

中文摘要

魚類呼吸具非呼吸空氣與呼吸空氣兩種模式，其中呼吸空氣魚類中，可區分成兩棲型與水生型。水生型呼吸空氣魚類具有特化的輔助呼吸器官來輔助鰓部進行氣體交換。魚鰓是一個多功能的器官，主要是進行氣體交換及離子調節。藉由鰓部形態與功能的變化，魚隻可以適應不同環境壓力的改變。對於水生型呼吸空氣魚類進行的研究，大多著重於鰓部血管的形態敘述；目前尚無證據指出，形態變異是否與功能分化有相關性。另外，對於離子調節酵素的相關研究，都以某一對鰓來代表魚隻鰓部，無個別觀察四對鰓來討論鰓部分化的分化。因此，此實驗假說是具迷器類型的水生型呼吸空氣魚類，鰓部有形態變異與功能分化情形。第一、二對鰓具適應離子調節壓力的能力，有形態與功能的可塑性。第三、四對鰓特化成輸送充氧血的血管通道，面對環境壓力時則不具可塑性。實驗物種為水生型呼吸空氣魚類中的珍珠馬甲 (*Trichogaster leeri*)，藉由量化鰓部型值與組織染色來檢視形態的變化；測量鰓部 Na^+ , K^+ -ATPase ESA (酵素活性值) 來檢視功能的分化。形態變異結果發現，魚隻四對鰓在外觀形態、鰓絲密度、鰓弓長度、鰓絲長度與鰓薄板長度皆具有不同程度的變化，加上組織染色發現第四對鰓具有膨大腔室的現象，皆支持第四對鰓已特化成輸送充氧血的血管通道。此外，富含粒線體細胞數量，第一與第二對鰓在

具離子調節壓力的環境下，有數量上的增加；相對地，在第三與第四對鰓則無此現象出現。推測此結果與前後鰓所假設的功能不同有關係。功能分化的結果中，檢視 Na^+, K^+ -ATPase ESA，顯示前後對鰓的離子調節能力在時間點上有所不同。此外，魚隻轉移至 5 g/L 半淡鹹水與一次去離子水環境中 4 天，第一與第二對鰓的 Na^+, K^+ -ATPase ESA，顯著大於第三與第四對鰓，暗示著水生型呼吸空氣魚類四對鰓在功能上有分化的現象。總結而言，水生型呼吸空氣魚類的珍珠馬甲 (*T. leeri*)，四對鰓形態與功能具有變異與分化的情形，而且各對鰓在面臨離子調節壓力時的可塑性不同。

Abstract

Non-air-breathing and air-breathing are two respiratory modes in fishes. The air-breathing fish can be further divided into the amphibious and the aquatic air-breathing fish. The aquatic air-breathing fish has specialized accessory air-breathing organ. Fish gill is a multifunctional organ and is responsible for at least gas exchange and ionic regulation. By modifying their gill morphologies and functions, fishes are adaptive to various environmental stresses. For the aquatic air-breathing fish, most studies focused on the morphology of the gill vascular system. There was no evidence whether the morphological plasticity directly relates to their functional differentiation. Nevertheless, most studies on the enzyme activity for the ionic regulation focused only on a particular pair of gills. No study was conducted to examine the four pairs of gills simultaneously. The experiment hypothesis is that aquatic air-breathing fish with labyrinthine organ has both morphological plasticity and functional differentiation in the gills. The first and the second gills have the morphological and functional plasticity and were responsible for ionic regulation stress; the third and the fourth gills become specialized for the transport of oxygenated blood, and are less plastic to environmental stress. The experimental species was the aquatic air-breathing fish, *Trichogaster leeri*. I investigated several morphometric parameters and the histological examination to test the morphological plasticity of the gills, and used the Na⁺, K⁺-ATPase ESA to test the functional differentiation of the gills. The morphological plasticity were found in various aspects, including the gross anatomy of gills, the filament density, the length of the gill arch, the length of the filaments and the length of the lamellae of

the each gill arch in fish. There were swelling chambers, presumably blood vessels, in the fourth gill arch and this implied that the morphology of the fourth gill could be specialized for the transport of oxygenated blood. Further, the number of mitochondria-rich cells in the first and the second gills increased upon an ionic stress, whereas no difference was found in the third and the fourth gills. This phenomenon suggested that there were functional differences between the anterior and the posterior gills. The variation in the Na⁺, K⁺-ATPase ESA demonstrated that the anterior and the posterior gills differ in their abilities to ionic stress. The Na⁺, K⁺-ATPase ESA was higher in the first and the second gills upon transferred to 5 g/L and deionized water, respectively, for 4 days. These imply that the gills of the aquatic air-breathing fish have the functional differentiation. These results support the hypothesis that both morphological plasticity and functional differentiation can be found in the gills of the aquatic air-breathing fish, *Trichogaster leeri*. And, the plasticity of each gill was different in ionic stress.

前言

一、硬骨魚類的分類

硬骨魚類依呼吸空氣模式而言，可以區分成呼吸空氣魚類（air-breathing fish）與非呼吸空氣魚類（non-air-breathing fish），非呼吸空氣魚類亦稱為水中呼吸魚類（water-breathing fish）（Graham 1997）。呼吸空氣魚類，是指能藉由特殊行為或特化組織，直接利用空氣協助鰓部進行氣體交換。例如：鰕虎魚科（Gobiidae）藉由濕潤的體表，在離水環境下協助魚體呼吸。鯉科（Cyprinidae）會在水表面，利用口打氣泡，增加表層溶氧量，最後再將氣泡中的表面水吞入，以進行氣體交換，這樣的行為稱之 ASR（aquatic surface respiratory）（Graham 1997）。攀鱸科（Anabantidae）具有特化的輔助呼吸器官—迷器（labyrinthine organ），可直接協助氣體交換（Wilhelm 1975；Munshi *et al.* 1986；Graham 1997）。

以呼吸空氣模式與棲地類型，又可將呼吸空氣魚類細分為：兩棲型呼吸空氣魚類（amphibious air-breathing fish）與水生型呼吸空氣魚類（aquatic air-breathing fish）（Graham 1997）。兩棲型呼吸空氣魚類，通常生活在海洋與潮間帶區域，具有暫時離水的上陸能力；利用皮膚、鰓腔黏膜與鰓來進行氣體交換，並無特化的輔助呼吸器官。水生型呼吸魚類，通常出現於淡水水域中，不具備上陸能力，利用鰓及特

化的輔助呼吸器官，來進行氣體的交換。根據 Graham (1997) 在 *Air-Breathing Fishes* 一書中的整理，呼吸空氣器官至少包括：鰓、上鰓腔室 (suprabranchial chamber)、樹狀結構 (dendrites structure)、迷器 (labyrinthine organ)、皮膚、肺、胃與腸等器官，呼吸空氣器官類型與魚種呼吸模式有關。此外，硬骨魚中已知有 17 目 49 科 125 屬 374 種魚類為呼吸空氣魚類，佔所有硬骨魚約 2%。

二、魚類鰓部結構與功能

1. 鰓的形態及細胞類型

硬骨魚的鰓由鰓弓、鰓耙、鰓絲與鰓薄板所組成。成對鰓絲架構在鰓弓上，鰓耙則分布在鰓絲對側的鰓弓，每條鰓絲上有兩排的鰓薄板。鰓絲血管包括了入鰓動脈 (afferent artery)、中央靜脈 (central vein) 與出鰓動脈 (efferent artery)，鰓薄板上則分布著由入鰓動脈與出鰓動脈所形成的微血管網絡。血流與水流呈現逆流 (counter-current) 的設計，可促使氣體與離子交換達到最高的效率。

鰓上皮組織主要由四種細胞所構成：平鋪細胞 (pavement cells)、富含粒線體細胞 (mitochondria-rich cells)、黏液細胞 (mucous cells) 與未分化細胞 (undifferentiated cells) (Perry 1997; Evans 1999)。平鋪細胞佔鰓部面積高達 90%，是主要進行氣體交換的細胞 (Moron and

Fernandes 1996 ; Evans 1999)。

富含粒線體細胞分布在鰓絲、鰓薄板區間與鰓薄板基部。具由頂端區域 (apical crypt) 與基底膜內褶 (elaborate basolateral infoldings) 所形成的細胞間管狀系統 (extensive intracellular tubular system) , 且富含粒線體與液泡。管狀系統與液泡中分布著許多的 Na^+ , K^+ -ATPase , 為離子調節有關的酵素 (Perry 1997 ; Evans 1999)。

黏液細胞的細胞質內具有分泌型液泡 , 經由外吐作用 (exocytosis) 分泌黏液。主要功能為潤溼魚鰓 , 減少游泳時水流對於鰓的衝擊 , 並且以及保護魚鰓 , 避免細菌與病毒的入侵 (Diaz *et al.* 2001) 。未分化細胞其形狀較小且不規則 , 尚不清楚其確切功能。

2. 氣體交換與離子調節功能

魚鰓為一多重功能的器官 , 主要為維持體內的平衡 , 包括 : 氣體交換、離子調節、酸鹼平衡與含氮廢物排除等功用 (Greco *et al.* 1995 ; Perry 1997、1998) 。主要在討論鰓部功能時 , 大多以氣體交換與離子調節的觀點來切入。

鰓上皮分布在鰓絲與鰓薄板最多的細胞 , 為負責氣體交換的平鋪細胞 , 是一般硬骨魚鰓部主要進行氣體交換之處。鰓薄板為單層上皮細胞所構築而成 , 因為具有最大的表面積、最小的氣體擴散距離與最

大量的水流經過組織表面等特點，所以有利於氣體交換 (Perry 1997 ; Evans *et al.*1999)。

離子調節功能，大多利用 Na^+, K^+ -ATPase ESA (酵素活性值) 來進行估計 (Morgan and Iwama 1998 ; Kelly *et al.* 1999 a、b ; Imsland *et al.* 2003)。 Na^+, K^+ -ATPase 是鰓上的初級主動輸送的蛋白質，每一個 ATP 發生水解作用，會運送 3 個鈉離子離開細胞及 2 個鉀離子進入細胞，造成細胞內外的離子濃度梯度差與電位差，進而帶動其他離子的流動，為鰓上離子調節功能的主要動力來源。海水環境中，主要由鰓絲上的富含粒線體細胞來負責離子的排出，滲透壓形式為低滲透壓調節 (hypoosmoregulatory)；淡水中由富含粒線體細胞負責離子的吸收，滲透壓形式為高滲透壓調節 (hyperosmoregulatory) (Shikano and Fuji 1998 a、b)。藉由洄游性魚類在不同生活史階段，所面臨的離子調節壓力，可當作觀察富含粒線體細胞數量、位置與 Na^+, K^+ -ATPase 酵素活性變化的題材 (Uchida *et al.* 1997 ; Kaneko *et al.* 2002)。廣鹽性魚類的研究中發現，當魚隻處理在高鹽度或淡水環境，與其最適棲地的離子條件不同時，魚鰓具有調節離子恆定的能力，鰓上富含粒線體細胞數量與 Na^+, K^+ -ATPase ESA，會有增加與上升的現象 (Morgan and Iwana 1998 ; Lin *et al.* 2003)。

三、輔助呼吸器官與血液循環

1. 輔助呼吸器官 (*Accessory air-breathing organ*)

在此所討論的輔助呼吸器官，著重於水生型呼吸空氣魚類部份。因為其特化的輔助呼吸器官與特殊的血液循環系統，是兩棲型呼吸空氣魚類所不具有的。兩棲型呼吸空氣魚類的輔助呼吸器官，主要為身體已有的皮膚或鰓等器官，並無特化出專司輔助呼吸的器官，因此其血液循環模式為單一血液循環模式，就不會因為特化的輔助呼吸器官，有改變的情形出現 (Graham 1997)。

攀鱸科 (*Anabantidae*) 的攀木鱸 (*Anabas testudineus*)，為呼吸空氣魚類中的水生型物種，具有的輔助呼吸器官為上鰓腔室與分布在其中的迷器。上鰓腔室為輔助呼吸器官是指利用鰓腔中的上皮組織來進行氣體交換。迷器，在魚隻左右側各一個，從第一對鰓弓衍生出具有包覆 (*folded*)、似鰓薄板 (*lamella-like*) 與軟骨組織 (*cartilaginous*) 的上鰓骨 (*epibranchial*) (Wilhelm 1975)。表面呈現高度血管化 (*vascularized*)，與稱作呼吸島 (*respiratory island*) 的結構，可以減少血液和外界環境進行氣體交換的距離與增加氣體交換效率 (Munshi *et al.* 1986)。利用電顯技術，也觀察到此結構上的細胞排列方式，可與外界環境大量接觸，亦有利於氣體交換 (Hughes and Munshi 1973)。迷器位於鰓部上方，接受第一對與第二對鰓弓的出鰓動脈血

液，主要功能推測為氣體交換中氧氣吸收 (Burggren 1979; Munshi *et al.* 1986; Olson *et al.* 1986)。攀木鱸 (*Anabas testudineus*) 若處於水中與或空氣等不同的呼吸介面時，發現鰓部排除二氧化碳的效率是迷器的 10 倍 (Hughes and Singh 1970; Hughes and Munshi 1973)。此外，利用與呼吸酵素活性值 (carbonic anhydrase ESA)，來觀察絲足鱸科 (Osphronemidae) 的三星攀鱸 (*Trichogaster trichopterus*)，結果發現此物種被短暫暴露在空氣中時，迷器亦有吸收氧氣與排除二氧化碳的功用 (Burggren and Haswell 1979)。

其餘例如在鬍鯰科 (Clariidae) 的蟾鬍鯰 (*Clarias batrachus*)，亦有輔助呼吸器官存在。包括了，樹狀結構 (dendritic organs)、扇狀結構 (fan organs) 與上鰓腔室內膜 (the membrane lining the suprabranchial chambers) (Lewis 1979 a、b)。鱧科 (Channidae) 的圓斑雷龍 (*Channa punctata*)、鱧魚 (*Channa maculata*)、烏鱧 (*Channa argus*)，亦為水生型呼吸空氣魚類，皆具有特化的輔助呼吸器官。利用測量血氧分壓值，觀察到鰓部具二氧化碳的排除與輔助呼吸器官有利於氧氣的吸收，也相同證明輔助呼吸器官的氣體交換功能 (Ishimatsu *et al.* 1979; Olson *et al.* 1994)。

上述物種，具有特殊的輔助呼吸器官，鰓部結構皆可以觀察出變異的現象，大多可以區分成前鰓 (第一與第二對鰓) 與後鰓 (第三與

第四對鰓)來論述。例如，攀木鱸 (*Anabas testudineus*) 的鰓部結構，在後鰓部份，利用灌流與血管模型製作，可以發現到血管管腔半徑有變大與鰓絲數量減少的情形 (Munshi *et al.* 1986)。三星攀鱸

(*Trichogaster trichopterus*) 的後鰓部份，外觀形態亦有鰓絲數量減少與形態變異的情形 (Burggren 1979)。鱧科 (Channidae) 的各物種，第三與第四對鰓部份，形態亦變化成具降低阻力的效果，有利於輸送充氧血。

因此，水生型呼吸空氣魚類四對鰓的結構，已有變異的情形。

Olson 等人，在 1986 年的文獻中曾提出水生型呼吸空氣魚類，前後對鰓因為形態上的變異，其功能可能已有分化現象。但實際情形為何，尚未深入研究，且無清楚的解答。

2. 特殊血液循環方式

水生型呼吸空氣魚類，已經被觀察到鰓部與體循環間，具有特殊的血液循環模式，與非呼吸空氣魚類的單一循環模式不同。單一循環血液系統是指：血液從心室出發，經過鰓部，流入體循環中，最後回到心房，完成循環過程 (Ishimatsu and Itazawa 1983)。水生型呼吸空氣魚類獨特的循環模式，為一種類似哺乳類與鳥類的雙循環血液系統 (Munshi *et al.* 2001)，具有鰓部循環與體循環。因為輔助呼吸器官一

迷器，相連在第一及第二對鰓之後。血液從心室出發後，首先流過第一與第二對鰓，進行氣體交換中的二氧化碳排除。其次，進入輔助呼吸器官，在佈滿微血管的表面的器官中，有效率的吸收氧氣。最後藉由流經頸動脈回到心房，完成第一次的循環。第二次循環則再度從心室出發，藉由流經血管形態變異成管徑大阻力小的第三與第四對鰓，進入體循環系統，進行與組織的氣體交換。最後，血液返回心房，完成第二次循環。這種過程形成一種類似雙循環的血液系統，可以將迷器交換的充氧血，快速且有效率的輸送到全身利用（Ishimatsu *et al.* 1979；Munshi *et al.* 1986；Olson *et al.* 1994、1995；Graham 1997；Munshi *et al.* 2001）。

在 Air-Breathing Fishes（Graham 1997）一書中，已經描述出 14 種不同於單一循環系統的血液模式。而上述所描述的血液循環模式，包含在其中之一，它只出現在水生型呼吸空氣魚類中的攀鱸亞目（Anabantoidei）與鱧亞目（Channoidei）魚種中。

四、呼吸與離子調節的衝突

硬骨魚類，面臨水體氧氣分壓降低的時候，通常會有呼吸面積增加（Saroglia *et al.* 2002）或增加血紅素與氧的親和性（Sollid *et al.* 2003）等互補機制，使魚隻有足夠的氧氣進行細胞呼吸或生化反應。

相對的，在面臨離子壓力的環境時，鰓部負責離子調節的富含粒線體細胞亦會增生，以補充或排除離子 (Greco *et al.* 1996)。然而，若氣體交換與離子調節這兩種壓力同時出現的時候，鰓上的互補機制就必須有所取捨。通常是以調節離子壓力為優先，增加富含粒線體細胞數量 (Greco *et al.* 1995)，其次才是氣體交換。但是，細胞增生會形成氣體交換的阻礙，此時，魚類會增加其呼吸頻率、呼吸振幅、增加心臟出血量或者增加血液攜帶氧氣量的能力，來對抗因為調節離子壓力所產生的阻礙 (Perry 1998 ; Sakuragui *et al.* 2003)。

鰓絲所分布的富含粒線體細胞，主要功能為離子調節；鰓薄板分布較多的平鋪細胞，為進行氣體交換的地方 (Perry 1998)。水生型呼吸空氣魚類，因為具有輔助呼吸空氣器官存在，可以協助氣體交換，所以在面臨離子調節壓力時，鰓薄板上可增生富含粒線體細胞，使得氣體交換與離子調節的功用有消長情形出現。這種結果可能跟其特殊的呼吸空氣能力有關係，而不會排擠到氣體交換的能力 (Lin and Sung 2003)。

五、實驗目的與假說

在前人對於水生型呼吸空氣魚類鰓部研究中的文獻，主要利用血管模型製作，說明鰓部血管的可能功用為何，或者描述鰓部與輔助呼

吸器官之間的血流模式 (Burggren 1979; Munshi *et al.* 1986; Olson *et al.* 1986)。其限制性在於只能觀察血管形態，無法了解細胞層次的變異情形，且尚無詳細針對四對鰓的細胞結構論述與細胞數量計算。其他對於水生型呼吸空氣魚類的相關文獻，對於生理功能上的呼吸機制調控或特殊呼吸行為亦有許多學者在研究 (Kramer and Graham 1976; Burtleson *et al.* 1998; Oliveira *et al.* 2004)。

