

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052007

胸奴纏余，難辨雌雄——以聚合酶連鎖反應檢驗蟹奴寄生率及雄蟹雌化的關聯

學校名稱：國立新竹科學園區實驗高級中等學校

作者： 高二 劉芷妤 高二 蔡孟伶 高二 卡羿德勞	指導老師： 揭維邦
--	------------------

關鍵詞：扁平多囊蟹奴 (*Polyascus plana*)、
白紋方蟹 (*Grapsus albolineatus*)、
寄生雌性化 (parasitic feminization)

摘要

國內外針對扁平多囊蟹奴 (*Polyascus plana*) 少有研究，且研究寄主對象多為方形大額蟹。蟹奴具內寄生生活史，若需從外觀判定其寄生與否，需待內寄生階段成熟後，外寄生時期才突出的外體構造進行判別，前人則依此方法。本研究為第一個以白紋方蟹 (*Grapsus albolineatus*) 為寄主、利用扁平多囊蟹奴 18s rRNA 專一性引子進行內寄生判定，修正先前以有無外體判定寄生率的偏誤，顯示總寄生率上升。為探討根頭目寄生雌性化影響，首例以白紋方蟹為寄主，除無寄生、外寄生時期外，加入內寄生時期，探討各時期腹節雌性化現象，結果顯示有無外體與雄性腹節雌性化現象具顯著相關性。最後，本研究發現扁平多囊蟹奴寄生誘發一雄性寄主肝胰腺卵黃蛋白原基因之表現，為另一個寄生雌性化的現象。

壹、研究動機

「蟹奴病」為水產養殖業問題之一，雖不會引起大量死亡，但據農委會，其嚴重影響經濟類螃蟹之肉質。例如有著「大閘蟹」別名之稱的中華絨螯蟹，時常遭受 *Sacculina* sp. 及 *Loxothylacus* sp. 等屬寄生，在養殖過程中發病。

高一時，老師曾為我們介紹台灣相關蟹種分佈以及行為。課餘進行螃蟹的相關資料搜索中，我們發現有數個報導提及關於「蟹奴」的影響，其標題多為「閹割雄蟹，使其成為沒有思想的代孕母親」。受到此標題的吸引，我們感到疑問的是，雄蟹如何發展出與雌蟹相同行為？蟹奴是如何去控制其行為，藉由影響激素平衡、抑或控制神經節？……

進一步查閱此物種的資料，臺灣具有一種名為「扁平多囊蟹奴」、目前僅知於臺灣的蟹奴種；而國際上針對其較無相關紀錄。同時，我們親自造訪各處漁港訪問當地漁民及攤販，也發現多數人對於此類物種較無認知，且多認為其為卵。曾有文獻提及不同種類蟹奴對於寄主影響會有所不同，例如受 *Briarosaccus callosus* 為降低食物消化量、受 *Loxothylacus texanus* 寄生則為呼吸量增加、游泳能力下降 (Waiho *et al.*, 2020)。令我們不禁好奇：扁平多囊蟹奴對於白紋方蟹的影響是否也與其他蟹奴種相似？又如何能判別一白紋方蟹是否有遭到寄生？

經過相關研究資料的搜索，我們查找到國內對於其寄生相關判定的研究，其過程中牽扯到聚合酶連鎖反應 (PCR) 的進行 (董子安, 2018)。對應課程所學、目前的疫情，除了上述對於寄生交互作用的好奇，我們也對於此技術的應用、如何操作感到新奇。

貳、研究目的及研究問題

扁平多囊蟹奴屬根頭目（Rhizocephala）有刺胞幼體亞目（Kentrogonida）蟹奴科（Sacculinidae）。根頭目為寄生性藤壺類，多寄生於十足目與等足目甲殼動物，可從寄主吸取養份，影響其生長、生殖及行為。而本次研究目的如下。

一、探討扁平多囊蟹奴是否為寄生於白紋方蟹蟹奴種

對於蟹奴品種的鑑定，可利用外體外型分類至屬，並切片觀察其內腸系膜、儲精巢等構造以確認至種（徐珩閔，2014）。針對扁平多囊蟹奴，塗子萱（2007）以幼蟲型態進行鑑定，本研究則希望進一步以分子證據證明之。

