

人工催熟過程九孔血淋巴係數的變化

許晉榮、劉君誠

水產試驗所海水繁養殖研究中心

前言

九孔的養殖在台灣已超過 30 年，養殖地區涵蓋台灣南部、東北部、東部及澎湖等地(黃，1999)，目前多半利用陸上立體式箱網進行養殖，人工繁殖及成貝的育成技術已趨成熟。九孔的繁殖季因地區不同略有差異，大致為每年的 10—12 月及次年 3—5 月(楊，2006)。在繁殖季時，漁民會挑選性腺成熟度較高的親貝來進行人工繁殖，之前的實驗已經證明 2 齡種貝的免疫力及生殖力較佳，由親方效應 (parental effect) 來考量，是屬於較好的親貝(許等，2005；許，2008)，而曾等(2008)的研究也建議適當的選用野生親貝配種，可以降低養殖場因近親繁殖導致的基因窄化現象。

鮑類的人工催熟方法包括添加過氧化氫浸泡法、紫外線照射法及變溫刺激法等(曾，1999；李等，2004)，其中對於九孔，根據業界及研究人員多年來的經驗，仍以乾曬及變溫刺激的組合最為有效(曾，1999)。但這種方法在施行上，包括對種貝的曝曬及溫度上下震盪等物理性刺激，也會對九孔本身產生很大的緊迫，以致催熟過後的種貝經常會有較高的死亡率。之前曾經有學者建議採取較緩和的溫差方法來降低九孔種貝的緊迫反應(翁及蘇，2005)，不過對於種貝在催熟過程中，體內生理反應的變化為何？免疫

反應會受到抑制或激活？截至目前，仍未有人進行過詳細調查。本實驗乃針對此，對催熟過程中及之後的親貝進行採樣，調查血淋巴液中生理及免疫指標，以了解其變化。

材料及方法

本實驗是在 2009 年 2 月進行，所使用之九孔為本所海水繁養殖研究中心自行培育的 2 齡種貝。為避免性別不同干擾實驗結果，所採用九孔均為雄貝，體重及殼長分別為 20.61 ± 0.90 g 與 54.62 ± 0.72 mm。供試之九孔先在室內海水循環池馴化約 2 周後進行實驗，循環池海水鹽度 33—34 psu，水溫 21—23℃，餵食之餌料為龍鬚菜。

實驗開始於早上 08:20，先隨機選取 12 粒九孔，抽取血淋巴液，當作起始對照組(I)。人工催熟方法依楊及陳(1979)之溫度刺激法，先將挑選好的 80 粒種貝外殼略加清洗後，移至陽光下，腹部朝上進行曝曬，此時氣溫約 29—30℃，照度為 34—37 Klux。待九孔曝曬至腹足略為轉黑，身體活動減少後，移入室內，整個過程約耗時 15 分鐘。由其中隨機選取 12 粒九孔作為曝曬組(E)，抽取血淋巴液。移入室內之九孔分置於 3 個 25 L 的塑膠桶內，內含紫外線光照射過之過濾海水 20 L，水溫約 22℃。以桶內的加溫棒逐漸加溫，4 小時後，水溫上升至 28℃。再隨機

自三桶中各選取 4 粒，共 12 粒九孔，抽取血淋巴液，為加溫組(W)。之後，加溫棒停止加溫，以冷氣及電扇降低水溫，約在 2.5–3 小時後，九孔開始產精，此時水溫約 23–24 °C，再自三桶中隨機採樣 4 粒，共 12 粒九孔，當作降溫組(C)，至此人工催熟過程結束。催熟結束之後，將剩餘之三桶九孔重新隨機分組，置入兩個箱網內，放回原水池蓄養，經第 24 與 72 小時後，再由其中一個箱網隨機選取 12 粒九孔採樣，為催熟實驗後第 1、3 天採樣組 (AD1, 3)。

九孔血淋巴液抽取後，在 4°C 下以 5,000 g，離心 15 分鐘後，取上清液，冷凍於 -85°C 中，進行血糖、蛋白質、滲透壓、血青素 (hemocyanin)、酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 及超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性的分析。各種指數分析方法見 Wu et al. (2006) 及許 (2008)。

結果與討論

圖 1 顯示九孔在人工催熟過程及實驗後第 1、3 天的血糖、蛋白質、血青素及滲透壓值變化。九孔在陽光下曝曬後，血糖值由起始之 0.45 mmol/L 升至 0.63 mmol/L，放入水桶中緩慢加溫後 4 小時，血糖值逐漸下降，最低值為 0.39 mmol/L，顯著低於曝曬組 ($p < 0.05$)；而後血糖又逐漸上升，在催熟實驗後第 1 天到達另一個高峰 0.63 mmol/L，之後再下降至 0.52 mmol/L。其它 3 組指標雖然在不同時間沒有出現顯著變化 ($p > 0.05$)，但仍以

曝曬組或催熟後第 1 天的數值較高。

圖 2 則是各時間點九孔血淋巴液中免疫酵素指標的變化，各指標在不同時間出現顯著變化者僅有鹼性磷酸酶 ($p < 0.05$)。鹼性磷酸酶的數據在人工催熟的各組 (曝曬、加溫及降溫組) 都比起始及實驗後組高，其中最高值出現在加溫組的 1.32 U/L，是起始組及實驗後組的兩倍左右。類似的情形並沒有出現在其它三種免疫酵素，在超氧歧化酶，反而起始組 (49.6 U/mL) 及實驗後第 1 天 (43.2 U/mL) 的數據還比人工催熟的 3 組 (33.4–35.5 U/mL) 高。

