

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科

052008

建立小綠皮珊瑚的保鮮盒養殖技術及觀察

學校名稱： 國立彰化女子高級中學

作者： 高二 蔡昱婕 高二 邱懷萱	指導老師： 劉國強
---------------------------------	------------------

關鍵詞： 小綠皮珊瑚 (Briareum stechei) 、珊瑚白
化、micro-incubation system

摘要

本研究致力於建立一套於保鮮盒中養殖小綠皮珊瑚的系統，旨在提供研究人員以簡單且低成本的方式進行珊瑚培育，甚至使高中生也能利用此系統進行相關研究。我們以單一珊瑚片段上的珊瑚蟲數量及施加藥劑誘導白化等變因為基準，比較不同條件下的生長與代謝反應，以量化小綠皮珊瑚的健康狀態。分析實驗數據後，結果顯示此系統具有可行性，所有小綠皮珊瑚樣本片段無論大小及是否為白化狀態，皆表現出穩定的生長，不僅存活率達 100%，小綠皮珊瑚的健康狀況也相較於培養前有所改善。此外，我們成功培育了白化狀態但仍健康的小綠皮珊瑚，以及僅含單一珊瑚蟲的珊瑚片段，有利於不同實驗目的的研究者進行相關研究。

壹、研究動機

本研究的實驗對象小綠皮珊瑚(*Briareum stechei*)是軟珊瑚(Malacalcyonacea) 的一種。軟珊瑚在珊瑚礁生態系統中扮演著重要的角色，其不僅為其他海洋生物提供躲藏和食物來源，亦具高度的生物多樣性。此外，軟珊瑚對環境變化極為敏感，因此其族群存活與分佈狀態可以作為氣候變遷的指標(S. Rajendra and C. Raghunathan., 2023)。

軟珊瑚具有潛在的生物醫學價值，例如體內的次級代謝物具有破壞鄰近其他生物組織、抑制其生長，甚至抵抗其他生物附著等作用(國立海洋生物博物館，2011)。然而，目前軟珊瑚面臨許多生存威脅，包括過度捕撈、污染、氣候變化等，期盼透過多方的深入研究，我們能夠制定與進行更有效的保護策略。

儘管軟珊瑚對於海洋生態系統至關重要，但對其復育培養的了解仍不夠(McFadden, C. S. et al., 2022)。其中最主要的因素是難以取得與培養實驗物種，研究因而受到阻礙 (Alutoin et al., 2001)。過去一般的養殖珊瑚需要昂貴且複雜的設備 (Craggs et al., 2017)。科學家們致力於建構易於處理的活珊瑚實驗平台，像是珊瑚晶片，但仍存在缺點 (Shapiro et al., 2016)，例如只能應用在少數的石珊瑚種類。

我們思索是否能建立一套系統，推動全國海洋教育讓全臺灣的高中生都能在學校實驗室

培養珊瑚，投入相關的珊瑚研究、保育的領域，進而達成復育的成就。這時我們注意到一項嶄新的技術，研究人員嘗試在直徑 9 公分的培養皿中培養石珊瑚，建立一個簡單的平台:珊瑚實驗室培養皿（Coral-on-a-Laboratory Dish, 以下簡稱 CLD）（Shikina et al., 2023），CLD 這個實驗平台除了可以維持珊瑚基本的生理功能外，也可以在顯微鏡下觀察珊瑚細微的結構，並應用於石珊瑚的生物及生理學等基礎研究中，但對於軟珊瑚的養殖技術仍尚未建立完成。

CLD 優點如下:

- 一、控制環境條件:可以在培養皿中精確控制水質、光線和溫度等環境因素，提供最適合珊瑚生長的條件。
- 二、減少外在影響:能隔離外部環境因素(如污染、疾病)，減少對珊瑚生長的負面影響。
- 三、研究以及保護:提供了一個方便的環境，用於研究、保護受威脅的珊瑚物種。
- 四、所需成本低廉:可簡單創造珊瑚微生長環境，無須冷水機等昂貴器材。平時定期餵食豐年蝦(*Artemia sp.*)及換水便可使珊瑚生長。
- 五、空間需求小: 只需培養箱內的部分空間，便可同時培養大量的珊瑚，以方便研究者操作或改變各種實驗變因。

在本研究中，我們使用透明保鮮盒來替代培養皿。保鮮盒除了在市面上方便取得外，且具有可密閉的扣蓋，可防止海水蒸發影響鹽度、隔離外界環境，且相較於培養皿，不需使用石蠟膜封住培養皿防止海水蒸發，可減少實驗廢棄物。此外，培養皿的高度及大小有限，保鮮盒則可配合研究的珊瑚物種選擇不同款式，適合用來培養珊瑚。

貳、研究目的

目前有關於軟珊瑚在實驗室培養的技術尚未被建立，本研究使用保鮮盒進行培養，以小綠皮珊瑚作為實驗生物，透過顯微鏡觀察組織構造及測量生理因子等方式，初步建立培養小綠皮珊瑚的技術，藉由此技術的突破，期望推動未來軟珊瑚研究的進展。

參、研究設備器材

一、實驗物種

小綠皮珊瑚屬於皮軟珊瑚科(Briareidae)、皮軟珊瑚屬(*Briareum*)，主要分布於西北太平洋以及東印度洋(Samimi et al. 2016)。皮軟珊瑚屬受到外在環境因素(波浪與海流)影響，在形態上具有高度的歧異性 (West et al. 1997)，而文獻中對其形態特徵描述仍不足 (Samimi et al., 2016)。此類珊瑚富含天然化學物質，隨著物質分離與鑑定技術的發展，這些化學物質經由提取，可在醫學上應用，像是抗菌或是防止病毒感染 (Chen et al. 2006; Wang et al. 2012; Yeh et al. 2012)，且它是目前最重要的 briarane 型二萜類化合物來源 (Sung et al. 2002; Hong et al. 2012)，這些海洋天然物在開發新藥方面有許多貢獻，成為醫藥界矚目的焦點，因此又被稱為養殖型皮軟珊瑚 (Malve H. 2016)。本研究之珊瑚物種選擇考量，是出於對小綠皮珊瑚在實驗室環境下可大規模且易於培養的期望，此選擇將有助於高中階段對於醫藥相關化合物之研究，學生可自行取得市售小綠皮珊瑚進行培養，並展開化合物萃取等相關實驗工作。

二、珊瑚取樣

本研究所使用的小綠皮珊瑚物種，均來自屏東海洋生物博物館水族實驗中心研究室 (22.0505°N, 120.6987°E)(圖 1a、圖 1b)。剪取不同的珊瑚片段，包含群體與獨立個體，分別給予樣本代號，確保珊瑚觸手伸出，代表其生理狀況良好後開始進行實驗。

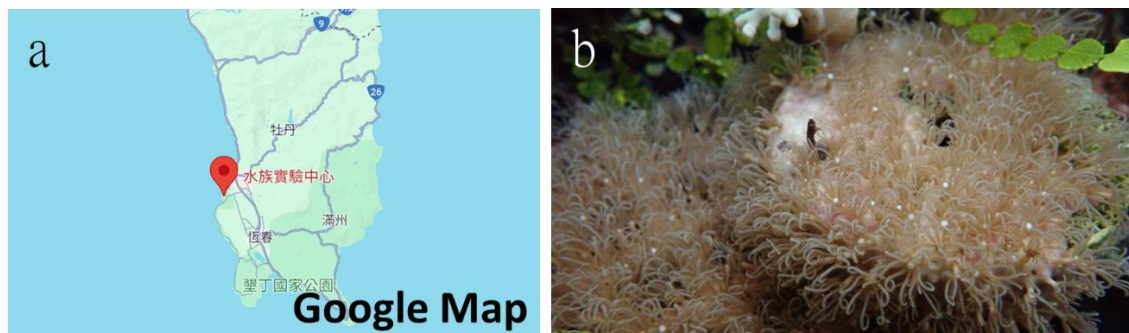


圖 1: 小綠皮珊瑚取樣點位置(a:取自 Google 地圖；b:諮詢人員協助拍攝)

a.水族實驗中心地理位置。b. 水族實驗中心的小綠皮珊瑚群體。

每個群體來源皆有將骨針取出以進行鑑種，確保物種的一致性(圖 2a、圖 2b、圖 2c、圖 2d、圖 2e)。小綠皮珊瑚骨針的長度大約介於 0.10 到 0.75 毫米之間。皮層骨針(圖 2fA)為無色，並且呈現紡錘形狀，可能具有直或彎曲的結構，帶有節點，呈橫向排列。而髓質骨針(圖 2fB)呈現洋紅色，帶有簡單或複雜的結節分支。相比皮質骨針，它們稍短，最長可達 0.60 毫米 (Samimi et al., 2016)。而經過對比，判斷其骨針形態與在圖鑑上的相同，確定此珊瑚物種為小綠皮珊瑚。

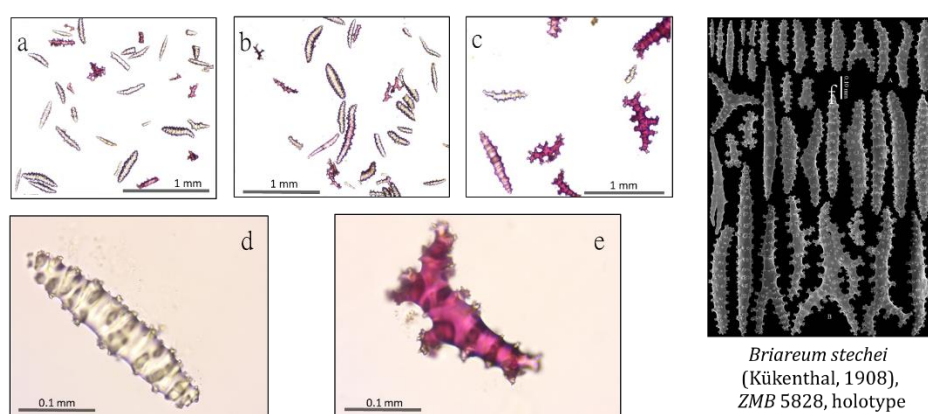


圖 2: *Briareum stechei* 骨針 (a,b,c,d,e:作者自行拍攝)

a, b, c 為用以鑑種之骨針。 d.皮層骨針。 e.髓質骨針。 f. 文獻中 *Briareum stechei* 骨針型態。

三、研究材料及儀器

實驗器材	用途
單溫層培養箱	提供良好培養環境
Pulse-amplitude Modulated(PAM螢光計)	測量共生藻光化學效率 (型號: Heinz Walz GmbH, Germany, JUNIOR-PAM)
水流抽氣機	加速海水的過濾
鹽度計	測量配製後海水鹽度(單位為ppt)
微量分注器	量取微量溶液
人工海水素	調配海水
過濾器	過濾海水(孔徑大小:0.22 μ m)
水族用瞬間膠	黏貼珊瑚碎片
保鮮盒	珊瑚之培養容器
豐年蝦卵	孵化餌食
滋養液	增加豐年蝦體內的高度不飽和脂肪酸(HUFA)，提升營養價值(來源:PACK Enrichment Diets)
數位相機	拍攝珊瑚狀態(型號:索尼，日本東京。RX100II)
解剖顯微鏡	觀察珊瑚(型號: Nikon, SMZ745T)
桌上型酸鹼度計SP-2100	測量海水的pH值
水質檢測試劑組	測量海水各離子濃度、鹼度
照度計	測量培養箱內部光強度
光譜照度計	測量培養箱內部光線之光譜

表 1:研究材料及儀器整理(作者自製)

四、過濾人工海水(Filter artificial seawater, FASW)製備

首先使用純水潤洗量杯，盛取所需的純水，然後添加足夠量的人工海水素，接著將磁力攪拌棒置入量杯中，並將其放在磁力攪拌機攪拌，使人工海水素充分溶解均勻，爾後進行三次鹽度測定，確定溶液鹽度為 35ppt 後，使用過濾器去除水中的雜質和微生物，完成過濾後再次進行一次鹽度檢測，以確保鹽度的準確性。之後便進行 pH 值的調整，若 pH 值過高，以稀釋後的 HCl 調整，直到 pH 值呈現大約 8.2 左右。

肆、研究方法步驟

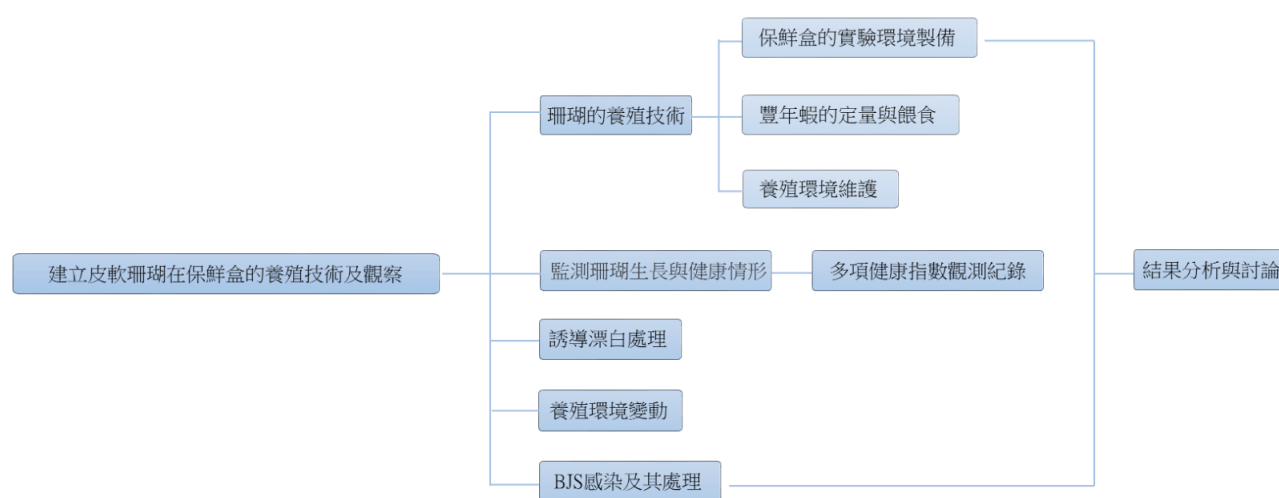


圖 3:研究架構圖(作者自繪)

一、實驗簡介

本研究針對以保鮮盒養殖軟珊瑚，在不同環境條件下，尤其是在高中校園內養殖的可行性進行深入探討。本研究共分成兩個階段。階段一:初步建立此項技術。

階段二:

(一)擴大樣本母體數及樣本數量以更加證實此系統的可行性。

(二)更換切割工具及避免寄送，降低珊瑚的初始健康狀況因系統製備受到的影響。

(三)新增監測項目，進一步優化此系統。

相異處	階段一	階段二
切割珊瑚工具	剪刀	筆刀
定量	面積	珊瑚蟲數量
母體樣本數	3 個群體	5 個群體
樣本數	大片段×6、小片段×12	大片段×30、小片段×30
水質檢測	無	有
珊瑚寄送	有	無
Fv/fm	有	無

表 2:實驗的兩階段相異處(作者自製)

關於 Fv/fm 值:在階段二，由於已從大學端返回本校，而本校無相關測量工具，嘗試尋求其他管道租借也未果，因此此項指標僅利用階段一的數據。

二、珊瑚的養殖技術

(一)保鮮盒的微環境製備

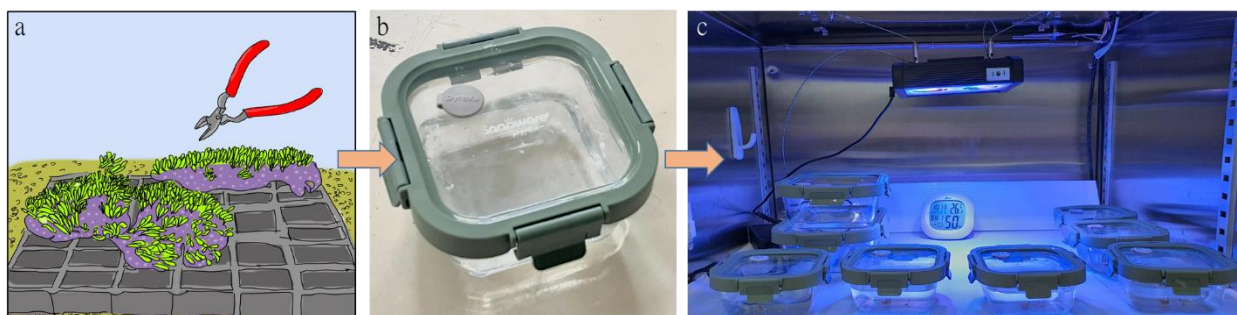


圖 4:實驗環境製備(作者自行繪圖及拍攝)

a. 剪取所需片段。b. 實驗用保鮮盒。c. 培養箱內部環境

取不同的小綠皮珊瑚群體，剪下所需片段，再以水族用瞬間膠黏在膠片上，置放於玻璃保鮮盒內（圖 4a、圖 4b）。待珊瑚黏妥，以過濾後的定量人工海水 (FASW)潤洗兩次，最後加入 200 ml 的人工海水，並蓋上蓋子以防止水分蒸發，於配備 LED 藍燈的培養箱中進行養殖(圖 4c)，過程中定期餵養豐年蝦。

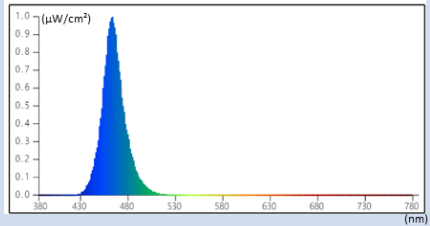
溫度	光週期	光強度	光波長
22°C	光照12小時 (9:00-21:00)	1.1(cd)	

表 3:培養環境條件(作者自製)

(二)珊瑚實驗樣本的區分

階段一:將三個群體各分為二組(正常處理組、白化實驗組)，共六小組，每小組各有一個約 1cm x 1cm 的小綠皮珊瑚片段 (多於兩個珊瑚蟲)，定義為大片段(群體)，及兩個僅含有一個珊瑚蟲的片段，定義為小片段(個體)，且以大片段位在盒內左側，分別將靠近上側的定義為小上，而靠近下側的定義為小下(圖 5)。

階段二:將五個群體各分為二組(正常處理組、白化實驗組)，共十小組，每小組各有三個約含有 5~10 個珊瑚的小綠皮珊瑚片段，定義為大片段，分別給予代號 A、B、C;三個僅含有一個珊瑚蟲的片段，定義為小片段，分別給予代號 a、b、c (圖 5)。

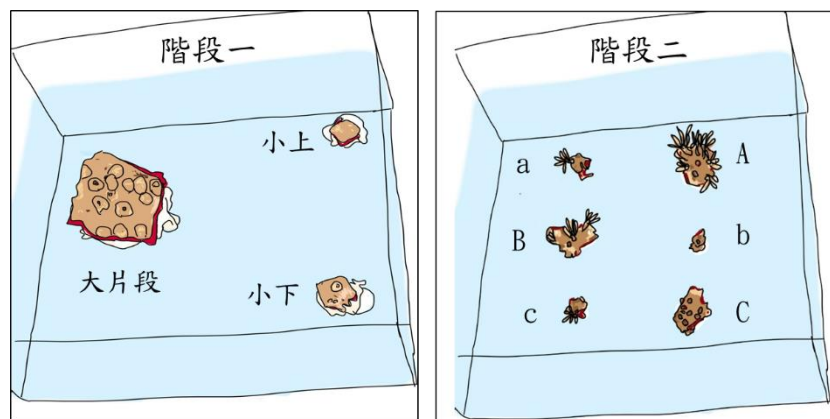


圖 5:實驗環境製備(作者家人協助繪圖)

