

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：低溫壓迫對魚類生理調適之研究

**Energy metabolism of fish under cold stress**

計畫編號：87-2311-B-002-026-B28

執行期限：民國八十六年八月一日至民國八十七年七月三十一日

主持人：郭欽明教授 國立台灣大學漁業科學研究所

## Abstract

Tilapia is one of economically important culture species in Taiwan, and its culture industry has contributed significantly to the national economic development. Since tilapias, a tropical species which are known less tolerant to the cold, are suitable for culture in the warm season of the year, mass mortality has often occurred in the winter when the cold front prevails, and consequently resulted in catastrophic loss in the industry. The objectives of this research are aimed to comprehend the physiological responses, energy metabolism mechanisms, expression and biological functions of cold-shock proteins in order to develop reliable technology for improved cold tolerance of commercial important cultured species, tilapia. The achievements will certainly contribute tremendously to sustained growth of aquaculture industry in this country.

Diversification in temperature tolerance and adaptation mechanisms in teleosts have been evolved from species differences in temperature niche. The temperature compensation mechanisms, species-specific under a defined temperature environment, enable fish by its capacity adaptation to maintain physiological homeostasis, but in adverse environment, a

strategy of resistance adaptation is unanimously followed for survival and propagation.

The behavioral responses and energy consumption for temporal thermal acclimation and the metabolic process, among others, for a long-term adaptation are reliable indicators to the state of thermal compensation towards physiological homeostasis. Alternation in key enzyme activities and metabolic pathway have been the general paradigm of thermal acclimation and adaptation at the subcellular levels.

Hyperglycemic responses of tilapias were clearly demonstrated at 15 °C. The blood glucose content was markedly elevated from 42.89 mg/dl to 88.09 mg/dl in 2 hr. Similarly, the cold tolerant grass carps at 12 °C showed the increase in the blood glucose from 62.44 mg/dl to 93.35 mg/dl in 6 hr, and the responses were much pronounced in tilapias than grass carps. In contrary, the blood glucose increased from 42.89 mg/dl to 57.26 mg/dl in 1 hr for the tilapias at 10 °C, which believed a low lethal limit of this species, evidences suggested that tilapias have shown a sign of physiological exhaustion resulting from the degradation of regulatory capabilities under this particular temperature. Hyperglycemia is therefore concluded to be a general stress response in fish, and the difference

in the hyperglycemic response reflects a species-specific difference in the thermal tolerance. A significant elevation of blood lactate was only detected in the tilapias at 10 °C, but not in other treatments. This suggests that lactate is produced through anaerobic metabolic pathway to meet a burst demand in the energy source under the extreme thermal condition. Finally, the oxygen consumption is a reliable indicator for physiological conditions of fish, and the trend of changes in the oxygen consumption was found highly correlated with the temperatures and the duration of sustained stimulation.

**Key Words:** Cold temperature adaptation, Energy metabolism, Cold shock protein

## 一、中文摘要

吳郭魚為台灣重要養殖魚種之一，其產業對台灣漁業發展上是相當重要的。惟因吳郭魚為熱帶魚種，適於高溫養殖，每在冬季寒流來襲之際，因其耐寒性欠佳而大量凍斃，產業損失甚為慘重，有鑑於此，就吳郭魚對低溫之生理反應與能量代謝的調節進行全盤性研究，探討本省主要養殖經濟魚種吳郭魚與耐寒性強之草魚在低溫適應下能量代謝型態及途徑之異同，確定吳郭魚耐寒性不足之生理因素，就此，應用生物技術以改進吳郭魚耐寒性，為本研究之主要目標。

魚類在不同棲息環境下生存繁衍，經由適應演化發展出對水溫變動的調節機能，出現耐溫性不同的魚種，因而，每一魚種對於水溫環境變動，具有與生俱來的適應潛力，以維持生理狀態的恆定性。魚類遭遇到低溫壓迫時，就低溫衝擊之幅度，魚類立即產生行為反應及生理上的反應與調節，以抒解低溫對生理機能產生的影響。本研究中吳郭魚之耐寒性欠佳，在 15 °C 低溫之急速刺激下，血糖量的增加非常明顯，僅僅在 2 hr 內即由 42.89 mg/dl 遽