二、探討白紋方蟹實際受扁平多囊蟹奴寄生情形

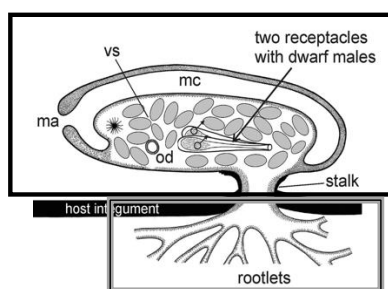


圖 1-1、根頭目有刺胞幼體亞目外體示意圖

（Hoeg *et al.*, 2019）。上方框內為外體；下方框內為內體根狀構造（rootlets）。ma，套鞘孔；mc，套鞘腔；od，輸卵管；receptacle，受雄囊；stalk，柄；vs，內臟囊（含卵巢）。

與一般固著性藤壺不同，根頭目具內寄生生活史。如圖 1-1，蟹奴主要構造可分為兩大部分，一為根狀構造，深入寄主體內，攀附於寄主腸道、內臟器官等向附肢延伸，稱為內體（interna）；一為突出於寄主體外之柔軟具外套膜組織，稱為外體（externa），為蟹奴之生殖器，具有類似卵巢功能。其發展過程如圖 1-2 所示。

見圖 1-2。蟹奴成熟後外體釋幼，稱為無節幼蟲（nauplii），並成長為腺介幼蟲（cyprid）（箭頭 A、B）。雌性幼蟲游動、附著於寄主體表外並成長為成蟲（kentrogon）。此時其脫去外殼、將其蠕形幼體（vermigon）注入寄主體內（箭頭 C ~ E）。注入後，其隨寄主血淋巴進行蠕動，並移至腸道等處發展內體以便吸取養分（箭頭 F）。待其內體成熟後，位於寄主腹部瘤狀體會逐漸膨大，在寄主蛻殼時向外突出、發展外體（箭頭 G）。

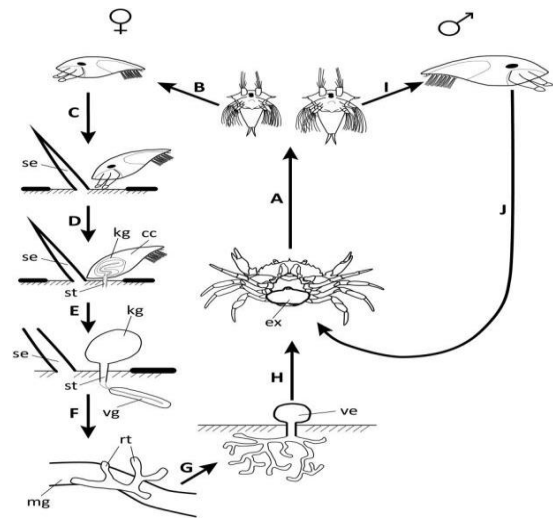


圖 1-2、根頭目有刺胞幼體亞目生活史示意圖 (Waiho *et al.*, 2020)

比較前人所判定方法，「寄主身上如已經具有外體或是雖無外體，但有寄生過後留下的疤痕視為有寄生，反之則判斷為無被寄生」（徐珩閔，2014）、「使用 DNA 基因體以扁蟹奴的 18S rRNA 進行聚合酶連鎖反應已確認個體是否被寄生」（董子安，2018）。前者只能觀察到外寄生、未考量內寄生；後者則具分子證據，涵蓋內寄生樣本。因此若以後者方法測定，實際寄生比率推測應較現有資料高。

國內關於白紋方蟹與扁平多囊蟹奴寄生相關性研究主要以塗子萱（2007）所提出為主，其於風吹沙測站、香蕉灣測站所記錄的寄生率分別為 63.3%、27.8%。然而其寄生判定方法與徐珩閔（2014）相同，因此本研究認為其後續觀察現象及統計量應進行修正。

三、探討雄性白紋方蟹於各寄生時期雌性化現象

本研究除探討白紋方蟹於無寄生時期、外寄生時期之腹部雌性化差異外，希望探討內寄生此一階段對於其腹部雌性化的影響。

據文獻，多數根頭藤壺寄生會使寄主出現寄生雌性化（parasitic feminization），造成雄性寄主腹部與螯足雌性化。已知方形大額蟹 *Metopograpsus thukuhar* 在受到扁平多囊蟹奴寄生後，如同大多數根頭藤壺對寄主的影響，雄性寄主會有寄生雌性化現象，其腹節會越來越寬，趨向與雌性相同之圓寬腹節（徐珩閔，2014）。