此外，整理離子調節酵素的文獻時發現，其大多利用鰓部中的某一對鰓，來代表鰓部離子調節功能的變化 (Uchida *et al.* 1997; Jensen *et al.* 1998; Morgan and Iwama 1998; Brill *et al.* 2001; Imsland *et al.* 2003; Katoh and Kaneko 2003; Lin *et al.* 2003; McCormick *et al.* 2003; Huong *et al.* 2004)，或是利用不同的器官，來討論魚體在離子調節功能的變化 (Kelly *et al.* 1999 b; Quinn *et al.* 2003)。鮮少同時針對四對鰓來研究鰓部形態與功能的變異。因此，此實驗將結合結構與功用兩部份，討論水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲 (*Trichogaster leeri*)，四對鰓的形態變異與功能分化情形。而本研究因為魚隻體型太小的限制，無法利用血管模型製作方式，來觀察鰓部的形態變異。

利用珍珠馬甲 (*T. leeri*)，實驗目的包含兩個部份：形態變異與功能分化的測試。實驗主要假說為，具有迷器的水生型呼吸空氣魚類，第一、二對鰓有形態與功能上的，來適應具離子調節壓力的環境。

第三、四對鰓則不具有可塑性的能力，因為此兩對鰓已特化成輸送充
氧血的血管通道。

材料與方法

一、魚種選擇與馴養

1. 實驗魚種選擇

前言中所描述的水生型呼吸空氣魚類物種，大多屬於攀鱸亞目 (Anabantoidei) 的魚種，在已知的 49 科呼吸空氣魚類中，為具有迷器類型的輔助呼吸器官與類似雙循環系統之魚種 (Graham 1997)。此亞目包括梭頭鱸科 (Luciocephalidae)、攀鱸科 (Anabantidae)、吻鱸科 (Helostomatidae)、絲足鱸科 (Osphronemidae) 與鬥魚科 (Belontiidae) 等 5 科，皆是具有迷器類型的水生型呼吸空氣魚種，原棲地為東南亞一帶的叢林細流與黑水域沼澤地，環境因水流速度慢與水中有機質分解速度快，造成水體的溶氧量下降。所以在此區域的環境中，分布著許多水生型呼吸空氣魚類的物種。

實驗所使用魚隻直接向水族中盤商進口國外繁殖廠魚隻，取樣方便且可大量購得。分別為鱸形目 (Perciformes) 攀鱸亞目 (Anabantoidei) 絲足鱸科 (Osphronemidae) 的珍珠馬甲 (*T. leeri*)。與鯉形目 (Cypriniforms) 鯉科 (Cyprinidae) 的泰國四鬚魮 (*Barbodes schwanenfeldi*)。泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*) 體型與珍珠馬甲 (*T. leeri*) 相近且皆為窄鹽性淡水魚，在實驗中為非呼吸空氣魚類的代表，以進行形態與功能的比較。

2. 馴養用水與裝置

實驗魚隻攜帶回實驗室後，馴養至少超過一星期，才進行實驗。光照週期為 11 小時光照／13 小時黑暗，使用曝氣、加熱過濾後的自來水馴養，控制水溫在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ，採上部循環過濾，定期清洗及更新濾材。實驗用淡水，亦使用曝氣、加熱與過濾後的自來水。以定量的魚飼料（NOVO Bits, JBL, Germany），每日餵食一次，每星期至少換水一次。

馴養用裝置為使用 $120 \times 45 \times 60$ 立方公分的玻璃缸，加入約 35 公分高的馴養用水。因魚隻對於馴養環境的穩定性要求度高，所以在底部鋪上一層約 5 公分厚的細沙（Sand, Lipis Crystal, USA），以利硝化系統穩定。利用空氣幫浦打氣，並置入加溫棒，控制水溫 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 。採上部循環過濾，定期清洗、更新濾材及換水。

3. 實驗用水配置與裝置

實驗用淡水，使用曝氣、加熱與過濾後的自來水。一次去離子水，由 Water purification system（PLATINUM, Taiwan）所製造。5 g/L 半淡鹹水是由曝氣水添加人工海鹽（Coralife Scientific Grade Marine Salt, USA），以折光型鹽度計（ATAGO Model S/Mill-E, Japan）測量其鹽度；各項水質條件整理如表一。

實驗用裝置，使用 58 × 41 × 35.5 立方公分的加蓋塑膠缸，加入約 20 公分高的各種實驗用水，不鋪底沙，利用空氣幫浦打氣，置入加溫棒控溫，每處理兩次實驗後更換實驗用水。

二、研究方法

(一) 形態變異的觀察

1. 鰓部組織埋蠟切片與染色

(1) 鰓部組織埋蠟切片

選取魚隻左右兩側的四對鰓組織，利用固定液（2% Paraformaldehyde 0.5% Glutaraldehyde, P₂G_{0.5}）在 4°C 下，避光，固定 8-12 小時後，再以 PBS（Phosphate Buffer Solution）清洗。接著以 30%、50%、70%、80%、90%、100% 酒精脫水，以二甲苯（Xylene）：酒精分別為 1：3、1：1、3：1 之混合液及 100% 二甲苯置換，並以石蠟（Paraffin）包埋組織。包埋後組織以厚度 3-5 μm 切片觀察（RM2125RT, Leica, Germany）。

(2) 組織染色（H&E stain）

先將組織置於覆有 poly-L-lysine solution（Sigma）的載玻片上，以二甲苯脫蠟 2 次各 5 分鐘，以 100%、100%、95%、90%、80%、70%、50% 酒精脫水各 2 分鐘後，以自來水沖洗 5 分鐘，蘇木紫

(Hematoxylin, Zymed) 染細胞核 5 分鐘，再以自來水沖洗 5 分鐘，利用伊紅 (Eosin, Sigma) 染細胞質 5 分鐘。最後，以 70%、80%、90%、95%、100%、100% 酒精各 2 分鐘及 100% 二甲苯 4 分鐘置換，蓋上蓋玻片與封片膠，待其風乾後，利用顯微鏡 (E600, Nikon, Japan) 觀察細胞形態，並利用數位相機 (D1, Nikon, Japan) 拍照。

2. 鰓絲密度計算與鰓弓、鰓絲、鰓薄板長度量化

在同一倍率的光學顯微鏡下，利用數位相機記錄 (CoolPix 5000, Nikon, Japan) 四對鰓照片，亦在相同倍率之下，記錄比例尺。藉由電腦上利用影像分析軟體 Image-Pro Plus (4.0) 計算各對鰓的鰓弓長度。每組重複數為 10 尾魚。

在解剖顯微鏡 (S2H10, Olympus, Japan) 上，利用數位相機記錄 (CoolPix 5000, Nikon, Japan)，並計算出每一對鰓的鰓絲數目。鰓絲數目為重複 3 次以求取平均值，並利用鰓弓長度和鰓絲數目，求得鰓弓的單位長度上鰓絲數目。

鰓部組織切片染色後照片，在電腦上利用影像分析軟體 Image-Pro Plus (4.0)，針對每一對鰓的照片，進行長度量化。選取不同的鰓絲 10 根以上與鰓薄板 60 根以上，分別計算其長度並加總，最後將其總和平均，得到每一對鰓的鰓絲與鰓薄板長度數值。每組重複

數為 10 尾魚。

3. 鰓部細胞的粒線體螢光標定

利用斷頸法犧牲魚隻，取第一到第四對鰓，去除鰓弓後，保留 3-5 根鰓絲，置於凹槽玻片。以 5 μM DASPMI [2-(4-Dimethylaminostryl) -1-methylpyridiniumiodide, Sigma] 覆蓋組織染色，置於避光盒內，輕微搖晃 5 分鐘，進行標定。利用魚類的生理食鹽水清洗多餘染劑，3 分鐘 2 次。染好的樣品蓋上蓋玻片，置入避光盒內避光，以波長 467 nm 的螢光於顯微鏡 (E600, Nikon, Japan) 下，觀察魚鰓組織中的富含粒線體細胞分布情形。

藥品配置

1. 5 μM DASPMI: 10 μL 的 500 μM DASPMI, 990 μL Ringer's solution
2. 500 μM DASPMI: 0.00915 g DASPMI, 50 mL methanol (避光)
3. Ringer's solution: 111 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.36 mM $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, 2.38 mM NaHCO_3

* 樣品在可見光操作下時間要盡量縮短，染色 30 分鐘內需完成組織觀察。

4. 免疫組織化學染色與富含粒線體細胞數量計算

(1) 免疫組織化學染色

將組織置於覆有 poly-L-lysine solution (Sigma) 的載玻片上，以二甲苯脫蠟兩次各 5 分鐘，100% 及 95% 酒精各置換 2 分鐘，以二次水清洗 10 分鐘，再以 3% H_2O_2 (in 100% methanol) 浸泡 7 分鐘以去除內生性抗原反應，PBS 清洗 2 分鐘 3 次，依序以一級抗體 (Na^+ , K^+ - ATPase monoclonal antibody, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA, 稀釋 1000 倍) 在室溫下，避光，反應 1 小時、進行 PBS 清洗 2 分鐘 3 次、二級抗體 (HRP/Fab polymer conjugate, Zymed) 在室溫下反應 30 分鐘，避光、PBS 清洗 2 分鐘 3 次、呈色劑 (aminoethyl carbazole signal solution chromogen (AEC), Zymed) 呈色 15 分鐘，最後以 Hematoxylin (Zymed) 染色 10 分鐘當作背景值，以封片膠 (GVA mounting solution, Zymed) 封片。每個樣本皆在 400 倍或 600 倍的光學顯微鏡下做觀察 (E600, Nikon, Japan)，以數位相機拍照存檔 (D1, Nikon, Japan)。此外，取同樣組織的切片，不加一級抗體，其他染色過程皆相同，以作為對照組。

藥品配置

1. $\text{P}_2\text{G}_{0.5}$ 固定液: 2% Paraformaldehyde (Sigma), 0.5% Glutaraldehyde (Wako), 0.1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 0.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck), pH=7.2, Osmolality=250 mOsm/Kg

* 選用此固定液的理由，是由於其滲透壓值接近窄鹽性淡水魚

(200-300 mOsm/Kg)，可避免組織在固定過程中有變形的情形發生。

2. PBS: 136.9 mM NaCl (Merck), 2.68 mM KCl (Merck), 10.15 mM

Na₂HPO₄ · 2H₂O (Merck), 1.76 mM KH₂PO₄ (Merck), pH=7.4

(2) 富含粒線體細胞數量計算

利用連續的石蠟切片，經免疫組織化學染色後，隨機選取 5 根鰓絲，計算鰓薄板上的富含粒線體細胞數量，爲了避免計算鰓薄板間或鰓絲上的富含粒線體細胞，只計算遠離鰓絲 5 μm 以上之富含粒線體細胞（圖一），並利用影像分析軟體 Image-Pro Plus（4.0）測量鰓薄板長度，求得單位長度中富含粒線體細胞的數量，每種處理條件取 8 尾魚，作為重複。

(二)、功能分化的檢視

1. 實驗水質與魚隻血漿的滲透壓濃度、鈉和氯離子濃度測定

實驗用水質，保留 50 μL，利用結晶式滲透壓儀（Osmomat 030-D, Gonotec, Germany），測定滲透壓濃度。各實驗水樣，經不同比例稀釋後，利用原子吸收光譜儀（Atomic Absorption Spectrophotometer, Z-5000, Hitachi, Japan），測定實驗用水的鈉離子濃度。氯離子則利用分光光度計（U-2001 Spectrophotometer, Hitachi, Japan），與不同濃度氯離子的標準液來比對實驗用水中氯離子濃度。水質中的 pH 值則利

用 pH 測定儀 (Microcomputer pH-Vision 6071, Jenco, Japan) 測定。

魚體經 MS-222 (3-Aminobenzoic Acid Ethyl Ester, Sigma) 麻醉後，剖開腹部，以 29 G × 1/2" (TERUMO, U-100, Japan) 針頭與 1 mL 的針筒 (TERUMO, U-100, Japan)，自心臟抽出體液，在 4°C 下 20160 g 離心 10 分鐘。因為體液收集不易，取 10 μL 部份，於蒸氣式滲透壓儀 (5500 Vapor Pressure Osmometer, Wescor, USA.) 測定魚體滲透壓。此外，上清液血漿分別經不同比例與二次去離子水稀釋後，利用原子吸收光譜儀 (Atomic Absorption Spectrophotometer, Z-5000, Hitachi, Japan)，測定魚體的的鈉離子濃度。氯離子則利用分光光度計 (U-2001 Spectrophotometer, Hitachi, Japan)，與不同濃度氯離子的標準液來比對實驗用水中氯離子濃度。

2. 鰓部蛋白質萃取與 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 測定

(1) 蛋白質萃取

將魚體置於有麻醉藥 MS-222 的各種水質中 (1:2500)，約 3 到 5 分鐘，待其失去活動力後，利用斷頸法犧牲。依序取下鰓部兩側各對鰓，放入 1.5 mL 塑膠離心管中，以 1:200 的比例與含有蛋白酶抑制劑 (Proteinase Inhibitor) 的均質液 (Homogenizing Medium) 萃取蛋白，並利用超音波組織均質機 (Ultrasonic Processor, SONICS,

USA), 將鰓均質化至看不見明顯的鰓薄板後, 在 4°C 下分別依序 1064 g 離心 10 分鐘, 20160 g 離心 20 分鐘, 以得到除去細胞核、粒線體及未均質組織的蛋白質萃取液。此新鮮蛋白萃取液不經冷凍過程, 立即進行 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 的活性測定。

蛋白質萃取液的蛋白質含量測定, 是將萃取液經適當比例稀釋後, 取體積 800 μL 加上 200 μL protein assay (Bio-Rad), 混合均勻後, 利用呈色比色法, 以分光光度計 (U-2001 Spectrophotometer, Hitachi, Japan) 在波長 595 nm 的可見光下, 測量萃取液所含的蛋白質濃度; 標準液則是以牛血清液 (Bovine Serum Albumin, Sigma) 利用二次水經相同稀釋比例而得。

(2) Na^+ , K^+ -ATPase ESA 測定

取以定量的蛋白質萃取液 10 μL , 分組進行 Na^+ , K^+ -ATPase 的活性測定。原理是利用一組有加入 Na^+ , K^+ -ATPase 專一抑制劑 (Ouabain) 的 reaction medium, 抑制 ATP 分解成 ADP 與 Pi, 與另一組未加入專一抑制劑的 reaction medium 之差值做比較。生化反應機制上, Ouabain 為其專一抑制劑, 主要與 Na^+ , K^+ -ATPase 膜上 K^+ 位置結合, 使酵素無法交換鈉、鉀離子, 失去其作用 (Silva *et al.* 1977)。步驟是將等體積的蛋白質萃取液, 分別加於 400 μL 不含 Ouabain 的 reaction medium 或含有 Ouabain 的 reaction medium 中均勻混合, 加入 100 μL ATP start

solution 起始反應，進行 30°C 水浴 30 分鐘後，以 200 μ L TCA stop solution 終止反應。以 1064 g 於 4°C 下離心 10 分鐘，取出 500 μ L 上清液加入 1 mL 的呈色混合劑 (Colormetry Solution) 於 20°C 冷水浴呈色 30 分鐘，最後以分光光度計 (U-2001 Spectrophotometer, Hitachi, Japan) 於波長 700 nm 下，測量溶液中磷酸根 (Pi) 的含量。除水浴與顯色完成後，所有步驟均於冰上進行。每種處理條件取 8 尾魚，作為重複。活性計算公式如下：

$$[(\text{Pi 濃度差, } \mu\text{g/mL}) \times 0.5 \text{ mL} \div 94.91 \mu\text{g}/\mu\text{mole}] \div$$

$$[(\text{蛋白質濃度, mg}/\mu\text{L}) \times 10 \mu\text{L} \times (500 \mu\text{L}/710 \mu\text{L})] \div$$

(反應時間, 0.5 hr)

Na^+ , K^+ -ATPase 活性單位為 μ mole Pi/mg protein/hr。

藥品配置

1. Homogenizing Medium: 100 mM imidazole (Imidazole-HCl buffer) (Sigma), 5 mM Na_2EDTA (Sigma), 200 mM sucrose (Sigma), 0.1 % sodium deoxycholate (Sigma), pH=7.6
2. Proteinase Inhibitor: 3.31 mM antipain (Sigma), 2.16 mM leupeptin (Sigma), 63.86 mM benzamidine (Sigma), 100% Aprotinin (Sigma)
3. Reaction Medium: 142.85 mM imidazole (Imidazole-HCl buffer) (Sigma), 178.5 mM NaCl (Sigma), 22.87 mM MgCl_2 (Sigma), 107.14 mM KCl (Sigma), pH=7.6

4. Ouabain: 12.46 mM ouabain (Sigma)
5. ATP Start Solution: 25 mM Na₂ATP (Sigma)
6. TCA Stop Solution: 30% Trichloroacetic acid (Merck) (約 1.8 mM)
7. Colormetry Solution: 2.5% acid molybdate (Molybdic acid, ammonium salt) (Sigma), 10% SDS (Dodecyl sulfate sodium salt) (Merck), 0.25% ANSA (1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid) (Sigma), 15% NaHSO₃ (Nacalai tesque), 40% Na₂SO₃ (Nacalai tesque)

三、實驗設計與統計分析

(一)、水生型呼吸空氣魚類鰓部形態變異

本實驗測試具有迷器的水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲 (*T. leeri*)，第一、二對鰓具形態上的可塑性，來適應離子調節壓力的環境。第三、四對鰓則不具有上述的能力，因為此鰓部形態已變異成輸送充氧血的血管通道。

此部份實驗，利用珍珠馬甲 (*T. leeri*) 與非呼吸空氣魚類的泰國四鬚魮 (*B. schwanefeldi*)，觀察四對鰓外觀形態、鰓部組織染色、鰓絲密度、鰓弓長度、鰓絲長度、鰓薄板長度、粒線體螢光標定與富含粒線體細胞數量來檢視鰓部變異情形為何。

(二)、水生型呼吸空氣魚類鰓部功能分化

本研究針對功能分化部份，僅利用 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 來測試具有迷器的水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲 (*T. leeri*)，第一、二對鰓具功能上的可塑性，來適應離子調節壓力的環境。第三、四對鰓則不具有上述的能力。

首先，實驗魚隻到一次去離子水環境中，0、6、12、24、96 小時，測定 Na^+ , K^+ -ATPase ESA，了解前後對鰓與迷器在離子調節功能差異性。並且將魚隻從馴養缸轉移到淡水、一次去離子水與 5 g/L 半淡鹹水中 4 天，測量實驗水質與被處理的魚體，其滲透壓與鈉和氯離子的濃度，以及魚體的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA，了解四對鰓離子調節功能的分化。

