

ISSN 1018 - 7324
GPN 2008200207

水產研究

**JOURNAL OF
TAIWAN FISHERIES RESEARCH**

Vol. 31 No.1 / October 2023



農業部水產試驗所
Fisheries Research Institute, MOA

水產研究

出 版 者：農業部水產試驗所

發 行 人：張錦宜

總 編 輯：葉信明

管理編輯：蔡惠萍、曾振德

諮詢委員：丘臺生、李國添、吳金冽、胡興華、孫璐西、郭光雄、許建宗

黃登福、陳瑤湖、陳宏遠、張清風、張水鍇、廖一久、劉錫江

蔡懷楨、鄭森雄、鄭明修、蕭錫延、蕭泉源、蘇偉成、蘇茂森

編輯委員：吳豐成、何源興、翁進興、許晉榮、曾福生、張可揚、楊順德、蔡慧君、謝恆毅

(皆依姓氏筆劃排列)

執行編輯：吳美錚、陳威克

本刊連絡處：

基隆市 202 和一路199號 農業部水產試驗所 水產研究執行編輯

電 話：(02) 2462-2101 轉 2506 或 2517

傳 真：(02) 2462-4627

E-mail：mcwu@mail.tfrin.gov.tw / wkchen@mail.tfrin.gov.tw

本刊刊登本所同仁研究成果，非經本所同意，不得重製、數位化或轉載

JOURNAL OF TAIWAN FISHERIES RESEARCH

Published by *Fisheries Research Institute, Ministry of Agriculture*

Publisher: *Chin-I Chang*

Editor-in-Chief: *Hsin-Ming Yeh*

Managing Editors: *Hui-Ping Tsai, Chen-Te Tseng*

Advisory Board: *Ching-Fong Chang, Shui-Kai Chang, Hounq-Yuan Chen, Yew-Hu Chien, Tai-Sheng Chiu,*

Chien-Chung Hsu, Sing-Hwa Hu, Deng-Fwu Hwang, Lucy Sun Hwang, Ming-Shiou Jeng,

Sen-Shyong Jeng, Guang-Hsiung Kuo, Kuo-Tien Lee, I-Chiu Liao, Hsi-Chiang Liu,

Chyuan-Yuan Shiau, Shi-Yen Shiau, Huai-Jen Tsai, Mao-Sen Su, Wei-Cheng Su, Jen-Leih Wu

Editorial Board: *Ke-Yang Chang, Huey-Jine Chai, Yuan-Shing Ho, Jinn-Rong Hseu, Hernyi Justin Hsieh,*

Fu-Seng Tseng, Jinn-Shing Weng Feng-Cheng Wu, Shuenn-Der Yang

(in alphabetical order)

Executive Editors: *Mei-Chen Wu, Wei-Ke Chen*

The Journal of Taiwan Fisheries Research contains scientific contributions from colleagues of Fisheries Research Institute, Ministry of Agriculture (MOA) and researchers of fisheries science. It is published by Fisheries Research Institute, MOA. Correspondence should be addressed to the Editor-in-Chief, Journal of Taiwan Fisheries Research, 199 Hou-Ih Road, Keelung 202, Taiwan. Phone: +886-2-2462-2101 ext. 2506 or 2517. Fax: +886-2-2462-4627. E-mail: mcwu@mail.tfrin.gov.tw or wkchen@mail.tfrin.gov.tw.

目 次

利用 RAPD 探討九孔 (*Haliotis diversicolor*) 歷年遺傳變異之變化 / 杜金蓮 · 朱惠真 · 王姿文 · 黃奕瑄 · 游蓁 · 曾福生

Using Random Amplified Polymorphic DNA to Study Historical Genetic Variation in the Abalone (*Haliotis diversicolor*) / Jin-Lien Du, Huei-Jen Ju, Zi-Wen Wang, Yi-Hsuan Huang, Chen Yu and Fu-Sheng Tseng

.....1

四指馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 魚苗袋裝運輸 – 最適撈捕體型、密度及其水質變化之探討 / 邱沛盛 · 朱永桐 · 張丁仁 · 黃建維 · 張哲誠 · 許晉榮

Live-bag Ttransportation of Juvenile Fourfinger Threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*): an Investigation of Handling Size, Packing Density, and Water-quality Variation / Pei-Sheng Chiu, Yeong-Torng Chu, Ting-Jeng Chang, Jian-Wei Huang, Che-Cheng Chang, and Jinn-Rong Hseu

.....13

以物種專一性引子建立擬球藻與綠球藻快速辨識技術 / 蘇義哲 · 許自研 · 利淑如 · 王淑欣 · 陳陽德 · 吳豐成

Rapid Identification Technology for *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. with Species-specific Primer / Yi-Che Su, Zi-Yan Xu, Shu-Ju Li, Sui-Sin Wang, Yang-De Chen and Feng-Cheng Wu

.....23

鱸鰻鰻苗細菌性口服疫苗開發研究 / 邱俊豪 · 李國誥 · 劉秉忠

The Development of Oral Bacterial Vaccines for Juvenile Marbled Eels (*Anguilla marmorata*) / Jung-Hau Chiou, Kuo-Kau Lee and Ping-Chung Liu

.....37

利用 RAPD 探討九孔 (*Haliotis diversicolor*) 歷年遺傳變異之變化

杜金蓮* · 朱惠真 · 王姿文 · 黃奕瑄 · 游蓁 · 曾福生

農業部水產試驗所水產養殖組

摘 要

九孔 (*Haliotis diversicolor*) 為臺灣極具特色之養殖物種，本研究以 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技術，針對 P3 基因座樣態，比較歷年 (2008-2021) 採集之九孔的遺傳變異變化。結果顯示，早期採集的野生九孔具有 8 - 12 條多型性擴增帶，主要落於 0.1 - 1.0 kb 之間，而養殖九孔之多型性擴增帶則以 1.0、0.8 及 0.65 kb 為主，且部分樣本出現條帶之深淺差異及遺漏狀況，顯示經過長期之人為選配，養殖九孔有遺傳變異與存活率降低之現象。為改善育成苗存活率不佳之問題，產業界開始引入其他地理群之種貝進行配種，證實透過雜交來提高物種的遺傳變異，確實有助於強化生物體適應外界多變環境之能力；然而近年來所採集之九孔樣本又逐漸出現基因多樣性降低，呈現遺傳變異同質性之趨勢。根據本研究追蹤結果顯示，人為選育確實會造成九孔遺傳變異降低，透過選擇差異度較高的種貝進行雜交雖可改善，但更重要的是，這些高遺傳變異種貝的保種、選育與管理。另外，為使養殖生物具備優良的養殖性狀 (成長、耐寒、抗熱等)，如何維持雜交種的優勢也是關鍵因素。

關鍵詞：九孔、*Haliotis diversicolor*、遺傳變異、隨機擴增多態性 DNA

前 言

隨機擴增多態性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析是利用逢機的 10 個核苷酸序列組為引子，進行生物體基因體之 PCR 擴增，以產生不同大小片段之 DNA 條帶，優點為操作簡單、快速、有效率且花費少，RAPD 屬於分子標誌的一種，此技術除了已廣泛應用於各生物領域 (動物、植物及微生物) 之遺傳多樣性監測、族群結構分析、遺傳距離、物種鑑定，以及建立遺傳圖譜等，亦大量應用於種群遺傳學、分類學、物種鑑定、系統發育評估和瀕危物種的管理等領域 (Ray *et al.*, 2022)。在水產養殖已有應用於評估 *Mugil cephalus*、*Liza ramad* 和 *Valamugil seheli* 等鰱科 (Mugilidae) 魚類的遺傳分化與系統發育關聯分析 (Hassanien *et al.*, 2020) 與吳郭魚的遺傳多樣性、遺傳變異、遺傳評估、區分地理群等相關分析等 (Al-Khafaji *et al.*, 2019; Mahboob *et al.*, 2019; Megbowon,

2019; Omer *et al.*, 2020; Parvez *et al.*, 2021)。近年，Malina *et al.* (2021) 以 RAPD 發展基因分型技術進行東南亞的金目鱸 (*Lates calcarifer*) 種群分析，結果可應用於野生金目鱸之種群管理與後續保護策略。另於淡水長臂大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 之選擇性育種研究中，亦應用建立之 RAPD 技術分析不同家系之生長和抗病性狀的遺傳變異 (Patra *et al.*, 2015)。雖然 RAPD 技術甚為便捷，但進行分析之前必須耗費相當多的時間篩選適用引子 (賴等, 2010)；曾等 (2008) 之研究亦敘明，在大量篩選適用引子與確認受檢測之樣本新鮮度之前提下，RAPD 方可應用於分析、追蹤遺傳歧異度或親緣鑑定等相關研究，併成兼具效率性及正確性之便捷工具。

基因歧異度又稱基因多樣性或遺傳歧異度，Nei 在 70 年代即對基因歧異度下定義：「由一族群中逢機選取的兩個交替基因 (alleles) 為相異的機率 (the probability that two alleles taken at random within a population are different)」(Nei, 1973)；族群中的每一個體 (基因體) 之不同的遺傳組合便可展現不同的性狀，族群中所有生物個體的基因總合即為此族群之基因庫 (gene pool)。當此族群的個體數

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02)2463-3101;
轉 2818; FAX: (02) 2462-8138; E-mail:
jlidu@mail.tfrin.gov.tw

愈多，通常也代表此族群的基因庫愈大，相對的基因歧異度也愈大；而基因歧異度之增加，將使同種內的個體差異性增加，也將使此群體對環境改變的適應力變大，增加生存機會；遺傳變異主要源於基因突變、基因重組和染色體變異等因素（童和李，2009）。

九孔為臺灣重要的養殖種類之一，屬暖水性物種，棲息水溫為 22 – 26 °C，最適鹽度為 30 – 34 psu，喜好深度為 3 – 10 m，種苗年產量曾達 2 – 3 億粒，成貝年產量、值將近 2,500 mt、新臺幣 20 億元。臺灣的九孔養殖於 1960 年代就已開始人工育苗及養殖（郭，2013），其養殖歷史摘錄如下：(1)1970 年代：在臺灣東北部之潮間帶開挖養殖池，利用潮汐漲退進行九孔養殖，產量約 38 mt。1983 年，政府明令禁止開發新的潮間帶養殖池，惟原有已開發的九孔海底養殖池設施仍可維護使用；(2)1986 – 2001 年：1986 年，高雄縣林園地區之立體式養殖法開發成功；1996 年，宜蘭縣及臺南縣境內之內陸鹹水九孔池養殖技術開發成功，養殖面積達 150 ha 左右，產量逐年提高；(3) 1995 – 2002 年：臺灣九孔養殖產量於 1995 年後逐年增加，2001 年達最高峰；然至 2002 年，養殖九孔陸續暴發大量死亡，產量驟跌；(4) 2004 年：因未能解決九孔死亡狀況，養殖戶紛紛棄養，只剩零星潮間帶及少數陸地池養殖（沈與趙，2003；郭，2013）；(5) 2009 年：堪稱是臺灣九孔養殖產業最寒冷的冬天，臺灣最大的九孔育苗場「新東洋九孔養殖場」放棄養殖九孔，只剩若干養殖業者仍堅持固守此產業；(6) 2010 年迄今：臺日雜交貝養殖測試成功，可耐低溫、輪捕。

傳統育種常由一個生物族群中，選拔最佳形質的親本進行配對，在人為的養殖環境，逐代選拔，但由於交配族群數量不足，易產生近交現象，逐代累積，造成遺傳變異下降；與自然野生族群相比，養殖族群所採用的繁殖樣本，數量相對很少，所以發生近交退化的可能性也相對增加，近交退化可能造成樣本早熟、成長緩慢以及族群適應力、存活率、繁殖力降低風險，對族群長遠發展而言並非好事（林與郭，2013；杜等，2015）；然於九孔的養殖過程中，養殖的幼貝主要由自家養殖場選取成長快、外型佳者為種貝繁育而成，因未有效管理種貝之選擇與配種策略，致使養殖九孔的遺傳變異逐年降低。這也造成自 2000 年起，臺灣各地的繁殖場紛紛發

生九孔幼生在附苗後，快者 1 週，慢者 1 個月內幼苗陸續白化脫落死亡，九孔成貝亦出現大量死亡狀況，導致業者重大損失，重創九孔產業發展（曾等，2008, 2013；郭，2013；杜等，2015）。面臨水產養殖物種的種種挑戰，除了積極提升養殖相關技術及改善養殖生態環境，針對養殖物種近親退化現象，使用雜交技術培育新品種為養殖貝類育種的重要方法（You *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012）。中國也朝著以雜交育種以防止種質退化之研究方向進行，目前已有不少關於雜色鮑種間雜交（柯等，2000；蔡等，2006）、群體間遠距離雜交（游等，2005；You *et al.*, 2009）、群體選育（You *et al.*, 2010a）和分子標誌輔助育種（Zhan *et al.*, 2009）等雜色鮑遺傳改良相關的研究。

本研究沿用曾等（2008）所篩選且經多年之驗證之引子，應用 RAPD 技術追蹤分析歷年採集之九孔遺傳變異，以作為未來九孔育種、資源管理與應用之根據。

材料與方法

一、九孔樣本

- (一) 2008 年之前收集的野生九孔 11 顆、野生九孔人工繁殖子代 12 顆、臺南養殖場九孔 12 顆、宜蘭九孔養殖場之養殖九孔 14 顆、養殖母貝配野生公貝之子代 15 顆及養殖公貝配野生母貝之子代 12 顆。
- (二) 2017 年收集的 5 群九孔，每群各 10 顆，其中 strain 1 – 4 為不同品系九孔，另外 strain 5 則為當年養殖之菜貝。
- (三) 2018 年於東北角海底池收集之九孔 30 顆。
- (四) 2020 年收集自宜蘭兩養殖場九孔各 10 顆、臺東九孔養殖場 16 顆及澎湖野生九孔 6 顆。
- (五) 2021 年收集自海大 108 品系 F₁ 15 顆及東北角海底池養殖之九孔 15 顆。

所有之樣本均為養殖現場採集後，以籠具攜回實驗室，經秤重、量測殼長及殼寬後，進行活體採樣，隨即進行體基因組之萃取，九孔樣本未經任何凍存，為新鮮採樣。

二、體基因組萃取

Table 1 Nucleotide sequences of target random primers and the number of amplified bands, as shown in the RAPD analysis of *Haliotis diversicolor*

Primer	Sequences of primer (5'→3')	Total bands	Molecular weight (kb)
P3	GACCGCTTGT	12	1.0, 0.9, 0.85, 0.8, 0.7, 0.65, 0.59, 0.53, 0.4, 0.37, 0.3, 0.26
P5	CAAACGTCGG	10	1.1, 0.93, 0.85, 0.8, 0.73, 0.68, 0.6, 0.31, 0.28, 0.2
P7	AGACGTCCAC	7	0.95, 0.81, 0.71, 0.6, 0.5, 0.45, 0.3
P8	TGTAGCTGGG	11	1.35, 1.2, 0.92, 0.8, 0.76, 0.64, 0.6, 0.5, 0.44, 0.35, 0.3
P9	AATGGCGCAG	11	1.3, 1.1, 0.9, 0.85, 0.7, 0.6, 0.55, 0.5, 0.4, 0.35, 0.3
P12	CCGCCTAGTC	13	1.1, 0.92, 0.84, 0.72, 0.66, 0.58, 0.55, 0.51, 0.47, 0.4, 0.36, 0.28, 0.22

切取約 0.1 g 的肌肉組織均質後，再加 500 µl lysis buffer (500 µg/mL proteinase K、50 mM Tris-HCl [pH 7.5]、10 mM EDTA、0.5% SDS) 混合均勻，置於 55°C 下輕搖振盪 2 hr 後，加入等體積的 phenol/chloroform 均勻混合，於 4°C 以 12,000×g 下離心 10 min，取上清液加入 6 倍體積無水酒精，靜置於 -70°C 下 1 hr 後，以 12,000×g 於 4°C 離心 30 min 除去上清液，再以 70% 酒精離心清洗沉澱物，於室溫下陰乾，陰乾後加入適量 TE buffer 溶解，並於測定 OD260 及 OD280 後，稀釋定量，放置於 -25°C 冰箱保存備用 (曾等, 2008)。

三、RAPD 引子

本研究沿用曾等 (2008) 所篩選且經多年驗證之 P3、P5、P7、P8、P9 及 P12 等 6 組可清楚辨識且再現性高者作為樣本分析之隨機引子，其引子序列及基因座多型性擴增帶如 Table 1 所示。另，選用 P3 引子所得之 12 條基因座多型性擴增帶 (1.0、0.9、0.85、0.8、0.7、0.65、0.59、0.53、0.4、0.37、0.3、0.26 kb)，與歷年收集之九孔 P3 基因座進行比對分析。

四、聚合酶連鎖反應

取定量之九孔體基因組 DNA 樣品 1.0 µl (30 ng/µl)、2.0 µl 引子 (10 µM)、0.5 µl dNTP (10 mM)、1.0 µl MgCl₂ (30 mM)、0.5 µl polymerase (100 U/µl) 和無菌水 15.0 µl，使之最終體積為 20.0 µl。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 反應條件：預熱 94°C，15 min 後，執行 30 個循環，每依次循環依序為：變性 (denature) 94°C，45 sec；

煉合 (annealing) 42°C，45 sec；延長 (elongation) 72°C，30 sec；最後於 72°C 延伸 10 min 使作用完全，擴增產物於 4°C 儲藏備用。

五、瓊脂膠電泳觀察

PCR 產物以 0.5 倍 Tris-acetate (TAE) 溶液等倍稀釋，加入 1 µl 6 倍 loading dye，混合後取 10 µl 進行電泳分析，經 120 伏特電泳 30 min，電泳後膠體浸泡在 0.5 µg/ml 溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 溶液中染色 1 min，再以蒸餾水退染 10 min，退染後於紫外燈下顯影，再由影像分析系統 (Bio Imaging System, SYNGENE, UK) 觀察和拍照 (曾等, 2008)。

六、聚類分析

受限於軟體輸出圖之解析度，僅針對 2020 年及 2021 年自 2 個宜蘭養殖場 (代號 I-lain I 及 I-lain II，樣本數量均為 10)、1 個臺東養殖場 (代號 TT，樣本數量 16)、海洋大學 108 品系九孔 F₁ (代號 ntou3，樣本數量 30) 及澎湖 (代號 ph，樣本數量 6) 採集之 77 個九孔樣本進行分析。

以 RAPD 之 P3、P5 及 P9 進行 PCR 擴增後，以 Bio Imaging System 影像分析系統中 GENE TOOLS 分析軟體判讀 P3、P5 及 P9 引子擴增所得基因座多型性擴增帶之電泳照片結果，求得數量化之數據。依 Nei and Li (1979) 之定義計算其遺傳相似係數。每一參試材料的運算分類單位以 OUT (operational taxonomic unit) 表示。P3、P5 及 P9 引子擴增所得基因座多型性擴增帶之結果如 Table 1 所列，將歷年收集之結果擴增條帶轉換為

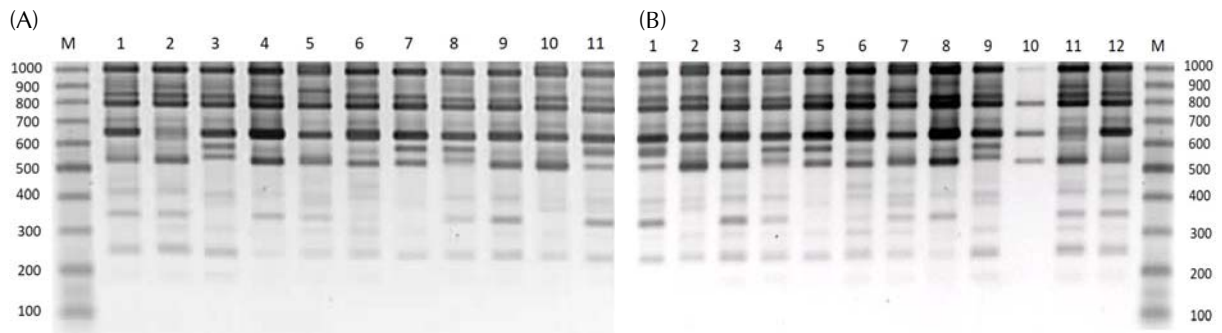


Fig. 1 Amplification products of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) from farmed abalone and wild abalone for comparison with genetic polymorphism. (A) Strain W (wild abalone); (B) Strain TT (inbred from wild of Taitung). M is the DNA ladder of molecular weight standards.

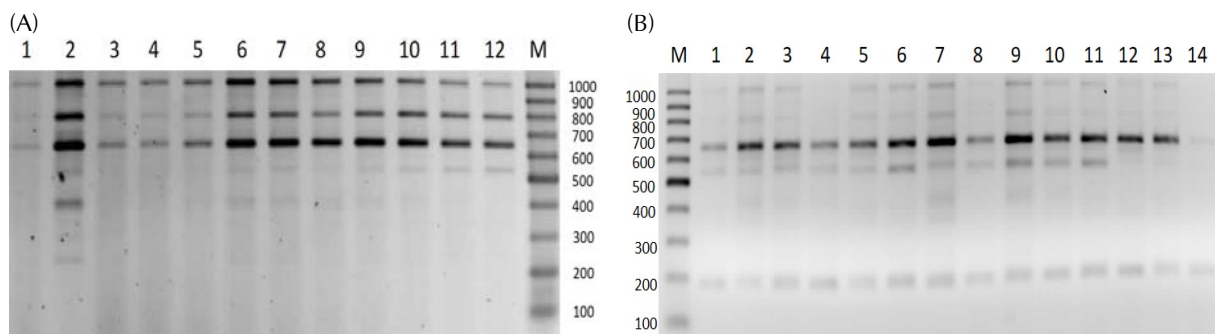


Fig. 2 Amplification products of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) for different farmed abalone compared to genetic polymorphism. (A) Inbred from farms in Tainan; (B) Inbred from farms in I-lian. All individuals were sampled before 2008. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

0 和 1 數據，同分子量位置出現擴增條帶記為 1，未出現者記為 0，以清晰可辨的標記列入統計，來估計分析。其公式為： $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ，其中 F：表示遺傳相似度估計值。 N_{xy} ：表示在 x、y 二個體間，同時擁有之條帶數。 N_x ：個體 x 可紀錄的條帶數。 N_y ：個體 y 可紀錄的條帶數。由上述計算出的遺傳相似矩陣，以 PAST 軟體用未加權算數平均法 (unweight pair-grouping method with arithmetic mean, UPGMA) 進行聚類分析 (cluster analysis)，求出樣品間的親緣距離，以建立分群樹狀圖 (dendrogram) (呂等, 2008; 呂與呂, 2013)。

結 果

本研究主要目的在於追蹤比對歷年收集之九孔，主因曾等 (2008) 所發表 P3 引子擴增所得基因座多型性擴增帶結果，於野生九孔及養殖九孔有明顯之差異，且於歷年收集結果出現易觀察之變化，故可針對此引子，進行不同採集時間九孔樣

本擴增所得基因座多型性擴增帶加以追蹤比對。Figs. 1 – 3 為早期 (2008 年之前) 採集之九孔分析資料，Fig. 1A 為野生九孔，Fig. 1B 為野生九孔人工繁殖子代之 P3 基因座樣態，所獲得之 PCR 多型性擴增帶主要落於 0.1 – 1.0 kb 之間，其中野生九孔可擴增之條帶為 8 – 12 條，野生九孔人工繁殖子代 (strain TT) 則為 4 – 12 條，主要差異出現於 0.4 – 0.8 kb 部分條帶，此差異有 2 種，1 種為出現不同深淺之條帶 (拷貝數變異, copy number variation, CNV)，另一種則為擴增帶之有無。另於同時期收集不同養殖區之九孔，可以發現養殖九孔 strain TN 之 P3 基因座樣態以 1.0、0.8 及 0.65 kb 為主，其他擴增帶稀少甚至沒有 (Fig. 2A)，更甚者於部分養殖場採集之九孔如 strain Y，有部分樣本出現條帶 (1.0 kb、0.8 kb) 之出現 CNV 之差異及條帶遺漏的狀況，更有超過 40% 樣本之 0.8 kb 條帶遺漏 (Fig. 2B)。以野生與養殖九孔進行雜交，其中養殖母貝配野生公貝，除了可獲得 1.0、0.8 及 0.65 kb 之擴增帶，而於 0.4 – 0.8 kb 有部分條帶

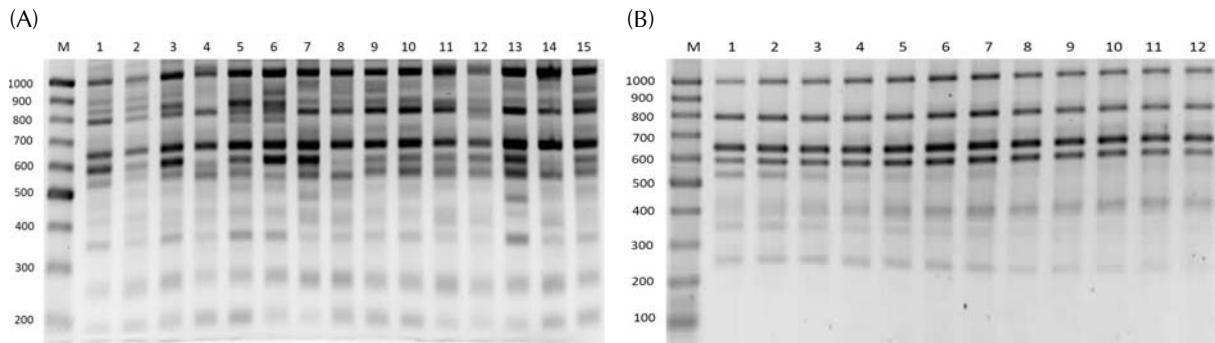


Fig. 3 Genetic polymorphisms of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products for different hybrid abalone. (A) from a hybrid farmed female crossing with a wild male; (B) individuals from a hybrid farmed male crossing with a wild female. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