圖 1-3、雄性腹部雌性化特徵圖。箭頭所指為其腹部。A) 雄蟹無寄生時期，腹部呈三角狀；B) 雌性，其腹部形狀寬且圓；C、D) 為同一樣本，為雄性寄生時期，具有與雌性相同之腹部外觀，箭頭所指為其雄性生殖肢，可作為雌雄性判別依據。

參、研究設備及器材

一、白紋方蟹 *Grapsus albolineatus* (Lamarck, 1818)

白紋方蟹屬於節肢動物門 (Arthropoda) 十足目 (Decapoda) 底下的方蟹科 (Grapsidae) 方蟹屬 (*Grapsus*)。分布在菲律賓、香港、新加坡、琉球群島、台灣等地的岩岸潮間帶上，為扁平多囊蟹奴的寄主之一。



圖 2-1、白紋方蟹外觀圖。A) 其螯足為紫色點狀；B) 頭胸甲呈藍綠色並布有斑點，步足以淺褐為底並有深褐色斑紋，長有倒鉤，使其能行走於岩壁上並承受海浪衝擊。

二、實驗

(一) 採集、飼養

藥品與器材	式量、用途
網子、手套、水桶	採集白紋方蟹
Red Sea SPS dominant 海水素、Erase-Cl 超濃縮強效水穩	人工調配海水
魚蝦飼料	餵食白紋方蟹

(二) 標本測量

藥品與器材	式量、用途
白紋方蟹酒精標本	研究標的物(使用 95 度酒精存放)
游標尺	測量白紋方蟹頭胸甲長寬、腹節長寬
電子秤	測量白紋方蟹重量

(三) 解剖動物

藥品與器材	式量、用途
0.01MPBS 適量	清洗組織
解剖盤一組	解剖標本、切割組織

(四) 抽取 Genomic DNA

1. 裂解細胞

藥品、器材	式量、用途
胸腺神經節組織	30 mg 以下
LYS Buffer	200 μ L
Proteinase K	10 μ L
100%酒精	210 μ L
EX Buffer	200 μ L
微量離心管(Eppendorf tube)	放置組織
直徑 1.6mm 鋼珠、Bullet blender(微珠型組織研磨器)	均質化組織
試管加熱器	於穩定溫度加熱試管

防爆夾	避免加熱時試管爆裂
移液器(pipette)、微量吸管尖(pipette tips)	輔助移液
桌上型離心機、vortex mixer 震盪混合器	充分混合溶液

2. 萃取 DNA

藥品、器材	式量、用途
WS Buffer	500 μ L
二次蒸餾水 (d.d.H ₂ O)	20 μ L
微量離心管(Eppendorf tube)	放置組織
DNA mini column、collection tube	放置抽出的 genomic DNA
離心機	移除廢液
移液器(pipette)、微量吸管尖(pipette tips)	輔助移液

(五) 濃度分析

EzDrop 1000 超微量分光光度計：在進行 PCR 以前，需先確認所萃取之 Genomic DNA 之濃度純度和品質，準備二次蒸餾水作為測量標準。選用 nucleic acid 模式，超微量分光光度計將根據吸光值確認品質，顯示出 A₂₆₀、A₂₆₀/A₂₃₀、A₂₆₀/A₂₈₀ 之值，A₂₆₀ 主要顯示核酸的濃度，A₂₈₀ 為蛋白質等，A₂₃₀ 則為碳水化合物或鹽類。

(六) 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

藥品、器材	式量、用途
二次蒸餾水 (d.d.H ₂ O)	14.87 μ L
5x go Taq Buffer	5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	2.5 μ L
dNTP (10mM)	0.5 μ L
F-primer	0.5 μ L
R-primer	0.5 μ L
Go Taq polymerase	0.13 μ L
Template (Genomic DNA、cDNA)	1 μ L
移液器(pipette)、微量吸管尖(pipette tips)	輔助移液