魚隻在具離子調節壓力的環境中經過 4 天，才進行觀察四對鰓的富含粒線體細胞數量與 Na^+ , K^+ -ATPase ESA，以檢視在形態與功能上是否有變異的現象。主要的考量為實驗的過程中，發現其容易受到驚嚇，所以處理較長的時間，以獲得穩定的實驗數據。

最後，被推測具輔助呼吸的迷器，也利用組織染色、粒線體螢光標定與 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 測定，檢視其離子調節功能。

(三)、統計分析

實驗中數據均以 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 表示。

在水生型呼吸空氣魚類鰓部形態與離子調節功能，是否與非呼吸空氣魚類不同實驗中，因為實驗魚隻中的每一各個體，其各對鰓或迷器的測量值具有不獨立的特性，且同時測量鰓部之間的型值。檢定四對鰓的鰓絲密度，鰓弓、鰓絲、鰓薄板長度、富含粒線體細胞的數量與 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 時，皆利用 Repeated-measure's ANOVA 進行比較。若達顯著差異，為樣本數為平衡類型時以 Tukey's studentized range test 分析差異；非平衡則以 Least Square Means (LSMEANS) 來檢定差異。此外， Na^+ , K^+ -ATPase ESA 結果中，若比較各時間點下的鰓部活性值差異，則利用 Tukey's studentized range test 分析。

馴養淡水、轉移淡水、實驗用一次去離子水與 5 g/L 半淡鹽水的滲透壓值，鈉與氯離子濃度，利用 one-way ANOVA 分析其差異情形。

上述分析，均以 $P < 0.05$ 為達顯著水準。統計分析軟體為 SAS 8e for windows。

結果

一、水生型呼吸空氣魚類鰓部形態變異

1. 鰓部外觀形態

非呼吸空氣魚類的泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*)，鰓腔中發現到另外一種的特化器官—偽鰓，四對鰓的外觀形態，從第一到第四對鰓並無顯著的改變情形 (圖二、A)。在水生呼吸空氣魚類的珍珠馬甲 (*T. leeri*)，四對鰓在鰓弓長度或鰓絲長度有顯著的變異 (圖三、A-D)，及觀察到輔助呼吸器官—迷器的存在 (圖三、E)。外觀照片可以觀察到，珍珠馬甲 (*T. leeri*) 從第一對鰓到第四對鰓，形態有顯著的縮短。其中，第四對鰓的形態變異度最明顯。然而，在非呼吸空氣魚類則無此現象出現 (圖二)。

2. 鰓部形態組織染色

觀察鰓部組織染色的照片，在非呼吸空氣魚類—泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*) (圖四)，第一對鰓到第四對鰓的鰓部組織形態並無顯著的變化，鰓絲與鰓薄板的長度也無明顯的變化。

水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的照片 (圖五、A，圖六、A，圖七、A)，第一對鰓到第三對鰓，鰓部組織形態類似，鰓薄板基部無形態上的變化。從放大的倍率下觀察，可以發現鰓薄板的

血管腔室，大多只能容納 1 至 3 顆的紅血球（圖五、B，圖六、B，圖七、B）。第四對鰓部份，鰓部組織形態有明顯的變化，鰓薄板基部有膨大的血管腔室，切片圖中亦可觀察到紅血球分布其中，所觀察到的紅血球數目遠多於其他三對鰓，而鰓薄板的長度也變得粗短（圖八、A）。此外，在部份的切片結果中，可以觀察到鰓薄板消失的現象，原本的鰓薄板間隙被一層上皮組織所覆蓋，導致此特殊的情形（圖八、B）。

迷器切片結果，除上下兩層表皮組織以外，空腔就分布在其中，並且可以觀察到紅血球存在，這樣的結構有助於增加氣體交換效率（圖九、A-B）。

3. 鰓部鰓絲密度、鰓弓、鰓絲與鰓薄板長度比較

以體長範圍 8 到 10 公分的魚體，在馴養淡水環境下進行觀察，說明水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲 (*T. leeri*) 鰓部型值變化的程度。

鰓絲密度計算的結果，泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*) 部份（圖十、A），第一對鰓到第四對鰓的密度， 61.31 ± 3.76 、 63.61 ± 2.56 、 69.63 ± 2.97 、 70.03 ± 3.87 (filament number/cm gill arch length)，統計上無顯著差異 (Repeated-measures ANOVA, $F_{3,2}=0.72$, $P=0.63$)。珍珠馬甲 (*T. leeri*) 部份（圖十、B），鰓絲密度經由統計分析後得知，

第一對到第三對鰓的鰓絲密度無明顯的差異， 58.46 ± 1.65 、 61.43 ± 2.23 、 63.96 ± 3.38 (filament number/cm gill arch length)，第四對鰓的密度， 48.45 ± 1.19 (filament number/cm gill arch length)，顯著低於其他三對鰓 (Repeated-measures ANOVA， $F_{3,7}=451.60$ ， $P < 0.0001$)。在鰓弓長度結果 (圖十一、A)，經由統計分析後，發現從第一對鰓到第四對鰓的鰓弓長度，分別為 10.26 ± 0.26 、 8.94 ± 0.38 、 6.81 ± 0.28 、 5.49 ± 0.23 (mm)，有顯著遞減的趨勢 (Repeated-measures ANOVA， $F_{3,7}=150.26$ ， $P < 0.0001$)。其次，在鰓絲長度結果 (圖十一、B)，藉由統計分析後，觀察到第一與第二對鰓的鰓絲長度值相似， 1.21 ± 0.08 、 1.14 ± 0.06 (mm)。在第三與第四對鰓的鰓絲長度值， 0.74 ± 0.04 、 0.33 ± 0.05 (mm)，則有逐漸變小的情形 (Repeated-measures ANOVA， $F_{3,7}=32.73$ ， $P=0.0002$)。最後，在鰓薄板的長度結果 (圖十一、C)，利用統計分析後，觀察到第一對到第三對鰓的鰓薄板長度無明顯的差異。然而，第四對鰓的鰓薄板長度， 26.22 ± 1.97 (μm)，顯著比其他三對鰓小， 45.22 ± 3.36 、 46.59 ± 3.20 、 40.56 ± 3.15 (μm) (Repeated-measures ANOVA， $F_{3,8}=19.01$ ， $P=0.0005$)。

4. 粒線體標定

此螢光標定原理為，利用與粒線體結合的物質，在特定波長下激發，使之呈現出方便觀察的可見光，快速檢視富含粒線體細胞

(McCormick 1990)，先初步觀察四對鰓或迷器在離子調節功用是否有差異。標定結果中，珍珠馬甲 (*T. leeri*) 從第一對鰓到第四對鰓，都有螢光標定的細胞出現 (圖十二、A-D)，四對鰓都可能具有基本的離子調節功能。在迷器部份，被標定到的細胞則明顯的變少 (圖十二、E)，其離子調節的功用，就可能比鰓部組織小。

5. 四對鰓在不同處理中，鰓薄板上富含粒線體細胞的數量變化

珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的免疫組織化學染色結果中 (圖十三、B-E)，可以發現到被深染的紅色細胞為富含粒線體細胞。除此之外，亦可以發現類似黏液細胞的出現，尤其是在第四對鰓末端數量特別多 (圖十三、F)，若要確定是否為黏液細胞，則應繼續利用其他染色方式 (例如：PNS 染色法) 來確認。

在不同的離子環境中，鰓薄板上富含粒線體細胞的數量分別為，馴養淡水 0 天的四對鰓： 2.94 ± 0.28 、 3.19 ± 0.41 、 2.52 ± 0.22 、 1.45 ± 0.56 (MRCs/100 μm)。轉移淡水 4 天的四對鰓： 2.85 ± 0.28 、 2.76 ± 0.41 、 2.69 ± 0.22 、 2.25 ± 0.56 (MRCs/100 μm)。一次去離子水 4 天的四對鰓為： 4.87 ± 0.28 、 5.54 ± 0.41 、 2.99 ± 0.22 、 1.92 ± 0.65

(MRCs/100 μm)，在所有的實驗處理與各對鰓之間的統計值具有顯著的差異 (Repeated-measures ANOVA, $F_{6,63}=4.62$, $P=0.0006$)。一次去離子水處理之下，第一與第二對鰓的富含粒線體細胞數量顯著與其他處理不同 (圖十四)，具有上升的趨勢 (LSMEAN/PDIFF, $P < 0.01$)。而馴養淡水與轉移淡水的處理之下，四對鰓的鰓薄板上富含粒線體細胞數量，其結果並無顯著差異。原因是量化過程已將長度標準化，呈現出鰓薄板長度為 100 μm 下的富含粒線體細胞數量。利用珍珠馬甲 (*T. leeri*) 在馴養淡水環境中，所量化四對鰓平均鰓薄板長度的型值 (圖十一、C)，加成此部份的數據，可推測四對鰓上的鰓薄板所有富含粒線體細胞數量變化 (表一)。結果呈現，四對鰓在鰓薄板全長時的富含粒線體細胞數量，有顯著性的差異。這是只利用量化鰓薄板單位長度的富含粒線體細胞數量時 (圖十四)，所觀察不到的結果。

在一次去離子水處理中 4 天與轉移淡水 4 天比較，第一與第二對鰓的富含粒線體細胞在數量上有顯著增加 (LSMEAN/PDIFF, $P < 0.001$)，大約為 1.71 到 2 倍；在第三與第四對鰓的富含粒線體細胞，則無增加的趨勢出現 (LSMEAN/PDIFF, $P > 0.05$)。在轉移淡水 4 天，第一與第二對鰓的富含粒線體細胞或第三與第四對鰓的富含粒線體細胞，皆無增加的現象 (LSMEAN/PDIFF, $P > 0.05$)。

二、水生型呼吸空氣魚類總部功能分化

1. 處理水樣與魚體的滲透壓值與鈉與氯離子濃度

表二的結果中，可以觀察到一次去離子水與 5 g/L 半淡鹹水，其滲透壓值分別為 0.33 ± 0.17 、 141.75 ± 4.21 (mOsm/Kg) 顯著的與馴養淡水、轉移淡水有所不同。一次去離水顯著的低於馴養淡水與轉移淡水；5 g/L 半淡鹹水則是顯著的高於馴養淡水與轉移淡水 (LSMEANS, $P < 0.05$)。一次去離子水處理組的鈉與氯離子濃度，分別為 0.06 ± 0.01 、 0.02 ± 0.01 (mM) 皆無顯著差異於馴養淡水、轉移淡水；5 g/L 半淡鹹水處理組的鈉與氯離子濃度，分別為 36.09 ± 2.97 、 88.36 ± 6.76 (mM) 皆顯著高於馴養淡水、轉移淡水 (鈉離子，LSMEANS, $P < 0.05$ ；氯離子，LSMEANS, $P < 0.05$)。因此，實驗利用一次去離子水與 5 g/L 半淡鹹水的處理，製造出對窄鹽性的硬骨魚而言，可能具有離子調節壓力的環境。

表三的結果中，魚體在面對具有離子調節壓力的環境時，有能力可以維持體內的滲透壓與鈉與氯離子濃度平衡。在一次去離水的環境中與 5 g/L 半淡鹹水的環境中，魚體的滲透壓值分別為 269.67 ± 7.97 與 291.00 ± 3.11 (mOsm/Kg)，與馴養淡水與轉移淡水的 280.50 ± 8.74 、 282.75 ± 10.01 (mOsm/Kg) 在統計上無顯著的差異 (LSMEANS, $P > 0.05$)。在一次去離水的環境中與 5 g/L 半淡鹹水的

環境中，魚體的鈉與氯離子濃度，分別為 92.61 ± 12.87 與 94.69 ± 18.06 (mM)、 106.96 ± 6.61 與 126.76 ± 8.03 (mM)，也與馴養淡水與轉移淡水的魚體鈉與氯離子濃度，無顯著的差異（鈉離子，LSMEANS， $P > 0.05$ ；氯離子，LSMEANS， $P > 0.05$ ）。

從鈉與氯離子的含量來看，在珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的體液中，鈉與氯離子的含量就佔了滲透壓值的 70% 左右，其餘 30% 就可能由其他離子提供。此外，鈉與氯離子含量，在不同的離子調節壓力下，各自無明顯的變化。這表示著此物種，面對因實驗所製造的離子調節壓力時，可藉由與離子調節有關的器官，進行調控以維持機能正常而不致死亡。

2. 前後對鰓與迷器的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA

魚隻被處理於一次去離水環境中，在不同的時間點下，檢視前後對鰓或迷器的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 變化。

泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*)， Na^+ , K^+ -ATPase ESA 的結果觀察到 (圖十五、A)，分析所有前後對鰓活性值，結果為具有顯著差異 (Repeated-measures ANOVA， $F_{1,16} = 11.31$ ， $P = 0.004$)。更進一步在各時間點下，利用 Tukey's studentized range test 來檢視前後對鰓活性值差異，結果發現到只有在 12 小時的時間點下，前後對鰓具有顯

著性差異 ($P < 0.05$)。前鰓部份 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 在 0、6、12、24、與 96 小時，其平均值分別為 2.09 ± 0.21 、 1.22 ± 0.26 、 1.13 ± 0.26 、 0.74 ± 0.26 、 2.69 ± 0.29 ($\mu \text{ mole Pi/mg protein/hr}$)，除了 96 小時以 (LSMEAN/PDIFF, $P=0.12$)，其餘時間點皆顯著與 0 小時不同；後鰓部份 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 在 0、6、12、24、與 96 小時，其平均值分別為 1.96 ± 0.23 、 0.95 ± 0.28 、 0.72 ± 0.28 、 0.42 ± 0.28 、 1.60 ± 0.32 ($\mu \text{ mole Pi/mg protein/hr}$)，除了 96 小時以外 (LSMEAN/PDIFF, $P=0.38$)，其餘時間點皆顯著與 0 小時不同。此外，前後對鰓在各時間點的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 與 0 小時比較，有差異的時間點其活性值趨向變小。

泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*) 的前後對鰓活性值間皆無差異，因為此物種為非呼吸空氣魚類，其鰓部組織無結構的變異，所以前後對鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 應該也不會出現差異。此結果也說明，一般非呼吸空氣的硬骨魚類，其前後對鰓無形態上的變化時，亦無 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 的差異。

珍珠馬甲 (*T. leeri*) 在各時間點之下，比較前後對鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA (圖十五、B)，0 小時為 1.92 ± 0.41 與 0.81 ± 0.23 、6 小時為 2.69 ± 0.41 與 1.29 ± 0.23 、12 小時為 2.37 ± 0.41 與 0.93 ± 0.23 、24 小時為 1.95 ± 0.41 與 1.33 ± 0.23 、96 小時為 2.64 ± 0.41

與 1.13 ± 0.23 (μ mole Pi/mg protein/hr) 皆有顯著差異

(Repeated-measures ANOVA, $F_{2,30}=56.67$, $P<0.001$), 前鰓比上後鰓大約為 1.4 到 2.5 倍。另外, 前鰓或後鰓在不同時間點與 0 小時的比較, 皆無顯著差異的趨勢 (LSMEAN/PDIFF, $P>0.05$)。前鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 在不同時間點下的變化, 結果呈現出無顯著差異, 這現象可能因實驗的重複數不夠多 ($n=4$), 或者是實驗方式中萃取蛋白質的步驟不穩定, 所導致的誤差太大, 無法顯現出其差異。最後, 迷器的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 比後鰓的活性值小, 但是無統計上的差異。其平均值分別為 0 小時為 0.45 ± 0.19 、6 小時為 0.77 ± 0.19 、12 小時為 0.58 ± 0.19 、24 小時為 0.72 ± 0.19 、96 小時為 0.69 ± 0.19 (μ mole Pi/mg protein/hr), 且在各時間點亦無顯著的變化 (LSMEAN/PDIFF, $P>0.05$)。

因此, 改良萃取蛋白質的步驟 (表五), 得到較穩定的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 後, 立即重新檢視珍珠馬甲 (*T. leeri*) 前後對鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 變化趨勢 (圖十六)。此結果中前後對鰓在各時間點下, 比較其 Na^+ , K^+ -ATPase ESA。0 小時為 0.94 ± 0.14 與 0.63 ± 0.07 、6 小時為 1.37 ± 0.14 與 0.66 ± 0.07 、12 小時為 1.67 ± 0.14 與 0.66 ± 0.07 、24 小時為 1.56 ± 0.14 與 0.77 ± 0.07 、96 小時為 1.47 ± 0.15 與 0.49 ± 0.07 (μ mole Pi/mg protein/hr), 發現皆有顯著差異

(Repeated-measures ANOVA, $F_{1,34} = 150.23$, $P < 0.001$), 前鰓比上後鰓大約從 1.25 到 3 倍。重要的是, 前鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 在各時間點與 0 小時的比較, 皆有顯著上升差異的趨勢

(LSMEAN/PDIFF, $P < 0.05$); 後鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 在各時間點與 0 小時的比較, 皆無顯著差異 (LSMEAN/PDIFF, $P > 0.05$)。

3. 四對鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA

在不同的離子環境中, 其 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 分別為, 馴養淡水 0 天的四對鰓 Na^+ , K^+ -ATPase ESA: 1.13 ± 0.10 、 1.15 ± 0.09 、 0.60 ± 0.05 、 0.45 ± 0.06 (μ mole Pi/mg protein/hr)。轉移淡水 4 天的四對鰓 Na^+ , K^+ -ATPase ESA: 0.87 ± 0.10 、 1.07 ± 0.11 、 0.62 ± 0.10 、 0.57 ± 0.09 (μ mole Pi/mg protein/hr)。一次去離子水 4 天的四對鰓 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 分別為: 1.93 ± 0.06 、 1.62 ± 0.06 、 0.67 ± 0.12 、 0.38 ± 0.07 (μ mole Pi/mg protein/hr)。5 g/L 半淡鹹水 4 天其四對鰓 Na^+ , K^+ -ATPase ESA: 1.90 ± 0.07 、 1.64 ± 0.08 、 0.66 ± 0.06 、 0.54 ± 0.05 (μ mole Pi/mg protein/hr)。

藉由結果可以觀察到 (圖十七, A), 第一與第二對鰓在具離子調節壓力的一次去離子水與 5 g/L 半淡鹹水處理下 4 天, Na^+ , K^+ -ATPase ESA 分別從馴養淡水的 1.13 ± 0.10 、 1.15 ± 0.09 (μ mole

Pi/mg protein/hr)與轉移淡水的 0.87 ± 0.10 、 1.07 ± 0.11 (μ mole Pi/mg protein/hr), 上升到 1.93 ± 0.06 、 1.62 ± 0.06 (μ mole Pi/mg protein/hr) 與 1.90 ± 0.07 、 1.64 ± 0.08 (μ mole Pi/mg protein/hr), 經由統計分析後皆有顯著的上升趨勢 (LSMEAN/PDIFF, $P < 0.01$)。在轉移淡水 4 天的第一對總 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 分別為 0.87 ± 0.10 (μ mole Pi/mg protein/hr), 第二對總 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 為 1.07 ± 0.11 (μ mole Pi/mg protein/hr), 與馴養淡水 0 天的第一與第二對總其 Na^+ , K^+ -ATPase ESA, 無顯著差異 (LSMEAN/PDIFF, $P = 0.08$ 、 $P = 0.54$)。因此, 第一與第二對總面臨離子調節壓力的環境, Na^+ , K^+ -ATPase ESA 有上升的反應 (Repeated-measures ANOVA, $F_{9,84} = 13.78$, $P < 0.0001$)。