增至 88.09mg/dl，增加幅度達 2 倍之多。吳郭魚暴露於 10 °C 水溫中，血糖量僅由 42.89 mg/dl，在 1 小時內增加到 57.26 mg/dl，雖然血糖量增加幅度不甚顯著，主要原因在於吳郭魚對 10 °C 之刺激反應，生理已失去調節能力，呈現衰減的結果。至於耐寒性草魚，在 12 °C 低溫下，血糖量亦有增加之現象，但其增加幅度相當有限，在 6 hr 內由 62.44 mg/dl 增加到 93.35 mg/dl。由此可見，血糖量的增加是共同性的次級壓迫反應。不同耐寒性魚種對相近低溫之刺激，所產生之反應程度確有明顯之差異。

血乳酸量的明顯變化僅出現於 10 °C 水溫下、乃源自於掙扎所造成的結果。至於氧氣消耗量之下降、是與水溫之高低及刺激持續時間呈相關性。

**關鍵詞：**耐寒性，血糖量，能量代謝酵素，吳郭魚，草魚

## 二、緣由與目的

魚類經演化適應出現不同適溫的型態的適溫魚種，因此，每一魚種有其最適宜存活生長之溫度範圍，在此範圍下其體內的生理機能得以保持在恆定狀態 (Homeostasis)，但水溫之變動，對魚體造成之壓迫，必須藉生理之調節來維持生理狀況之穩定，所表現的是生物的潛力適應 (Capacity adaptation)，若一旦超出所能調節的範圍，魚類將面臨生存的危機，生物得依賴抵制適應 (Resistance adaptation) 之型態，進行生理調節以適應活存於不適宜水溫環境中。

魚類對溫度變動短暫性之調適及長時間性的適應，表現於行為反應及在能量耗費，達到生理機能之適應調整，充分反映在氧氣消耗量之增加，它所代表的是體內能量整體之耗費及生理代謝的狀態，即代謝酵素活性作用之增減，或代謝酵素作用途徑之變動，在細胞層次上，魚類對溫度的調適，則藉由細胞內主要代謝調控酵素的調適，達到細胞代謝作用的重整，增強能量代謝，促使魚體在變動水溫環境下調

適、馴應。

溫度影響魚類生理，相當廣泛且錯綜複雜。短期的低溫壓迫下，魚體可藉著神經內分系統的調節，以增強生理機能，因應暫時的需要。魚體能否在低溫衝擊下存活，牽涉到它是否能適當運用能量以維持生理機能。就目前所知，耐寒性魚種如鮭鱒魚類及鯉科魚類等，於低溫長期馴養下，發展出完備的代謝補償機制 (temperature metabolic compensation)，低溫下某些代謝途徑 (metabolic pathway) 的酵素活性大幅改變，亦即這些酵素在低溫下被大量合成，為量的適應策略 (quantitative compensation strategy)，或是有適宜低溫下作用的同功異構酵素 (isozyme) 表現，為質的適應策略 (qualitative compensation strategy) 或酵素特性及動力學 (Kinetics) 之調整，為調節之適應策略 (Modulative strategy)。

吳郭魚為台灣重要養殖魚種之一，其產業對台灣漁業發展上是相當重要的。惟因吳郭魚為熱帶魚種，適於高溫養殖，每在冬季寒流來襲之際，因其耐寒性欠佳而大量凍斃，產業損失甚為慘重，有鑑於此，就吳郭魚對低溫之生理反應與能量代謝的調節進行全盤性研究，探討本省主要養殖經濟魚種吳郭魚與耐寒性強之草魚在低溫適應下能量代謝型態及途徑之異同，確定吳郭魚耐寒性不足之生理因素，追蹤低溫壓迫蛋白之表現。就此，應用生物技術改進吳郭魚耐寒性，為本研究之主要目標。