區分大小片段的目的是:

- 1.比較個體與群體何種型態更適合於該系統的培養，提供未來的研究者參考。
- 2.若能以此系統培養僅含單一小綠皮珊瑚蟲的片段，可避免群體內不同珊瑚

蟲的生理差異造成的實驗誤差。

3.目前仍不清楚珊瑚蟲在群體中是否互相有化學訊號的傳遞，進而影響珊瑚生長。若僅含單一珊瑚蟲的片段的培養成功，便能推動相關研究的進展。

(三)豐年蝦餌食的培養與定量餵食

除了珊瑚體內共生藻行光合作用所產生的營養外，我們也餵食豐年蝦作為其營養來源之一。根據前人研究，飼養珊瑚時在 500 隻豐年蝦/60ml 海水中珊瑚能夠輕易的以觸手捕捉 (Shikina et al., 2023)，而 500 隻豐年蝦的重量約是 0.0025g，參考這幾項數據，為每回餵食的豐年蝦定量。

產出可供餵食的豐年蝦所需時間約為 40-42 小時。先使用約一天的時間孵化，將海水裝入 300ml 的塑膠容器，在有加熱棒助恆溫 25°C 之容器內隔水加熱 (圖 6a)。孵化完成後，加入 0.25 μL 滋養液滋養豐年蝦(圖 6b)，約 16 至 18 小時完成後即餵食。孵豐年蝦的步驟完畢後，利用虹吸現象的原理，將原本在塑膠罐裡的豐年蝦取出，並去除蝦殼及未孵化的蝦卵。

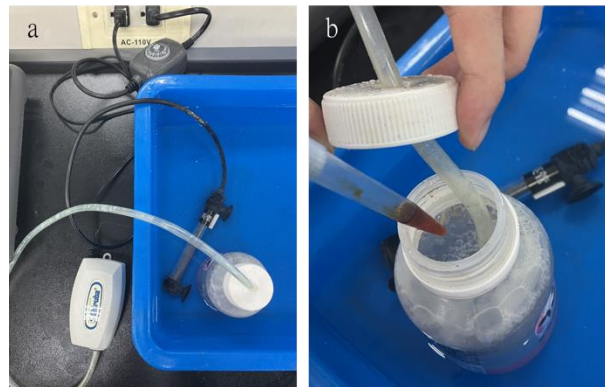


圖 6:孵化、滋養豐年蝦示意圖(作者自行拍攝)

a. 孵化豐年蝦之裝置圖。b. 滋養豐年蝦示意圖。

為考量珊瑚觸手是否能輕易捕捉到豐年蝦作為餌食，餵食豐年蝦前，需計算及定量餵食量。其方法如下：計算豐年蝦數量時，首先吸取 50 μL 孵化且滋養後的豐年

蝦液，滴數滴至培養皿後，計算每滴含有的豐年蝦量，再放置至顯微鏡底下確認數量(圖 7)，依比例調配後，最後得到濃度為 50 隻豐年蝦/50 μ L 海水的溶液。

確定豐年蝦液體的濃度後，使用微量分注器在每個保鮮盒(200ml)裡加入 2.4ml 配置完畢的溶液，每組餵食 2400 隻的豐年蝦。餵食時間固定為每週二、五，餵食後三小時更換 FASW。

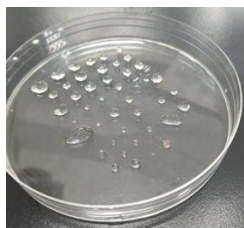


圖 7:以培養皿計算豐年蝦數量(作者自行拍攝)

(三) 海水化學因子監測

配合餵食時間，每 3 天用新鮮的 FASW 更換保鮮盒中的海水。為了確保養殖環境的水質穩定，於階段二新增此監測項目。在剛換水時以及其三天後(餵食前)收集海水以檢測水質。測量項目包含鹽度、pH 值、鈣離子 (Ca^{2+})、鎂離子(Mg^{2+})、鹼度、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 。作為對照組，在兩個無珊瑚片段的保鮮盒中也注入新鮮 FASW，在相同環境中培養 3 天，並測量其水質變化。

三、誘導白化 (bleaching) 處理

根據科學家的研究，可以透過薄荷醇(menthol)處理(最終濃度：0.19 mM)誘導白化(Wang et al., 2012)。我們於週一至週五每天早上九點加入薄荷醇，並於下午五點將培養盒中的溶液換成新鮮的 FASW。誘導白化是為了和對照組(未經誘導白化處理)進行珊瑚蟲健康指數的比較，作為珊瑚健康程度的指標。此外，本研究希望透過誘導白化處理，扣合研究目的，使高中學生可以在學校實驗室培養不具共生藻的小綠皮珊瑚，進行珊瑚白化的相關實驗，例如在取得白化珊瑚後，探討不同條件下共生藻回到珊瑚本體的可行性與所需時間。

四、監測珊瑚生長與健康情形

(一)存活率 (survival rate) 、異常率 (abnormality rate)

存活率的定義:

$$\text{存活率} = \frac{\text{存活樣本數}}{\text{總樣本數}} \times 100\%$$

異常率的定義:

$$\text{異常率} = \frac{\text{異常樣本數}}{\text{總樣本數}} \times 100\%$$

異常的狀況包括組織剝落、軟爛，以及觸手伸出的頻率的異常，透過異常情形的監測，分析造成異常的原因並加以排除。

(二)珊瑚觸手伸出程度(E)

珊瑚的觸手伸出的原因可能有兩種:觸手上具有共生藻，伸出觸手使共生藻得以行光合作用，兩者能互利共生，藉彼此獲得營養；或是伸出觸手以利捕食。因此推論珊瑚伸出觸手表示其生理狀況良好，進而記錄每天珊瑚觸手的伸縮以監測其健康情形。

在飼養過程中，於每天下午三點(開燈後六小時)計算並記錄珊瑚的平均觸手伸出程度，當其處於健康狀態時，其觸手伸出的程度越大。0 級為無觸手伸出，1 級為觸手頂端伸出，2 級為觸手完全伸出(圖 8)。

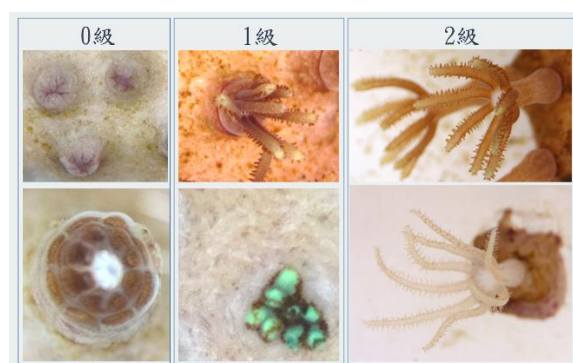


圖 8:珊瑚觸手伸出程度(作者自行拍攝)

平均觸手伸出程度的定義如下:

$$\frac{\text{片段上定義分數總分}}{\text{片段上總珊瑚蟲數量}} = \text{平均觸手伸出分數(E)}$$

根據定義，每個珊瑚片段所得最低分為 0 分(無觸手開啟)，滿分則為 2 分(觸手皆完全伸出)。

(三)珊瑚白化程度分析(RGB 色彩分析)

參考先前的研究，以 RGB 色彩分析來量化珊瑚的白化程度(Hirayama et al., 2017)。每週一次，使用數位相機並固定其參數，在解剖顯微鏡下對保鮮盒中的珊瑚進行拍攝，並使用 Fiji Image J 軟體（Wayne Rasband，美國馬裡蘭州貝塞斯達國立衛生研究院）中的 Color Histogram 進行影像分析，固定圈選相同的珊瑚片段面積進行分析，量測每個珊瑚群體的 RGB 值，再將測得的 RGB 三原色數值加總，並比較和前一次拍攝的差異。數值變大代表珊瑚逐漸白化，減少代表顏色變深，共生藻數量變多。為方便做比較，使用下方公式計算顏色變化百分比，而所得百分比越高，表示珊瑚片段顏色變深。

$$\text{顏色變化百分比} = \left(\frac{\text{Day(m)total RGB} - \text{Day(n)total RGB}}{\text{Day(m)total RGB}} \right) \times 100\%$$

(四)共生藻光化學效率 (photochemical efficiency) (單位:Fv / Fm ;最大螢光參數)

珊瑚體內的共生藻可行光合作用，並提供珊瑚養分。Fv/Fm 以葉綠素螢光釋放量估算，為黑暗狀態下，PSII(photosystem II)光反應最大螢光值。首先，將保鮮盒於室溫下置於全黑室內，並於其上以黑色塑膠袋遮蓋，進行蔽光至少 30 分鐘的暗適應 (dark adaption)後，僅用微弱紅光照明，於黑暗環境下使用 JUNIOR-PAM 並搭配電腦軟體 WinControl-3 進行測定。JUNIOR-PAM 的螢光計連接著單根塑膠纖維(長 50 cm、直徑 1.5 mm)，並任意選擇小綠皮珊瑚大片段(1x1cm)上面兩個位置進行接觸。纖維頂端會釋放藍光脈衝。調整藍光強度以及頻率以控制 ft 值的範圍為 250±15。此時便可以測定，並得到小綠皮珊瑚片段的 Pulse Amplitude Modulation(脈衝幅度調製)值(以下簡

稱為 PAM 值)。同一個片段測定兩次並取其平均。(圖 9)以 1x1 公分的片段的 PAM 值作為該以 1x1 公分的小綠皮珊瑚片段的 PAM 值作為該組別的共生藻光化學效率指標(林等人，2022)。



圖 9: 珊瑚體內共生藻光化學效率測定示意圖(諮詢人員協助拍攝)

(五)珊瑚的組織修復、再生情形觀察

經過剪或切割珊瑚的動作，珊瑚的共肉組織(coenosarc)邊緣可能出現撕裂、受損的情形。將珊瑚於保鮮盒飼養一段時間後，若生長情形良好珊瑚會修復受損組織，將參差不齊的邊緣回復平整，因此可透過觀察共肉組織修復程度了解珊瑚健康狀況。

組織修復後，原本因剪珊瑚而缺失的共肉組織部分，可能會生長出新的組織，稱為組織再生(reorganization)。出現再生情形代表珊瑚有足夠能力使傷口完全康復，之後進一步可能會出現組織擴張情形。

(六)珊瑚面積成長變化

每週一次拍攝珊瑚群體後，使用 Fiji Image J 軟體（Wayne Rasband，美國馬裡蘭州貝塞斯達國立衛生研究院）量測面積變化，並比較和前一次拍攝的差異，呈現其面積變化趨勢並比較差異。

(七)珊瑚蟲無性生殖數量

根據研究，CLD 系統內的珊瑚片段仍會無性生殖新生出來珊瑚蟲 (Shikina et al., 2023)。研究期間每週一次觀察並記錄珊瑚蟲進行無性生殖的狀態。

五、養殖環境變動

因本研究希望實現以保鮮盒在高中實驗室中養殖軟珊瑚，因此在大學端經過兩週的培養後，選擇本校作為後續的新養殖場所。在開始培養後的第二十七天，將小綠皮珊瑚移回本校以做進一步的觀察與研究。

我們盡量將所有可能影響結果的變因控制以與大學端實驗室一致，包括溫度範圍、餵食頻率、光照條件等，以確保實驗結果的準確性。透過這些控制措施，能夠更精確地評估保鮮盒養殖軟珊瑚在不同環境下的生存和生長狀況，並證明其可持續性。

六、Brown Jelly Syndrome(BJS)感染及其處理

在階段一的養殖第六天，B1 控制組的 B1 大片段發生了 BJS 感染(圖 10a)。

(一)BJS 介紹與發生原因

BJS 是一種常見的珊瑚疾病，受感染的珊瑚組織會潰爛，並產生黃色或棕色果凍狀組織，已發現這些組織主要由纖毛蟲組成(Cheng et al., 2021)。珊瑚在受到環境壓力時，會增加活性氧的產生，這可能導致珊瑚白化，進而死亡。此疾病具有高度傳染性，會擴散感染同水體的珊瑚 (Borneman & Lowrie, 2001; Danovaro & Luna, 2008; Lesser et al., 2006; Baird et al., 2009)。

纖毛蟲屬於古纖毛蟲綱(Ciliophora)，具有纖毛及細長的管狀身體結構，體內亦有共生藻(Bourne et al., 2008)。纖毛蟲可能透過珊瑚上的損傷、病變，或透過其他類型微生物的間接交互作用而進入珊瑚體腔 (Chinnarajan et al., 2021)。

約十六種纖毛蟲以死亡組織為食並攝取珊瑚共生藻 (Chinnarajan et al., 2021)，這可能造成 BJS 感染，越來越多的證據表明，纖毛蟲在珊瑚疾病中發揮作用 (Randall et al., 2015)。目前關於纖毛蟲引起的珊瑚疾病和相關的病理學研究仍不足，因此不確定 B1 大片段是受到何種纖毛蟲影響，也可能是不同物種交互作用而成。但由於我們使用的是定期更換的人工海水，可推知 B1 大片段本身就是纖毛蟲的帶原者。

(二)緊急處理的進行

立即以滴管沖洗受感染部位，物理性去除纖毛蟲(圖 10b)，並進行換水。隔天(第七天)觀察到珊瑚狀況並無惡化，因此進行更進一步的處理。為了預防大量的纖毛蟲再次孳生，我們選擇使用 KCl 進行處理。根據科學家對於 *Goniopora columna* 這種珊瑚的研究顯示，1.5%的 KCl 濃度可以有效殺死纖毛蟲，同時不會引起珊瑚的壓力反應，並且能在短時間內使珊瑚蟲恢復完整形態 (Cheng et al., 2021)。考慮到目前無對小綠皮珊瑚的相關研究，因此選擇以較低的濃度 1%的 KCl 進行嘗試。以 200ml 的 KCl 浸泡 B1 保鮮盒三分鐘，浸泡完成後，使用新鮮的 FASW 進行三次沖洗，確保容器內 KCl 並無殘留，再補充 200ml 的 FASW。

(三)後續觀察情形與結論

沒有再發生 BJS 感染情形，且 B1 的 Fv/Fm 值在第十四天較第一天提升;在第八週，白化部分也成功康復。

由此次 BJS 感染發生，可體現使用保鮮盒養殖珊瑚技術之優點。在發生感染時，若是在水體流動的海水缸，感染會大規模擴散，而在保鮮盒可迅速抑制感染，且只須更換少量水體，如果要將受感染的珊瑚株隔離也十分容易，只要沿著珊瑚底部邊緣將膠片剪下即可。

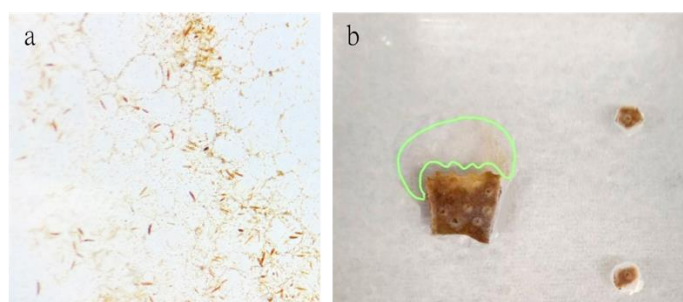


圖 10:B1 大片段發生 BJS 感染(作者自行拍攝)

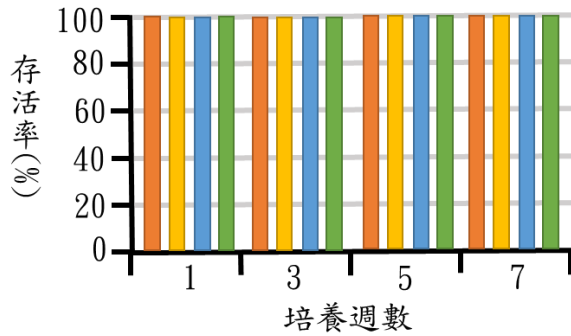
a. 為顯微鏡下綠色線圈選處的狀態，棕色長條狀的即是纖毛蟲。

b. 綠色線圈選處為 BJS 擴散範圍示意圖

伍、研究結果與討論

一、存活率、異常率

階段一



階段二

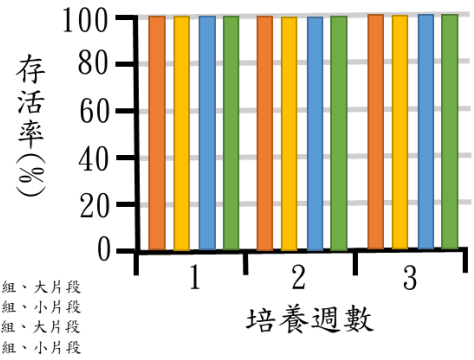
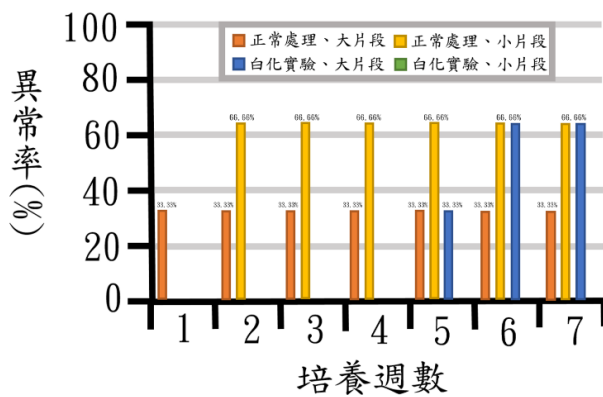


圖 11: 小綠皮珊瑚的存活率(作者自繪)

此培養系統能維持小綠皮珊瑚的生理狀態，根據實驗結果(圖 11)無論正常處理組或白化實驗組，存活率達百分之百。

階段一



階段二

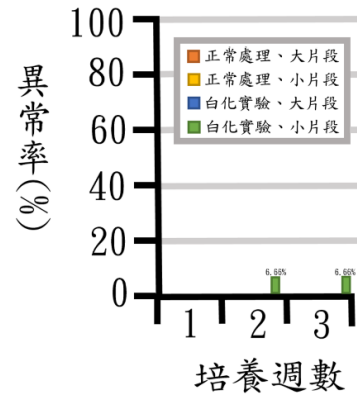


圖 12: 小綠皮珊瑚的異常率(作者自繪)

根據圖 12 可以看出在不同週數下各小綠皮珊瑚片段的異常率，而詳細異常情形如下圖。

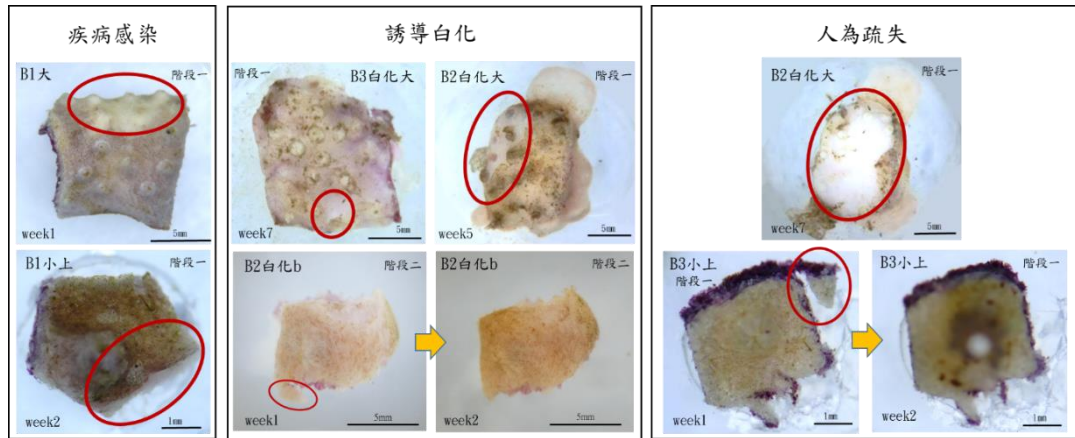


圖 13:組織異常情形與造成異常原因。圈選處為組織異常處。(作者自攝)

