中華民國第 57 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　動物與醫學學科

第三名

052009

海馬識途—棘海馬棲枝的選擇與標示

學校名稱：國立科學工業園區實驗高級中學

作者：	指導老師：
高二 王子維 高二 林政孚 高二 孫志朋	揭維邦

關鍵詞：棘海馬、棲枝標示物、標示行為

摘要

本研究發現棘海馬(*Hippocampus spinosissimus*)會排放標示物以標記自己的棲枝。海馬因游泳能力弱，所以習慣棲息於固定環境。目前海洋魚類尚未被發現有類似標示行為，但觀察棘海馬發現，其會由泄殖腔孔排放一種標示物。此標示物的氣味能幫助牠們尋找自己的棲枝(卡方值: 24.183, P<0.001) ，且有效成分為水溶性。標示效能在室溫下可維持約 7 天，但冷藏可延長其標示效能。它是一種黏液，成分與棘海馬的食物無關，且比重較排遺物小，使其更容易在水中漂流並黏附在棲枝上。標示物的排放週期與餵食、排遺頻率無關。無論性別相同(卡方值:0, P>0.05)或相異(卡方值:0, P>0.05)，棘海馬不會傾向攀附附有其他海馬標示物的棲枝。經由解剖和切片觀察，證實標示物的分泌器官為泄殖腔中的生殖腺，但與繁殖無關。

前言

海馬具有棲地忠誠性(site fidelity)。海馬會利用尾巴纏繞住棲地中的枝條以固定自己的身體，而這些枝條稱為棲枝。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(Harasti *et al.* 2014)。成年的懷氏海馬偏好海綿及軟珊瑚，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)。

為了瞭解台灣海域的海馬生態，本研究訪談了國內的資深潛水員，得知在台灣海域出沒的海馬有：棘海馬、花海馬、庫達海馬、豆丁海馬、長棘海馬等，且出沒於約 8 至 20 公尺深的海域。

而本研究使用的海馬—棘海馬(*Hippocampus spinosissimus*)分布於印度洋以及太平洋，包括斯里蘭卡、泰國、馬來西亞、印尼、台灣、越南、菲律賓、柬埔寨、澳洲等海域。棘海馬的成熟個體體長約 10～17 公分，全身布滿突出且尖的棘，一直延伸至尾部。



圖 0-1 公棘海馬



圖 0-2 母棘海馬

壹、 研究動機

已知野生的海馬對於生存環境有高度的忠誠性，可以維持同一個棲枝達到 10 個月以上。在觀察實驗室中的海馬後，發現海馬會用善於抓握的尾巴攀附環境中的棲枝，例如珊瑚礁、海樹等等。意外地，在海馬所纏的棲枝上，我們發現了一些坨狀、疑似是排遺物的東西。這引起了我們的好奇心 (基礎生物(下)的第六單元—生物與環境)。

目前科學界對海洋魚類的標示行為發現跟化學物質有關，但魚類如何產生這些標示物質甚缺乏了解。因此，我們選擇深入研究棘海馬的棲枝標示行為，同時也將研究是何種分泌物造成此現象。

貳、 研究目的

一、發現棘海馬排放標示物的過程，並分析標示物的特性。

二、確認標示物的標示效能。

三、了解棘海馬如何偵測標示物。

四、分析標示物中可能的有效成分，並推測失效原因。

五、探討標示物的標示效能的持續時間。

六、探討標示物對不同個體間效能的差異。

七、證實棘海馬標示物的分泌器官。

參、 研究設備及器材

一、研究設備

器材	用途
海馬飼養環境(圖 3-1)	於實驗室中飼養海馬，減少變因
維持飼養環境之用品	讓飼養環境保持穩定，有利於海馬生活
錄影器材(JVC、SONY 錄影機、三腳架)	觀察與記錄棘海馬排放標示物與排遺物
顯微鏡(Olympus SZ61)	觀察解剖後的棘海馬
ImageJ (影像分析軟體)	記錄標示物與排遺物於水中漂流軌跡
MicroCap v3.0 (顯微鏡電腦端程式)	標示物與排遺物之鏡檢
解剖用具(解剖刀、剪刀)	解剖自然死亡之棘海馬以了解體內構造
萃取器材與藥品(超音波震盪器(圖 3-2)、乙醚等)	萃取標示物之有效成分
切片及染色器材(石蠟、切片機(圖 3-3)、蘇木精、伊紅等)	切片並觀察可能的標示物分泌器官



圖 3-1 海馬飼養環境



圖 3-2 超音波震盪器



圖 3-3 切片機

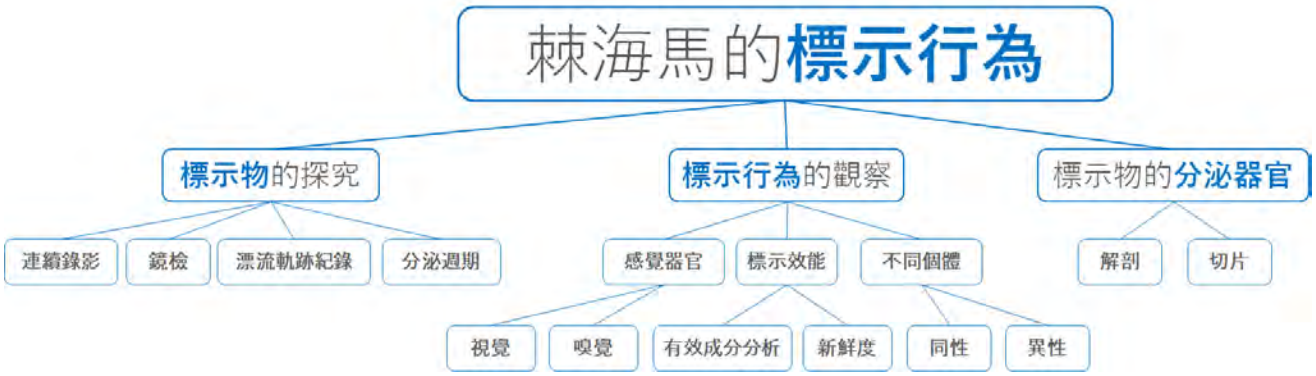
肆、 研究過程或方法

一、文獻回顧

(一) 海馬找到習慣棲枝的感官推測

從文獻中得知，天竺鯛(*Cheilodipterus quinquelineatus*)會利用嗅覺偵測自身的化學氣味來回到自己的棲地(Døving *et al.* 2006)。鮭魚(*Salmo alpines*)則會利用嗅覺記憶膽鹽的氣味辨別自己的同類(Døving *et al.* 1980)。因此推測棘海馬(*H. spinosissimus*)可以利用嗅覺偵測標示物。同時也將視覺列入考量，並針對海馬的嗅覺與視覺設計實驗。

二、實驗流程



三、實驗步驟：

(一) 海馬如何排放標示物？

【實驗一】了解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：
   (1) 架設錄影機於水族缸前。
   (2) 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。

(二) 標示物與排遺物有何差異？

【實驗二】探討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
  (1) 將棘海馬和三斑海馬的排遺物與標示物製成樣本。
  (2) 使用 MicroCap 顯微鏡檢視樣本，並以 MicroCap v3.0 記錄影像。
  (3) 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 分析漂流軌跡
  (1) 將 1000mL 燒杯裝滿海水。
  (2) 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 記錄標示物與排遺物的排放頻率
  (1) 記錄每天棘海馬排放的排遺物與標示物的數量。
  (2) 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。

(三) 棘海馬是否以視覺感知標示物？

【實驗三】標示物是否具有標示效能(視覺)

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)。

(四) 棘海馬是否以嗅覺感知標示物？

【實驗四】標示物是否具有標示效能(嗅覺)

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)。

(五) 棘海馬是否以視覺感知排遺物？

【實驗五】排遺物是否具有標示效能(視覺)

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。

(六) 棘海馬是否以嗅覺感知排遺物？

【實驗六】排遺物是否具有標示效能(嗅覺)

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。

(七) 標示物的標示效能能持續多久？

【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。

(八) 標示物中的有效物質為何？

【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。

(九) 冷藏與萃取對標示物標示效能的影響？

【實驗九】探討標示物的失效原因

1. 目的：藉由冷藏標示物與水層於攝氏 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
  (1) 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

(1) 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。

(十) 標示物會不會對其他海馬個體產生標示效能？

【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。

(十一) 棘海馬的標示物由何器官分泌？

【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：
   (1) 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。
   (2) 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】將分泌標示物之器官切片

1. 目的：觀察【實驗十一】中發現的白色器官組織。
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：
   (1) 利用石蠟將標本包埋並進行切片。
   (2) 使用蘇木紫—伊紅染色法進行染色。