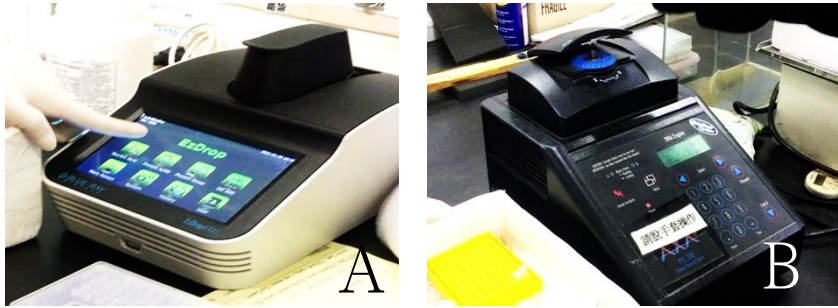


圖 2-2、本研究使用之儀器示意圖。A) EzDrop 1000 超微量分光光度計；B) PCR 基因擴增儀(DTC-3G plus)

(七) 凝膠電泳分析

藥品、器材	式量、用途
瓊脂糖(Agarose)、0.5x Tae Buffer	重量百分濃度 1.2%
溴化乙錠核酸染劑	染色
Marker (DM2300 ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder)	1 μ L
DNA 樣本	5 μ L
微波爐	幫助瓊脂糖溶解
製膠基座、齒書	定型凝膠
電泳槽、電泳儀電源供應器	執行電泳

(八) 提取總量 RNA

1. 裂解細胞

藥品、器材	式量、用途
肝胰腺組織	50 mg~100mg
Trizol	1000 μ L(300+700)
微量離心管(Eppendorf tube)	放置組織
Bullet blender(微珠型組織研磨器)	均質化組織
移液器(pipette)、微量吸管尖(pipette tips)	輔助移液
桌上型離心機、vortex mixer 震盪混合器	充分混合溶液

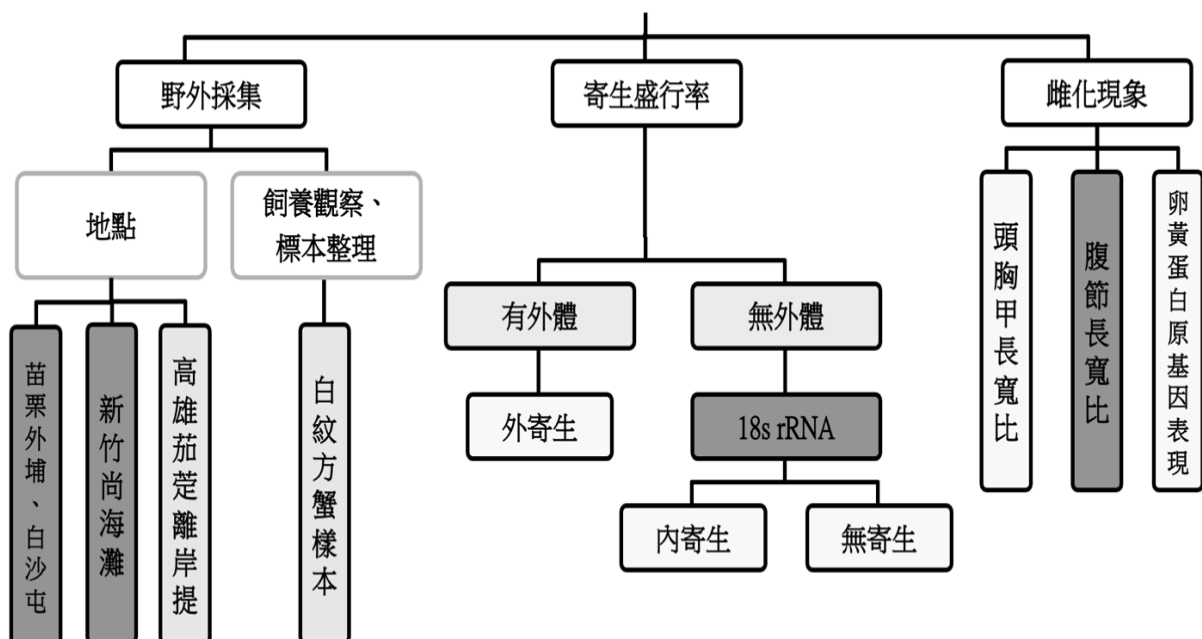
2. 萃取 RNA

藥品、器材	式量、用途
氯仿	200 μ L
異丙醇 (Isopropanol)	500 μ L
75%酒精 (75ml 無水乙醇 +25ml DEPC 水)	700~900 μ L
1%DEPC 水	30~50 μ L
微量離心管(Eppendorf tube)	放置組織
離心機	移除廢液
移液器(pipette)、微量吸管尖(pipette tips)	輔助移液