分析造成異常的原因有三:

(一)疾病感染造成的異常

當珊瑚受到 BJS 感染，其共肉組織遭受纖毛蟲啃食，出現部分嚴重白化、邊緣組織剝落等異常現象，而同一個保鮮盒中的片段連帶受影響，共肉組織掀起。

(二)誘導白化造成的異常

參考先前研究，誘導白化處理會讓珊瑚出現異常(曲昱玲，2024)。

(三)人為疏失造成的異常

進行換水時，不耐水流沖擊力而造成物理性組織剝落，為了避免類似情形再次發生，換水時應注意潤洗位置、數量與速度。

二、平均觸手伸出程度(E)

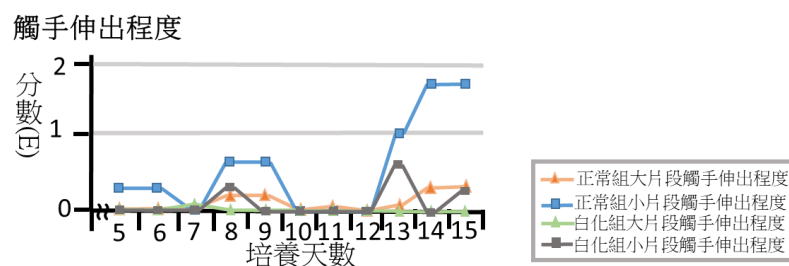


圖 14：第一階段養殖環境變動前觸手伸出程度分數變化圖(作者自繪)

由圖中分數之變化可知，正常處理組的小片段小綠皮珊瑚之分數較高，其生長狀況較佳；而關於白化實驗組之大、小片段，因其有進行白化處理，觸手幾乎沒有伸出。

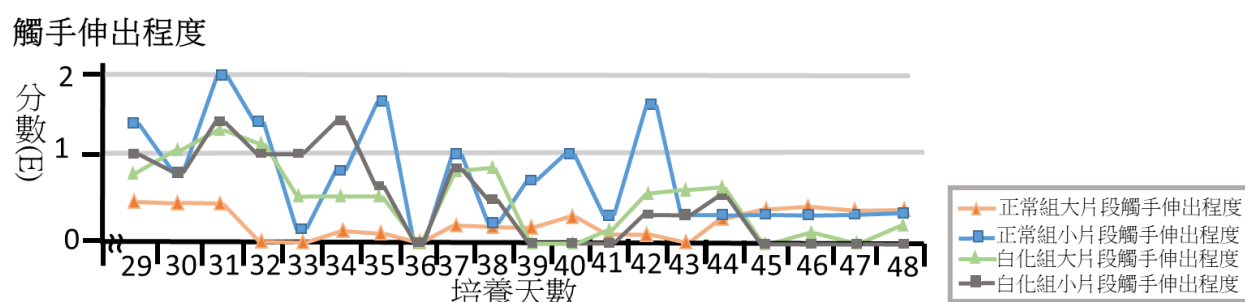


圖 15：第一階段養殖環境變動後觸手伸出程度分數變化圖(研究者自繪)

將所有珊瑚片段帶回學校飼養後，可觀察到觸手伸出的頻率較高。因第一個星期(約第 29~36 天)為適應週，未施加薄荷醇誘導珊瑚白化，白化實驗組的觸手伸出程度明顯較誘導白化處理時多。在第 37 天後陸續開始誘導白化，可以觀察到其分數有慢慢地降低。至於正常處理組之觸手伸出程度有比較低的趨勢，推測因為 B1 大片段受到 BJS 感染尚未恢復，整個數值因此受到影響。

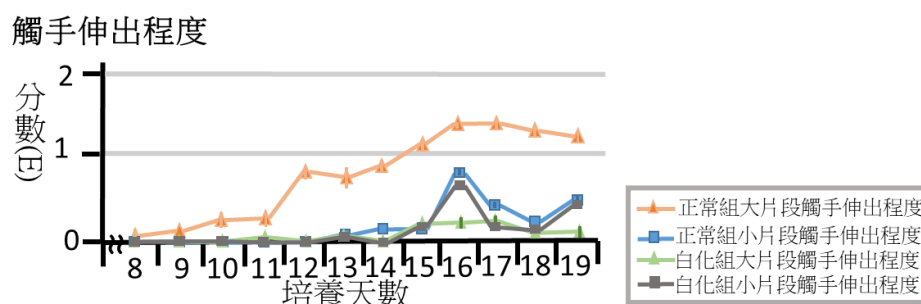


圖 16：第二階段觸手伸出程度分數變化圖(作者自繪)

在第二階段的實驗中，我們從第 10 天起始在白化組別內進行誘導白化。而雖然目前僅記錄到飼養第 19 天的天數，但是仍能明顯看到觸手的伸出。尤其是正常組白化的各個大片段，有先片段上的觸手幾乎全開，顯示其生長狀況良好。而在兩個星期後小片段的觸手也陸續有伸出的趨勢，但是分數沒有大片段的高。

綜合以上結果，推論在剪下片段後一週珊瑚即恢復為原本的生長狀態，觸手始伸出，使體內共生藻進行光合作用以獲得養分。而關於白化實驗組，我們觀察到其在誘

導白化時觸手不會伸出，但在尚未以薄荷醇進行白化處理前時觸手會開啟，而在每日早上九點進行誘導白化後，觸手又會縮起。而時間久後觸手也會在經白化處理時開啟，以用來捕食以獲得失去共生藻後所需要的營養。推論在這段期間觸手開始伸出的原因為因為下白化已使珊瑚體內的共生藻數量減少，因此珊瑚必須得伸出觸手，捕捉外面的食物以當作營養來源。

三、白化程度分析(RGB 色彩分析)

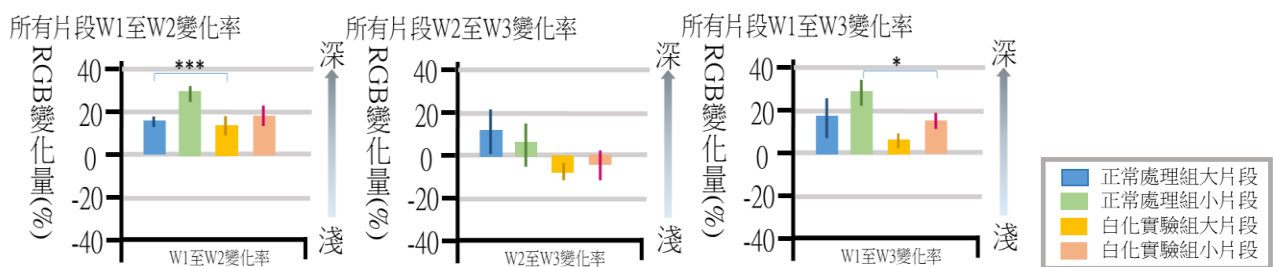


圖 17:第一階段養殖環境變動前各週及各組 RGB 變化率比較(作者自繪)

(左:第一週至第二週之顏色變化；中:第二週至第三週顏色變化；右:第一週至第三週顏色變化)

根據圖 17 的左圖，可以看到所有片段在未經白化處理前，珊瑚皆呈現顏色變深的趨勢，中間的圖則能清楚看見第二週開始誘導白化之後白化處理組顏色有變淺的趨勢但在但此時兩組差異仍不明顯；右圖則說明了經過一段時間的培養後，所有的小綠皮珊瑚片段在當時顏色皆變深。

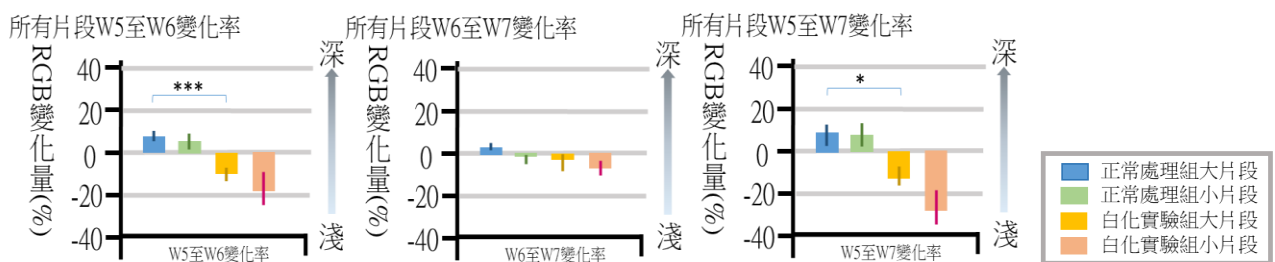


圖 18:第一階段養殖環境變動後各週及各組 RGB 變化率比較(作者自繪)

(左:第五週至第六週之顏色變化；中:第六週至第七週顏色變化；右:第五週至第七週顏色變化)

在養殖環境變動後，我們持續觀察每個片段的 RGB 數值變化率。而在第五、六週的實驗數據中，正常和白化組的大片段開始有了顯著的差異($p < 0.001$)。在五至七週的實

驗中也可以看到在正常和白化組的比較下，所有珊瑚大片段之顏色變化具有顯著差異 ($p<0.05$)。此時能夠證明，薄荷醇能成功使小綠皮珊瑚白化，但大片段及小片段之顏色變化之差異並不明顯。

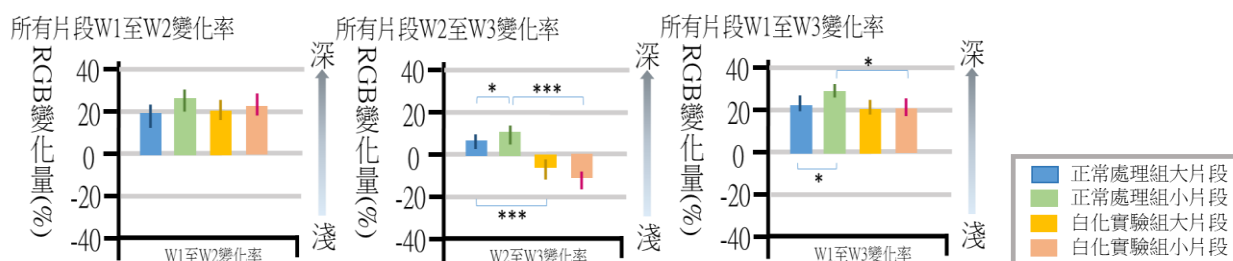


圖 19:第二階段各週及各組 RGB 變化率比較(作者自繪)

圖 19 與圖 17 之解讀方式相同。在第二階段的實驗中從第二週開始做誘導白化的處理，也觀察到了相同的結果——正常組和白化組無論是大片段及小片段在顏色變化下具有十分顯著的差異 ($p<0.001$)。而不同於第一階段另外觀察到的是，正常處理組的大小片段似乎也有變化的差異性 ($p<0.05$)，推論小片段與大片段相較之下，因小片段之儲存養分空間較小，難使共生藻如大片段在較快的速度下成長並使片段顏色加深。

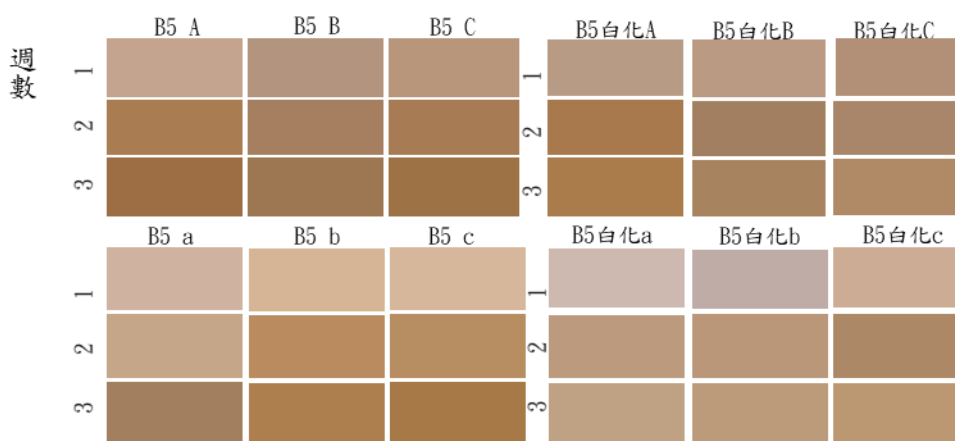


圖 20: 利用 RGB 色彩分析後做出的色塊圖(以第二階段之 B5 為例) (作者自繪)

以各片段的平均 RGB 數值做出此色塊圖，在圖中可以觀察到正常組的顏色隨著週次增加有變深趨勢，而第一至第二週的白化組片段因未開始誘導白化，顏色變深；第二週至第三週白化處理後，則有顏色變淺的趨勢，但因為誘導白化時間為短，仍較第一週時為深。

四、體內共生藻光化學效率測定(單位:Fv / Fm ;最大螢光參數)

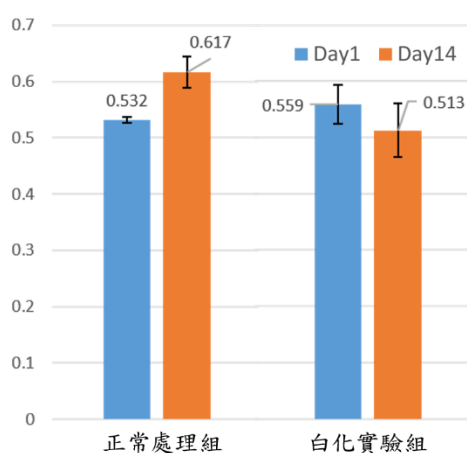


圖 21:光化學效率測定(作者自繪)

在階段一，我們求取每個珊瑚片段的光化學效率在十四天內的變化量數值後，將正常處理組的所有數值加總後求取平均，而白化實驗組也是相同的處理。經由 T 檢定，可明顯看出在此保鮮盒養殖系統內，正常處理組和白化實驗組具有顯著差異 ($p < 0.05$)，因此白化有效。而正常處理組在光化學效率有明顯的成長，可證實在保鮮盒中飼養小綠皮珊瑚這項系統能維持小綠皮珊瑚的生理狀況。

五、組織修復與再生情形

(一)階段一的組織修復與再生

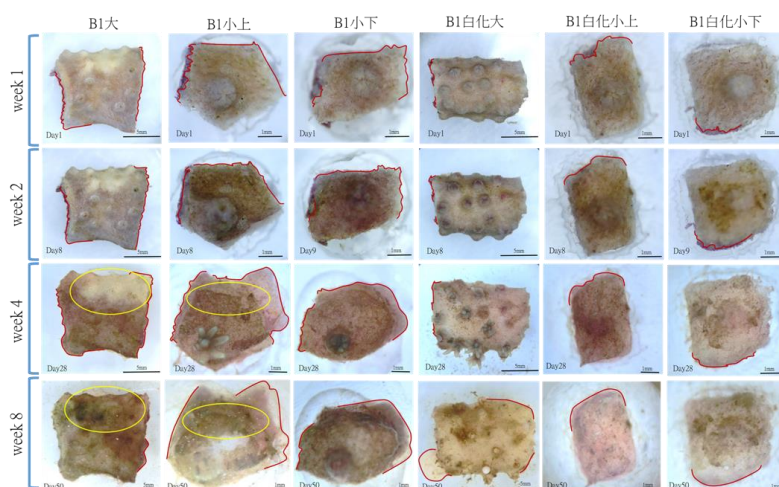


圖 22:B1 組織修復、再生情形。(作者自行拍攝)

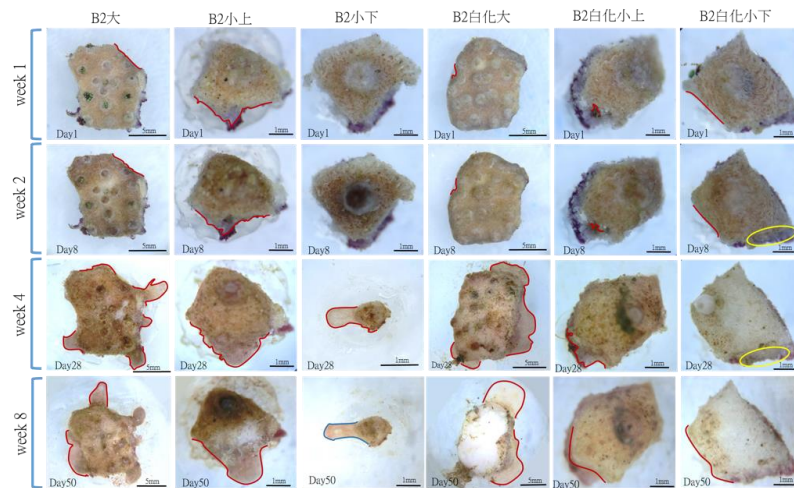


圖 23:B2 組織修復、再生情形(作者自行拍攝)

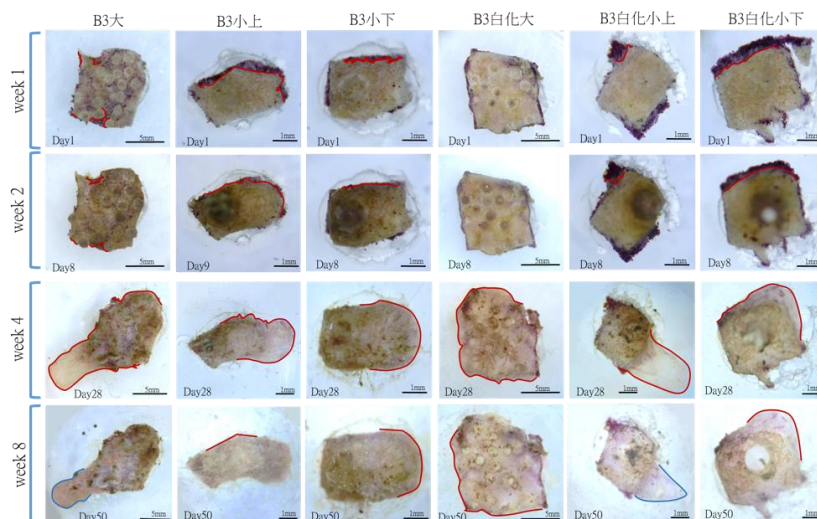


圖 24:B3 組織修復、再生情形(作者自行拍攝)

片段大小以各圖的比例尺為準，而由於在大學端與本校的照片拍攝地點明暗程度有所不同，因此一、二週和四、八週的顏色深淺程度不能直接以圖片比較。圖片中以紅色線段加強輪廓以凸顯修復、再生部位。圈選處出現組織修復情形。

1. 正常處理組內的大小片段差異

撇除 B1 大片段，每個群體無論大、小片段皆有明顯的組織擴張。因此推測，在正常環境下，小綠皮珊瑚的組織的修復、再生與擴張情形應不是受到群體與個體間的生長差異所影響導致。

2.白化實驗組組內差異

B1、B2 白化實驗組在八週內僅有大片段出現組織擴張情形，小片段皆僅有微微的組織修復、再生，而 B3 由於整體適應力強，大、小片段皆有明顯的組織擴張。根據以上結果推測，在誘導白化處理下，片段上有多個珊瑚蟲分擔壓力的大片段，以及本身適應力強的群體，組織擴張情形都不易受到藥劑影響。