伍、 研究結果

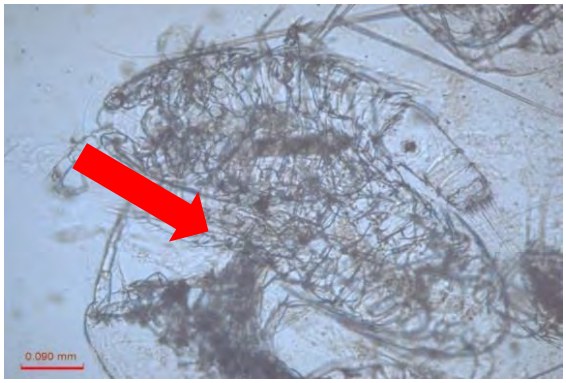
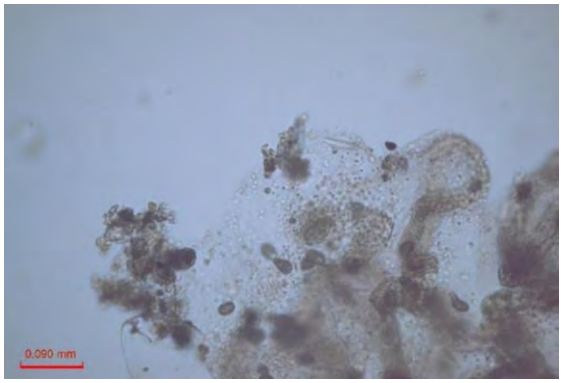
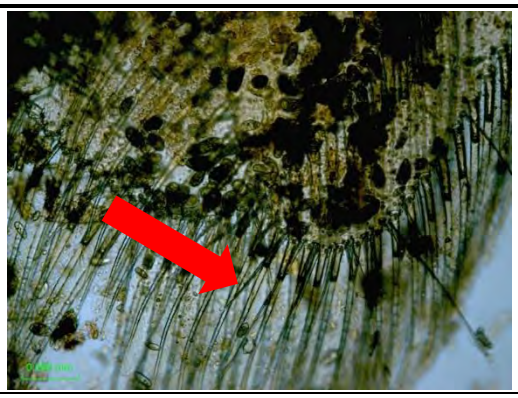
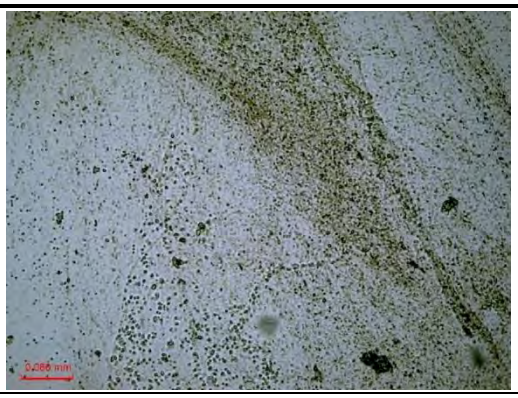
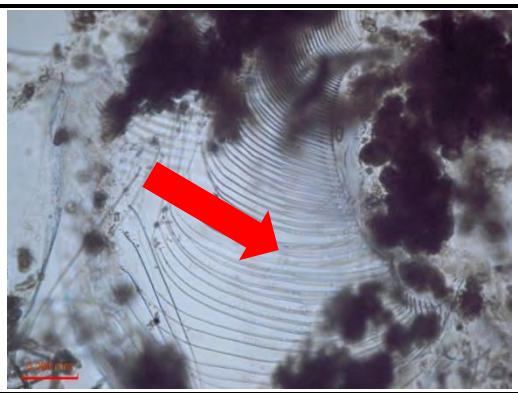
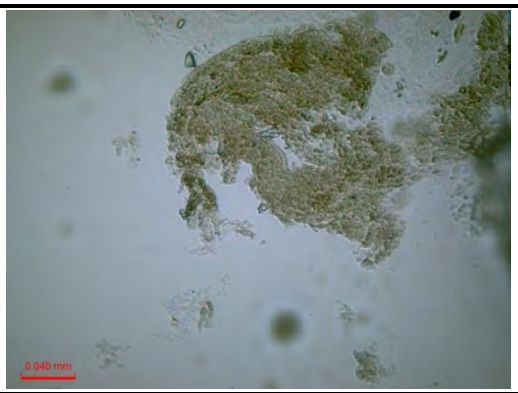
一、標示物的探究：標示物確實為海馬自己所排出，且成分、排放週期皆與排遺物無關，為特定的一種標示物。

(一) 【實驗一】了解海馬標示棲枝的方式：標示物確實為棘海馬自己由泄殖腔孔排出的，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。為了證明標示物為棘海馬自己所排出，以及標示物如何附著於棲枝上。本研究分別對六隻棘海馬(2 公 4 母)進行連續錄影的實驗，每日錄影時間約十小時。我們共記錄到兩次排遺，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。

(二) 【實驗二】探討標示物和排遺物的差異：標示物的結構與餵食餌料種類無關，且改變餵食頻率亦不會影響標示物的排放頻率。標示物的漂流時間較長，不容易在水中散開；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。

- 2-1 鏡檢

  為了更了解海馬的排遺物與標示物，本研究藉由鏡檢比較 6 隻棘海馬(2 公 4 母)與 2 隻三斑海馬(1 公 1 母)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，並進行 23 次觀察，以確保實驗結果非個案。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 5-1、圖 5-3，而食用黑殼蝦後的標示物則沒有類似現象，如圖 5-2、圖 5-4；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 5-5，而食用豐年蝦後所排出的標示物中則沒有類似現象，如圖 5-6，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 5-1 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 5-2** 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 5-3 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 5-1 類似。	**圖 5-4** 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 5-5 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 5-6** 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 5-2、圖 5-4 類似。

- 2-2 記錄標示物與排遺物的漂流軌跡：

  由【實驗一】的結果發現，標示物與排遺物的漂流軌跡明顯不同，如下圖 5-7。為了瞭解標示物是如何有效黏附在棲枝上，本研究運用錄影機記錄標示物與排遺物在裝滿海水的燒杯中的漂流軌跡，再利用 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 5-8、圖 5-9。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都較排遺物來的久，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。

連續錄影後排遺物與標示物的漂流軌跡圖

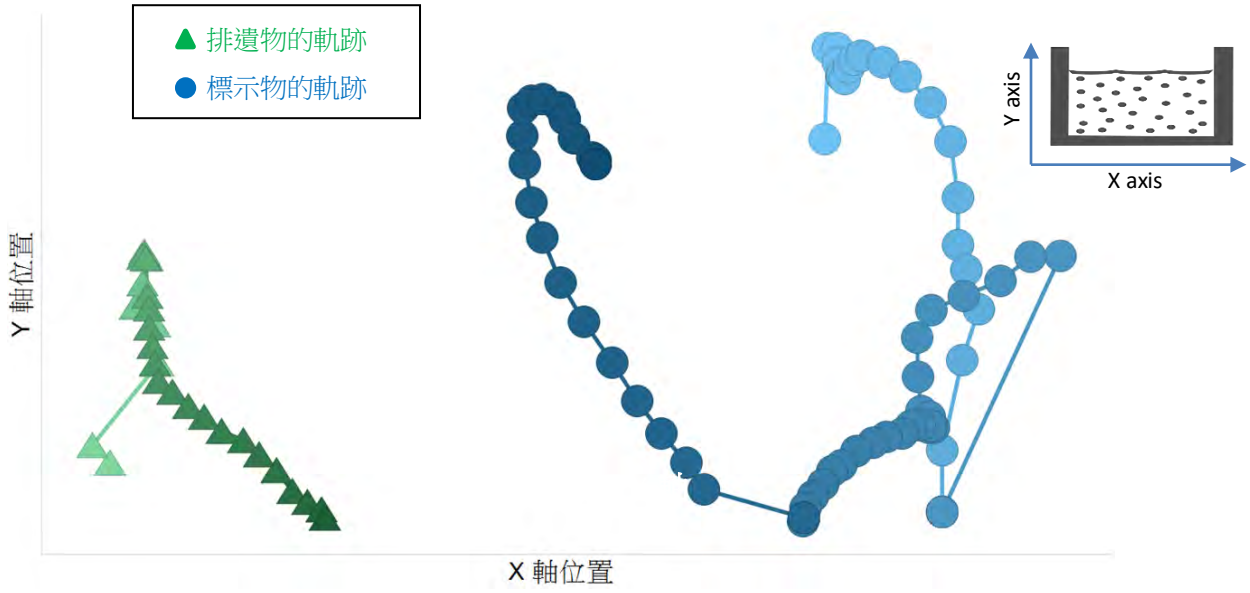


圖 5-7 排遺物與標示物之連續錄影漂流軌跡圖。圖中每個點之間的間隔為一秒，時間順序由淺到深。(左)餵食黑殼蝦的排遺物在水缸中的漂流總時間為 28 秒；(右)為標示物在水缸中的漂流總時間為 96 秒。可清楚看到，標示物的漂流時間明顯比排遺物來的長。

燒杯中棘海馬的排遺物和標示物的漂流軌跡圖

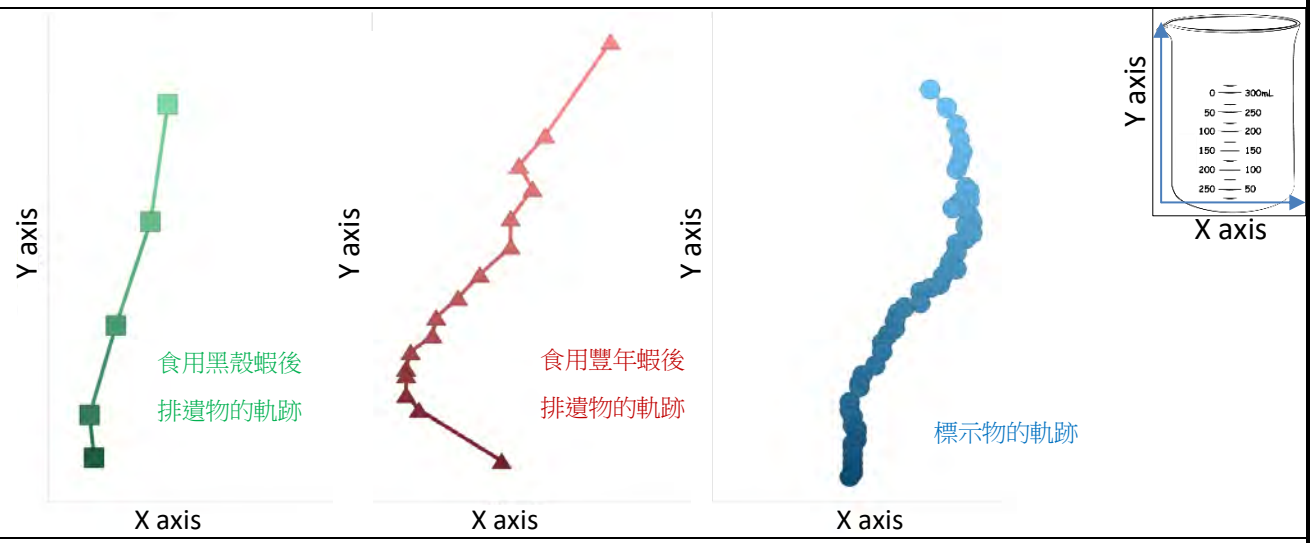


圖 5-8 棘海馬排遺物與標示物之漂流軌跡圖。圖中每個點之間的間隔為一秒，時間順序由淺到深。(左)棘海馬餵食黑殼蝦後產生的排遺物在燒杯中的漂流軌跡，總時間為 4 秒；(中)棘海馬餵食豐年蝦後產生的排遺物在燒杯中的漂流總時間為 15 秒；(右)棘海馬的標示物在燒杯中的漂流總時間為 51 秒。可清楚看到，棘海馬標示物的漂流時間明顯比排遺物來的長。