相對的, 第三與第四對總的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA, 馴養淡水、轉移淡水、一次去離子水與 5 g/L 半淡鹹水中, 分別為, 0.60 ± 0.05 與 0.45 ± 0.06 (μ mole Pi/mg protein/hr), 0.62 ± 0.10 與 0.57 ± 0.09 (μ mole Pi/mg protein/hr), 0.67 ± 0.12 與 0.38 ± 0.07 (μ mole Pi/mg protein/hr), 0.66 ± 0.06 與 0.54 ± 0.05 (μ mole Pi/mg protein/hr), 利用統計分析馴養淡水 0 天與轉移淡水 4 天, 發現四對總活性值皆無顯著的變化 (LSMEAN/PDIFF, $P > 0.05$)。唯一例外的是轉移淡水 4 天與一次去離子水 4 天處理組, 第四對總活性值具顯著下降的差異

(LSMEAN/PDIFF, $P=0.0402$)。

若以第一到第四對鰓的 Na^+, K^+ -ATPase ESA 來檢視 (圖十七, B), 在馴養淡水、轉移淡水、一次去離子水與 5 g/L 半淡鹹水等四種處理組, Na^+, K^+ -ATPase ESA 結果, 皆可以輕易觀察到, 第一與第二對鰓活性值皆顯著比第三與第四對鰓高, 這兩對鰓主要功能可能為輸送充氧血, 且鰓部形態發現具特殊的改變, 整個鰓部的鰓絲與鰓薄板的總面積, 比第一與第二對鰓少。第三與第四對鰓的功能可能偏向與呼吸有關, 但非直接進行呼吸作用, 所以隨著功能上的消長, 可以進行離子調節區域的減少, 第三、四對鰓在面對離子調節壓力時, 就無增加進行排除離子或吸收離子的反應。

最後, 鰓部的 Na^+, K^+ -ATPase ESA 在馴養淡水 0 天與轉移淡水 4 天轉移結果中, 大多無明顯的差異, 說明了實驗中的轉移動作, 不至於影響其活性值。然而, 第四對鰓的活性值, 在轉移淡水 4 天與一次去離子水 4 天的比較時, 統計分析具有些微的下降。這種現象, 可能與第四對鰓體積較小, 在蛋白質萃取與測試過程中, 所造成的實驗誤差, 導致統計分析具顯著不同。

討論

本實驗為水生型呼吸空氣魚類中，首次將結構與功能的實驗結合，檢視具有輔助呼吸器官的魚種，在離子調節壓力的處理下，討論鰓部的形態變異與功能分化情形。

一、呼吸空氣魚類與輔助呼吸器官在生存方面關係

魚類在 500 百萬年前已開始獨自演化，在當時易變動的環境之下，溶氧量、鹽度、溫度等環境因子容易受到影響，會導致鰓部的形態與功能變化 (Sakamoto *et al.* 2001; Baruner *et al.* 2004)，所以氧氣對於魚類演化是一個顯著的因子 (Nikinmaa 2002)。此外，呼吸空氣魚類在演化過程是屬於多次單獨出現，發生呼吸空氣的次數在演化上至少出現 38~67 次，是一種偶發性的結果，可能剛好是環境狀態與棲地擴張相關 (Graham and Lee 2005)。因此，輔助呼吸器官會隨著物種的不同，具有形態的多樣性，例如：迷器、上鰓器、樹狀組織、氣鰓與肺等不同構造。

呼吸空氣魚類因為具有輔助呼吸器官，所以環境中的溶氧變少時，魚隻可以適當調整呼吸機制中的呼吸振幅與呼吸頻率，且不影響體內酸鹼平衡與血氧狀態狀態下，補充氣體交換的不足 (Burlison *et al.* 1998; Oliverira *et al.* 2004)。此外，在缺乏離子的環境中，一般的淡

水硬骨魚類會增生鰓絲與鰓薄板的富含粒線體細胞，以補充離子吸收的不足。但是因為富含粒線體細胞的增大與增生，會導致水流通道（water channel）變小與氣體擴散距離（blood-to-water diffusion distance）增加，這樣的現象會引發水流經過鰓薄板時出現擾動且增加氣體交換的障礙，對於氣體交換功能具負面的影響（Greco *et al.* 1996）。

相對的在呼吸空氣魚類因為輔助呼吸器官存在，可以協助鰓部的氣體交換功用，而不使呼吸機制受到影響。例如，鯰魚（*Hypostomus CF. plecostomus*），因為具有輔助呼吸器官一胃，所以當鰓薄板上的富含粒線體細胞增生時，不會影響其氣體交換的作用（Fernandes and Perna-Martins 2001）。利用皮膚當做輔助呼吸器官的兩棲型呼吸空氣魚類，具有特殊的短暫上陸行為，造成鰓絲表皮上存在著許多的黏液，會妨礙離子調節功能。所以富含粒線體細胞增生僅侷限於鰓薄板，氣體交換可藉由皮膚來進行（Moron and Oba 2003）。因此，呼吸空氣魚類具有的輔助呼吸器官，對於面臨環境變化時，有相當程度的協助，以增加生存機率（Hughes *et al.* 1973）。

二、水生型呼吸空氣魚類鰓部形態變異

實驗利用非呼吸空氣魚類的泰國四鬚魮（*B. schwanenfeldi*）與水

水生型呼吸空氣魚類的珍珠馬甲 (*T. leeri*)，來比較四對鰓在形態與離子調節功能的差異。雖然兩物種間的比較在邏輯或統計方面具有限制性，但大部份的生物學者承認，比較類型的研究文獻，對假設的演化適應鑑定與了解生理基礎有相當的貢獻 (Garland and Adolph 1994)。

首先，非呼吸空氣魚類的泰國四鬚鮃 (*B. schwanenfeldi*) 在鰓腔中可發現具有外鰓組織—偽鰓，偽鰓的功能大多被推測可能與協助離子調節有關 (Kültz *et al.* 1992; King *et al.* 1993; Bridges *et al.* 1998)，但本研究中並不討論此組織確切功用。組織切片染色發現此物種，四對鰓的形態並無顯著特化的結構，鰓絲密度，經統計分析，無顯著的變化，且鰓弓、鰓絲或鰓薄板亦無顯著的變異，與一般的非呼吸空氣魚類相似 (Mazon *et al.* 1998)。不過鰓絲與鰓薄板長度就明顯比珍珠馬甲 (*T. leeri*) 長，兩物種間鰓絲或鰓薄板長度不同，可能原因至少有兩點：其一是魚種之間種類不同，所導致的差異；其次，泰國四鬚鮃 (*B. schwanenfeldi*) 本身為活動力較高的物種，需要較大的鰓部呼吸表面積 (gill respiration surface area) 有關 (Jakubowski 1997)。

水生型呼吸空氣魚類的珍珠馬甲 (*T. leeri*)，第一到第四對鰓，形態有顯著的變異，尤其是假設特化成輸送充氧血的血管通道的第三與第四對鰓。在第四對鰓組織切片，出現類似擴大的血管腔室結構，所觀察到的紅血球數目遠多於其他三對鰓，這暗示著可能有利血液的

大量輸送。部份切片中發現，第四對鰓短小的鰓薄板消失不見，被一層上皮組織所覆蓋。這種現象，針對流經第四對鰓的血液，增加了氣體擴散距離 (Greco *et al.* 1996)。擴散距離的增加，根據氣體擴散定律 (Henry's law) 可以知道，第四對鰓中輸送的充氧血，其氧氣擴散到外界的效率就會下降，可確保血液具較高的含氧量，供體循環時使用。上述針對第四對鰓所具有的特殊結構，更支持特化成輸送充氧血的血管通道的說法 (Olson *et al.* 1986)。原本推測是輸送充氧血的血管通道的第三對鰓，切片結果中，形態大多與前兩對鰓相似，不像第四對鰓的觀察，具有擴大的血管腔室與增加氣體擴散距離，只有少數的切片，發現類似擴大的血管腔室。因此，第三對鰓的鰓部形態可能介於前鰓與第四對鰓之間，具有數量不多的類似擴大血管腔室且無增加血水屏障的上皮組織。而觀察到少數的類似擴大血管腔室，其原因可能與切片角度或位置不同有關，導致觀察到此結構出現的機率並不高。

而珍珠馬甲 (*T. leeri*) 無論是鰓絲密度、鰓弓、鰓絲與鰓薄板長度量化，後鰓皆明顯發現減少與變短，此現象與同屬於鱸形目的其他水生型呼吸空氣魚類所觀察到的結果相似 (Ishimatsu *et al.* 1979; Olson *et al.* 1994)。若鰓絲密度減少，鰓弓、鰓絲與鰓薄板的長度亦變小時，血液流經此鰓部的時間就可以縮短，快速的將流經迷器後的

充氧血送入體循環內利用 (Olson *et al.* 1986)。因此，型值部份的結果支持，第三與第四對鰓可能傾向成為輸送充氧血的通道血管。

一般而言，討論鰓部形態與呼吸功能的相互關係時，最常利用鰓部呼吸表面積檢視與棲息地環境、魚體活動力大小、捕食習性的相關性 (Jakubowski 1996、1997)。細部方法為量化鰓絲總長度、鰓薄板個數與鰓薄板上的面積，進行公式計算，數據轉形。在其他文獻中，水生型呼吸空氣魚類中的攀木鱸 (*Anabas testudineus*)、印地安鰓 (*Heteropneustes fossilis*) 與鱧科中的 *Channa gaucha* 已有被計算出鰓部呼吸表面積數值，且與非呼吸空氣魚類相互比較時，具有呼吸空氣能力的魚種，其鰓部呼吸表面積明顯變的比較小 (Fernandes *et al.* 1993; Perna and Fernandes 1996)。藉由測量鰓部型值的變化，可以說明呼吸空氣魚類，在鰓部的氣體交換功能，因為輔助呼吸器官的存在，所以有轉移的情形。相對的，若將實驗中的鰓絲密度、鰓弓長度、鰓絲長度與鰓薄板長度一起加總檢視，所得到的數據與其他文獻的帶入的公式有所不同，所以無法來進行魚種間的鰓部呼吸面積的比較。不過，從表四的數據中，推測第一到第四對鰓可進行呼吸的區域有顯著降低，代表著珍珠馬甲 (*T. leeri*) 鰓部除了形態的變異外，呼吸功能也有所消長。

螢光標定檢視富含粒線體細胞的結果，珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的四

對鰓，皆具有富含粒線體細胞存在，並因為檢視四對鰓時為直接利用2~3根鰓絲或部份迷器 (whole-mount) 進行觀察，角度不能完全統一且量化數量時無法利用肉眼清楚計算，因此對於無法精確推測鰓部的離子調節功用實際差異。此外，輔助呼吸器官的迷器，所標定到的數量顯著少於四對鰓，這個現象與迷器所特化出氣體交換功能有關 (Hughes *et al.* 1973 ; Burggern and Haswell 1979)，就不被預期具有離子調節能力。

珍珠馬甲 (*T. leeri*) 在一次去離水環境中4天，第一與第二對鰓的鰓薄板上富含粒線體細胞數量有顯著的增加，第三與第四對鰓就無顯著的變化。富含粒線體細胞的增加，意味是可以補充 Na^+ , K^+ -ATPase 的數量，代表鰓部在面臨環境變化時，離子調節功能會有改變 (Chang *et al.* 2003 ; Chang and Hwang 2004)。相同在水生型呼吸空氣魚類中的蒂河下口鯰 (*Hypostomus tietensis*)，藉由鰓絲與鰓薄板的富含粒線體細胞增生，可以來應付缺乏離子的環境 (Fernandes *et al.* 1998 ; Fernandes and Perna-Martins 2002)。鰓絲原本就是分布著富含粒線體細胞，為離子調節區域；鰓薄板原本分布較多的平鋪細胞，為進行氣體交換的地方 (Perry 1998)。因為具有輔助呼吸空氣器官存在，可以協助氣體交換，所以在面臨離子調節壓力時，水生型呼吸空氣魚類鰓薄板上可增加細胞。這樣的結果可能跟其特殊的呼吸空氣能力有關

係，不會排擠到氣體交換的能力 (Lin and Sung 2003)。例如：蒂河下口鯰 (*Hypostomus tietensis*) 可以利用胃來進行輔助呼吸 (Fernandes *et al.* 1998; Fernandes and Perna-Martins 2002)。珍珠馬甲 (*T. leeri*) 可以用迷器來進行氣體交換，對於第一與第二對鰓的鰓薄板上原本從氣體交換變成離子調節區域，有互補的效果，不會對魚隻產生呼吸能力上的壓力。第三與第四對鰓的鰓薄板上數量，雖然在面臨離子調節壓力時沒有增加的趨勢，不過富含粒線體細胞除了離子調節的功用外，此類型細胞可能還有負責酸鹼平衡與含氮廢物排除的功用 (Perry 1997)。只是目前的實驗無法檢視鰓部的這些功用，是否亦有分化的情形。

本研究欲檢視水生型呼吸空氣魚類的珍珠馬甲 (*T. leeri*)，四對鰓在形態與功能的可塑性，因此觀察鰓薄板上的富含粒線體細胞數量變化，可能無法完全說明每一對鰓中，所有富含粒線體細胞數量的變化。因為鰓絲部份的富含粒線體細胞，在此研究的切片角度下無法檢驗，需要從另一種角度，或是利用電子顯微鏡的方式觀察鰓絲的富含粒線體細胞數量 (Greco *et al.* 1996)。此外，實驗中未被觀察的鰓絲上富含粒線體細胞，其數量是否也會隨著鰓薄板上的富含粒線體細胞一樣，面臨離子調節壓力時，會有型值上的可塑性出現，是值得觀察的地方。

在缺乏離子的環境中，珍珠馬甲 (*T. leeri*) 鰓部鰓薄板的富含粒線體細胞數量增加上可塑性有差異。過去文獻藉由觀察廣鹽性海水魚的底鱯 (*Fundulus heteroclitus*) 與莫三比克吳郭魚 (*Oreochromis mossambicus*)，推測富含粒線體細胞數量的增加至少有兩種來源，其一是不活化的富含粒線體細胞 (inactivated MRC)，藉由改變與平鋪細胞間的結構，轉變成具有功用的富含粒線體細胞 (activated MRC) (Kato and Kaneko 2003; Lin and Hwang 2004)。其二是由新分化與未成熟的細胞，轉變類型補充而來 (Hiroi *et al.* 2005)。在水生型呼吸空氣魚類中，富含粒線體細胞的增加是否與上述推測相同，是為另一個的實驗方向。

廣鹽性海水魚的虱目魚 (*Chanos chanos*) 轉移到淡水環境 (0 g/L 半淡鹽水)，觀察到細胞數量增加的同時， Na^+ , K^+ -ATPase ESA 也會隨之上升 (Lin *et al.* 2003)。因此，珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的第一與第二對鰓， Na^+ , K^+ -ATPase ESA 是否也有相同的反應趨勢，可以與功能部份實驗進行對照。

三、水生型呼吸空氣魚類鰓部功能分化

在高張的海水環境之下，魚體必須持續排除流入體內的過多離子與藉由喝水來吸收水分，以應付從外界流入的離子與體內的水分流

失，維持體內離子濃度與滲透壓恆定 (Evans *et al.* 1999)。位於基底膜的 Na^+, K^+ -ATPase，主要功能是將鈉離子排出細胞外，以維持細胞內的低鈉離子環境，造成離子濃度梯度為負值。氯離子藉由亦為在基底膜的鈉、鉀與二氯離子共同運輸蛋白 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ cotransporter)，進入細胞中，在由富含粒線體細胞的頂端的氯通道 (Cl^- channel) 排除到細胞外。如此，會造成富含粒線體細胞所面臨的外界環境為負電荷，細胞內鉀離子可能就經由鉀通道 (K^+ channel) 來進行循環。最後，鈉離子會因為電位差的因素，藉由細胞間的滲漏連結 (leaky junction) 排除到細胞外 (Marshall *et al.* 2002; Hirose *et al.* 2003; Hiroi *et al.* 2005)。

在低張的淡水環境之下，魚體必須持續主動吸收的離子與利用稀釋的尿液，以補充體內離子流失與排除多餘的水分，維持體內恆定 (Evans *et al.* 1999)。在硬骨魚類離子輸送機制中，鈉離子的吸收，主要是藉由富含粒線體細胞頂端區域的 H^+ -ATPase，以主動的方式將氫離子送出細胞外，使細胞內產生負電荷較高的狀態，使得環境中的帶正電的鈉離子因為電位差的關係，由鈉離子通道 (Na^+ channel) 進入細胞中，另外一種方式可能是藉由頂端區域的鈉與氫離子交換 (Na^+/H^+ exchange)，進入細胞中。 Na^+, K^+ -ATPase，將細胞內的鈉離子送入血液中。此時，氯離子的吸收則是因為電位差的因素，利用頂

端區域的氯與碳酸氫根離子交換 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger) 和可能位於基底膜的氯離子通道 (Cl^- channel)，通過細胞進入血液 (Hirose *et al.* 2003; Perry *et al.* 2003)。由上述的淡水與海水環境之離子輸送模式，可以確定，位於基底膜的 Na^+ , K^+ -ATPase 對於離子的吸收與排除，在廣鹽性硬骨魚的研究中，都佔有重要的角色。

在實驗中一次去離子水與 5 g/L 半淡鹹水中的珍珠馬甲 (*T. leeri*)，其滲透壓值與控制組無顯著的差異，滲透壓值大約為 290 (mOsm/Kg)，與一般淡水硬骨魚的數值接近 (Evans *et al.* 2005)。滲透壓是由體液中的離子含量所組成，主要為鈉、鉀、鈣、鎂與氯等離子。大部份的實驗都利用滲透壓組成最大量的鈉與氯離子含量，來檢視體液組成，說明面臨環境變化時，魚體具調整吸收離子與排出離子的生理機制 (Morgan and Iwama 1998; Kelly *et al.* 1999 a、b)。

非呼吸空氣魚類的泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*)，若先從時間點來檢視，前鰓與後鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 趨勢為下降，在 24 小時最低，然後再回復到原始的活性值。這種活性變化趨勢，與預期魚隻被處理在離子調節壓力下，會有活性值上升的結果不相符合。可能因為實驗設計的時間點，與實際鰓部 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 上升的時間點不符，無法觀察出上升的趨勢。或是此物種為窄鹽性的硬骨魚，面臨環境變化鰓部的機能無法正常調節，與廣鹽性硬骨魚具有調節能力