3.正常處理組與白化實驗組之差異

B1 白化實驗組的組織修復與再生情形相與正常處理組相比並不顯著；B2 正常處理組無論片段大小皆有顯著的組織擴張情形，而白化實驗組除了大片段之外，白化小上和小下皆在第二十八天才有明顯的組織修復，上述情形在 B1 群體也有觀察到；而 B3 白化實驗組無論大、小片段皆有明顯的組織擴張，但在前四週，相較於正常處理組有兩個片段出現大範圍的組織擴張，白化實驗組只有一個片段是如此，可得知大片段出現擴張的時間點較晚。因此我們推測，共生藻的有無會影響小綠皮珊瑚傷口修復與組織擴張的速度。

4.異常對組織修復、擴張情形的影響

(1)白化異常

B1 大片段的組織擴張程度不明顯，推測因為其曾受到 BLS 感染，康復情形主要表現在組織修復方面，而部分嚴重白化的區域到第八週有顯著改善。

(2)組織掀起與剝落

除了 B1 大，其餘出現組織異常的片段皆屬此類。無論是哪個片段，組織擴張情形皆無受到影響。

(二)階段二的組織修復與再生



圖 25:階段二的組織修復、再生情形(作者自行拍攝)

由階段二的實驗結果也可看出前文提及之結果。

六、面積成長變化

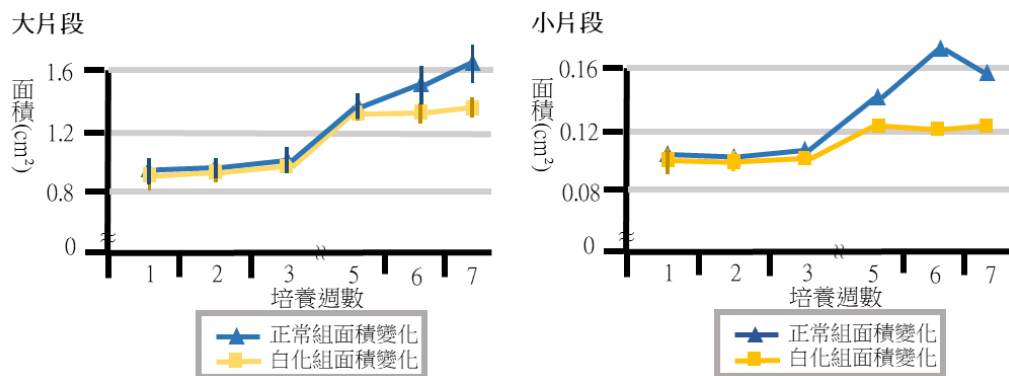


圖 26:第一階段面積成長變化圖(作者自繪)

由圖表可知，無論是正常組或是白化組，皆從第五週後面積成長變化愈趨明顯。而一至三週小部分的面積成長為組織修復後的微幅再生。

然而根據 T 檢定，不論是大小片段或是正常白化組別的面積成長變化差異皆不明顯($p>0.05$)。

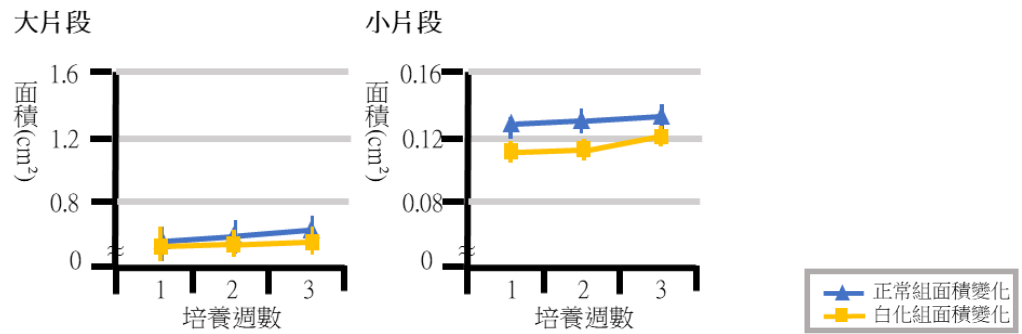


圖 27:第二階段面積成長變化圖(作者自繪)

而在第二階段的實驗中，我們可以在養殖前三週觀察到面積有些微的成長，而此為組織修復所得到的結論(可參考結果與討論第五大點)，以肉眼觀之，無法觀察到明顯的面積成長，若照前一階段的結果來看，應是四週後才會出現較明顯的組織擴張。

七、 珊瑚蟲無性生殖數量

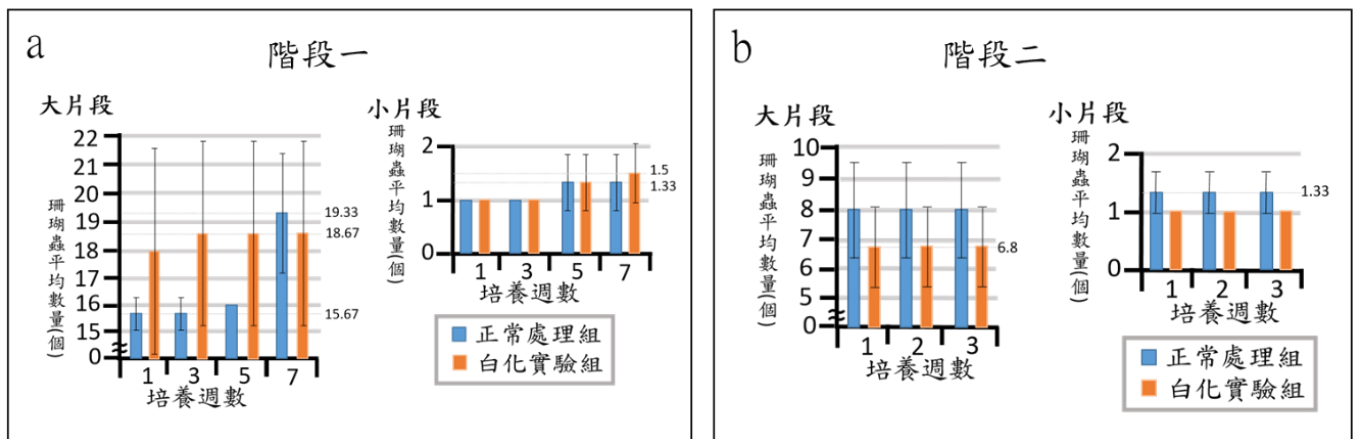


圖 28:珊瑚蟲的平均數量變化圖(作者自繪)

珊瑚蟲個數在前三週沒有明顯增加。然而在第四週之後，我們觀察到不僅一個，而是多個僅含有小片段開始進行無性生殖，使得片段上的珊瑚蟲數量增加到兩個。這讓我們確信，在此培養系統內，珊瑚蟲可以進行無性生殖，且時間約在剪下後一個月。

八、海水化學變化

		樣本數		鹽度 (‰)	pH	TA (ppm)	Ca ²⁺ (ppm)	Mg ²⁺ (ppm)	NH ₃ (ppm)	NO ₂ (ppm)	NO ₃ (ppm)
原配製人工海水	Day0	5	Min	35	8.06	4.1	495	795	0.05	0	0.1
			Max	35	8.45	5.25	500	1860	0.05	0	0.1
			Mean ± SE	35	8.24 ± 0.11	4.68 ± 0.39	497.22 ± 2.64	1410 ± 428.94	0.09 ± 0.07	0 ± 0	0.1 ± 1.47E-17
控制組 (不含珊瑚片段)	Day3	5	Min	35	8.033	4.8	485	960	0.05	0	0.1
			Max	35	8.21	5.55	500	1770	0.05	0	0.1
			Mean ± SE	35 ^b	8.15 ^a ± 0.1 ^a	5.25 ^a ± 0.4 ^a	492.5 ^a ± 10.61 ^a	1365 ^a ± 527.76 ^a	0.05 ^a ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	0.1 ^b ± 0
實驗組 (含珊瑚片段)	Day3	5	Min	35	8.0	0.05	490	900	4.95	0	0.1
			Max	35	7.98	0.25	495	1779	5.4	0	2.5
			Mean ± SE	35 ^b	7.7 ^{***} ± 0.18	0.07 [*] ± 0.06	493 [*] ± 2.74 [*]	1353.22 ^a ± 395.94 ^a	5.1 ^a ± 0.21 ^a	0 ± 0 ^b	0.76 ^a ± 1.05 ^a

表 4: 海水化學變化(作者自製)

以 T 檢定比較控制組和實驗組分別與原配製人工海水的差異。a:無顯著差異; b:每筆數據完全相同。

保鮮盒中的海水每 3 天更換一次。培養 3 天後，放有小綠皮珊瑚的保鮮盒中的海水鹽度幾乎沒有變化。Mg²⁺會協助骨針形成(Meibom et al., 2004)，須維持穩定，而結果顯示實驗組與原配製海水相比沒有顯著差異。NH₄⁺的實驗組與原配製海水相比沒有顯著差異，推測原因為珊瑚代謝產生的氨提供給共生藻利用。而 NO₂⁻、NO₃⁻的濃度非常低，幾乎檢測不到，可得知環境中沒有硝化菌或數量極少。受到小綠皮珊瑚代謝作用影響，pH 值從 8.24 下降到 7.7，Ca²⁺和總鹼度也顯著下降。Ca²⁺和總鹼度的變化可能是由於珊瑚的骨針形成所造成(Allemand, D. & Grillo, M.-C., 1992)。

海水的 pH 值平均在 8.2 左右，近年來海水的 pH 值下降，稱為海洋酸化。已有許多研究表明石珊瑚受到海洋酸化的影響顯著，例如阻礙其骨骼生長或導致共肉組織啟動細胞凋亡 (Fine and Tchernov, 2007; Kvitt et al., 2015)。然而，軟珊瑚的相關研究仍不足。僅有少數研究提到特定物種的軟珊瑚組織對不利的 pH 條件具有保護作用，且和石珊瑚相比，較能夠在生理上承受酸化的條件(Gabay et al., 2014; Lopes AR et al., 2018)。在保鮮盒養殖系統中，即使 pH 值經過三天有下降趨勢，但小綠皮珊瑚仍持續生長且觸手正常開啟，表示其能適應短暫的酸化情形，為前人提出的推論增添可信度，也提供未來的研究者探討適應環境 pH 值變化機制的平台。

陸、結論

一、研究成果

- (一) 此研究系統可培養僅含小片段以及白化小綠皮珊瑚，存活率達百分之百
- (二) 此研究系統可因應疾病感染狀況培養小綠皮珊瑚，且存活率達百分之百
- (三) 一個月內生長狀況佳者可開始進行無性生殖

二、其他

- (一) 在小綠皮珊瑚受到 BJS 感染時，可使用 1% 的 KCl 消毒處理
- (二) 異常不影響組織修復以及成長
- (三) 小綠皮珊瑚約在四週後會有明顯的組織成長
- (四) 使用薄荷醇可使小綠皮珊瑚白化

透過二個階段的實驗，即使有些許差異(例如:培養地點、有無珊瑚寄送)，但在各項指標皆無明顯差異，可證明此飼養軟珊瑚之系統具有穩定性。

三、未來實驗方向

- (一) 探討海洋環境因子變化(溫度、pH 值、鹽度等)或汙染物對軟珊瑚生長的影響
- (二) 進一步優化珊瑚養殖系統，以應用在珊瑚復育工作上
- (三) 擴及其他珊瑚物種的人工飼養

柒、參考資料

一、中文論文(依姓氏筆畫順序排列)

- (一) 曲昱玲。2024。以實驗室培養皿培養珊瑚技術探討紫外線過濾劑對 2 種石珊瑚的影響。國立臺灣海洋大學
- (二) 林子傑。2022。建立石珊瑚的新實驗平台：在培養皿中培養珊瑚。國立臺

二、中文書籍

- (一)國立海洋生物博物館。珊瑚世界的探索與了解，2011;24 頁

三、英文論文(依字母先後順序排列)

- (一) Allemand, D. and Grillo, M.-C. (1992), Biocalcification mechanism in gorgonians: ^{45}Ca uptake and deposition by the mediterranean red coral *Corallium rubrum*. J. Exp. Zool., 262: 237-246. <https://doi.org/10.1002/jez.1402620302>
- (二) Baird, A.H.; Bhagooli, R.; Ralph, P.J.; Takahashi, S. Coral bleaching: The role of the host. Trends Ecol. Evol. 2009, 24, 16 – 20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.005>
- (三) Borneman E.H. and Lowrie J. (2001) Advances in captive husbandry and propagation: an easily utilized reef replenishment means from the private sector ? Bulletin of Marine Science 69, 897 – 913.
- (四) Bourne DG, Boyett HV, Henderson ME, Muirhead A, Willis BL. Identification of a ciliate (Oligohymenophorea: Scuticociliatia) associated with brown band disease on corals of the Great Barrier Reef. Appl Environ Microbiol. 2008 Feb;74(3):883-8. doi: 10.1128/AEM.01124-07. Epub 2007 Dec 14. PMID: 18083868; PMCID: PMC2227702.
- (五) Cheng, C.-M.; Cheng, Y.-R.; Ding, D.-S.; Chen, Y.-T.; Sun, W.-T.; Pan, C.-H. Effects of Ciliate Infection on the Activities of Two Antioxidant Enzymes (SOD and CAT) in Captive Coral (*Goniopora columna*) and Evaluation of Drug Therapy. Biology 2021, 10, 1216. <https://doi.org/10.3390/biology10111216>
- (六) Chen Y-P, Wu S-L, Su J-H, Lin M-R, Hu W-P, Hwang T-L, Sheu J-H (2006) Briar excavatins G and H, Two new Briaranes from the octocoral *Briareum excavatum*. Bulletin of the Chemical Society of Japan 79(12): 1900 – 1905. doi: 10.1246/bcsj.79.1900

- (七) Chinnarajan Ravindran a b, Haritha P. Raveendran a, Lawrance Irudayarajan a b (2021). Ciliated protozoan occurrence and association in the pathogenesis of coral disease. *Microbial Pathogenesis* Volume 162, January 2022, 105211 doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105211>
- (八) Craggs J., Guest J. R., Davis M., Simmons J., Dashti E., Sweet M. (2017). Inducing broadcast coral spawning ex situ: closed system mesocosm design and husbandry protocol. *Ecol. Evol.* 7 (24), 11066 – 11078. doi: 10.1002/ece3.3538
- (九) Danovaro D. and Luna G. (2008) Italian Consortium for Marine Sciences (CoNISMa) : Research Unit—Coral Zoo. <http://www.coralzoo.org/home/>
- (十) Fine M., Tchernov D. (2007). Scleractinian coral species survive and recover from decalcification. *Science* 315 (5820), 1811. doi: 10.1126/science.1137094
- (十一) Gabay Y, Fine M, Barkay Z, Benayahu Y (2014) Octocoral Tissue Provides Protection from Declining Oceanic pH. *PLoS ONE* 9(4): e91553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091553>
- (十二) Hong P-H, Su Y-D, Su J-H, Chen Y-H, Hwang T-L, Weng C-F, Lee C-H, Wen Z-H, Sheu J-H, Lin N-C, Kuo Y-H, Sung P-J (2012) Briarenolides F and G, new briarane diterpenoids from a *Briareum* sp. octocoral. *Marine Drugs* 10: 1156 – 1168. doi: 10.3390/md10051156
- (十三) J.A. Schwarz, Carys L Mitchelmore, Ross Jones, A O'Dea, S Seymour. (2012). Exposure to copper induces oxidative and stress responses and DNA damage in the coral *Montastraea franksi*. December 2012. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology* 157(3). DOI:10.1016/j.cbpc.2012.12.003. Source PubMed
- (十四) Kvitt H., Kramarsky-Winter E., Maor-Landaw K., Zandbank K., Kushmaro A., Rosenfeld H., et al. (2015). Breakdown of coral colonial form under reduced pH conditions is initiated in polyps and mediated through apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (7),

- (十五) Lesser, M.P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 2006, 68, 253 – 278.
doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.phyol.68.040104.110001>
- (十六) Lopes AR, Faleiro F, Rosa IC, Pimentel MS, Trubenbach K, Repolho T, Diniz M, Rosa R. Physiological resilience of a temperate soft coral to ocean warming and acidification. *Cell Stress Chaperones*. 2018 Sep;23(5):1093-1100. doi: 10.1007/s12192-018-0919-9. Epub 2018 Jun 11. PMID: 29948929; PMCID: PMC6111073.
- (十七) Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016 Apr-Jun;8(2):83-91. doi: 10.4103/0975-7406.171700. PMID: 27134458; PMCID: PMC4832911.
- (十八) McFadden, C. S., van Ofwegen, L. P., & Quattrini, A. M. (2022). Revisionary systematics of Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) guided by phylogenomics. *Bulletin of the Society of Systematic Biologists*, 1(3). <http://doi.org/10.18061/bssb.v1i3.8735>
- (十九) Meibom, A., J.-P. Cuif, F. Hillion, B. R. Constantz, A. Juillet-Leclerc, Y. Dauphin, T. Watanabe, and R. B. Dunbar (2004), Distribution of magnesium in coral skeleton, *Geophys. Res. Lett.*, 31, L23306, doi:10.1029/2004GL021313.
- (二十) Randall, C.J., Jordán-Garza, A.G. & van Woesik, R. Ciliates associated with signs of disease on two Caribbean corals. *Coral Reefs* 34,243 – 247 (2015).
<https://doi.org/10.1007/s00338-014-1212-8>
- (二十一) Samimi-Namin K, van Ofwegen LP (2016) Overview of the genus *Briareum* (Cnidaria, Octocorallia, Briareidae) in the Indo-Pacific, with the description of a new species. *ZooKeys* 557: 1 – 44. doi: 10.3897/zookeys.557.6298

- (二十二)Shapiro O. H., Kramarsky-Winter E., Gavish A. R., Stocker R., Vardi A. (2016). A coral-on-a-chip microfluidic platform enabling live-imaging microscopy of reef-building corals. *Nat. Commun.* 7, 10860. doi: 10.1038/ncomms10860
- (二十三)[Shinya Shikina](#), Tzu-Chieh Lin, Yu-Ling Chu, Yin-Chu Cheng, Yu-En Chang, [Naohisa Wada](#), [Sen-Lin Tang](#), Yoshiyuki Iizuka, Yi-Ling Chiu. (2023). Culturing reef-building corals on a laboratory dish: a simple experimental platform for stony corals. *Front. Mar. Sci.*, 13 July 2023. Sec. Marine Biotechnology and Bioproducts. Volume 10 - 2023 | <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1149495>
- (二十四)S. Rajendra and C. Raghunathan Zoological Survey of India, Prani Vigyan Bhawan, M-Block, New Alipore, Kolkata 700 053, West Bengal. (2023). Comparative analysis on Sclerite Morphometry: a useful tool in the soft corals *Lobophytum* sp. (Sarcophytidae: Octocorallia: Anthozoa) identification from Andaman and Nicobar Islands, India. *Rec. zool. Surv. India: Vol. 123(iS2)/01-15, 2023 DOI: 10.26515/rzsi/v123/i1S/2023/172458*
- (二十五)Sung P-J, Sheu J-H, Xu J-P (2002) Survey of briarane-type diterpenoids of marine origin. *Heterocycles* 57: 535 – 579. doi: 10.3987/REV-01-546
- (二十六)Wang J-T, Chen Y-Y, Tew KS, Meng P-J, Chen CA (2012) Physiological and Biochemical Performances of Menthol-Induced Aposymbiotic Corals. *PLoS ONE* 7(9): e46406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046406>
- (二十七)West JM. (1997) Plasticity in the sclerites of a gorgonian coral: tests of water motion, light level, and damage cues. *The Biological Bulletin* 192(2): 279 – 289. doi: 10.2307/1542721
- (二十八)Yeh T-T, Wang S-K, Dai C-F, Duh C-Y (2012) Briacavatolides A – C, New Briaranes from the Taiwanese Octocoral *Briareum excavatum*. *Marine Drugs* 10(5): 1019 – 1026. doi: 10.3390/md10051019