燒杯中三斑海馬的排遺物和標示物的漂流軌跡圖

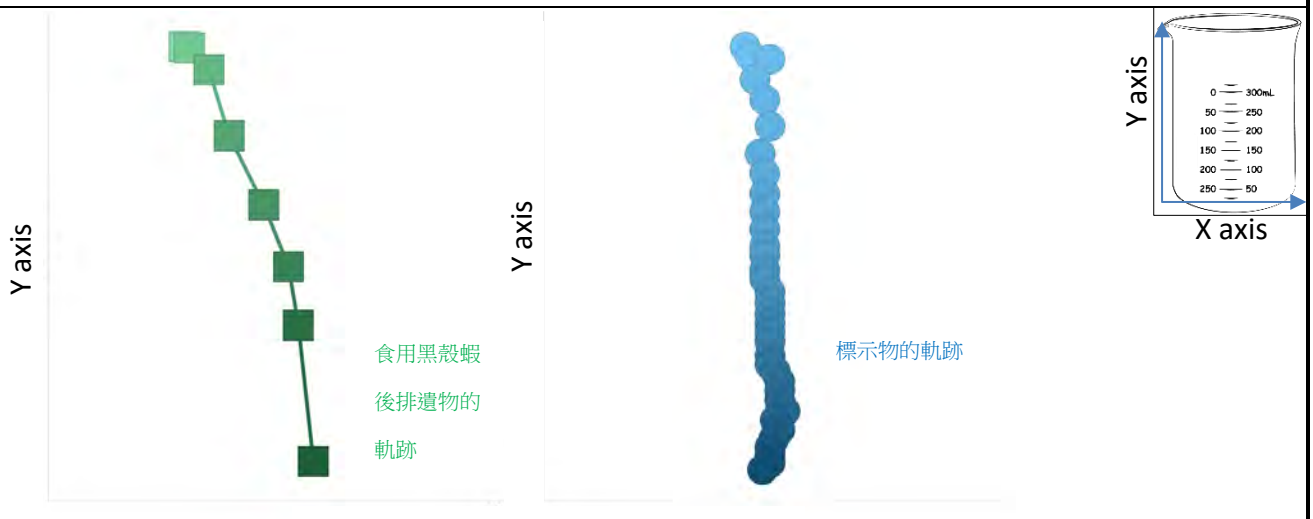


圖 5-9 三斑海馬排遺物與標示物之漂流軌跡圖。圖中每個點之間的間隔為一秒，時間順序由淺到深。(左)三斑海馬餵食黑殼蝦後產生的排遺物在燒杯中的漂流總時間為 7 秒；(右)三斑海馬的標示物在燒杯中的漂流總時間為 35 秒。可清楚看到，三斑海馬標示物的漂流時間明顯比排遺物來的長。

- 2-3 記錄棘海馬排放標示物的週期

  為了進一步確認棘海馬排放的標示物的週期與排遺物無關，本研究改變餵食頻率，並比較餵食頻率高與餵食頻率低時，標示物與排遺物的排放週期差異。在 27 天內，記錄得兩隻棘海馬(0 公 2 母)的標示物與排遺物的數量，記錄後即清除，並比較標示物與排遺物排放頻率之差異。由圖 5-10 可以發現，餵食頻率對於棘海馬排放排遺物的頻率具有重大的影響，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。

不同餵食頻率下排遺物與標示物的分泌頻率比較

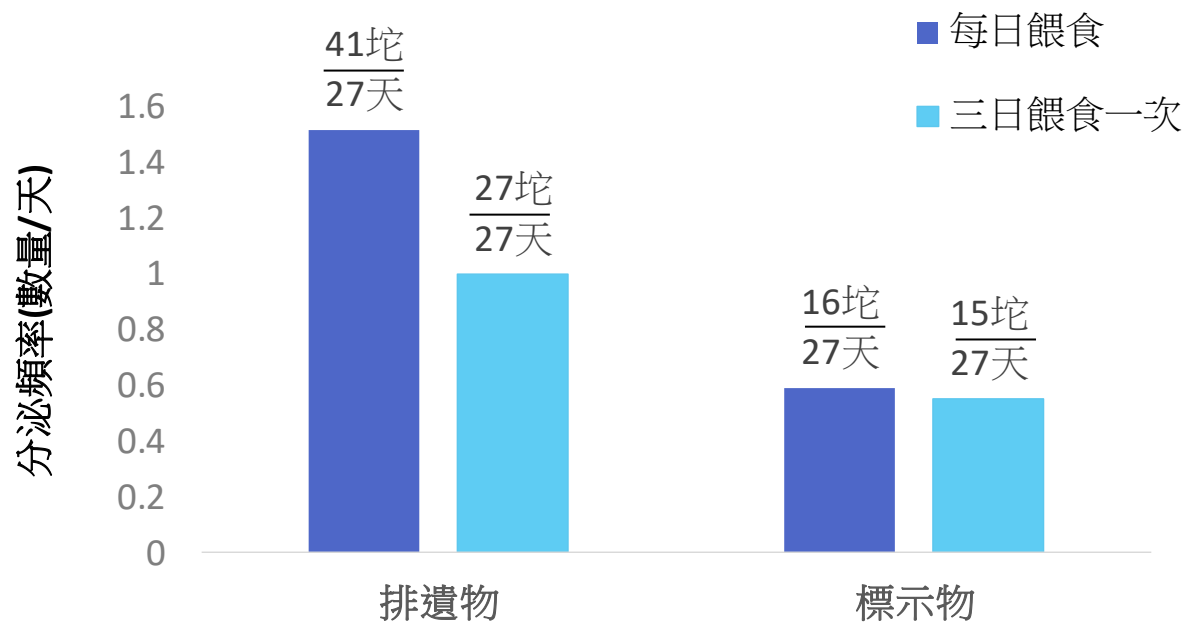


圖 5-10 餵食頻率對棘海馬排遺物及標示物排放頻率的影響。

二、標示行為的觀察：棘海馬會利用嗅覺偵測標示物，且標示物只對自身海馬產生標示效能，對同性別、不同性別個體則沒有標示效能。標示物的標示效能在室溫下可以維持約 7 天，但冷藏保存可延長標示物的標示效能。標示物中有效成分為水溶性，且將其在室溫下放置 7 天後一樣會失去標示效能。

(一) 【實驗三】標示物是否具有標示效能(視覺)：海馬並不會用視覺偵測標示物。

為了確認標示物是否具有標示效能，並探討棘海馬是否以視覺感知標示物，本研究分別對 2 隻棘海馬(1 公 1 母)施作此實驗，累積足夠的重複數。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。可以發現，棘海馬選擇兩支棲枝的結果並無顯著差異。從此實驗可以得知棘海馬並非運用視覺偵測標示物。

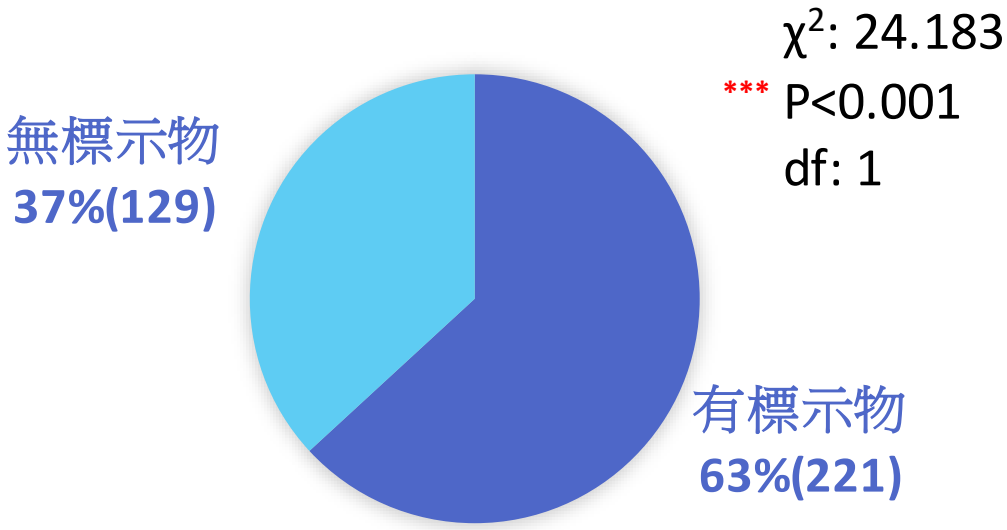
表 5-1 棘海馬利用視覺偵測標示物的選擇結果

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

(二) 【實驗四】標示物是否具有標示效能(嗅覺)：棘海馬會用嗅覺偵測標示物，進而達到標示的目的。

為了確認標示物是否具有標示效能，並探討棘海馬是否以嗅覺感知標示物，本研究對 6 隻棘海馬(2 公 4 母)施作實驗。由圖 5-11 中發現，棘海馬選擇含有標示物的棲枝比例明顯較高。由此可見，棘海馬會傾向攀附附有標示物的棲枝，且棘海馬運用嗅覺來偵測標示物。

棘海馬利用嗅覺偵測標示物的選擇結果



			χ^2	P	df
實驗組	有標示物：221	無標示物：129	24.183	***<0.001	1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	0.003	0.855	1

圖 5-11 確認標示物的標示效能(嗅覺)之實驗組結果。在圓餅圖中，深藍色部分為有標示物的選擇結果；淺藍色部分為沒有標示物的選擇結果。可發現，兩者具有顯著差異(χ^2:24.183, P<0.001)。

(三) 【實驗五、實驗六】排遺物是否具有標示效能：排遺物沒有標示效能。

為了確認排遺物是否具有標示效能。本研究分別對 2 隻棘海馬(1 公 1 母)施作此實驗，累積足夠的重複數。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。由下表 5-2、表 5-3，可以發現棘海馬的排遺物並沒有標示效能。

表 5-2 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
對照組	棲枝一：15	棲枝二：15	0	1	1

表 5-3 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

(四) 【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)。

為了找出標示物標示效能的持續時間，本研究分別對存放 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(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不會因為存放天數有太大的變化。