時， Na^+ , K^+ -ATPase 會有上升的趨勢不相同 (Chang and Hwang 2004)。

水生型呼吸空氣魚類的珍珠馬甲 (*T. leeri*)，後鰓與迷器的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 高低，與其功用為何有關 (Hughes *et al.* 1973; Olson *et al.* 1986)，後鰓推測為推測成為輸送充氧血的血管通道，其形態已觀察具變異的情形，所以其活性值數據與專司呼吸功能的迷器相似，可能只為組織中基本含量，以維持機能正常。此外、實驗中不同時期的魚隻，因為養殖場的環境狀態、季節因素或個體間的差異，可能影響了細胞膜上脂質改變、酵素數量上不同或改變同功異構酶

(isoenzyme) 的表現，使同一物種在相同的實驗方法下，其 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 的數據，出現差異的情形 (Packer and Garvin 1998)。

在修正與微調在取鰓部蛋白質的方法並增加重複數後 (圖十六)，在珍珠馬甲 (*T. leeri*) 假設具功能可塑性的前鰓，其 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 有顯著上升。相對的，假設無可塑性的後鰓，其活性值則無變化。暗示前後對鰓在不同時間點之下，其離子調節功能可能有分化的情形。然而，此部份為觀察前後對鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA，沒有分開觀察四對鰓，因此，利用處理兩種不同的離子調節壓力，觀察到第一與第二對鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 皆有顯著的上升，說明了此兩對鰓在面對離子調節壓力時，可以增加進行排除離子或吸收離子的反應。相對的，第三與第四對鰓無上升的現象，無增加進行

排除離子或吸收離子的反應。因此可以推測珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的四對鰓，在離子調節壓力前提下，在 Na^+, K^+ -ATPase ESA 已具有分化的現象。

過去針對離子調節酵素— Na^+, K^+ -ATPase 文獻中，主要為利用鰓部組織中的第二對鰓，少數為第一對鰓，觀察魚隻在面臨不同的離子環境時，鰓部離子調節功能的變化，被檢視的魚種包括廣鹽性硬骨魚類，或洄游性魚類 (Uchida *et al.* 1997; Jensen *et al.* 1998; Morgan *et al.* 1998; Brill *et al.* 2001; Imsland *et al.* 2003; Katoh and Kaneko 2003; Lin *et al.* 2003; McCormick *et al.* 2003; Huong *et al.* 2004)。相對地，在窄鹽性淡水魚類鰓部功能的研究，因為實驗所要探討的方向與廣鹽性硬骨魚類不同，所以相關文獻比較少。本研究提供了屬於窄鹽性淡水魚中的水生型呼吸空氣魚類，在離子調節壓力下，鰓部形態變異與功能分化。

檢視功能變異的實驗中，處理了魚隻在自然環境中不會面臨的離子調節壓力，即一次去離水與 5 g/L 半淡鹽水，觀察四對鰓的 Na^+, K^+ -ATPase ESA 變異的情形。一次去離子水 4 天，推測具功能可塑性的第一與第二對鰓在活性值上皆有變化，這樣的結果，在生活史中不會接觸淡水的廣鹽性硬骨魚之虱目魚 (*Chanos chanos*) 與鱸科中的 *Dicentrachus labrax*，或是洄游性的鮭魚 (*Oncorhynchus kisutch*)，處

理在淡水 (0 g/L 半淡鹽水) 的情形類似，皆屬於在低滲透壓的環境 (hyposmotic)，鰓部的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 有上升現象，以維持體內恆定 (Jensen *et al.* 1998; Morgan and Iwama 1998; Lin *et al.* 2003)。

屬於廣鹽性淡水魚的海水適應型吳郭魚 (*Oreochromis mossambicus*) 相同轉移至淡水(0 g/L 半淡鹽水)環境時，鰓部的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 反而會隨著時間點增加而逐漸下降 (Lin *et al.* 2004)。所以面臨低離子環境時，鰓部的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 反應情形，可能會隨著魚種所屬的特性與環境壓力不同，而有所不同。5 g/L 半淡鹽水 4 天，珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的第一與第二對鰓，其 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 有上升的現象。這種活性上升的現象暗示著此處理對於魚隻，具有離子調節的壓力 (Evans *et al.* 1999; Sakamoto *et al.* 2001)。在具離子調節壓力下，前鰓 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 有上升的反應，與鰓薄板上富含粒線體細胞反應情形相同，這樣的結果與廣鹽性硬骨魚類所觀察到，富含粒線體細胞增加時， Na^+ , K^+ -ATPase ESA 亦有上升的現象相同 (Lin *et al.* 2003)。然而，對於窄鹽性淡水魚來說，似乎與廣鹽性海水魚的鱸科的 *Dicentrarchus labrax*，在面臨的 50、60 g/L 鹽水等的高滲透壓環境 (hyperosmotic) 時，呈現出上升的 Na^+ , K^+ -ATPase ESA，有所不同 (Jensen *et al.* 1998)。這個現象是因為廣鹽性海水魚的實驗中，處理的環境滲透壓值已經顯著的高於魚隻滲透壓，魚隻必須進行低滲透壓

調節 (Jensen *et al.* 1998 ; Shikano and Fuji 1999)。若檢視 5 g/L 半淡鹽水處理中，環境與魚體的滲透壓與鈉氯離子的含量，可以發現到環境的滲透壓值尚且低於魚隻，且鈉氯離子的含量亦低於魚隻，所以 5 g/L 半淡鹽水，對於珍珠馬甲 (*T. leeri*) 不會造成低滲透壓調節。不過，因為窄鹽性淡水魚的成長環境或生存壓力，不同於廣鹽性淡水魚或廣鹽性海水魚，因此 5 g/L 半淡鹽水的處理，對此類型魚隻可能會造成細胞所面臨的外在離子濃度改變，引發總部的離子調節功能的變化。

四、結論

本研究假說為，具有迷器的水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲 (*T. leeri*)，第一、二對鰓有形態與功能上的可塑性，來適應具離子調節壓力的環境。第三、四對鰓則不具可塑性，因為此兩對鰓已特化成輸送充氧血的血管通道。

結果呈現第一與第二對鰓的形態的觀察與非呼吸空氣魚類相似，無特殊的變異情形。富含粒線體細胞與 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 則在具離子壓力的環境中，有明顯的增加與上升，意味著這兩對鰓具有形態與功能上的可塑性；第三與第四對鰓，形態呈現出與第一和第二對鰓顯著不同，可觀察到膨大的血管腔室，已類似特化成輸送充氧血的

血管通道。富含粒線體細胞與 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 則在具離子壓力的環境中，皆無顯著的變化，意味著這兩對鰓不具有形態與功能上的可塑性。總而言之，水生型呼吸空氣魚類的珍珠馬甲 (*T. leeri*) 鰓部形態與功能已有分化情形出現，與實驗假說相符。

不過，鰓部功能除了氣體交換與離子調節以外，還有酸鹼平衡與含氮廢物的排除，在珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的鰓部功能分化部份，後兩者是否亦有分化的現象，是可再繼續討論的地方。

此外，迷器的觀察部份，無論是組織染色、粒線體螢光標定與 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 的結果，皆顯示出其主要為呼吸功能，相對在離子調節功用的可塑性則較缺乏。

五、未來實驗發展

- (1) 增加水生型呼吸空氣魚類的物種數量，與利用組織切片染色與 Na^+ , K^+ -ATPase ESA，來探討攀鱸亞目下魚種的四對鰓，是否都具有形態與功能的變異。
- (2) 記錄個體發育過程，以了解四對鰓在結構上變異的現象，從何時開始出現，且在發育過程中，鰓部與腎臟在滲透壓調節的功用上，是否會隨著不同的生活史，而有不同程度的轉移。

(3) 觀察攀鱸亞目下不同科的水生型呼吸空氣魚類，其迷器與鰓部在執行氣體交換功能的消長情形為何？並配合親緣關係，找出較原始的物種，其迷器或鰓部在呼吸功能上比例為何。藉此來討論，迷器最初的功用是否專司呼吸空氣。

參考文獻

- Brauner C.J., V. Matery, J.M. Wilson, N.J. Bernier, and A.L Val. 2004. Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from *Arapaima gigas*, an obligate air-breathing teleosts from the Amzon. *J Exp Biol* 207:1433-1438.
- Bridges C.R., M. Berenbrink, R. Müller, and W. Waser. 1998. Physiology and biochemistry of the pseudobranch: an unanswered question? *Comp Biochem Physiol* 119(A):67-77.
- Brill R., Y. Swimmer, C. Taxboel, K. Cousins, and T. Lowe. 2001. Gill and intestinal Na^+ - K^+ ATPase activity, and estimated maximal osmoregulatory costs, in three high-energy-demand teleosts: yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), and dolphin fish (*Coryphaena hippurus*). *Mar Biol* 138:935-944.
- Burggern W.W. 1979. Biomodal gas exchange during variation in environmental oxygen and carbon dioxide in *Trichogaster trichopterus*. *J. Exp Biol* 82:197-213.
- Burggern W.W. and S. Haswell. 1979. Aerial CO_2 excretion in the obligate air breathing fish *Trichogaster trichopterus*: a role for carbonic anhydrase. *J. Exp Biol* 82:215-225.
- Burleson M., B.S. Shipman, and N.J. Smatresk. 1998. Ventilation and acid-base recovery following exhausting activity in an air-breathing fish. *J Exp Biol* 201:1359-1368.
- Chang I.C. and P.P. Hwang. 2004. Cl^- uptake mechanism in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Physiol Biochem Zool* 77:406-414.

- Chang I.C., Y.Y. Wei, F.I. Chou, and P.P. Huang. 2003. Stimulation of Cl⁻ uptake and morphological changes in gill mitochondria-rich cells in freshwater tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Physiol Biochem Zool* 76:544-552.
- Diaz A.O., A.M. Garcia, C.V. Devinceenti, and A.L. Goldeemberg. 2001. Mucous cells in *Micropogonias furnier* gills: histochemistry and ultrastructure. *Anat Histol Embryol* 30:135-139.
- Evans D.H. 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J Exp Zool* 283:641-652.
- Evans D.H., P.M. Piermarini, and K.P. Choe. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rew* 85:97-177.
- Fernandes M.N. and S.A. Perna-Martins. 2001. Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus* CF. *plecostomus* (Loricariidae). *Rev Brasil Biol* 61:69-78
- Fernandes M.N. and S.A. Perna-Martins. 2002. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). *Acta Zool* 83:321-328.
- Fernandes M.N., S.A. Perna, and S.E. Moron. 1998. Chloride cell apical surface changes in gill epithelia of the Armoured catfish *Hypostomus plecostomus* during exposure to distilled water. *J Fish Biol* 52:844-849.
- Fernandes M.N., F.T. Rantin, A.L. Kalinin, and S.E. Moron. 1993. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. *Can J Zool* 72:160-165.

- Graham J.B. 1997. Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity, and Adatation. Academic Press, New York, USA.
- Graham J.B. and H.J. Lee. 2005. Breathing air in air: In water ways might extant amphibious fish biology relate to prevailing concepts about early tetrapods, the evolution of vertebrate air breathing, and the vertebrate land transition? *Physiol Biochem Zool* 77:720-731.
- Garland T., Jr, and S.C. Adolph. 1994. Why not do two-species comparative studies: limitation on inferring adaptation. *Physiol Zool* 67:797-828.
- Greco A.M., J.C. Fenwick, and S.F. Perry. 1996. The effects of soft-water acclimation on gill structure in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Cell Tissue Res* 285:75-82.
- Greco A.M., K.M. Gilmour, J.C. Fenwick, and S.F. Perry. 1995. The effect of softwater acclimation on respiratory transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Biol* 198:2557-2567.
- Hiroi J., S.D. McCorimick, R. Ohatni-Kaneko, and T. Kaneko. 2005. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel. *J Exp Biol* 208:2023-2036.
- Hirose S., T. Kaneko, N. Naito, and Y. Takei. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp Biochem Physiol* 136(B):593-620.
- Hughes G.M. and J.S. Datta Munshi. 1973. Fine structure of the respiratory organs of the Climbing perch, *Anabas testudineus* (Pisces: Anabantidae). *J Zool Lond* 170:201-225.

- Hughes G.M., S.C. Dube, and J.S. Datta-Munshi. 1973. Surface area of the respiratory organs of the climbing perch, *Anabas testudineus* (Pisces: Anabantidae). J Zool Lond 170:227-243.
- Hughes G.M. and B.N. Singh. 1970. Respiration in an air-breathing fish, the climbing perch *Anabas testudineus* Bloch. I. oxygen uptake and carbon dioxide release into air and water. J Exp Biol 53:265-280.
- Huong D.T.T., V. Jayasankar, S. Jasmani, H. Saïdo-Sakanaka, A.J. Wigginton, and M.N. Wilder. 2004. Na/K-ATPase activity during larval development in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of salinity on survival rates. Fisheries Science 70:518-520.
- Imsland A.K., S. Gunnarsson, A. Foss, and S.O. Stefansson. 2003. Gill Na⁺-K⁺-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. Aquaculture 218:671-683.
- Ishimatsu A. and Y. Itazawa. 1983. Difference in blood oxygen levels in the outflow vessels of the heart of an air-breathing fish, *Channa argus*: do separate blood streams exist in a teleostean heart? J Comp Physiol 149:435-440.
- Ishimatsu A., Y. Itazawa, and T. Takeda. 1979. On the circulatory systems of the snakeheads *Channa maculata* and *C. aargus* with reference to bimodel breathing. Japanese J Ichthyology (in Japanese) 26:167-180.
- Jakubowski M. 1996. Gill structure and morphometry of its respiratory components in the baikaluan golomyankas (Comephoridae; Cottoidei; Pisces). J Morph 228:19-26.

- Jakubowski M. 1997. Morphometry of gill respiratory area in the baikaluan deep-water sculpins *Abyssocottus korotneffi* and *Cottinella bouleengeri* (Abyssocottidae, Cottoidei). *J Morph* 233:105-112.
- Jensen M.K., S.S. Madsen, and K. Kristiansen 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺, K⁺-ATPase activity in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J Exp Zool* 282:290-300.
- Kaneko T., K. Shiraishi, F. Katoh, S. Hasegawa, and J. Hiroi. 2002. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. *Fisheries Science* 68:1-9.
- Katoh F. and T. Kaneko. 2003. Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and established 'time-differential double fluorescent staining' technique. *J Exp Biol* 206:4113-4123.
- Kelly S.P., I.N.K. Chow, and Y.S.W. Norman. 1999 a. Alteration in Na⁺-K⁺-ATPase activity and gill chloride cell morphometrics of juvenile black sea bream (*Mylio macrocephalus*) in response to salinity and ration size. *Aquaculture* 172:351-367.
- Kelly S.P., I.N.K. Chow, and N.Y.S. Woo. 1999 b. Halopalasticity of black seabream (*Mylio macrocephalus*): hypersaline to freshwater acclimation. *J Exp Zool* 283:226-241.
- King J.A.C., P.R. Smith, J.C. Ashcraft, and D. R. Drbona. 1993. Ultrastructure of the pseudobranch in the euryhaline cyprinodontid fish, *Rivulus marmoratus*. *J Morph* 218:127-142.

- Kramer D.J. and J.B. Graham. 1976. Synchronous air breathings, a social component of respiration in fishes. *Copeia* 4:689-697.
- Kültz D., R. Bastrop, K. Jürss, and D. Siebers. 1992. Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities. *Comp Biochem Physiol* 102(B):293-301.
- Lewis S.V. 1979 a. The morphology of the accessory air-breathing organs of the catfish, *Clarias batrachus*: a SEM study. *J Fish Biol* 14:187-191.
- Lewis S.V. 1979 b. A scanning electron microscope study of the gills of the air-breathing catfish, *Clarias batrachus* L. *J Fish Biol* 15:381-384.
- Lin Y.M., C.N. Chen, and T.H. Lee. 2003. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comp Biochem Physiol* 135(A):489-497.
- Lin C.H., C.L. Huang, C.H. Yang, T.H. Lee, and P.P. Hwang. 2004. Time-course changes in the expression of Na, K-ATPase and the morphometry of mitochondrion- rich cells in gills of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during freshwater acclimation. *J Exp Zool* 301(A):85-96.
- Lin L.Y. and P.P. Hwang. 2004. Mitochondria-rich cell activity in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae acclimatized to different ambient chloride levels. *J Exp Biol* 207:1335-1344.
- Lin H.C. and W.T. Sung. 2003. The distribution of mitochondria-rich cells in the gills of air-breathing fish. *Physiol Biochem Zool* 76:215-228.

- Marshall W.S., E.M. Lynch, and R.R.F. Cozzi. 2002. Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water. *J Exp Biol* 205:1265-1273.
- Mazon A. de F., M.N. Fernandes, M.A. Nolasco, and W. Severi. 1998. Functional morphology of gills and respiratory area of two activity rhephilic fish species, *Plagioscion squamosissimus* and *Prochiodus scrofa*. *J Fish Biol* 52:50-61.
- McCormick S.D. 1990. Fluorescent labeling of Na⁺, K⁺-ATPase in intact cells by use of a fluorescent derivative of ouabain: salinity and teleosts chloride cells. *Cell Tissue Res* 260:529-533.
- McCormick S.D., K. Sundell, B.T. Bjornsson, C.L. Brown, and J. Hiroi. 2003. Influence of salinity on the localization of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). *J Exp Biol* 206:4575-4583.
- Morgan J.D. and G.K. Iwama 1998. Salinity effects on oxygen consumption, gill Na⁺, K⁺-ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. *J Fish Biol* 53:1110-1119.
- Moron S.E. and M.N. Fernandes. 1996. Pavement cell ultrastructural differences on *Hoplias malabaricus* gill epithelia. *J Fish Biol* 49:357-362.
- Moron S.E. and E.T. Oba. 2003. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerethrinus unitaeniatus*. *J Exp Zool* 298(A):93-104.

- Munshi J.S.D., K.R. Olson, J. Ojha, and T.K. Ghosh. 1986. Morphology and vascular anatomy of the accessory respiratory organs of the air-breathing climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch). *Am J Anat* 176:321-331.
- Munshi J.S.D., K.R. Olson, P.K. Roy, and U. Ghosh. 2001. Scanning electron microscopy of the heart of the climbing perch. *J Fish Biol* 59:1170-1180.
- Nikinmaa M. 2002. Oxygen-dependent cellular functions-why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comp Biol Physiol* 133(A):1-16.
- Oliveira R.D., J.M. Lopes, J.R. Sanches, A.L. Kalinin, M.N. Glass, and F.T. Rantin. 2004. Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinide), exposed to graded ambient hypoxia. *Comp Bio Physiol* 139(A):479-485.
- Olson K.R., T.K. Ghosh, P.K. Roy, and J.S.D. Munshi. 1995. Microcirculation of gills and accessory respiratory organs of the walking catfish *Clarias batrachus*. *Anat Rec* 242:383-399.
- Olson K.R., J.S.D. Munshi, T.K. Ghosh, and J. Ojha. 1986. Gill microcirculation of the air-breathing climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch): relationships with the accessory respiratory organs and systemic circulation. *Am J Anat* 176:305-320.
- Olson K.R., P.K. Roy, T.K. Ghosh, and J.S.D. Munshi. 1994. Microcirculation of gills and accessory respiratory organs from the air-breathing snakehead fish, *Channa punctata*, *C. gachua*, and *C. marulius*. *Anat Rec* 238:92-107.