【評語】 052008

本研究計畫展示了在簡單且低成本的環境中進行珊瑚培育的創新方法，特別是針對小綠皮珊瑚。該研究系統的設計使得高中生，也能簡易的進行珊瑚養殖與觀察，在珊瑚研究的推廣教育和科學觀察上有其價值。具體來說，通過比較不同條件下的生長與代謝反應，研究成功地量化了小綠皮珊瑚的健康狀態，並顯示出該系統對於珊瑚片段的培養具有高度可行性。本研究透過珊瑚實驗室培養皿 (Coral-on-a-Laboratory Dish, CLD)，建立在學校實驗室就能培養珊瑚的系統，而且把培養皿改為保鮮盒，更方便一般環境使用，這個想法有創意。整體實驗方向明確，實驗數據也很完整，唯獨論文寫作部分需要再加強。

1. 國立海洋生物博物館近年積極推展珊瑚人工培育的轉型升級，建立珊瑚培育數位科技化，應加以觀摩及討論。
2. 近年來珊瑚復育多以大規模及長期培育，並移植海洋復育區進行觀察，本研究培育之珊瑚幼苗，亦可觀察其野外復育之存活率加以比較。

3. 本研究屬於初步的觀察，亦達成一些培育方式的成果，應該依此再加以設計較深入的研究課題應用。
4. 表 4: 海水化學變化，欲說明受到小綠皮珊瑚代謝作用影響，pH 值從 8.24 下降到 7.7，但表 4 實驗組的 pH Min 是 8.0，Max 是 7.98，但 Mean 卻是 $7.7+0.18$ ，顯然有誤，而且 Min 與 Max 的數字大小也與控制組及原配製人工海水組相反，請再確認。
5. 擴大樣本母體數及樣本數量以更加證實此系統的可行性，可再新增監測項目，進一步優化此系統。

作品簡報



建立小綠皮珊瑚的 保鮮盒養殖技術及觀察

壹、研究動機與摘要

一般養殖珊瑚需要昂貴且複雜的設備，目前軟珊瑚的實驗室培養技術尚未建立。我們思索是否能設計一套系統，使高中生在學校實驗室培養軟珊瑚，投入相關研究。保鮮盒方便取得，具密閉扣蓋，能防止海水蒸發影響鹽度並隔離外界環境。相比培養皿，保鮮盒不需石蠟膜封住，減少實驗廢棄物，且高度及大小多樣，可配合研究需求選擇不同款式。本研究利用保鮮盒培養小綠皮珊瑚，並探討個體與群體及誘導白化的影響。

- 實驗物種:小綠皮珊瑚(*Briareum stechei*)，屬於軟珊瑚目
- 價值:醫療用途(briarane型二萜類化合物來源)
- 發想:Coral-on-a-Laboratory Dish, CLD (Shikina et al., 2023)
- 優點:操作簡單、成本低、環境可控、空間需求小、易觀察

變因一:個體與群體

目的:探討可否培養珊瑚蟲個體、比較個體與群體的生理差異。
培養珊瑚蟲個體可避免群體內不同珊瑚蟲的生理差異、珊瑚蟲間的化學訊號傳遞影響實驗。

變因二:是否誘導珊瑚白化

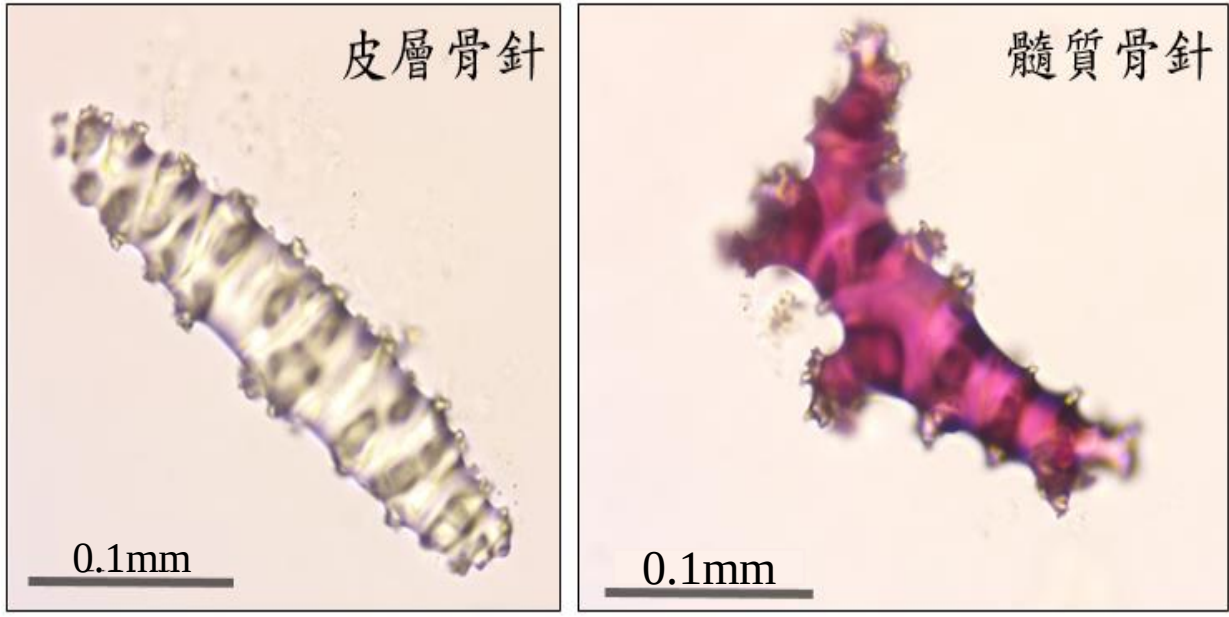
- 目的:
- 1.探討薄荷醇誘導小綠皮珊瑚白化的效能
 - 2.培養白化但健康的小綠皮珊瑚，可供研究珊瑚白化機制
 - 3.比較正常處理組與白化實驗組的生理差異

成果:成功在玻璃保鮮盒培養小綠皮珊瑚、白化狀態但仍健康的小綠皮珊瑚，以及珊瑚蟲個體。個體與群體間於生理上除了組織修復的速度外，其餘指標沒有顯著差異，而白化與否在組織修復、面積成長方面會有所影響。

貳、研究過程與方法

一、實驗物種判定-骨針觀察

軟珊瑚具有骨針，而不同物種的骨針特徵不一。透過骨針可判定其為軟珊瑚，並初步推測其物種。本研究中實驗樣本皆由相關研究單位鑑種、提供。

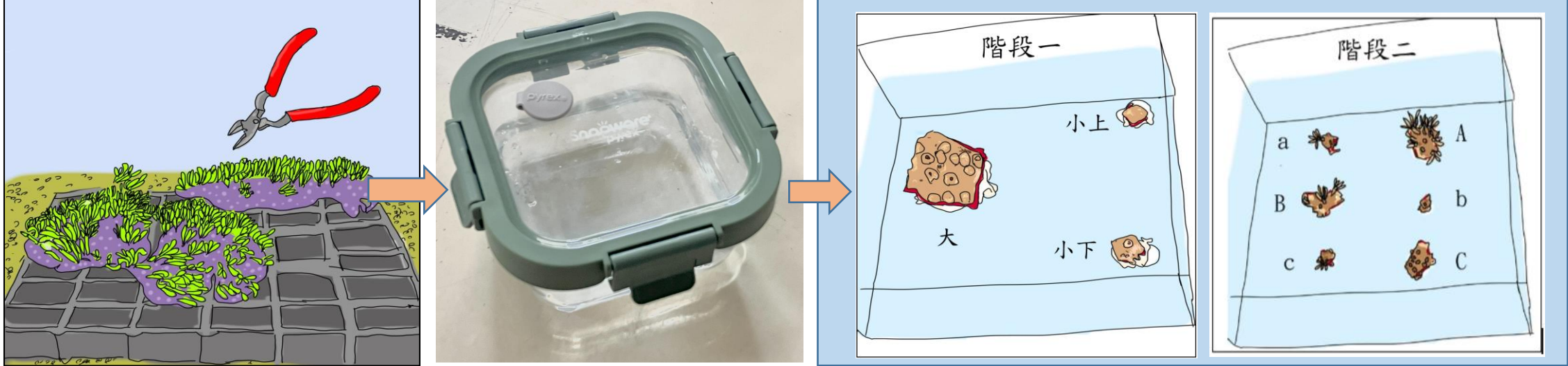


二、玻璃保鮮盒養殖系統製備

培養的環境因子:

溫度	光照週期	光強度	照明光譜
22℃	光照12小時 (9:00-21:00)	1.1(cd)	

取得所需珊瑚樣本片段，以水族用瞬間膠黏在塑膠片上，置放玻璃保鮮盒內，加入人工海水。於階段二新增樣本數及監測項目，以提高研究可信度。



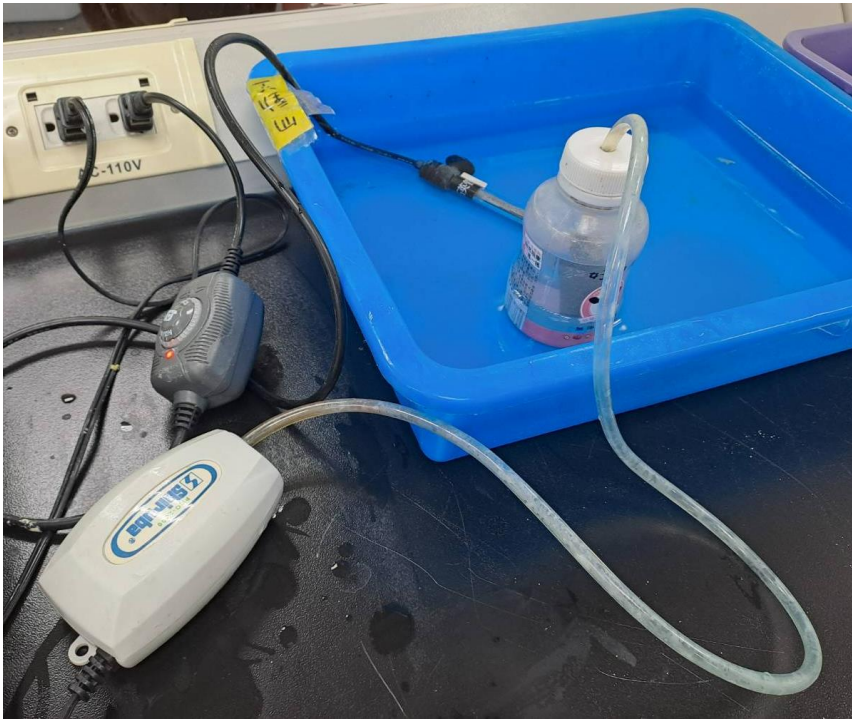
階段相異處	階段一	階段二
切割珊瑚工具	剪刀	筆刀
個體與群體定義	面積	珊瑚蟲數量
珊瑚來源	3個群體	5個群體
樣本數	各組群體x3、 個體x6	各組群體x15、 個體x15
水質檢測	無	有
螢光監測	無	有
珊瑚寄送	有	無
Fv/fm*	有	無

*此指珊瑚體內共生藻光化學效率該項指標

三、珊瑚餌食的培養與餵食

(1次/3天、2400隻/盒)

珊瑚體內除了共生藻行光合作用所產生的營養外，也額外餵食豐年蝦作為其營養來源之一。

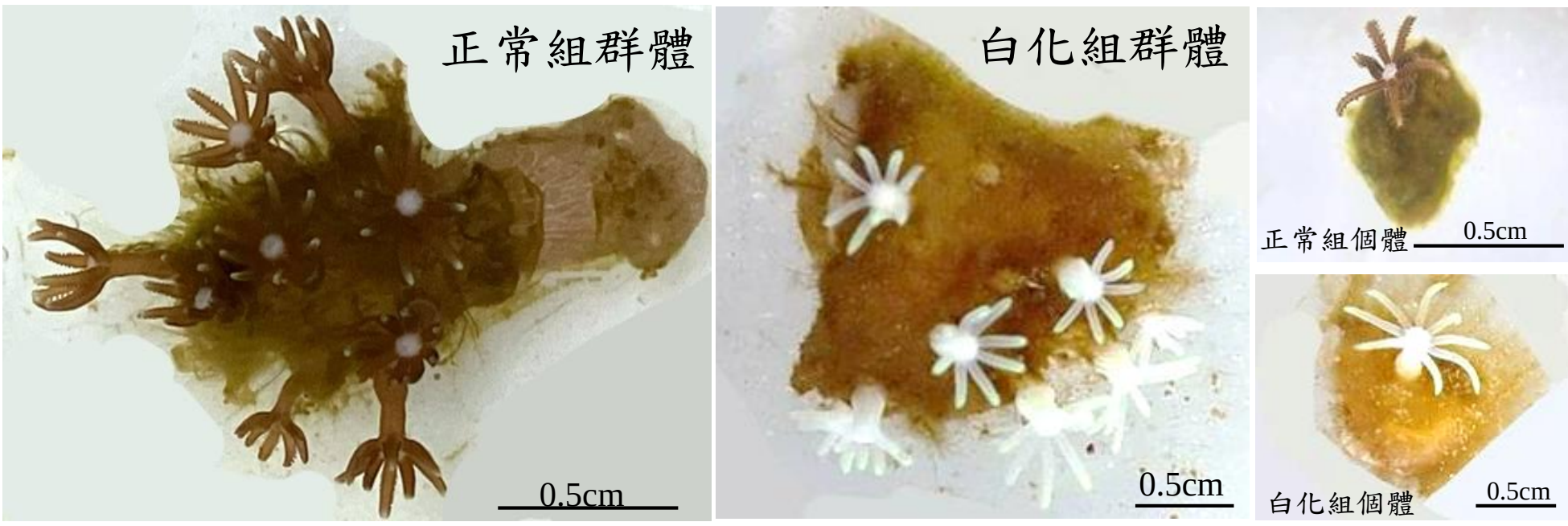


四、海水水質監測

配合餵食時間，用新鮮的人工海水更換保鮮盒中的海水。為了確保養殖環境的水質穩定，於階段二新增此監測項目(pH值、鹽度、Mg²⁺、NH₄⁺等離子)。

五、以薄荷醇誘導珊瑚白化

參考過往研究，以薄荷醇（最終濃度：0.19 mM）誘導白化（Wang et al., 2012）。



六、監測生長與健康情形

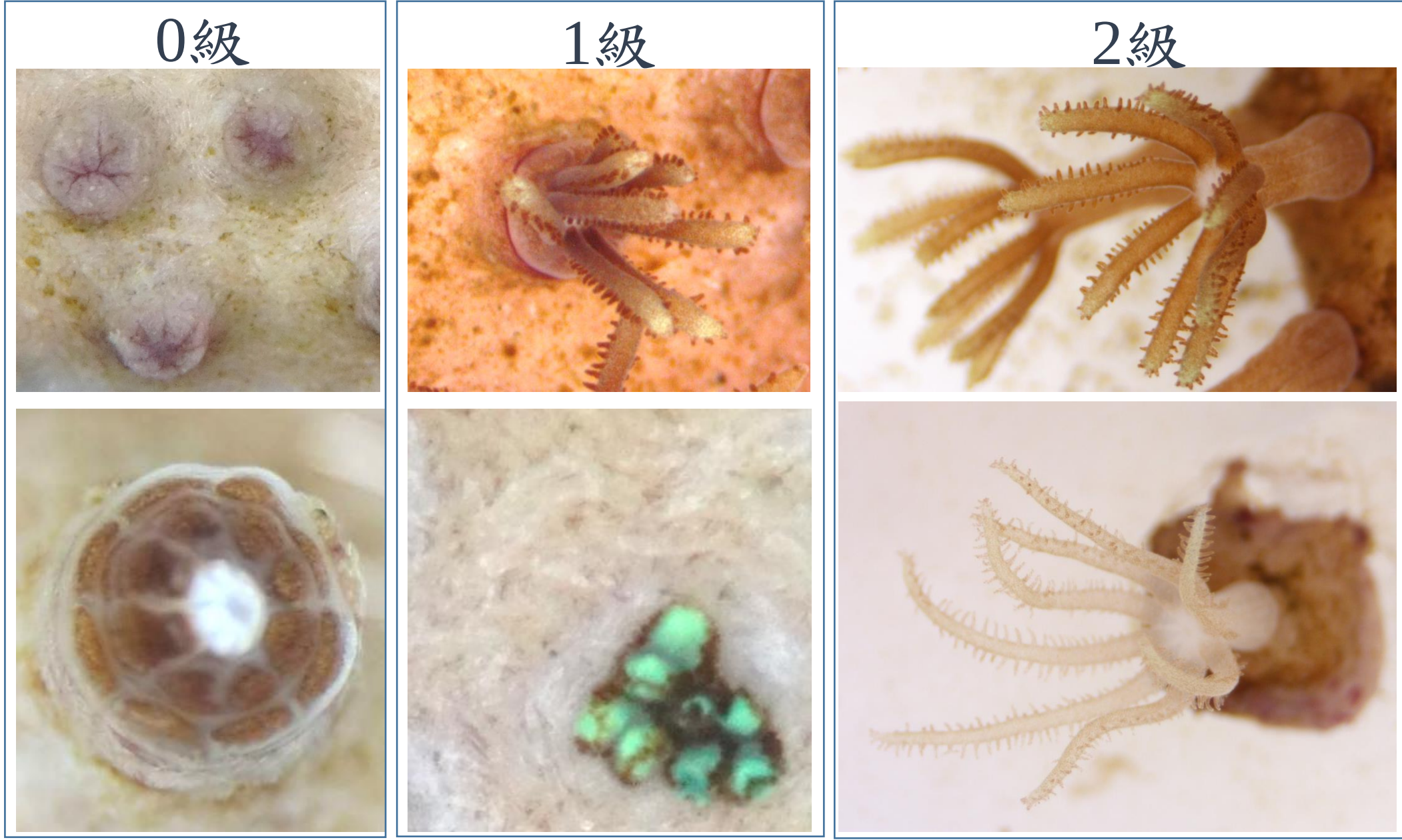
(一)存活率(survival rate)、異常率(abnormality rate)

$$\text{存活率} = \frac{\text{存活樣本數}}{\text{總樣本數}} \times 100\%$$

$$\text{異常率} = \frac{\text{異常樣本數}}{\text{總樣本數}} \times 100\%$$

(二)珊瑚觸手伸出程度

珊瑚觸手伸出的原因可能有:觸手上具有共生藻，伸出觸手有利於共生藻行光合作用；或是伸出觸手以捕食。而在良好的培養環境下，珊瑚會伸出觸手。



$$\text{平均觸手伸出分數(E)} = \frac{\text{片段上定義總級數}}{\text{片段上總珊瑚蟲數量}}$$

(三)珊瑚體內共生藻光化學效率測定(Fv/Fm)