棘海馬的標示物與排遺物標示效能的長度

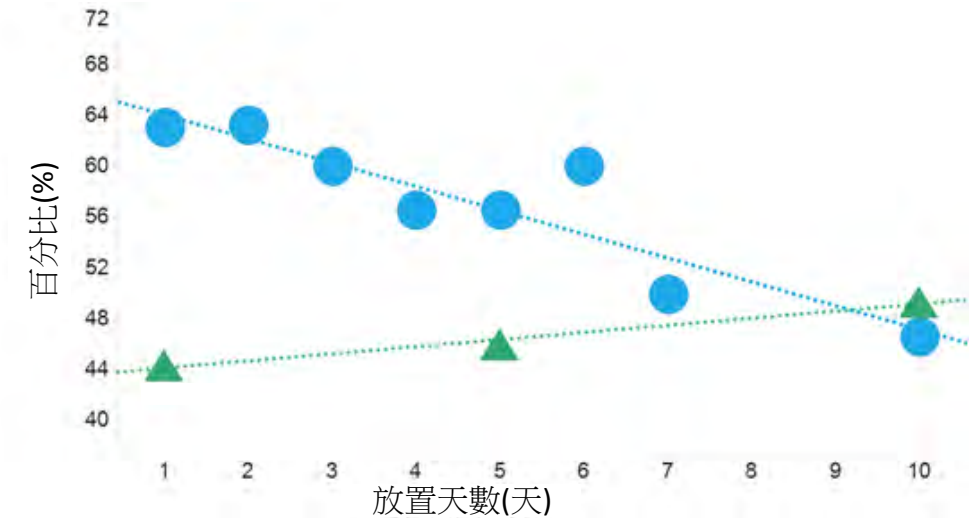
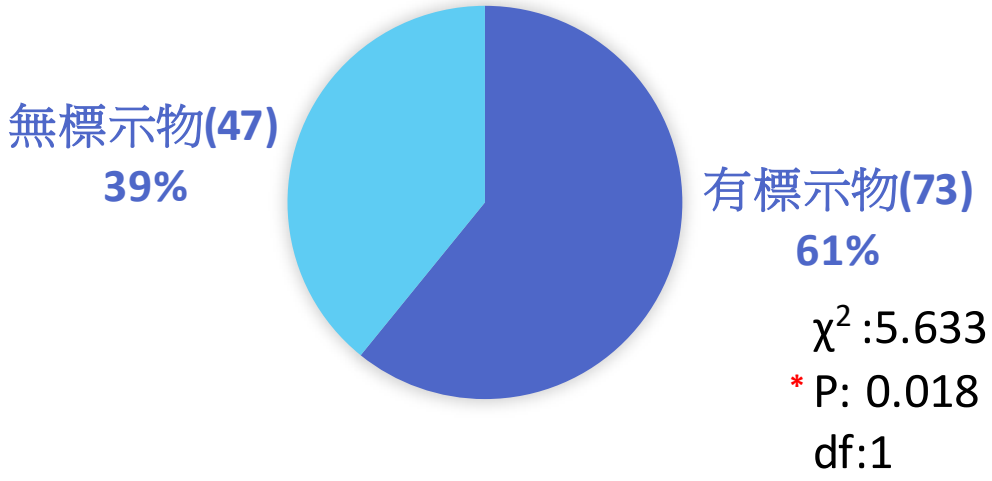


圖 5-12 棘海馬的標示物與排遺物標示效能的長度。圖中每個藍點代表一個標示物的數據點，每個綠三角形為一個排遺物的數據點。橫軸為放置天數，縱軸為選擇有標示物之棲枝的百分比。標示物的標示效能會隨時間漸減(斜率：-0.0188)，呈高度相關(R^2>0.7)，直到 7 天後減至約 50%。排遺物的標示效能則不會因為存放天數有太大的變化，且皆接近 50%。

(五)　【實驗八】標示物中有效物質之成分分析：標示物的有效成分為水溶性，且不具揮發性。

為了瞭解棘海馬標示物有效成分的基本化學性質，本研究利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 5-13、表 5-4、表 5-5。結果顯示，標示物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。

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 5-13 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 5-4 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 5-5 棘海馬標示物經萃取後殘渣的棲枝選擇結果

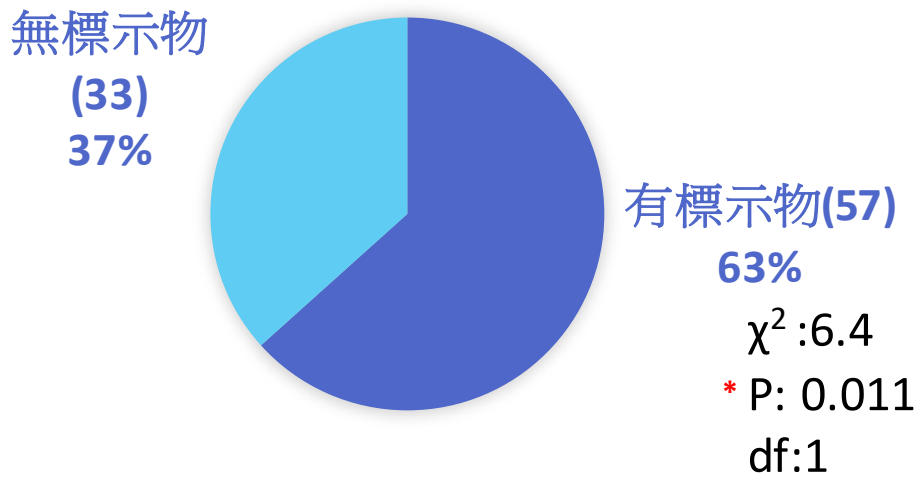
			χ^2	P	df
實驗組	有標示物：28	無標示物：32	0.267	0.606	1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	0.003	0.855	1

(六) 【實驗九】探討標示物的失效原因：標示物經冷藏可延長其標示效能。經萃取並放置 7 天後，乙醚層及殘渣仍不具標示效能，而水層的標示效能也將接近無效。

- 9-1 冷藏 7 天

  為了找出標示物無效的原因，本研究將標示物冷藏 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 5-14。由圖中可發現，標示物冷藏 7 天後，仍具有標示效能。

棘海馬標示物經冷藏 7 天後的棲枝選擇結果



			χ^2	P	df
實驗組	有標示物 57	無標示物：33	6.4	*0.011	1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	0.003	0.855	1

圖 5-14 棘海馬標示物經冷藏 7 天後的棲枝選擇結果。在圓餅圖中，深藍色部分為有冷藏 7 天標示物的選擇結果；淺藍色部分為沒有冷藏 7 天標示物的選擇結果。可發現，兩者具有顯著差異（χ^2: 4.267, P<0.05）。

- 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的水層、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 5-6、表 5-7、表 5-8。由表中可發現，乙醚層及殘渣仍不具標示效能，而水層的標示效能也將接近無效。。

表 5-6 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 5-7 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 5-8 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

(七) 【實驗十】標示物的效能對於同性別、不同性別海馬間的差異：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。

為了進一步探討標示物在棘海馬不同個體之間的效能差異，本研究分別對同性別、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。從數據中可以得知標示物並不會在不同個體之同性棘海馬間產生標示效

能，如表 5-9、表 5-10；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可看出其不產生標示效能，如表 5-11、表 5-12。

表 5-9 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 5-10 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 5-11 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 5-12 標示物在母棘海馬對公棘海馬的標示效能。

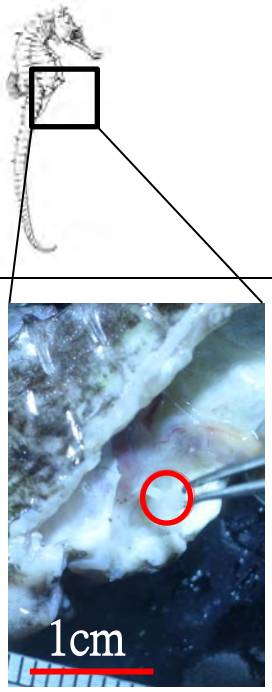
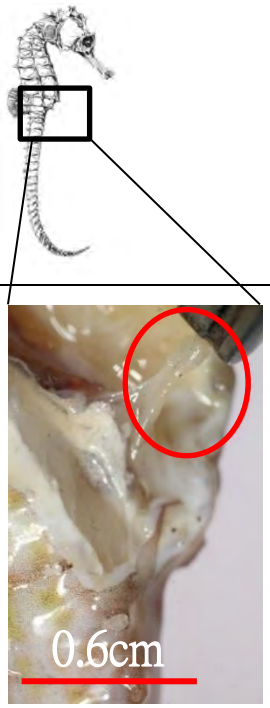
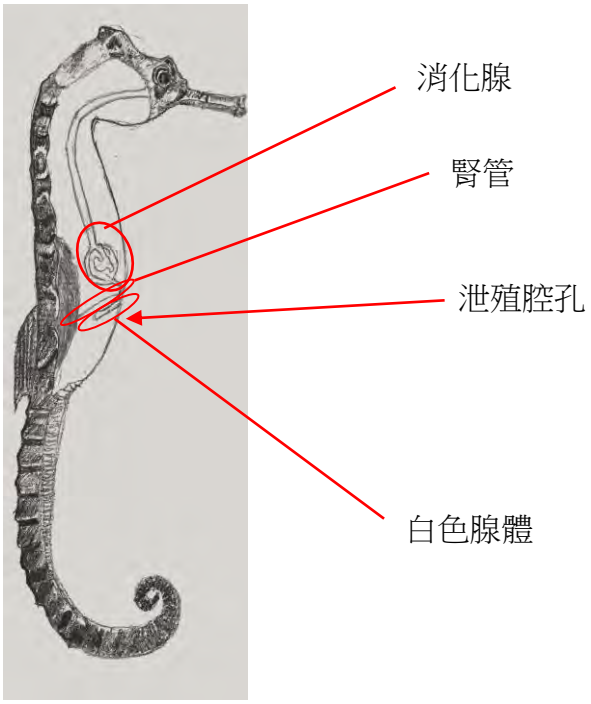
			χ^2	P	df
實驗組	有標示物：14	無標示物：16	0.133	0.715	1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	0.003	0.855	1

