

低溫緊迫對褐石斑、鞍帶石斑及其雜交子代 血漿生化參數之影響

邱沛盛^{1*} · 朱永桐¹ · 陳陽德² · 黃政軒¹ · 黃建維¹ · 何信緯¹ · 葉信利¹

¹行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心

²行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心

摘 要

本研究探討褐石斑 (longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*)、鞍帶石斑 (giant grouper, *E. lanceolatus*) 及其雜交子代 (hybrid grouper, *E. bruneus* × *E. lanceolatus*) 在低溫緊迫下的血漿生化參數。實驗由水溫 26°C 開始以每小時降低 0.8°C 之速率降至 15°C 並持續暴露 24 hr，之後使水溫回復至 26°C。分別在暴露前 (26°C, sampling time 1, S1)、降溫至 15°C 時 (S2)、15°C 暴露 24 hr 後 (S3)、回溫至 26°C 時 (S4) 及回溫後 24 hr (S5) 採樣並分析三種石斑魚的血漿生化參數。結果顯示褐石斑血漿血糖 (GLU) 濃度在低溫暴露 24 hr 後 (S3) 顯著高於控制組，但溫度回升後 24 hr (S5) 即恢復至控制組水平，鞍帶石斑血漿血糖濃度在低溫暴露期間 (S2-S3) 顯著高於控制組，即使回溫後仍持續顯著高於控制組。雜交子代血漿血糖濃度在低溫暴露 24 hr 後 (S3) 顯著高於控制組，但回溫後 24 hr (S5) 即恢復至控制組水平。三種石斑魚血漿中三酸甘油酯 (TRIG) 及膽固醇 (CHOL) 濃度經歷低溫暴露後 (S2-S3) 都顯著升高。GLU、TRIG 及 CHOL 為三種石斑魚面對低溫暴露及後續回溫時，與控制組相比均呈現明顯變化的血漿生化參數，而以 GLU 變化來看，雜交子代在經歷低溫緊迫時呈現較鞍帶石斑更佳的調節適應能力。

關鍵詞：褐石斑、鞍帶石斑、褐石斑 × 鞍帶石斑、低溫緊迫、血漿生化參數

前 言

環境因子的變化程度若超過魚類可以耐受的範圍，將會顯著影響魚類正常的生理反應 (Barton *et al.*, 1991; Barton *et al.*, 2002; Magnadottir, 2010)，而溫度則是在水產養殖過程影響生物活存及成長最劇烈的環境因子之一，任何養殖環境的水溫改變都可能影響生物活存、生理及免疫防禦功能 (Bowden, 2008; Lee *et al.*, 2014)。許多研究指出，低溫緊迫會影響魚類的成長、行為及活存 (Bly and Clem, 1992; Nikoskelainen *et al.*, 2004)。血液與魚類之代謝、營養狀態及疾病有密切關係，當魚體受到外界因子影響而產生生理變化或緊迫反應時，

會在血液參數中反映出來 (Selye, 1950; Wedemeyer *et al.*, 1990; Jobling, 1994; Wendelaar Bonga, 1997)。

鮨科 (Serranidae) 石斑魚屬 (Genus *Epinephelus*) 魚類廣泛分布於全球各大洋，是重要的水產養殖物種，具有高經濟價值，全世界已發現 86 種石斑魚屬魚類 (Shao, 2019)，而褐石斑 (longtooth grouper, *Epinephelus bruneus*) 肉質鮮美，價格昂貴，主要分布於日本、韓國、中國沿岸至香港和臺灣海域，然因過度捕撈目前產量已日益減少 (Froese and Pauly, 2019)。褐石斑可耐 10°C 以下低溫 (Chu *et al.*, 2017)，相較於目前臺灣養殖之點帶石斑 (orange-spotted grouper, *E. coioides*)、鞍帶石斑 (giant grouper, *E. lanceolatus*) 等，更能適應臺灣地區冬季之低水溫期。又稱龍膽的鞍帶石斑為成長快速之大型石斑魚 (Heemstra and Randall, 1993)，是臺灣石斑魚養殖

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

的主要魚種之一，但因其為熱帶魚種 (Froese and Pauly, 2019)，不耐低溫，在國內因極端寒流而凍斃的事件時有所聞。藉由雜交來獲得在活存、抗病性、抗逆境及繁殖能力上具有優勢性狀的品種已是水產養殖產業的普遍知識 (Bartley *et al.*, 2001; Hulata, 2001)，將石斑魚透過雜交育種來獲得具有抗逆境性狀的子代，可提供產業許多新品種選擇並創造更多收益。

褐石斑和鞍帶石斑雜交子代 (hybrid grouper, *E. bruneus* × *E. lanceolatus*) 的胚胎發育及仔稚魚培育，已由 Murata *et al.* (2017) 記錄並描述；Chu *et al.* (2017) 除進行褐石斑和鞍帶石斑雜交子代的培育外，也發現雜交子代之體全長及體重成長有優於褐石斑的趨勢，同時也透過行為參數證實雜交子代與褐石斑有相同的耐低溫能力。近年內有多位學者發表關於純種石斑魚及雜交石斑魚在低溫下的血液生化參數反應的相關研究；Chen *et al.* (2012) 探討低溫緊迫對七帶下美鮨 (*Hyporthodus septemfasciatus*) 稚魚的血清生化參數影響，測定鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALKP)、麥胺丙酮酸轉胺酶 (Glutamic-pyruvic transaminase, GPT)、麥胺草醋酸轉胺酶 (Glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT) 等酵素以及總蛋白質 (Total protein, TP)、血糖 (Glucose, GLU)、三酸甘油酯 (Triglyceride, TRIG) 及肌肝酸 (Creatinine, CREA) 等生化參數。許等 (2016) 探討點帶石斑在低溫緊迫下的血容積比 (hematocrit)、血漿總蛋白質、血糖與鹼性磷酸酶變化；Shi *et al.* (2015) 則分析雲紋石斑 (*E. moara*) 稚魚在低溫緊迫下之血清總蛋白質、血糖、三酸甘油酯及肌肝酸等生化參數變化。雜交石斑魚則有 Shao *et al.* (2017) 發表低溫緊迫對於雲紋石斑 × 鞍帶石斑血清中血糖、總蛋白質、三酸甘油酯、肌肝酸、鹼性磷酸酶、麥胺丙酮酸轉胺酶及麥胺草醋酸轉胺酶的影響。

上述研究均顯示低溫暴露會影響魚類血液中總蛋白質、血糖、三酸甘油酯及肌肝酸等與代謝恆定相關的生化參數。此外，魚類屬於變溫動物，環境溫度同樣顯著影響其代謝速率與體內酵素 (酶) 活性 (Martnez-Alvarez *et al.*, 2005)，因此，分析不同石斑魚類在低溫緊迫下的血液生化參數，對於了解石斑魚類的低溫調節機制與耐低溫品種的選育相當重要 (Shao *et al.*, 2017)。關於褐石斑、鞍帶石斑及其雜交子代在低溫緊迫下的血液生化參數