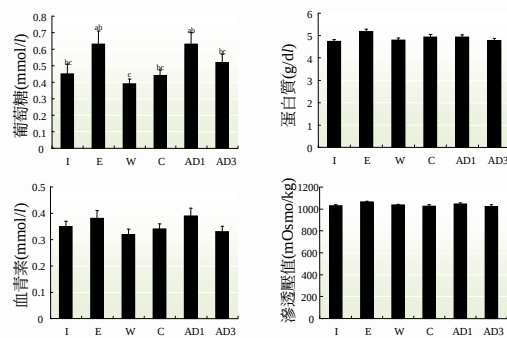


圖 1 在人工催熟階段前、中、後期的九孔雄種貝，血淋巴液中的葡萄糖、蛋白質、血青素及滲透壓值的變化。I：起始對照組；E：曝曬組；W：加溫組；C：降溫組；AD1, 3：催熟實驗後第 1、3 天採樣組 (圖上的不同字母代表有顯著差異($p < 0.05$))

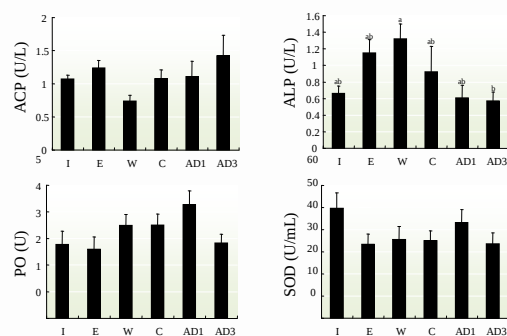


圖 2 在人工催熟階段前、中、後期的九孔雄種貝，血淋巴液中酸性磷酸酶、鹼性磷酸酶、酚氧化酶及超氧歧化酶活性變化 (圖上的不同字母代表有顯著差異($p < 0.05$))

之前的活貝運送實驗顯示，九孔暴露在空氣中，即便是保持運送容器內的潮溼，血糖值仍會升高 (Wu et al., 2006; 許等, 2008)。本實驗的曝曬過程讓九孔完全裸露在日光下，雖然時間僅約 15 分鐘，但對九孔而言，顯然仍是一個較大的緊迫，因此血糖明顯上升。當九孔被放回水桶後，雖有溫度刺激法的處理，但可能因為溫度的變化較為緩和，並沒有對九孔造成太大的緊迫，因此上升的血糖又逐漸下降；達到最低溫時的種貝，剛開始進行產精後不久即進行採樣，此時所採之血糖值尚未發現升高。可是九孔在移回原水池內的箱網時，產精過程仍持續，要到回復後第 1 天下午才完全停止，此時血糖的上升可能是因九孔產精過程需要體內肝醣分解，產生血糖提供能量所致。Kubokawa et al. (1999) 指出，野生虹鱒 (*Onchorynchus nerka*) 排精、卵及產精、卵的過程同樣也會使其血糖值上升，此可能與生殖季時的荷爾蒙，如可體松的升高有關。Vosloo and Vosloo (2006) 發現，長時間的乾式運輸法，會導致鮑魚體內的水分經由蒸發及產生黏液而流失，血淋巴液中的離子值會上升，由本實驗來看，短時間的曝曬並未讓九孔的血中滲透壓值及蛋白質值產生顯著變化。

雖然一些環境因子、疾病、免疫促進物質、種貝年齡及來源等對於鮑類免疫力的影響已被報導 (e.g., 張等, 2005; 王, 2005; Hooper et al., 2007; 許, 2008)，但有關鮑類在生殖過程前、後免疫力的研究似乎仍不多見。太平洋牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 產下配子後，會造成血中噬菌能力、血球密度及抗菌蛋白質總量下降 (Ishikawa et al., 1999;

Cho and Jeong, 2005; Li et al., 2009)，此顯示種貝的免疫力會因為生殖行為而下降，而這可能是造成牡蠣種貝在夏天產下配子後有較高死亡率的原因 (Cho and Jeong, 2005; Li et al., 2009)。因為生殖季而導致免疫力下降的情形也見於澳洲石牡蠣 (*Saccostrea glomerata*) (Peters and Raftos, 2003)、貽貝 (*Mytilus edulis* 及 *M. trossulus*) (Cartier et al., 2004)、蛤仔 (*Venerupis philippinarum*) (Soudant et al., 2004) 等雙殼貝。鮑類也有類似的狀況，歐洲鮑 (*H. tuberculata*) 在夏季生殖季時，同樣因為免疫力下降，以致於無力對抗弧菌等病原的感染，而出現夏季死亡潮的現象 (Travers et al., 2008)。由筆者過去多年的人工繁殖經驗，的確顯示經過人工催熟過後的九孔種貝通常會有較高的死亡率。由本實驗的數據來看，九孔種貝淋巴液中的四種免疫酵素的活性，僅有鹼性磷酸酶出現顯著下降，因此尚無法確認，人工催熟所造成的短期緊迫，對於九孔種貝的免疫力產生明顯的抑制；但由九孔血糖變化的情形來判斷，種貝儲存的能量在此刻應該有所耗損。由九孔週年血淋巴免疫指標的變化發現，在秋、冬低溫生殖季時的種貝，血中免疫指標活性，包括免疫酵素，都較非生殖季者低。低溫時正是疱疹樣病毒 (herpes-like virus) 盛行的時候，此病毒已被證明會攻擊九孔 (Chang et al., 2005)，如果人工催熟過程本身也會造成九孔種貝免疫力下降與能量耗損，則這兩個長期性 (週年性變化) 與短期性 (催熟緊迫) 因素的總和影響，可能就是使得人工催熟後的九孔種貝有較高死亡率的主要原因之一。