三、找出標示物的分泌器官：證實生殖腺為標示物分泌器官。

(一) 【實驗十一】解剖自然死亡之棘海馬：解剖自然死亡之棘海馬後，證實生殖腺為棘海馬標示物的分泌器官。

為了找出標示物的分泌器官，本研究解剖並觀察自然死亡海馬。另外也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 5-15、圖 5-16。

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。

<table>
<tr><td colspan="3">解剖棘海馬</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td><td rowspan="2">
</td></tr>
<tr><td>圖 5-15 公棘海馬體內的白色腺體。</td><td>圖 5-16 母棘海馬體內的白色腺體。</td></tr>
<tr><td colspan="3">圖 5-17 海馬的解剖構造示意圖。</td></tr>
</table>

(二) 【實驗十二】將分泌標示物之器官切片：證實白色腺體為生殖腺，且標示行為與繁殖無關。

為了證實白色腺體為生殖腺，本研究將發現的器官做切片處理。觀察後得知由解剖公母海馬後得到之白色腺體為生殖腺(Piras *et al.* 2015; Selman *et al.* 1991)，實驗結果如圖 5-18、5-19。另外，解剖的樣本死亡時間並非繁殖季(春、夏)(Lourie *et al*, 2004)，所以沒有在切片中發現生殖細胞。但是，這些海馬仍具有標示行為，可證明標示行為與繁殖無關。

海馬生殖腺的切片結果

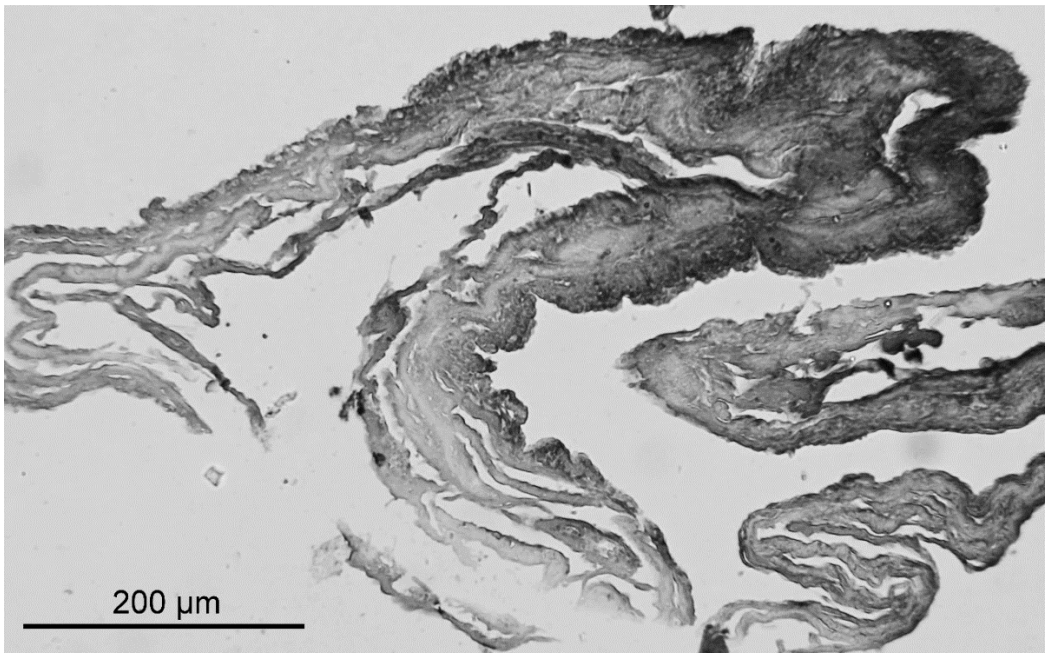


圖 5-18 公海馬生殖腺的切片結果。

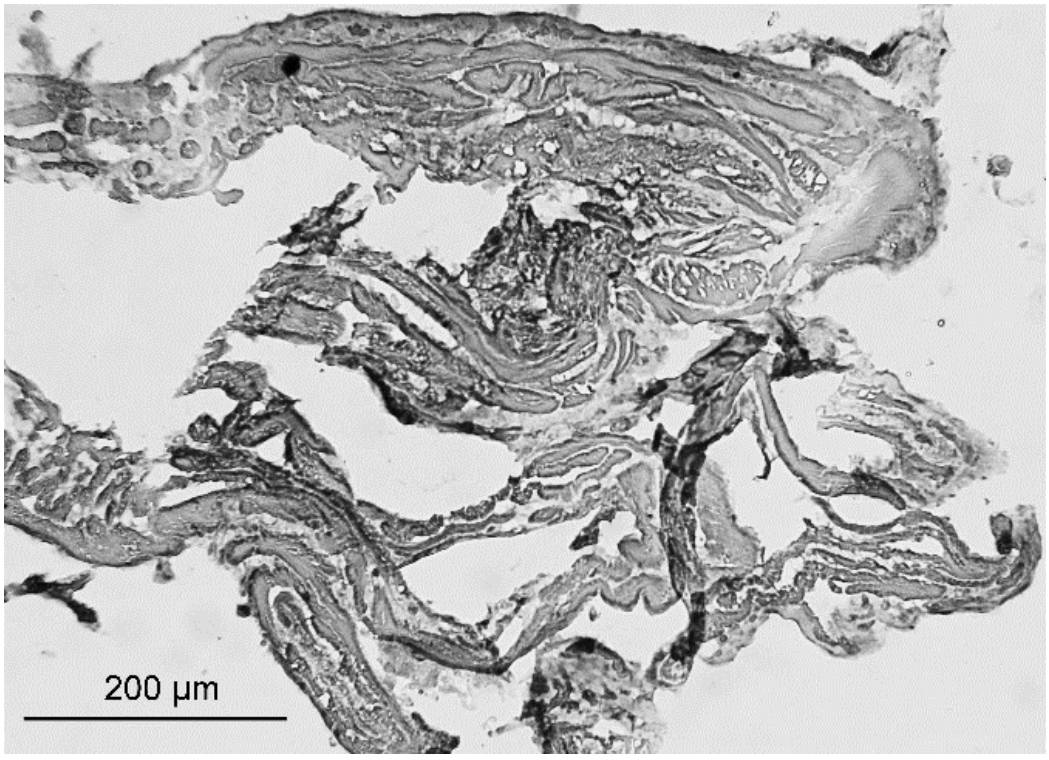


圖 5-19 母海馬生殖腺的切片結果。

陸、討論

一、海馬棲枝標示行為的發現

文獻中提到，海馬具有棲地忠誠性。棲地忠誠性是指生物在繁殖與非繁殖期，皆會傾向於回到先前居住的棲地(Switzer *et al.* 1993)。而本研究更發現，棘海馬具有棲枝標示行為，即其會利用自己排放的標示物氣味幫助自己找到舊有的棲枝。

二、海馬標示行為的特殊性

從文獻中得知，天竺鯛會利用嗅覺偵測自身的化學氣味來回到自己的棲地(Døving *et al.* 2006)。鮭魚則會利用其排遺物中膽鹽的氣味幫助自己辨別同類(Døving *et al.* 1980)。本研究則發現：海馬會獨立排放一種異於排遺物的標示物以標示自己的棲枝。此標示方式與其他海洋魚類利用其排遺物的氣味標示自己的棲地不同；也與陸生生物直接標示在領地上不同，為此類標示行為開啟先例。

三、海馬習性和標示行為的關聯

(一) 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，公母棘海馬之間並沒有明顯差異。推測原因為：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，與文獻中觀察的懷氏海馬不同。

(二) 本研究發現標示物會在水中漂流後黏附於棲枝。因結構複雜的棲枝接觸面積較大，所以較易黏附標示物。查閱文獻後得知結構較密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，標示物的特性支持海馬選擇棲枝的偏好—標示行為會使海馬持續攀附同一結構複雜的棲枝，提高生存優勢。

(三) 經過三十天的觀察之後(2/10~3/9)並未觀察到庫達海馬有任何標示物。由文獻得知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。與文獻中的幼年懷氏海馬棲地忠誠性不高之描述相符。

四、標示行為在野外的意義

(一) 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。而在切片中也發現標本並無性成熟，或其不在繁殖季，但自然死亡前這些海馬仍有標示行為，證實標示行為應與繁殖無關。

(二) 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並不相符。因此可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。

(三) 因為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。

(四) 【實驗八】的結果顯示：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。海馬不會捍衛自己的棲息地(Vincent *et al.* 2005)，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。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並無產生警示的意味。

五、海馬的身體構造

(一) 在【實驗九】中，本研究解剖兩隻棘海馬(1 公 1 母)。根據《脊椎動物學(上) 》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 6-1 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 6-1 棘海馬腸道中的食糜。

六、本實驗中三種不同種海馬的觀察結果比較

表 6-1 本實驗中三種不同種海馬的觀察結果比較

	棘海馬(*H. spinosissimus*)	三斑海馬(*H. trimaculatus*)	庫達海馬(*H. kuda*)
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。	

棘海馬會利用嗅覺感知標示物(χ^2:24.183, P<0.001)，而三斑海馬目前還不確定，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. 實驗組數不足。庫達海馬的部分，目前沒有觀察到標示物，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. 實驗組數不足(目前僅飼養 1 公 1 母)。

七、標示物的失效原因

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中有許多微生物，如圖 6-2。冷藏可減緩微生物分解標示物有效成分的速度，所以我們推測使標示物失效的因素為微生物。

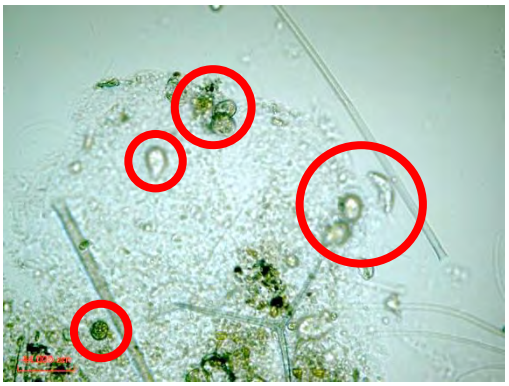


圖 6-2 含有微生物的標示物

柒、 結論

一、棘海馬會排放標示物，且棘海馬傾向停留在有自己標示物的棲枝($P<0.001$)。

二、棘海馬利用嗅覺感知自己的標示物，且此有效成分為水溶性。

三、棘海馬排放標示物的頻率與餌料種類、餵食頻率、排遺頻率皆無關，證明了標示物是一種特定的、與排遺物不同的分泌物。

四、標示物的比重明顯較排遺物小，且具有黏性，可加長其在海中漂流的時間，進而提高附著在海馬所攀附之棲枝的機會。

五、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。

六、公母棘海馬的標示物皆只對自己具有標示效能，而從解剖得知棘海馬分泌標示物的器官為生殖腺，切片也驗證了棘海馬的標示行為與繁殖無關，只與棲枝標示有關。

七、目前已確定棘海馬具有標示行為。三斑海馬疑似有標示行為，而庫達海馬因目前年齡過小，沒有觀察到標示物。

捌、 未來展望

目前確認棘海馬(*H. spinosissimus*)具有棲枝標示行為，且標示行為與繁殖無關。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，但礙於設備與經費，我們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。我們期許在未來臺灣能擁有一塊為海馬而設的野生動物保護區，以在自然環境下觀察海馬，並對已配對的海馬進行實驗，使海馬的棲枝標示行為擁有更完備的描述。

玖、 參考資料及其他

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

二、 Døving, K. B., Stabell, O. B., Östlund-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.