尚未有實驗探討，另外，目前已發表的研究多半以體重範圍 34 - 300 g 的石斑魚稚魚作為實驗對象，以大於 600 g 甚至更大體型的石斑魚作為實驗對象的研究較少，但國內養殖的石斑魚之上市體型從 600 g - 6 kg 均有，而寒流來襲造成的溫度驟降對不同體型的石斑魚皆會造成影響，其緊迫反應也不盡相同 (Li *et al.*, 2014)，因近年來的寒害模式有極端化趨勢 (吳等, 2016)，突然來襲的低溫也會使得不耐低溫的大型石斑魚凍斃，即使這些大型石斑魚已活存多年，仍然會面臨低溫的威脅。因此，本研究探討褐石斑、鞍帶石斑及其雜交子代面對低溫緊迫時的血液生化參數變化，以作為石斑魚類在面臨低溫時的生理基礎資料，同時也有助於日後選育、開發耐低溫的石斑魚品種。

材料與方法

一、實驗地點與實驗魚隻

本研究於海水繁養殖研究中心室內養殖場進行，水源為經過不織布濾袋過濾後的天然海水 (溫度範圍 25 - 27°C、鹽度範圍 31 - 35 psu)。實驗水槽為玻璃纖維米白色圓形水槽 (容量 735 L，注水量 700 L)，水槽內不放置任何遮蔽物或供躲藏的岩石，養殖場內無加裝人工光源，以屋頂透明瓦自然採光，實驗系統為循環過濾系統。實驗使用之褐石斑 (平均體重 6.68 ± 0.13 kg, 平均體全長 57.88 ± 1.26 cm, $n=9$)、鞍帶石斑 (平均體重 6.76 ± 0.11 kg, 平均體全長 59.82 ± 1.51 cm, $n=9$) 及褐石斑 × 鞍帶石斑 (平均體重 7.20 ± 1.15 kg, 平均體全長 65.1 ± 0.80 cm, $n=9$) 由室外土池移至室內桶槽先蓄養 2 - 3 週，蓄養期間每日投餵一次人工配合飼料 (石斑魚沉料 5B，健承飼料股份有限公司)，每次投餵量為魚體重的 2%，低溫暴露實驗前 24 hr 停止餵食。

二、實驗設計

本實驗分別探討三種石斑魚在低溫暴露及後續回溫過程之血漿生化參數變化，實驗分為控制組與低溫處理組，每組採三重複進行，每個水槽放入三尾石斑魚，各水槽均連接循環系統。控制組從實驗開始至實驗結束後均保持水溫 26°C，低溫組

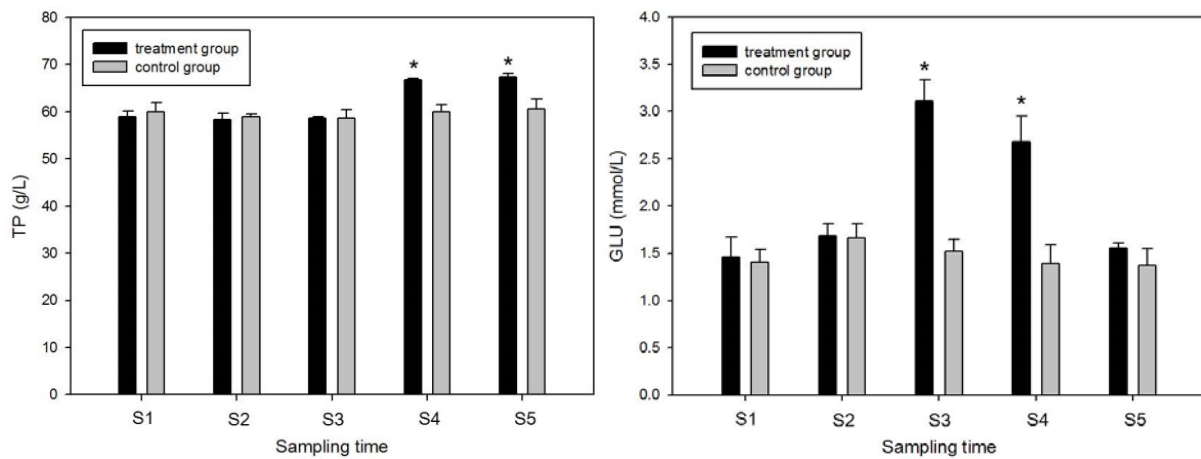


Fig. 1 Concentrations of total protein (TP) and glucose (GLU) in the plasma of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* in different temperatures of sea water, $n = 6$. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisks indicate a significant difference (t -test, $p < 0.05$).

從水溫 26°C 開始使用循環控溫裝置 (AD-C-H-9000, 朝華有限公司) 以每小時降 0.8°C 之速率降至 15°C 並持續暴露 24 hr, 模擬寒流來襲之情形, 之後再關閉降溫裝置, 使水溫自然回復至 26°C, 模擬寒流退去的回溫情形。低溫組分別在暴露前 (26°C, Sampling time 1, S1)、降溫至 15°C 時 (S2)、15°C 暴露 24 hr 後 (S3)、回溫至 26°C 時 (S4) 及回溫後 24 hr (S5) 五個時間點採血分析各項血液生化參數, 控制組也同時在上述五個時間點採樣作為對照。

三、血漿生化分析

本研究使用血漿生化參數作為分析標的, 在上述五個採樣時間點分別將魚移出, 置於 600 μ L 2-phenoxyethanol (2-PE) 麻醉至完全失去平衡期 (total loss of equilibrium) 後採樣 (Hseu *et al.*, 2005)。每一採樣點由每一水槽中任意取兩尾魚採血, 以 2.5 ml 的注射器自實驗魚隻的尾靜脈採血, 抽取血樣 1.5 ml 後, 加入真空採血管 (Sodium Heparin 75 USP Units Blood Collection Tubes, BD Vacutainer, USA) 中, 輕晃混合均勻後, 以 18°C, 4500 rpm 離心 10 min, 將上清液之血漿抽出收集至 1.5 ml 試管中進行後續分析。以商業血液生化試藥套組 (VetTest, IDEXX, USA) 搭配血液生化分析儀 (VetTest 8008, IDEXX, USA), 測定 TP、

GLU、TRIG、CHOL、ALKP 及 CREA 六項參數。

四、統計分析

所有實驗數據以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) 表示, 實驗結果以 t 檢定 (t -test) 進行統計分析, 比較各採樣時間點低溫處理組與控制組間各項血液生化參數平均值差異的顯著性, 顯著水準 $\alpha = 0.05$, 統計軟體為 Sigma stat 3.5 版本。

結 果

一、低溫緊迫後褐石斑的血漿生化參數變化

褐石斑經歷低溫緊迫後血漿 TP 及 GLU 濃度變化如 Fig. 1。血漿 TP 濃度在低溫暴露前 (S1), 控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$), 在降溫至 15°C (S2) 及 15°C 暴露 24 hr 後 (S3) 也無顯著變化, 但在回溫後 (S4) 與回溫後 24 hr (S5) 顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。血漿 GLU 濃度在低溫暴露前 (S1), 控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$), 但在低溫暴露持續 24 hr 後 (S3) 顯著高於控制組 ($p < 0.05$), 但隨著溫度回升後 24 hr (S5) GLU 濃度即與控制組無顯著差異 ($p > 0.05$)。褐石斑經歷低溫緊迫後血漿 TRIG 及

