞入兩支水管的其中一端，藉此讓水管中的水體與水缸水體保持流通。
- (3)準備一個水缸(35cm*55cm*35cm)，裝水至水深 30 公分。將棲枝分別置於水缸兩側，並把兩支試管分別置於水管前。
- (4)將棘海馬放入水缸，並用燒杯將棘海馬固定於水缸中間後靜置。
- (5)將棘海馬放出，並等待其選擇棲枝。
- (6)待棘海馬選擇棲枝後，用燒杯重新將棘海馬固定於起始位置，並隨機更換棲枝位置。
- (7)使用卡方檢定分析數據，計算 P 值。

對照組

- (1)準備兩支長約 5 公分的透明試管，其中皆沒有棘海馬的標示物。把兩支試管都注滿水，並栓緊蓋子，使管內水體與缸內無法流通。
- (2)接續實驗組步驟(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)。

【實驗四】標示物是否具有嗅覺標示效能

1. 目的：探討棘海馬是否會以嗅覺感知標示物，並確認標示物的標示效能。
2. 器材：水缸、水管、珊瑚砂、生化棉、燒杯。
3. 步驟：

實驗組

- (1)準備兩段長度約 60 公分的水管，作為棘海馬的棲枝。用滴管將標示物擠在一段長約 2 公分的生化棉上，並將其塞入一支水管的其中一端。另一支水管則塞入沒有標示物的生化棉。
- (2)準備一個水缸(35cm*55cm*35cm)，裝水至水深 30 公分。將棲枝分別置於水缸兩側。
- (3)將棘海馬放入水缸，並用燒杯將棘海馬固定於水缸中間後靜置。
- (4)將棘海馬放出，並等待其選擇棲枝。

(5)待棘海馬選擇棲枝後，用燒杯重新將海馬固定於起始位置，並隨機更換棲枝位置。

(6)使用卡方檢定分析數據，計算 P 值。

對照組

(1)準備兩段長度約 60 公分的水管，作為棘海馬的棲枝。將兩段長約 2 公分的生化棉，分別塞入兩支水管的其中一端，藉此讓水管中的水體與水缸水體保持流通。

(2)接續實驗組步驟(2)、(3)、(4)、(5)、(6)。

【實驗五】排遺物是否具有視覺標示效能

1. 目的：探討棘海馬是否會以視覺感知排遺物，並確認排遺物的標示效能。
2. 器材：水缸、水管、珊瑚砂、生化棉、燒杯。
3. 步驟：與【實驗三】相同。

【實驗六】排遺物是否具有嗅覺標示效能

1. 目的：探討棘海馬是否會以嗅覺感知排遺物，並確認排遺物的標示效能。
2. 器材：水缸、水管、珊瑚砂、生化棉、燒杯。
3. 步驟：與【實驗四】相同。

【實驗七】標示物的標示效能持續時間

1. 目的：證實標示物存放的時間是否會影響其標示效能。
2. 器材：水缸、水管、珊瑚砂、生化棉、燒杯、小試管。
3. 步驟：

實驗組：分別對在海水中存放 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、10 天的標示物，用【實驗四】實驗組的實驗方法確認其標示效能。

對照組：分別對在海水中存放 1 天、5 天、10 天的排遺物，用【實驗六】實驗組的實驗方法確認其標示效能。

【實驗八】標示物中有效物質之成分分析

1. 目的：藉由萃取標示物，推測標示物中有效成分之基礎化學性質。

2. 器材：超音波震盪器、乙醚、蒸餾水、小試管、水缸、水管、珊瑚砂、生化棉、燒杯。

3. 步驟：

(1)將標示物、0.5mL 的蒸餾水和 0.5mL 乙醚放入小試管，並以超音波震盪器萃取分離，得含高極性物質之水層、低極性物質之乙醚層以及不溶於兩者之殘渣。

(2)以生化棉分別吸附萃取之溶液，並待其自然乾燥。用【實驗四】之實驗方法確認其是否還具有標示效能。

【實驗九】探討標示物的標示效能

1. 目的：藉由冷藏標示物於攝氏 7 度並保存 7 天，和將標示物萃取後放置 7 天，再分別利用【實驗四】的實驗方法確認其是否還具有標示效能。

2. 器材：超音波震盪器、乙醚、蒸餾水、小試管、水缸、水管、珊瑚砂、生化棉、燒杯，冰箱。

3. 步驟：

- 9-1 冷藏 7 天，冷藏標示物並保存 7 天後，對冷藏 7 天的標示物用【實驗四】實驗組的實驗方法確認其標示效能。

- 9-2 萃取後常溫保存 7 天，利用【實驗八】的方法萃取標示物後將水層、乙醚層以及殘渣分別在常溫下放置 7 天後，利用【實驗四】實驗組的實驗方法確認其標示效能。

【實驗十】標示物的效能對於同性別、不同性別海馬間的差異

1. 目的：探討標示物的效能對於同性別、不同性別海馬間的差異。

2. 器材：水缸、水管、珊瑚砂、生化棉、燒杯。

3. 步驟：和【實驗四】相同。

【實驗十一】解剖自然死亡之棘海馬

1. 目的：尋找海馬體內與泄殖腔口相連的器官，以推測標示物的分泌器官。

2. 器材：解剖用剪刀、手術刀、鑷子、立體生物顯微鏡(OLYMPUS SZ61)、顯微鏡外接相機(CANON EOS6D)、光源。

3. 步驟：將自然死亡的棘海馬由泄殖腔孔至頸部剪開，並劃開其腹腔壁。

尋找並檢視海馬體內與泄殖腔連接的器官。利用立體生物顯微鏡和顯微鏡外接相機等等設備記錄。

【實驗十二】分泌標示物之器官連續切片

1. 目的：觀察【實驗十一】中發現的白色分泌標示物之器官組織。

2. 器材：石蠟、樣品瓶、切片機、真空烘箱、酒精、二甲苯、不鏽鋼標本盒、蘇木精、伊紅、封片膠、相機(Canon, EOS60D)。

3. 步驟：記錄於附錄一。

研究結果與討論

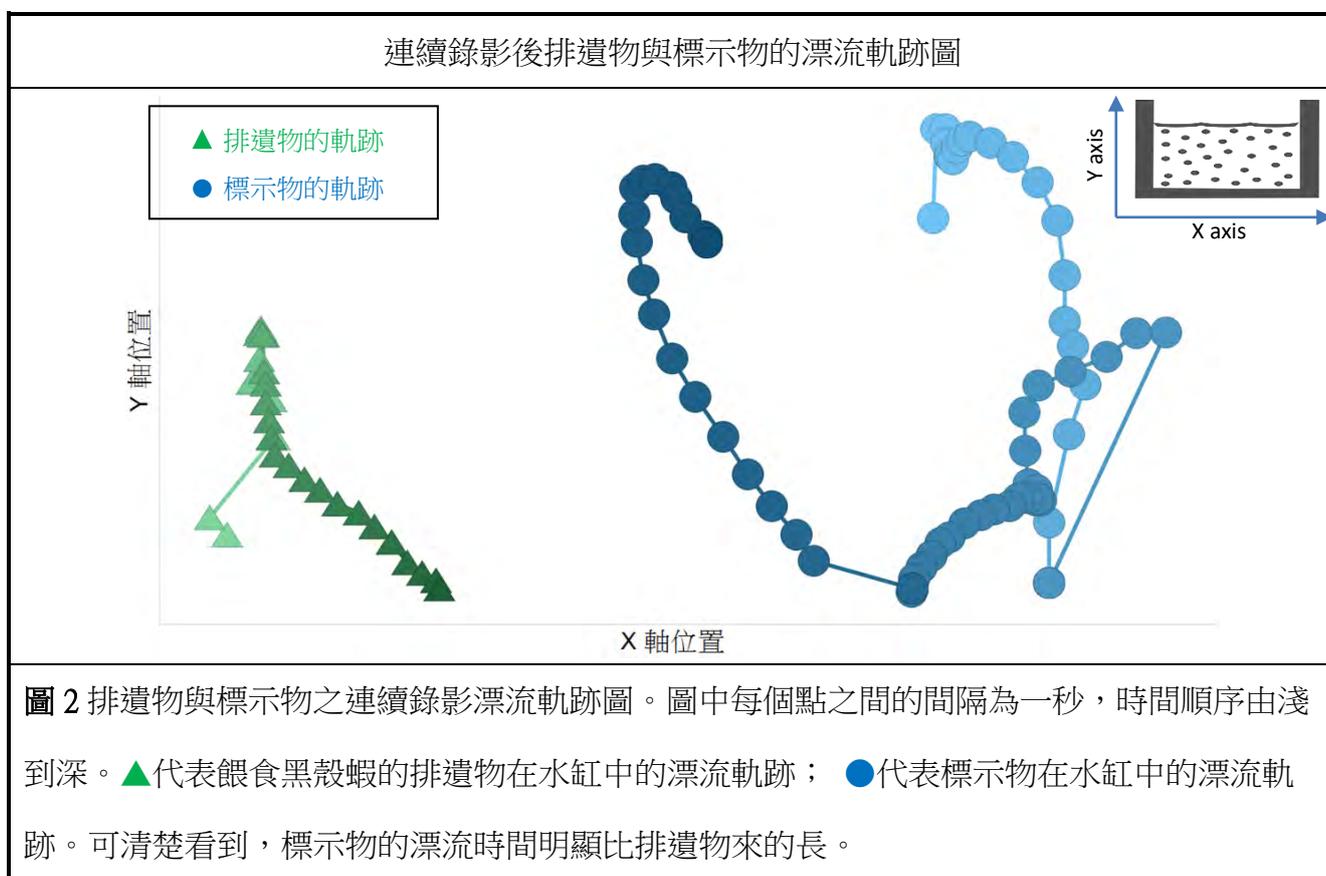
【實驗一】棘海馬標示棲枝的方式

本研究分別對六隻棘海馬(共 2 尾公、4 尾母魚)進行連續錄影的實驗，每日錄影時間約十小時。期間共記錄到兩次排遺，以及兩次排放標示物。海馬會將標示物噴射至水中，標示物會在水中漂流一段時間再黏附到棲枝上；排遺物則會直接漂流至缸底，由結果發現，標示物與排遺物的漂流軌跡明顯不同，如下圖 2。