- Packer R.K. and J.L. Garvin. 1998. Seasonal differences in activity of perch (*Perca flavescens*) gill Na⁺/K⁺ ATPase. *Comp Biochem Physiol* 120(B):777-783.
- Perna S.A. and M.N. Fernandes. 1996. Gill morphometry of the facultative air-breathing loricariid fish, *Hypostomus plecostomus* (Walbaum) with special emphasis on aquatic respiration. *Fish Physiol and Biol* 15:213-220.
- Perry S.F. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu Rev Physiol* 59:325-47.
- Perry S.F. 1998. Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. *J Exp Biol* 119:9-16.
- Perry S.F., A. Shamsavarani, T. Georgalis, M. Bayaa, M. Furimsky, and S.L.Y. Thomas. 2003. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *J Exp Zool* 300(A):53-62.
- Quinn C.J.M., P.A. Veillette, and G. Young. 2003. Pseudobranch and gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*: developmental changes and effects of growth hormone, cortisol and seawater transfer. *Comp Biochem Physiol* 135(A):249-262.
- Sakamoto T., K. Uchida, and S. Yokota. 2001. Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleosts fishes to different salinities. *Zool Science* 18:1163-1174.

- Sakuragui M.M., J.R. Sanches, and M.N. Fernandes. 2003 Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J Comp Physiol* 173(B):309-317.
- Saroglia M., G. Terova, A.De. Stradis, and A. Caputo. 2002. Morphometric adaptations of sea bass gills to different dissolved oxygen partial pressure. *J Fish Biol* 2002:1423-1430.
- Shikano T. and Y. Fuji. 1998 a. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. *J Exp Biol* 210:3031-3040.
- Shikano T. and Y. Fuji. 1998 b. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation in a euryhaline teleosts, *Poecilia reticulata*. *J Exp Zool* 281:80-89.
- Shikano T. and Y. Fuji. 1999. Changes in salinity tolerance and branchial cells of newborn guppy during freshwater and seawater adaptation. *J Exp Biol* 284:137-146.
- Silva P., R. Solomon, K. Spokes, and F.H. Epstein. 1977. Ouabain inhibition of gill Na-K-ATPase: relationship to active chloride transport. *J Exp Zool* 199:419-426.
- Sollid J., P.D. Angelis, K. Gundersen, and G.E. Nilsson. 2003. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J Exp Biol* 206:3667-3673.

- Uchida K., T. Kaneko, A. Yamaguchi, T. Ogasawara, and T. Hirano. 1997.
Reduced hypoosmoregulatory ability and alteration in gill chloride cell
distribution in mature chum salmon (*Oncorhynchus keta*) migrating
upstream for spawning. *Mar Biol* 129:247-253.
- Wilhelm H. 1975. *Anatomy of Fishes*. Hans Richarz, Sank Augustin,
Germany.

表與圖目

表一、推測鰓薄板上富含粒線體細胞總量.....	70
表二、馴養與實驗用水質.....	71
表三、轉移實驗中，魚隻體長、體重、滲透壓與鈉氯離子含量.....	72
表四、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 鰓部呼吸區域推算.....	73
表五、改良萃取蛋白質的步驟.....	74
圖一、鰓薄板上富含粒線體細胞的計算方式.....	75
圖二、泰國四鬚魮 (<i>B. schwanenfeldi</i>) 與珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 四對鰓外觀形態.....	76
圖三、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 四對鰓與迷器外觀形態.....	77
圖四、泰國四鬚魮 (<i>B. schwanenfeldi</i>) 四對鰓的組織染色圖.....	78
圖五、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 的第一對鰓組織染色.....	79
圖六、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 的第二對鰓組織染色.....	80
圖七、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 的第三對鰓組織染色.....	81
圖八、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 的第四對鰓組織染色.....	82
圖九、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 迷器的組織染色.....	83
圖十、泰國四鬚魮 (<i>B. schwanenfeldi</i>) 與珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 四對鰓的鰓絲密度計算結果.....	84
圖十一、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 四對鰓在不同層級下長度量化結果...	85
圖十二、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>)，四對鰓與迷器的粒線體標定.....	86
圖十三、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>)，富含粒線體細胞的免疫組織化學染色結果.....	87
圖十四、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>)，四對鰓上的富含粒線體細胞，在馴養淡水 0 天、轉移淡水 4 天與一次去離子水環境 4 天中，細胞數量的變化情形.....	88

圖十五、泰國四鬚魮 (<i>B. schwanenfeldi</i>) 前後對鰓與珍珠馬甲前後對鰓與迷器 (<i>T. leeri</i>), 在一次去離子水中, 不同時間點, Na^+ , K^+ -ATPase ESA 趨勢.....	89
圖十六、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 前後對鰓, 在一次去離子水中, 不同時間點, Na^+ , K^+ -ATPase ESA 趨勢.....	90
圖十七、珍珠馬甲 (<i>T. leeri</i>) 四對鰓, 在馴養淡水 0 天、轉移淡水 4 天與一次去離子水 4 天與 5 g/L 半淡鹹水 4 天中, Na^+ , K^+ -ATPase ESA 變化情形.....	91

表一、推測鰓薄板上富含粒線體細胞總量

	鰓薄板上富含粒線 體細胞數量	馴養淡水 0 天下鰓 薄板平均長度	鰓薄板全長時的富 含粒線體細胞總量
馴養淡水 0 天	(MRCs/100 μm)	(μm)	(MRCs)
第一對鰓	2.94	45.22	132.98
第二對鰓	3.19	46.59	148.54
第三對鰓	2.52	40.56	102.26
第四對鰓	1.45	26.22	38.02
轉移淡水 4 天			
第一對鰓	2.85	45.22	128.70
第二對鰓	2.76	46.59	128.71
第三對鰓	2.69	40.56	108.98
第四對鰓	2.25	26.22	59.04
一次去離子水 4 天			
第一對鰓	4.87	45.22	220.23
第二對鰓	5.54	46.59	257.97
第三對鰓	2.99	40.56	121.17
第四對鰓	1.92	26.22	50.31

表二、馴養與實驗用水質

水質\環境	馴養淡水	轉移淡水	一次去離子水	轉移海水
水溫 (°C)	28 ± 1	28 ± 1	28 ± 1	28 ± 1
pH 值	7.38 ± 0.24	7.69 ± 0.05	6.85 ± 0.12	7.49 ± 0.08
滲透壓 (mOsm/Kg)	10.57 ± 1.27	6.89 ± 0.26	0.33 ± 0.17*	141.75 ± 4.21*
Na ⁺ (mM)	2.84 ± 0.36	0.97 ± 0.05	0.06 ± 0.01	36.09 ± 2.97*
Cl ⁻ (mM)	2.71 ± 0.45	0.87 ± 0.07	0.02 ± 0.01	88.36 ± 6.76*

* : Lsmeans , $P < 0.05$

表三、轉移實驗中，魚隻體長、體重、滲透壓與鈉氣離子含量

水質\環境	馴養淡水	轉移淡水	一次去離子水	轉移海水
體長 (cm)	9.12 ± 0.24	9.40 ± 0.16	9.26 ± 0.16	8.95 ± 0.09
體重 (g)	8.70 ± 0.61	9.33 ± 0.60	8.66 ± 0.54	8.32 ± 0.36
滲透壓 (mOsm/Kg)	280.50 ± 8.74 ^{NS}	282.75 ± 10.01 ^{NS}	269.67 ± 7.97 ^{NS}	291.00 ± 3.11 ^{NS}
Na ⁺ (mM)	101.61 ± 6.65 ^{NS}	105.51 ± 5.78 ^{NS}	92.61 ± 12.87 ^{NS}	106.96 ± 6.61 ^{NS}
Cl ⁻ (mM)	114.05 ± 13.88 ^{NS}	119.80 ± 9.87 ^{NS}	94.69 ± 18.06 ^{NS}	126.76 ± 8.03 ^{NS}

NS : Lsmeans , P > 0.05

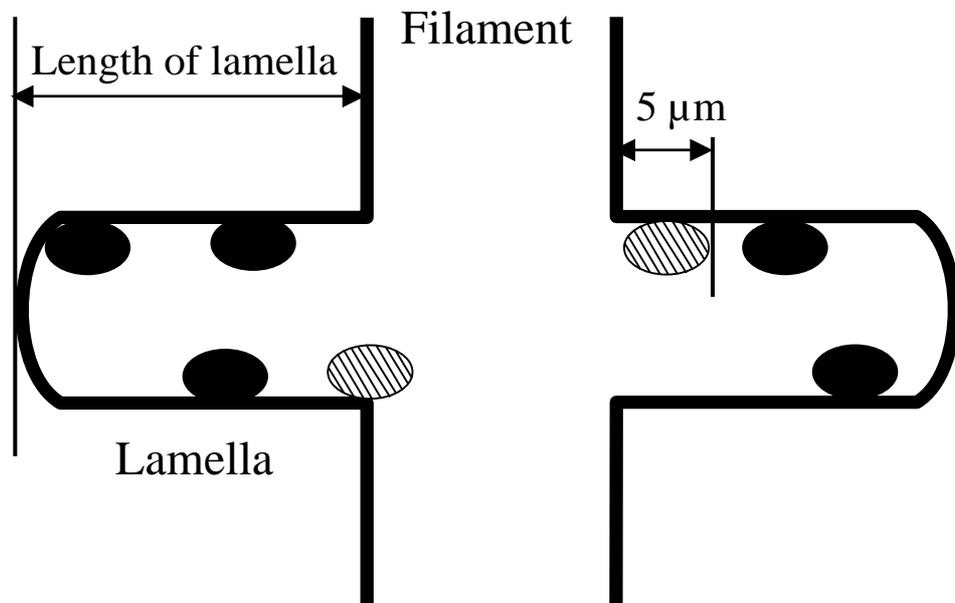
表四、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 鰓部呼吸區域推算

鰓/型值	鰓絲密度 (filament/mm gill arch)	鰓弓長度 (mm)	鰓絲長度 (mm)	鰓薄板長度 (mm)	呼吸區域計算
第一對鰓	58.46 ± 1.65 ^a	10.26 ± 0.26 ^a	1.21 ± 0.08 ^a	0.05 ± 0 ^{ab}	31.83 ± 1.57 ^a
第二對鰓	61.43 ± 2.23 ^a	8.94 ± 0.38 ^b	1.14 ± 0.06 ^a	0.05 ± 0 ^a	29.18 ± 2.2 ^a
第三對鰓	63.96 ± 3.38 ^a	6.81 ± 0.28 ^c	0.74 ± 0.04 ^b	0.04 ± 0 ^{ab}	13.24 ± 1.28 ^b
第四對鰓	48.45 ± 1.19 ^b	5.49 ± 0.23 ^d	0.33 ± 0.05 ^c	0.03 ± 0 ^c	2.21 ± 0.35 ^c

a、b、c : Tukey's studentized range test , $P < 0.05$

表五、改良萃取蛋白質的步驟

步驟\方法	改良前	改良後	改良原因
超音波破膜機次數	前後對總各 100 次	前後對總分別為 30 與 15 次	破膜次數過久， 導致酵素過熱
破膜頻率	1 次 / 1 秒、 不停留	1 次 / 1 秒、 次 - 次 / 2 秒	增加次數間距， 以利降溫冷卻
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase ESA 測定	非現測	現取現測	維持與固定酵素的 最好狀態
四對總 ESA	體積較小的第三與 第四對總出現負值 (n=9)	四對總活性 皆為正值 (n=9)	採用改良後方式進 行後續 ESA 測定 (2004.11~2004.05)

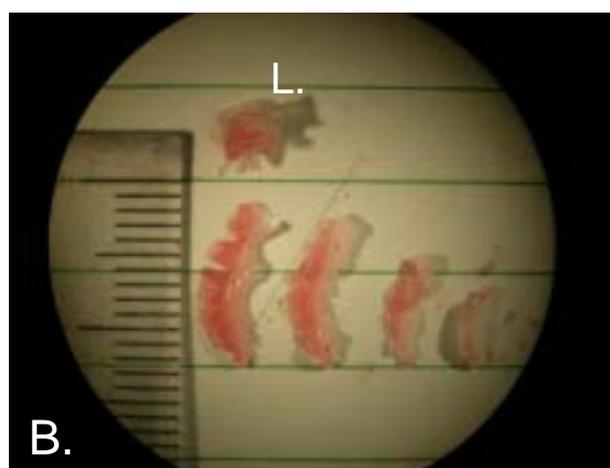
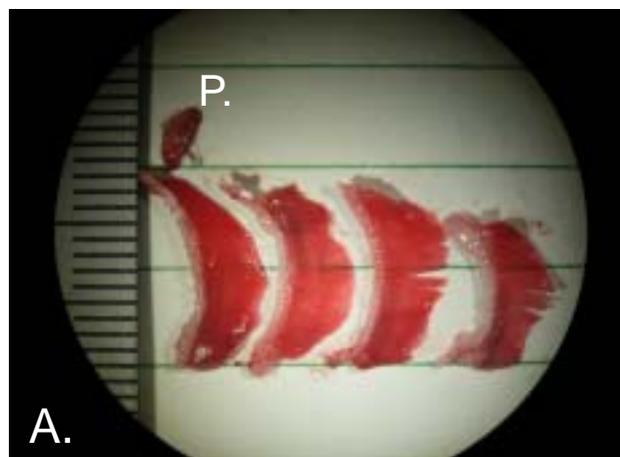


圖一、鰓薄板上富含粒線體細胞的計算方式。

● 表示列入計算的富含粒線體細胞

▨ 表示不列入計算的富含粒線體細胞

富含粒線體細胞的邊緣必須離開鰓絲 5 μm 以上，才算是鰓薄板的富含粒線體細胞。

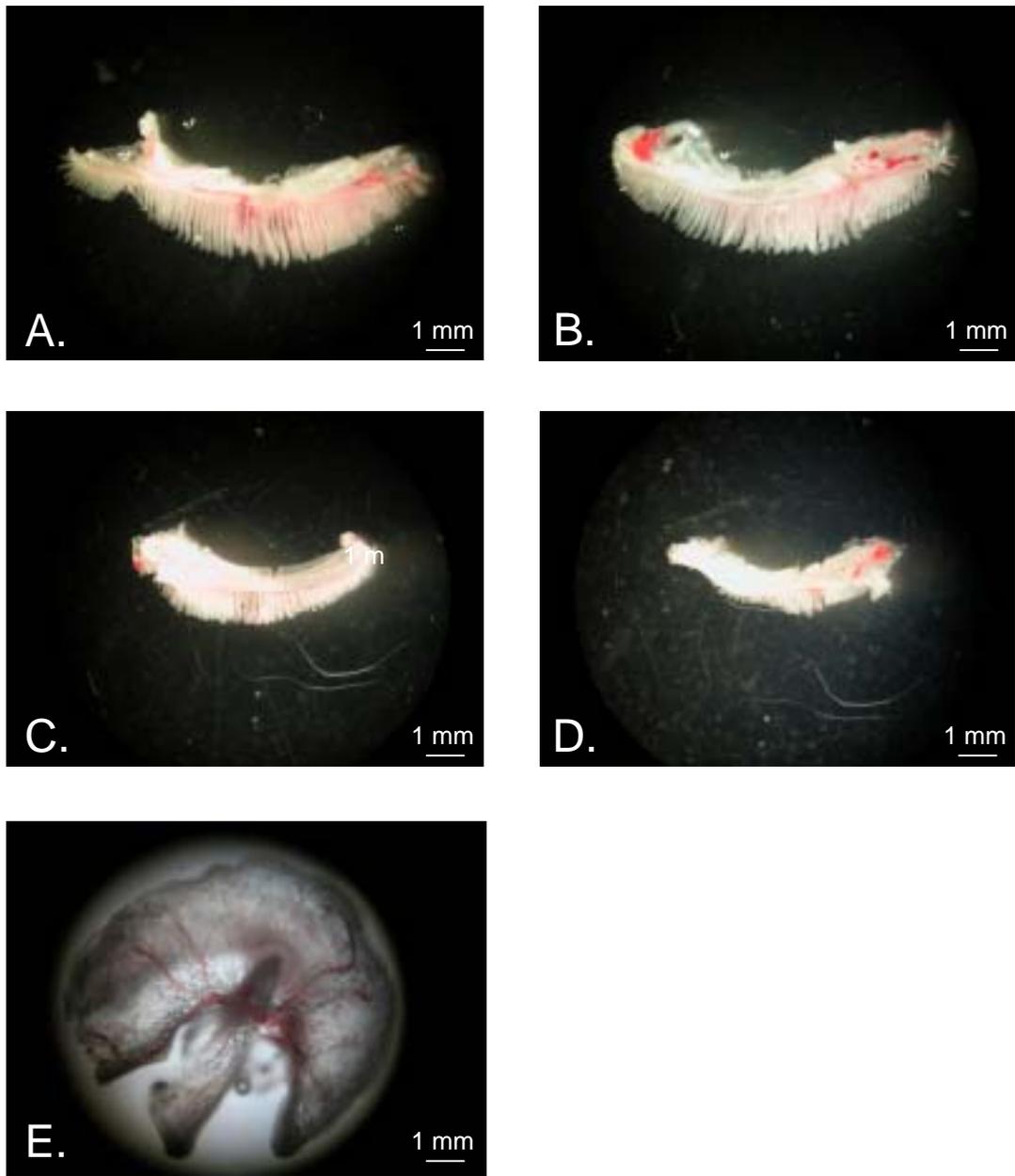


圖二、四對鰓外觀形態。從左到右為第一到第四對鰓。圖中刻度每一小格為 1 公厘。

A、泰國四鬚魮 (*B.s schwanenfeldi*)。

B、珍珠馬甲 (*T. leeri*)。

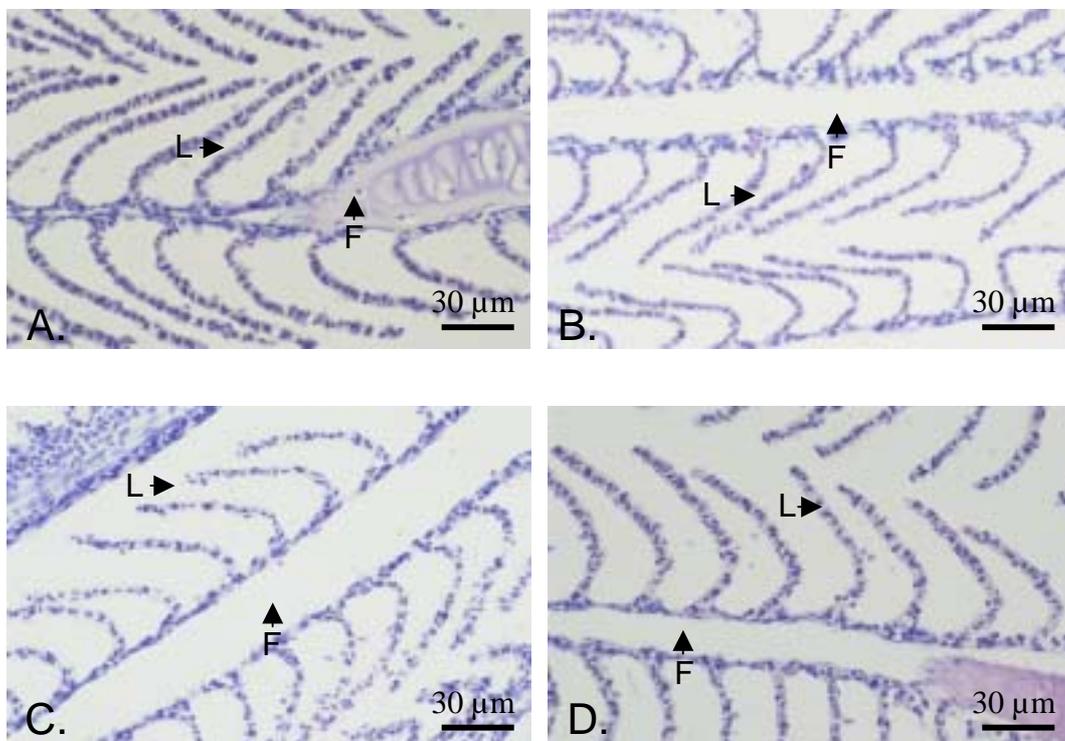
(P：偽鰓 L：迷器)