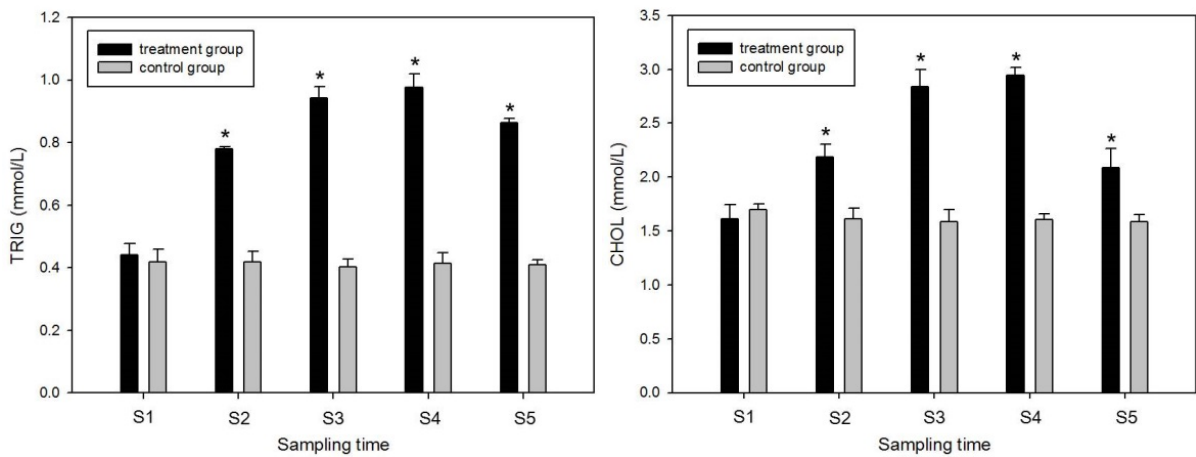


Fig. 2 Concentrations of triglyceride (TRIG) and cholesterol (CHOL) in the plasma of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* in different temperatures of sea water, $n = 6$. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisks indicate a significant difference (t -test, $p < 0.05$).

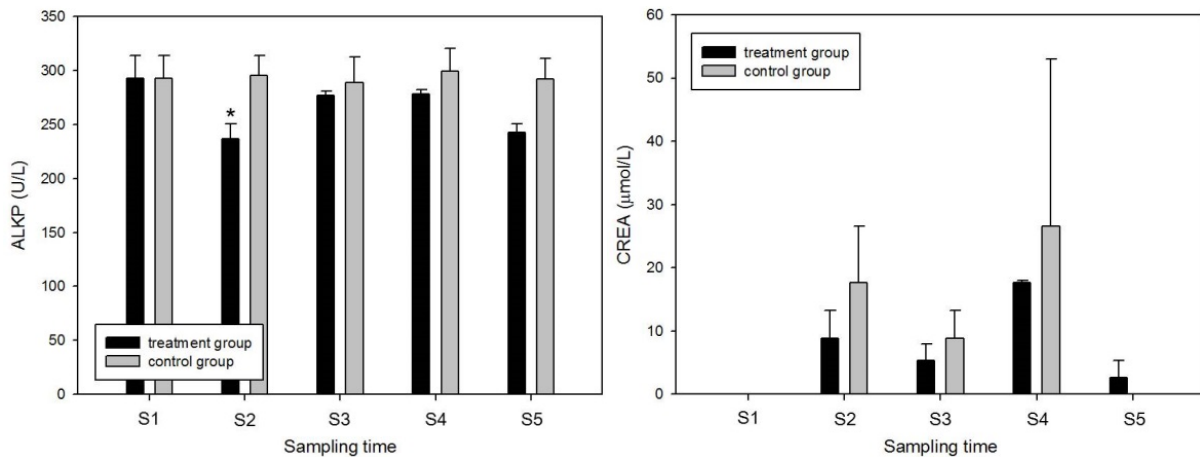


Fig. 3 Concentrations of alkaline phosphatase (ALKP) and creatinine (CREA) in the plasma of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* in different temperatures of sea water, $n = 6$. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisk indicates a significant difference (t -test, $p < 0.05$).

CHOL 濃度變化如 Fig. 2。血漿 TRIG 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，但在降溫至 15°C 時 (S2) 顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，在 15°C 暴露 24 hr 後 (S3) 及回溫至 26°C 時 (S4) 達到高峰，持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，而回溫後 24 hr (S5) 仍顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。血漿 CHOL 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，但在降至 15°C 時 (S2) 升高，顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，低溫暴露 24 hr 後 (S3) 再度升高，持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，直到回溫後 24 hr (S5)

仍顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。

褐石斑經歷低溫緊迫後，血漿 ALKP 及 CREA 濃度變化如 Fig. 3。血漿 ALKP 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，在降至 15°C 時 (S2) 顯著低於控制組 ($p < 0.05$)，但持續暴露低溫 24 hr 後 (S3) 即與控制組無顯著差異 ($p > 0.05$)。血漿 CREA 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，而在低溫暴露過程 (S2-S3) 與回溫過程 (S4-S5) 均同樣與控制組無顯著差異 ($p > 0.05$)。

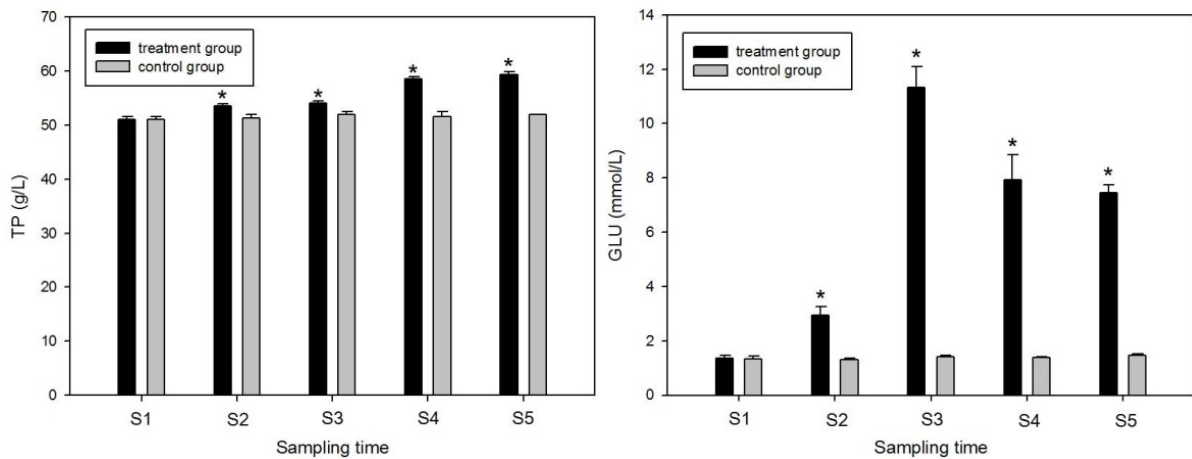


Fig. 4 Concentrations of total protein (TP) and glucose (GLU) in the plasma of giant grouper *Epinephelus lanceolatus* in different temperatures of sea water, $n = 6$. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisks indicate a significant difference (t -test, $p < 0.05$).