錄影結果顯示標示物為棘海馬由泄殖腔孔排出的，且排出後維持結構，並會在水中漂流一段時間再黏附到棲枝上，如圖 1。分析結果棘海馬排出標示物，且其成分、排放週期皆與排遺物無關。



圖 1 棘海馬由泄殖腔孔排出白色標示物



【實驗二】標示物和排遺物的差異：

- 2-1 鏡檢

顯微鏡檢查比較 6 隻棘海馬(2 尾公、4 尾母魚)與 2 隻三斑海馬(1 尾公、1 尾母魚)在餵食黑殼蝦與豐年蝦後產生的排遺物與標示物的結構差異，並計進行 23 次觀察。

在食用黑殼蝦後排出的排遺物中可看到明顯的甲殼類構造，如圖 3、圖 5，而食用黑殼蝦後的標示物則沒有類似現象，如圖 4、圖 6；食用豐年蝦後排出的排遺物則可以清楚看到豐年蝦的結構，如圖 7，而食用豐年蝦後所排出的標示物中則沒有類似現象，如圖 8，且結構與餵食黑殼蝦所排放的標示物類似。

棘海馬與三斑海馬的兩種分泌物—排遺物與標示物



圖 3 棘海馬餵食黑殼蝦後產生的排遺物鏡檢結果。可發現明顯的蝦殼結構。

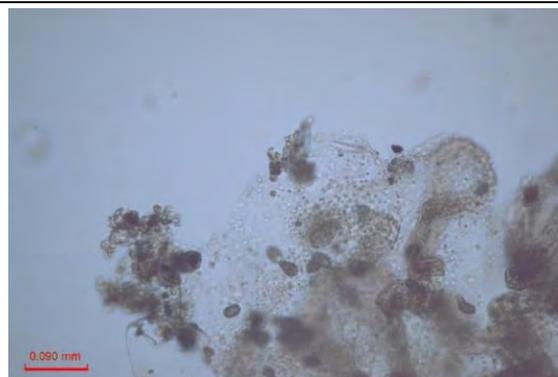


圖 4 棘海馬餵食黑殼蝦後產生的標示物鏡檢結果。未發現明顯的蝦殼結構。

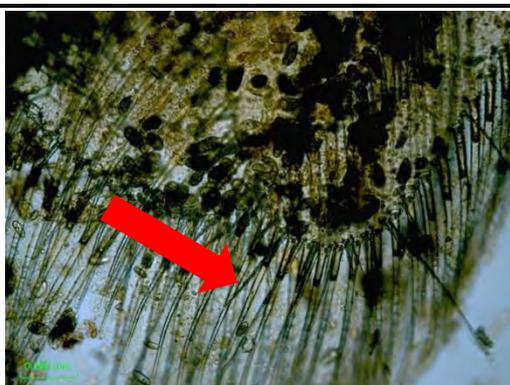


圖 5 三斑海馬在餵食黑殼蝦後產生的排遺物鏡檢結果。可發現明顯的蝦殼結構，且內容物與圖 3 類似。

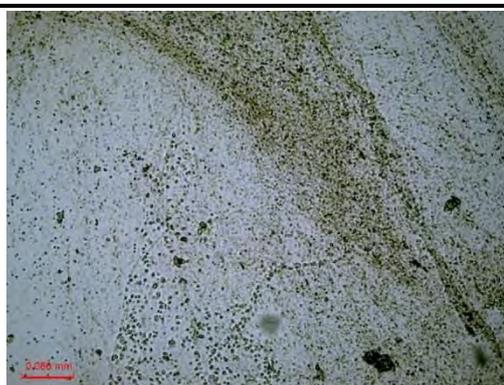


圖 6 三斑海馬在餵食黑殼蝦後產生的標示物鏡檢結果。未發現明顯的蝦殼結構。



圖 7 棘海馬在餵食豐年蝦後產生的排遺物鏡檢結果。可發現明顯的豐年蝦結構。

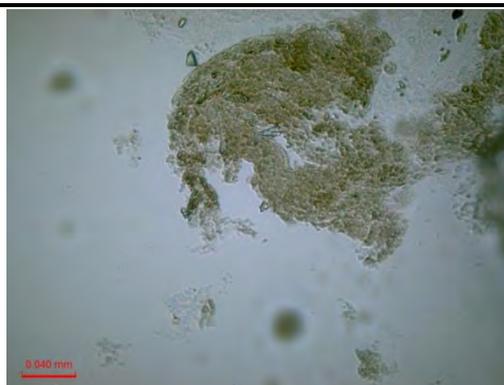


圖 8 棘海馬在餵食豐年蝦後產生的標示物鏡檢結果。未發現明顯的豐年蝦結構，且內容物與圖 4、圖 6 類似。

● 2-2 漂流軌跡的分析：

利用 Spotfire 與 ImageJ 繪製標示物及兩種餵食不同食物後產生的排遺物，從釋放到漂流至燒杯底的軌跡圖，如下圖 9、圖 10。可發現，不論是食用黑殼蝦還是豐年蝦，海馬標示物的漂流時間(51 秒)都較排遺物(4 秒、15 秒)來的久，進而增加其附著在棘海馬和三斑海馬所攀附之棲枝的機率。此外標示物的漂流時間較長，不容易在水中散開；排遺物的漂流時間較短，而容易在水中散開。