光化學效率為經過暗適應後，利用光脈衝測定葉綠素螢光釋放量進而估算PSII光反應最大螢光值的參數。



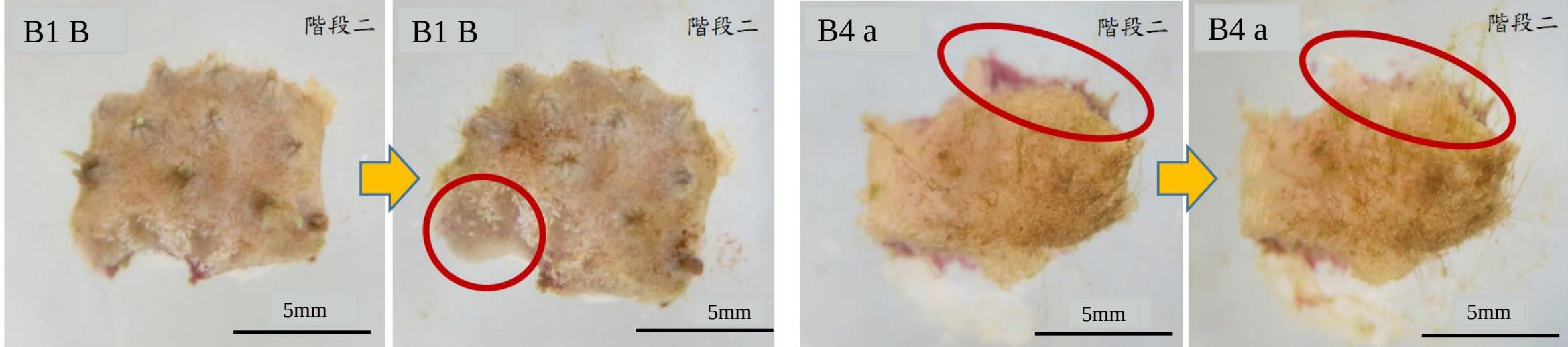
(四)珊瑚白化程度分析(RGB色彩分析)

$$\frac{\text{第m天RGB數值加總} - \text{第n天RGB數值加總}}{\text{第m天RGB數值加總}} \times 100\%$$

所得百分比越高，珊瑚片段顏色越深。

透過(三)、(四)兩項指標可得知誘導白化的效果。

(五)珊瑚的組織修復

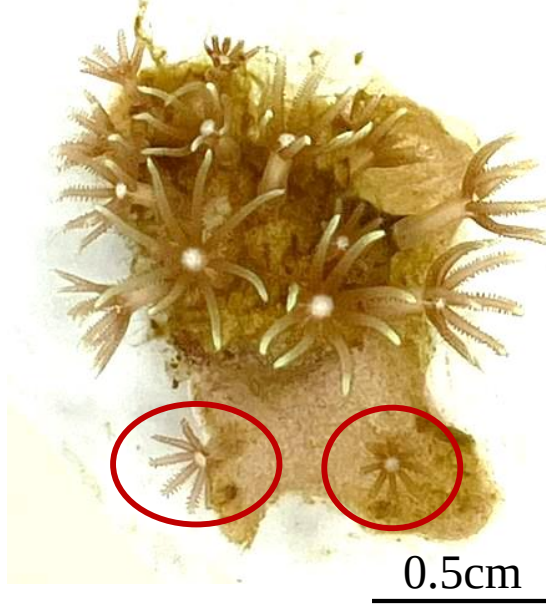


$$\text{修復完成百分比} = \frac{\text{組織修復完成個體數}}{\text{樣本數}} \times 100\%$$

(六)共肉組織面積變化

(七)珊瑚蟲無性生殖數量

每週一次觀察並記錄珊瑚進行無性生殖的狀態。(右圖中紅圈處)



使用螢光解剖顯微鏡觀測珊瑚體內之共生藻的紅色螢光以評估誘導白化的效果;另外監測小綠皮珊瑚之綠螢光蛋白的綠螢光，根據前人研究，白化後的珊瑚綠螢光會增強(Melissa S. Roth & Dimitri D. Deheyn, 2013)。



(綠色圈起區域為BJS擴散範圍)

階段一(共7週)
(各組群體:n=3;各組個體:n=6)

存活率(%)

組別	存活率(%)
正常處理、群體	100
正常處理、個體	100
白化實驗、群體	100
白化實驗、個體	100

階段一(共7週)
(各組群體:n=3;各組個體:n=6)

異常率(%)

培養週數	正常處理、群體	正常處理、個體	白化實驗、群體	白化實驗、個體
1	33.33			
2	33.33	66.66		
3	33.33	66.66		
5	33.33	66.66	33.33	
6	33.33	66.66	66.66	
7	33.33	66.66	66.66	

階段二(共8週)
(各組n=15)

存活率(%)

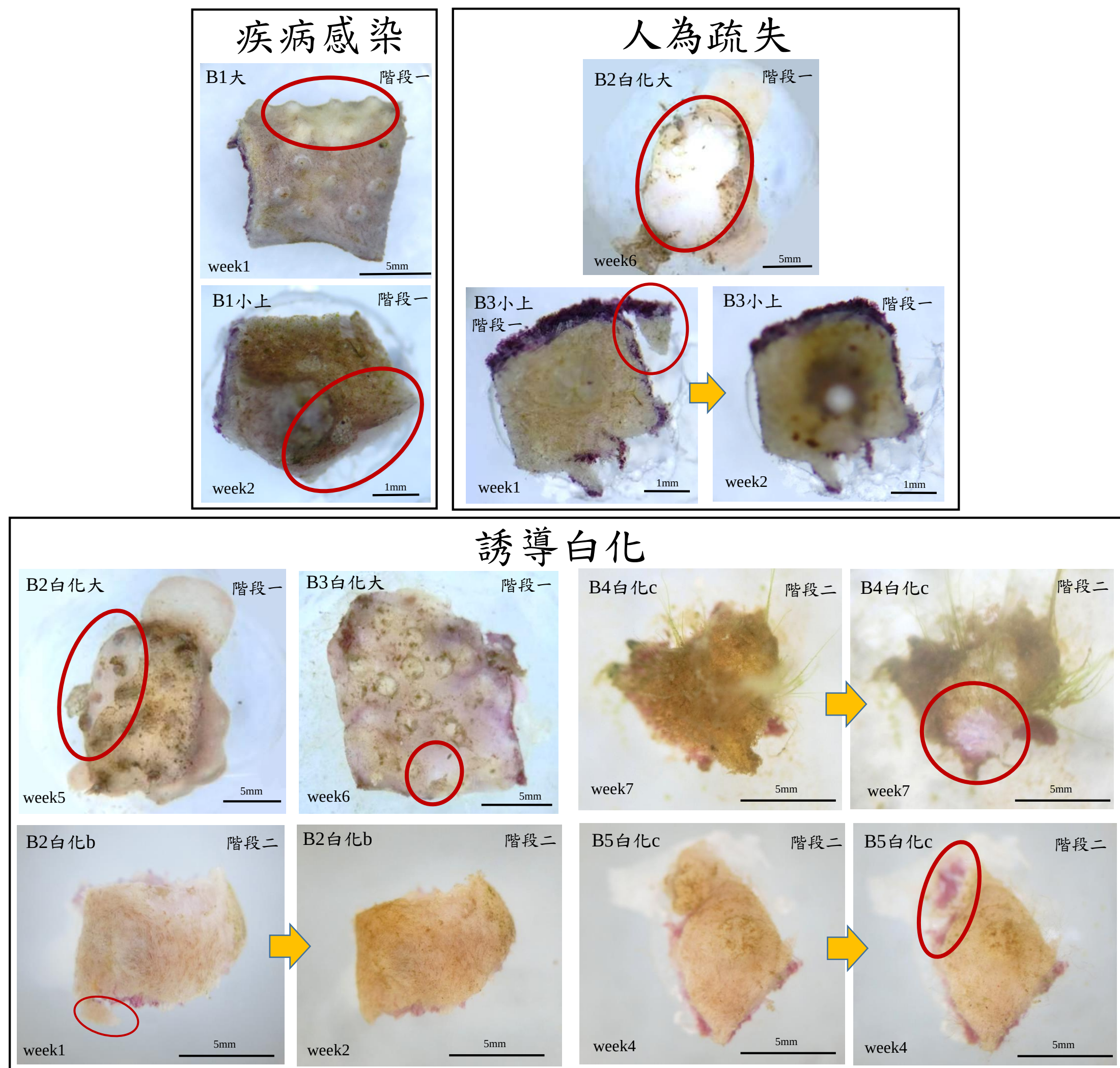
組別	存活率(%)
正常處理、群體	100
正常處理、個體	100
白化實驗、群體	100
白化實驗、個體	100

階段二(共8週)
(各組n=15)

異常率(%)

培養週數	正常處理、群體	正常處理、個體	白化實驗、群體	白化實驗、個體
1				
2				6.66
3				6.66
4				13.33
5				13.33
6				13.33
7				20
8				20

小綠皮珊瑚在本系統中的存活率達



透過異常情形的監測，分析造成異常的原因並加以排除。

小綠皮珊瑚在本系統中的存活率達到百分之百。

而除了因疾病感染和人為疏失引起的異常情況外，其餘所有異常皆由誘導白化所致。

分數

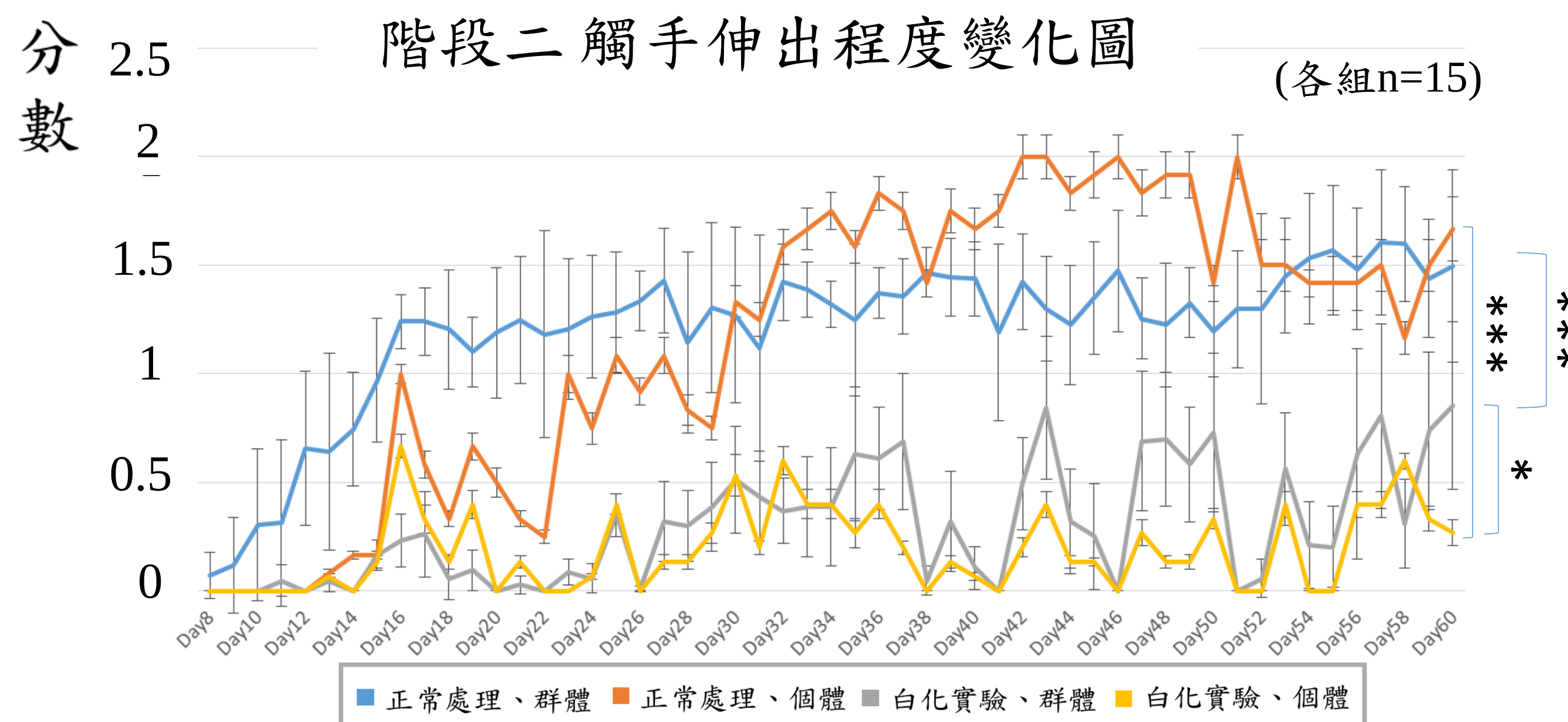
階段一觸手伸出程度變化圖

(各組群體: n=3; 各組個體: n=6)

Day	正常處理、群體	正常處理、個體	白化實驗、群體	白化實驗、個體
Day5	0.0	0.3	0.0	0.0
Day6	0.0	0.0	0.0	0.0
Day7	0.0	0.0	0.0	0.0
Day8	0.25	0.6	0.0	0.0
Day9	0.25	0.6	0.0	0.0
Day10	0.0	0.0	0.0	0.0
Day11	0.0	0.0	0.0	0.0
Day12	0.0	0.0	0.0	0.0
Day13	0.0	0.0	0.0	0.6
Day14	0.35	1.7	0.0	0.0
Day15	0.35	1.7	0.0	0.0
Day16	0.35	1.7	0.0	0.0
Day17	0.35	1.7	0.0	0.0
Day18	0.35	1.7	0.0	0.0
Day19	0.35	1.3	0.0	0.0
Day20	0.35	0.8	0.0	0.0
Day21	0.35	0.8	0.0	0.0
Day22	0.35	0.8	0.0	0.0
Day23	0.35	0.8	0.0	0.0
Day24	0.35	0.8	0.0	0.0
Day25	0.35	0.8	0.0	0.0
Day26	0.35	0.8	0.0	0.0
Day27	0.35	0.8	0.0	0.0
Day28	0.35	0.8	0.0	0.0
Day29	0.35	0.8	0.0	0.0
Day30	0.35	2.0	0.0	1.3
Day31	0.35	1.3	0.0	1.3
Day32	0.0	0.9	0.0	0.9
Day33	0.0	0.9	0.0	0.9
Day34	0.0	0.9	0.0	1.3
Day35	0.0	1.1	0.0	0.9
Day36	0.0	0.9	0.0	0.9
Day37	0.0	0.9	0.0	0.9
Day38	0.0	0.9	0.0	0.9
Day39	0.0	0.9	0.0	0.9
Day40	0.0	0.9	0.0	0.9
Day41	0.0	0.9	0.0	0.9
Day42	0.0	0.9	0.0	0.9
Day43	0.0	0.9	0.0	0.9
Day44	0.0	0.9	0.0	0.9
Day45	0.0	0.9	0.0	0.9
Day46	0.0	0.9	0.0	0.9
Day47	0.0	0.9	0.0	0.9
Day48	0.0	0.9	0.0	0.9

■ 正常處理、群體 ■ 正常處理、個體 ■ 白化實驗、群體 ■ 白化實驗、個體

在階段一中，正常處理組與白化實驗組觸手伸出頻率不具有顯著差異($p>0.05$)；群體和個體相比也沒有顯著差異($p>0.05$)。推測原因為正常處理組的B1群體受疾病感染進而影響分數。



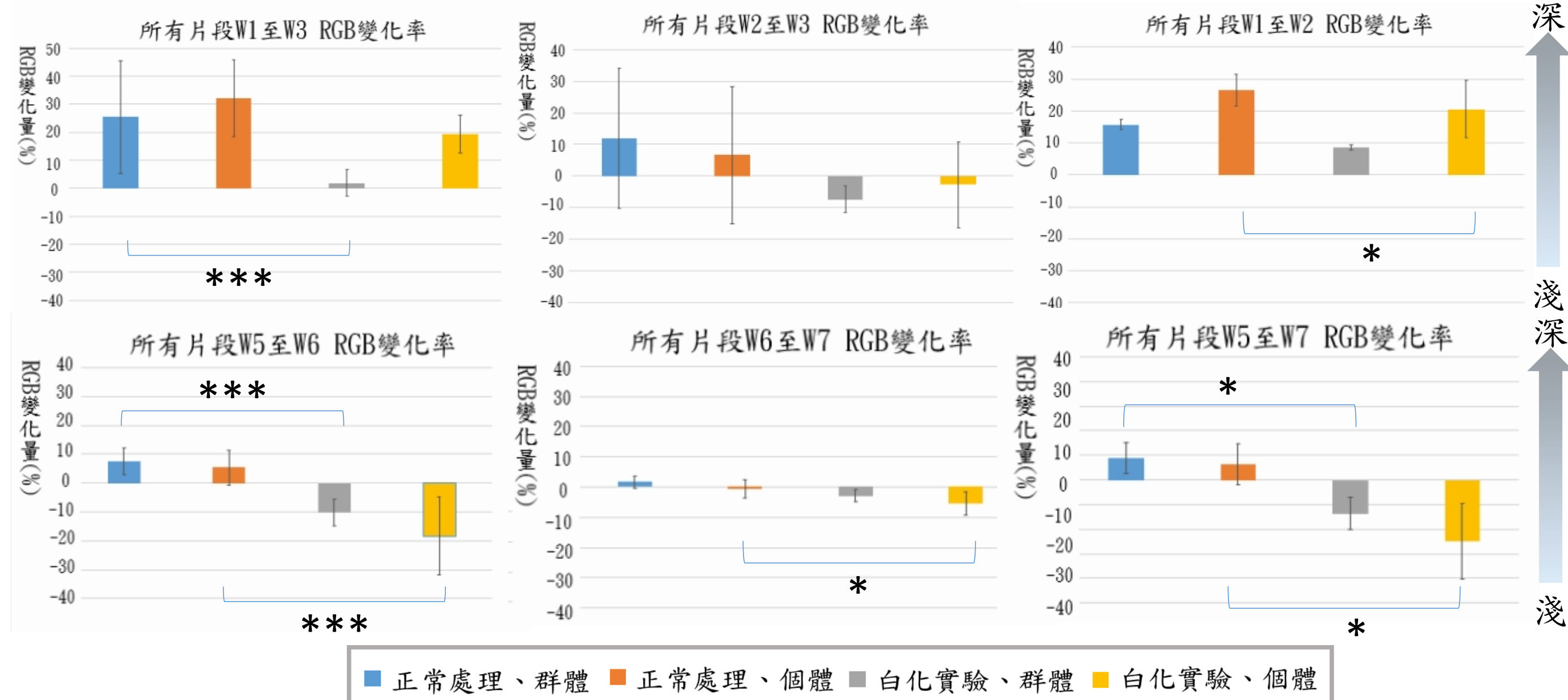
階段二中，正常處理組與白化實驗組觸手伸出頻率有顯著差異($p < 0.05$)；正常處理組的群體、個體相比沒有顯著差異($p > 0.05$)而白化實驗組的群體、個體相比有顯著差異($p < 0.05$)。綜合上述，所有片段之小綠皮珊瑚在剪下後一週即能將觸手伸出。白化實驗組在進行誘導白化時觸手縮起，未進行時觸手開啟。培養一段時間後，珊瑚的觸手開始會在白化過程中伸出捕食，推測是為了補充因失去共生藻所需的營養因而有此動作。