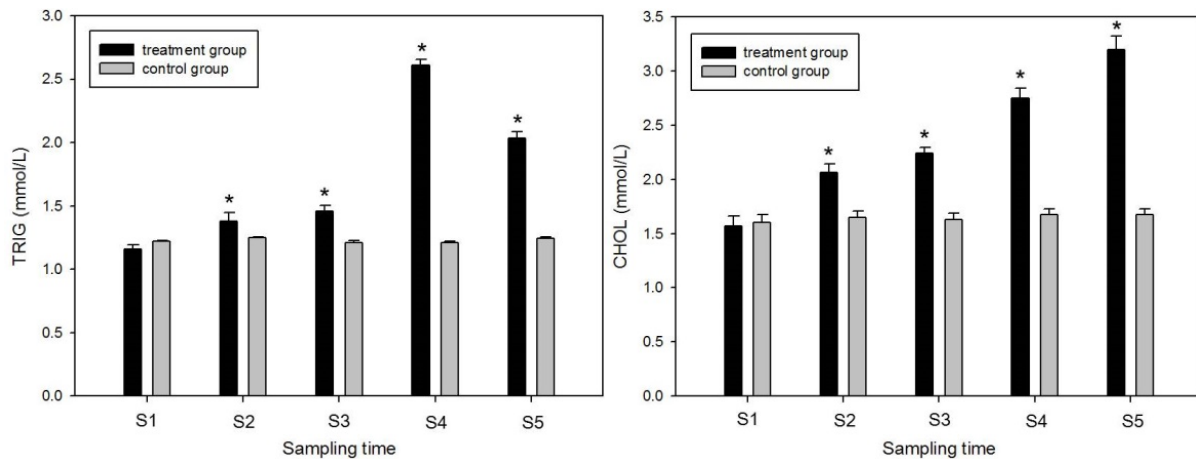


Fig. 5 Concentrations of triglyceride (TRIG) and cholesterol (CHOL) in the plasma of giant grouper *Epinephelus lanceolatus* in different temperatures of sea water, $n = 6$. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisks indicate a significant difference (t -test, $p < 0.05$).

二、低溫緊迫對鞍帶石斑的血漿生化參數變化

鞍帶石斑經歷低溫緊迫後血漿 TP 及 GLU 濃度變化如 Fig. 4。血漿 TP 在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，而降至 15°C (S2) 並持續 24 hr 後 (S3)，鞍帶石斑血漿中 TP 濃度逐漸升高，顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，至回溫後 (S4) 與回溫 24 hr 後 (S5) 持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。血漿 GLU 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，但在降溫至 15°C (S2) 時顯著高於控制

組 ($p < 0.05$)，低溫暴露持續 24 hr 後 (S3) 持續顯著升高 ($p < 0.05$)，回溫後 (S4) 及回溫後 24 hr (S5) 仍持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。

鞍帶石斑經歷低溫緊迫後血漿中 TRIG 及 CHOL 濃度變化如 Fig. 5。血漿 TRIG 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，但在降至 15°C 時 (S2) 顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，暴露 24 hr 後 (S3) 仍顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，回溫後 (S4) 達到高峰，顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，回溫後 24 hr (S5) 持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。血漿 CHOL 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p >$

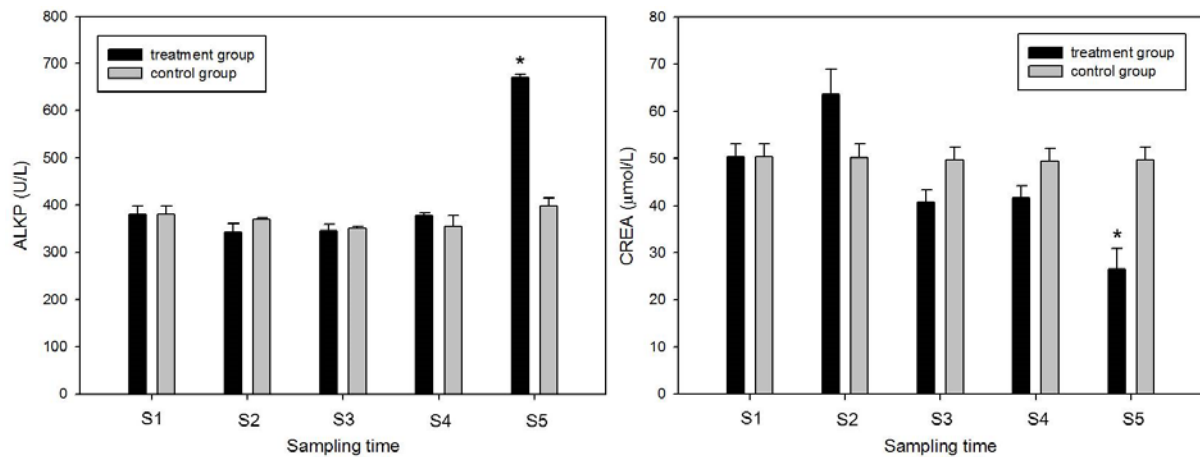


Fig. 6 Concentrations of alkaline phosphatase (ALKP) and creatinine (CREA) in the plasma of giant grouper *Epinephelus lanceolatus* in different temperatures of sea water, $n = 6$. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisks indicate a significant difference (t -test, $p < 0.05$).

0.05)，但在降至 15°C 時 (S2) 顯著升高 ($p < 0.05$)，暴露 24 hr 後 (S3) 仍持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，回溫後 (S4) 及回溫後 24 hr (S5) 仍持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。

鞍帶石斑經歷低溫緊迫後血漿中 ALKP 及 CREA 濃度變化如 Fig. 6。血漿 ALKP 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，在經歷低溫暴露及回溫過程 (S2-S4) 均並無明顯變化 ($p > 0.05$)，但在回溫後 24 hr (S5) 顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，而血漿 CREA 濃度在低溫暴露前 (S1) 與低溫暴露時 (S2-S3)，處理組與控制組間無明顯變化 ($p > 0.05$)，但在回溫後 24 hr (S5) 濃度顯著低於控制組 ($p < 0.05$)。

三、低溫緊迫後褐石斑×鞍帶石斑的血漿生化參數變化

褐石斑×鞍帶石斑經歷低溫緊迫後之血漿 TP 及 GLU 變化如 Fig. 7。血漿 TP 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，在降溫至 15°C 時 (S2)、15°C 暴露 24 hr 後 (S3)、回溫後 (S4) 及回溫後 24 hr (S5) 均與控制組無顯著差異 ($p > 0.05$)。血漿 GLU 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，在 15°C 暴露 24 hr 後 (S3) 顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，回溫後 (S4) 仍持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，直到回溫後 24 hr (S5) 才與控制