三、 Escobar-Camacho, D., & Carleton, K. L. (2015). Sensory modalities in cichlid fish behavior. *Current opinion in behavioral sciences*, *6*, 115-124.

四、 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.

五、 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.

六、 Lin, Q., Lin, J., & Huang, L. (2010). Effects of light intensity, stocking density and temperature on the air-bubble disease, survivorship and growth of early juvenile seahorse Hippocampus erectus Perry, 1810. *Aquaculture Research*, *42*(1), 91-98.

七、 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*

八、 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*.

九、 Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2013). *Campbell biology*. Pearson Higher Ed.

十、 Roessler, K. Site fidelity and homing abilities in Mediterranean anemonefish G. bucchichi.

十一、 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.

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

十三、 Sweatman, H. (1988). Field evidence that settling coral reef fish larvae detect resident fishes using dissolved chemical cues. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *124*(3), 163-174.

十四、 Switzer, P. V. (1993). Site fidelity in predictable and unpredictable habitats. Evolutionary Ecology, 7(6), 533-555.

十五、 White, G. E., & Brown, C. (2013). Site fidelity and homing behaviour in intertidal fishes. *Marine biology*, *160*(6), 1365-1372.

十六、 楊安峰(1990)・*脊椎動物學(上)*・臺北市：淑馨。

壹拾、附錄

一、野外資深潛水員訪談結果

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】052009

本研究探討棘海馬（*Hippocampus spinosissinus*）之棲枝之選擇及標示。因海馬游泳能力弱所以習慣於棲息固定環境，由泄殖腔孔排放具氨味之黏性標示物，該物為水溶性，於室溫可維持七天，該標示物比重比排遺物小，且與食物無關，並可黏附在棲枝上，該標事務之分泌器官為泄殖腔中之生殖腺，本研究觀察詳實。實驗方法設計完整細膩、富有邏輯層次。統計方法符合科學。以解剖方法推測其管腺管徑與標示物的大小相符，推測生殖腺所以可能為標示物的分泌器官。加以鏡檢輔助排除胃部、腎臟之可能性。背景介紹與討論的內容仔細豐富。建議未來可進一步以分子生物或蛋白質體的方法研究標誌物的組成與差異，以及不同棲地、或不同環境變遷下、壓力下的差異程度。綜合而言，是很優秀具創新性的研究報告。

作品海報

壹、摘要

本研究發現棘海馬(*Hippocampus spinosissimus*)會排放標示物以標記自己的棲枝。海馬因游泳能力弱，所以習慣棲息於固定環境。目前海洋魚類尚未被發現有類似標示行為，但觀察棘海馬發現，其會由泄殖腔孔排放一種標示物。此標示物的氣味能幫助牠們尋找自己的棲枝(χ^2 : 24.183, P<0.001) ，且有效成分為水溶性。標示效能在室溫下可維持約7天，但冷藏可延長其標示效能。它是一種黏液，成分與棘海馬的食物無關，且比重較排遺物小，使其更容易在水中漂流並黏附在棲枝上。標示物的排放週期與餵食、排遺頻率無關。無論性別相同(χ^2 :0, P>0.05)或相異(χ^2 :0, P>0.05)，棘海馬不會傾向攀附附有其他海馬標示物的棲枝。經由解剖和切片觀察，證實標示物的分泌器官為泄殖腔中的生殖腺，但與繁殖無關。

貳、研究動機

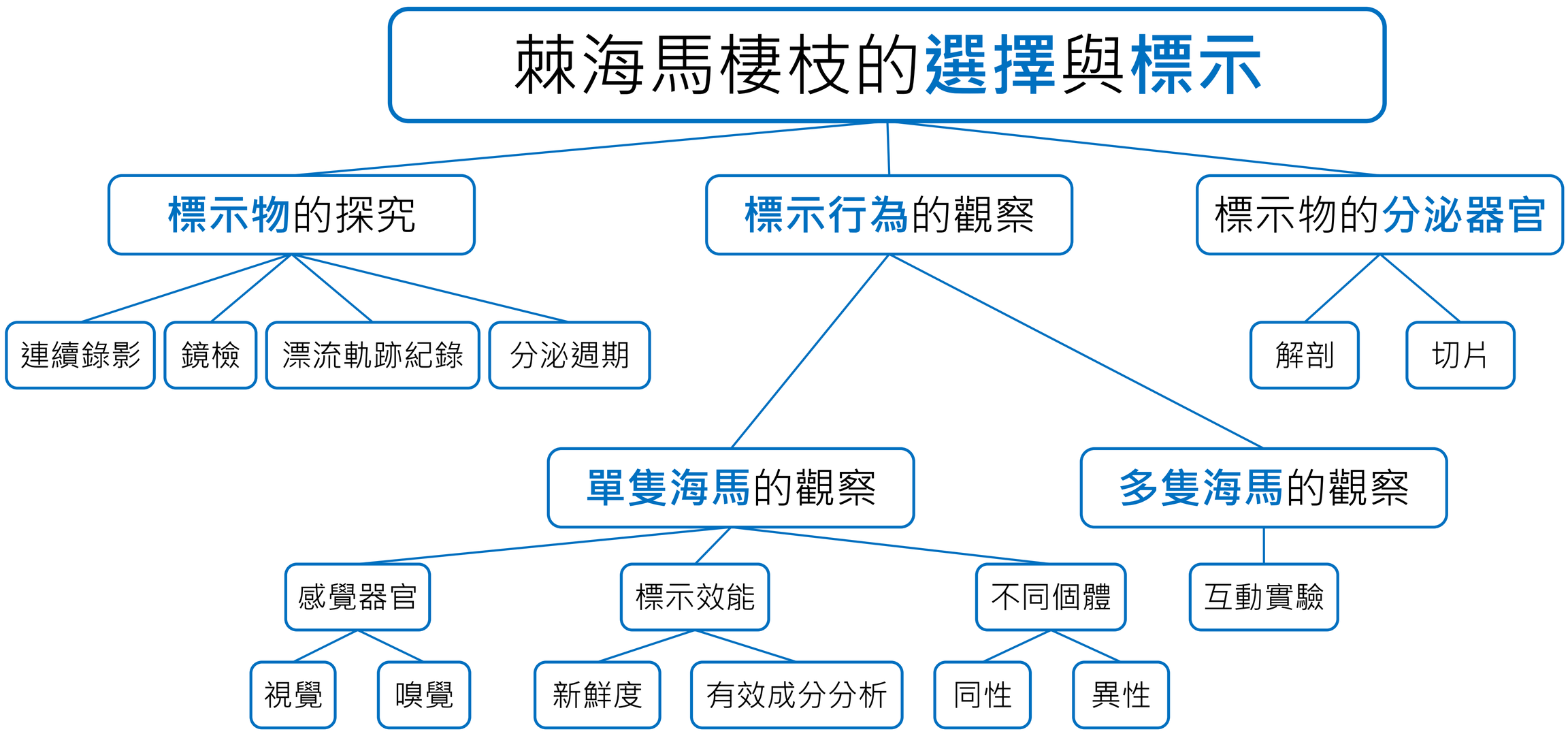
我們在觀察實驗室中的棘海馬後，發現海馬會用善於抓握的尾巴攀附環境中的珊瑚礁、海樹等等。在海馬所纏的棲枝上，我們發現了一些坨狀、疑似是排遺物的東西。 查閱文獻後，發現海馬對野生環境的棲所具有棲地忠誠性。也就是說，海馬會對自己習慣攀附的棲枝具有偏好。這引起了我們的好奇心。

參、研究目的

- **發現棘海馬排放標示物的過程，並分析標示物的特性。**
- **確認標示物的標示效能。**
- **了解棘海馬如何偵測標示物。**
- **分析標示物中可能的有效成分，並推測失效原因。**
- **探討標示物的標示效能的持續時間。**
- **探討標示物對不同個體間效能的差異。**
- **找出棘海馬標示物的分泌器官。**