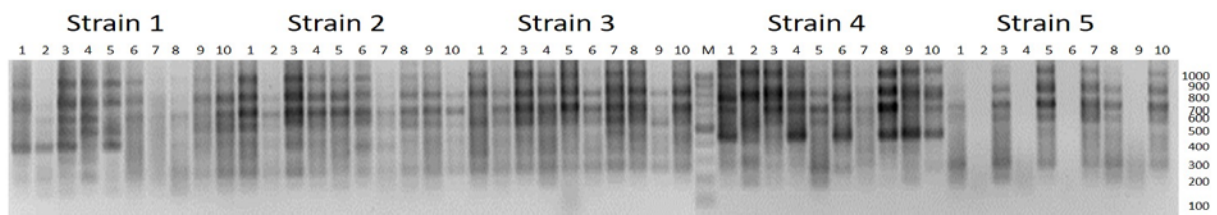


Fig. 4 Genetic polymorphisms of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products from five strains of small abalone in 2017. Strain 1 to strain 4 are samples from different farms; strain 5 are samples from the farmed abalone. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

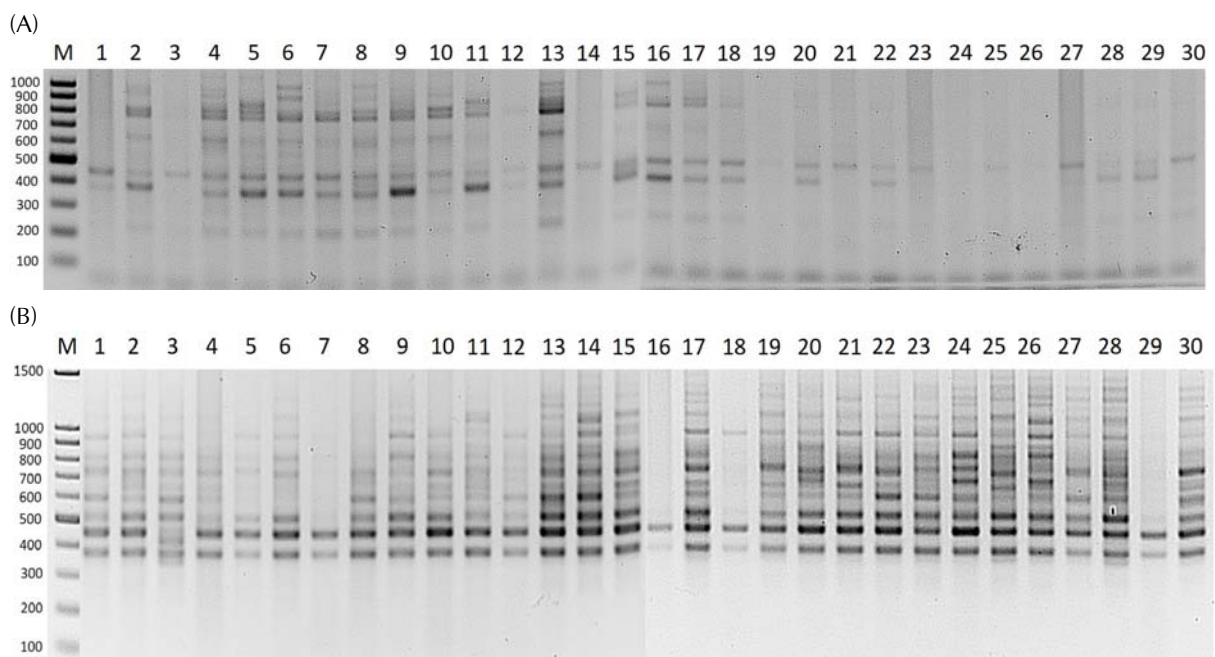


Fig. 5 Genetic polymorphisms of RAPD primer amplification products of abalone from abalone intertidal pool farming in the northeast corner in 2018; (A) RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products; (B) RAPD P7 primer (AGACGTCCAC) amplification products. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

有明顯之差異 (Fig. 3A)。另一雜交組為養殖公貝配野生母貝，主要獲得 1.0、0.8、0.65 及 0.59 之擴增帶，而於 0.2 - 0.55 kb 區域之條帶 (Fig. 3B)，兩個雜交配對方式所產生之子代有明顯之差異。

2017 年採集之 5 群九孔中，strain 1 - 4 為業者提供不同配對組合之九孔，strain 5 為當年採集之菜貝，在 P3 基因座檢測 5 組九孔基因多型性擴增帶比較分析如 Fig. 4，結果顯示，其擴增條帶為

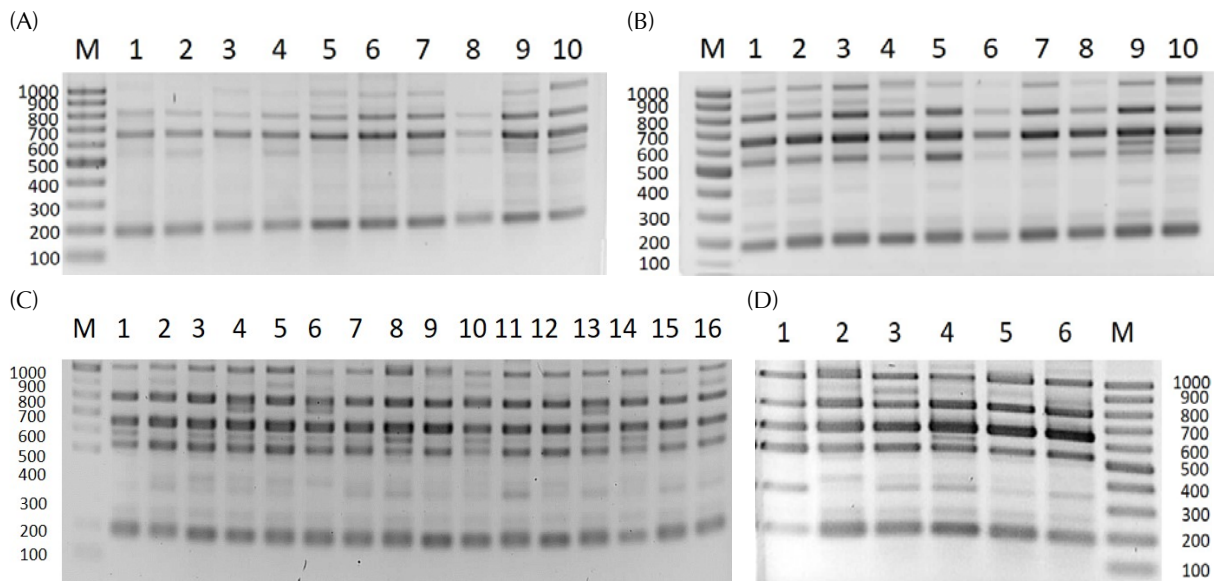


Fig. 6 Genetic polymorphisms of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products of abalone from different farms in 2020; (A) samples from I-lain farm A; (B) samples from I-lain farm B; (C) samples from Taitung farm; (D) samples from Penghu farm. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

4 – 6 條之間，主要位於分子量 0.4 – 1 kb 之間，並有部分樣本出現條帶遺漏的狀況，其中基因擴增帶 (1.0、0.8 與 0.65 kb) 有逐漸遺漏，於分子量約 0.42 kb 有明顯產生 CNV 之差異，亦有明顯遺漏的情形。在檢測的 5 組中，10 – 30% 樣本出現多型性擴增帶 CNV 之差異，有條帶遺漏的狀況，尤其在第 5 組，甚至有 40% 的樣本整個基因座完全缺失。

而於 2018 年於東北角九孔養殖海底池所採集之 30 個樣本亦可觀察到條帶遺漏或基因座多型性擴增帶遺失之狀況。於此批樣本中，體基因組均已定量後再進行 PCR，於電泳時，每片電泳片均有標準品，再利用標準品進行定位，拼接同一個基因座所得之電泳片；P3 基因座已有超過 50% 樣本出現基因多型性擴增帶之差異，亦有整個基因座完全缺失現象 (Fig. 5A)，為釐清體是否人為操作導致之基因組樣態表現差異，另以 P7 基因座作為對照 (RAPD 引子 7：AGACGTCCAC，所得基因座多型性擴增帶為 0.95、0.81、0.71、0.6、0.5、0.45 與 0.3 kb 7 條)，結果顯示此 30 個均可獲得擴增條帶，可確認 P3 基因座之差異非實驗誤差導致。

而於 2020 採集來自 3 個九孔養殖場及澎湖野生九孔之樣本顯示，在 I-lain I 10 個樣本中，P3 基因座多型性擴增帶為 3 – 7 條之間，有 30% 的樣本之 1.0 kb 擴增帶已出現漏失狀況 (Fig. 6A)，而於

I-lain II 場 10 個樣本中，可獲得 6 – 8 條的擴增帶 (Fig. 6B)。同年臺東九孔養殖場所採集之樣本 (TT)，於 P3 基因座可擴增出 5 – 7 條擴增帶，主要的 1.0、0.8 與 0.65 kb 擴增帶均存在 (Fig. 6C)；而於澎湖收集之九孔樣本 (ph)，因主要目的為後續之配種，故僅能採集較衰弱無法進行繁殖之種貝，數量較少，僅有 6 顆，可擴增出 6 – 8 條擴增帶，然其 P3 基因座之樣態於個體間呈現較相似的狀況，均有主要的 1.0、0.8 與 0.65 kb 擴增帶，另亦有 0.53 及 2.0 kb 擴增帶，各擴增帶之 CNV 也呈現較為一致的現象 (Fig. 6D)。

海大 108 品系 (代號 ntou 3) 係因應產業需求，收集自基隆嶼之野生九孔與海大原有之九孔選配而來，因樣品珍貴，待其 F_1 子代足夠大時，方進行採樣分析。採樣日期為 2021 年，樣本可得 5 – 9 條基因多型性擴增帶 (Fig. 7A)。同年採集自東北角海底池之樣本則可獲得 5 – 8 條之擴增帶，15 個樣本中，主要的 1.0、0.8 與 0.65 kb 擴增帶均有 (除了樣本 15)，其他的擴增帶則有深淺或遺漏之狀況 (Fig. 7B)。

另針對 2020 年及 2021 年收集之九孔 (詳如材料方法中之聚類分析)，以 RAPD 之 P3、P5 及 P9 進行 PCR 擴增後，依其電泳擴增帶之有無，進行聚類分析，同分子量位置出現擴增條帶記為 1，未出現者記為 0，將擴增條帶轉換為 0 和 1 數據，

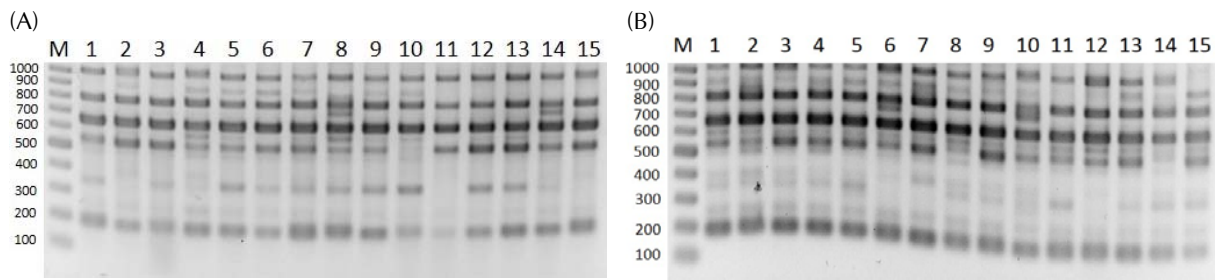


Fig. 7 Genetic polymorphisms of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products of abalone in 2021. (A) Samples from ntou; (B) samples from abalone artificial farms in the northeast coast intertidal pool farming region. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

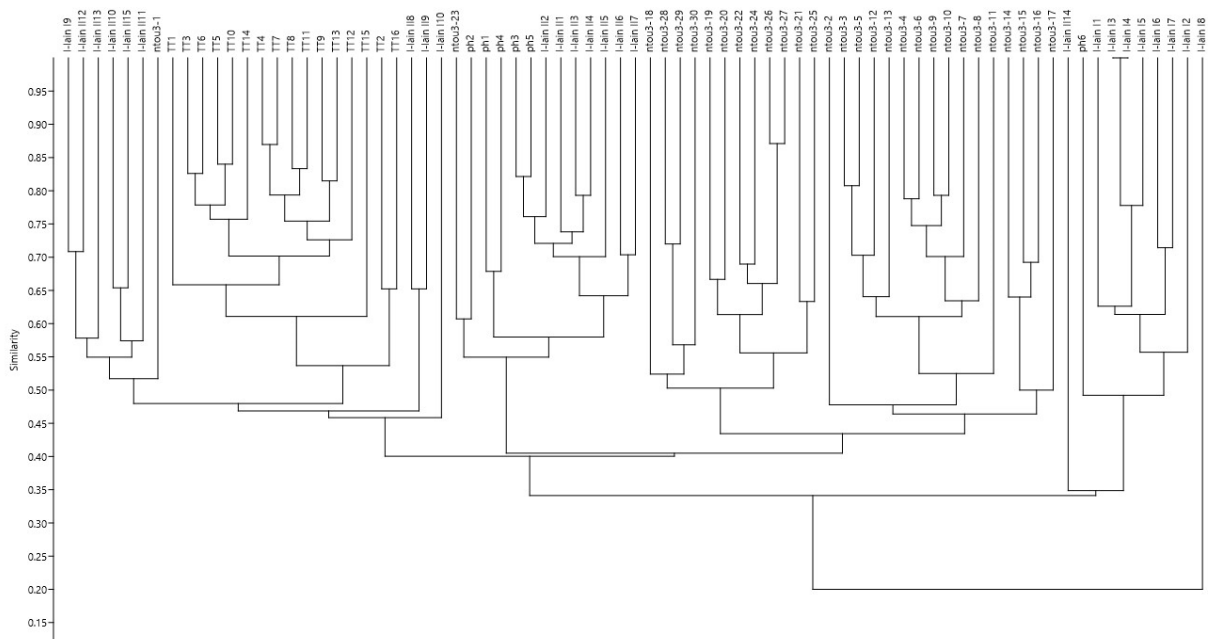


Fig. 8 UPGMA dendrogram with RAPD P3, P5, and P9 primer amplification products showing the relationships among abalones obtained from five domestic hatcheries and two wild samples in 2020 and 2021.

再以 PAST 軟體 UPGMA 進行聚類分析，限於 PAST 軟體之輸出版面與版面解析度，僅挑選部分樣品進行分析，結果顯示，雖僅用 3 組引子，已可將九孔分群，於相似度 0.41 時，可將這群九孔分成 6 群，包括 (1) 1 個宜蘭養殖場 I 採集之樣本；(2) 7 個宜蘭養殖場 I 採集之樣本(其中有 2 顆九孔基因型完全一樣) 及 1 個澎湖野生九孔；(3) 1 個宜蘭養殖場 II 採集之樣本；(4) 28 個 108 品系九孔 F₁；(5) 1 個 108 品系九孔 F₁、7 個宜蘭養殖場 II 採集之樣本和 5 個澎湖採集之野生九孔；(6) 1 個 108 品系九孔 F₁、7 個宜蘭養殖場 II 採集之樣本、2 個宜蘭養殖場 I 採集之樣本和 16 個臺東養殖場九孔 (Fig. 8)。

討 論

本研究以所建立之 RAPD 技術進行歷年蒐集之九孔樣本之遺傳變異分析，使用 RAPD 係為了研究多少個基因有同一個隨機引子的 10 個核苷酸序列，鑑於十餘年追蹤之結果，發現歷次分析九孔之 P3 基因座最容易觀察遺傳變異之變化，其中基因擴增帶 1.0、0.8 與 0.65 kb 尤為明顯，故本研究將此設定為目標追蹤區，追蹤爾後收集自各場域九孔之遺傳變異，且每個樣本均經過測定、定量後，再取定量樣本進行 RAPD 之 PCR 擴增。於 2008 年之前採集之九孔樣本可發現野生貝的遺傳變異明顯高於養殖九孔，在養殖貝 strain Y 甚至僅

出現 0.65 kb 之條帶，約有 40% 之個體在 0.85 kb 已出現條帶有明顯之差異，擴增帶的有無會直接影響交替基因，進而影響性狀之表現；為改善九孔養殖之狀況，部份業者亦收集野生之九孔進行雜交繁殖，如野生九孔自交、野生母貝配養殖公貝及養殖母貝配野生公貝等正反交不同組合等，於野生貝自交，其遺傳變異與野生貝較為相似，然尚未做好養殖管理或遺傳變異之監控，亦可能於子代中，不慎挑選到遺傳變異較少的九孔當作種貝進行後續繁殖，將會造成子代之遺傳漂變(曾等, 2008, 2014; 杜等, 2019)；雜交雖然可改善子代之遺傳變異，但是於養殖貝和野生貝之正、反交不同組合也可發現雜交子代的擴增帶介於兩親之間，但子代遺傳變異有甚大差異 (Fig. 3)，其中養殖母貝配野生公貝之子代遺傳變異較多元，除了主要基因擴增帶 1.0、0.8 與 0.65 kb 外，在 0.5 – 0.7 kb 間亦出現深淺不一之擴增帶，然於野生母貝配養殖公貝之子代遺傳變異卻呈現較一致之樣態，呈現趨於同質化之趨勢；另於海灣扇貝 (鄭等, 2004; Haibin *et al.*, 2007)、雜色鮑 (游等, 2010)、長牡蠣 (孔等, 2013)、櫛孔扇貝 (*Chlamys irregularis*) (劉等, 2003, 2005) 等研究發現正反交、自交配對等不同組合，確實影響子代存活率；本團隊之研究亦發現，雜交優勢確實影響子代之成長與存活率，且正反交亦有差異，另基因歧異度低的幼貝其存活率顯著較低，成長發育情形亦顯著較差。因此，親代的正反交組合也應列入育種之考量 (杜等, 2015)。

而於 2017 年採集之九孔樣本中發現於 P3 基因座中，除了主要基因擴增帶有逐漸遺漏，於 0.42 kb 擴增帶除了出現 CNV 之差異，亦有明顯遺漏的情形，在檢測的 5 組中，10 – 30% 樣本出現基因擴增帶 CNV 之差異，有條帶遺漏的狀況，尤其在第 5 組，甚至有 40% 的樣本整個基因座完全缺失；此狀況在 2018 年收集之樣本尤為嚴重，在所檢測樣本已有超過 50% 樣本出現基因擴增帶 CNV 之差異，有些擴增帶顏色極淺，亦有整個基因座完全缺失現象，經 P7 基因座檢測，每一個樣本均可擴增出條帶 (Fig. 5B)，故基因擴增帶之差異甚至缺失，並非因人工操作失誤所致，這極可能是長期人工選育之結果；臺灣九孔養殖已有很長一段時間，一來許多養殖戶已習慣了自繁自養的繁殖模式，便宜行事使用養殖貝作為繁殖的種貝，再則，以往九

孔繁殖時，養殖業者常以雌雄種貝以 20 : 1 (有些種貝場高達 30 : 1，甚至 35 : 1 亦有之) 的性比進行繁殖(曾, 2015)；在繁殖時會將雌雄種貝分為雌貝一群和雄貝一群，經由環境刺激方式催產，僅能知道哪一群已產卵排精，無法明確得知清楚知道後代的親本來源是哪一顆。這種雌雄比懸殊的繁殖方式，因雄貝的使用個數不多，間接造成人擇行為之瓶頸效應，進而導致遺傳漂變，亦提高了近交退化的機率，這將使九孔種質下降，遺傳基礎趨於狹窄，逐代降低九孔的遺傳變異，逐漸導致子代生長速度變慢，樣本變小，對環境的適應力降低，也會影響九孔幼生、附著苗的培育到養成等狀況，甚至造成嚴重的損失 (曾等, 2013; 郭, 2013; 蔣等, 2013; 杜等, 2015; 曾, 2015)。

而於 2020 年收集自養殖場或澎湖野生九孔，大多具備 P3 基因座主要基因擴增帶 (1.0、0.8 與 0.65 kb)，但可以發現臺東養殖場及澎湖野生九孔的擴增條帶多態性略優於宜蘭地區採集的兩場區，宜蘭兩場區的九孔亦有差異，II 場之遺傳變異略優於 I 場；而於 2021 年採集自海大 108 品系及東北角海底池之九孔，除了主要擴增帶，在約 0.9、0.6 及 0.53 kb 亦出現深淺不一之條帶；檢視本團隊於 2003 – 2007 年的調查結果，推估民間養殖場之九孔種貝基因因同質化現象，恐為九孔苗大量落苗原因之一 (曾等, 2008; 曾, 2015)，而於近年採集之九孔基因擴增條帶雖較 2008 年前採集之養殖貝稍多，但其遺傳變異卻有趨於同質性之趨勢，此為一重要警訊，遺傳變異於群體中出現同質性，並非壞事，如於合宜的環境中，子代同種內的個體性狀表現較整齊一致，有助於養殖管理，然而也意味著此族群對環境改變的適應力低，極可能年以因應環境之劇變，不甚將導致群體生存危機；此外，對育種者而言，遺傳變異同質性之群體亦是雙面刃，優點是不用再進行自交、純化等選配工作，即可在短時間獲得相對純的品系，而且在適合的養殖環境或可掌控之養殖條件下，或許可以培育經濟性狀優良的物種，然缺點卻是遺傳變異同質性將導致子代差異小，難以進行差異化選別 (曾等, 2011)。

另由 2020 及 2021 年收集之九孔進行聚類分析，雖僅使用 3 組 RAPD 引子 P3、P5 及 P9 結果，即可進行分析，其中 P3、P5 於各個體間，所呈現

之擴增帶歧異度較高，P9 之擴增帶則較為相似，將上述所有擴增帶一起比較時（最多為 33 條條帶），於相似度約 0.41 可將此 77 個樣本初步分成 6 群，幾乎已可將相同地方採樣之樣本歸納成群，亦可發現其中宜蘭 I 場有 2 顆基因型相似度為 1，而臺東樣本之基因型相似度相較於其他群高；本研究證明可利用 RAPD 結果，進行樣本之初步聚類分析，判斷各樣本群之相似度，亦可提供現場配種時，種貝選擇的重要參考。然此分析方式耗時費力，目前須由人工進行初步判讀登錄，故於時間較緊迫時，可以此 3 組引子作為初步分析，待另有時間可再加入其他合宜的 RAPD 引子之 PCR 擴增結果，可更提升聚類準確度，更有利於後續分析。

透過雜交選育確實可增加子代基因的歧異度，且經比對幼苗之存活率及成長情形後，發現基因歧異度低的幼貝其存活率顯著較低，成長發育情形亦顯著較差。在太平洋牡蠣 (Hedgecock and Davis, 2007)、扇貝 (Zhang *et al.*, 2007)、九孔 (曾等, 2008; 于, 2013; 杜等, 2019) 之研究顯示，經由具有顯著遺傳差異的種內群體雜交，可讓雜交子代之經濟性狀較自交子代表現優異；另外倘選配管理得當，可透過不同品系的九孔雜交擴增九孔之基因歧異度，可有效改良子代之成長與存活率，基因歧異度越高，其子代存活率也越高，基因歧異度與存活率呈正相關 (杜等, 2015)。Ray *et al.* (2022) 針對印度特有之鯉魚 (*Cirrhinus cirrhosus*) 進行遺傳變異分析，其樣本來自不同的 5 組孵化群，另外 1 組天然族群則採集自 Halda River，結果顯示這些群體之間的遺傳距離是多樣化的，但是，孵化的群體被發現有更多的同質性，缺乏遺傳變異性，從而導致生長性能下降，這也呼應另一學者早於 2006 提出之論證，近親繁殖是造成 *C. cirrhosus* 生長性能下降的原因，增加遺傳變異性是提高產量和生長性能的唯一解決方案 (Aflalo *et al.*, 2006)。

物種的遺傳變異增強了生物適應不斷變化的環境的能力，是物種生存的必要條件，然而在水產養殖的馴養過程，極易造成遺傳變異的降低。Radona *et al.* (2018) 利用 RAPD 針對施氏魷 (*Barbonymus schwanefeldii*) 連續三代群体世代進行遺傳變異監測，各世代之的育成係選擇上一世代優良生長的個體進行繁殖所形成，結果從第一

代到第三代的多態性及雜合性下降了 30 - 40%，顯示在逐代選育馴養的過程會導致基因多樣性的減少；而於現今甚多水產養殖種苗場，仍採取「選魚頭」方式進行繁殖，而成長性狀較優異的個體，大多是因為雜交強勢所造成結果，此性狀並無法以遺傳方式於子代體現，這要是現在許多商用養殖苗於當代有極優異之養殖性狀，但其繁衍子代性狀出現參差甚至逐漸低下之原因，除了因無意的以人擇的方式促成近親繁殖，另外也是因為所擇之雜交親代性狀並未固定之緣故，此外在水產養殖業中，不同魚類具有各種具有經濟重要性的特徵，種苗生產者倘不及早建立正確之育種與保種之觀念，不但會一再陷入生產出經濟性狀欠佳、性狀不一、產業接受度差之泥沼，更難生產出好的種苗以因應未來氣候變遷之考驗。在不同種類的物種，重要經濟性狀的表現及養殖地區亦有所差異 (Fu and Yuna, 2022)。因此現今已有甚多國家開始制定自有之育種計畫，也開始明白育種計畫的成功及在水產養殖的可持續性在很大的程度上取決於遺傳多樣性評估和理解的結果，因此在制定育種計畫之前必須先事前確定目標選育物種之種群遺傳變異和種群結構 (Radona *et al.*, 2018; Adesola *et al.*, 2020; Omer *et al.*, 2020; Parvez *et al.*, 2021)，在制定良好的育種計畫後，加入妥適的追蹤監測，除了維持現有品種，亦須適時導入不同品種進行雜交以增加目標種群內之遺傳變異，進行後代選育，方能有效種原管理維持優異種質，永續經營水產養殖 (Eknath *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2022)。