組無顯著差異 ($p > 0.05$)。

褐石斑×鞍帶石斑經歷低溫緊迫後血漿 TRIG 及 CHOL 濃度變化如 Fig. 8。血漿 TRIG 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)；在 15°C 暴露 24 hr 後 (S3) 顯著升高 ($p < 0.05$)，回溫後 (S4) 達到高峰，在回溫後 24 hr (S5) 降低，但持續顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。血漿 CHOL 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，但在降至 15°C 時 (S2) 升高，顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，回溫後 (S4) 及回溫後 24 hr (S5) 均顯著低於控制組 ($p < 0.05$)。

褐石斑×鞍帶石斑經歷低溫緊迫後血漿 ALKP 及 CREA 濃度變化如 Fig. 9。血漿 ALKP 濃度在低溫暴露前 (S1)，控制組與低溫處理組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，在降至 15°C 時 (S2) 顯著低於控制組 ($p < 0.05$)，低溫暴露 24 hr 後 (S3) 即與控制組無顯著差異 ($p > 0.05$)，但在回溫後 24 hr (S5) 顯著高於控制組 ($p < 0.05$)。血漿 CREA 濃度在低溫暴露前 (S1) 與低溫暴露至回溫過程 (S2-S4) 與控制組相比皆無顯著變化 ($p > 0.05$)，但在回溫 24 hr 後 (S5) 顯著低於控制組 ($p < 0.05$)。

討 論

Li *et al.* (2014) 認為，石斑魚類隨著體型增大，其低溫耐受性越差。過去對石斑魚類的低溫暴露研究 (Chen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Shi *et al.*,

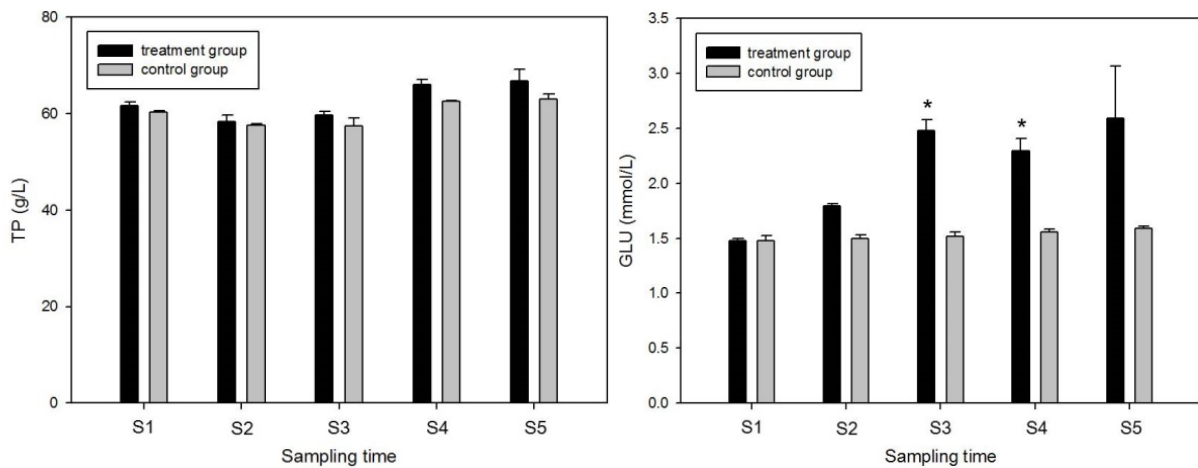


Fig. 7 Concentrations of total protein (TP) and glucose (GLU) in the plasma of hybrid grouper (*Epinephelus bruneus* × *E. lanceolatus*) in different temperatures of sea water, n = 6. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisks indicate a significant difference (*t*-test, *p* < 0.05).

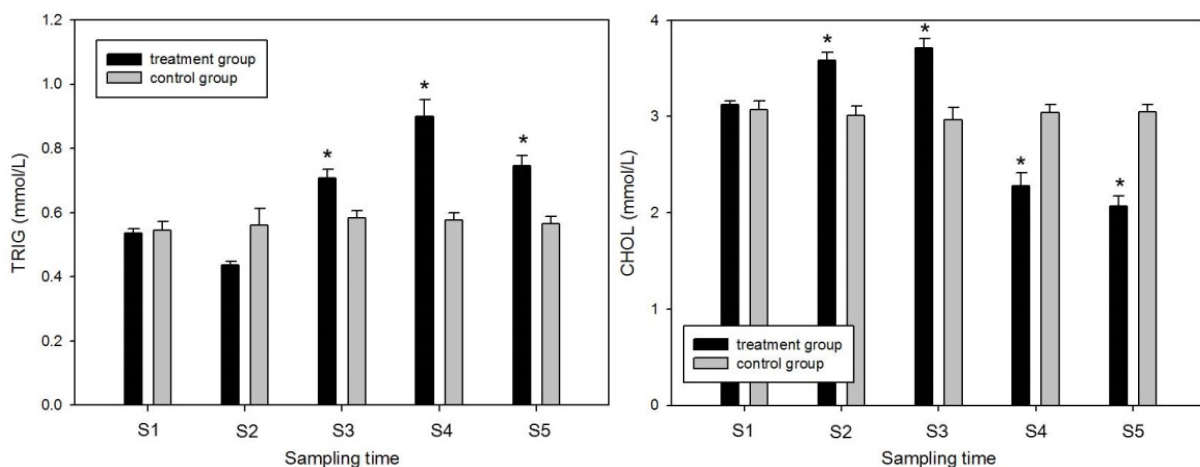


Fig. 8 Concentrations of triglyceride (TRIG) and cholesterol (CHOL) in the plasma of hybrid grouper (*Epinephelus bruneus* × *E. lanceolatus*) in different temperatures of sea water, n = 6. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisks indicate a significant difference (*t*-test, *p* < 0.05).

2015), 大部分使用 600 g 以下的魚隻, 少有針對體型大於 600 g 或其他體型的石斑魚進行試驗的報告, 本研究則使用 6 kg 以上的石斑魚進行實驗, 希望能建立較大體型的石斑魚及其雜交種在低溫暴露下的血液生化參數資訊。Chu *et al.* (2017) 比較褐石斑、鞍帶石斑及其雜交子代 (體重 300 – 600 g) 在低溫暴露下的凍昏時間與凍昏溫度, 在 72 hr 的持續降溫實驗中, 褐石斑的凍昏時間與溫度分別為 65.67 ± 1.15 hr、 8.73 ± 0.12 °C, 鞍帶石斑的凍昏時間與溫度分別為 29.67 ± 1.53 hr、 12.77 ± 0.31 °C, 其雜交子代的凍昏時間與溫度分別為