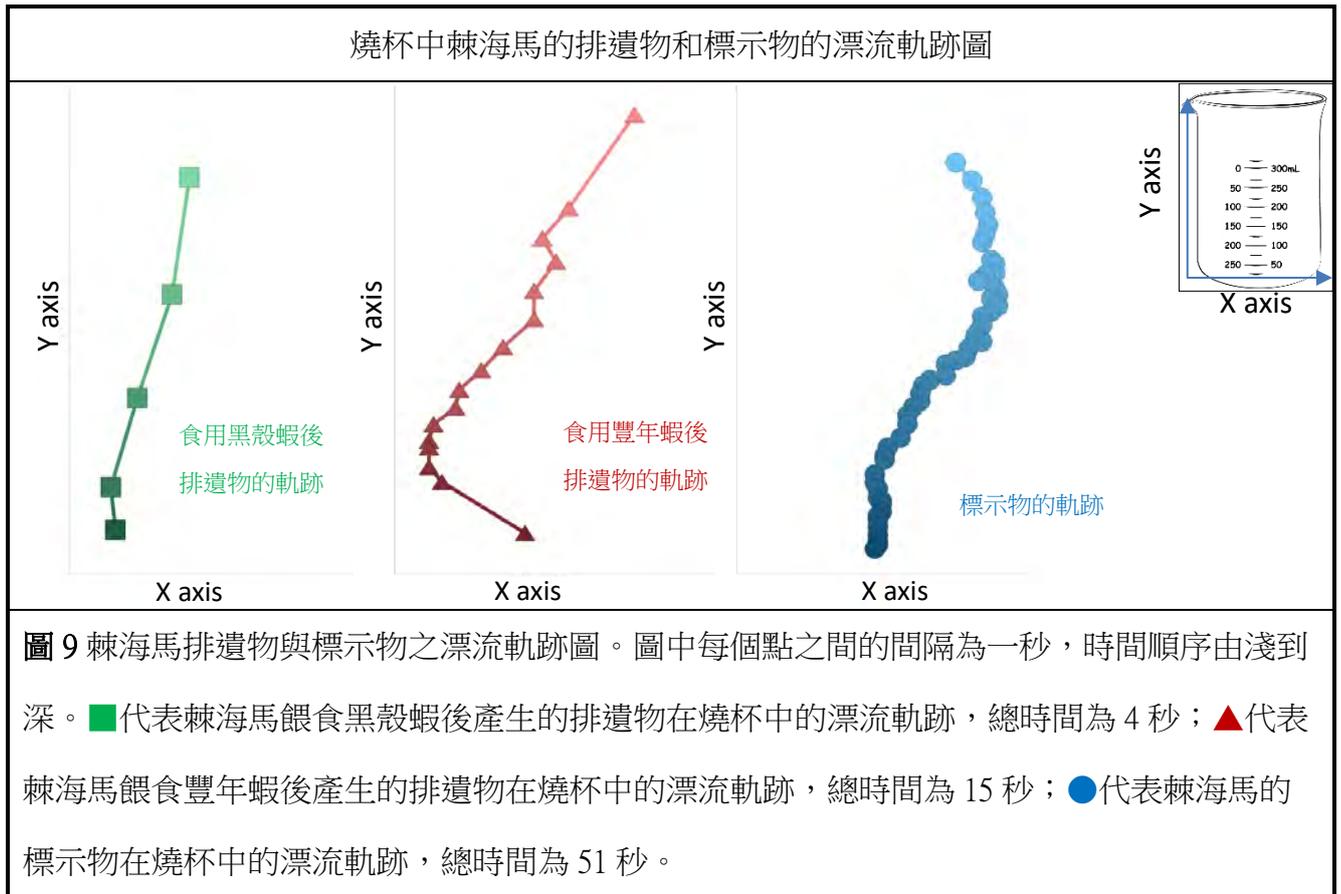


圖 9 棘海馬排遺物與標示物之漂流軌跡圖。圖中每個點之間的時間間隔為一秒，時間順序由淺到深。■代表棘海馬餵食黑殼蝦後產生的排遺物在燒杯中的漂流軌跡，總時間為 4 秒；▲代表棘海馬餵食豐年蝦後產生的排遺物在燒杯中的漂流軌跡，總時間為 15 秒；●代表棘海馬的標示物在燒杯中的漂流軌跡，總時間為 51 秒。

燒杯中三斑海馬的排遺物和標示物的漂流軌跡圖

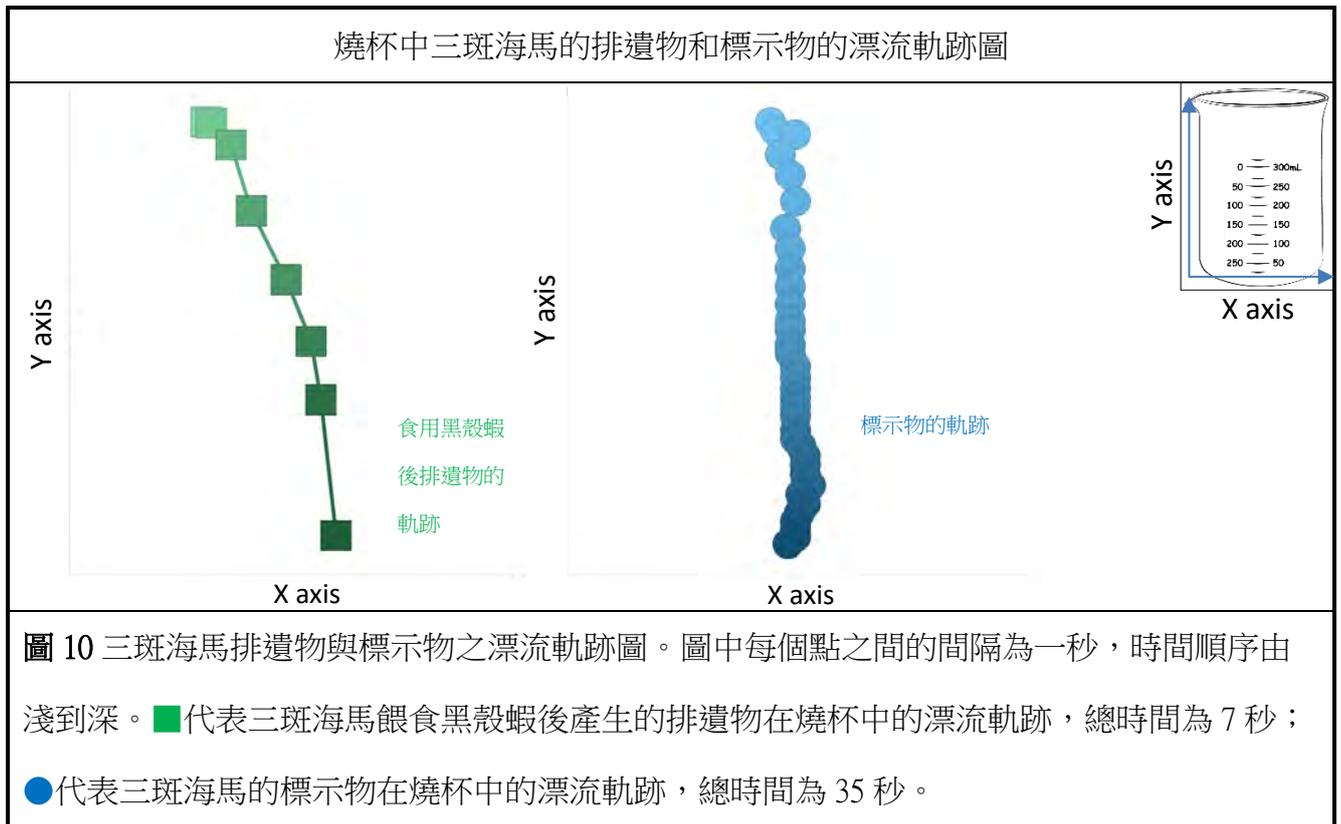
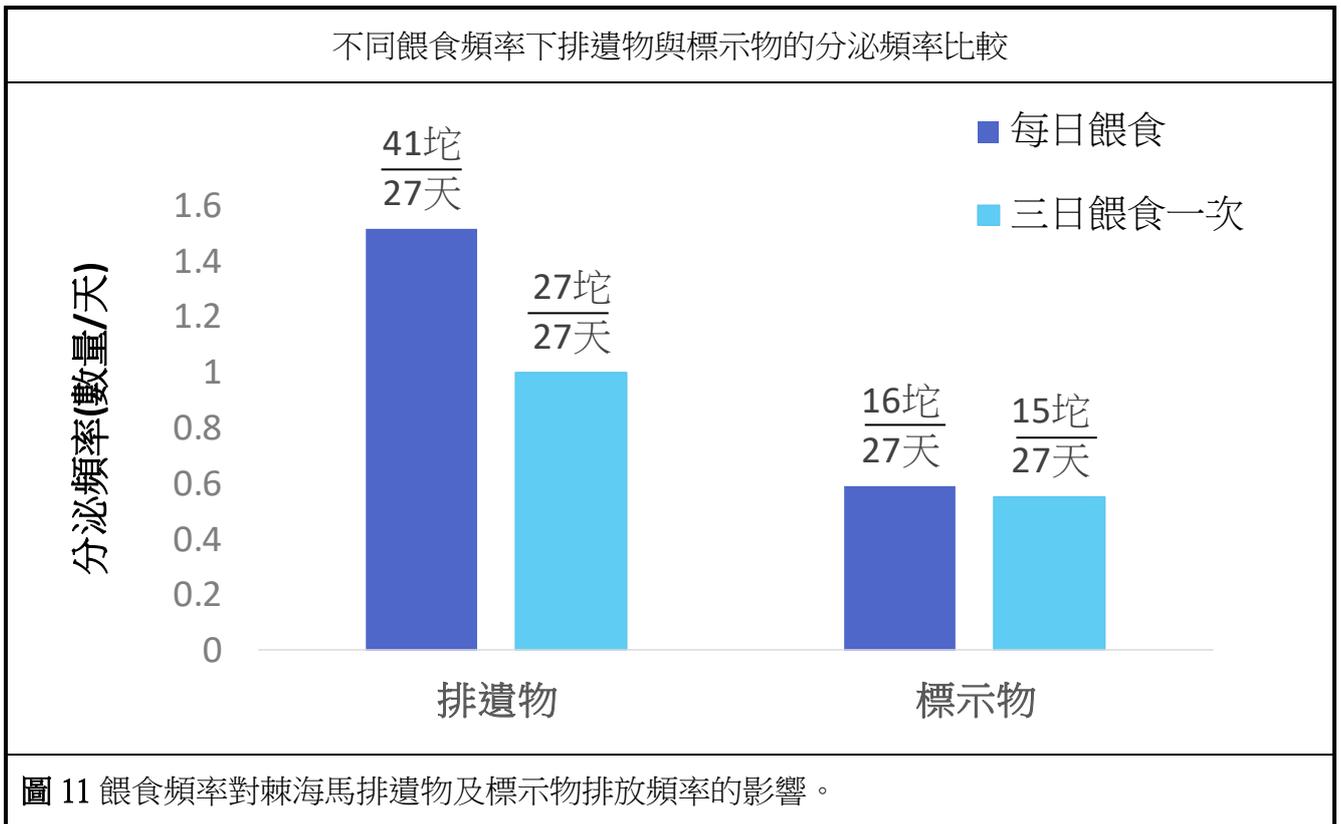