於本研究追蹤歷年九孔之 P3 基因座遺傳變異調查結果顯示，適當的選配確實可以改良子代之 P3 基因座樣態，但是正、反交或選擇之種貝可能會造成子代遺傳變異之差異，在同一群體中未能獲得相同的擴增條帶，這表示經由人為選育配種的過程，已造成人為的遺傳漂變。因此，在配種時，需注意親本的質與量的選擇，除了不宜長期利用單一品系九孔，應適時利用不同養殖場間九孔品系之交換和雜交；另一方面要注意繁殖親本的數量，避免基因漂流效應 (曾等, 2008, 2011, 2012, 2014; 曾, 2015; 杜等, 2015)，再配合基因標誌輔助九孔選配，可明確管控那些基因型過量，那些基因型缺少，也可減少種貝的使用量，防止種原耗損，亦可對精卵品質進行篩選作為留種依據，達到種

貝配對管理和後代的基因型管理，建立遺傳育種資材，故未來應建立累積各性狀(如耐寒、耐熱、成長等)與基因資料之關聯分析，以提出最適性之配種策略，如此方可有效管理並維持九孔之基因歧異度，有效地防止養殖所造成的族群基因歧異度急劇降低和近交衰退，以利永續經營九孔產業。

謝辭

承蒙國立臺灣海洋大學副校長冉繁華特聘教授提供海大九孔 108 品系供測試分析，使本研究資料更加完整，特此致謝。

參考文獻

- 丁雲源，楊鴻禧 (2003) 九孔種苗生產及幼生病害防治之對策. 水產試驗所特刊第1號 - 九孔種苗生產及病害防治, 47-50.
- 于淳康 (2013) 培育九孔種內雜交品系及應用於國內養殖. 國立臺灣海洋大學碩士論文, 基隆.
- 孔令鋒，滕爽爽，李琪 (2013) 長牡蠣中國群體與日本群體雜交子一代的生長和存活比較. 海洋科學, 37(8): 78-84.
- 呂秀英，魏夢麗，呂椿棠 (2008) DNA分子標誌資料之遺傳變異的歸群分析. 農業試驗所技術服務, 73: 25-27.
- 呂椿棠，呂秀英 (2013) PAST統計軟體於DNA分子標誌多樣性分析之應用. 農業試驗所技術服務, 95: 8-12.
- 杜金蓮，曾福生，王姿文，張錦宜 (2015) 九孔基因歧異度對幼苗存活率及幼貝成長表現之影響. 水產研究, 23 (1): 67-75.
- 杜金蓮，王姿文，曾亮瑋，姜其平，曾福生 (2019) 臺灣養殖九孔遺傳特性調查與耐低溫選育. 水產試驗所2019年年報, 39.
- 沈士新，趙文榮 (2003) 附著板上附著性藻類對九孔幼苗之附苗及成長效應之探討. 水產試驗所特刊第1號 - 九孔種苗生產及病害防治, 31-40.
- 林凌霄，郭金泉 (2013) 中國於鮑魚遺傳育種之研究. 農業生技產業季刊, 35: 59-67.
- 柯才煥，田越，周時強，李復雪 (2000) 雜色鮑與皺紋盤鮑、盤鮑雜交的初步研究. 海洋科學, 24(11): 39-41.
- 郭金泉 (2013) 簡介中國「東優1號」九孔的育種研究(上). 漁友, 430: 26-28.
- 曾福生 (2015) 九孔鮑種貝選配方式及幼生培育季節適應探討. 豐年, 65(03): 38-43
- 曾福生，杜金蓮，謝立偉，王姿文，張錦宜 (2014) 近親交配對紅色吳郭魚成長與死亡率之影響. 水產研究, 22 (1): 63-70.
- 曾福生，周賢鏘，朱惠真，余俊欣，盧民益，林金榮 (2008) 利用RAPD分析臺灣東部養殖及野生九孔的遺傳變異. 水產研究, 16 (2): 49-58.
- 曾福生，周賢鏘，盧民益，李憶如，朱惠真，林瑩祝，林金榮 (2011) 以全同胞近親育種選育高度近親紅色吳郭魚品系. 水產研究, 19 (2): 55-62.
- 曾福生，林金榮 (2012) 雜交育種改善九孔養殖成效佳. 水試專訊, 37: 9.
- 游偉偉，駱軒，王德祥，林壯炳，林煥陽，柯才煥 (2010) “東優1號”雜色鮑及其親本群體的形態特徵和養殖性能比較. 水產學報, 34(12): 1837-1843.
- 童禕珊，李冠群 (2009) 遺傳變異的產生方式 (Genetic Variation). 高瞻自然科學教學資源平台 - 科學online (<https://reurl.cc/ZyA2rp>).
- 劉小林，常亞青，相建海，李富花，劉憲傑 (2005) 櫛孔扇貝不同種群雜交效果的研究 - II. 中國種群和俄羅斯種群及其雜種F₁中期生長發育. 海洋學報, 27(2): 135-140.
- 劉小林，常亞青，相建海，劉憲傑，李富花，劉保忠 (2003) 櫛孔扇貝中國種群與日本種群雜交一代的中期生長發育. 水產學報, 27(3): 193-199.
- 蔣湘，劉建勇，賴志服 (2013a) 九孔鮑養殖群體與野生群體雜交一代生長比較. 廣東海洋大學學報, 33(1): 22-27.
- 蔣湘，劉建勇，賴志服 (2013b) 九孔鮑選擇群體F₁的選擇反應與現實遺傳力估計. 南方水產科學, 9(2): 9-13.
- 鄭懷平，張國範，劉曉，闕華勇 (2004) 海灣扇貝雜交家系與自交家系生長和存活的比較. 水產學報, 28(3): 267-272.
- 賴佩珊，王婉伶，陳瑞祥，連大進，吳昭慧，蔡竹固 (2010) 利用隨機增幅多型性 DNA 技術分析大豆品系之遺傳歧異性. 稻江學報, 4 (2): 1-15.
- Adesola, O. F., M. O. Awodiran, F. Olaleye and J. I. Awopetu (2020) Genetic characterization based on RAPD-PCR in cultured strains of *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae). Genet. Aquat. Org., 4(2): 81-88.
- Aflalo, E. D., T. T. T. Hoang, V. H. Nguyen, Q. Lam, D. M. Nguyen, Q. S. Trinh, S. Raviv and A. Sagi (2006) A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 256(1-4): 468-478.
- Al-Khafaji T. Y, M. S. F. Ziyadi and M. K. Musad (2019) DNA fingerprints of two tilapia fish species of Euphrates River at Governorate of Al-Muthanna

- using RAPD markers. Eng. Technol. J., 37(3): 345-349
- Eknath, A. E., M. M. Dey, M. Rye, B. Gjerde, T. A. Abella, R. Sevilleja, M. M. Tayamen, R. A. Reyes and H. B. Bentsen (1998) Selective breeding of Nile tilapia for Asia. Proc. 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 27: 89-96.
- Fu, G. and Y. Yuna (2022) Phenotyping and phenomics in aquaculture breeding. Aquacul. Fish., 7(2): 140-146.
- Haibin, Z., L. Xiao, Z. Guofan and W. Chunde (2007) Growth and survival of reciprocal crosses between two bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck. Aquaculture, 272: S88-S93.
- Hassanien, A. H., R. M. Abou Zied, A. K. Eldeeb (2020) Genetic divergence and phylogenetic relationship among three species of mullet inferred from RAPD markers in Egypt', Egypt. J. Aquat. Biol. Fish., 24(3): 389-401.
- Hedgecock, D. and J. P. Davis (2007) Heterosis for yield and crossbreeding of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 272: S17-S29.
- Liu, F., W. Zhan, Q. Xie, B. Lou, M. Han, W. Xu and S. Tao (2022) First genetic evaluation of growth traits in *Larimichthys polyactis* to guide the formulation of selective breeding programs. Aquaculture, 554: 738141.
- Luo, X., C. Ke, W. You, D. Wang and F. Chen (2010) Molecular identification of interspecific hybrids between *Haliotis discus hannai* Ino and *Haliotis gigantea* Gmelin using amplified fragment-length polymorphism and microsatellite markers. Aquac. Res., 41(12): 1827-1834.
- Mahboob, S., K. A. Al-Ghanim, F. Al-Misned, H. F. A. Al-Balawi, A. Ashraf and N. M. A. Al-Mulhim (2019) Genetic diversity in tilapia populations in a freshwater reservoir assayed by randomly amplified polymorphic DNA markers. Saudi. J. Biol. Sci., 26(2): 363-367.
- Malina, A. C., A. A. Husain, A. R. Annisa, I. A. K. Kadriah and A. Alimuddin (2021) Genetic variation in the Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) from Wallacea region estimated using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. In IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, IOP Pub., Vol. 763(1): 012010.
- Megbowon, I. (2019) Genetic evaluation of some tilapiine fishes using varying RAPD markers. Int. J. Fisheries and Aqu. Stu, 7(4): 275-279.
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 3321-3323.
- Nei, M. and W. H. Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. PNAS, 76(10): 5269-5273.
- Omer, O. M., A. E. W. H. Abdalla and Z. N. Mahmoud (2020) Genetic diversity of two tilapia species (*Oreochromis Niloticus* and *Sarotherodon Galilaeus*) using random amplified polymorphic DNA. Open Biol., 8(1): 22-28.
- Parvez, M., M. Sarower, M. Hasan, S. Debnath, S. Aktar and M. Ahsan (2021) Monitoring of genetic variation in mono-sex tilapia stocks using randomly amplified polymorphic DNA markers in some private hatcheries of Bangladesh. Egypt. J. Aquat. Biol. Fish., 25(1): 1017-1030.
- Patra, G., J. Mohanty, S. K. Garnayak, P. K. Sahoo and B. R. Pillai (2015) Genetic variations among families of selectively bred *Macrobrachium rosenbergii* (de man) by RAPD-PCR analysis. J. Aqua., 23: 17-36.
- Radona, D., I. I. Kusmini, M. H. F. Ath-thar, S. Sundari and R. Gustiano (2018) Genetic diversity of three generations tinfoil barb *Barbonymus schwanenfeldii* (Bleeker 1854) from West Kalimantan, Indonesia. Int. J. Fish Aquat. Stud., 6(4): 111-114.
- Ray, S., S. M. R. Hossain, U. Kumar, S. K. Biswas, A. K. Ghosh and M. G. Sarower (2022) Genetic variation of wild and hatchery populations of the mrigal Indian major carp (*Cirrhinus cirrhosus*) conferred by RAPD markers. AACL Bioflux., 15(4): 2132-2141.
- Xu, F., G. Zgang, X. Liu, S. Zhang, B. Shi and X. Guo (2009) Laboratory hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. sikamea*. J. Shellfish Res., 28(3): 453-458.
- You, W. W., C. H. Ke, X. Lou and C. H. Wang (2009) Growth and survival of three small abalone *Haliotis diversicolor* populations and their reciprocal crosses. Aquac. Res., 40(13): 1474-1480.
- Zhang, H., X. Liu, G. Zhang and C. Wang (2007) Growth and survival of reciprocal crosses between two bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck. Aquaculture, 272: S88-S93.
- Zhang, Y., Z. Wang and X. Yan (2012) Laboratory hybridization between two oysters: *Crassostrea gigas* and *Crassostrea hongkongensis*. J. Shellfish Res., 31(3): 619-625.

Using Random Amplified Polymorphic DNA to Study Historical Genetic Variation in the Abalone (*Haliotis diversicolor*)

Jin-Lien Du*, Huei-Jen Ju, Zi-Wen Wang, Yi-Hsuan Huang, Chen Yu and Fu-Sheng Tseng

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The small abalone (*Haliotis diversicolor*) is an extremely distinctive cultured species in Taiwan. The present study used the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique with the P3 locus pattern, to compare the genetic variation of small abalone collected from 2008 to 2021. Early results showed that small wild abalone had 8-12 polyphenotypic amplification bands, primarily between 0.1 kb and 1.0 kb, whereas the polyphenotypic amplification bands of cultured small abalone were mostly 1.0 kb, 0.8 kb, and 0.65 kb. In addition, some cultured small abalone samples presented differences in band depth (e.g., copy number variation, CNV) and also showed band omission, indicating that the genetic variation and survival rate of cultured small abalone have declined as the result of constant artificial selection.

The industry has improved the survival rate of cultured seedlings by introducing abalones from other geographic populations, which demonstrates that it is feasible to enhance the genetic variation of species through hybridization and to subsequently strengthen the ability of organisms to adapt to a changing environment. However, the samples collected in recent years have begun to show a reduction in genetic diversity and a trend in homogeneity of genetic variation.

In summary, this study demonstrated that genetic variation can be improved by selecting breeds with higher genetic variation for crossbreeding; however, the preservation, selection, and management of breeds with a higher degree of genetic variation are key factors for the success of this industry. Moreover, it is equally important to maintain and sustain the benefits of crossbreeding, in order to promote excellent breeding performance in the cultured organisms, including growth, cold tolerance, and heat resistance, among other factors.

Key words: small abalone, *Haliotis diversicolor*, genetic variation, random amplified polymorphic DNA (RAPD)

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung, Taiwan 202. TEL: (02)2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jl原因@mail.tfrin.gov.tw

四指馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 魚苗袋裝運輸 - 最適撈捕體型、密度及其水質變化之探討

邱沛盛* · 朱永桐 · 張丁仁 · 黃建維 · 張哲誠 · 許晉榮

農業部水產試驗所海水養殖研究中心

摘 要

活魚運輸是水產養殖過程中的重要環節，但運輸過程中，魚隻體型、運輸密度及水質變化均會影響其活存率。四指馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 為臺灣重要的經濟性海水養殖物種，然而，有關其魚苗袋裝運輸研究目前仍然缺乏。為建立四指馬鮫魚苗袋裝運輸過程的適宜條件，本研究探討 (1)較適合撈捕的魚苗體型；(2)不同密度對魚苗袋裝運輸的活存率影響及水質變化情形。結果顯示，不同體型 ($S = 16.86 \pm 1.39$ 、 $M = 21.37 \pm 3.07$ 及 $L = 36.50 \pm 4.03$ mm) 的魚苗撈捕後經過 24 hr，體型 M 及 L 的魚苗活存率顯著高於 S。以上述 M 體型之魚苗進行不同密度 (1,000、2,000 及 3,000 尾/袋，每袋水量 6.25 L) 包裝，模擬運輸 5 hr，結果顯示以 1000 尾/袋的組別有最高的活存率 ($99.53 \pm 0.20\%$)。分析運輸袋水中的 pH、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 及 $\text{NO}_2\text{-N}$ ，發現運輸後的 pH 隨著運輸密度增加而降低，相反地， $\text{NH}_3\text{-N}$ 及 $\text{NO}_2\text{-N}$ 則隨密度增加而升高，3,000 尾/袋的組別水質惡變的情形顯著高於其他兩組。綜合本研究結果，建議適合撈捕操作的四指馬鮫魚苗體型至少需達 20 mm，並以 1,000 尾/袋的密度進行包裝運輸，且時間以不超過 5 hr 為宜。

關鍵詞：四指馬鮫、活魚運輸、操作體型、包裝密度

前 言

活魚運輸是水產養殖過程中的重要環節，這使活魚在養殖過程中的異地移動成為可能，例如，從孵化場轉移到養成場 (Piper *et al.*, 1982; Harmon, 2009; Koolhaas *et al.*, 2011)。活魚運輸可分為封閉系統和開放系統，封閉系統通常是一個密封的塑料袋，裡面裝有一定比例的水和氧氣，而開放系統則由裝滿水的容器組成，不斷從外部提供氧氣，其中最簡單的是帶有打氣石的水槽 (Berka, 1986; 許等, 1995; Hseu *et al.*, 2000; Sampaio *et al.*, 2016; 張等, 2021)。活魚運輸程序又分為運輸前分級、撈捕、禁食、包裝、運輸中以及運抵後處理等 (Pakhira *et al.*, 2015; Refaey and Li, 2018)，而上述運輸過程的人為處理均會對魚隻造成一定程度的緊迫，尤其是撈捕、不當的運輸密度及水質惡變 (Harmon, 2009;

Santurtun *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2020)，因此，為了降低魚體代謝率，時常利用降溫或在活魚袋內添加麻醉劑來達到此目的 (許等, 1995; Hseu *et al.*, 2000; 張等, 2021)。

四指馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 屬於馬鮫科 (Polynemidae)、四指馬鮫屬 (*Eleutheronema*) 的魚類，為臺灣重要經濟性海水養殖物種。有關其養殖技術已有相當多文獻發表，包含生殖生物學 (Pember *et al.*, 2005; Nesarul *et al.*, 2014; 區等, 2017; Cheng *et al.*, 2017) 及養殖生產管理 (區等, 2017; 邱等, 2022)。有關撈捕及運輸研究已有賴等 (2020) 針對大型稚魚 (15.2 ± 2.9 g、 9.7 ± 0.6 cm) 在開放系統中的運輸密度條件進行研究。然而，有關小型魚苗的袋裝運輸研究仍然缺乏，因此有必要針對此一主題進行探討。

在四指馬鮫魚苗運輸前的準備過程中，撈捕魚苗往往造成魚隻驚嚇、緊迫，進而死亡，且魚隻體型越大、死亡率越高，所以業者多選在體型 6 分 (18 – 19 mm) 到 8 分 (24 – 25 mm) 左右的魚苗進行撈捕，是為了提升後續運輸的活存率。然而，此

*通訊作者 / 臺南市七股區三股里海埔 4 號；TEL: (06) 788-0461 轉 219; FAX: (06) 788-1597; E-mail: pschiu@mail.tfrin.gov.tw

說法沒有經過實驗證實，多半是憑藉養殖從業人員的經驗而定。Sampaio *et al.* (2016) 認為，魚類的體型與運輸成功與否有關，因為魚隻體型連帶影響運輸密度、袋中水質及運輸時間 (Harmon, 2009; Crosby *et al.*, 2014)。此外，為了有效降低運輸成本，需要提高運輸的裝載率，意即增加包裝密度。然而，若密度過高則可能對魚類健康有害，進而增加死亡率，最終使得養殖收益降低 (Carneiro and Urbinati, 2002; Urbinati *et al.*, 2004)。因此，確認理想的包裝運輸密度、最大限度地降低成本、減輕魚隻緊迫及提升活存率就成為重要課題 (Carneiro and Urbinati, 2002; Sampaio *et al.*, 2016)。

袋裝運輸過程水質的變化也是運輸成功與否的關鍵因素，包括溶氧 (DO)、pH、溫度、鹽度及含氮廢物等參數都顯著影響魚隻的活存率 (Belema *et al.*, 2017; Metar *et al.*, 2018; Espinoza-Ramos *et al.*, 2022)。其中，值得關注的水質因子是 pH 及含氮廢物，在運輸過程袋中的海水 pH 通常會降低，這與魚隻在運輸過程的代謝和產生二氧化碳有關 (Watson *et al.*, 2010)。此外，氨的累積也是導致魚隻死亡的主要原因 (Watson *et al.*, 2010; Barbieri and Bondioli, 2015)。Lim *et al.* (2003) 認為含氮廢物濃度增加與魚隻密度、運輸時間成正比，然而有關四指馬鮫魚苗在袋中運輸過程的 pH 及含氮廢物變化還尚未有研究探討。

綜上所述，為瞭解與建立四指馬鮫魚苗袋裝運輸過程的適宜條件，本研究將探討 (1) 較適合撈捕的魚苗體型；(2) 不同密度對魚苗袋裝運輸的活存率及水質變化，以補足目前仍然缺乏的資訊。

材料與方法

一、實驗動物

本研究已通過實驗動物照護及使用委員會核准進行相關動物實驗 (核准編號 110-IACUC-02)，且無使用瀕危的生物。

二、探討不同體型的魚苗在撈捕後之活存率 (實驗一)

實驗魚苗來自民間養殖場購買的受精卵並自行培育，魚苗培育方法參照邱等 (2022)。進行三批

次育苗並挑選篩分三種尺寸的魚苗進行實驗，分別是 6 分苗 (16.86 ± 1.39 mm, S 體型)、7 分苗 (21.37 ± 3.07 mm, M 體型) 及寸 2 苗 (36.50 ± 4.03 mm, L 體型)。不同體型的魚苗篩分後，依據體型分別移至塑膠箱網 ($3\text{ m} \times 4\text{ m} \times 4\text{ m}$) 內暫養，每個箱網暫養 1,000 尾，密度約 20 尾/ m^3 ，箱網總共有 9 個 (3 組 $\times$ 3 重複)，9 個箱網都放置在一 3,000 噸水池內。蓄養 3 天等待魚苗適應並恢復活力。實驗前 24 hr 禁食，實驗開始時以手撈網在 3 分鐘內從不同箱網中各組撈取 300 尾魚苗分別移至另一組同樣尺寸的箱網內開始觀察，並在 24 hr 後觀察魚隻狀態並計算活存率，公式如下：

撈捕後 24 hr 活存率 (%) = (剩餘魚苗數量 $\div$ 初始魚苗數量) $\times$ 100

三、探討不同包裝密度對魚苗運輸之活存率及水質變化 (實驗二)

根據實驗一活存率最高的結果，選用該體型的魚苗進行本實驗，藉此探討理想的包裝密度及運輸前後的水質變化，實驗方法參照 Hong *et al.* (2019) 並稍做調整。實驗前所有魚隻均禁食 24 hr，接著以 25 L 塑膠魚苗袋，盛裝乾淨海水 6.25 L (33 psu)，每袋分別放入 1,000、2,000 及 3,000 尾魚苗，每袋均充填滿純氧並以橡皮筋封住袋口 (氧氣與水的體積比 = 3:1，參照 Estudillo and Duray (2003)，每組三重複。將包裝袋放入紙箱中，放置於以空調控溫的實驗室中，將溫度維持 24–25°C，每小時將紙箱搖動一次，進行 5 hr 的模擬運輸，最後打開包裝袋觀察魚隻狀態以計算活存率，公式如下：

運輸 5 hr 後活存率 (%) = (運輸後袋中活存魚苗數量 $\div$ 運輸前袋中魚苗數量) $\times$ 100

水質分析部分，參考 Estudillo and Duray (2003) 的方法，測量運輸前與運輸後兩個時間點，以手持式多參數水質測定儀 (XT-131M, JAQUA, Taiwan) 直接分析袋中水溫、鹽度及 pH。採樣 500 mL 的袋中水，以桌上型多參數水質儀 (HI83300, Hanna Instruments, USA) 分析 $\text{NH}_3\text{-N}$ 及 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度。

四、統計分析

所有數據以平均值 $\pm$ 標準差 (mean $\pm$ SD) 表示，以單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 及

Tukey's honestly significant difference test 比較不同魚隻體型、不同包裝密度條件下魚隻活存率及水質參數之平均值差異顯著性。以 paired sample t-test 比較運輸前後水質參數差異的顯著性。有關水質參數與包裝密度的關係以簡單線性迴歸 (simple regression) 及皮爾森相關 (Pearson correlation) 進行分析。各項分析之顯著水準 $\alpha=0.05$ ，統計繪圖軟體為 GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software)。

結 果

一、不同體型的魚苗在捕撈後之活存率

不同體型 (S、M 及 L) 的魚苗撈捕後，經過 24 hr 的活存率分別為 $69.00 \pm 2.64\%$ 、 $98.33 \pm 1.47\%$ 及 $99.62 \pm 0.64\%$ 。其中體型 M 及 L 的魚苗活存率顯著高於體型 S 的魚苗 ($p < 0.05$)，而體型 M 及 L 之間活存率沒有顯著差異 (Fig. 1)。

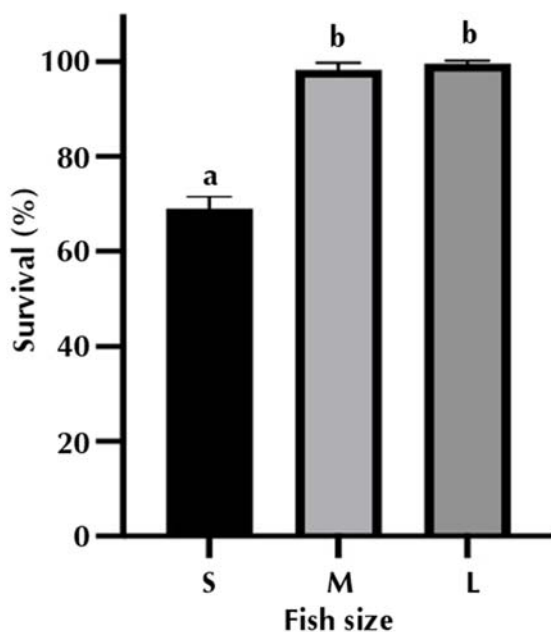


Fig. 1 The survival of *Eleutheronema tetradactylum* juveniles of different sizes at 24 hr after handling. S = small (16.86 ± 1.39 mm); M = medium (21.37 ± 3.07 mm); L = large (36.50 ± 4.03 mm). The different letter above the bar indicates significant difference ($p < 0.05$, $df = 8$).