圖三、珍珠馬甲 (*T. Leeri*) 四對鰓與迷器外觀形態。

A-D、第一對鰓到第四對鰓。

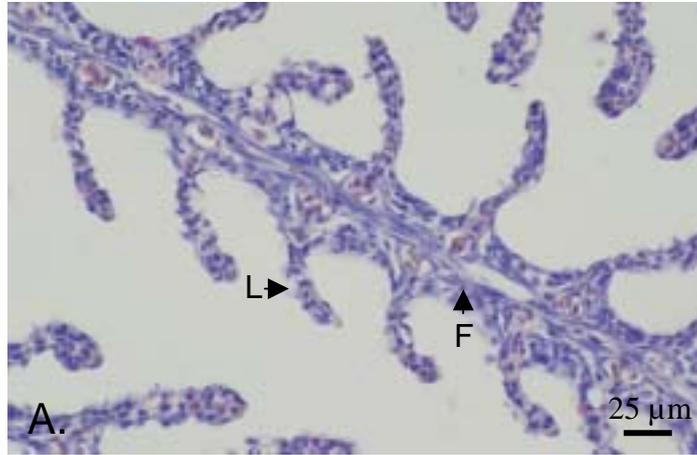
E、迷器。



圖四、泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldii*) 四對鰓的組織染色。

A-D、分別為第一、二、三及四對鰓。

(F：鰓絲 L：鰓薄板)

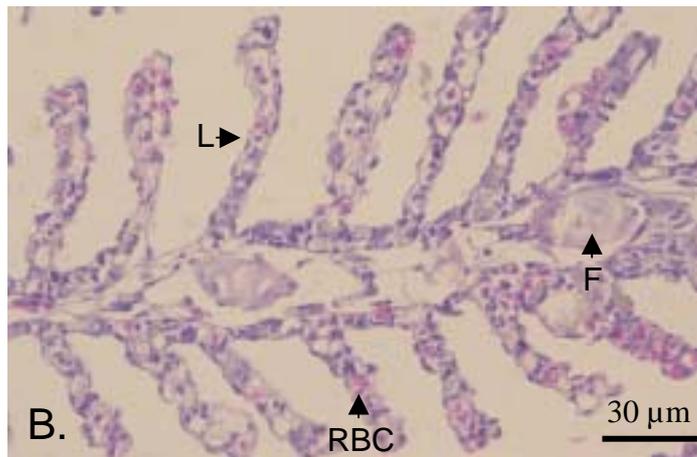
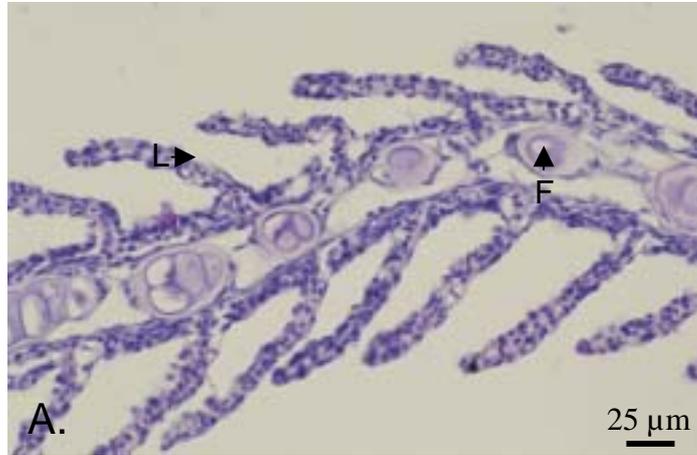


圖五、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的第一對鰓組織染色。

A、無顯著變異的鰓部組織。

B、鰓薄板中的血管腔室可容納 1~3 顆紅血球。

(F：鰓絲 L：鰓薄板 RBC：紅血球)

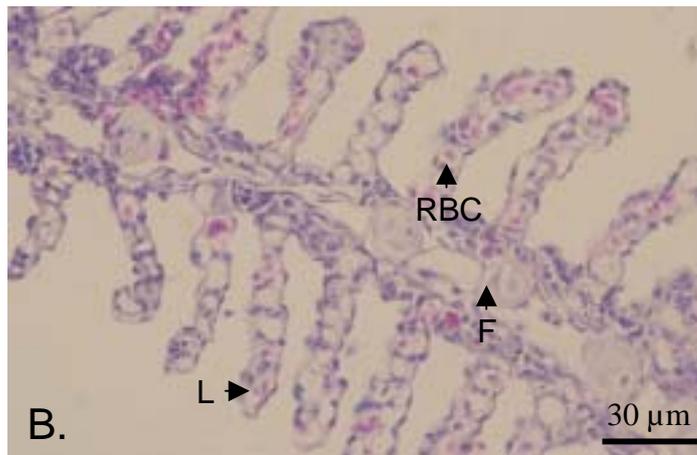
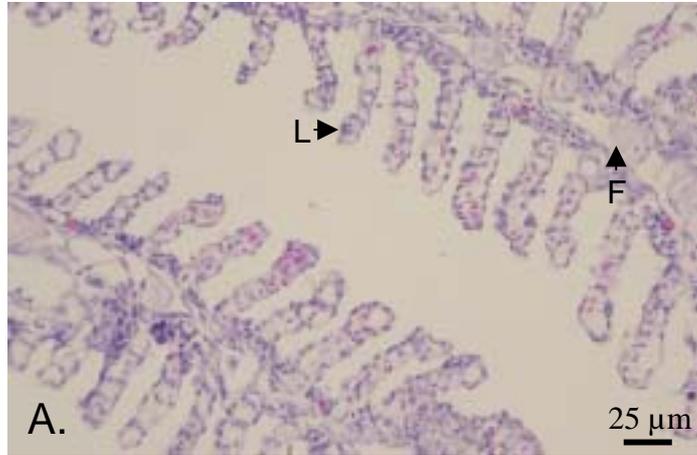


圖六、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的第二對鰓組織染色。

A、無顯著變異的鰓部組織。

B、鰓薄板中的血管腔室可容納 1~3 顆紅血球。

(F：鰓絲 L：鰓薄板 RBC：紅血球)

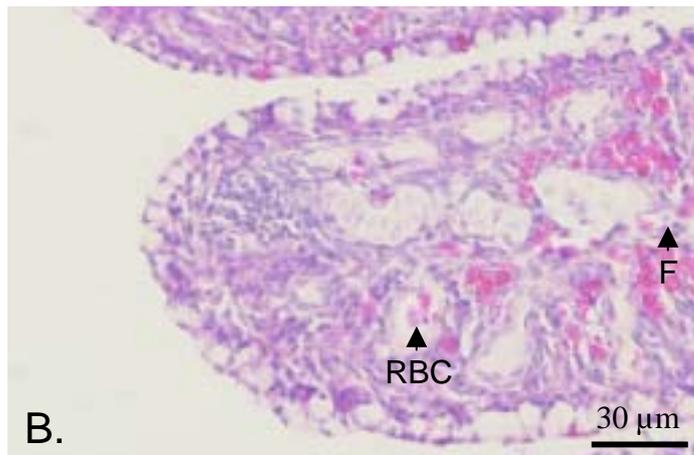
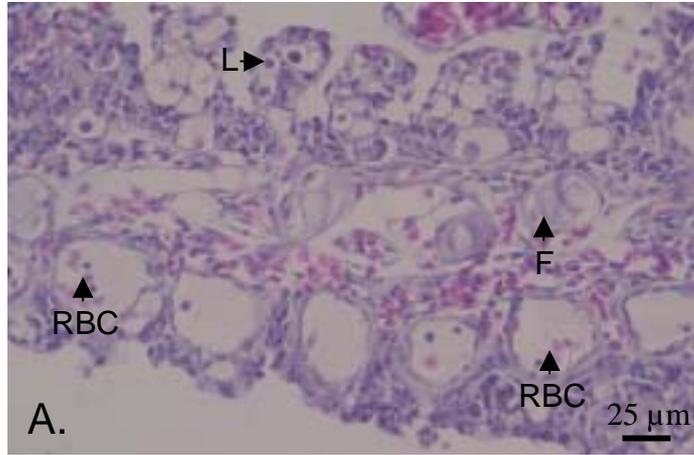


圖七、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的第三對鰓組織染色。

A、無顯著變異的鰓部組織。

B、鰓薄板中的血管腔室可容納 1~3 顆紅血球。

(F：鰓絲 L：鰓薄板 RBC：紅血球)

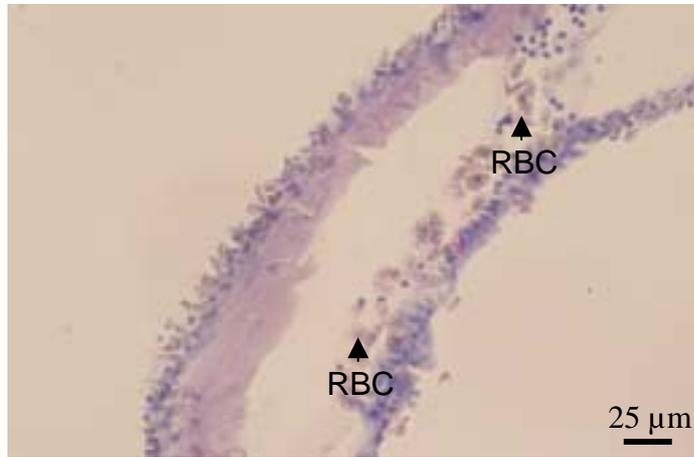


圖八、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 的第四對鰓組織染色。

A、具有擴大的血管腔室結構。

B、部份鰓薄板消失的鰓部結構。

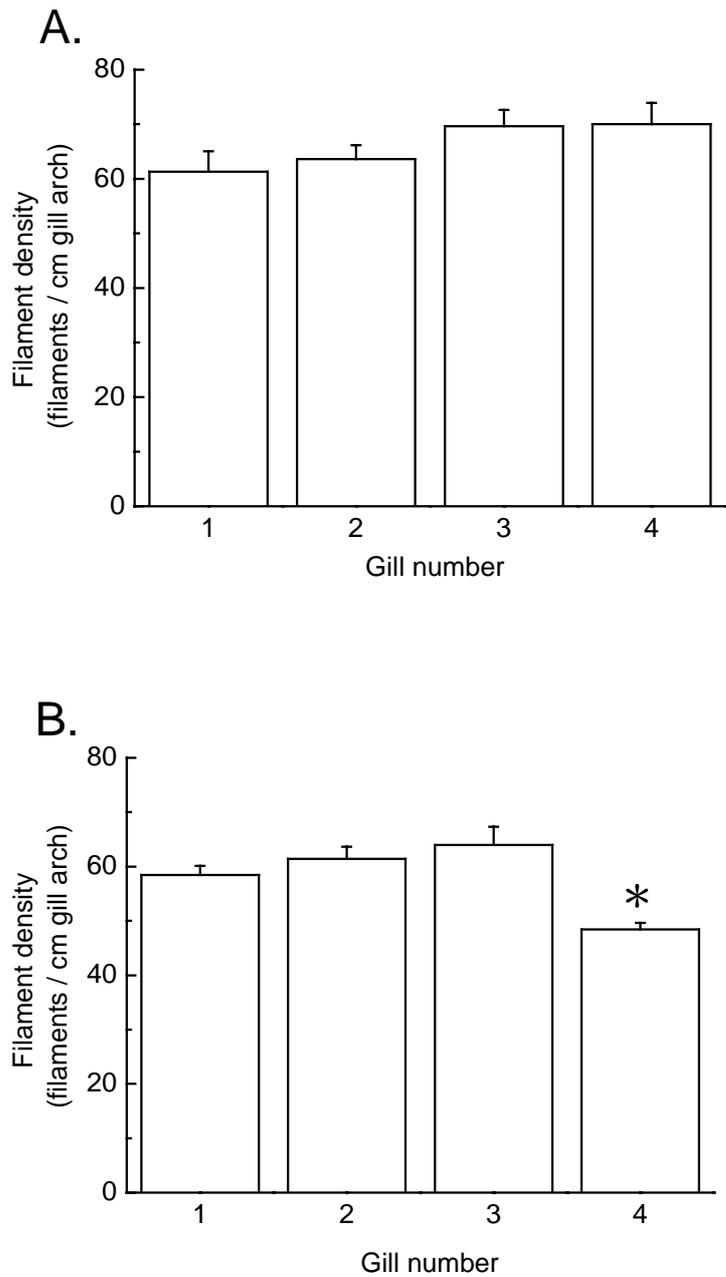
(F：鰓絲 L：鰓薄板 RBC：紅血球)



圖九、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 迷器的組織染色。

具有較短的氣體擴散距離與大面積的氣體交換區域，有利於迷器進行氣體交換作用。

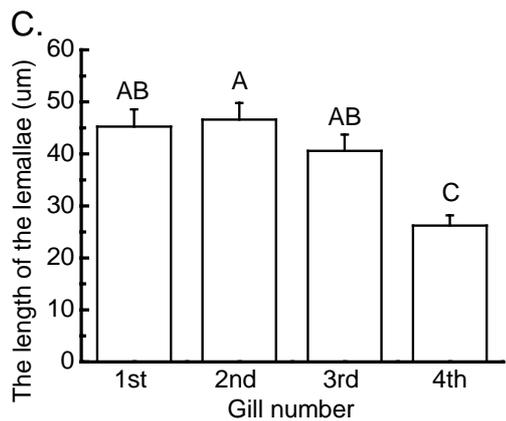
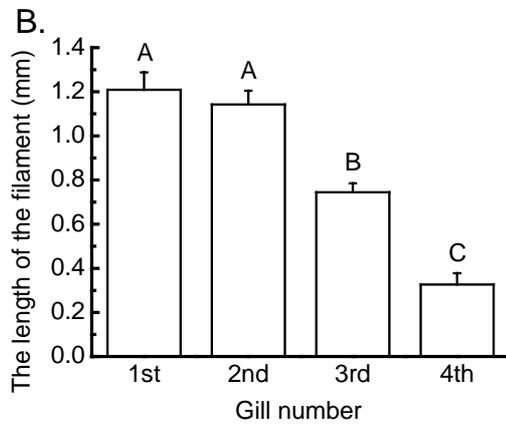
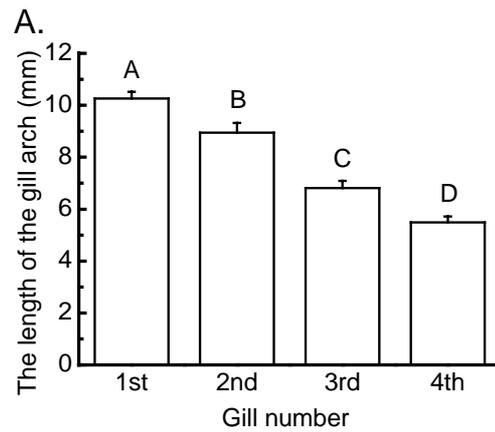
(RBC：紅血球)



圖十、泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*) 與珍珠馬甲 (*T. leeri*) 四對鰓的鰓絲密度計算結果。

A、泰國四鬚魮的四對鰓，密度無顯著差異 (Tukey's studentized range test, $P < 0.05$)。

B、珍珠馬甲的四對鰓，只有第四對鰓密度與其他三對不同 (* : Tukey's studentized range test, $P < 0.05$)。



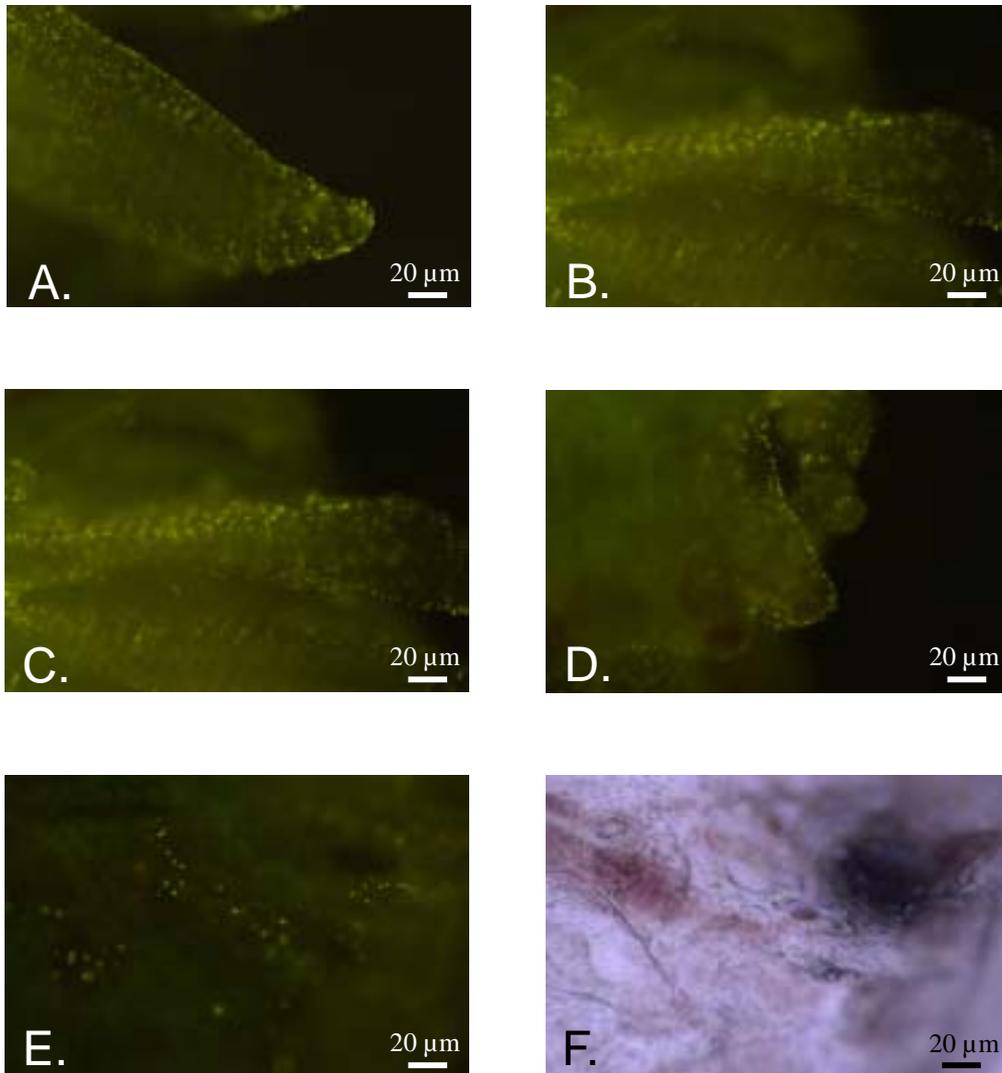
圖十一、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 四對鰓在不同層級下量化長度的結果。