圖 10 三斑海馬排遺物與標示物之漂流軌跡圖。圖中每個點之間的時間間隔為一秒，時間順序由淺到深。■代表三斑海馬餵食黑殼蝦後產生的排遺物在燒杯中的漂流軌跡，總時間為 7 秒；●代表三斑海馬的標示物在燒杯中的漂流軌跡，總時間為 35 秒。

- 2-3 排放頻率的記錄：

飼養期間改變餵食頻率，並比較餵食頻率高與餵食頻率差異。在 27 天內，記錄得兩隻棘海馬(0 尾公、2 尾母魚)的標示物與排遺物的數量，記錄後即清除，結果如圖 11。結果顯示餵食頻率對於棘海馬排放排遺物的頻率具有較大的影響，對排放標示物的頻率則幾乎沒有影響。當餵食頻率提高時，排遺物排放頻率也跟著升高。相反的，排放標示物的頻率則幾乎不受餵食頻率影響。

因此，標示物的結構與餵食餌料種類無關，改變餵食頻率亦不會影響標示物的排放頻率，且標示物的漂流時間較長，不容易在水中散開；而排遺物的結構與餵食餌料種類有關，且排遺頻率受餵食頻率影響。排遺物的漂流時間較短，而容易在水中散開。分析結果顯示，標示物與排遺物都是由泄殖孔排出，但兩者間的差異很大。



【實驗三】標示物是否具視覺標示效能：

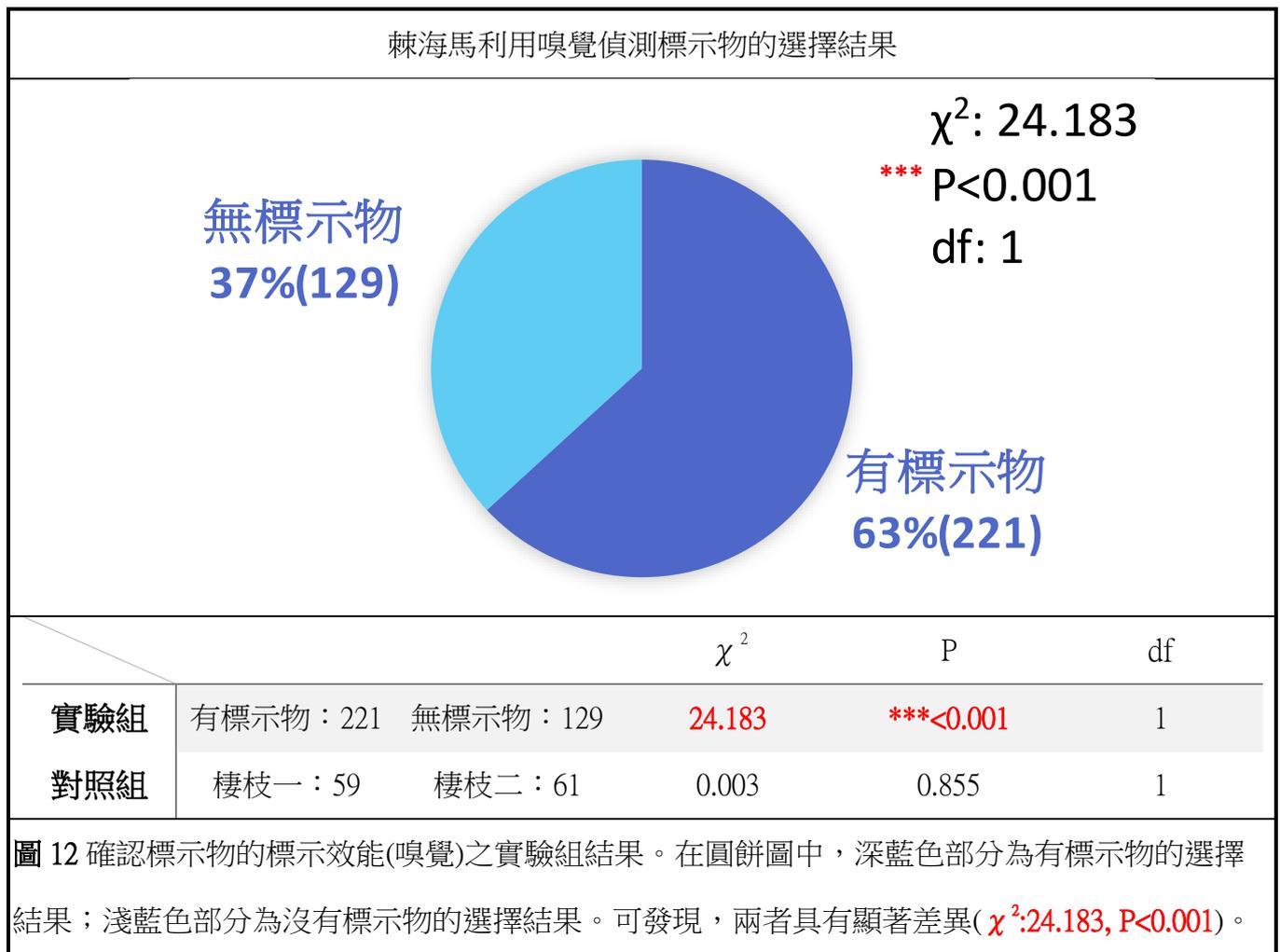
重複觀察記錄 2 隻棘海馬(1 尾公、1 尾母魚) 選擇兩隻不同棲枝的次數是否為隨機分配，實驗的數據分析使用卡方檢定，結果如表 1。結果顯示，無論有無標示物，棘海馬選擇兩支棲枝的結果並無顯著差異。此實驗可知棘海馬無明顯證據運用視覺偵測標示物。

表 1 棘海馬利用視覺偵測標示物的選擇結果

		χ^2	P	df
實驗組	有標示物：14 無標示物：16	0.133	0.715	1
	棲枝一：15 棲枝二：15			
對照組	棲枝一：15 棲枝二：15	0	1	1

【實驗四】標示物是否具嗅覺標示效能：

重複觀察記錄 6 隻棘海馬(2 尾公、4 尾母魚)施作實驗。由圖 12 中發現，棘海馬選擇含有標示物的棲枝比例顯著高於對照組 $\chi^2: 24.183, P < 0.001$ 。證明棘海馬會傾向攀附附有標示物的棲枝，並運用嗅覺來偵測含標示物的棲枝。



【實驗五、實驗六】排遺物是否具視覺、嗅覺標示效能

重複觀察 2 隻棘海馬(1 尾公、1 尾母魚)進行測驗，本實驗的數據分析使用卡方檢定表 2、表 3，結果中棘海馬選擇棲枝的與排遺物並未達顯著水準。排遺物並沒有標示棲枝效能。

表 2 棘海馬利用視覺偵測排遺物的選擇結果

			χ^2	P	df
實驗組	有排遺物：16	無排遺物：14	0.133	0.715	1
	棲枝一：15	棲枝二：15	0	1	1

表 3 棘海馬利用嗅覺偵測排遺物的選擇結果

		χ^2	P	df
實驗組	有排遺物：18 無排遺物：22	0.4	0.527	1
對照組	棲枝一：59 棲枝二：61	0.003	0.855	1

【實驗七】標示物的標示效能持續時間 標示物的標示效能可維持約 7 天(斜率=-0.0188， $R^2>0.7$)。

蒐集標示物並存放 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、10 天的標示物，以及 1 天、5 天、10 天的排遺物，利用【實驗四】的實驗方法確認其標示效能的強弱。實驗結果如圖 5-12。由圖中可發現，標示物的效用會隨放置天數緩緩下降 (斜率：-0.0188， $R^2>0.7$)。本研究發現選擇結果之百分比漸漸趨於 50%時，放置天數約莫是 7 天，意即標示物會在 7 天後失去效用。

但排遺物的標示效能則且皆接近 50%，排遺物的標示效能則與放置時間無顯著差異 ($P>0.05$)。，如圖 13。

棘海馬的標示物與排遺物標示效能的長度

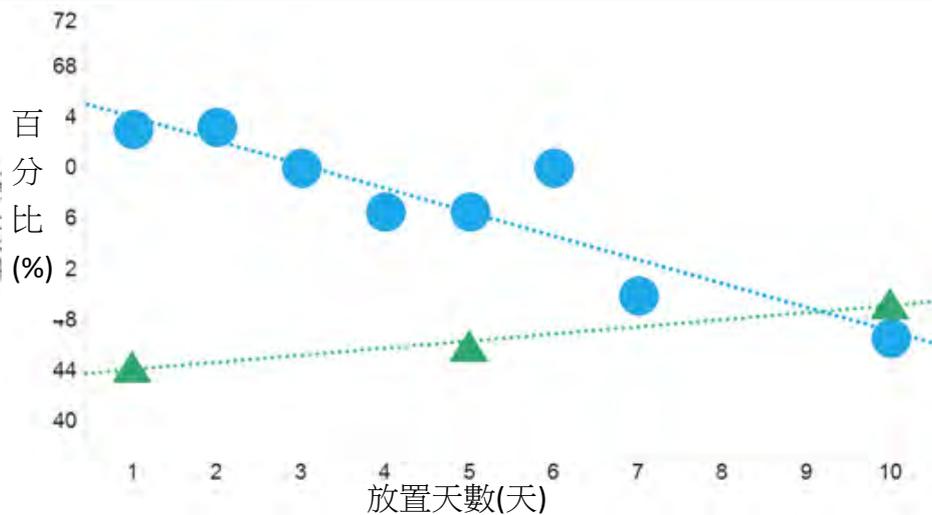


圖 13 棘海馬的標示物與排遺物標示效能的長度。●代表一個標示物的數據點，▲代表一個排遺物的數據點。橫軸為放置天數，縱軸為選擇有標示物之棲枝的百分比。標示物的標示效能會隨時間漸減(斜率：-0.0188)，呈高度相關($R^2>0.7$)，直到 7 天後減至約 50%。排遺物的標示效能則與放置時間無顯著差異($P>0.05$)。