二、不同包裝密度對魚苗運輸之活存率及水質變化

以上述 M 體型大小之魚苗，進行不同密度的模擬包裝運輸 5 hr 之後，1,000 尾/袋的組別有最高的活存率 ($99.53 \pm 0.20\%$)，顯著 ($p < 0.05$) 高於其他兩組，而 2,000 尾/袋的組別活存率 ($48.18 \pm 7.85\%$) 也顯著 ($p < 0.05$) 高於 3,000 尾/袋的組別 ($6.99 \pm 1.18\%$) (Fig. 2)。運輸前，在不同組別：1,000 尾、2,000 尾及 3,000 尾/袋的水溫分別為 $24.57 \pm 0.25^\circ\text{C}$ 、 $24.47 \pm 0.20^\circ\text{C}$ 及 $24.6 \pm 0.15^\circ\text{C}$ ，鹽度分別為 33.23 ± 0.15 psu、 33.20 ± 0.10 psu 及 33.00 ± 0.10 psu，各組之間與運輸後的溫度 ($24.13 - 24.67^\circ\text{C}$) 及鹽度 ($33.17 - 33.30$ psu) 均沒有顯著差異。

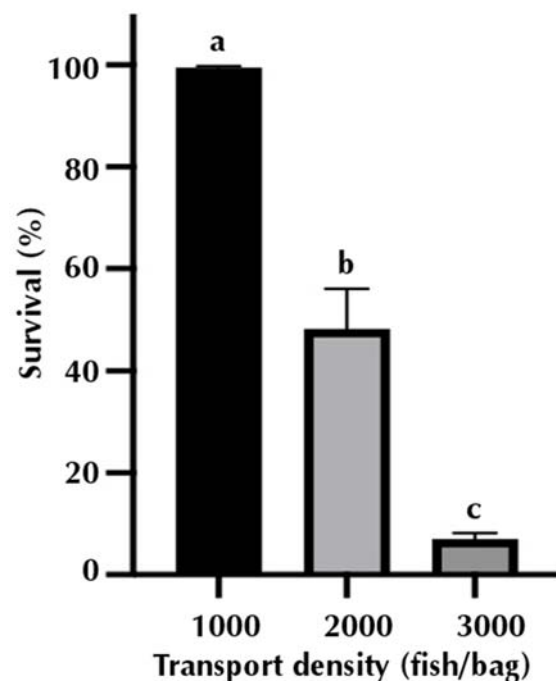


Fig. 2 The survival of *Eleutheronema tetradactylum* juveniles at different packing-densities and 5 hr after simulated transportation. The different letter above the bar indicates significant difference ($p < 0.05$, $df = 8$).

在水質分析方面，運輸前 1,000 尾、2,000 尾及 3,000 尾/袋組之 pH 分別為 8.06 ± 0.01 、 8.03 ± 0.03 及 8.05 ± 0.04 ，經過 5 hr 運輸之後，各組 pH 值分別為 6.58 ± 0.06 、 6.48 ± 0.03 及 6.36 ± 0.02 ，運輸後的 pH 顯著降低 ($p < 0.05$)，且 3,000 尾/袋的 pH 顯著 ($p < 0.05$) 低於 1,000 尾及 2,000 尾/袋的組別 (Fig. 3A)。運輸前 1,000 尾、2,000 尾及 3,000 尾/袋各組 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度均為 0，運輸 5 hr 後分別為 0.09 ± 0.00 mg/L、 0.25 ± 0.02 mg/L 及 0.36 ± 0.04 mg/L，

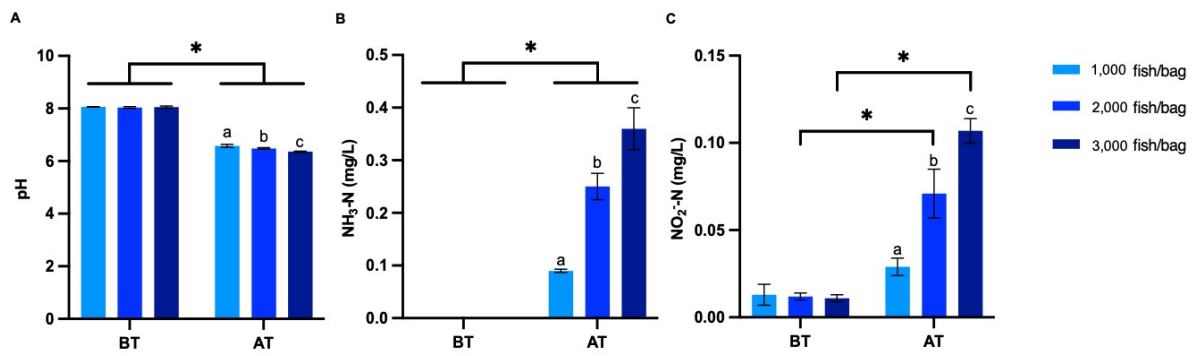


Fig. 3 Variations of pH, NH₃-N, and NO₂-N during the simulated transport experiment under different packing-density conditions. BT = before transportation; AT = after transportation. The asterisks represent significant differences ($p < 0.05$, paired sample t-test) after transportation compared to before transportation. The different letter above the bar indicates significant difference ($p < 0.05$, df = 8).

各組在運輸後的 NH₃-N 濃度均顯著升高 ($p < 0.05$)，而以 3,000 尾/袋的 NH₃-N 濃度最高，其次是 2,000 尾/袋，兩組均顯著 ($p < 0.05$) 高於 1,000 尾/袋的組別 (Fig. 3B)。運輸前 1,000 尾、2,000 尾及 3,000 尾/袋各組 NO₂-N 濃度分別為 0.013 ± 0.006 mg/L、 0.012 ± 0.002 mg/L 及 0.011 ± 0.002 mg/L，運輸後 2,000 尾及 3,000 尾/袋的 NO₂-N 濃度與運輸前相比均有顯著 ($p < 0.05$) 升高。1,000 尾、2,000 尾及 3,000 尾/袋在運輸後的 NO₂-N 濃度分別為 0.029 ± 0.005 mg/L、 0.071 ± 0.014 mg/L 及 0.107 ± 0.007 mg/L，3,000 尾/袋顯著 ($p < 0.05$) 高於其他兩組，濃度最低 ($p < 0.05$) 者為 1,000 尾/袋 (Fig. 3C)。

將 pH、NH₃-N 及 NO₂-N 濃度與包裝密度以簡單線性迴歸及皮爾森相關進行分析，結果顯示包裝密度與 pH 的迴歸方程式為 $Y = -0.00011X + 6.698$ ， $R^2 = 0.860$ ，相關係數 $r = -0.927$ ，呈現顯著 ($p < 0.05$) 負相關，代表包裝密度越高，運輸後水中 pH 也越低 (Fig. 4A)。包裝密度與 NH₃-N 濃度的迴歸方程式為 $Y = 0.000137X - 0.036$ ， $R^2 = 0.950$ ，相關係數 $r = 0.974$ ，呈現顯著 ($p < 0.05$) 正相關，代表包裝密度越高，運輸後水中 NH₃-N 濃度也越高 (Fig. 4B)。包裝密度與 NO₂-N 濃度的迴歸方程式為 $Y = 0.000039X - 0.008$ ， $R^2 = 0.937$ ，相關係數 $r = 0.968$ ，呈現顯著 ($p < 0.05$) 正相關，代表包裝密度越高，運輸後水中 NO₂-N 濃度也越高 (Fig. 4C)。

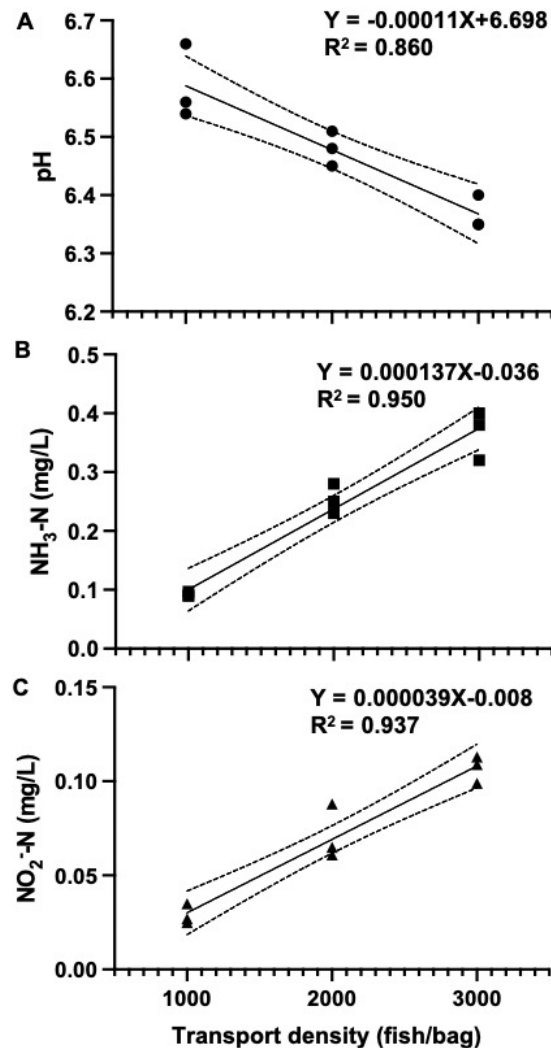


Fig. 4 Simple regression and Pearson correlation analysis between transport packing density and water quality. A: pH; B: NH₃-N; C: NO₂-N. Dashed lines represent the 95% confidence intervals.

討 論

眾所周知，撈捕會造成養殖魚類明顯的緊迫 (Acerete *et al.*, 2004; Barcellos *et al.*, 2006)，當緊迫程度超過魚類生理可調節的範圍即會造成死亡 (Urbinati *et al.*, 2003)。賴等 (2020) 發現四指馬鮫大型魚苗 (15.2 ± 2.9 g, 9.7 ± 0.6 cm) 在撈捕後會因為緊迫而有皮質醇 (plasma cortisol) 濃度上升的現象，但沒有描述撈捕過後魚隻的活存率。本研究首次探討不同體型四指馬鮫小型魚苗 (16 – 36 mm) 在撈捕後的活存情形，確認了體型介於 20 – 40 mm 的魚苗在撈捕後 24 hr 仍有超過 90% 的活存率，而小於 20 mm 的魚苗則在撈捕後發生約 30% 的死亡率，可解釋產業界多挑選體型 6 分到 8 分 (18 – 25 mm) 的魚苗進行撈捕的原因。由實驗一結果可看出四指馬鮫魚苗成長至 20 mm 以上 (組別 M 及 L)，對於抗緊迫的能力有顯著提升，未來可進一步從血液學或基因表現的層次來解釋這個變化。Barcellos *et al.* (2012) 指出，不同年齡的魚隻會表現出不同的抗緊迫與調節反應，因此，養殖從業人員應在特定養殖階段 (如魚苗撈捕與運輸時) 考慮這點，因為魚隻體型不同，對於人為操作後的反應也會有差異。相反的，Hemre and Krogdahl (1996) 則發現不同體型 (0.5 及 3 kg) 的大西洋鮭魚 (*Salmo salar*) 在撈捕運送後的血液生化參數變化沒有顯著差異，這可能是因為種別差異或者該研究魚隻的實驗體型較大所致。根據實驗一結果，組別 M 及 L 在撈捕後活存率沒有顯著差異，但一般來說單位水體中魚苗體型越小，可裝載運輸的數量較多，較符合實際上的經濟效益，因此選擇體型 M 的魚苗進行實驗二。

目前已有許多關於海水魚苗運輸的研究 (Table 1)，針對不同魚種，其運輸體型也不同，可發現 Table 1 所列運輸魚隻體長介於 1.47 – 9.70 cm，體重介於 0.12 – 15.2 g，而體型也影響包裝運輸的密度。在不同的研究中，運輸密度表示的方式存在差異，例如以單位水體內的魚隻重量表示 (Pavlidis *et al.*, 2003; Treasurer, 2010; 張等, 2014; Hong *et al.*, 2019; 賴等, 2020; Espinoza-Ramos *et al.*, 2022) 或與本研究一樣，以單位水體內的魚隻數量表示 (Ayson *et al.*, 1990; Estudillo and Duray, 2003; Xavier *et al.*, 2018)，適合運輸的密度具有明顯的種

別特性，需根據不同魚種分別進行實驗探討。與先前同樣進行四指馬鮫運輸的研究 (賴等, 2020) 相比，本研究使用的魚苗體型較小，且使用塑料袋包裝進行模擬運輸，與賴等 (2020) 的研究使用塑膠桶放置車上運輸的方式不同。目前袋裝運輸是產業界運送受精卵或小型魚苗常使用的方式 (Loka and Philipose, 2012)，本研究得出的實驗參數可提供產業界做參考。在運輸時間方面，本研究模擬運輸 5 hr，而從臺灣南部到北部也約為 5 hr 車程。在先前的研究中，點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 魚苗的模擬運輸採用 6 hr (Xavier *et al.*, 2018)，與本研究設定的時間相近。其它臺灣常見的海水魚種如石斑 (*Epinephelus* sp.) (Estudillo and Duray, 2003)、星斑臭肚魚 (*Siganus guttatus*) (Ayson *et al.*, 1990) 及黃臘鰻 (*Trachinotus ovatus*) (Hong *et al.*, 2019) 運輸時間都在 8 hr，大西洋鱈 (*Gadus morhua*) (Treasurer, 2010)、嘉鱯 (*Pagrus pagrus*) (Pavlidis *et al.*, 2003) 及海鱸 (*Rachycentron canadum*) (Stieglitz *et al.*, 2012) 則較長，為 24 – 48 hr，運輸時間的長短取決於物種特性、運送地點及水溫。

本研究發現包裝密度顯著影響四指馬鮫魚苗的活存率，當包裝密度越高、運送後的活存率越低，在星斑臭肚魚 (Ayson *et al.*, 1990) 及石斑魚 (Estudillo and Duray, 2003) 及大黃魚 (*Larimichthys crocea*) (張等, 2014) 的模擬運輸實驗中也觀察到同樣的現象。相反的，點帶石斑在較高包裝密度下沒有造成任何魚隻死亡，但在緊迫相關生化參數表現上高於低密度的組別 (Xavier *et al.*, 2018)，而黃臘鰻在不同包裝密度下生理與血液中與緊迫相關的參數並沒有顯著差異，因此根據實驗結果可選擇較高的運輸密度 (Hong *et al.*, 2019)，不會影響魚隻活存。除了以活存率作為指標，配合其他生化或分子層次的生理指標來綜合判斷，對於精確的定出最適運輸的條件有一定助益，因此未來應進一步探討。

許多水質因子影響活魚運輸時的魚隻健康、緊迫及活存，例如二氧化碳、氨 (NH_3 、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 及 NH_4^+)、溶氧及 pH (Pavlidis *et al.*, 2003; Harmon, 2009; Portz *et al.*, 2006; Treasurer, 2010; 張等, 2021)。在魚隻運輸過程中，水中 pH 會隨著時間的推移顯著降低，而氨氮濃度則會增加 (Bui *et al.*,

Table 1 Comparison of commercial marine fish transport parameters and optimum transport conditions

Species	Fish size	Experimental density	Transport time (hr)	Temperature (°C)	Optimum transport conditions	Reference
<i>Anisotremus scapularis</i>	6.48 ± 0.43 cm 3.53 ± 0.73 g	21.18 ± 4.38, 31.77 ± 6.57, and 42.36 ± 8.76 kg/m ³	8-12	16.87-17.67	31.77 ± 6.57 kg/m ³ 8-10 h	Espinoza-Ramos <i>et al.</i> , 2022
<i>Epinephelus coioides</i>	6.0 ± 0.2 cm 3.0 ± 0.2 g	20, 30, 40, and 50 fish/L	6	28.5-34.5	< 50 fish/L	Xavier <i>et al.</i> , 2018
<i>Epinephelus</i> sp.	1.47–2.81 cm	50, 100, and 200 larvae/L	8	23, 28	50 larvae/L 2.81 cm	Estudillo and Duray, 2003
<i>Eleutheronema tetradactylum</i>	9.7 ± 0.6 cm 15.2 ± 2.9 g	50, 70, and 90 g/L	1	27.9	50 and 90 g/L ^{PB}	Lai <i>et al.</i> , 2020
<i>E. tetradactylum</i>	1.68-3.65 cm	160, 320, and 480 fish/L	5	24-25	21.37 mm 160 fish/L	The present study
<i>Gadus morhua</i>	12 ± 1 g	10, 20, and 30 kg/m ³	24	11-11.4	30 kg/m ³ ^T	Treasurer, 2010
<i>Pagrus pagrus</i>	5.22 ± 1.09 g	10, 20, 30, and 40 kg/m ³	48	14, 19, 24	20-25 kg/m ³ ^C	Pavlidis <i>et al.</i> , 2003
<i>Rachycentron canadum</i>	7.33 ± 1.01 cm 1.65 ± 0.7 g	5, 10, 15, and 20 kg/m ³	24	19.28 ± 0.72	20 kg/m ³	Stieglitz <i>et al.</i> , 2012
<i>Siganus guttatus</i>	2.1 ± 0.11 cm	100, 200, 300, and 400 fish/L	8	28	100 fish/L 8 h 300 fish/L 2 h 200 fish/L 4 h	Ayson <i>et al.</i> , 1990
<i>Trachinotus ovatus</i>	5.86 ± 0.51 cm 3.38 ± 0.36 g	27, 54, and 81 kg/m ³	8	26	81 kg/m ³	Hong <i>et al.</i> , 2019
<i>Larimichthys crocea</i>	0.12 ± 0.03 g	2, 4, and 8 g/L	10	16.5	< 8 g/L	Zhang <i>et al.</i> , 2014

PB: plastic buckets; T: tanks; C: containers

2013; Zeppenfeld *et al.*, 2014; Salbego *et al.*, 2015)。本研究發現不論包裝密度為何，袋中水的 pH 都在模擬運輸 5 hr 後降低，而 NH₃-N 濃度升高，與 Hong *et al.* (2019) 進行黃鰺的包裝運輸實驗結果相似，運輸後的 NH₃-N 濃度顯著高於運輸前，且隨包裝密度增加，NH₃-N 濃度也逐漸增加。此外，在 Espinoza-Ramos *et al.* (2022) 進行肩板異孔石鱸 (*Anisotremus scapularis*) 的包裝運輸實驗，不論運輸時間為 8、10 或 12 hr，高密度組的氨濃度 (NH₃-N、NH₃ 及 NH₄) 都顯著高於低密度組，而運輸 8–10 hr 後高密度組 pH 均顯著低於低密度組。由於運輸過程中魚隻可能因為緊迫導致呼吸頻率提高，進而產生更多 CO₂ 造成 pH 降低 (Paterson *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004)，同時也在運輸過程中因為代謝增加而排出更多的非離子氨 (un-ionized ammonia) (Dan and Yong, 2012; Hong *et al.*, 2019)，這可解釋本研究檢測到 pH 降

低及 NH₃-N 濃度升高的原因，而 NH₃-N 濃度升高會導致魚隻存活率降低 (Loka and Philipose, 2012)，這也反映在本研究結果中。此外，NO₂⁻-N 濃度增加的趨勢與 NH₃-N 相同，然而，早期的研究指出與淡水魚相比，海水魚對 NO₂⁻-N 具有較強的耐受性 (Brownell, 1980)，某些海水魚甚至能夠忍受高於 30 ppm 的濃度 (Atwood *et al.*, 2004)，本研究檢測到最高密度組的 NO₂⁻-N 濃度仍不超過 0.5 ppm (mg/L)，可推斷對於四指馬鮫魚苗的影響並不明顯，這也是為什麼大部分海水魚苗運輸密度實驗僅檢測氨作為水質指標，而非 NO₂⁻-N (Pavlidis *et al.*, 2003; Treasurer, 2010; Hong *et al.*, 2019; Espinoza-Ramos *et al.*, 2022)。

透過簡單線性迴歸與皮爾森相關分析，我們得知 pH 及 NH₃-N 濃度與包裝密度之間，分別呈現負相關與正相關，這與 Espinoza-Ramos *et al.* (2022) 的實驗結果相似。Timmons *et al.* (2002) 認

為海水魚對 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度耐受性較低，不宜超過 0.05 mg/L 。然而，本研究在最低密度的組合 (1,000 尾/袋) 之 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度都已達 0.1 mg/L ，若運輸時間過長可能對魚苗造成負面影響。雖然在此條件下，魚苗的活存率高達 $99.53 \pm 0.20\%$ ，但日後仍須透過如降溫、添加麻醉劑等方式降低魚隻代謝速率，進而降低因 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度累積造成魚苗後續的損傷。綜合本研究結果，以目前的實驗條件來說，進行四指馬鮫魚苗運輸之撈捕操作時，其體型至少需達 20 mm ，包裝密度為 1,000 尾/袋，運輸時間以不超過 5 hr 為宜。

參考文獻

- 邱沛盛, 朱永桐, 張哲誠, 葉信利 (2022) 四指馬鮫的仔稚魚發育及不同養殖密度對稚魚育成表現之影響. 水產研究, 30(1): 45-57.
- 區又君, 謝木嬌, 李加兒, 溫久福, 周慧, 劉奇奇 (2017) 廣東池塘培育四指馬鮫親魚初次性成熟和苗種規模化繁育技術研究. 南方水產科學, 13: 97-104.
- 張坤, 劉書城, 范秀萍, 魏帥, 孫欽秀, 夏秋瑜, 吉宏武, 郝記明, 鄧楚津 (2021) 魚類保活運輸策略與關鍵技術研究. 廣東海洋大學學報, 41(5): 137-144.
- 張偉, 王有基, 李偉明, 呂為群 (2014) 運輸密度和鹽度對大黃魚幼魚皮質醇、糖元及乳酸含量的影響. 水產學報, 38(7): 973-980.
- 許晉榮, 葉信利, 朱永桐, 丁雲源 (1995) 添加 2-phenoxyethanol 在黑鯛輸送過程的效果. 水產研究, 3(1): 11-18.
- 賴哲翊, 郭錦朱, 林如謙, 張博淵, 周瑞良, 吳豐成 (2020) 捕撈及運輸對四絲馬鮫緊迫之影響. 水產研究, 28(2): 71-79.
- Acerete, L., J. C. Balasch, E. Espinosa, A. Josa and L. Tort (2004) Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) subjected to stress by transport and handling. Aquaculture, 237: 167-178.
- Atwood, H. L., S. P. Young, J. R. Tomasso and T. I. J., Smith (2004) Resistance of coho *Rachycentron canadum*, juveniles to low salinity, low temperature, and high environmental nitrite concentrations. J. Appl. Aquac., 15: 191-195.
- Ayson, F. G., M. M. Parazo and D. M. Reyes Jr (1990) Survival of young rabbitfish (*Siganus guttatus* Bloch) under simulated transport conditions. J. Appl. Ichthyol., 6: 161-166.
- Barbieri, E. and A. C. V. Bondioli (2015) Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. Aquac. Res., 46: 565-571.
- Barcellos, L., L. Kreutz and R. Quevedo (2006) Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard) fingerlings. Aquaculture, 253: 317-321.
- Barcellos, L. J. G., L. C. Kreutz, G. Koakoski, T. A. Oliveira, J. G. S. da Rosa and M. Fagundes (2012) Fish age, instead of weight and size, as a determining factor for time course differences in cortisol response to stress. Physiol. Behav., 107: 397-400.
- Belema, M., K. O. Idowu, K. D. Aghogho, A. Ndubuisi, A. Oluwakemi and U. Stella (2017) Handling and packaging of ornamental fishes for successful transportation. J. Fish. Aquat. Sci., 5: 263-265.
- Berka, R. (1986) The transport of live fish: a review (Vol. 48). FAO, Rome, Italy, 52 pp.
- Brownell, C. L. (1980) Water quality requirements for first-feeding in marine fish larvae. I. Ammonia, nitrite, and nitrate. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 44: 269-283.
- Bui, T. M., N. T. Phuong, G. H. Nguyen and S.S.D. Silva (2013) Fry and fingerling transportation in the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, farming sector, mekong delta, Vietnam: a pivotal link in the production chain. Aquaculture, 388: 70-75.
- Carneiro, P. C. F. and E. C. Urbinati (2002) Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. Aquac. Int., 10: 221-229.
- Cheng, A. C., P. C. Liu, T. S. Chin, S. B. Wang and C. H. Liu (2017) Growth and reproductive biology of the four finger threadfin, *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw), in an aquaculture pond, Pingtung, Taiwan. J. Fish. Soc. Taiwan, 44: 23-35.
- Crosby, T. C., J. E. Hill, C. V. Martinez, C. A. Watson, D. B. Pouder and R. P. E. Yanong (2014) On-farm transport of ornamental fish. UF/IFAS Extension, 119: 1-7.
- Dan, Z. and J. L. Yong (2012) Technology of reducing ammonia-nitrogen discharged by fish in water. Fish. Sci. Prog., 33: 107-112.
- Espinoza - Ramos, L. A., R. Pepe - Victoriano, J. I. Huanacuni and M. Nande (2022) Effect of transportation time and stocking density on seawater quality and survival of *Anisotremus*