各組n=6

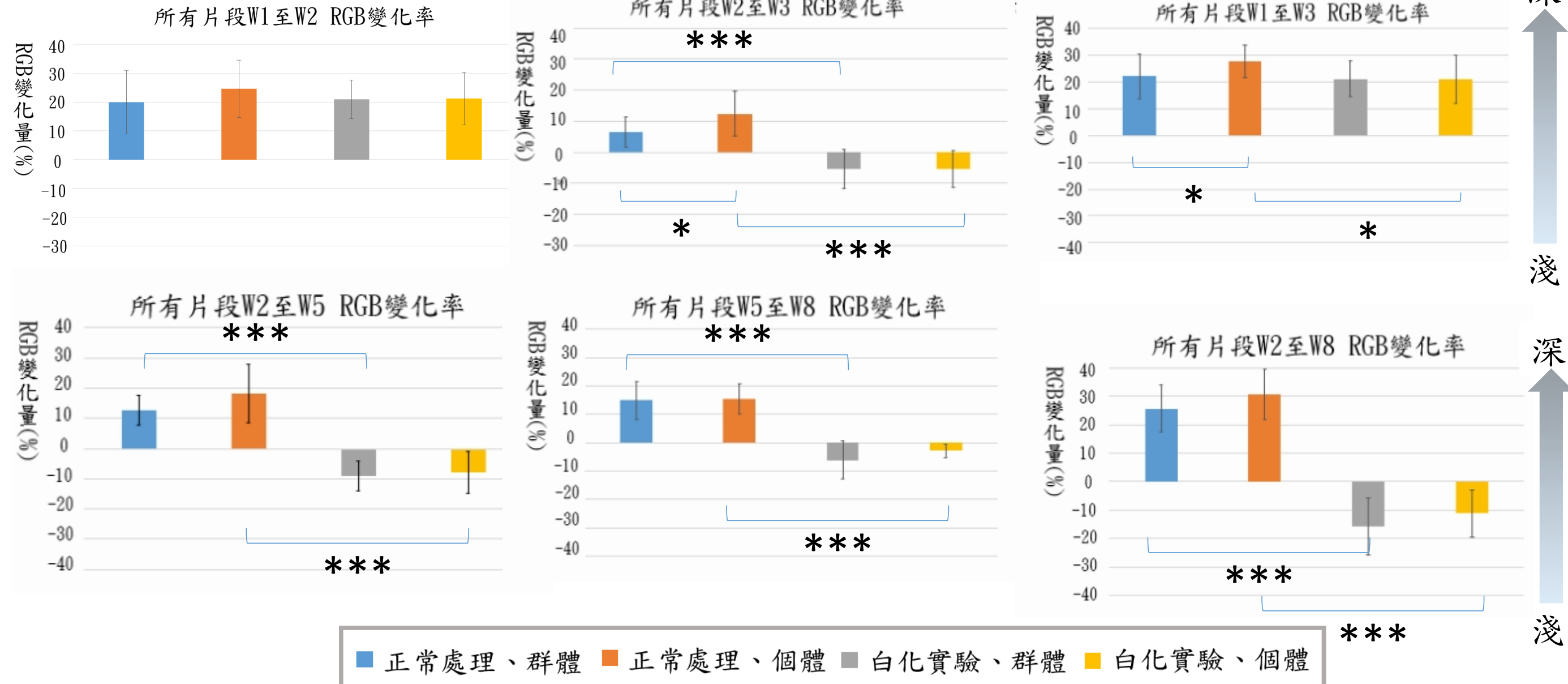
Group	Day1	Day14
正常處理組	0.532	0.617
白化實驗組	0.559	0.513

正常處理組與白化實驗組的共生藻光化學效應變化量具有顯著差異($p<0.05$)。

階段一(各組群體:n=3;各組個體:n=6)

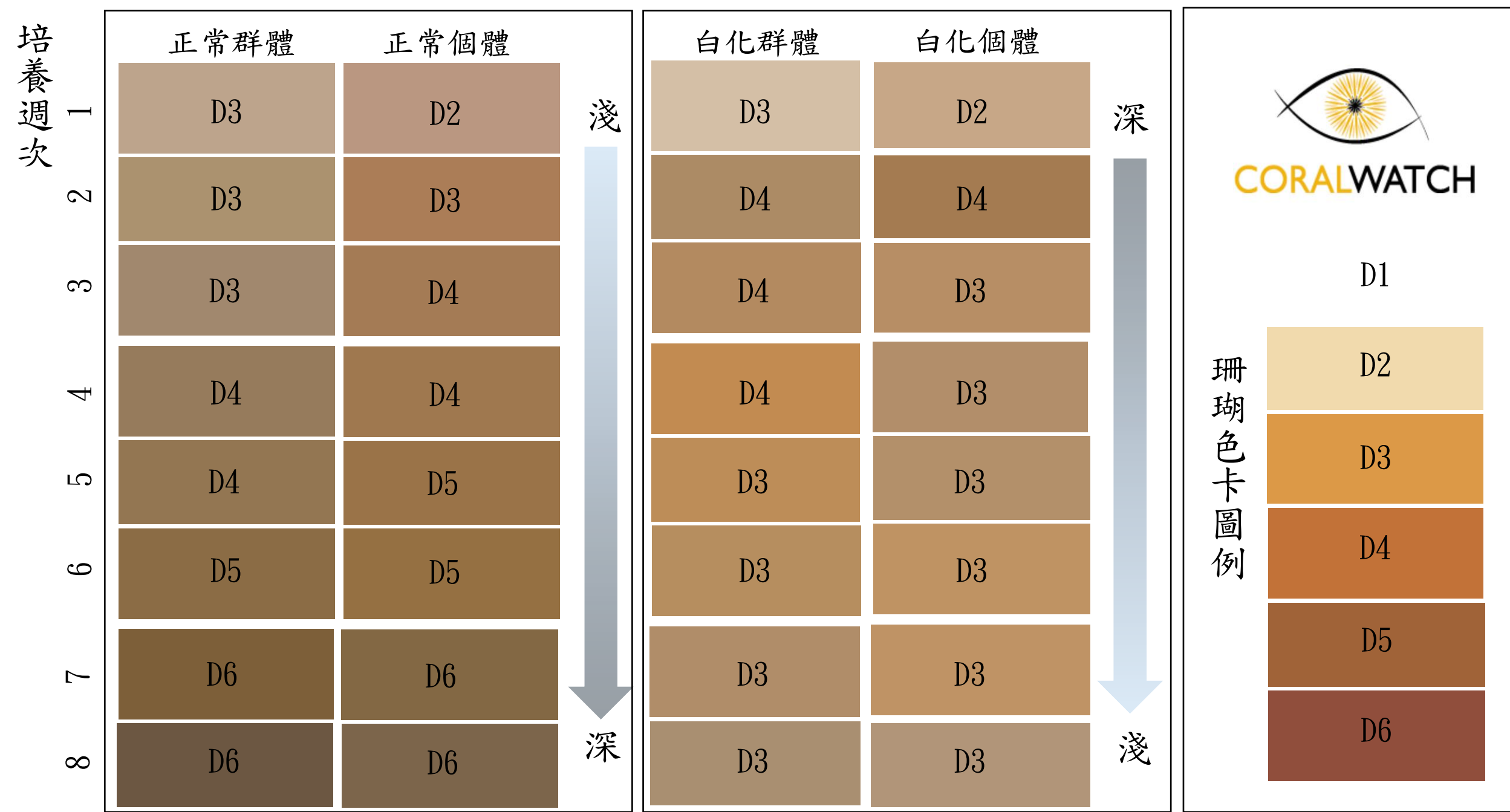


階段二(各組n=15)



正常實驗組及白化處理組的顏色變化量具有顯著差異($p < 0.05$)；個體與群體顏色變化差異不大($p > 0.05$)。

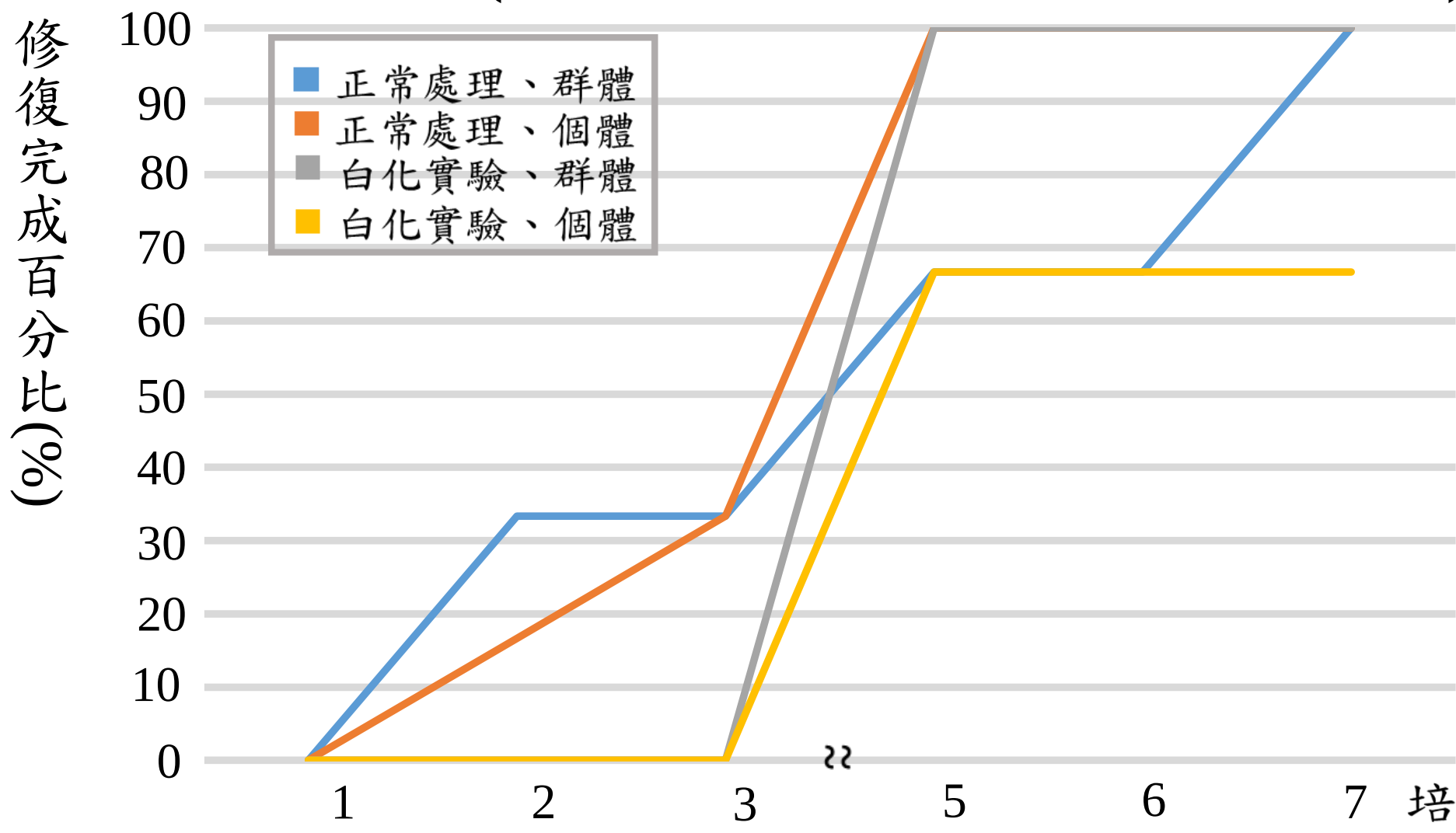
(二)珊瑚色卡白化程度比對



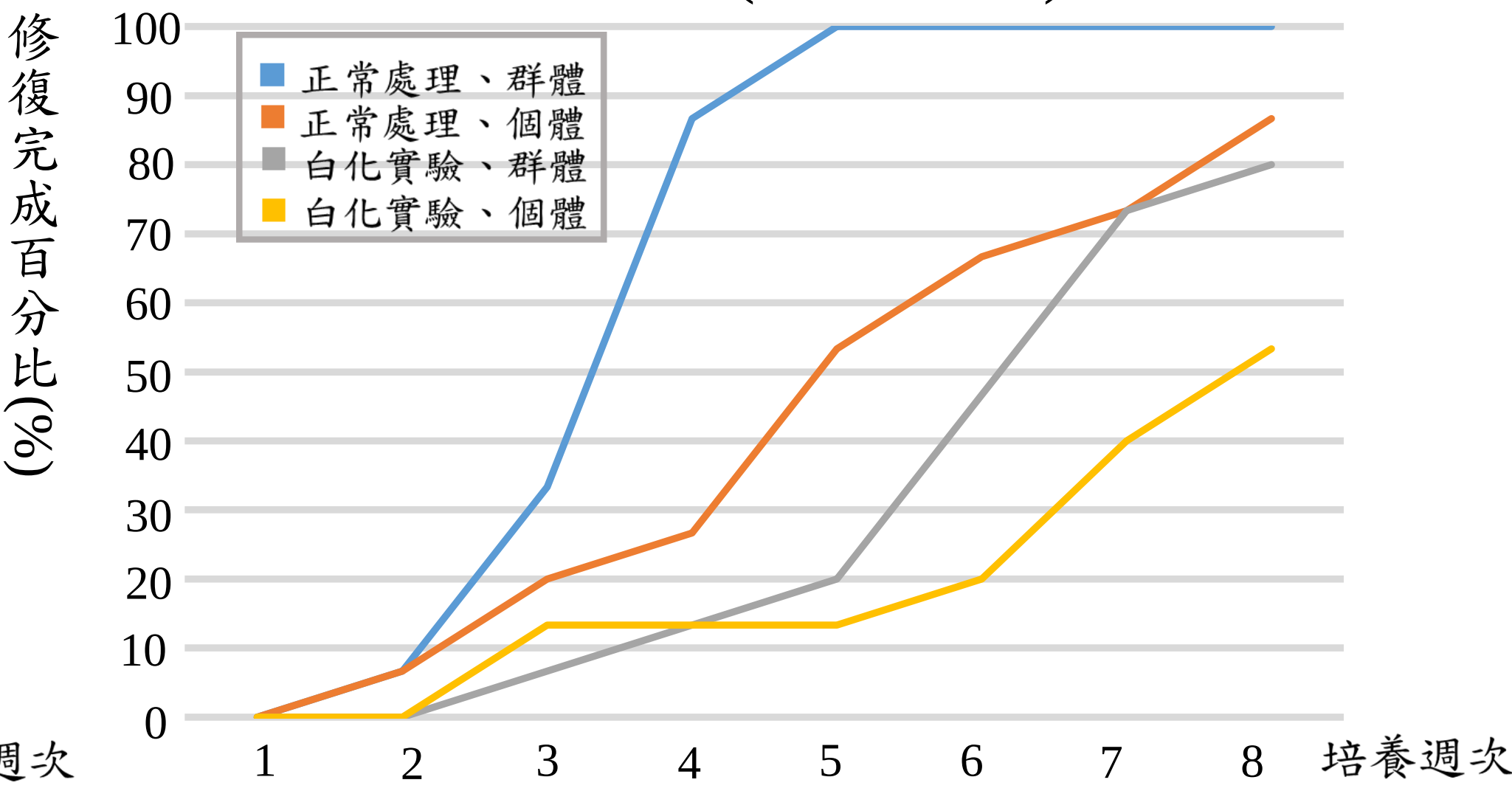
Coral Watch(珊瑚色卡)由昆士蘭大學推動，其簡化了全球珊瑚礁健康情形的數據收集，讓非科學家也能參與監測。藉由與原始數據製作出的色塊與色卡的對比能夠看出小綠皮珊瑚的健康情形(正常處理組顏色變深；白化實驗組顏色變淺)。

五、組織修復

階段一(各組群體:n=3;各組個體:n=6)



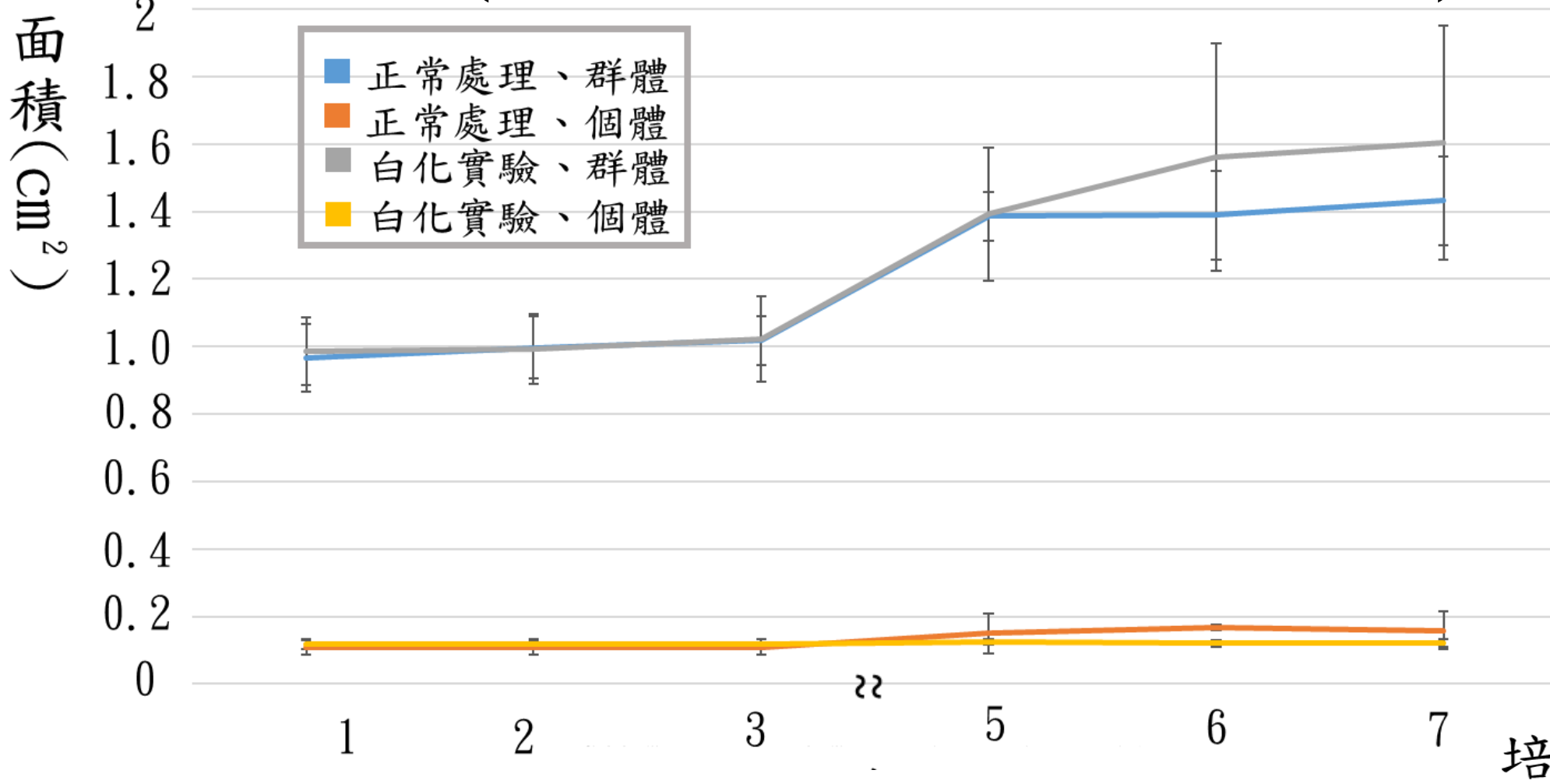
階段二(各組n=15)