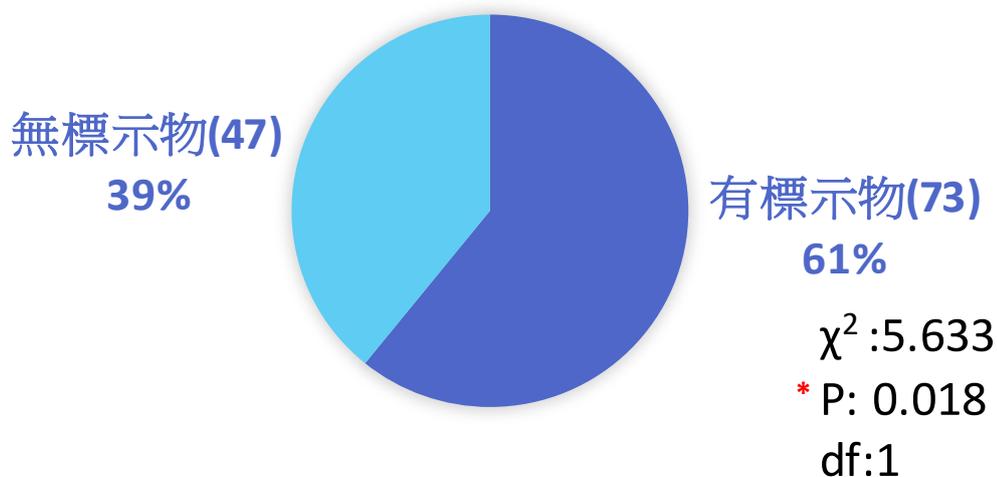
【實驗八】標示物中有效物質之成分分析

使用乙醚以及蒸餾水將標示物中高極性成分與低極性成分分別萃取，以超音波震盪器震盪後利用【實驗四】的實驗方法確認其標示效能的強弱。

實驗結果如圖 14、表 4、表 5。標示物經萃取後水層成分，對棲枝選擇具有顯著差異($\chi^2: 5.633, P<0.05$)。萃取後乙醚層成分、萃取後殘渣等，對棲枝選擇未具有顯著水準。

結果顯示標示物中的有效成分會被水溶解，而萃取結果中的乙醚層與殘渣都不再具有標示效能。因此推論標示物中的有效成分為水溶性物質，且不具揮發性。

棘海馬標示物經萃取後水層的棲枝選擇結果



			χ^2	P	df
實驗組	有標示物：73	無標示物：47	5.633	*0.018	1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	0.003	0.855	1

圖 14 棘海馬標示物經萃取後水層的棲枝選擇結果。在圓餅圖中，深藍色部分為有標示物水層的選擇結果；淺藍色部分為沒有標示物水層的選擇結果。可發現兩者具有顯著差異(χ^2 : 5.633, $P < 0.05$)。

表 4 棘海馬標示物經萃取後乙醚層的棲枝選擇結果

			χ^2	P	df
實驗組	有標示物：30	無標示物：30	0	1	1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	0.003	0.855	1

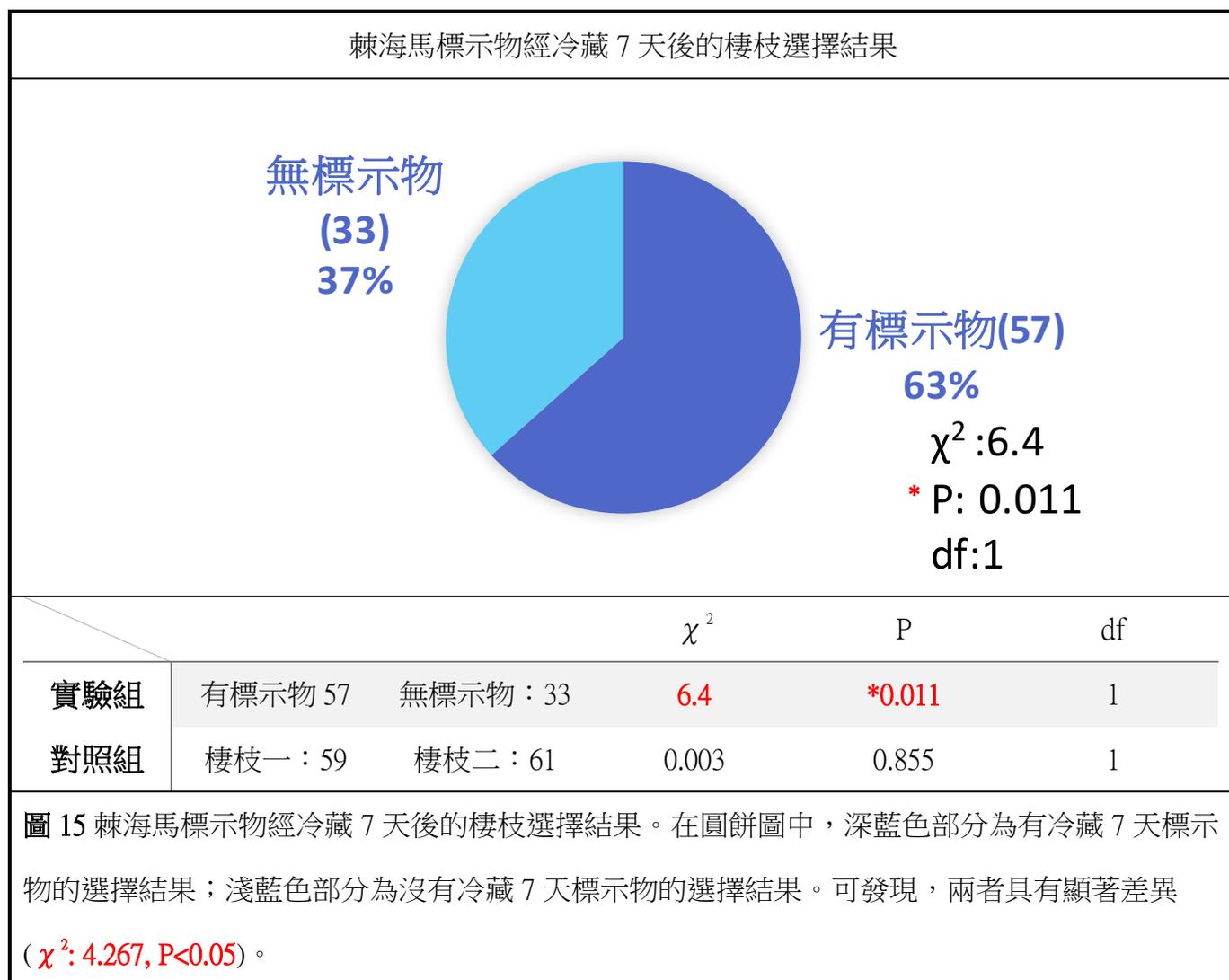
表 5 棘海馬標示物經萃取後殘渣的棲枝選擇結果

			χ^2	P	df
實驗組	有標示物：28	無標示物：32	0.267	0.606	1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	0.003	0.855	1

【實驗九】探討標示物的標示效能

● 9-1 冷藏標示物

將標示物冷藏 7 天，再利用【實驗四】的實驗方法確認其標示效能的強弱。實驗結果如圖 15，冷藏 7 天標示物的選擇結果，與對照組比較具有顯著差異 ($\chi^2: 4.267$, $P < 0.05$)。推論標示物冷藏 7 天後仍具有標示效能。



● 9-2 萃取後常溫保存 7 天

為了再次證實【實驗八】中，水層中的有效成分就是標示物的有效成分，和找出標示物無效的原因，本研究分別將萃取出水層、乙醚層和殘渣放置 7 天，再利用【實驗四】的實驗方法確認其標示效能的強弱。實驗結果如表 6、表 7、表 8。由表中可發現，乙醚層及殘渣仍不具標示效能，而水層的標示效能未達顯著水準。