- scapularis* (Perciformes: Haemulidae). J. World Aquac. Soc., 53: 1042-1050.
- Estudillo, C. B. and M. N. Duray (2003) Transport of hatchery-reared and wild grouper larvae, *Epinephelus* sp. Aquaculture, 219: 279-290.
- Harmon, T. S. (2009) Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. Rev. Aquac. 1: 58-66.
- Hemre, G. I. and Å. Kroghdahl (1996) Effect of handling and fish size on secondary changes in carbohydrate metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquac. Nutr., 2: 249-252.
- Hong, J., X. Chen, S. Liu, Z. Fu, M. Han, Y. Wang, Z. Gu and Z. Ma (2019) Impact of fish density on water quality and physiological response of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) fingerlings during transportation. Aquaculture, 507: 260-265.
- Hseu, J. R., Y. T. Chu, S. L. Yeh and Y. Y. Ting (2000) Application of 2-phenoxyethanol in live transportation of sea bass, *Lates calcarifer*. J. Fish. Soc. Taiwan, 27(1): 59-62.
- Koolhaas, J. M., A. Bartolomucci, G. Flügge, S. M. Korte, R. Murison and B. Olivier (2011) Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. Neurosci. Biobehav. Rev., 35: 1291-1301.
- Lim, L. C., P. Dhert and P. Sorgeloos (2003) Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. Aquac. Res., 34: 923-935.
- Lima, A. F., H. B. D. Oliveira, A. S. Pereira and S. S. Sakamoto (2020) Effect of density of fingerling and juvenile pirarucu during transportation on water quality and physiological parameters. Acta Amazon., 50: 223-231.
- Loka, J. and K. K. Philipose (2012) Transportation of fingerlings and juveniles of marine finfish. In Handbook on Opensea Cage Culture (K. K. Philipose, J. Loka, S. R. Krupesha Sharma and D. Damodaran eds.), Central Marine Fisheries Research Institute, Karwar, 77-83.
- Metar, S., N. Chogale, K. Shinde, S. Satam, V. Sadawarte, A. Sawant, V. Nirmale, A. Pagarkar and H. Singh (2018) Transportation of live marine ornamental fish. Adv. Agric. Res. Technol. J., 2: 206-208.
- Nesarul, H. M., M. K. Abu Hena, A. S. M. Saifullah and M. H. Idris (2014) Breeding biology of *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw, 1804) from the bay of Bengal, Indian Ocean. World Appl. Sci. J., 30: 240-244.
- Pakhira, C., T. S. Nagesh, T. J. Abraham, G. Dash and S. Behera (2015) Stress responses in rohu, *Labeo rohita* transported at different densities. Aquac. Rep., 2: 39-45.
- Paterson, B. D., M. A. Rimmer, G. M. Meikle and G. L. Semmens (2003) Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. Aquaculture, 218: 717-728.
- Pavlidis, M., L. Angellotti, N. Papandroulakis and P. Divanach (2003) Evaluation of transportation procedures on water quality and fry performance in red porgy (*Pagrus pagrus*) fry. Aquaculture, 218: 187-202.
- Pember, M. B., S. J. Newman, S. A. Hesp, G. C. Young, C. L. Skepper and N. G. Hall (2005) Biological parameters for managing the fisheries for blue and king threadfins, estuary rockcod, malabar grouper and mangrove jack in north-western Australia. Report to FRDC on Project No. 2002/003, Murdoch, Australia, 172 pp.
- Piper, R. G., I. B. McElwain, L. E. Orme, J. P. McCraren, L. C. Fowler and J. R. Leonard (1982) Fish hatchery management. U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C., U.S.A., 517 pp.
- Portz, D. E., C. M. Woodley and J. J. Cech (2006) Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. Rev. Fish Biol. Fish., 16: 125-170.
- Refaey, M. M. and D. Li (2018) Transport stress changes blood biochemistry, antioxidant defense system, and hepatic HSPs mRNA expressions of channel catfish *Ictalurus punctatus*. Front. Psychol. 9: 1628.
- Salbego, J., A. G. Becker, T. V. Parodi, C. C. Zeppenfeld, J. F. Gonçalves and V. L. Loro (2015) Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen*. Aquaculture, 437: 46-50.
- Sampaio, F. D. and C. A. Freire (2016) An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. Fish Fish., 17: 1055-1072.
- Santurtun, E., D. M. Broom and C. J. C. Phillips (2018) A review of factors affecting the welfare of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Anim. Welf., 27: 193-204.
- Singh, R. K., V. R. Vartak, A. K. Balange and M. M. Ghughuskar (2004) Water quality management during

- transportation of fry of Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture*, 235: 297-302.
- Stieglitz, J. D., D. D. Benetti and J. E. Serafy (2012) Optimizing transport of live juvenile cobia (*Rachycentron canadum*): effects of salinity and shipping biomass. *Aquaculture*, 364: 293-297.
- Timmons, M. B., J. M. Ebeling, F. W. Wheaton, S. T. Summerfelt and B. J. Vinci (2002) *Recirculating Aquaculture Systems*, 2nd Edition. Cayuga Aqua Ventures, New York, U.S.A., 76 pp.
- Treasurer, J. W. (2010) Remediation of ammonia accumulation during live transport of juvenile cod, *Gadus morhua* L., and the effects of fast period on ammonia levels and water quality. *Aquaculture*, 308: 190-195.
- Watson, C., K. H. Kilgore and C. Martinez (2010) Shipping fish in boxes. *SRAC*, 3903: 1-9.
- Urbinati, E. C., S. A. Janessa, A. C. S. Camargo and M. A. L. Parra (2003) Loading transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Charidae) at various densities. *Aquaculture*, 229: 389-400.
- Xavier, B., S. Megarajan, R. Ranjan, P. Shiva, B. Dash and S. Ghosh (2018) Effect of packing density on selected tissue biochemical parameters of hatchery produced fingerlings of orange spotted grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) during transportaion. *Indian J. Fish.*, 65: 138-143.
- Zeppenfeld, C. C., C. Toni, A. G. Becker, D. D. S. Miron, T. V. Parodi, B. M. Heinzmann, L. J. G. Barcellos, G. Koakoski, J. G. S. D. Rosa, V. L. Loro, M. A. D. Cunha and B. Baldisserotto (2014) Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'herit) britton. *Aquaculture*, 418-419: 101-107.

Live-bag Transportation of Juvenile Fourfinger Threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*): an Investigation of Handling Size, Packing Density, and Water-quality Variation

Pei-Sheng Chiu*, Yeong-Torng Chu, Ting-Jeng Chang, Jian-Wei Huang, Che-Cheng Chang,
and Jinn-Rong Hseu

Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Live-fish transportation is an essential feature of aquaculture. However, during the transportation process, factors such as fish size, packing density, and variations in water quality can impact fish survival. The fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) is an important economic marine fish in Taiwan. To date, adequate information about optimal practices for the transportation of fourfinger threadfin is still limited. To establish the appropriate conditions for live transportation of juvenile fish, the present study investigated (1) the suitable handling size of juveniles, and (2) the survival of juveniles and the variation of water quality at different packing-densities. The results showed that the survival of juveniles of different sizes ($S = 16.86 \pm 1.39$, $M = 21.37 \pm 3.07$, and $L = 36.50 \pm 4.03$ mm) was significantly higher in M and L sizes than that in S size at 24 hr after handling. We subsequently investigated the survival rate and water qualities of M size fish in 3 packing densities (1,000, 2,000, and 3,000 fish/bag; water volume per bag = 6.25 L) after 5 hr of simulated transportation. The highest survival rate ($99.53 \pm 0.20\%$) was observed with a density of 1000 fish/bag. The analysis of water quality parameters showed that pH decreased with density; in contrast, $\text{NH}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2^-\text{-N}$ increased with density, and the deterioration of water quality was significantly higher in the 3,000 fish/bag per bag than that in the other two groups. To summarize, we recommend that juveniles should be at least 20 mm in size, transported in a packing density of 1,000 fish/bag, and with transport time no longer than 5 hr.

Key words: *Eleutheronema tetradactylum*, live-fish transportation, handling size, packing density

*Correspondence: 4, Haipu, Sangu, Qigu Dist., Tainan, Taiwan. TEL: (06)7880461 ext. 219; E-mail: pschiu@mail.tfrin.gov.tw

以物種專一性引子建立擬球藻與綠球藻快速辨識技術

蘇義哲·許自研*·利淑如·王淑欣·陳陽德·吳豐成

農業部水產試驗所東港養殖研究中心

摘 要

無論是基礎研究、種原保存或現場應用皆需快速且準確的檢測方法來進行品種鑑定。擬球藻 (*Nannochloropsis* sp.) 與綠球藻 (*Chlorella* sp.) 在外觀上極為相似，營養組成卻有所差異，擬球藻富含二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)，綠球藻則無，EPA 對水產幼苗育成率甚為重要，使用錯誤藻類滋養餌料生物後再投餵幼苗，可能導致育成率降低。利用外觀辨識藻類可能發生誤判，以傳統的葉綠素、脂肪酸及基因定序等方法進行檢測需耗時 2-5 天不等，且成本較高。本研究根據擬球藻與綠球藻 18S 核糖體 RNA (18S ribosomal RNA, 18S rRNA) 基因序列上的差異設計物種專一性引子 (species-specific primer)，結果顯示利用物種專一性引子 NSCS 1 進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，能根據擴增片段的大小不同，在 3 小時內鑑別出擬球藻與綠球藻及其交叉污染的樣品，避免因誤用藻種而影響養殖成果，有助於餌料生物的開發以及水產種苗的穩定生產。

關鍵詞：擬球藻、綠球藻、物種專一性引子、品種鑑定、18S 核糖體 RNA 基因

前 言

微藻的生物多樣性極高，並且具有不同特性，可用來生產各種具高經濟價值之生物產品，生產上具有一系列的優勢，例如：生活週期短、繁殖快速、容易培養、繼代方便、成本低廉、不需要耕地、能夠在大型戶外系統或生物反應器中快速增長，微藻正逐漸成為新的生物資源，近年來不僅在食品、醫療及再生能源應用進行開發外 (Boyd *et al.*, 2020; El-Sheekh *et al.*, 2020; Fabris *et al.*, 2020)，取代飼料中魚粉成分的研究也正持續進行 (Qiao *et al.*, 2019)。

魚蝦蟹貝等水產品為人類優良蛋白質來源 (Hua *et al.*, 2019)，主要來源為捕撈及養殖，近年受氣候變遷影響，全球漁業資源恐逐漸枯竭，水產養殖所提供的養殖漁獲產量占比已超越捕撈漁業 (FAO, 2016)。為確保養殖產業穩定生產並供應漁獲，種苗育成被視為一大重點環節。水產種苗培育

是否順利，除了氣候環境外，營養充足均衡的餌料則是另一決定性的關鍵因素。考量部分種類魚苗初期口徑大小無法攝食營養充足的人工飼料，須以合適體型的餌料生物作為食物來源，可利用餌料生物其載體特性，藉由微藻提高餌料生物本身的營養價值，增加育苗的成功率 (蘇, 1999)。以仔稚魚苗為例，影響生長發育的關鍵營養素主要為高度不飽和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acids, HUFAs)、維生素 (vitamin)、磷脂質 (phospholipid) 等。相較於淡水魚而言，其中高度不飽和脂肪酸之二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 與二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 對於海水魚苗更為重要，因海水魚無法將十八碳的多元不飽和脂肪酸 (poly-unsaturated fatty acids, PUFAs) 生物轉化 (biotransformation) 為 EPA 與 DHA，而需透過外界攝食而取得，故 EPA 與 DHA 為海水魚類之必需脂肪酸 (essential fatty acid, EFA) (Tocher, 2003; Turchini *et al.*, 2009)。目前海水魚育苗主要使用富含 DHA 的等鞭金藻 (*Isochrysis* sp.) 以及富含 EPA 的擬球藻 (*Nannochloropsis* sp.) (Renaud *et al.*, 1991)，擬球藻由水產試驗所東港養殖研究中心研究人員於 1987 年自日本引進後，用於輪蟲培養與

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁街 67 號; TEL: (08)8324-121 轉 285; FAX: (08)8320-234; E-mail: zyxu@mail.tfrin.gov.tw

營養強化、魚池水色營造使用，為海水魚類育苗的主要藻種之一。

綠球藻 (*Chlorella* sp.) 又稱小球藻，係綠藻門 (Chlorophyta)、共球藻綱 (Trebouxiophyceae)、小球藻目 (Chlorellales)、小球藻科 (Chlorellaceae)，為綠色小球體，直徑範圍較大，落在 2-10 μm 間。擬球藻分類上為金藻門 (Chrysophycophyta)、真眼點藻綱 (Eustigmatophyceae)、真眼點藻目 (Eustigmatales)、單珠藻科 (Monodopsidaceae)，亦為綠色小球體，直徑在 2 - 4 μm 間，外觀與綠球藻極為相似，故被稱為擬 (綠) 球藻。綠球藻成長增殖時呈四分裂與擬球藻之二分裂相異 (Maruyama *et al.*, 1986)。在藻體葉綠素 (chlorophyll) 組成方面，綠球藻係屬綠藻門，光合色素成分含葉綠素 *a* 及葉綠素 *b*，擬球藻因屬真眼點藻綱僅含葉綠素 *a* (Hoek *et al.*, 1996; Lubián *et al.*, 2000)。在藻體脂肪酸組成部分，綠球藻不含 EPA，擬球藻則富含 EPA (Boussiba *et al.*, 1987; Ötles and Pire, 2001)，如誤用不含 EPA 的綠球藻來維持水色或是滋養輪蟲後再投餵魚苗，則對魚苗育成率與品質有一定程度的影響，因此開發快速準確的藻種辨識技術為必要之務。

因受限於環境設備與人員經驗不足，鮮少會在養殖現場進行藻種辨識，通常直接購入擬球藻藻種進行擴大培養，再倒入育苗魚池中營造水色。具有分析設備的實驗室人員，目前常用來辨識藻種的方法有以下四種：一、利用顯微鏡檢視：此法雖然快速方便，但由於外觀辨識須由具備足夠經驗與觀察力的人員進行操作，仍有誤判之可能；二、藻體葉綠素組成分析：此法為利用葉綠素組成差異進行分辨，須先破壞細胞壁後以溶劑萃取，再藉由分光光度計量測其葉綠素組成種類，過程約需 2 天，較為耗時不便 (金等, 2010)；三、藻體脂肪酸組成分析：此法係利用藻體脂肪酸組成差異進行分辨，須破壞細胞壁後萃取油脂，以有機溶劑將脂肪酸甲酯化 (methyl esterification) 後，再利用氣相層析儀進行比對分析，所需天數約為 3 天，操作繁瑣耗時不便 (蘇等, 2014)；四、利用基因定序區分藻種：此法最為直接準確，但因硬體設備限制，通常委託民間基因定序公司進行，所需天數約 3 - 5 天，成本及時間花費高。以上方法若在藻種樣品有交叉污染的情況下，更是難以判斷，因此開

發快速準確的鑑定方法是有其必要性。

許多類型的分子技術已被應用於物種鑑定，包括限制性片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、擴增片段長度多態性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、隨機擴增多態性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、單鏈構象多態性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP)、DNA 序列分析和物種專一性引子 PCR (species-specific primer) 等方法 (Wu *et al.*, 2014; Fahmy *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2015; Varadinova *et al.*, 2015)。在這些技術中，物種專一性引子是一種基於 PCR 原理，常用於相似物種鑑定的檢測方法，因其高靈敏度、專一性和便利性而成為一種常用的物種鑑定技術 (Aguirre *et al.*, 2015)，例如：細菌 (Matsuki *et al.*, 1999)、酵母菌 (Muir *et al.*, 2011)、線蟲 (AL-Banna *et al.*, 2004)、象鼻蟲 (Curculionidae) (Aguirre *et al.*, 2015)、嚙蟲目昆蟲 (Psocoptera) (Zhao *et al.*, 2016)、河豚 (*Takifugu* spp.) (Dong *et al.*, 2019) 等。許多文獻利用 18S 核糖體 RNA (18S ribosomal RNA, 18S rRNA) 的基因序列來進行微藻的物種鑑定 (Rasoul-Amini *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014)，特別是綠球藻種類的辨識 (Wan *et al.*, 2011; Tear *et al.*, 2013; Khaw *et al.*, 2020)，但目前尚無文獻利用物種專一性引子的方法區分擬球藻與綠球藻這兩個藻種。

在本研究中，透過此檢測方法的開發，根據物種專一性引子的高靈敏度，能從綠球藻及擬球藻的基因組 DNA (genomic DNA, gDNA) 中擴增出大小不同的 PCR 產物，進而能夠快速準確地鑑別出綠球藻及擬球藻。

材料與方法

一、藻類樣品及基因組 DNA 萃取

本研究所使用的擬球藻三株、綠球藻 11 株均取自水產試驗所東港養殖研究中心。藻種取得後分別以 500 ml 錐形瓶連續打氣培養，培養環境溫度範圍為 26 - 28°C，光照條件為全光照，表面光強度約 280 - 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ，培養液為 Walne 配方 (Walne, 1974)。藻種樣品採樣時依序進行樣品編

Table 1 Primers used in this study

Name of primer	5'-----3'	Size (mer)	Temperature (°C)	Product (bp)
CS 18S F1	GCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTC	27	60	1503
CS 18S R1	ACACCCAATCGGTAGGAGCGACG	23	61	
NS 18S F1	CTCTGAATCTGCGAATGGCTCATTATATC	29	59	1661
NS 18S R1	GATGAGGTTTAGATAACTTCTCACGCTG	28	58	
CS F1	GCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTG	32	58	344
NS F1	TACATGCATCAACTCCCAACTGCTTGTC	28	60	229
NSCS R1	AGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC	23	61	
NSCS F2	AGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAG	26	61	
CS R2	ACAGCAAGATAGGCGCCGTCAGTGC	25	63	139
NS R2	GCGTGCAAACCAACAAAATAGACCACC	27	60	290
NSCS F3	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAG	27	63	
CS R3	TGTTATTGCCTCATGCTTCCATTGGCTAG	29	60	293
NS R3	GTTCGTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACT	32	59	180

號、外觀拍照記錄，離心後採集藻體儲存於 99%酒精溶液中，於-20°C 保存，以備後續實驗使用。外觀形態則根據顯微鏡鏡檢等形態學特徵進行記錄。基因組 DNA 抽取方法參照植物組織抽取套組 (taco™ Plant DNA/RNA Extraction Kit) 進行抽取，經萃取後的 DNA 樣品於-80°C 冰箱保存，以備後續實驗使用。

二、18S rRNA 基因序列分析

本研究依據美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 基因資料庫 (Madden *et al.*, 1996) 上所提供之 11 條擬球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: MG920501.1, KC594687.1, GU220364.1, KU900229.1, U38902.1, AF045045.1, AF045044.1, KJ756827.1, KJ756833.1, KU342038.1, HQ710566.1) 與 12 條綠球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: AF514413.1, LC385651.1, MT992791.1, KF879600.1, Y12816.1, LC535350.1, KF879591.1, KF879601.1, KF879597.1, KF879594.1, KF879592.1, KF879587.1)，利用歐洲生物資訊研究所 (European Bioinformatics Institute, EBI) 歐洲分子生物學實驗室 (European Molecular Biology Laboratory, EMBL) 網站的多重序列比對軟體 (multiple sequence alignment, MSA) (Kanz *et al.*, 2005)，找出基因序列上的差異。

三、18S rRNA 基因引子設計

18S rRNA 基因序列常作為物種鑑定使用，其引子主要是根據同物種序列中的高度保留區而設計，對同物種具有很高的專一性。擬球藻與綠球藻 18S rRNA 序列分別以多重序列比對軟體進行比對後，根據其基因序列上相似度高的保留區域，各設計了一組引子 (擬球藻：NS18S F1 primer: 5'-CTCTGAATCTGCGAATGGCTCATTATATC-3' 與 NS18S R1 primer: 5'-GATGAGGTTTAGATAA CTTCTCACGCTG-3'；綠球藻：CS18S F1 primer: 5'-GCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTC-3' 與 CS18S R1 primer: 5'-ACACCCAATCGGTAGG AGCGACG-3') (Table 1)。擬球藻與綠球藻 18S rRNA 引子委由基龍米克斯生物科技股份有限公司進行合成。

四、物種專一性引子設計

利用 DNASTAR 軟體及多重序列比對軟體對擬球藻與綠球藻的 18S rRNA 序列進行比對，根據基因序列上的差異，設計了三組物種專一性引子，代號分別為 NSCS 1、NSCS 2 及 NSCS 3 (Table 1)，每組引子中均包含一條高度保留序列作為共用引子，以及兩條針對不同物種間基因序列差異所設計的物種專一性引子，藉由擴增出 PCR 產物的大小不同，進而區分藻種。NSCS 1 引子內含：

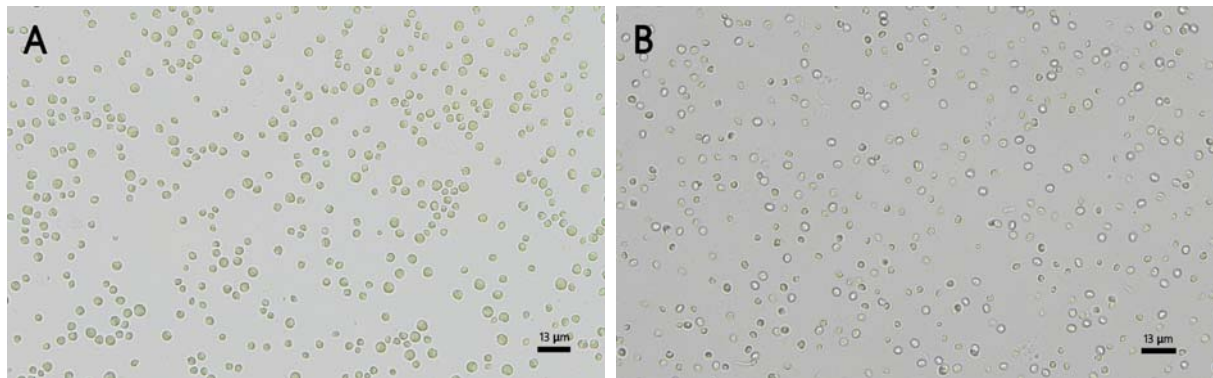


Fig. 1 *Chlorella* sp. (A) and *Nannochloropsis* sp. (B) are very similar in appearance and shape. The scale bars for (A) and (B) = 13 μ m.

CS F1 primer : 5'-GCATGTCTAAGTATAAACTGC TTTATACTGTG-3'、NS F1 primer : 5'-TACATGC ATCAACTCCCAACTGCTTGTC-3' 與 NSCS R1 primer : 5'-AGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC-3' ; NSCS 2 引子內含 : NSCS F2 primer : 5'-AGCCGC GG TAATTCCAGCTCCAATAG-3'、NS R2 primer : 5'-GCGTGCAAACCAACAAAATAGACCACC-3' 與 CS R2 primer : 5'-ACAGCAAGATAGGCGCCGTCAG TGC-3' ; NSCS 3 引子內含 : NSCS F3 primer : 5'-AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAG-3'、NS R3 primer : 5'-GTTTCGTAACGGAATTAACCAGAC AAATCACT-3'、CS R3 primer : 5'-TGTTATTGCC TCATGCTTCCATTGGCTAG-3' (Table 1), 引子委由基龍米克斯生物科技股份有限公司進行合成。

五、PCR 條件及膠體電泳

綠球藻 18S rRNA 的 PCR 條件為分別取 10 μ l 的 Master Mix (KAPA KK1024 KAPA Taq Ready Mix, Merck) 10 μ l 去離子水, 加入 CS18S 引子各 1 μ l (10 μ M), 最後加入 1 μ l 的綠球藻 DNA 樣本至 PCR 離心管內 (約 23 μ l)。擬球藻 18S rRNA 的 PCR 條件除更換為擬球藻 DNA 樣本及 NS18S 引子各 1 μ l, 其他條件與綠球藻 18S rRNA 的 PCR 條件相同。將上述離心管置於 PCR 儀器中設定升降溫程序。PCR 循環包括在 94°C 下加熱 5 分鐘的初始步驟, 隨後是 35 個循環, 即 95°C 加熱 30 秒、58°C 加熱 30 秒、72°C 加熱 1 分 30 秒, 最後在 72°C 下加熱 7 分鐘。

NSCS 物種專一性引子的 PCR 條件為分別取

10 μ l 的 Master Mix (KAPA KK1024 KAPA Taq Ready Mix, Merck) 及 10 μ l 去離子水, 再加入 NSCS 引子各 1 μ l (10 μ M), 最後加入 1 μ l 的 DNA 樣本至 PCR 離心管內 (約 24 μ l), 且設置一組陰性對照組。將上述離心管置於 PCR 儀器中設定升降溫程序。PCR 循環包括在 94°C 下加熱 5 分鐘的初始步驟, 隨後是 35 個循環, 即 95°C 加熱 30 秒、63°C 加熱 30 秒、72°C 加熱 30 秒, 最後在 72°C 下加熱 7 分鐘。

配置 1.5%濃度的電泳膠體, 將 PCR 產物樣本添加 DNA 染劑 (DNA VIEW TT-DNA01, 圖爾思生技) 注入電泳膠體孔槽中, 以 100 bp DNA ladder (DM001-R500, GeneDireX™) 為對照, 以電壓 100 V 進行電泳 15 分鐘, 再將膠體放置於紫外光箱中, 以相機拍攝 DNA 條帶。

六、基因定序及分析

分別將所擴增的 PCR 產物從電泳膠體切出後, 委由生技公司 (基龍米克斯) 進行定序, 採用 Chromas 軟體查看序列峰形圖及編輯, 將基因定序結果利用 NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) 比對軟體與 NCBI 基因資料庫進行序列比對。

結果與討論

由於擬球藻與綠球藻在某些生長階段, 其外觀形質上極為相似 (Fig. 1), 營養組成卻有所差異, 擬球藻富含水產幼苗發育所必需的 EPA, 而

綠球藻則無，因此正確辨識藻種對於水產幼苗發育及存活率甚為重要。若以鏡檢方式辨識藻類外觀加以鑑定，即使交由具備敏銳觀察力及經驗豐富的操作人員執行，仍有誤判之可能；分析藻體葉綠素種類組成、脂肪酸種類組成或基因定序等方法，不僅耗費時間長且需使用有機溶劑，所需投入之檢測成本亦相當高。若此兩種藻類種原有交互污染的情況下更加難以判斷，因此需進一步開發新的鑑定方法。

18S rRNA 引子設計根據 NCBI 基因資料庫中公開的 11 條擬球藻 18S rRNA 基因序列與 12 條綠球藻 18S rRNA 基因序列，利用 EMBL-EBI 網站多重序列比對軟體進行比對 (Fig. 2)。根據擬球藻與綠球藻 18S rRNA 序列的高度保留區各設計一組引子 (Table 1)，分別進行 PCR 反應，擴增出綠球藻 18S rRNA 基因片段 1,503 bp，擬球藻 18S rRNA 基因片段 1,661 bp (Fig. 3)。

```

MG920501.1 GACAATAATTAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KC594687.1 GACAACAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
GU220364.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KU900229.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
U38902.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
AF045045.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
AF045044.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KJ756827.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KJ756833.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KU342038.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
HQ710566.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
AF514413.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
LC385651.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
MT992791.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KF879600.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
Y12816.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
LC535350.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KF879591.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KF879601.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KF879597.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KF879594.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KF879592.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
KF879587.1 GACAATAAATAACATGCCGGGCTTT---AACTCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTAA
*****
MG920501.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KC594687.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
GU220364.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KU900229.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
U38902.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
AF045045.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
AF045044.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KJ756827.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KJ756833.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KU342038.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
HQ710566.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
AF514413.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
LC385651.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
MT992791.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KF879600.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
Y12816.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
LC535350.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KF879591.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KF879601.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KF879597.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KF879594.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KF879592.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
KF879587.1 ATCCTTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAG
*****

```

Fig. 2 Multiple sequence alignment results for *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. genomic DNA 18S rRNA genes. *Indicates that the sequence is consistent.