### 三、結果與討論

本研究以吳郭魚 (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) 為試驗對象，並以較耐寒性魚種 - 草魚 (*Ctenopharyngodon idella*) 為對照魚種，比較這兩者在低溫刺激下，能量代謝生理上的異同。

本研究之重點在於建立低溫壓迫下，不耐寒魚種吳郭魚之生理反應，並探討該魚種在低溫下馴應過程，參與能量代謝酵

素之盛衰，以推論所需能量來源之途徑。試驗魚在 25℃ 水溫下馴化二個月，隨即急速暴露於不同水溫，包括 20℃、15℃ 及 10℃，定時追蹤壓迫生理指標之變動，以及參與能量代謝酵素活性之增減。

### 1、氧氣消耗量

吳郭魚活存成長最適溫度範圍在 22℃ 以上，在氧氣消耗量的變化，明顯地隨著溫度之下降而緩慢，在同一水溫下，也隨著刺激之持續，氧氣消耗量亦隨時間而下降 (Fig 1)。至於氧氣消耗量隨著時間之下降程度，是隨著水溫之高低，呈現相關趨勢。

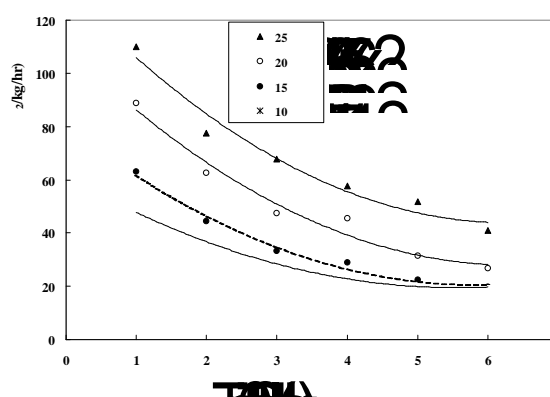


Fig. 1. Oxygen consumption of monosex tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) under cold shock.

### 2、壓迫生理指標

6 小時內低溫壓迫下，血醣量之變化，表示於 Fig. 2 及 Table 1。馴化於 25℃ 下之試驗魚經由操作處理，呈現血醣量之上揚現象，由 42.89mg/dl，持續上升，在 2 小時內達到最高點 63.07mg/dl。在相近之水溫 (20℃) 血醣量之變化趨勢，與對照組相近，惟在 15℃ 之情況，血醣量之增加更為明顯，在 2 至 6 小時內增加的幅度是對照組的 1.4 - 1.6 倍之間，但在 10℃ 下，由於水溫已偏離該魚種適宜溫度範圍，生理失去平衡，血醣量的變化與對照組相近，並無明顯之增加。在 12℃ 下，耐寒性草魚血

醣量,由 62.44 mg/dl 在 6 小時增加到 93.35 mg/dl, 12 小時即上升到 112.53 mg/dl, 由此可見, 吳郭魚在 15 水溫即呈現明顯的壓迫反應, 血液乳酸乃由於在環境急速改變下, 魚類藉由無氧代謝過程獲得短暫之能量供應, 其結果表示於 Fig. 3. 水溫 10

下血液乳酸量由 1.37 mg/dl 在 1 小時內即上升到 19.85 mg/dl, 增加達 15 倍之多, 至於其他試驗溫度下, 血液乳酸含量在 1 hr 時分別為 1.41 mg/dl (15 )、1.50 mg/dl (20 ) 及 2.33 mg/dl (對照組 25 )。由此可見, 吳郭魚在 10 情況下已處於掙扎之狀態, 因而, 乳酸之生成非常明顯, 但在醣解作用反而呈現衰退之現象。

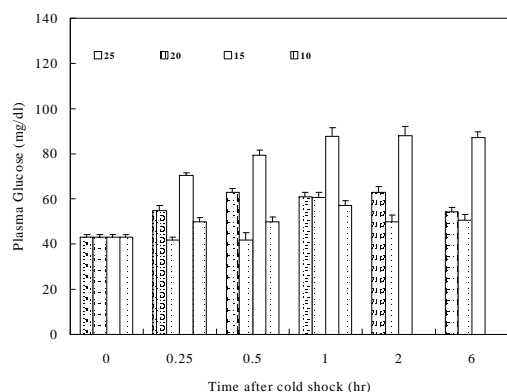


Fig. 2. Time-course changes in the plasma glucose content in monosex tilapia hybrids, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* under cold shock.