表 6 棘海馬標示物經萃取並放置 7 天後水層的棲枝選擇結果。

		χ^2	P	df
實驗組	有標示物：58 無標示物：62	0.133	0.715	1
對照組	棲枝一：59 棲枝二：61	0.003	0.855	1

表 7 棘海馬標示物經萃取並放置 7 天後乙醚層的棲枝選擇結果。

		χ^2	P	df
實驗組	有標示物：30 無標示物：30	0	1	1
對照組	棲枝一：59 棲枝二：61	0.003	0.855	1

表 8 棘海馬標示物經萃取並放置 7 天後殘渣的棲枝選擇結果。

		χ^2	P	df
實驗組	有標示物：29 無標示物：31	0.067	0.796	1
對照組	棲枝一：59 棲枝二：61	0.003	0.855	1

【實驗十】標示物的效能對於同性別、不同性別海馬間的差異

分別對同性別、不同性別的海馬以【實驗四】之實驗方法確認標示物的標示效能。本實驗的數據分析使用卡方檢定，來檢驗棘海馬選擇兩支棲枝的次數是否為隨機分配。

從結果數據表 9、表 10 中可以得知，標示物在不同個體之同性棘海馬間，與對照組標示效能無顯著差別。

從公棘海馬的標示物給母棘海馬的棲枝選擇結果，和母棘海馬的標示物給公棘海馬的棲枝選擇結果中如表 11、表 12，與對照組標示效能均無顯著差別。

因此推論無論性別相同或相異，棘海馬不會傾向攀附附有其他海馬標示物的棲枝。

表 9 標示物在不同個體之公棘海馬間的標示效能。

		χ^2	P	df
實驗組	有標示物：16 無標示物：14	0.133	0.715	1
對照組	棲枝一：59 棲枝二：61	0.003	0.855	1

表 10 標示物在不同個體之母棘海馬間的標示效能。

		χ^2	P	df
實驗組	有標示物：14 無標示物：16	0.133	0.715	1
對照組	棲枝一：59 棲枝二：61	0.003	0.855	1

表 11 標示物在公棘海馬對母棘海馬的標示效能。

		χ^2	P	df
實驗組	有標示物：16 無標示物：14	0.133	0.715	1
對照組	棲枝一：59 棲枝二：61	0.003	0.855	1

表 12 標示物在母棘海馬對公棘海馬的標示效能。

		χ^2	P	df
實驗組	有標示物：14 無標示物：16	0.133	0.715	1
對照組	棲枝一：59 棲枝二：61	0.003	0.855	1

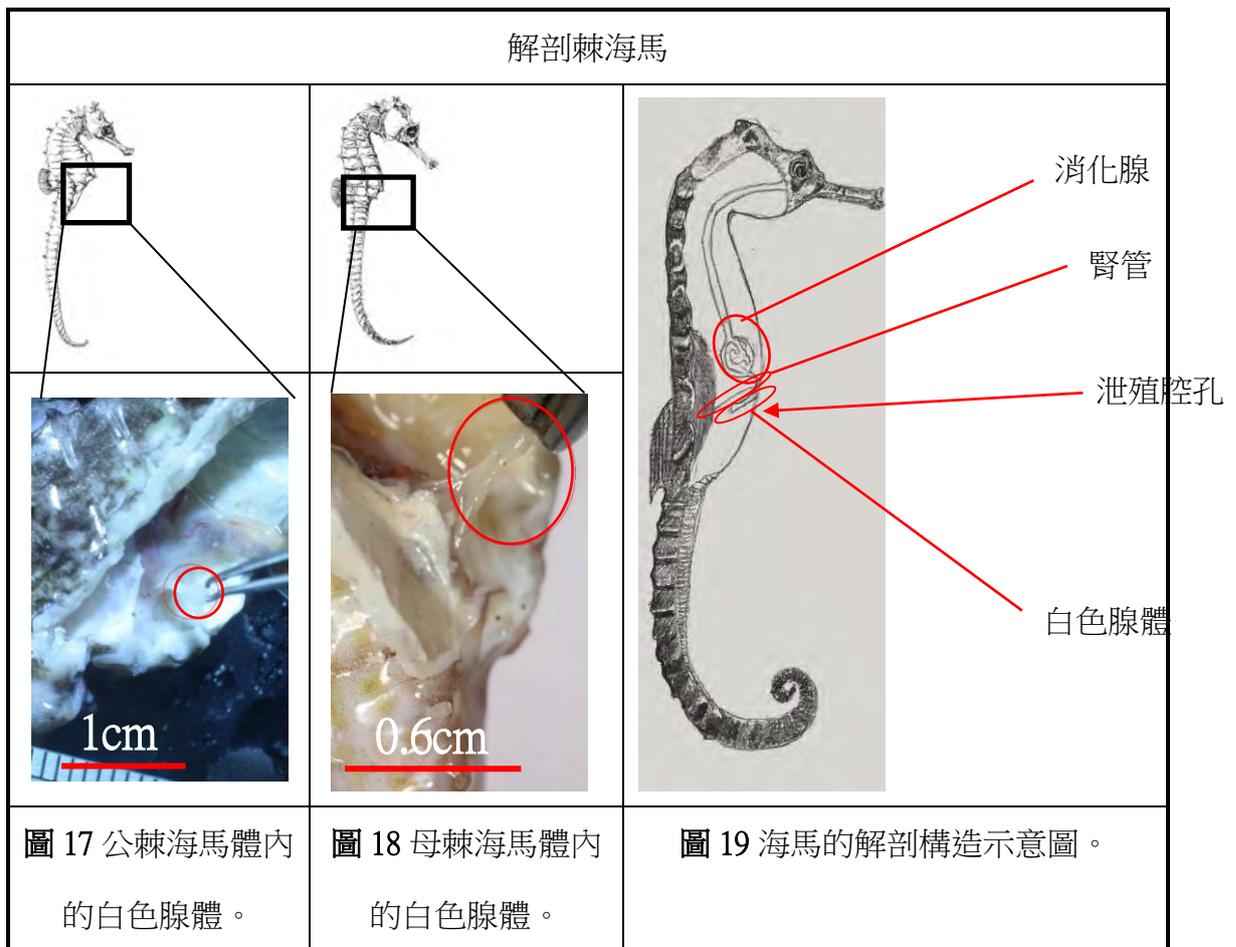
【實驗十一】解剖自然死亡之棘海馬

解剖並觀察自然死亡海馬發現泄殖腔內有一白色器官連接至泄殖腔孔，推測其為生殖腺，如圖 17、圖 18。因為其管腺管徑與標示物的大小相符，所以可能為標示物的分泌器官如圖 19。腎管構造管徑太細，初步排除排出分泌標示物的可能性。

根據脊椎動物學（上）(楊安峰，1990)之說明，魚類連接到泄殖腔孔的管腺只有消化腺、腎管與生殖腺。解剖時在其腸道中發現一團食糜，如圖 16 所示。可發現，食糜的構造與【實驗二】中排遺物的鏡檢結果相似，而異於標示物的結構。所以可推斷標示物的分泌應與消化腺無關；而棘海馬的腎管極細，與標示物的大小不符，因此推論標示物應與腎臟無關。由此證實在棘海馬泄殖腔內找到的白色腺體即為生殖腺，而分泌標示物的器官即此腺體。



圖 16 棘海馬腸道中的食糜。



【實驗十二】分泌標示物之器官連續切片

比對泄殖腔內一白色器官做切片處理(Piras *et al.* 2015; Selman *et al.* 1991)，結果得知解剖公、母海馬之白色腺體為生殖腺，實驗結果如圖 20、21。

另外，解剖的樣本死亡時間並非春、夏繁殖季(Lourie *et al.*, 2004)，所以沒有在切片中公海馬並未發現精子生成如圖 20，母海馬也未發現卵子如圖 21。但是，這些海馬仍具有標示行為，可證明標示行為與可能繁殖無關。