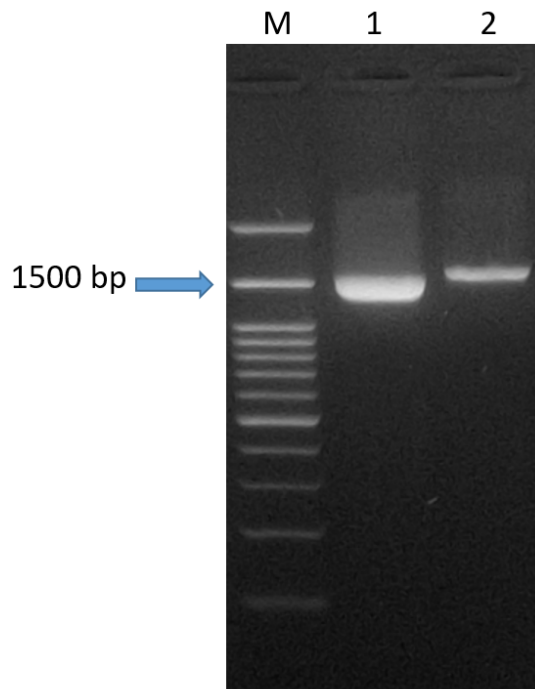


Fig. 3 PCR results of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. genomic DNA with CS 18S and NS 18S primer. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *Chlorella* sp. (1,503 bp), Lane 2: *Nannochloropsis* sp. (1,661 bp).

除了檢測 NS18S 與 CS18S 引子所擴增 PCR 產物片段大小是否符合外，分別將所擴增的 PCR 產物進行基因定序及比對。綠球藻 CS18S 之 PCR 產物序列與 NCBI 基因資料庫進行比對 (Fig. 4A)，結果顯示定序結果與綠球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: MN879272.1) 符合，一致性高達 99% (Fig. 4B)。擬球藻 NS18S 引子所擴增之 PCR 產物經定序後，將基因序列與 NCBI 基因資料庫進行比對 (Fig. 5A)，定序結果與擬球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: MN160639.1) 符合，一致性達 99% (Fig. 5B)，由定序結果確認本研究使用的藻種樣品分別為擬球藻與綠球藻。

物種專一性引子係利用 DNASTAR 軟體及多重序列比對軟體進行擬球藻與綠球藻的 18S rRNA 序列比對，根據擬球藻與綠球藻 18S rRNA DNA 序列上的鹼基差異進行設計 (Fig. 6)，共設計了 NSCS 1、NSCS 2 及 NSCS 3，三組物種專一性引子 (Table 1)，每組引子中均包含一條高度保留序列作為共用引子，以及兩條針對不同物種間基因序列差異所設計的物種專一性引子，藉由擴增出大小不同的 PCR 產物，進而區分擬球藻與綠球藻。

(A)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Chlorella sp. UMT-B13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. UMT...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1697	MN879272.1
☒ Parachlorella kessleri KNG021201 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Parachlorella kes...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1731	LC505553.1
☒ Chlorella sp. UPMC-A0075 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. UP...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1679	MH166732.1
☒ Dicroster acutatus strain Xmm25W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicroster acutatus	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1716	KY054950.1
☒ Dicroster acutatus strain Xmm31W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicroster acutatus	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1707	KY054949.1
☒ Dictyosphaerium ehrenbergianum isolate Xmm36S6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dictyosphaerium...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1713	KJ561148.1
☒ Masaia oloidia isolate Xmm36S4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Masaia oloidia	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1713	KJ561130.1
☒ Parachlorella kimitsuensis NIES-3827 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Parachlorella kim...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1660	LC779591.1
☒ Chlorella sp. TNBR1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. TN...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1792	KR869729.1
☒ Parachlorella sp. NS001C NS001C gene for 18S rRNA, partial sequence	Parachlorella sp...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1751	LC636332.1

(B)

Chlorella sp. UMT-B13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenceSequence ID: [MN879272.1](#) Length: 1697 Number of Matches: 1Range 1: 114 to 1598 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2713 bits(1469)	0.0	1480/1485(99%)	1/1485(0%)	Plus/Plus
Query 7	TAAAACGGGCG-AAATCCCACGCTTCTGGAAGGGGCGTATTTATTAGATTTAAGGCCGACC	65		
Sbjct 114	TAATACGTGCGTAAACCCCACGCTTCTGGAAGGGGCGTATTTATTAGATTTAAGGCCGACC	173		
Query 66	CGGCTCTGCCGGTCTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTCGCG	125		
Sbjct 174	CGGCTCTGCCGGTCTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTCGCG	233		
Query 126	GCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCA	185		
Sbjct 234	GCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCA	293		
Query 186	TGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG	245		
Sbjct 294	TGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG	353		
Query 246	CTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTA	305		
Sbjct 354	CTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTA	413		
Query 306	GTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCT	365		
Sbjct 414	GTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCT	473		
Query 366	AAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCC	425		
Sbjct 474	AAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCC	533		
Query 426	AGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTTCGGGC	485		
Sbjct 534	AGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTTCGGGC	593		

Fig. 4 (A) Alignment results of PCR products amplified by CS 18S primer with *Chlorella* sp. genomic DNA. (B) The results show 99.66% identity with *Chlorella* sp. genomic DNA 18S rRNA gene (accession number: MN879272.1).

利用物種專一性引子 NSCS 1 所擴增的 PCR 產物長度，綠球藻為 344 bp，而擬球藻為 229 bp，經電泳後可得到大小符合的相對應條帶，陰性對照組則無 PCR 產物擴增，將擬球藻與綠球藻基因組 DNA 混合後進行 PCR 反應，則出現兩條條帶。電泳結果證實物種專一性引子 NSCS 1 能明確區

分擬球藻與綠球藻，且能藉由此結果來判別樣品是否交叉汙染 (Fig. 7)。物種專一性引子 NSCS 2 所擴增的 PCR 產物長度，綠球藻為 139 bp，而擬球藻為 290 bp，但電泳結果發現引子專一性不佳且有非專一性產物擴增 (Fig. 8)，故 NSCS 2 不適合做為藻種鑑定使用。

(A)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Nannochloropsis oceanica strain IPPAS D-734 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1678	MN160639.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain LAMB2011 chromosome 14	Nannochloropsis oceanica	2974	5942	96%	0.0	99.69%	961379	CP038111.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain IMP-BG-006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1677	MG224777.1
✓	Nannochloropsis oceanica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	97%	0.0	99.63%	1647	KY399778.1
✓	Nannochloropsis oceanica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1645	KY399777.1
✓	Nannochloropsis oceanica gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, strain CGNM1081	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1687	LC189504.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain IMET-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1686	KR904905.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain CS-179 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1713	KT031995.1
✓	Nannochloropsis oceanica NIES-2146 gene for 18S rRNA, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1751	LC730857.1
✓	Nannochloropsis oceanica NIES-2145 gene for 18S rRNA, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1751	LC730856.1

(B)

***Nannochloropsis oceanica* strain IPPAS D-734 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence**
Sequence ID: [MN160639.1](#) Length: 1678 Number of Matches: 1

Range 1: 25 to 1651 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2974 bits(1610)	0.0	1622/1627(99%)	4/1627(0%)	Plus/Plus
Query 31	GCTCATCATATCAGT-ATAGTTTA-TTGATAGTCCTTTACTACTTGGAT-ACCGTAGTAA	87		
Sbjct 25	GCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTGATAGTCCTTTACTACTTGGATAACCGTAGTAA	84		
Query 88	TTCTAGAGCTAATACATGCATCAACTCCCAACTGC-TGTCGGACGGGATGTATTTATTAG	146		
Sbjct 85	TTCTAGAGCTAATACATGCATCAACTCCCAACTGCTTGTCGGACGGGATGTATTTATTAG	144		
Query 147	ATAGAAACCAATGCGGGGCAACCCGGTATTGTGGTGAATCATGATAAATTTGCGGATCGC	206		
Sbjct 145	ATAGAAACCAATGCGGGGCAACCCGGTATTGTGGTGAATCATGATAAATTTGCGGATCGC	204		
Query 207	CGGCTTTTGCCAGCGACGAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGT	266		
Sbjct 205	CGGCTTTTGCCAGCGACGAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGT	264		
Query 267	ATTGGCCTACCATTGGCTCTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCGGAGAGGGAG	326		
Sbjct 265	ATTGGCCTACCATTGGCTCTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCGGAGAGGGAG	324		
Query 327	CCTGAGAGACGGCTACCATCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGA	386		
Sbjct 325	CCTGAGAGACGGCTACCATCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGA	384		
Query 387	CACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGGTTAACTCTGGCAATTGGAATGA	446		
Sbjct 385	CACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGGTTAACTCTGGCAATTGGAATGA	444		
Query 447	GAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC	506		
Sbjct 445	GAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC	504		

Fig. 5 (A) Alignment results of PCR products amplified by NS 18S primer with *Nannochloropsis* sp. genomic DNA. (B) The results show 99.69% identity with *Nannochloropsis* sp. genomic DNA 18S rRNA gene (accession number: MN160639.1).

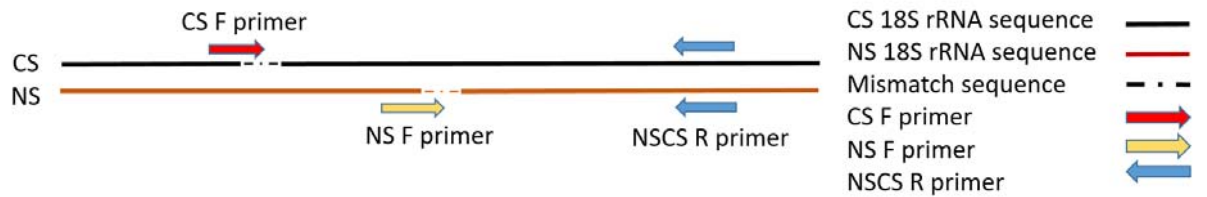


Fig. 6 Schematic of NSCS species-specific primer design.

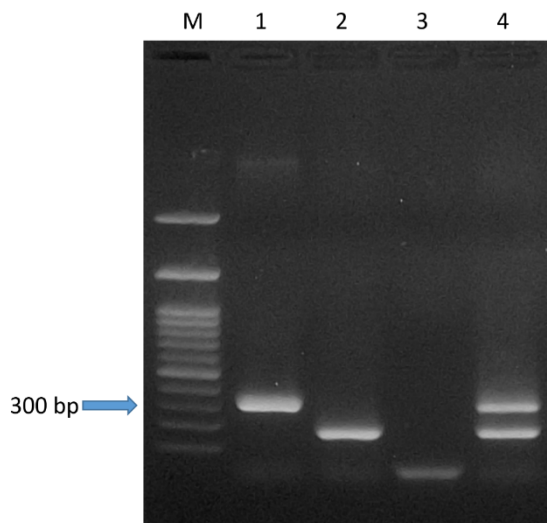


Fig. 7 PCR results of NSCS 1 species-specific primer. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *Chlorella* sp. (344 bp), Lane 2: *Nannochloropsis* sp. (229 bp), Lane 3: negative control, Lane 4: *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. genomic DNA mixed sample; according to the PCR product size, NSCS 1 species-specific primer can identify *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp.

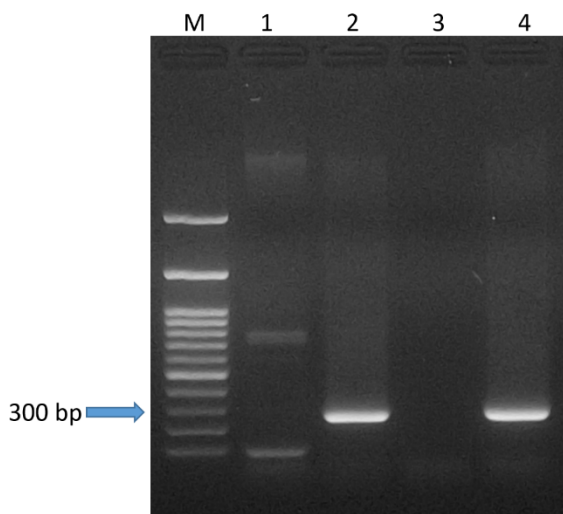


Fig. 8 PCR results of NSCS 2 species-specific primer. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *Chlorella* sp. (139 bp), Lane 2: *Nannochloropsis* sp. (290 bp), Lane 3: negative control, Lane 4: *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. genomic DNA mixed sample; according to PCR product size, NSCS 2 species-specific primer can not identify *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp.

利用物種專一性引子 NSCS 3 所擴增的 PCR 產物長度，綠球藻為 293 bp，而擬球藻為 180 bp，陰性對照組則無 PCR 產物擴增，將擬球藻與綠球

藻基因組 DNA 混合後進行 PCR 反應，可得到兩個大小符合的相對應條帶，由電泳結果確認物種專一性引子 NSCS 3 能明確區分擬球藻與綠球藻，且能藉由電泳結果來檢測藻種樣品是否交叉汙染 (Fig. 9)。結果發現物種專一性引子 NSCS 1 及 NSCS 3 皆能清楚區分綠球藻及擬球藻。

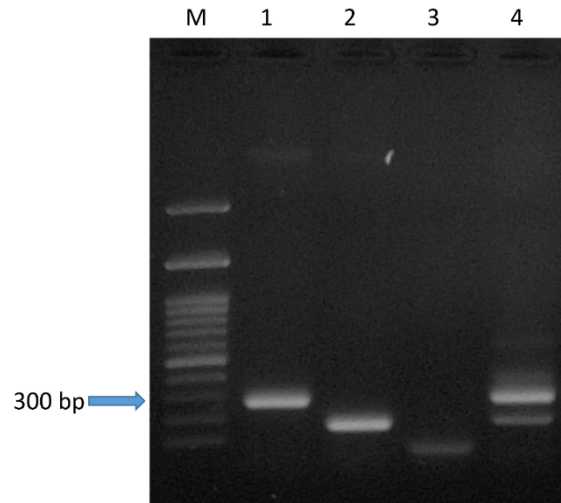


Fig. 9 PCR results of NSCS 3 species-specific primer. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *Chlorella* sp. (293 bp), Lane 2: *Nannochloropsis* sp. (180 bp), Lane 3: negative control, Lane 4: *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. genomic DNA mixed sample; according to PCR product size, NSCS 3 species-specific primer can identify *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp.

綠球藻經 NSCS 1 引子擴增後的 PCR 產物從電泳膠體切出後，委由基因定序公司進行定序，與 NCBI 基因資料庫進行比對 (Fig. 10A)，結果顯示與綠球藻 18S rRNA (accession number: MN879266.2) 基因序列符合，一致性達 99% (Fig. 10B)。擬球藻經 NSCS 1 引子擴增後的 PCR 產物經定序後，進行 NCBI 基因資料庫序列比對 (Fig. 11A)，結果顯示與擬球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: CP044589.1) 符合，一致性達 100% (Fig. 11B)。

綠球藻及擬球藻經 NSCS 3 引子進行擴增後的 PCR 產物經基因定序後與 NCBI 基因資料庫進行比對，結果顯示綠球藻樣品與綠球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: MN879266.2) 符合，一致性達 100% (data not shown)。擬球藻樣品與擬

(A)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Chlorella sp. UMT-B8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. UM...	628	628	99%	2e-175	99.71%	1746	MN879266.2
✓	Chlorella sp. isolate Pozzillo small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp.	628	628	99%	2e-175	99.71%	556	MT259188.1
✓	Chlorella sp. isolate Barcarello small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp.	628	628	99%	2e-175	99.71%	494	MT259187.1
✓	Chlorella sp. UMT-B13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. UM...	628	628	99%	2e-175	99.71%	1697	MN879272.1
✓	Parachlorella kessleri NKG021201 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Parachlorella ke...	628	628	99%	2e-175	99.71%	1731	LC505553.1
✓	Dictyosphaerium libertatis strain Xmm7S1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dictyosphaerium...	628	628	99%	2e-175	99.71%	1714	KY054951.1
✓	Dicloster acuatius strain Xmm25W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicloster acuatius	628	628	99%	2e-175	99.71%	1716	KY054950.1
✓	Dicloster acuatius strain Xmm31W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicloster acuatius	628	628	99%	2e-175	99.71%	1707	KY054949.1
✓	Dicloster acuatius strain Xmm20W1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicloster acuatius	628	628	99%	2e-175	99.71%	1716	KY054948.1
✓	Chlorella sp. HN08 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. HN08	628	628	99%	2e-175	99.71%	1716	KX943590.1

(B)

Chlorella sp. UMT-B8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenceSequence ID: [MN879266.2](#) Length: 1746 Number of Matches: 1Range 1: 25 to 368 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
628 bits(340)	2e-175	343/344(99%)	1/344(0%)	Plus/Plus
Query 2	TGCATGTCTAA-TATAAACTGCTTTTACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGT	60		
Sbjct 25	TGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTTACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGT	84		
Query 61	TATAGTTTATTTGATGGTACCTTACTACCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACG	120		
Sbjct 85	TATAGTTTATTTGATGGTACCTTACTACCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACG	144		
Query 121	TGCGTAAACCCCGACTCCTGGAAGGGCGTATTTATTAGATTTAAGGCCGACCCGGCTCT	180		
Sbjct 145	TGCGTAAACCCCGACTCCTGGAAGGGCGTATTTATTAGATTTAAGGCCGACCCGGCTCT	204		
Query 181	GCCGGTCTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGT	240		
Sbjct 205	GCCGGTCTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGT	264		
Query 241	TTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGT	300		
Sbjct 265	TTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGT	324		
Query 301	AACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT	344		
Sbjct 325	AACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT	368		

Fig. 10 (A) Alignment results of PCR products amplified by NSCS 1 primer with *Chlorella* sp. genomic DNA. (B) The results show 99% identity with *Chlorella* sp. genomic DNA 18S rRNA gene (accession number: MN879266.2).

球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: AB025533.1) 符合，一致性達 99% (data not shown)。但因 NSCS 3 所擴增的擬球藻 18S rRNA 基因序列太短 (180 bp)，NCBI 基因資料庫比對結果專一性不高 (data not shown)，序列辨識度較低，故本研究建議使用物種專一性引子 NSCS 1 應用於擬球藻與綠球藻快速品種鑑定。

本研究設計的物種專一性引子 NSCS 1 引子

可透過 PCR 反應擴增目標基因片段，以膠體電泳法區分目標基因片段的大小不同，可在三小時內快速準確的區分出擬球藻與綠球藻及其交叉污染的樣品，除可降低時間及成本的花費，減少有機溶劑的使用外，並提供基因定序上的驗證，避免因藻種的誤用而影響養殖成果，本技術將有助於養殖產業餌料生物的開發應用以及維持水產種苗的穩定生產。

(A)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Nannochloropsis oceanica strain BR2 chromosome 14	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	914843	CP044589.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain KB1 chromosome 14	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	878997	CP044557.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain IPPAS D-734 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1678	MN160639.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain LAMB2011 chromosome 6	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1340162	CP038132.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain LAMB2011 chromosome 2	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1596162	CP038117.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain LAMB2011 chromosome 14	Nannochloropsis oceanica	427	855	99%	5e-115	100.00%	961379	CP038111.1
✓	Nannochloropsis oceanica isolate KSPA38 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	840	MK158312.1
✓	Nannochloropsis sp. isolate PJ2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis sp.	427	427	99%	5e-115	100.00%	1748	MH444206.1
✓	Nannochloropsis oceanica strain IMP-BG-006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1677	MG224777.1
✓	Nannochloropsis oceanica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1647	KY399778.1

(B)

***Nannochloropsis oceanica* strain BR2 chromosome 14**

Sequence ID: [CP044589.1](#) Length: 914843 Number of Matches: 1

Range 1: 433825 to 434055 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
427 bits(231)	5e-115	231/231(100%)	0/231(0%)	Plus/Plus
Query 2	TACATGCATCAACTCCCAACTGCTTGTCGGACGGGATGTATTTATTAGATAGAAACCAAT	61		
Sbjct 433825	TACATGCATCAACTCCCAACTGCTTGTCGGACGGGATGTATTTATTAGATAGAAACCAAT	433884		
Query 62	GCGGGGCAACCCGGTATTGTGGTGAATCATGATAACTTTGCGGATCGCCGGCTTTGCCA	121		
Sbjct 433885	GCGGGGCAACCCGGTATTGTGGTGAATCATGATAACTTTGCGGATCGCCGGCTTTGCCA	433944		
Query 122	GCGACGAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCCTACCA	181		
Sbjct 433945	GCGACGAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCCTACCA	434004		
Query 182	TGGCTCTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT	232		
Sbjct 434005	TGGCTCTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT	434055		

Fig. 11 Alignment results of PCR products amplified by NSCS 1 primer with *Nannochloropsis* sp. genomic DNA (A). The results show 100% identity with *Nannochloropsis* sp. genomic DNA 18S rRNA gene (accession number: CP044589.1) (B).

參考文獻

- 金霞，金志芳，孫光舉，陳曦 (2010) 分光光度法測定海水中葉綠素含量的研究. 廣州化工, 38(4): 132-136.
- 蘇惠美 (1999) 餌料生物之培養與利用. 臺灣省水產試驗所東港分所, 105 pp.
- 蘇惠美，陳苑菁，王淑欣，陳紫嫻 (2014) 等鞭金藻與擬球藻脂肪酸組成分析及測定方法之探討. 水試專訊, 47: 11-15.
- Aguirre, C., N. Olivares, P. Luppichini and P. Hinrichsen (2015) A PCR-based diagnostic system for differentiating two weevil species (Coleoptera: Curculionidae) of economic importance to the Chilean Citrus Industry. J. Econ. Entomol., 108(1): 107-113.
- Al-Banna, L., A. T. Ploeg, V. M. Williamson and I. Kaloshian (2004) Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. J. Nematol., 36(2): 142-146.
- Boussiba, S., A. Vonshak, Z. Cohen, Y. Avissar and A. Richmond (1987) "Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*". Biomass, 12(1): 37-47.
- Boyd, C. E., L. R. D'Abramo, B. D. Glencross, D. C. Huyben, L. M. Juarez, G. S. Lockwood, A. A. McNevin, A. G. J. Tacon, F. Teletchea, J. R. Tomasso, C. S. Tucker and W. C. Valenti (2020) Achieving sustainable aquaculture: historical and current perspectives and future needs and challenges. J. World Aquacul. Soc., 51(3): 578-633.