A、鰓弓長度部份，第一對鰓到第四對鰓有遞減的趨勢。

B、鰓絲長度部份，第一與第二對鰓相似，第三與第四對鰓則傾向變小。

C、鰓薄板長度部份，只有第四對鰓的長度顯著最小。

(Tukey's studentized range test, $P < 0.05$)

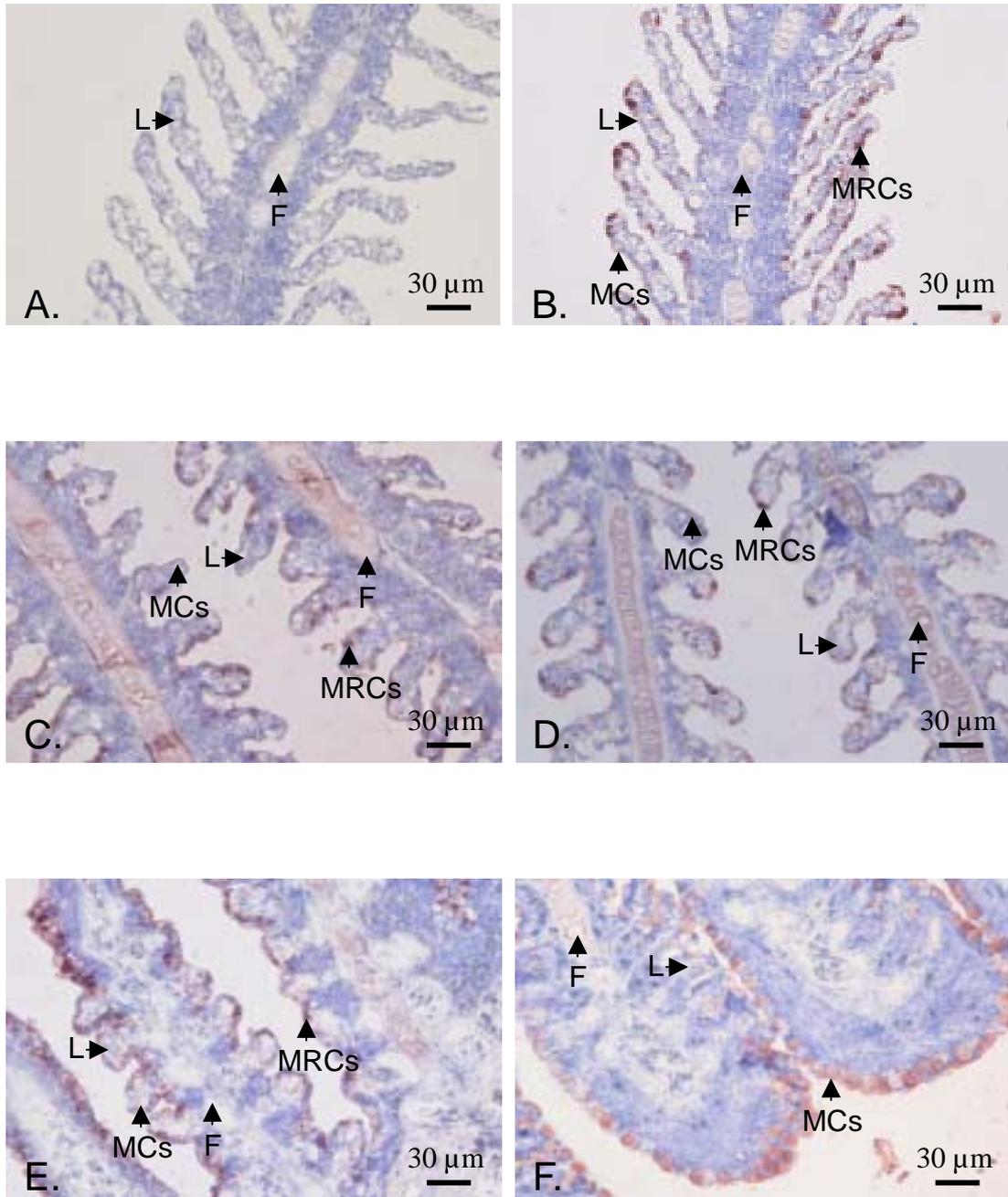


圖十二、珍珠馬甲 (*T. leeri*)，四對鰓與迷器的粒線體標定。

A-D、分別為第一、二、三及四對鰓。

E、迷器。

F、無進行螢光染色的迷器。



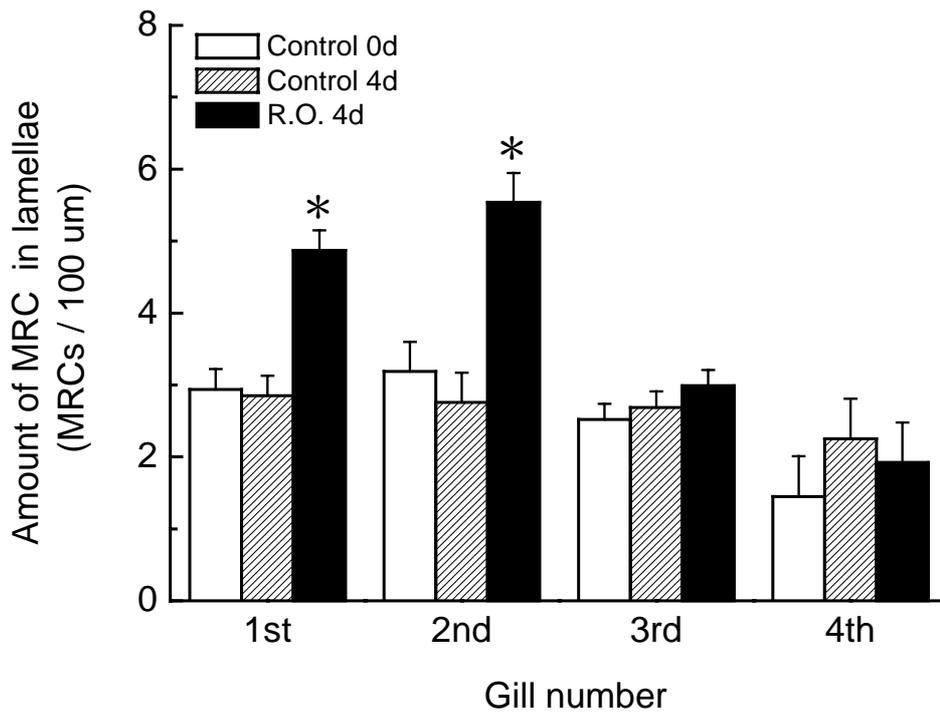
圖十三、珍珠馬甲 (*T. leeri*)，鰓薄板上富含粒線體細胞的免疫組織化學染色。

A、不加一級抗體的對照組結果。

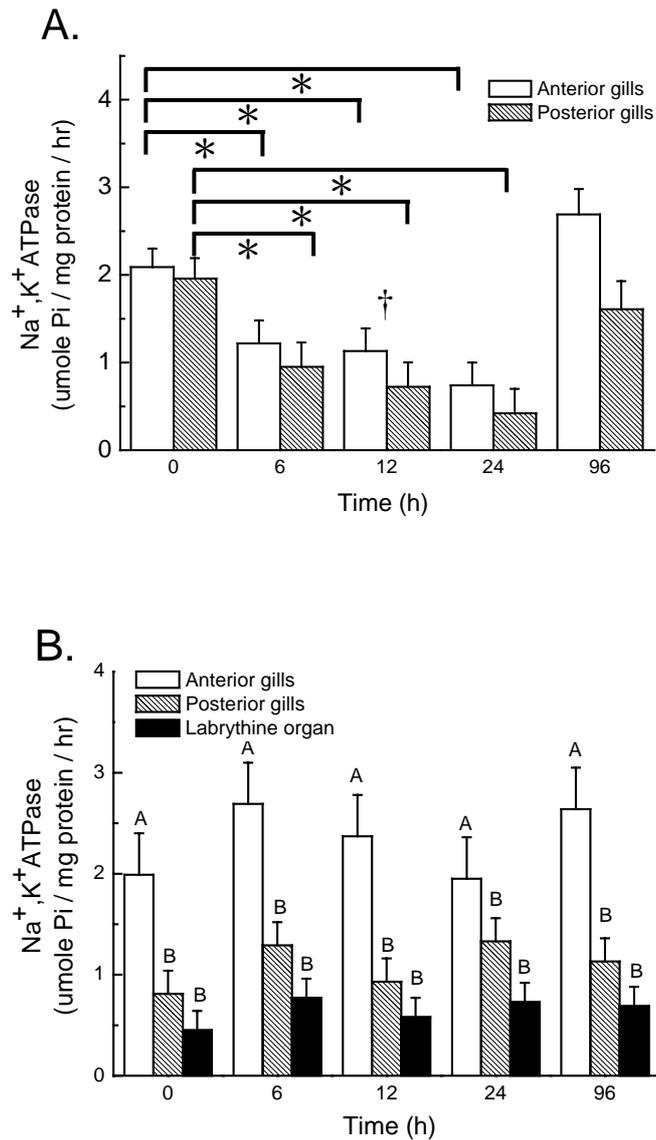
B-D、分別為第一、二、三對鰓。

E-F、四對鰓。

(F：鰓絲 L：鰓薄板 MRCs：富含粒線體細胞 MCs：黏液細胞)



圖十四、珍珠馬甲 (*T. leeri*)，四對鰓上的富含粒線體細胞，在馴養淡水 0 天、轉移淡水 4 天與一次去離子水環境 4 天中，細胞數量的變化情形。第一對與第二對鰓，在一次去離子水 4 天處理，細胞數量有顯著增加 (*：LSMEAN/PDIFF, $P < 0.001$)。第三與第四對鰓則無活性上升情形 (LSMEAN/PDIFF, $P > 0.05$)。

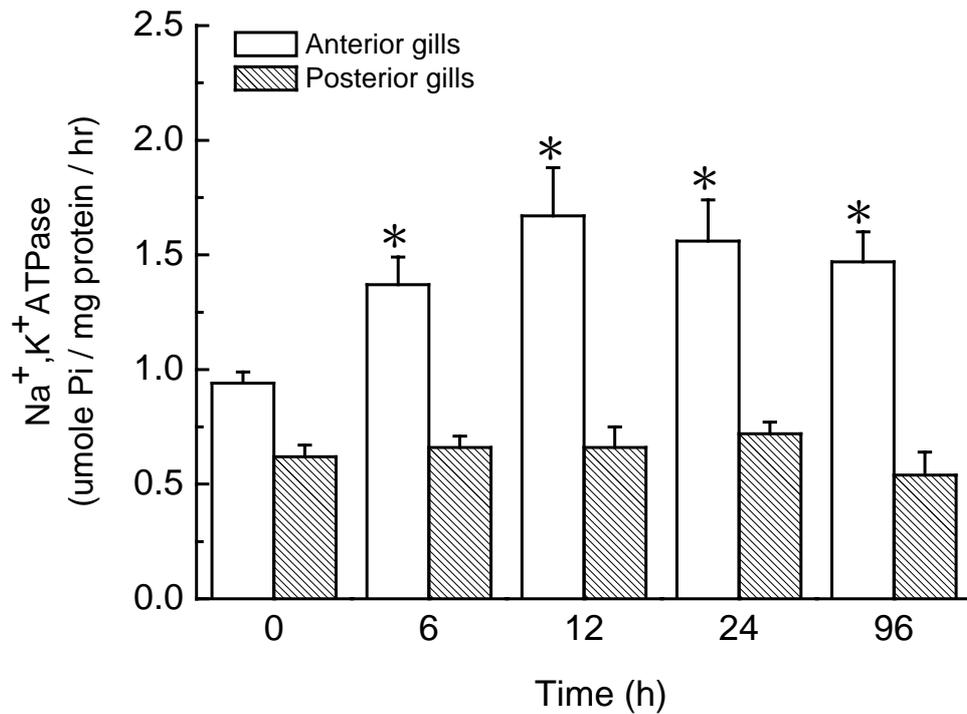


圖十五、泰國四鬚魮 (*B. schwanenfeldi*) 與珍珠馬甲 (*T. leeri*)，前後對鰓與迷器，在一次去離子水中，不同時間點，酵素活性趨勢圖。

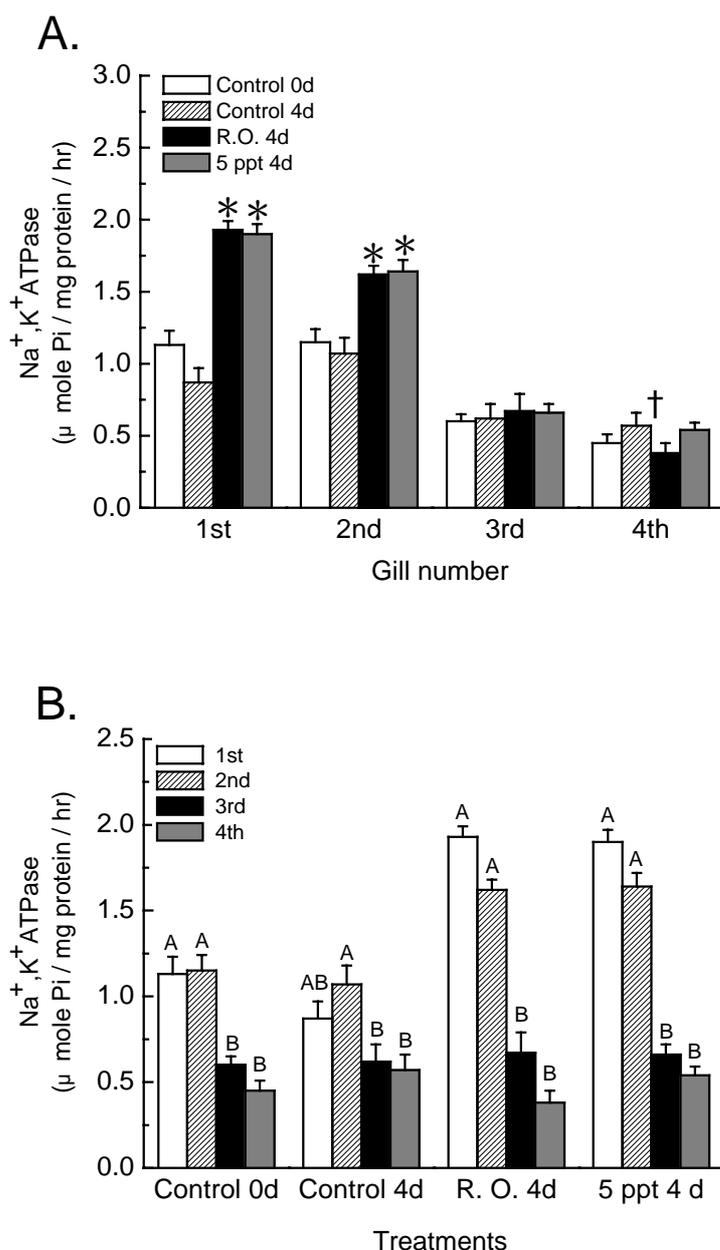
A、泰國四鬚魮前後對鰓活性。前鰓部份，只有 96 小時 Na^+, K^+ -ATPase ESA 與 0 小時無顯著差異 (LSMEAN/PDIFF, $P=0.12$)；後鰓部份，只有 96 小時 Na^+, K^+ -ATPase ESA 與 0 小時相同 (LSMEAN/PDIFF, $P=0.38$)。 (* : LSMEAN/PDIFF, $P<0.05$)。

在各時間點之下，前後對鰓 Na^+, K^+ -ATPase ESA 只有 12 小時顯著不同 († : Tukey's studentized range test, $P<0.05$)。

B、珍珠馬甲前後對鰓與迷器 Na^+, K^+ -ATPase ESA，在不同時間點下，皆無顯著差異 (LSMEAN/PDIFF, $P>0.05$)。且在各時間點之下，前後對鰓活性值皆顯著不同；後鰓與迷器無顯著不同 (A、B : Tukey's studentized range test, $P<0.05$)。



圖十六、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 前後對鰓，在一次去離子水中，不同時間點， Na^+ , K^+ -ATPase ESA 趨勢圖。統計分析後得知，前鰓活性值在各時間點之下皆與 0 小時有顯著的差異 (* : LSMEAN/PDIFF, $P < 0.05$)；後鰓 Na^+ , K^+ -ATPase ESA 在任何一個時間點下皆無明顯上升的趨勢 (LSMEAN/PDIFF, $P > 0.05$)。若前後對鰓的活性值來比較，在任何一個時間點之下，皆有顯著的差異 (Tukey's studentized range test, $P < 0.05$)。



圖十七、珍珠馬甲 (*T. leeri*) 四對鰓在馴養淡水 0 天、轉移淡水 4 天、一次去離子水 4 天與 5 g/L 半淡鹹水 4 天中，Na⁺, K⁺-ATPase ESA 變化情形。

A、第一對與第二對鰓，在一次去離子水與 5 g/L 海水 4 天的處理，Na⁺, K⁺-ATPase ESA 極顯著提升 (*)；第三與第四對鰓則無 Na⁺, K⁺-ATPase ESA 上升情形 (LSMEAN/PDIFF, $P > 0.01$)。(†: LSMEAN/PDIFF, $P = 0.0402$)

B、在馴養淡水 0 天、一次去離子水 4 天與 5 g/L 海水 4 天的處理，第一與第二對鰓 Na⁺, K⁺-ATPase ESA 大於第三與第四對鰓；在轉移淡水 4 天，鰓部 Na⁺, K⁺-ATPase ESA 分成三群 (Tukey's studentized range test, $P < 0.05$)。