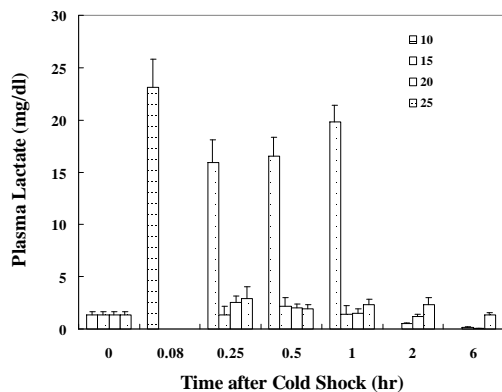


Fig. 3. Time-course changes in the plasma lactate content in monosex tilapia hybrids, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* under cold shock.

### 3、參與能量代謝酵素之途徑分析

參與能量代謝酵素主要包含糖解作用 (Glycolysis) 中的丙酮酸激活酵素 (Pyruvate kinase), 有氧呼吸循環 (TCA cycle) 中的檸檬酸合成酵素 (Citrate Synthase) 及蘋果酸去氫酵素 (Malate Dehydrogenase), 電子傳遞鏈 (Oxidative electron transport) 中的細胞色素 C 氧化酵素 (Cytochrome c Oxidase), 五碳糖代謝 (Pentose shunt pathway) 的葡萄糖-6-磷酸去氫酵素 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase), 及糖質新生 (Gluconeogenesis) 中的果糖-1,6-雙磷酸化酵素 (Fructose-1,6-Biphosphatase), 肝糖分解 (Glycogenolysis) 中的 Phosphorylase a, 無氧代謝途徑 (Anaerobic metabolism) 的乳酸去氫酵素 (Lactate dehydrogenase, LDH) 等。由於這些酵素主要涉及到能量的產生與利用, 低溫下這些酵素活性在質與量上的改變, 就魚類對低溫適應而言, 甚有它的生理意義。有關本研究中參與能量代謝酵素之活性變化, 低溫刺激試驗已完成, 且按時間採樣以追蹤分析, 已完成部份材料之預先處理及各酵素之分析工作, 目前尚積極進行酵素之分析工作。本研究擬探討各代謝途徑的主要酵素活性的變化及其途徑之變移與水溫及刺激時間之關連性。同功異構酵素的表現, 達到整體性的代謝調節機制, 並比較吳郭魚和耐寒性魚種, 在低溫下代謝上的差異, 以探求吳郭魚低溫下的能量代謝調節缺失, 是否造成其死亡的主因, 有助於改進吳郭魚的耐寒策略之開發。

Table 1. Plasma glucose content of monosex tilapia under cold shock

Time (hr)	25	20	15	10
0	42.89 ± 1.32	42.89 ± 1.32	42.89 ± 1.32	42.89 ± 1.32
0.25	54.77 ± 2.28	41.90 ± 1.21	70.56 ± 1.06	50.06 ± 1.81
0.5	62.97 ± 1.83	41.77 ± 3.35	79.46 ± 2.35	51.19 ± 1.31
1	61.05 ± 1.83	60.60 ± 2.30	87.76 ± 3.89	57.26 ± 1.96
2	63.07 ± 2.49	50.03 ± 2.76	88.09 ± 3.85	
6	54.18 ± 2.06	50.53 ± 2.53	87.23 ± 2.60	

Remarks : Values are presented in Mean+SEM (n=6~10) (mg/dl).