- Dong, C. M., Y. J. Park, J. K. Noh, E. S. Noh, C. M. An, J. H. Kang, J. Y. Park and E. M. Kim (2019) Development of species-specific PCR primers for the rapid and simultaneous identification of the six species of Genus *Takifugu*. *Dev. Reprod.*, 23(4): 367-375.
- El-Sheekh, M., M. Abu-Faddan, A. Abo-Shady, M. Z. A. Nassar and W. Labib (2020) Molecular identification, biomass, and biochemical composition of the marine chlorophyte *Chlorella* sp. MF1 isolated from Suez Bay. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 18(1): 27.
- Fabris, M., R. M. Abbriano, M. Pernice, D. L. Sutherland, A. S. Commault, C. C. Hall, L. Labeeuw, J. I. McCauley, U. Kuzhiuparambil, P. Ray, T. Kahlke and P. J. Ralph (2020) Emerging technologies in algal biotechnology: toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. *Front. Plant Sci.*, 11: 279.
- Fahmy, N. T., J. T. Villinski, F. Bolay, C. A. Stoops, R. A. Tageldin, L. Fakoli, O. Okasha, P. J. Obenauer and J. W. Diclaro II (2015) The seasonality and ecology of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) in Liberia using molecular identification. *J. Med. Entomol.*, 52(3): 475-482.
- FAO (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: Contributing to Food Security and Nutrition for all. FAO, Rome, 200 pp.
- Hoek, van den C., D. G. Mann and H. M. Jahns (1996) *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge Univ. Press, 623 pp.
- Hua, K., J. M. Cobcroft, A. Cole, K. Condon, D. R. Jerry, A. Mangott, C. Praeger, M. J. Vucko, C. Zeng, K. Zenger and J. M. Strugnell (2019) The future of aquatic protein: Implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3): 316-329.
- Kanz, C., P. Aldebert, N. Althorpe, W. Baker, A. Baldwin, K. Bates, P. Browne, A. van den Broek, M. Castro, G. Cochrane, K. Duggan, R. Eberhardt, N. Faruque, J. Gamble, F. G. Diez, N. Harte, T. Kulikova, Q. Lin, V. Lombard, R. Lopez, R. Mancuso, M. McHale, F. Nardone, V. Silventoinen, S. Sobhany, P. Stoehr, M. A. Tuli, K. Tzouvara, R. Vaughan, D. Wu, W. Zhu and R. Apweiler (2005) The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res.*, 33(Database issue): D29-33.
- Khaw, Y. S., N. M. H. Khong, N. A. Shaharuddin and F. Md. Yusoff (2020) A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers. *J. Microbiol. Methods*, 172: 105890.
- Lubián, L. M., O. Montero, I. Moreno-Garrido, I. E. Huertas, C. Sobrino, M. G. Valle and G. Parés (2000) *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *J. Appl. Phycol.*, 12: 249-255.
- Madden, T. L., R. L. Tatusov and J. Zhang (1996) Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.*, 266: 131-141.
- Maruyama, I., T. Nakamura, T. Matsubayashi, Y. Ando and T. Maeda (1986) Identification of the alga known as "marine *chlorella*" as a member of the Eustigmatophyceae. *Jpn. J. Phycol.*, 34(4): 319-325.
- Matsuki, T., K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda and H. Oyaizu (1999) Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10): 4506-4512.
- Muir, A., E. Harrison and A. Wheals (2011) A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Res.*, 11(7): 552-563.
- Murphy, K. A., T. R. Unruh, L. M. Zhou, F. G. Zalom, P. W. Shearer, E. H. Beers, V. M. Walton, B. Miller and J. C. Chiu (2015) Using comparative genomics to develop a molecular diagnostic for the identification of an emerging pest *Drosophila suzukii*. *Bull. Entomol. Res.*, 105(3): 364-372.
- Ötles, S. and R. Pire (2001) Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. AOAC Int.*, 84(6): 1708-1714.
- Qiao, H., D. Hu, J. Ma, X. Wang, H. Wu and J. Wang (2019) Feeding effects of the microalga *Nannochloropsis* sp. on juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Algal Res.*, 41: 101540.
- Rasoul-Amini, S., Y. Ghasemi, M. H. Morowvat and A. Mohagheghzadeh (2009) PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. *Food Chem.*, 116(1): 129-136.
- Renaud, S. M., D. L. Parry, L. V. Thinh, C. Kuo, A. Padovan and N. Sammy (1991) Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. And *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.*, 3: 43-53.
- Tear, C., C. Lim, J. Wu and H. Zhao (2013) Accumulated lipids rather than the rigid cell walls impede the extraction of genetic materials for

- effective colony PCRs in *Chlorella vulgaris*. Microb. Cell Factories, 12: 106.
- Tocher, D. R. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Fish. Sci., 11(2): 107-184.
- Turchini, G. M., B. E. Torstensen and W. K. Ng (2009) Fish oil replacement in finfish nutrition. Rev. Aquacul., 1(1): 10-57.
- Varadinova, Z., Y. J. Wang, Z. Kučerová, V. Stejskal, G. Opit, Y. Cao, F. J. Li and Z. H. Li (2015) COI barcode based species-specific primers for identification of five species of stored-product pests from genus *Cryptolestes* (Coleoptera: Laemophloeidae). Bull. Entomol. Res., 105(2): 202-209.
- Walne, P. R. (1974) Culture of Bivalve Molluscs. 50 years' Experience at Conway. Fishing News (Books) Ltd. England, Surrey, 173 pp.
- Wan, M., J. N. Rosenberg, J. Faruq, M. J. Betenbaugh and J. Xia (2011) An improved colony PCR procedure for genetic screening of *Chlorella* and related microalgae. Biotechnol. Lett., 33(8): 1615-1619.
- Wu, F. Z., Z. H. Liu, H. Shen, F. Yu, J. Ma, X. Hu and L. Zeng (2014) Morphological and molecular identification of *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Yunnan, China. Fla. Entomol., 97(4): 1469-1473.
- Zhang, S., P. H. Liu, X. Yang, L. Zhang, N. Luo and J. Shi (2014) Isolation and identification by 18S rDNA sequence of high lipid potential microalgal species for fuel production in Hainan Dao. Biomass Bioenergy, 66: 197-203.
- Zhao, Z. H., B. Y. Cui, Z. H. Li, J. Fan, Q. Yang, Z. Kučerová, V. Stejskal, G. P. Opit, Y. Cao and F. Li (2016) The establishment of species-specific primers for the molecular identification of ten stored-product psocids based on ITS2 rDNA. Sci. Rep., 6: 21022.

Rapid Identification Technology for *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. with Species-specific Primer

Yi-Che Su, Zi-Yan Xu*, Shu-Ju Li, Sui-Sin Wang, Yang-De Chen and Feng-cheng Wu

Tungkang Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

A rapid and accurate detection method is required for variety identification in basic research, germplasm preservation, and field applications. The microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. exhibit striking similarities in appearance, yet differ in nutritional composition. *Nannochloropsis* sp. is rich in eicosapentaenoic acid (EPA), while *Chlorella* sp. is not. EPA is very important to the breeding rate of aquatic seedlings. Using the wrong algae to nourish the bait organisms and feed the seedlings may lead to a decrease in the breeding rate. Visual identification of algae may result in misjudgments, and traditional methods such as chlorophyll, fatty acids, and gene sequencing take 2-5 days and are cost-intensive. In this study, a species-specific primer was designed based on the differences in the 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene sequences between *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. The results indicate that using the species-specific primer NSCS 1 in polymerase chain reaction (PCR) enables the identification of *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp., as well as cross-contaminated samples, within 3 hours based on the different sizes of the amplified fragments. This helps avoid the negative impact on aquaculture outcomes due to the inadvertent use of the wrong algal species, contributing to the development of bait organisms in the aquaculture industry and the stable production of aquatic seedlings.

Key words: *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp., species-specific primers, variety identification, 18S ribosomal RNA gene

*Correspondence: No. 67, Fongyu St., Tungkang, Pingtung 92845, Taiwan. TEL: (08)8324121 ext. 285; FAX: (08)8320234; E-mail: zyxu@mail.tfrin.gov.tw

鱸鰻鰻苗細菌性口服疫苗開發研究

邱俊豪^{1*} · 李國誥² · 劉秉忠²

¹農業部水產試驗所東部漁業生物研究中心

²國立臺灣海洋大學水產養殖學系

摘 要

本研究旨在開發嗜水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 與愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 口服疫苗以改善鱸鰻 (*Anguilla marmorata*) 鰻苗在蓄養期間常見的細菌性疾病問題，提升其存活率。疫苗之製備係以福馬林不活化抗原後以 3% 褐藻酸鈉溶液或 6% 鄰苯二甲酸乙酸纖維素溶液作為殼材包覆，及福馬林不活化抗原以超音波細胞均質機處理 1.5 hr，再以 5% 褐藻酸鈉溶液或 9% 鄰苯二甲酸乙酸纖維素溶液包覆。鰻苗經口服接種疫苗後血清抗體力價有顯著性上升，分別以 *A. hydrophila* 與 *E. tarda* 進行腹腔攻毒注射，單次接種組以褐藻酸鈉組優於鄰苯二甲酸乙酸纖維素組，其效果於第 8 週達最佳。二次接種組可顯著提升鰻苗之血清抗體力價並延長疫苗效果至第 12 週，抗原經均質處理後則能提高抗原包覆量而達到更好的疫苗效果。本研究顯示施用口服疫苗可協助抗原通過胃酸到達腸道並因而激活免疫反應，有效提升鱸鰻對此二病原之抵抗能力。

關鍵詞：鱸鰻、嗜水性產氣單胞菌、愛德華氏菌、口服疫苗、免疫系統

前 言

鰻鱺科是由 16 種鰻鱺所組成，多分布在太平洋東部以及大西洋南部之熱帶與溫帶海域 (Silfvergrip, 2009)。鰻鱺為降河產卵魚類，最終會返回海洋進行產卵，世代長度取決於物種及地理位置等因素 (Jacoby and Gollock, 2014; Jacoby *et al.*, 2014)。日本一直被認為是鰻魚的經濟主導市場，然而從 1960 年後，日本鰻玻璃鰻因每年捕撈以及非法買賣，導致日本開始尋求進口之替代物種。根據聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 報告顯出，日本對於鰻魚消費量雖有下降，但是中國鰻魚的進口量卻沒有下降，推測是有新的物種作為替代 (Shiraishi and Crook, 2015)。臺灣於 1989 年因過度捕撈、洄游路徑受阻、鰻苗不當丟棄等原因將鱸鰻列入保育動物名錄。爾後有鑑於各縣市致力鱸鰻保育工作之成效，經科學評估，

臺灣本土鱸鰻資源量已有恢復之情況，且在眾多科學證據支持下，農委會 (現為農業部) 於 2009 年解除鱸鰻禁捕令，自此鱸鰻可在臺灣合法進行養殖及販售，連帶異種鰻 (歐洲鰻、美洲鰻、澳洲寬鰭鰻、鱸鰻、太平洋雙色鰻、印尼短鰭鰻、莫三比克鰻等) 養殖風潮也逐漸興起。因臺灣地區日本鰻苗捕獲量銳減，依據 2021 年漁業統計年報顯示，鰻魚苗產量約 800 萬尾，產值高達 5.5 億元，未來除找出日本鰻替代物種外，維持鰻魚養殖穩定性亦為重要。

臺灣異種鰻養殖地區多分布於中、南及東部地區，其中又以屏東為最主要之養殖地區；在眾多異種鰻品項中，又以鱸鰻和黑鰻 (太平洋雙色鰻及印尼短鰭鰻) 為臺灣主要放養的異種鰻品種。

過去鰻魚養殖時期所遇到的疾病和問題，依然出現在現今的鱸鰻養殖上，如病毒方面有柱狀壞死病毒 (eel birnavirus) 的報告 (Lee *et al.*, 1999) 以及疱疹病毒 (*Herpesvirus anguillae*) 的研究 (Davidse *et al.*, 1999; Hangalapura *et al.*, 2007)。細菌方面有 *Aeromonas hydrophila* (Guo *et al.*, 2014; 徐, 2015)、*Edwardsiella tarda* (Alcaide *et al.*, 2006; 徐, 2015)、偽單胞菌 (*Pseudomonas anguilliseptica*) 以及

* 通訊作者/臺東縣成功鎮五權路 22 號, TEL: (089)850090#304; FAX: (089) 850092; E-mail: jhchiou@mail.tfrin.gov.tw

Enterobacteriaceae 等腸道菌 (Alcaide *et al.*, 2006)。寄生蟲方面有擬指環蟲 (Denmark, 1987)、微孢子蟲 (*Pleistophora anguillarum*) (Joh *et al.*, 2007)、鰻線蟲 (*Anguillicola crassus*) (Knopf *et al.*, 2000; Sures and Knopf, 2004)、車輪蟲 (*Trichodina* spp.; *Trichodinella* spp.) (Dung *et al.*, 2014)、指環蟲 (*Dactylogyrus* sp.) (Abdelmonem *et al.*, 2009) 等的感染。

自 1940 年來首篇作為魚類預防疾病的疫苗開發是由 Snieszko and Friddle (1949) 發表，爾後也相繼開發許多疫苗，每年也有數以萬計之魚類接種疫苗，例如挪威自使用疫苗後，減少抗生素的使用 (Rodger, 2016) 且疫苗接種已成為控制魚類感染性疾病最具成本效益及可持續性的方法之一 (Horzinek *et al.*, 1997; Radhakrishnan *et al.*, 2022)。

為提升鱸鰻鰻苗育成率，促進鱸鰻養殖產業發展，本研究擬針對鱸鰻養殖過程常見的細菌病原 *A. hydrophila* 與 *E. tarda* 製備雙價口服疫苗進行投餌接種，並比較藻膠酸鈉殼材以及鄰苯二甲酸乙酸纖維素對口服疫苗的效力的提升效果，同時再利用不活化抗原均質處理，探討其對鱸鰻鰻苗的免疫力的效益。

材料與方法

一、實驗菌株

(一) 菌株來源

本研究所使用的菌株為 *A. hydrophila* 及 *E. tarda*，為 2015 年由宜蘭鰻苗中間養成場瀕死病體肝臟及腎臟所分離純化之菌株。聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 檢測 *A. hydrophila* 所使用之引子參考 Chu and Lu *et al.* (2005) 之方法，預計增幅產物約 685 base pair (bp)；*E. tarda* 所使用之引子參考 Savan *et al.* (2004) 之方法，預計增幅產物約 290 bp。

(二) 菌株強化

將實驗菌株培養培養於 0.5% NaCl 胰蛋白胨大豆瓊脂 (tryptone soy agar, TSA) 上，於 30°C 下培養 24 hr，使用無菌之 PBS (phosphate buffer saline, pH = 7.2)，兩菌株最初以 10^8 CFU/g fish body weight 之最終接受劑量對鰻苗 (1000 尾/kg) 行腹腔注

射，期間停止投餌 3 日、每日換水並觀察 1 週，待魚體瀕臨死亡時，從肝、脾及後腎進行分離並鑑定，之後根據魚隻之死亡情形，逐次降低注射菌液之濃度並求得其半致死劑量 (lethal dose 50%, LD₅₀)。

二、多價疫苗製備

(一) 抗原製備

將菌株 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 各別活化於含 0.5% NaCl TSA 之瓊脂平板上 (面積約 50 cm²)，於 30°C 培養 24 hr，利用 PBS 沖洗菌落製成菌懸液，再將菌懸液塗佈於已覆蓋 cellophane 之含 0.5% NaCl TSA 之滅菌鐵盤上 (面積約 875 cm²) 以大量生產抗原，於 30°C 培養 24 hr，利用少量 PBS 沖洗、濕潤 cellophane 上之細菌，再以滅菌 L 棒收集菌體於 50 ml 離心瓶。以 $19,500 \times g$ 離心 90 min，倒去上清液，重複三次，最後以適量 PBS 懸浮，加入總體積 1% (v/v) 之 37% 福馬林進行不活化，置於室溫下搖晃三天後抽取 100 μ l 塗佈於 0.5% NaCl TSA 上，後將此 TSA 以 30°C 培養 24 hr，確認不活化完成。最後以 $19,500 \times g$ 離心 90 min，倒去上清液，再以 PBS 沖散沉澱菌塊，重複上述動作 3 次，置於 4°C 下備用。

(二) 褐藻酸鈉包覆製備

取濃度 10^{11} CFU/ml 福馬林不活化菌體與 3% 褐藻酸鈉 (Sigma-Aldrich) 水溶液以 1:1 比例混合，成為 1.5% 褐藻酸鈉 - 不活化菌體混合液。將混合液以 1:9 的比例加入含 0.05% span 80 之大豆油中，以轉速 500 rpm 攪拌至乳化。爾後再加入等體積之 1.5% CaCl₂ (含 3% 乙酸，45% 乙醇) 水溶液攪拌 10 min，再加入等體積相同濃度之 CaCl₂ 水溶液，靜置等待微顆粒沉澱後，低速離心使溶液與顆粒分離，倒去上部液體，取下微顆粒，再使用冷凍乾燥機去除水分備用。*A. hydrophila* 及 *E. tarda* 之 1:1 混合菌載量約為 5.77×10^{11} CFU/g (後同)。

(三) 鄰苯二甲酸乙酸纖維素包覆製備

將鄰苯二甲酸乙酸纖維素顆粒 (cellulose acetate phthalate, CAP) (Sigma-Aldrich) 溶於 100% 丙酮，製成 6% CAP 溶液，再與濃度 10^{11} CFU/ml

的福馬林不活化菌體以 9:1 比例混合，均勻混合後利用抽風裝置去除丙酮，最後將成品製成粉末備用，菌載量約為 4.02×10^{11} CFU/g。

(四) 抗原均質後包覆製備

福馬林不活化之菌液以超音波細胞均質機 (Sonic Vibra cell, VCX 500/750) 以 pulse on: 10 sec; pulse off: 2 sec，進行細胞均質處理 1.5 hr，期間每 0.5 hr 將菌液均勻搖晃 10 sec，完畢後置於 4°C 下備用。

包覆製備步驟同上，惟褐藻酸鈉水溶液濃度更改為 5%，CaCl₂ 濃度改為 2.5%，菌載量約為 9.13×10^{11} CFU/g。CAP 製備成 9% 溶液，菌載量約為 5.94×10^{11} CFU/g。

三、免疫試驗

(一) 實驗設計

將鰻苗分成 9 組，每組 200 尾，蓄養於 64 L 之玻璃缸內，玻璃缸蓄淡水 48 L，水溫為 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 且有打氣，每日換水且所用之水取於蓄水桶中，蓄水桶之水以 5 ppm ClO₂ 消毒後打氣至少 8 hr 後才使用。疫苗組分別為褐藻酸鈉組 (Alginate)、褐藻酸鈉均質組 (Alginatesonicated, AS)、褐藻酸鈉二次接種組 (Alginateboost, AB)、褐藻酸鈉均質二次接種組 (ASB)、CAP 組、CAP 均質組 (CS)、CAP 二次接種組 (CB)、CAP 均質二次接種組 (CSB) 以及對照組 (control)。以每日兩餐的方式進行投餵，每餐重量為總重的 5%，其中實驗組投餵之飼料係以 10% 疫苗 (第一次接種，Alginate 組每隻的每日接受抗原量為 1.74×10^{10} ；CAP 組為 1.17×10^{10} ；AS 組為 2.74×10^{10} ；CS 組為 1.79×10^{10} 。二次接種，AB 組為 2.18×10^{10} ；ASB 組為 3.43×10^{10} ；CB 組為 1.46×10^{10} ；CSB 組為 2.24×10^{10} CFU/g fish body weight)、10% 赤蟲及 80% 鰻粉混合，持續投餵 1 週，之後以全鰻粉投餵；對照組只投餵鰻粉，二次接種則於第 5 週進行第二次投餵。於第 4、8、12、16 週進行腹腔注射攻毒試驗，每組取 10 尾；第 2、4、6、8、10、12、14、16 週進行採血，每組取 5 尾，3 重複，分析其血清抗體力價。

(二) 攻毒試驗

先將欲攻毒之實驗菌株培養於 0.5% NaCl 的 TSA 上，於 30 °C 培養 24 hr，利用滅過菌之 PBS 製成菌懸液，調整濃度為 20 倍 LD₅₀ (*A. hydrophila*: 2.0×10^7 CFU/g fish body weight; *E. tarda*: 1.8×10^6 CFU/g fish body weight)，以腹腔注射進行攻毒。實驗期間停止餵食 3 日、每日換水 (30 - 40%) 並觀察 2 週，統計死亡率後計算出相對活存率 (relative percent survival, RPS)。瀕臨死亡、死亡魚隻皆由肝、脾以及後腎進行採樣，分離及純化強勢菌種後進行 PCR 鑑定。

$$RPS = 100 \times \left(1 - \frac{\text{疫苗組死亡率 (\%)}}{\text{對照組死亡率 (\%)}}\right)$$

(三) 血清抗體力價分析

本研究使用酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 進行分析。將實驗菌株製成菌懸液，並調整濃度至 108 CFU/ml 後加入 100 μl 菌懸液於 96 孔盤中，置於 4°C overnight，隔日將菌懸液倒掉後，加入 100 μl 含 0.5% 脫脂奶粉之 PBS，於 37°C 培養 2 hr 後倒去液體，以 1×wash solution 清洗 3 次，加入已將蛋白量定量為 10 μg/ml 之待測樣本血清，於 37°C 培養 2 hr 後倒去液體，以 1×wash solution 清洗 3 次，加入 100 μl Rabbit anti - *Anguilla marmorata* IgM (以 PBS 稀釋 2500 倍)，於 37°C 培養 2 hr 後倒去液體，以 1×wash solution 清洗 3 次，再加入 100 μl Goat anti - Rabbit IgG，HRP conjugate (以 PBS 稀釋 2500 倍) 於 37°C 培養 2 hr 再倒去液體，以 1×wash solution 清洗 3 次，最後加入呈色劑反應 30 min，用 ELISA reader 以波長 405 nm 下測定吸光值。

四、統計分析

將實驗所得之血清抗體力價及血液非特異性免疫力價數據利用 SAS/PC (SAS/PC version, SAS Institute, Cary, CA, USA) 套裝軟體進行單變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA, one-way) 測試各實驗組是否有差異，再以 Duncan's New-multiple Range Test 比較各處理組間差異之顯著性，顯著水準定為 $p < 0.05$ 。

結 果

一、菌株鑑定

將實驗菌株以專一性引子進行聚合酶連鎖反應，經洋菜膠膠體電泳後，菌株 *A. hydrophila* 之 DNA 萃取物於 685 bp 出現專一性的 PCR 產物 (Fig. 1)；菌株 *E. tarda* 則於 290 bp 出現專一性的 PCR 產物 (Fig. 2)，此兩實驗菌株確實為 *A. hydrophila* 及 *E. tarda*。*A. hydrophila* 之 LD_{50} 為 1.00×10^6 CFU/g fish body weight，*E. tarda* 之 LD_{50} 為 9.05×10^4 CFU/g fish body weight。

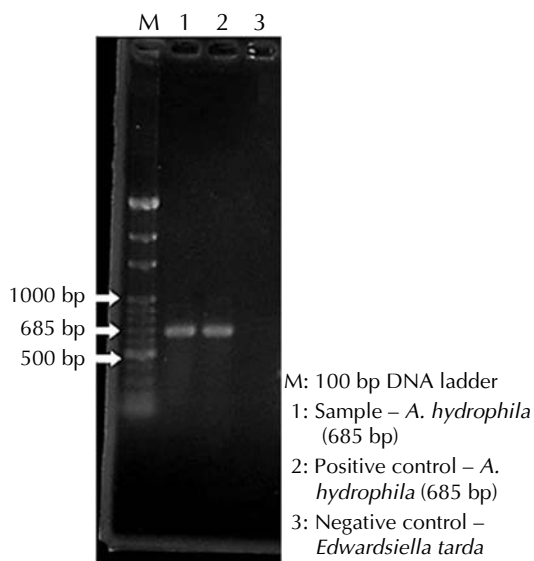


Fig. 1 Gel electrophoresis of *Aeromonas hydrophila* collected from dying or dead eels.

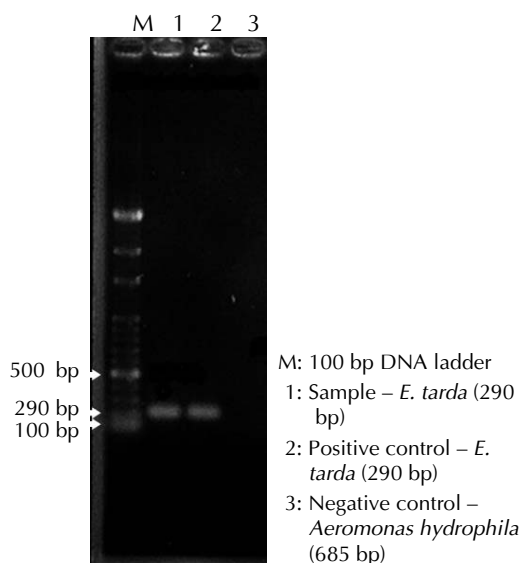


Fig. 2 Gel electrophoresis of *Edwardsiella tarda* collected from dying or dead eels.