經組織比對白色腺體為生殖腺結果，且未發現有生殖細胞生成，推論棘海馬此時為生殖前期，尚未達到性成熟，因此推論標示行為與繁殖無關。

海馬生殖腺的切片結果

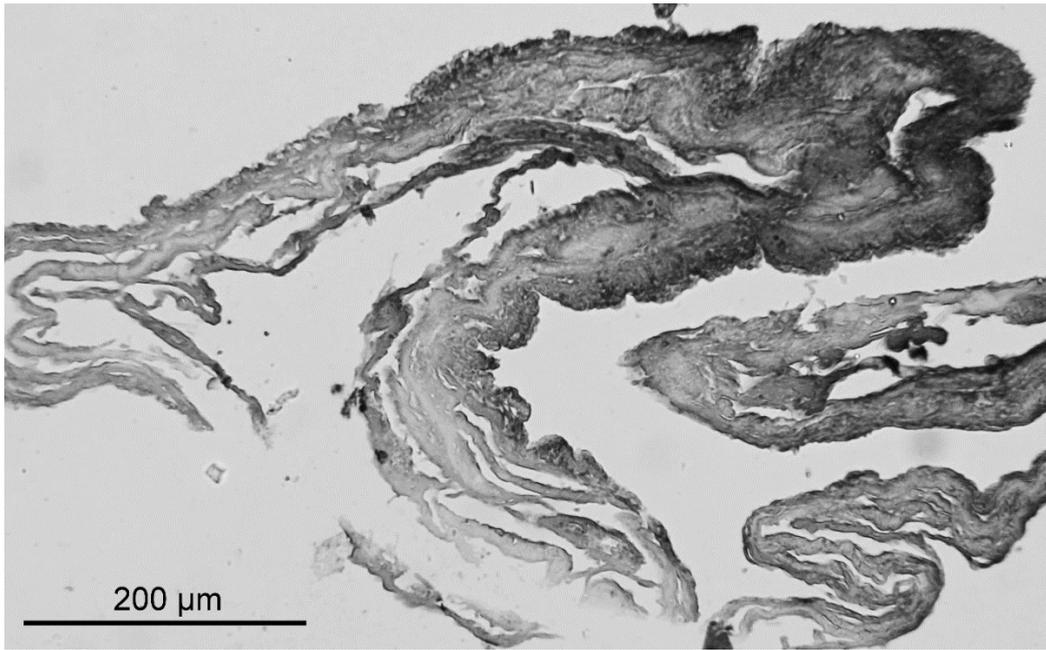


圖 20 公海馬生殖腺的切片結果。

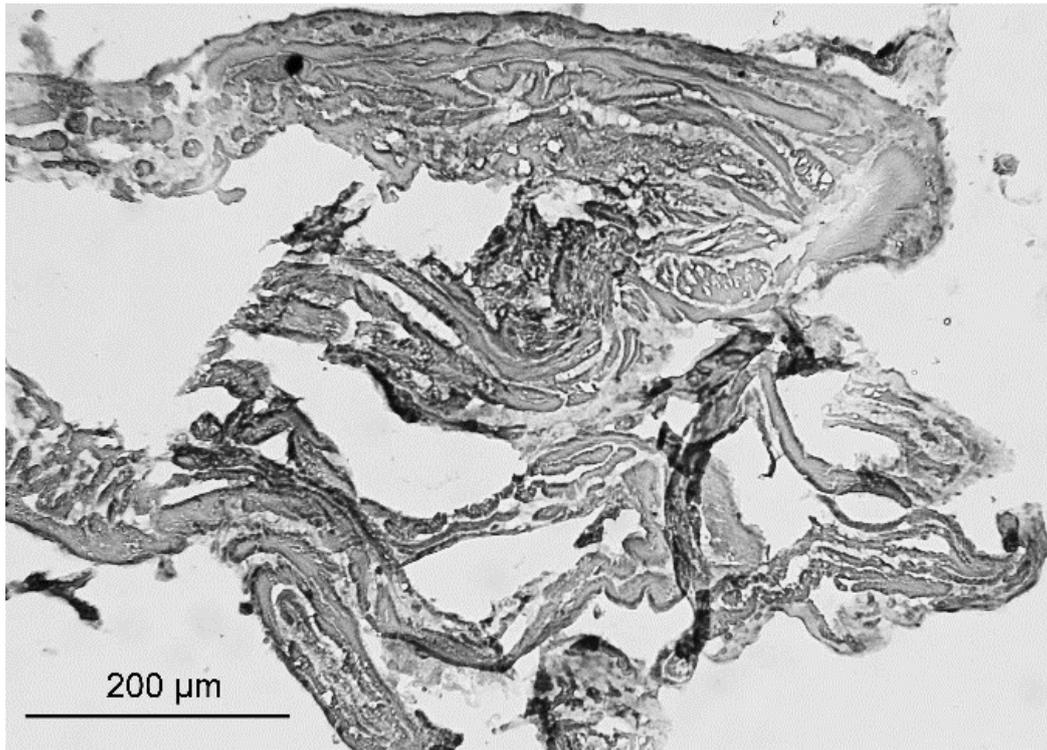


圖 21 母海馬生殖腺的切片結果。

結論與應用

一、海馬標示棲枝行為的首次發現

雖然已知野外海馬移動範圍有限，並偏好棲息於海綿及軟珊瑚等，而且可以停留在同一個棲枝長達數個月之久 (Harasti *et al.* 2014)。顯示野生海馬對棲地具有選擇性與忠誠性。然而對珊瑚礁魚類對棲地選擇性與忠誠性的解釋，仍然未能了解。

學者發現野外天竺鯛具有返家行為 (Gardiner & Jones, 2016)。目前大多數的學者都提出氣味的假說，例如 Doving *et al.*, 2006 實驗證明，五線巨齒天竺鯛對同種個體棲息的人工巢穴，具有明顯的偏好性(Doving *et al.*, 2006)，但目前為止研究員仍無法證明其標示人工巢穴氣味的由來。

本文研究的棘海馬經證明會排放標示物，並傾向停留在有自己標示物的棲枝上，並利用自己排放的標示物氣味，幫助自己找到舊有的棲枝，進而表現出棲地忠誠性，此項研究是目前科學上首先被證實的珊瑚礁魚類的標示行為，其結果深具生物意義與研究價值。

二、全新的標示物標示案例

棘海馬排放頻率與餌料種類、餵食頻率、排遺頻率皆無關，證明了棘海馬標示物是週期性的固定排放，與排遺物的功能不同，標示物的比重明顯較排遺物小，且具有較高的黏性，可加長其在海中漂流的時間，進而提高附著在攀附之棲枝的機會，達到標示棲枝的目的。鮭魚則會利用其排遺物中膽鹽的氣味幫助自己辨別同類(Doving *et al.* 1980)，與海馬利用性腺標示物以黏附於棲枝的方式迥異。標示原理與也與陸生生物直接以尿液標示在領地上不盡相同，成為一種全新的標示行為的例子。

本研究發現標示物會在水中漂流後黏附於棲枝，可能也會與偏好的海綿及軟珊瑚等結構較密集複雜有關，結構密集的棲枝可提供海馬較好的偽裝及掠食環境(Flynn *et al.*, 1999)，使海馬傾向攀附(Harasti *et al.* 2014)，因此結構密集的棲枝容易黏附標示物，有可能可以促使海馬持續攀附同一結構複雜的棲枝，並提高生存優勢。

三、標示行為在野外可能的意義

因公棘海馬的標示物不會對母棘海馬產生吸引力，且排放標示物的週期與海馬的繁

殖期(春、夏)並無關聯。切片中也發現標本並無性成熟，證明標示行為應與繁殖可能無關。海馬會在繁殖期遷徙至離岸較近的海域 (Vincent *et al.* 2005)。但因繁殖期較長，與實驗結果顯示出的標示物的時效約七天並不相符。因此排除標示物是棘海馬用以找到交配前生活的棲枝的可能性。

在海馬的繁殖模式中，母海馬會主動尋找交配對象，公海馬則負責撫育、生產。因此母懷氏海馬在野外的活動距離 (最大 70 公尺)會比公懷氏海馬 (最大 38 公尺)來的大許多 (Harasti *et al.* 2014)。但實驗結果中，公、母棘海馬之間標示物並沒有明顯差異。推測可能原因為：1.實驗中所使用的水缸與海馬在野外觀察的活動範圍相差甚大。2.此實驗施作對象為棘海馬，與 Harasti *et al.* 2014 中觀察的懷氏海馬不同。期待在未來也能對更多品種的海馬進行研究，進而證明棲枝標示行為是海馬屬的特徵。

另外，海馬是一夫一妻制的魚類，但礙於實際上養殖的困難，無法取得已配對的棘海馬以確認標示行為，是否在配對的海馬中有獨特意義。因此如果臺灣本地能擁有一塊為珊瑚礁生物而設立的野生動物保護區，在自然環境下觀察海馬的行為，並對已配對的公母海馬進行實驗，使海馬的棲枝標示行為能更完整的描述。

然而飼養環境觀察棘海馬的游泳能力極差，且入夜後海馬幾乎呈靜止狀態，若沒有纏繞棲枝，則可能被水流沖走。所以推測棘海馬必須以標示物的氣味做為記號，辨認自己的棲枝，並用尾巴將自己固定於棲枝上，以防在光線不足時海馬無法找到棲枝、成功纏繞安全的棲枝上。

海馬無領域行為，並不會捍衛自己的棲息地，棲息地只是牠們常活動的範圍而已。海馬的棲地範圍會彼此重疊，且棲地範圍大小與海馬的體長無關連 (Vincent *et al.* 2005)。在實驗室觀察標示物的功用，無論性別棘海馬並不會對其他個體的標示物產生吸引或排斥等，符合文獻中在野外的觀察報告。訪談國內潛水教練得知，野生海馬並不會互相打鬥或爭搶地盤，所以推論標示物對其他個體間，並無產生領域性警示的意味 (表 13)。

四、不同種海馬的觀察結果比較

本研究得知棘海馬會利用嗅覺感知標示物，同時也觀察三班海馬與庫達海馬 (表 13)。而目前三斑海馬的飼養觀察中還不確定，其原因為：1. 三斑海馬排放標示物的週

期較棘海馬長(約 7 天排放一次)。2. 因飼養困難而實驗組數不足。

表 13 本實驗中三種不同種海馬的觀察結果比較

	棘海馬(<i>H. spinosissimus</i>)	三斑海馬(<i>H. trimaculatus</i>)	庫達海馬(<i>H. kuda</i>)
外觀	黑褐色。	灰黑色。	黃色。
體長	約 13cm。	約 11cm。	約 7cm。
行為	會有固定棲枝。	不確定是否會有固定棲枝。	不固定棲枝。
標示物	有。	有。	無。
棲枝的選擇	傾向具有標示物的棲枝。	目前還不確定。	