64.33 ± 1.15 hr、 8.90 ± 0.17 °C, 顯示雜交子代與親本鞍帶石斑相比, 耐低溫能力較佳, 也與褐石斑之耐低溫能力相似。在點帶石斑低溫暴露實驗中發現 10 – 14°C 的低溫會造成實驗魚隻死亡 (Li *et al.*, 2014), 維持其活存的水溫環境至少需在 15°C 以上。本研究於預備試驗中發現鞍帶石斑魚的凍昏溫度為 13.5 – 14.0°C, 再經過 24 hr 的暴露有約 20% 的魚隻死亡, 進一步降低至 12.0°C 暴露 24 hr 則有約 75% 的魚隻死亡, 而在過去的養殖經驗中, 褐石斑及褐石斑 × 鞍帶石斑, 在上述的降溫過程並無任何魚隻死亡, 為確保實驗魚隻活存以便順利採

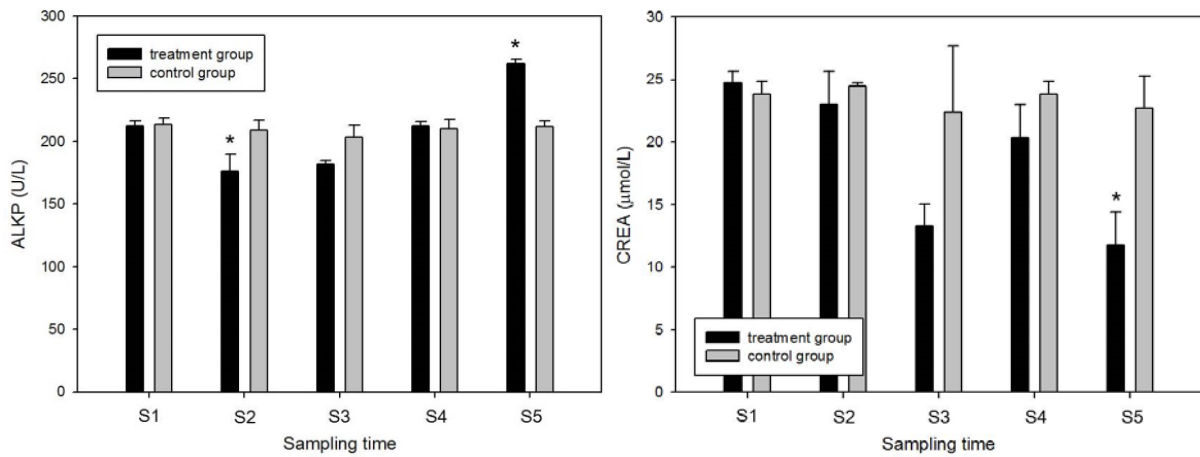


Fig. 9 Concentrations of alkaline phosphatase (ALKP) and creatinine (CREA) in the plasma of hybrid grouper (*Epinephelus bruneus* × *E. lanceolatus*) in different temperatures of sea water, $n = 6$. S1: sampling at 26°C; S2: sampling at 15°C; S3: sampling at 24 hours after exposure to 15°C; S4: sampling at recovery to 26°C; S5: sampling at 24 hours after recovery to 26°C. The asterisks indicate a significant difference (t-test, $p < 0.05$).

血分析，以耐低溫能力最差的鞍帶石斑對低溫的適應程度，設定 15°C 作為低溫基準。

血液生化參數的變化被廣泛應用於評估魚類的健康、營養狀況及對環境適應情形 (Sun *et al.*, 1992)，GLU 及 TP 被認為是在緊迫狀態下評估生物體健康跟代謝狀態的有效參數 (Cheng *et al.*, 2017)。褐石斑血液 TP 濃度在低溫暴露過程沒有明顯變化，僅在回溫後高於控制組，鞍帶石斑血液 TP 濃度在低溫暴露及後續回溫過程均持續升高，而褐石斑 × 鞍帶石斑血液 TP 濃度在低溫暴露至回溫後與控制組無明顯差異，與耐低溫的七帶下美鯧及雲紋石斑血液 TP 在經過低溫緊迫後無明顯變化的結果相似 (Chen *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015)。GLU 一般被認為是緊迫反應之二級反應參數，魚類經過外在環境刺激後，其體內經常出現短暫性的高血糖現象 (Wedemeyer *et al.*, 1990; Wendelaar Bonga, 1997)，褐石斑的血液 GLU 濃度在低溫暴露 24 hr 後升高，但隨著溫度回升，最終與控制組無顯著差異，鞍帶石斑血液中 GLU 濃度在低溫暴露持續 24 hr 後飆升，與控制組相比增加約 6 倍之多，回溫後 24 hr 仍持續顯著高於控制組，這樣的結果顯示褐石斑對低溫緊迫有較佳的適應調節能力，而褐石斑 × 鞍帶石斑血液中 GLU 濃度在低溫暴露期間與控制組間無顯著差異，在回溫後 24 hr 即與控制組無顯著差異，其變動趨勢較接近於褐石斑，因此對於低溫的適應力也較鞍

帶石斑佳。其他石斑魚類在面臨低溫緊迫時也同樣出現血液 GLU 濃度升高的現象，與本研究結果相似，點帶石斑暴露在低溫暴露一天後 GLU 濃度升高，即使回溫一天後仍高於對照組 (許等, 2016)，七帶下美鯧面對長期的低溫暴露時，血液中 GLU 濃度同樣呈現上升趨勢 (Chen *et al.*, 2012)。許等 (2016) 認為，石斑魚處於其低溫極限時，肝糖會分解產生 GLU，以便魚體利用以耐過低溫緊迫。

ALKP 參與磷酸基團轉移及鈣、磷代謝，是生物體內鈣、磷平衡的重要參數，其濃度升高可能代表肝臟受損、代謝異常及免疫力下降 (Li *et al.*, 2009)。褐石斑血漿中的 ALKP 在暴露低溫時降低，但在暴露 24 hr 過後即與控制組無顯著差異，整體變化並不明顯。鞍帶石斑血漿中的 ALKP 濃度在經歷低溫暴露過程雖無明顯變化，但卻在回溫後 24 hr 出現明顯的飆升，而褐石斑 × 鞍帶石斑血漿 ALKP 濃度在暴露低溫過程變動不大，也在回溫後 24 hr 高於控制組。雲紋石斑稚魚在經歷低溫暴露時，ALKP 持續上升 (Shi *et al.*, 2015)，與本研究中鞍帶石斑及褐石斑 × 鞍帶石斑之 ALKP 在回溫期間才上升的情形不同，可能原因為肝臟受損或代謝障礙在低溫暴露當下並沒有隨即產生，而是在回溫後才逐漸顯現，推測此種差異可能與 Shi *et al.* (2015) 進行實驗的雲紋石斑體型較小，面對低溫時血液 ALKP 上升速度較本研究採用的大體型個體快速。因此日後針對同種石