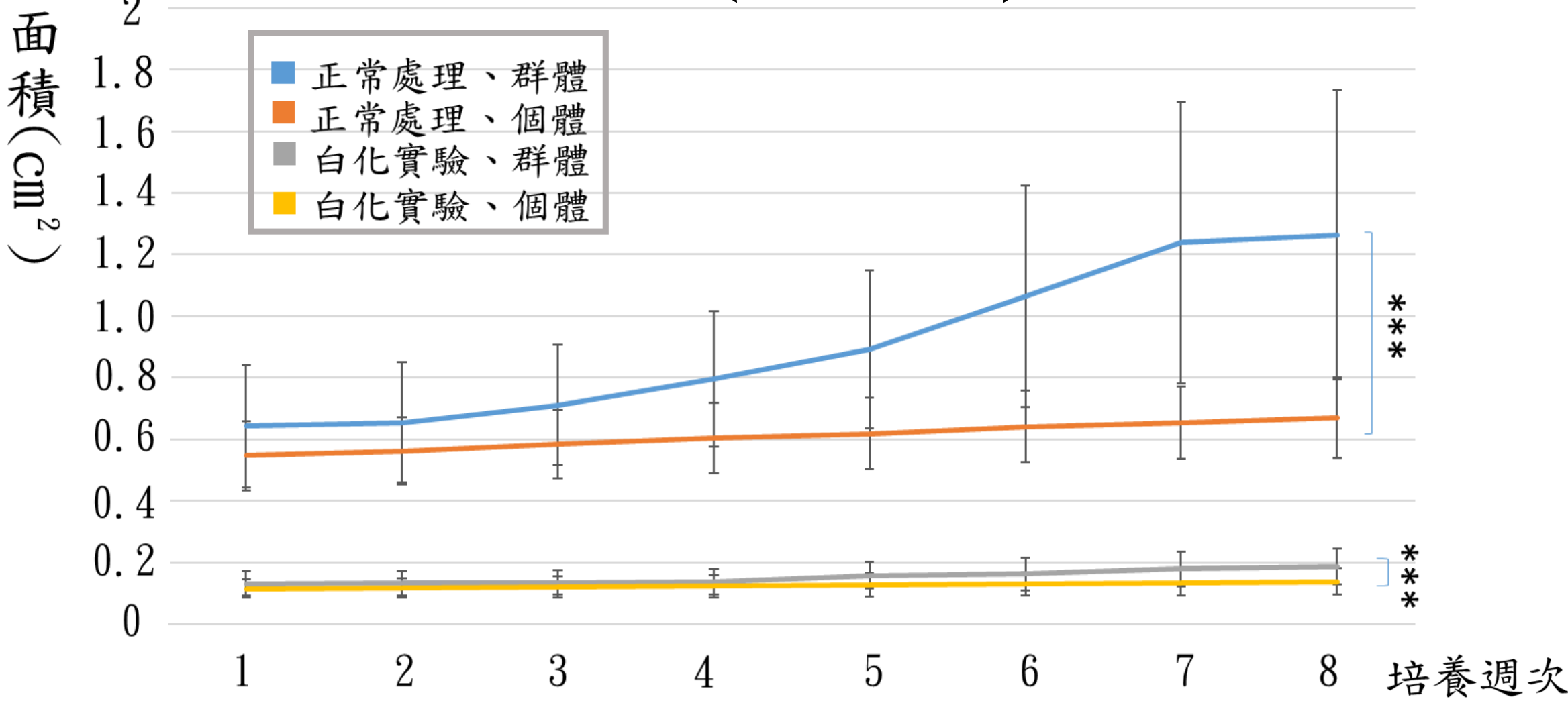
兩個階段中，組織修復的速度:正常群體>正常個體>白化群體>白化個體。階段一中的正常群體不符合趨勢，原因為B1群體遭受BJS感染，出現白化異常的部分直至第7週才完全復原。

六、共肉組織面積變化

階段一(各組群體:n=3;各組個體:n=6)



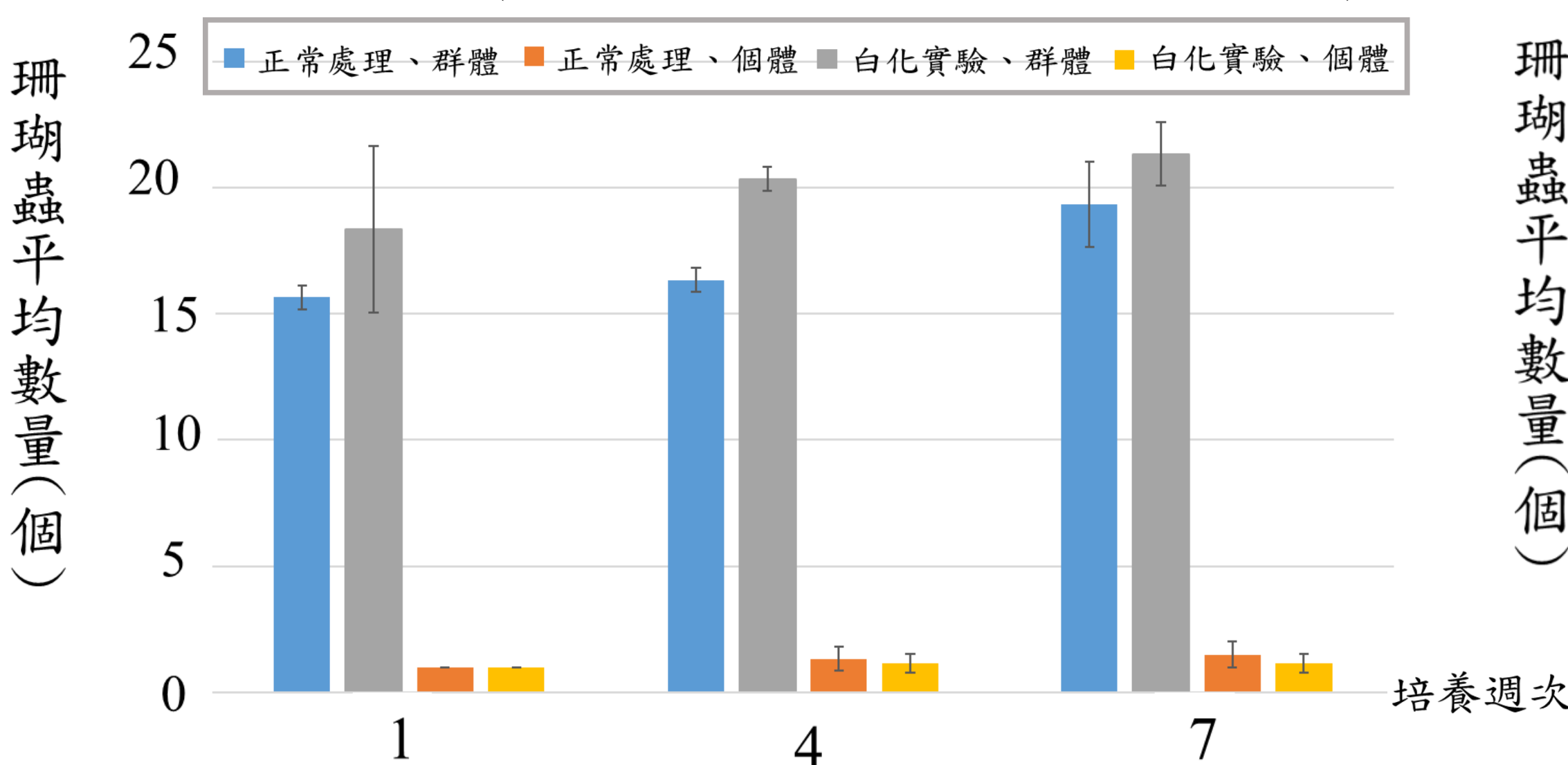
階段二(各組n=15)



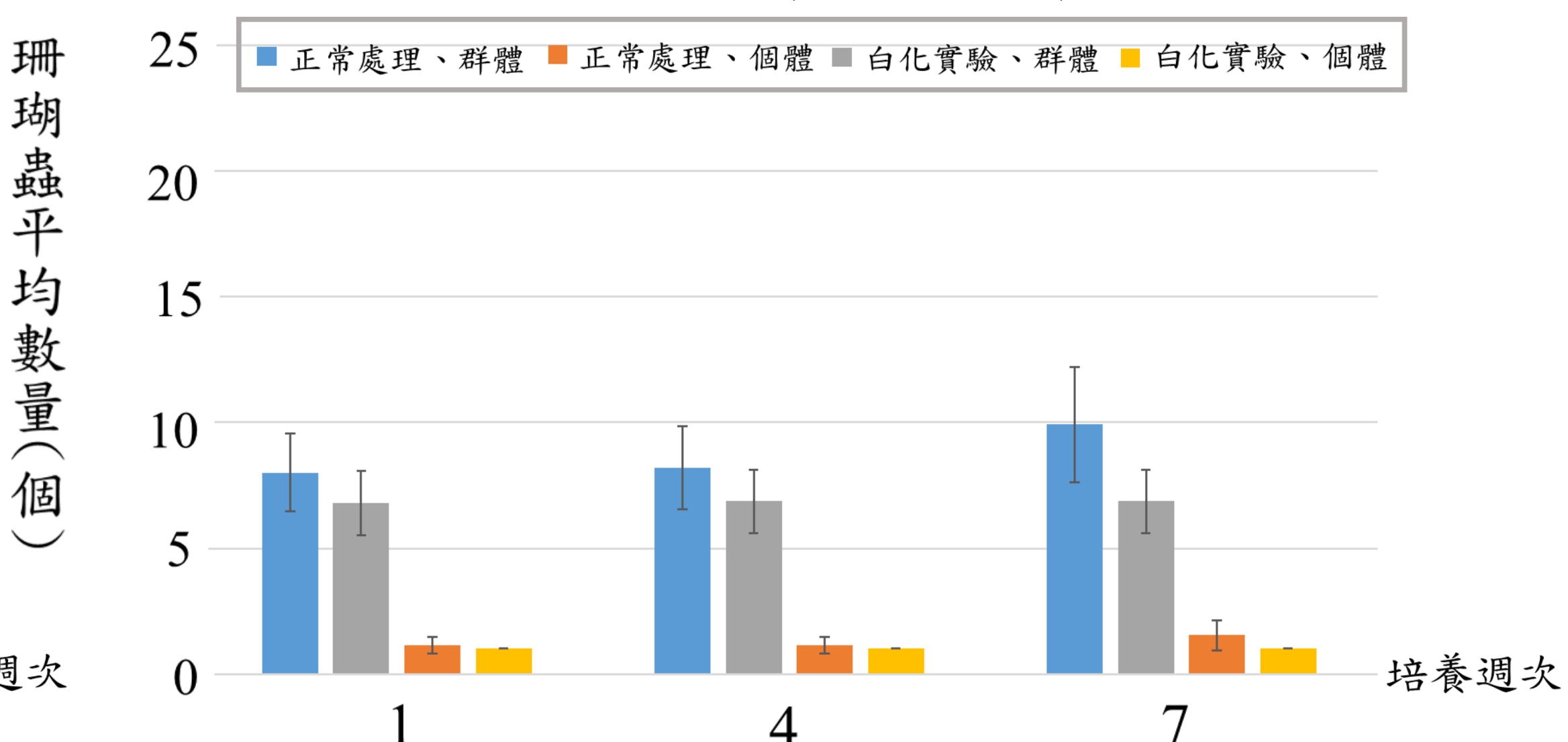
兩個階段中面積到第四週後才有明顯增加。使用面積變化率進行分析，在第一階段中，正常處理組和白化實驗組之差異不明顯(p>0.05)，而第二階段則有顯著差異(p<0.05)；群體珊瑚與個體珊瑚蟲的成長差異不明顯。

七、珊瑚蟲無性生殖數量

階段一(各組群體:n=3;各組個體:n=6)

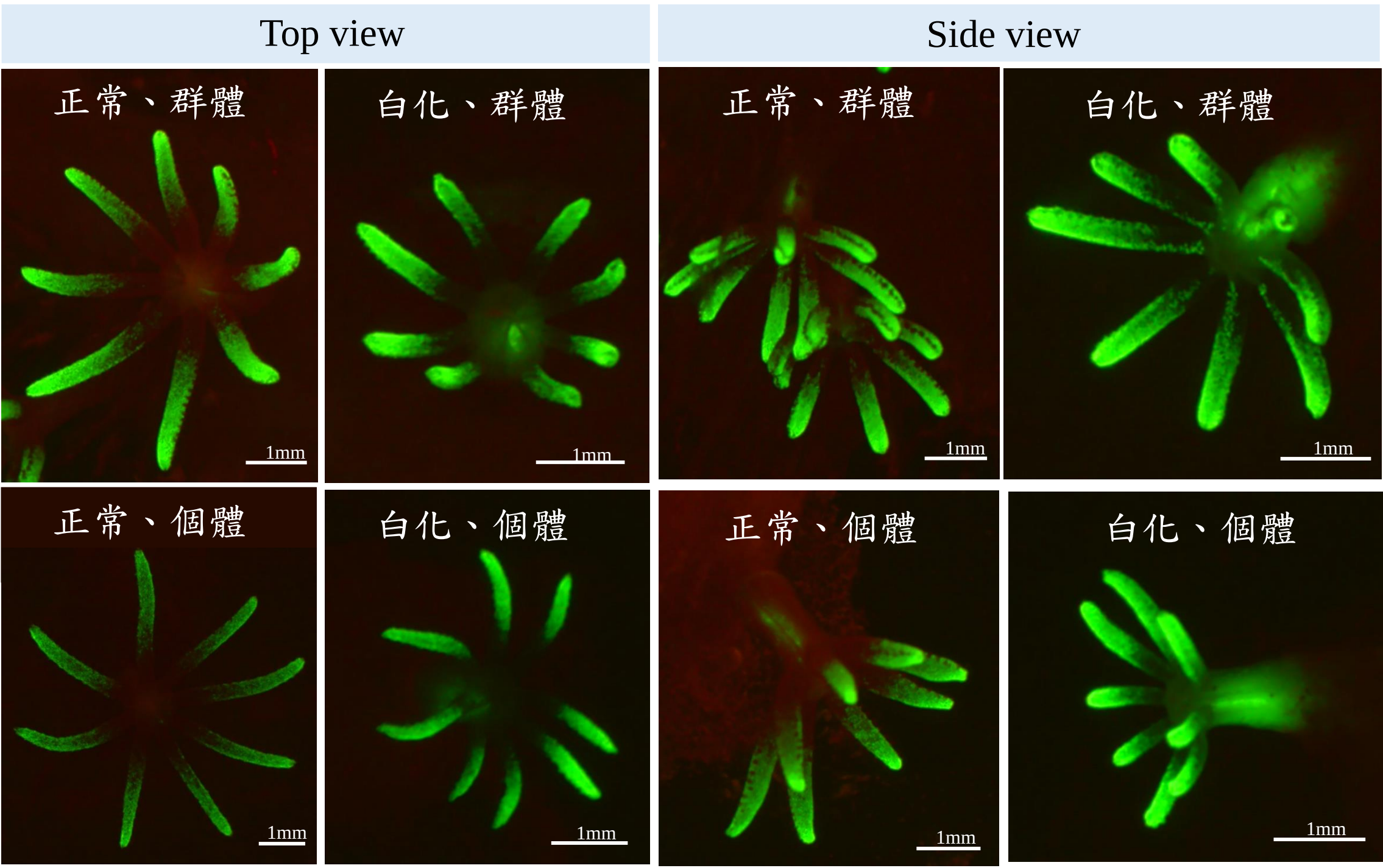


階段二(各組n=15)



個體或是群體，正常及白化組別皆無顯著的變化差異(p>0.05)。

八、螢光觀測



無論白化實驗組相較於正常處理組綠螢光較強、紅螢光較弱，說明白化有效。

九、海水化學變化

樣品	天數	樣本數		鹽度 (%)	pH	TA (ppm)	Ca ²⁺ (ppm)	Mg ²⁺ (ppm)	NH ₃ (ppm)	NO ₂ (ppm)	NO ₃ (ppm)
原配製人工海水 (Original seawater)	Day0	5	Min	35	8.06	4.1	495	795	0.05	0	0.1
			Max	35	8.45	5.25	500	1860	0.05	0	0.1
			Mean ± SE	35	8.24 ± 0.11	4.68 ± 0.39	497.22 ± 2.64	1410 ± 428.94	0.09 ± 0.07	0 ± 0	0.1 ± 1.47E-17
控制組 (不含珊瑚片段)	Day3	5	Min	35	8.033	4.8	485	960	0.05	0	0.1
			Max	35	8.21	5.55	500	1770	0.05	0	0.1
			Mean ± SE	35 ^b	8.15 _a ± 0.1	5.25 _a ± 0.4	492.5 _a ± 10.61	1365 ± 527.76 ^a	0.05 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	0.1 ± 0 ^b
實驗組 (含珊瑚片段)	Day3	5	Min	35	8.0	0.05	490	900	4.95	0	0.1
			Max	35	7.98	0.25	495	1779	5.4	0	2.5
			Mean ± SE	35 ^b	7.7*** ± 0.18	0.07 ± 0.06*	493 ± 2.74	1353.22 _a ± 395.94	5.1 _a ± 0.21	0 ± 0 ^b	0.76 _a ± 1.05

以T檢定比較控制組和實驗組分別與原配製人工海水的差異。a:無顯著差異；b:每筆數據值完全相同。

培養3天後，實驗組的海水鹽度幾乎沒有變化。Mg²⁺、NH₄⁺於實驗組與原配製海水相比沒有顯著差異(p<0.05)。而NO₂⁻、NO₃⁻的濃度非常低，幾乎檢測不到。受到小綠皮珊瑚代謝作用影響，pH值從8.24下降到7.7，Ca²⁺和總鹼度也顯著下降。

陸、結論

一、結論與研究成果

(一)群體、個體及是否白化誘導處理之各項監測項目比較

	存活率/異常率	平均觸手收縮程度(E)	白化程度分析 (RGB色彩分析)	體內共生藻光化學效率測定	組織修復與再生情形	面積成長變化	珊瑚蟲無性生殖數量
群體、個體	✗	✗	✗	✓	✓	✗	✗
有無誘導白化	✗/✓	✓	✓		✓	✓	✗

(二)研究成果

- 1.本實驗證實可使用玻璃保鮮盒培養小綠皮珊瑚、珊瑚蟲個體以及白化的小綠皮珊瑚，存活率達百分之百
- 2.此研究系統可因應疾病感染狀況

(三)其他

- 1.小綠皮珊瑚感染BJS時，可利用適當濃度的氯化鉀(1%KCl)處理
- 2.小綠皮珊瑚在本系統約在四週後會有明顯的組織成長
- 3.使用適當濃度薄荷醇可使小綠皮珊瑚白化且正常生長
- 4.於本系統培養四週後生長狀況佳者開始進行無性生殖

柒、主要參考文獻

- 1.Shinya Shikina, Tzu-Chieh Lin, Yu-Ling Chu, Yin-Chu Cheng, Yu-En Chang, Naohisa Wada, Sen-Lin Tang, Yoshiyuki Iizuka, Yi-Ling Chiu. (2023). Culturing reef-building corals on a laboratory dish: a simple experimental platform for stony corals. Front. Mar. Sci., 13 July 2023, Sec. Marine Biotechnology and Bioproducts. Volume 10 - 2023 | <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1149495>
- 2.Wang J-T, Chen Y-Y, Tew KS, Meng P-J, Chen CA (2012) Physiological and Biochemical Performances of Menthol-Induced Aposymbiotic Corals. PLoS ONE 7(9): e46406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046406>
- 3.Cheng, C.-M.; Cheng, Y.-R.; Ding, D.-S.; Chen, Y.-T.; Sun, W.-T.; Pan, C.-H. Effects of Ciliate Infection on the Activities of Two Antioxidant Enzymes (SOD and CAT) in Captive Coral (*Goniopora columna*) and Evaluation of Drug Therapy. Biology 2021, 10, 1216. <https://doi.org/10.3390/biology10111216>
- 4.Roth, M., Deheyn, D. Effects of cold stress and heat stress on coral fluorescence in reef-building corals. Sci Rep 3, 1421 (2013). <https://doi.org/10.1038/srep01421>