棘海馬
Hippocampus spinosissimus

肆、實驗流程



【實驗一：了解海馬標示棲枝的方式】：了解標示物如何附著於棲枝上。

【實驗二：探討標示物和排遺物的差異】：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。

【實驗三：標示物是否具有標示效能(視覺)】：探討棘海馬是否會以視覺感知標示物。

【實驗四：標示物是否具有標示效能(嗅覺)】：探討棘海馬是否會以嗅覺感知標示物。

【實驗五：標示物的標示效能持續時間】：證實標示物存放的時間是否會影響其標示效能。

【實驗六：探討標示物的失效原因】：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。

【實驗七：標示物中有效物質之成分分析】：藉由萃取標示物，推測標示物中有效成分之基礎化學性質。

【實驗八：標示物對於不同個體海馬間的效能差異】：探討標示物對於同性別、不同性別海馬間的差異。

【實驗九：互動實驗】：觀察標示物在多隻海馬互動情況下的作用。

【實驗十：解剖自然死亡之棘海馬】：尋找海馬體內與泄殖腔口相連的器官，推測標示物的分泌器官。

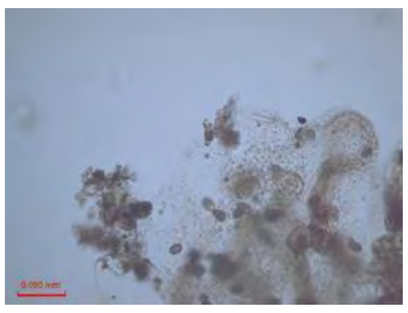
【實驗十一：將分泌標示物之器官切片】：觀察【實驗十】中發現的白色器官組織。

伍、實驗結果

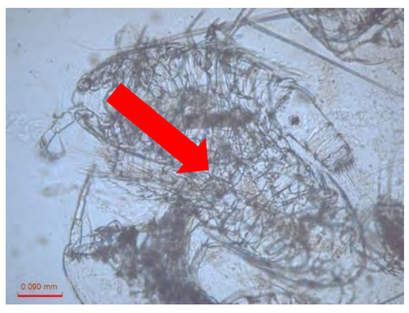
【實驗一：了解海馬標示棲枝的方式】

共紀錄到兩次排遺，以及兩次排放標示物。**標示物由海馬排出後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。**

【實驗二：探討標示物和排遺物的差異】



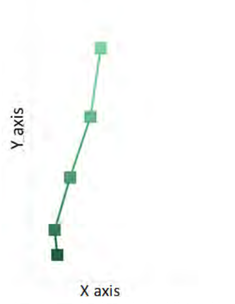
棘海馬餵食黑殼蝦的標示物



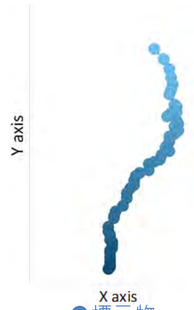
棘海馬餵食黑殼蝦的排遺物

無論食用了黑殼蝦或豐年蝦，**排遺物的結構皆和海馬的食物結構類似，但標示物卻都維持黏液狀。**

燒杯中棘海馬的排遺物和標示物的漂流軌跡圖

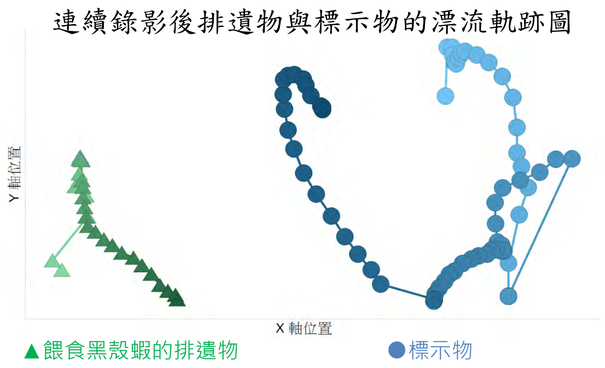


■餵食黑殼蝦後的排遺物 (4秒)



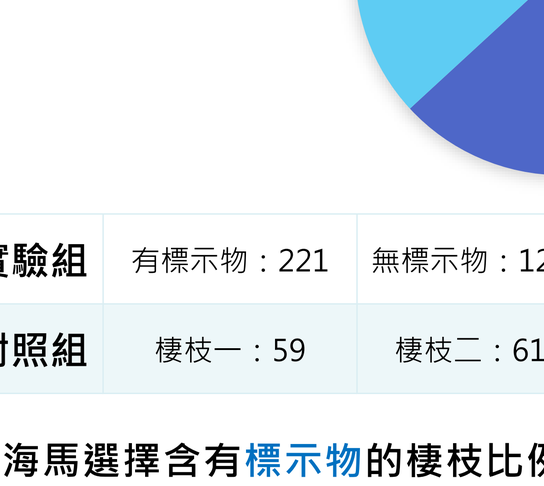
●標示物 (51秒)

連續錄影後排遺物與標示物的漂流軌跡圖



▲餵食黑殼蝦的排遺物 (28秒)

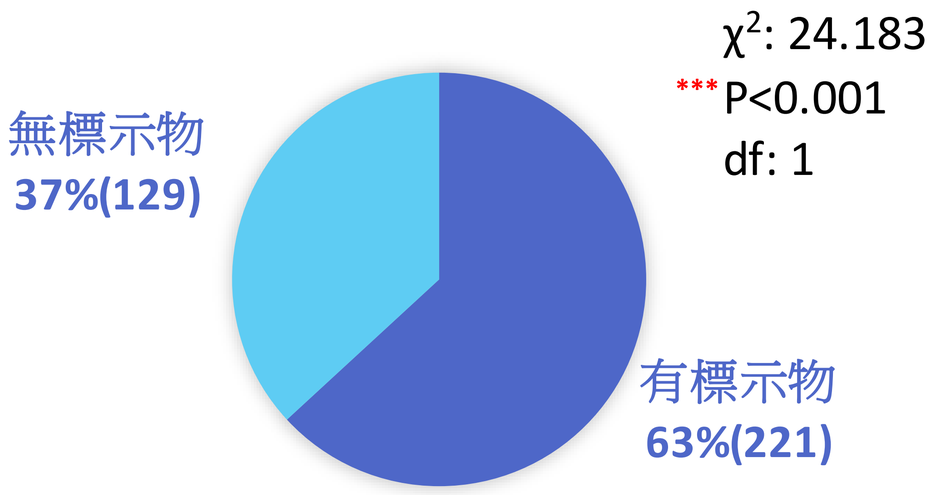
●標示物 (96秒)



餵食頻率對於棘海馬排放排遺物的頻率具有顯著影響，對排放標示物則無。綜合【實驗一】【實驗二】的結果，可以得知**排遺物與標示物為兩種成分、分泌週期完全不同的物質。**

【實驗三、四：標示物是否具有標示效能】

棘海馬利用嗅覺偵測標示物的選擇結果



實驗組	有標示物：221	無標示物：129	χ^2:24.183	P:***<0.001	df:1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	χ^2:0.003	P:0.855	df:1

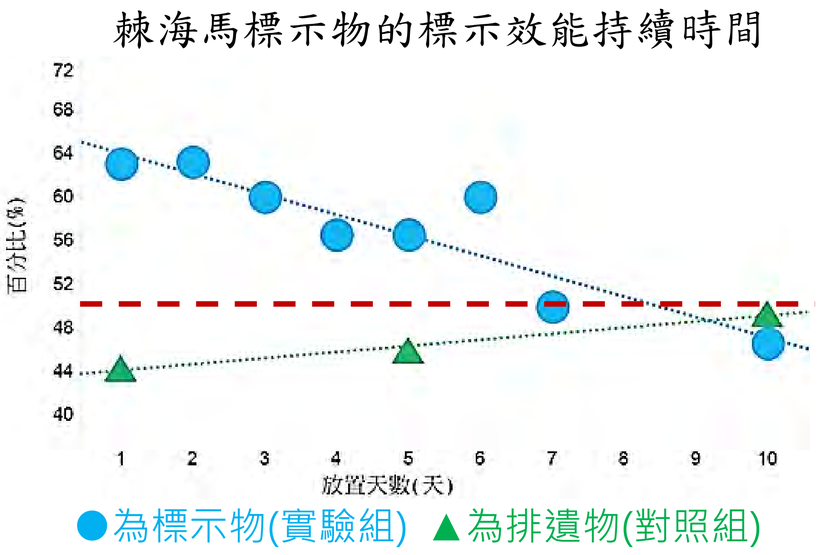
棘海馬選擇含有標示物的棲枝比例明顯較高(χ^2=24.183，P<0.001)，達顯著水準。顯示棘海馬**會用嗅覺偵測標示物**，進而達到標示的目的。

棘海馬利用視覺偵測標示物的選擇結果

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

【實驗五、六：標示物的標示效能持續時間及失效原因】

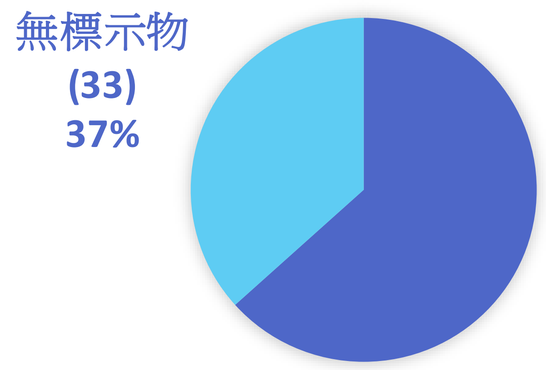
棘海馬標示物的標示效能持續時間



●為標示物(實驗組) ▲為排遺物(對照組)