經過三十天的觀察之後(2/10~3/9)，庫達海馬並未觀察到有任何標示物。庫達海馬尚無觀察到標示物的可能原因為： 1. 飼養的庫達海馬年齡過小，而幼體懷氏海馬的棲地忠誠性較低 (Harasti *et al.* 2014)，因此認為幼體庫達海馬不會排放標示物標示自己的棲枝。2. 飼養困難而實驗組數不足(目前僅飼養 1 公 1 母)。

幼年的懷氏海馬棲地忠誠性並不高(Harasti *et al.* 2014)，而本研究飼養的幼體庫達海馬體長僅有 9 公分，和成體體長(17 公分)差異甚大，因此與文獻中的幼年懷氏海馬棲地忠誠性不高之描述相符。

五、棘海馬標示物中的有效成分為水溶性物質

棘海馬的標示物之效能在常溫會隨著時間遞減，直到約第 7 天接近無效，但冷藏可延長其標示效能，在【實驗 9-1】中得知標示物在冷藏保存 7 天後仍具有標示效能，顯示低溫有助於延長標示物的標示效能。

而在鏡檢的時候發現標示物常溫中有許多微生物活動，如圖 22。所以我們推測使標示物失效的可能因素為微生物的分解作用。

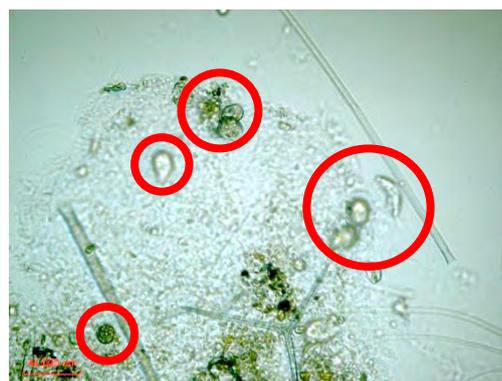


圖 22 標示物中的微生物

參考文獻

楊安峰 (1990) 脊椎動物學(上) 臺北市：淑馨出版社。

Doving, K. B., Selset, R., & Thommesen, G. (1980) Olfactory sensitivity to bile acids in salmonid fishes. *Acta*, 108(2), 123-131.

Doving, K. B., Stabell, O. B., Ostlund-Nilsson, S., & Fisher, R. (2006) Site fidelity and homing in tropical coral reef cardinalfish: are they using olfactory cues?. *Chemical Senses*, 31(3), 265-272.

Flynn, A. J., & Ritz, D. A. (1999) Effect of habitat complexity and predatory style on the capture success of fish feeding on aggregated prey. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 79(03), 487-494.

Gardiner, N. M., & Jones, G. P. (2016) Habitat specialisation, site fidelity and sociality predict homing success in coral reef cardinalfish. *Marine Ecology Progress Series*, 558, 81-96.

Harasti, D., Martin-Smith, K., & Gladstone, W. (2014) Ontogenetic and sex-based differences in habitat preferences and site fidelity of White's seahorse *Hippocampus whitei*. *Journal of fish biology*, 85(5), 1413-1428.

Lourie, S. A., Foster, S. J., Cooper, E. W., & Vincent, A. C. (2004) A guide to the identification of seahorses. Washington, DC: University of British Columbia and World Wildlife Fund.

Piras, F., Biagi, F., Taddei, A. R., Fausto, A. M., Farina, V., Zedda, M. & Carcupino, M. (2015) Male gonads morphology, spermatogenesis and sperm ultrastructure of the seahorse *Hippocampus guttulatus* (Syngnathidae). *Acta Zoologica*.

Sale, P.F. (1978) Reef Fishes and Other Vertebrates: A Comparison of Social Structures. John Wiley, New York.

Selman, K., Wallace, R. A., & Player, D. (1991) Ovary of the seahorse, *Hippocampus erectus*. *Journal of morphology*, 209(3), 285-304.

Shao K. T. Taiwan Fish Database. WWW Web electronic publication. <http://fishdb.sinica.edu.tw>, (2017-10-22)

Vincent, A. C., Evans, K. L., & Marsden, A. D. (2005) Home range behaviour of the monogamous Australian seahorse, *Hippocampus whitei*. *Environmental Biology of Fishes*, 72(1), 1-12.

附錄 一

一、組織切片實驗步驟：

(一) 固定(fixation)：

1. 將欲觀察之海馬組織用解剖剪刀剪下。

(二) 脫水(dehydrate)：

1. 將標本依序置入 50%、60%、70%、80%酒精各 5 分鐘。
2. 將標本依序置入 90%、99.5%酒精各 5 分鐘，分別重複兩次。

(三) 透明(clearing)：

1. 將標本置入 99.5%酒精與二甲苯(Xylene)等比例混合溶液 5 分鐘。
2. 將標本置入二甲苯(Xylene)中 5 分鐘。

(四) 浸潤(infiltration)：

1. 將標本置入二甲苯溶液及石蠟等比例混合溶液 5 分鐘。
2. 將標本置入熔融石蠟 30 分鐘，重複兩次。

(五) 包埋(embedding)：

1. 利用加熱板加熱不鏽鋼標本盒，置適量乾淨石蠟填滿標本盒 2/3 高度。
2. 將標本置入標本盒中，調整標本平放於盒中。
3. 將熔融石蠟填滿標本盒，蓋上蓋上塑膠蓋。
4. 將標本盒置於冷凍庫中急速冷卻，約 5 分鐘取出並分離塑膠蓋與標本盒。

(六) 切片(cutting)：

1. 將石蠟塊固定於切片機。
2. 利用切片機進行切片。
3. 在玻片加熱台上放置上滴滿純水的載玻片，並加熱至 40 度。
4. 將蠟帶挑起，取適當長度的蠟帶放至玻片上一個禮拜，待蠟帶平整。

(七) 蘇木精—伊紅染色(Haematoxylin-Eosin staining)：

1. 將含蠟帶的載玻片逆向進行透明及脫水步驟，並將時間縮短為 3 分鐘。

2. 將標本浸入蒸餾水 1 分鐘。
3. 將標本浸入蘇木精約 10 秒至 3 分鐘（浸泡時間在顯微鏡下視染色效果而定）。
4. 將標本浸入流動的水 20 分鐘，使蘇木精完全氧化。
5. 將標本浸入 70%酒精 30 秒。
6. 將標本浸入伊紅 10 秒至 3 分鐘（浸泡時間在顯微鏡下視染色效果而定）。
7. 進行脫水及透明步驟，並將時間縮為數秒。

(八) 封片(mounting)：

1. 保留些許二甲苯溶液於載玻片上。
2. 於載玻片有組織的那面塗上封片膠(Mounting Medium)。
3. 取適當大小蓋玻片，以 45 度角慢慢蓋上。
4. 靜置一週，於玻片上記錄標本資訊即完成。

附錄 二

表 10-1 野外資深潛水員訪談結果

教練名	研究區域	主要海馬品種	棲息棲枝	棲地忠誠性
教練甲	綠島。	庫達海馬、一般海馬。	同顏色海綿、海藻。	庫達海馬高； 其他不高。
教練乙	墾丁。	長吻海馬、豆丁海馬。	柳珊瑚。	不高。
教練丙	東北角。	庫達海馬。	海膽、廢棄漁網。	/
教練丁	墾丁。	刺海馬、花海馬、庫達海馬。	顏色相近的珊瑚或海藻。	很難說。
教練戊	墾丁。	庫達海馬。	黑色海綿、馬尾藻。	/
教練己	左營軍港。	庫達海馬。	海草。	/

教練名	是否成對出現	附註
教練甲	通常成對。	白天大部分分開各自覓食，但不會離開太遠。
教練乙	通常成對或居住於附近。	長吻海馬冬末、初春出現。豆丁海馬連續三年成雙成對出現。
教練丙	不成對(因為很少見)。	發現深度於 8~20m。
教練丁	通常成對。	/
教練戊	/	/
教練己	/	菲律賓宿霧島附近海域有野生海馬與圈養，而越南亦有大量的海馬養殖。

【評語】 050011

1. 由相關實驗設計來探究棘海馬生態領地行為，以目前研究所得之訊息，可明確了解此標示物質具有物種與相關物性之鑑別，在未來大型的生態實驗或許能有所幫助。
2. 海洋生物生態研究(生物遷移迴游、物種食物鏈、宿主與寄主間關係等) 若能完整探究生態行為或其中關鍵因子，對未來海洋資源研究是很重要的課題。

本研究發現棘海馬排放標示物以標記棲枝。本研究具獨特原創性，所有實驗設計都是基於 "問題導向"。整篇研究讀來兼顧知識性與趣味性。唯獨實驗 3,4 的實驗設計文字說明部分並不清楚。