斑魚之不同體型個體分別探討其血液生化參數變化是可以深入研究的部分，可更準確的判斷與比較。

脂肪的體內平衡 (homoeostasis) 是肝臟功能的主要參數，血中 TRIG 濃度增加可能與肝臟損傷有關 (Coz-Rakovac *et al.*, 2005; Šegvić-Bubić *et al.*, 2013)。Shao *et al.* (2017) 實驗發現，當雲紋石斑×鞍帶石斑處於從 20°C 開始降溫的環境時，血液中 TRIG 含量在降至 15°C 及 10°C 時顯著高於控制組，Chen *et al.* (2012) 的研究也呈現相同結果。在本研究中，褐石斑、鞍帶石斑及褐石斑×鞍帶石斑在暴露低溫的過程，血液中 TRIG 濃度都有升高的趨勢。當魚類暴露於低溫時，血液中 TRIG 濃度增加可以提供魚類調節、適應低溫環境所需之能量 (Kyprianou *et al.*, 2010)。本研究結果顯示隨著低溫暴露增強，三種石斑魚的血漿中 CHOL 濃度均顯著增加，並在暴露後 24 hr 達到高峰。Hsieh *et al.* (2003) 進行虱目魚低溫 (15°C) 暴露的研究中發現，血漿中脂肪 (包含 TRIG 及 CHOL) 同樣在低溫暴露後增加，但卻在第 5 天時才達到高峰，較其血漿中 GLU 濃度增加速度慢，也較本研究三種石斑魚血漿 CHOL 濃度上升的速度慢，而 Shikata *et al.* (1995) 在鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 的低溫暴露實驗中，發現需經過長達 45 天的低溫 (17°C) 暴露，血液中 CHOL 濃度才顯著上升。推測石斑魚類可能相較於虱目魚及鯉魚而言，在面對低溫緊迫時能夠更迅速的透過增加血液中 CHOL 的含量來抵抗低溫，另外在 Shikata *et al.* (1995) 的研究中，低溫暴露時間延長至 75 天時，鯉魚為適應長期低溫環境，血液中 CHOL 濃度仍持續上升，透過分析體脂肪量也發現較低溫暴露前期增加，日增重率與暴露前期相比沒有顯著差異。後續對於石斑魚類長期低溫暴露之生理反應可進一步研究，以了解其調節適應機制。

CREA 是肌酸代謝的產物，魚類的 CREA 經過腎小球過濾而排出體外，因此 CREA 是腎及鰓功能的重要參數，Sano (1962) 指出，低溫環境會造成魚體血清之 CREA 濃度升高，可能是因為低溫對魚隻腎臟及鰓造成損傷，使得腎臟對於 CREA 的過濾及排泄功能弱化所至，然而褐石斑、鞍帶石斑及褐石斑×鞍帶石斑血液中 CREA 濃度在低溫暴露過程中與控制組沒有顯著差異，對本研究三

種石斑魚來說，CREA 可能在低溫暴露 24 hr 並不會有明顯變化，此結果與 Chen *et al.* (2012) 對七帶下美鮨稚魚的低溫暴露實驗結果相似，他認為低溫暴露對七帶下美鮨稚魚的腎組織並不會造成傷害，但 Shi *et al.* (2015) 在雲紋石斑稚魚的低溫暴露實驗中發現，血清 CREA 濃度隨著低溫暴露強度增加及暴露時間延長，出現下降的趨勢，並在實驗結束時與低溫暴露前呈現顯著差異。本研究發現褐石斑之 CREA 濃度在回溫後 24 hr 與控制組無顯著差異，可能對於耐寒能力最佳的褐石斑來說，15°C 的低溫及 24 hr 的暴露時間並不會造成腎臟損傷，但是鞍帶石斑及褐石斑×鞍帶石斑的 CREA 濃度均在回溫後 24 hr 顯著低於控制組，與 Shi *et al.* (2015) 的研究結果相似，但先前的研究還不知 CREA 濃度在實驗結束後降低的詳細原因，我們推測可能是鞍帶石斑及其雜交子代的耐低溫能力較褐石斑低，因此在實驗過程中因抵抗低溫造成輕微的肌肉量流失或是實驗過程因沒有蛋白質攝取導致消瘦，使回溫後 24 hr 血液中 CREA 的濃度下降，但詳細原因還有待深入研究。

在先前的研究中已經證實褐石斑與鞍帶石斑的雜交子代耐低溫能力優於鞍帶石斑，暴露於 $8.90 \pm 0.17^\circ\text{C}$ 才發生凍昏現象 (Chu *et al.*, 2017)，本研究進一步探討低溫暴露以及後續回溫過程的血液生化參數變化，實驗發現三種石斑魚血漿中六項參數 TP、GLU、TRIG、CHOL、ALKP 及 CREA，在低溫暴露或後續回溫的過程都分別產生不同程度的變化，而其中 GLU、TRIG 及 CHOL 是在低溫暴露及後續的回溫過程中，變化較為快速與明顯的參數，而 TP、ALKP 及 CREA 濃度在魚體面臨低溫時則變化較緩慢甚至並無明顯受低溫緊迫影響，因此不建議作為此三種石斑魚的低溫緊迫之血液學參數。耐低溫能力最佳的褐石斑，其 GLU 濃度經歷低溫時升高，並於回溫時恢復至與控制組無顯著差異；耐低溫能力最差的鞍帶石斑，在經歷低溫時 GLU 則急遽升高，回溫後仍沒有恢復；而雜交子代的 GLU 雖在回溫後顯著高於控制組，但在經歷低溫時卻沒有明顯升高，表現出較佳的耐低溫能力。TRIG 在三種石斑魚經歷低溫時均顯著升高，直到回溫後仍持續顯著高於控制組；CHOL 在三種石斑魚經歷低溫時都顯著升高，但褐石斑及雜交子代之 CHOL 在回溫後都有下降恢復

的趨勢，鞍帶石斑則在回溫後仍持續升高，顯示出雜交子代較佳的低溫適應調節能力。褐石斑×鞍帶石斑在經歷低溫時的行為反應及血液生化參數均呈現較鞍帶石斑更佳的調節適應能力，可見雜交子代具有一定的雜交優勢，適合做為在冬季或溫帶養殖區推廣的石斑魚品種。

謝 辭

本研究由行政院農業委員會科技計畫經費支持，並蒙國立中山大學海洋科學系故湯政豪博士在生理實驗上提供寶貴意見與經驗分享，張丁仁、吳承憬先生協助現場實驗魚隻搬運，黃致中先生協助魚隻蓄養，使本研究得以順利完成，特此致謝。