二、接種二價口服疫苗後之攻毒試驗

將實驗魚以 *A. hydrophila* 攻毒後之結果呈現於 Table 1，第 4 週以褐藻酸鈉組之 RPS 優於鄰苯二甲酸乙酸纖維素組；各組 RPS 自第 8 週起，二次接種組別較無接種組高，以有抗原均質處理組高於無均質處理組，褐藻酸鈉組優於鄰苯二甲酸乙酸纖維素組，實驗魚隻以 *E. tarda* 攻毒後之結果呈現於 Table 2，其結果與 *A. hydrophila* 之結果相似。本實驗攻毒後之瀕臨死亡或死亡鰻隻所分離及純化之強勢菌種皆為攻毒菌種。

三、二價疫苗之有效性與時間性之抗體力價分析

以 *A. hydrophila* 為抗原進行抗體力價分析，其結果如 Table 3。第 2 週各處理組抗體力價皆有提升，處理組與對照組已有顯著差異，AS 及 ASB 組顯著高於其他組；第 4 週處理組有小幅度提升，處理組與對照組有顯著差異，AS 及 ASB 組顯著高於其他組；第 6 週各處理組抗體力價有上升之現象，二次接種組有更大幅度之提升，以 Alginate-SB 組顯著高於其他組；第 8 週各處理組有微量之上升，處理組與對照組有顯著差異，以 AB 及 ASB 組顯著高於其他組；第 10 週除 AB 組、AS 組、ASB 組、CAP 組、CB 組及 CSB 組之抗體力價有上升外，其餘皆下降，各處理組與對照組有顯著差異，AB 及 ASB 組顯著高於其他組；第 12 週，除 AB 組、ASB 組、CB 組及 CSB 組之抗體力價有持平與些微上升，其餘皆小幅度下降，各處理組與對照組有顯著差異，以 AB 及 ASB 組顯著高於其他組；第 14 週除 ASB 組之抗體力價持平以及 CAP 組有些微上升外，其他各處理組皆下降，各處理組與對照組有顯著差異，以 ASB 組最為顯著；第 16 週每組處理組之抗體力價皆呈現下降，處理組與對照組有顯著差異，AB 及 ASB 組顯著高於其他組別。

以 *E. tarda* 為抗原進行抗體力價分析，其結果如 Table 4。第 2 週各處理組抗體力價有提升但差異性不大，與對照組間已有顯著差異；第 4 週發現處理組 Alginate 包埋組與 CAP 包埋組開始出現差異性；第 6 週單次與二次接種組發生顯著性差異，二次接種組別之抗體力價提升幅度大，尤

其 CS 與 CSB 組間差異最大；第 8 週各處理組上升之現象，以 ASB 組之值最明顯；第 10 週 Alginate 組、CAP 組及 CS 組之值下降，其餘處理組皆持續上升，ASB 組效果最顯著；第 12 週除 AB 組及 CSB 組有小幅上升外，其餘皆下降；第 14 週僅

ASB 組有上升之現象，其餘處理組皆下降；第 16 週除 ASB 及 CS 組有小幅上升，其餘皆下降，其中 ASB 組自第 10 週起，血清抗體力價顯著高於其他各組。

Table 1 Survival rate and relative percent survival (RPS) of *Anguilla marmorata* after receiving oral bacterial vaccines, followed by intraperitoneal injection challenge with *Aeromonas hydrophila* (2.0×10^7 CFU/g fish body weight) at different timepoints (in weeks)

Time (Weeks)	Group	Mortality	Survival rate (%)	RPS (%)
4	Control	9/10	10	-
	Alginate	2/10	80	78
	AS	2/10	80	78
	AB	3/10	70	67
	ASB	2/10	80	78
	CAP	4/10	60	56
	CS	4/10	60	56
	CB	4/10	60	56
	CSB	3/10	70	67
8	Control	10/10	0	-
	Alginate	2/10	80	80
	AS	1/10	90	90
	AB	0/10	100	100
	ASB	0/10	100	100
	CAP	3/10	70	70
	CS	3/10	70	70
	CB	2/10	80	80
	CSB	1/10	90	90
12	Control	10/10	0	-
	Alginate	3/10	70	70
	AS	2/10	80	80
	AB	1/10	90	90
	ASB	0/10	100	100
	CAP	4/10	60	60
	CS	3/10	70	70
	CB	2/10	80	80
	CSB	2/10	80	80
16	Control	9/10	10	-
	Alginate	3/10	70	67
	AS	2/10	80	78
	AB	2/10	80	78
	ASB	1/10	90	89
	CAP	3/10	70	67
	CS	2/10	80	78
	CB	2/10	80	78
	CSB	2/10	80	78

Table 2 Survival rate and relative percent survival (RPS) of *Anguilla marmorata* after vaccination with oral bacterial vaccines followed by intraperitoneal injection challenge with *Edwardsiella tarda* (1.8×10^6 CFU/g fish body weight) at different timepoints (in weeks)

Time (Weeks)	Group	Mortality	Survival rate (%)	RPS (%)
4	Control	10/10	0	-
	Alginate	5/10	50	50
	AS	3/10	70	70
	AB	4/10	60	60
	ASB	3/10	70	70
	CAP	7/10	30	30
	CS	6/10	40	40
	CB	6/10	40	40
	CSB	6/10	40	40
8	Control	10/10	0	-
	Alginate	3/10	70	70
	AS	2/10	80	80
	AB	0/10	100	100
	ASB	0/10	100	100
	CAP	3/10	70	70
	CS	3/10	70	70
	CB	2/10	80	80
	CSB	2/10	80	80
12	Control	10/10	0	-
	Alginate	3/10	70	70
	AS	2/10	80	80
	AB	1/10	90	90
	ASB	0/10	100	100
	CAP	4/10	60	60
	CS	3/10	70	70
	CB	2/10	80	80
	CSB	2/10	80	80
16	Control	10/10	0	-
	Alginate	5/10	50	50
	AS	3/10	70	70
	AB	2/10	80	80
	ASB	0/10	100	100
	CAP	5/10	50	50
	CS	4/10	60	60
	CB	3/10	70	70
	CSB	3/10	70	70

Table 3 Serum antibody titer against *Aeromonas hydrophila* from *Anguilla marmorata* after oral vaccination

	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Control	0.89±0.20 ^{A,b}	0.91±0.07 ^{E,b}	0.95±0.05 ^{E,a}	0.87±0.02 ^{H,b}	0.92±0.03 ^{F,ab}	0.95±0.05 ^{F,a}	0.90±0.01 ^{F,ab}	0.91±0.10 ^{E,ab}	0.89±0.12 ^{D,b}
Alginate	0.89±0.20 ^{A,g}	1.31±0.05 ^{C,de}	1.35±0.20 ^{C,cd}	1.43±0.03 ^{E,b}	1.49±0.04 ^{D,a}	1.41±0.08 ^{D,b}	1.36±0.17 ^{D,c}	1.29±0.14 ^{D,e}	1.21±0.20 ^{C,f}
AS	0.89±0.20 ^{A,d}	1.42±0.13 ^{A,c}	1.50±0.07 ^{A,b}	1.53±0.06 ^{D,b}	1.60±0.31 ^{BC,a}	1.62±0.12 ^{B,a}	1.59±0.13 ^{B,a}	1.51±0.09 ^{C,b}	1.43±0.23 ^{B,c}
AB	0.89±0.20 ^{A,e}	1.35±0.09 ^{B,d}	1.36±0.05 ^{C,d}	1.62±0.05 ^{B,c}	1.69±0.04 ^{A,b}	1.73±0.09 ^{A,a}	1.74±0.07 ^{A,a}	1.70±0.13 ^{B,ab}	1.68±0.14 ^{A,b}
ASB	0.89±0.20 ^{A,g}	1.40±0.03 ^{A,f}	1.49±0.03 ^{A,e}	1.67±0.04 ^{A,d}	1.69±0.04 ^{A,cd}	1.73±0.14 ^{A,bc}	1.79±0.16 ^{A,a}	1.79±0.15 ^{A,a}	1.76±0.25 ^{A,ab}
CAP	0.89±0.20 ^{A,f}	1.27±0.04 ^{D,cde}	1.31±0.10 ^{D,bcd}	1.40±0.04 ^{G,ab}	1.42±0.06 ^{E,a}	1.33±0.16 ^{E,abc}	1.23±0.44 ^{E,de}	1.25±0.29 ^{D,cde}	1.16±0.56 ^{C,e}
CS	0.89±0.20 ^{A,e}	1.31±0.04 ^{C,c}	1.42±0.03 ^{B,b}	1.46±0.05 ^{E,ab}	1.51±0.06 ^{D,a}	1.48±0.35 ^{C,ab}	1.47±0.26 ^{C,ab}	1.30±0.33 ^{D,c}	1.22±0.12 ^{C,d}
CB	0.89±0.20 ^{A,f}	1.35±0.07 ^{B,e}	1.35±0.02 ^{C,e}	1.55±0.04 ^{C,ab}	1.59±0.07 ^{C,ab}	1.61±0.09 ^{B,a}	1.62±0.18 ^{B,a}	1.51±0.22 ^{C,c}	1.46±0.19 ^{B,d}
CSB	0.89±0.20 ^{A,f}	1.31±0.11 ^{C,e}	1.41±0.08 ^{B,d}	1.54±0.02 ^{D,b}	1.63±0.06 ^{B,a}	1.63±0.17 ^{B,a}	1.64±0.04 ^{B,a}	1.53±0.25 ^{C,bc}	1.48±0.16 ^{B,c}

Different letters (A, B, C, D, E, F, G, and H) in the same column indicate a significant difference ($p<0.05$) was observed.

Different letters (a, b, c, d, e, f, g) in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) was observed.

Table 4 Serum antibody titer against *Edwardsiella tarda* from *Anguilla marmorata* after oral vaccination

	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Control	1.12±0.10 ^{A,a}	1.15±0.02 ^{C,a}	1.08±0.07 ^{D,a}	1.00±0.07 ^{G,a}	0.95±0.30 ^{E,ab}	0.97±0.07 ^{E,ab}	1.00±0.01 ^{F,a}	0.89±0.12 ^{F,b}	0.97±0.07 ^{H,ab}
Alginate	1.12±0.10 ^{A,g}	1.43±0.28 ^{A,e}	1.56±0.32 ^{A,bc}	1.63±0.13 ^{CD,ab}	1.71±0.25 ^{C,a}	1.64±0.42 ^{C,ab}	1.54±0.17 ^{DE,cd}	1.47±0.14 ^{DE,de}	1.30±0.05 ^{G,f}
AS	1.12±0.10 ^{A,f}	1.33±0.42 ^{AB,e}	1.55±0.47 ^{A,d}	1.59±0.04 ^{DE,cd}	1.72±0.29 ^{B,ab}	1.78±0.05 ^{C,a}	1.75±0.13 ^{C,a}	1.73±0.19 ^{C,ab}	1.65±0.17 ^{D,ab}
AB	1.12±0.10 ^{A,e}	1.36±0.43 ^{AB,d}	1.48±0.35 ^{ABC,c}	1.73±0.43 ^{AB,b}	1.83±0.41 ^{B,ab}	1.85±0.10 ^{B,a}	1.87±0.07 ^{B,a}	1.80±0.06 ^{B,ab}	1.73±0.10 ^{BC,b}
ASB	1.12±0.10 ^{A,f}	1.41±0.16 ^{A,e}	1.53±0.37 ^{AB,d}	1.78±0.08 ^{A,c}	1.96±0.27 ^{A,b}	2.12±0.40 ^{A,a}	2.10±0.41 ^{A,a}	2.19±0.31 ^{A,a}	2.20±0.06 ^{A,a}
CAP	1.12±0.10 ^{A,f}	1.28±0.22 ^{B,e}	1.44±0.09 ^{BC,bcd}	1.53±0.22 ^{EF,b}	1.64±0.11 ^{D,a}	1.52±0.39 ^{D,b}	1.47±0.51 ^{E,bc}	1.41±0.25 ^{E,cd}	1.36±0.11 ^{F,de}
CS	1.12±0.10 ^{A,e}	1.40±0.37 ^{A,d}	1.40±0.08 ^{C,d}	1.50±0.36 ^{F,c}	1.69±0.12 ^{C,a}	1.68±0.17 ^{C,a}	1.60±0.12 ^{D,b}	1.51±0.04 ^{D,c}	1.52±0.06 ^{E,c}
CB	1.12±0.10 ^{A,f}	1.32±0.20 ^{AB,e}	1.44±0.21 ^{BC,d}	1.68±0.17 ^{BC,c}	1.76±0.10 ^{B,ab}	1.80±0.10 ^{B,a}	1.77±0.06 ^{C,ab}	1.75±0.15 ^{BC,b}	1.69±0.10 ^{CD,c}
CSB	1.12±0.10 ^{A,f}	1.40±0.18 ^{A,e}	1.49±0.23 ^{ABC,d}	1.72±0.15 ^{AB,c}	1.83±0.15 ^{B,b}	1.87±0.04 ^{B,ab}	1.89±0.01 ^{B,a}	1.76±0.18 ^{BC,c}	1.74±0.22 ^{B,c}

Different letters (A, B, C, D, E, F, G, and H) in the same column indicate a significant difference ($p<0.05$) was observed.

Different letters (a, b, c, d, e, f, g) in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) was observed.

討 論

至 2019 年全球已有 26 種市售魚類疫苗，但多位於歐美國家且用於冷水魚種如鮭、鱒魚類 (Ma *et al.*, 2019)。鰻魚為臺灣重要之養殖水產品且以輸出日本為大宗，但因藥物殘留之事件層出不窮，致日本對於從本國輸出的活鰻進行更為嚴格的藥物殘留檢驗方式，因此研發疫苗之防疫手段成為目前水產養殖發展的主要目標之一 (蕭, 2009; Gudding and Van Muiswinkel, 2013)。口服方式給予疫苗是最便捷之方法，對生物造成的緊迫也最小 (Mutoloki *et al.*, 2015)，但需克服腸胃道酸性環境的破壞，因此找尋最合適的包覆方式，可幫

助疫苗效力的改善 (Johnson and Amend, 1983; Adams *et al.*, 2006)。二次接種疫苗後，其保護力優於單次接種 (Joosten *et al.*, 1997; Tobar *et al.*, 2014)。褐藻酸係一多醣且在水產養殖上常作為一種免疫刺激物，促進巨噬細胞之活性以提高魚類非特異性免疫功能 (Yang and Jones, 2009)，於小鼠研究中亦證實其可增強免疫能力 (Huang *et al.*, 2021)。近年來仍不斷有研究以不同或改良殼材將免疫性物質包覆，以提升口服免疫的效力 (Pumchan *et al.*, 2022)，根據葉 (2012)、楊 (2014) 及徐 (2015) 等人之疫苗研究，本研究選用效果較好之鄰苯二甲酸乙酸纖維素及褐藻酸鈉作為抗原包覆殼材；參照林 (2016) 以不活化抗原，再均質

處理後進行試驗，探討除包覆材料及佐劑添加外，抗原的再加工是否對疫苗效果有影響。

本研究結果發現，單次接種褐藻酸鈉組以 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 攻毒結果，其最佳 RPS 於第 8 週有 80%、70%；鄰苯二甲酸乙酸纖維素組亦於第 8 週有 70%、70%。相較過去之發表結果，葉 (2012) 以褐藻酸鈉包覆 *V. alginolyticus* 及 *V. carchariae* 後以口服方式接種石斑魚後進行 10 倍 LD₅₀ 攻毒試驗，最佳 RPS 分別發現於第 8 週 75% 及第 4 週 88.89%。徐 (2015) 以褐藻酸鈉及鄰苯二甲酸乙酸纖維素包覆 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 後以口服方式接種鱸鰻苗後進行 10 倍 LD₅₀ 攻毒試驗，褐藻酸鈉組最佳 RPS 於第 12 週達 80%、90%；鄰苯二甲酸乙酸纖維素組於第 8 週達 90% 及 80%。本研究 RPS 成效不如葉及徐之研究，推測其原因為本研究使用 20 倍之 LD₅₀ 進行注射攻毒所致，但疫苗效果的趨勢皆主要出現於第 8 週。於二次接種實驗中，疫苗效力較單次好，且延長至第 12 週後才趨降，截至實驗結束之第 16 週仍與對照組有顯著性差異。於 Choi *et al.* (2011) 以單次接種及第 2 週二次口服接種 10⁸ 與 10⁹ CFU/fish 之 *E. tarda* 於牙鯡 (*Paralichthys olivaceus*) 之結果發現，於第 3 週進行攻毒試驗後，單次接種 10⁹ CFU/fish 及先接種 10⁹ CFU/fish 再接種 10⁸ CFU/fish *E. tarda* 皆為 100% RPS，表示疫苗於牙鯡中可保持至少 3 週之效力。在抗原有無均質處理組的比較中，發現有經過均質疫苗處理組之保護力優於無處理組，此結果與林 (2016) 相符，認為係包覆之抗原量不同所致，此結果與 Anuradha *et al.* (2010) 分別以 *A. hydrophila* 10⁶ 及 10⁸ CFU/g of feed 口服接種吳郭魚，高濃度下有較好的保護率效果相符。褐藻酸鈉效果優於鄰苯二甲酸乙酸纖維素推測係因非特異性免疫刺激所得之結果。

依據鰻苗抗體力價結果顯示，單次口服接種疫苗之保護最佳效果於第 8 週，未來可嘗試於不同時間點進行第二次接種，尋找疫苗之最大效益。一般養殖池菌體大量繁殖係因水中營養過高且於高溫下細菌繁殖速度增快所致，而本實驗所用菌株皆為環境常在菌且鰻魚無論幼鰻或成鰻皆易受其感染，故此疫苗之接種建議可於進入高溫期前使用，以度過易感染週期並減少抗生素之投入，降低對環境之衝擊。

參考文獻

- 漁業署 (2021) 中華民國110年台閩地區漁業統計年報。行政院農業委員會漁業署，臺北，臺灣。
- 林超群 (2016) 以生物殼材包覆福馬林不活化及超音波震碎腸炎及創傷弧菌作為口服疫苗對養殖石斑之保護效果。國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 85 pp.
- 徐程鈞 (2015) 鱸鰻苗鹽度馴化及細菌性疾病防治研究。國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 51 pp.
- 楊政勳 (2014) 不同殼材包覆溶藻弧菌與鮫弧菌口服疫苗對養殖石斑魚之有效性研究。國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 56 pp.
- 葉偉生 (2012) 弧菌二價疫苗及微球體包覆口服疫苗應用於石斑魚上之研究。國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 119 pp.
- 蕭宇辰 (2009) 愛德華氏菌及嗜水性產氣單胞菌混合疫苗對日本鰻保護之效果研究。國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 89 pp.
- Abdelmonem, A. A., M. M. Mohamed and S. H. Metwally (2009) Pathological studies on some parasitic diseases of eel (*Anguilla anguilla*). Egypt. J. Comp. Pathol. Clin. Pathol., 22 (3): 96-113.
- Adams, A. and K. D. Thompson (2006) Biotechnology offers revolution to fish health management. Trends Biotechnol., 24(5): 201-205.
- Alcaide, E., S. Herraiz and C. Esteve (2006) Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla* from Mediterranean Spain. Dis. Aquat. Org., 73: 77-81.
- Anuradha, K., H. L. Foo, N. S. Mariana, T. C. Loh, K. Yusoff, M. D. Hassan, H. Sasan and A. R. Raha (2010) Live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing aerolysin genes D1 and D4 for protection against *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Appl. Microbiol., 109(5): 1632-1642.
- Choi, S. H., M. S. Kim, and K. H. Kim (2011) Protection of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Edwardsiella tarda* infection by oral administration of auxotrophic mutant *E. tarda* (Δ alr Δ asd *E. tarda*). Aquaculture, 317(1-4): 48-52.
- Chu, W. H. and C. P. Lu (2005) Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. J. Fish. Dis., 28: 437-441.
- Davidse, A., O. L. M. Haenen, S. G. Dijkstra, A. P. van Nieuwstadt, T. J. K. van der Vorst, F. Wagenaar and G. J. Wellenberg (1999) First isolation of

- herpesvirus of eel (*Herpesvirus anguillae*) in diseased European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Europe. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 19(4): 137.
- Denmark, F. C. (1987) Pseudodactylogyrus infections in eel: a review. Dis. Aquat. Org., 3: 51-57.
- Dung, T. V., V. C. Cong, T. V. Dung and A. B. Glenn (2014) Parasites of wild glass eels and cultured elvers of the giant mottled eel (*Anguilla marmorata* Quoy and Gaimard, 1824) in Vietnam. J. Aquacul. Sci., 5 (2): 145-153.
- Gudding, R. and W. B. Van Muiswinkel (2013) A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. Fish Shellfish Immunol., 35(6): 1683-1688.
- Guo, S. L., J. J. Feng, Q. H. Yang, R. Z. Guan, Y. Wang and P. P. Lu (2014) Immune effects of bathing European eels in live pathogenic bacteria, *Aeromonas hydrophila*. Aquacul. Res., 45: 913-921.
- Hangalapura, B. N., R. Zwart, M. Y. Engelsma and O. L. Haenen (2007) Pathogenesis of Herpesvirus anguillae (HVA) in juvenile European eel *Anguilla anguilla* after infection by bath immersion. Dis. Aquacul. Org., 78 (1): 13-22.
- Horzinek, M. C., V. E. C. J. Schijna, M. Denis, P. Desmettre and L. A. Babiuk (1997) General description of vaccines. In Veterinary Vaccinology (P. P. Pastoret, J. Blancou and C. Vannier eds.), Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands, 132-152.
- Huang, J., J. Huang, Y. Li, Y. Wang, F. Wang, X. Qiu, X. Liu and H. Li (2021) Sodium alginate modulates immunity, intestinal mucosal barrier function, and gut microbiota in cyclophosphamide-induced immunosuppressed BALB/c mice. J. Agricul. Food Chem., 69(25): 7064-7073.
- Jacoby, D. and M. Gollock (2014) *Anguilla bicolor*, *Anguilla celebesensis*, *Anguilla japonica*, *Anguilla luzonensis* and *Anguilla marmorata*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014/10 (www.iucnredlist.org).
- Jacoby, D., J. Casselman, M. DeLucia, G. A. Hammerson and M. Gollock (2014) *Anguilla rostrata*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014/10 (www.iucnredlist.org).
- Joh, S. J., Y. K. Kwon, M. C. Kim, M. J. Kim, H. M. Kwon, J. W. Park, J. H. Kwon and J. H. Kim (2007) *Heterosporis anguillarum* infections in farm cultured eels (*Anguilla japonica*) in Korea. J. Vet. Sci., 8 (2): 147-149.
- Johnson, K. A. and D. F. Amend (1983) Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. J. Fish Dis., 6(5): 473-476.
- Joosten, P. H. M., E. Tiemersma, A. Threels, C. Caumartin-Dhieux and J. H. W. M. Ronibout (1997) Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. Fish Shellfish Immunol., 7: 471-485.
- Knopf, K., K. Naser, M. H. van der Heijden and H. Taraschewski (2000) Humoral immune response of European eel *Anguilla anguilla* experimentally infected with *Anguillicola crassus*. Dis. Aquacul. Org., 42 (1): 61-69.
- Lee, N. S., Y. Nomura and T. Miyazaki (1999) Gill lamellar pillar cell necrosis, a new birnavirus disease in Japanese eels. Dis. Aquacul. Org., 37(1): 13-21.
- Ma, J., T. J. Bruce, E. M. Jones and K. D. Cain (2019) A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. Microorganisms, 7(11): 569.
- Mutoloki, S., H. M. Munang'andu and Ø. Evensen (2015) Oral vaccination of fish—antigen preparations, uptake, and immune induction. Front. Immunol., 6: 519.
- Pumchan, A., U. Sae-Ueng, C. Prasittichai, S. Sirisuay, N. Areechon and S. Unajak (2022) A novel efficient piscine oral nano-vaccine delivery system: Modified halloysite nanotubes (HNTs) preventing streptococcosis disease in tilapia (*Oreochromis* sp.). Vaccines, 10(8): 1180.
- Radhakrishnan, A., B. Vaseeharan, P. Ramasamy and S. Jeyachandran (2022) Oral vaccination for sustainable disease prevention in aquaculture: an encapsulation approach. Aquacul. Int., 1-25.
- Rodger, H. D. (2016). Fish Disease Causing Economic Impact in Global Aquaculture. In Fish Vaccines, Birkhäuser Advances in Infectious Diseases (A. Adams eds), Springer, Basel, pp.1-34 https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1_1.
- Savan, R., A. Igarashi, S. Matsuoka and M. Sakai (2004) Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop: mediated isothermal amplification method. Appl. Environ. Microbiol., 70: 621-624.
- Shiraishi, H., and V. Crook (2015). Eel market dynamics: An analysis of *Anguilla* production. TRAFFIC, Tokyo, Japan.
- Silfvergrip, A. M. C. (2009) CITES identification Guide to the Freshwater Eels (Anguillidae) with Focus on the

- European Eel *Anguilla anguilla*. Report 5943, Version 1.1, The Rep. Swed. Environ. Prot. Agency, Stockholm.
- Snieszko, S. F. and S. B. Friddle (1949) Prophylaxis of furunculosis in brook trout (*Salvelinus Fontinalis*) by oral immunization and sulfamerazine. Prog. Fish. Cult., 11: 161-168.
- Sures, B. and K. Knopf (2004) Individual and combined effects of cadmium and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the humoral immune response in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally infected with larvae of *Anguillicola crassus* (Nematoda). Parasitology, 128 (4): 445-454.
- Tobar, I., S. Arancibia, C. Torres, V. Vera, P. Soto, C. Carrasco, M. Alvarado, E. Neira, S. Arcos and J. A. Tobar (2015) Successive oral immunizations against *Piscirickettsia salmonis* and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long-term protection in farmed salmonids. Front. immunol., 6: 244.
- Yang, D. and K. S. Jones (2009) Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. J. Biomed. Mater. Res., 90A: 411-418.

The Development of Oral Bacterial Vaccines for Juvenile Marbled Eels (*Anguilla marmorata*)

Jung-Hau Chiou^{1*}, Kuo-Kau Lee² and Ping-Chung Liu²

¹Eastern Fishery Research Center, Fisheries Research Institute

²Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

The present study aimed to address bacterial disease and improve the survival rate of juvenile marbled eels (*Anguilla marmorata*) with the development of oral bacterial vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. The vaccines were developed using bacterial cells treated with formalin and encapsulated with 3% sodium alginate or 6% cellulose acetate phthalate (CAP) and formalin-treated bacterial cells which were sonicated for 1.5 hours and encapsulated with 5% of sodium alginate or 9% CAP. The eels' serum antibody titer significantly increased after oral vaccination, and results from eels intraperitoneally (i.p.) challenged with *A. hydrophila* and *E. tarda*, respectively, showed that the highest relative percent survival was obtained at week 8 in the one-time orally vaccinated groups. Eels administered with boosters of the same oral vaccine exhibited a higher antibody titer that was maintained to the 12th week. Due to the higher quantity of antigen in the encapsulated vaccine, the sonicated-antigen vaccine groups demonstrated increased vaccine efficacy compared to the untreated groups. The results show that oral administration with encapsulated vaccine may protect bacterial antigens from stomach acid, thereby enabling antigen-induced immune responses in the eels' intestine.

Key words: *Anguilla marmorata*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, oral vaccine, immune system

*Correspondence: No. 22, Wu-Chuan Rd., Chengkung, Taitung, Taiwan. TEL: (089) 850-090 ext. 304; Fax: (089) 850-092; E-mail: jhchiou@mail.tfrin.gov.tw

水產研究 第31卷 第1期

出 版 者：農業部水產試驗所

發 行 人：張錦宜

總 編 輯：葉信明

地 址：基隆市中正區 20246 和一路 199 號

電 話：(02) 2462-2101

傳 真：(02) 2462-9388

網 址：<https://www.tfrin.gov.tw>

創刊日期：民國 82 年 6 月

出版日期：民國 112 年 10 月

刊 別：半年刊

ISSN 1018-7324 GPN 2008200207