標示物的效能會隨放置天數下降，**在7天後失去效能**，但**排遺物**的標示效能不因存放天數有明顯的變化。

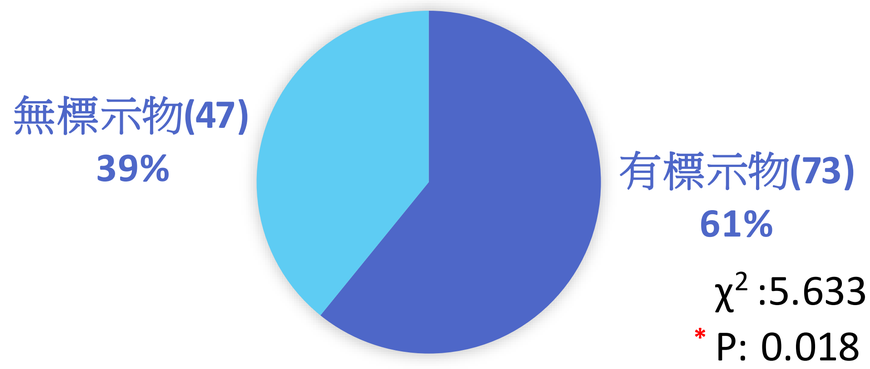
棘海馬標示物經冷藏 7 天後的棲枝選擇結果



實驗組	有標示物 57	無標示物：33	χ^2:6.4	P:*0.011	1
對照組	棲枝一：59	棲枝二：61	χ^2:0.003	P:0.855	1

【實驗七：標示物中有效物質之成分分析】

棘海馬標示物經萃取後水層的棲枝選擇結果



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

【實驗八：標示物對於不同個體海馬間的效能差異】

標示物在不同個體之公棘海馬間的標示效能

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

標示物在不同個體之母棘海馬間的標示效能

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

標示物在公棘海馬對母棘海馬的標示效能

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

標示物在母棘海馬對公棘海馬的標示效能

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

【實驗九：互動實驗】

在兩隻海馬互動的情況下，海馬的個體差異會影響到棲枝的選擇。

同性兩隻海馬互動

	A 海馬先纏(次)	B 海馬先纏(次)
實驗組	11	4
對照組	9	5

χ^2:0.644, P:0.422, df:1

異性兩隻海馬互動

	A 海馬先纏(次)	B 海馬先纏(次)
實驗組	10	5
對照組	12	3

χ^2:1.667, P:0.197, df:1

A 先纏時A與B纏上棲枝之秒差

同性

	平均數	標準差	重複次數(N)
實驗組	32	27.017	11
對照組	42	28.810	9

t:0.8, P:0.434, df:18

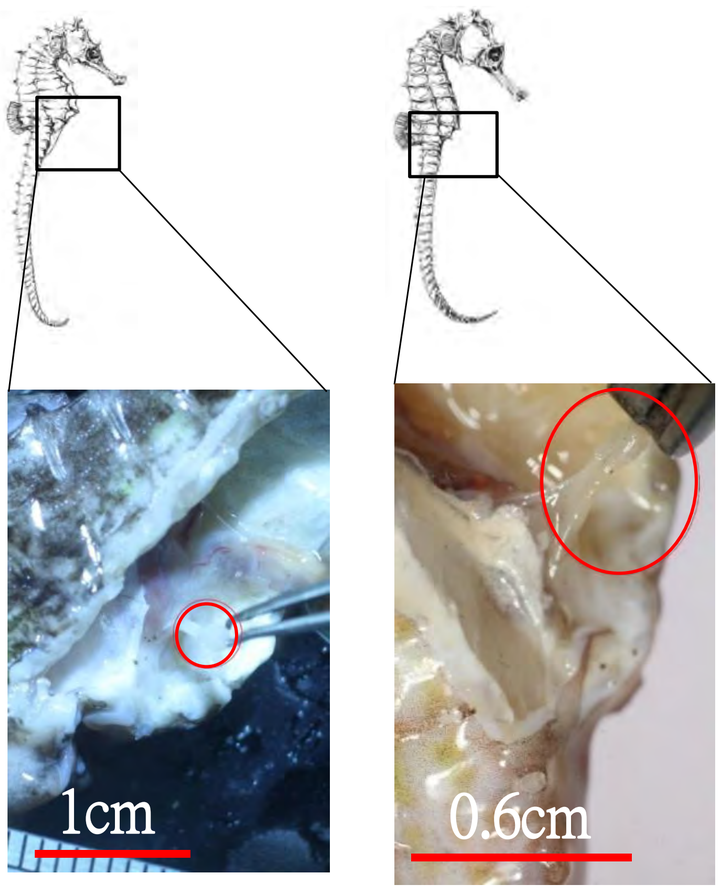
異性

	平均數	標準差	重複次數(N)
實驗組	17	15.394	10
對照組	45.167	59.084	12

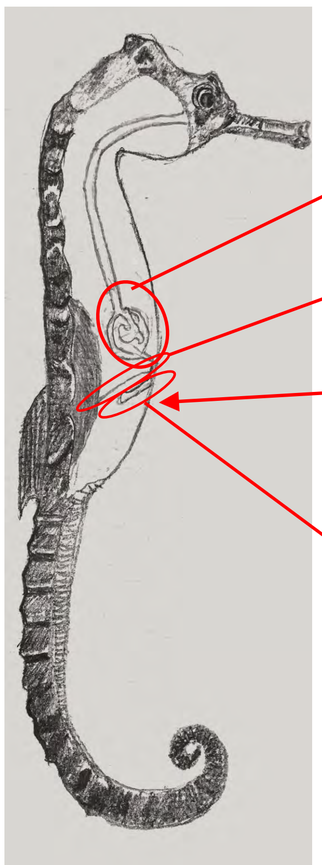
t:1.461, P:0.16, df:20

【實驗十、十一：證明分泌標示物之器官為生殖腺】

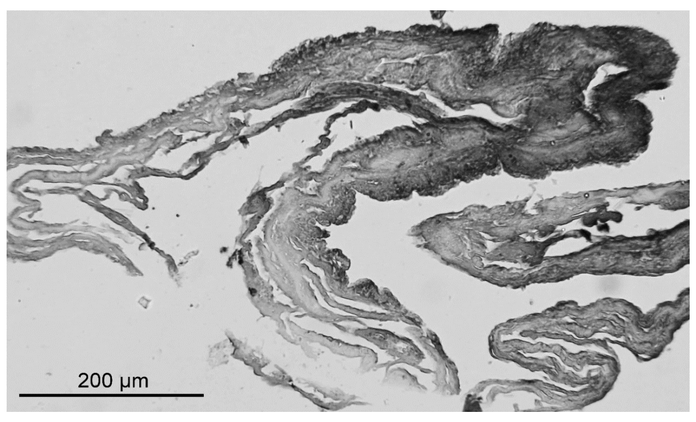
棘海馬的泄殖腔解剖與示意圖



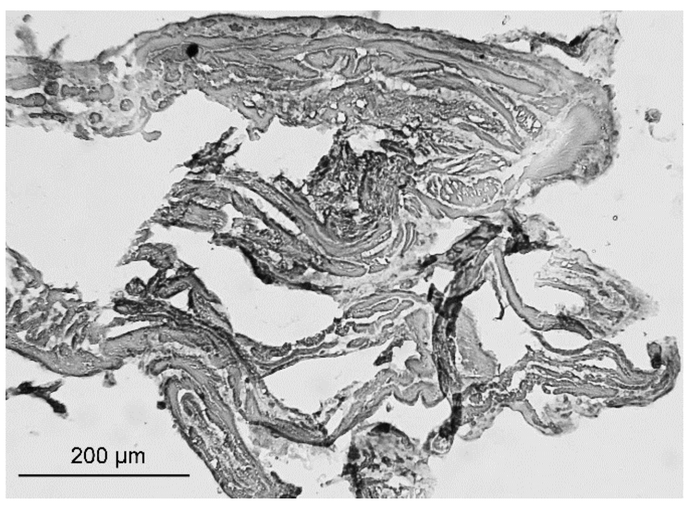
公棘海馬　　母棘海馬



棘海馬的生殖腺切片結果



公棘海馬



母棘海馬

陸、討論

一、海馬領地標示行為的發現

文獻中提到，海馬具有棲地忠誠性。棲地忠誠性是指生物在繁殖與非繁殖期，皆會傾向於回到先前居住的棲地(Switzer *et al.* 1993)。而本研究更發現，棘海馬具有**棲枝標示行為**，即其會利用**自己排放的標示物氣味幫助自己找到舊有的棲枝**。

二、海馬標示行為的特殊性

從文獻中得知，天竺鯛會利用嗅覺偵測自身的化學氣味來回到自己的棲地(Døving *et al.* 2006)，但論文中並沒有直接證明此化學氣味來自何種分泌物，也沒有找出此分泌物的分泌器官。而我們的研究解開了這個謎題—**海馬會從生殖腺排放一種標示物，而此標示物的有效成分為水溶性的物質。海馬會利用嗅覺感知此標示物的氣味，進而表現棲地忠誠性。**

三、訪談潛水員結果與互動實驗之關聯

訪談結果發現，墾丁合界海域會有多隻長棘海馬輪流使用同一支棲枝的情形。而我們從多隻海馬互動的實驗結果得知，在兩隻海馬的情況，標示物並不會顯著地影響海馬對棲枝的選擇，個體差異則會。此結果與野外觀察之現象相符。

柒、結論

1. 棘海馬排放標示物的頻率與餌料種類、餵食頻率、排遺頻率皆無關，證明了標示物是一種特定的、與排遺物不同的分泌物。
2. 標示物的比重明顯較排遺物小，且具有黏性，可加長其在海中漂流的時間，進而提高附著在海馬所攀附之棲枝的機會。
3. 棘海馬利用嗅覺感知自己的標示物，且此有效成分為水溶性。
4. 棘海馬會排放標示物，且棘海馬傾向停留在有自己標示物的棲枝(**$P<0.001$**)。
5. 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。
6. 公母棘海馬的標示物皆只對自己具有標示效能。
7. 從解剖得知棘海馬分泌標示物的器官為生殖腺，切片也驗證了棘海馬的標示行為與繁殖無關，只與棲枝標示有關。

1. Døving, K. B., Selset, R., & Thommesen, G. (1980). Olfactory sensitivity to bile acids in salmonid fishes. *Acta Physiologica, 108*(2), 123-131.
2. Døving, K. B., Stabell, O. B., Östlund-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.
3. Escobar-Camacho, D., & Carleton, K. L. (2015). Sensory modalities in cichlid fish behavior. *Current opinion in behavioral sciences*, *6*, 115-124.
4. 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.
5. 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.
6. Lin, Q., Lin, J., & Huang, L. (2010). Effects of light intensity, stocking density and temperature on the air-bubble disease, survivorship and growth of early juvenile seahorse Hippocampus erectus Perry, 1810. *Aquaculture Research*, *42*(1), 91-98.
7. 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*
8. 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*.
9. Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2013). *Campbell biology*. Pearson Higher Ed.
10. Roessler, K. Site fidelity and homing abilities in Mediterranean anemonefish G. bucchichi.
11. 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.
12. Selman, K., Wallace, R. A., & Player, D. (1991). Ovary of the seahorse, Hippocampus erectus. *Journal of morphology*, *209*(3), 285-304.
13. Sweatman, H. (1988). Field evidence that settling coral reef fish larvae detect resident fishes using dissolved chemical cues. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *124*(3), 163-174.
14. Switzer, P. V. (1993). Site fidelity in predictable and unpredictable habitats. Evolutionary Ecology, 7(6), 533-555.
15. White, G. E., & Brown, C. (2013). Site fidelity and homing behaviour in intertidal fishes. *Marine biology*, *160*(6), 1365-1372.
16. 楊安峰(1990)• *脊椎動物學(上)*•臺北市：淑馨。