參考文獻

- 吳育甄, 林峰右, 胡益順, 朱永桐, 王俊堯, 呂連棋, 葉信利 (2016) 霸王寒流後臺南養殖業的災損及今後的因應對策. 水試專訊, 54: 23-35。
- 許晉榮, 林冠宏, 蔡志明 (2016) 空氣暴露及低溫緊迫對點帶石斑血液指標與三種熱休克蛋白基因表現的影響. 水產研究, 24(2): 25-34.
- Bartley, D. M., K. Rana and A. J. Immink (2001) The use of interspecific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 10: 325-337.
- Barton, B. A. (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. comp. biol.*, 42: 517-525.
- Barton, B. A. and G. K. Iwama (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.
- Bly, J. E. and L. W. Clem (1992) Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.*, 2: 159-171.
- Bowden, T. J. (2008) Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 373-383.
- Chen, C., Z. Shi, B. Xue, L. Wang, Y. Li, L. Wu, J. Qu and A. Ma (2012) Influence of low-temperature stress on serum biochemical parameters in juvenile *Epinephelus septemfasciatus*. *J. Fish. Chin.*, 36: 1249-1255.
- Cheng, C. H., C. X. Ye, Z. X. Guo and A. L. Wang (2017) Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. *Fish Shellfish Immunol.*, 64: 137-145.
- Coz-Rakovac, R., I. Strunjak-Perovic, M. Hacmanjek, Z. Lipej and B. Sostaric (2005) Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. *Vet. Res. Commun.*, 29: 677-687.
- Chu, Y. T., Y. D. Chen, Z. L. Huang, Y. C. Tsao, T. H. Liu and S. L. Yeh (2017) The growth performance and low temperature tolerance of grouper hybrid offspring (*Epinephelus bruneus* × *Epinephelus lanceolatus*). Presented in Annual Meeting for the Fisheries Society of Taiwan, 17 Jan. 2017, Keelung, Taiwan.
- Froese, R. and D. Pauly (2019) FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org. (02/2019)
- Heemstra, P. C. and J. E. Randall (1993) Groupers of the world. *FAO Fisheries Synopsis*, 125: 1-124.
- Hseu, J. R., Y. T. Chu, S. L. Yeh and Y. Y. Ting (2005) Prior anesthesia with 2-phenoxyethanol cannot reduce stress response of black porgy to air exposure? *J. Fish. Soc. Taiwan*, 32: 187-191.
- Hsieh, S. L., Y. N. Chen and C. M. Kuo (2003) Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation. *Aquaculture*, 220: 903-918.
- Hulata, G. (2001) Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111: 155-173.
- Jobling, M. (1994) Environmental stressors. *Fish Bioenergetics*, Chapman and Hall, London, 285-290.
- Kyprianou, T. D., H. O. Pörtner, A. Anestis, B. Kostoglou, K. Feidantsis and B. Michaelidis (2010) Metabolic and molecular stress responses of gilthead sea bream *Sparus aurata* during exposure to low ambient temperature: an analysis of mechanisms underlying the winter syndrome. *Comp. Biochem. Physiol., B.*, 180: 1005-1018.
- Lee, S., K. Ji and K. Choi (2014) Effects of water temperature on perchlorate toxicity to the thyroid and reproductive system of *Oryzias latipes*. *Ecotox. Environ. Safe.*, 108: 311-317.
- Li, C., H. Lin, J. Lin, B. Wang, H. Zhong and Z. Zhai (2014) Mariculture and meteorology I – Study on chilling injury index of *Epinephelus coioides*. *Chin. Sci. Bull.*, 30: 42-46.
- Li, J., X. Sun, F. Zheng and H. Sun (2009) Histochemical

- localization and characterization of AKP, ACP, NSE and POD from cultured *Apostichopus japonicus*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 27: 550-554.
- Magnadottir, B. (2010) Immunological control of fish diseases. *Mar. Biotechnol.*, 12: 361-379.
- Murata, O., S. Itakura, S. Yamamoto, N. Hattori, M. Kurata, H. Ohta and S. Masuma (2017) Interspecific hybridization of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* × giant grouper *E. lanceolatus* and growth of hybrid larvae and juveniles. *Aquacult. Sci.*, 65: 93-95.
- Nikoskelainen, S., G. Bylund and E. M. Lilius (2004) Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 581-592.
- Sano, T. (1962) Haematological studies of the culture fishes in Japan. *Tokyo Suisan Daigaku kenkyu hokoku*, 48: 105-109.
- Šegvić-Bubić, T., J. Boban, L. Grubišić, Ž. Trumbić, M. Radman, M. Perčić and R. Čož-Rakovac (2013) Effects of propolis enriched diet on growth performance and plasma biochemical parameters of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under acute low - temperature stress. *Aquacult. Nutr.*, 19: 877-885.
- Selye, H. (1950) The physiology and pathology of exposure to stress. *Acta Inc.*, Oxford, England.
- Shao, K. T. (2019) Taiwan Fish Database. WWW Web electronic publication. <http://fishdb.sinica.edu.tw> (2019-5-24).
- Shao, Y., C. Chen, Y. Li, M. Zhang, J. Chen and Z. Pang (2017) Effects of low temperature stress on serum biochemical indices of the juvenile hybrid of *Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂. *Progress in Fish. Sci.*, 38: 70-76.
- Shi, Z., Y. Zhang, Q. Gao, S. Peng and C. Zhang (2015) Effects of low-temperature stress on serum biochemical parameters and metabolic enzyme activity in juvenile *Epinephelus moara*. *Chin. J. Ecol.*, 34: 2222-2228.
- Shikata, T., S. Iwanaga and S. Shimeno (1995) Metabolic response to acclimation temperature in carp. *Fish. Sci.*, 61: 512-516.
- Sun, L. T., G. R. Chen and C. F. Chang (1992) The physiological responses of tilapia exposed to low temperatures. *J. Therm. Biol.*, 17: 149-153.
- Wedemeyer, G. A., B. A. Barton and D. J. McLeay (1990) Stress and acclimation. *In Methods for Fish Biology* (Schreck, C. B. and P. B. Moyle eds.), Amer. Fish. Soc., Bethesda, M. A., USA, 451-489.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997) The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 592-625.

Effects of Low-Temperature Stress on Plasma Biochemical Parameters of Longtooth Grouper *Epinephelus bruneus*, Giant Grouper *E. lanceolatus* and Hybrid Grouper *E. bruneus* × *E. lanceolatus*

Pei-Sheng Chiu^{1*}, Yeong-Torng Chu¹, Yang-Der Chen², Cheng-Hsan Huang¹, Jian-Wei Huang¹, Shine-Wei Ho¹ and Shinn-Lih Yeh¹

¹Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

²Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

This study investigated the effects of low-temperature stress on the plasma biochemical parameters of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*), giant grouper (*E. lanceolatus*) and a hybrid grouper (*E. bruneus* × *E. lanceolatus*). In the low-temperature exposure experiment, the temperature was reduced by 0.8°C per hour from 26°C to 15°C. The fish plasma was sampled and analyzed at 26°C (Sampling time 1, S1), 15°C (S2), 24 hours after exposure to 15°C (S3), recovery to 26°C (S4) and 24 hours after recovery to 26°C (S5), respectively. The results showed that the glucose (GLU) concentration of longtooth grouper was significantly increased at S3 and recovered to the control group level at S5. The GLU concentration of giant grouper at S2-S3 was significantly higher than that in the control group even at recovery to 26°C. The GLU concentration of hybrid grouper was significantly increased at S3 and also recovered to the control group level at S5. The plasma triglyceride (TRIG) and cholesterol (CHOL) concentrations of the three grouper species were all significantly increased during the low-temperature exposure period. The results indicated that the GLU, TRIG and CHOL concentrations of the three grouper species were obviously changed during the low-temperature exposure and recovery periods. Based on the changes in their plasma GLU concentrations, the physiological acclimation ability of the hybrid grouper was higher than that of the giant grouper during the cold stress period.

Key words: longtooth grouper, giant grouper, hybrid grouper, low-temperature stress, plasma biochemical parameters

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