(九) 反轉錄作用

藥品、器材	式量、用途
隨機引子	1 μ L
1%DEPC 水	
RNasin® Plus RNase Inhibitor	1 μ L
M-MLV RT 5x reaction buffer	5 μ L
M-MLV RT(H-)(200U/ μ L)	1.25 μ L
移液器(pipette)、微量吸管尖(pipette tips)	輔助移液

肆、研究過程或方法及進行步驟



本研究共分為三個部分，分別為野外採集、扁平多囊蟹奴於白紋方蟹之寄生盛行率以及針對雌性化現象之探討。本研究利用扁平多囊蟹奴 18srRNA 進行聚合酶連鎖反應，檢驗肉眼看不見的内寄生生活史，希望了解實際寄生盛行率，以及内寄生對於雌化現象之影響，分雌、雄性進行探討。

一、實驗動物採集與處理

(一) 樣本採集

本研究樣本採自各地潮間帶，由東北至西南分別為宜蘭蘇澳豆腐岬、新北野柳、龜吼、新竹新豐鳳坑漁港、新竹竹北尚海灘、南寮漁港、苗栗外埔、白沙屯漁港、臺南白水湖、高雄茄萣離岸堤等地之潮間帶。因應方便性及時間考量，本研究主要採集自竹苗海岸。竹苗海岸環境雖可觀察，但較不易採集；此外，白紋方蟹於白天採集較有難度、採集量較少，故於後期轉為夜間採集。

採集時間自 2020 年 8 月至 2021 年 5 月，且仍持續採樣中。參考交通部中央氣象局潮汐預報之當日漲退潮時間，每次採樣時間自最低潮時間前 2 小時起至最低潮時間後 1 小時，以人工徒手方式採集潮間帶上十足目個體，經人工馴養後供實驗使用。

據採集觀察，白紋方蟹退潮時多棲息於石間縫隙、或海浪拍打處（消波塊、礁石），易受驚嚇，自五、六公尺外方可躲避，而其速度快可跳海。如圖 3-1，新竹尚海灘地形大致可分左、右、近側三區塊。左側石縫，可見數隻，但深度較深，不易抓取；右側多垂直岩壁，風勢、浪勢較大，比較難找到適合位置釣取；近側則是躲在石塊縫隙中，但較難以翻動。對比高雄茄萣離岸堤，浪勢經消波塊後明顯減小，且消波塊與消波塊間環形沙灘結構較易接近海浪拍打處、以消波塊隱蔽，接近方蟹聚集處。



圖 3-1、各地採集情形示意圖。A) 新竹竹北尚海灘；
B) 高雄茄萣離岸堤。

(二) 人工飼養處理

人工馴養環境為由人工調配之 31‰-32‰海水中（經曝曬、打氣，加入）。期間每一至二日更換 1/3 海水、餵食人工飼料一次。依有無外體、外體階段暫置於不同飼養缸中，避免馴養過程中成熟外體釋幼造成被寄生情形。如圖 3-2-C，見蟹奴外體轉為褐色即為成熟外體。



圖 3-2、人工馴養環境。A) 馴養環境實驗室情形；B) 缸內情形。為避免爭鬥情況，一缸中以五隻為上限；C) 成熟外體。見箭頭所指。

本研究於飼養期間，在海水裡發現黑色小點。參考塗子萱（2007）對幼蟲發育之研究，判斷其為扁平多囊蟹奴幼蟲。因其幼蟲具正趨光性，於暗室內以燈光照之，可見其向照光處聚集，此時以滴管吸取並放置到玻片上，吸去多餘的液體以避免烘乾後鹽類結晶影響觀察。接著，調和封片膠與二甲苯替代液，滴加於幼蟲樣本上，蓋上蓋玻片，用玻片加熱器以 50°C 烘乾。最後製成永久封片標本，以顯微鏡觀察。標本如附錄所示。

（三）白紋方蟹標本處理

已死亡樣本以 95% 酒精浸泡，鑑定並紀錄其採集資訊、性別、重量、是否具有外體或被寄生過痕跡及其外體數量、位置（圖 3-3）。同時，紀錄寄主頭胸甲、各腹節及螯足長、寬（以 cm 為單位，圖 3-4），並以 Canon EOS 6D 數位單眼相機記錄寄主與寄生物外型。

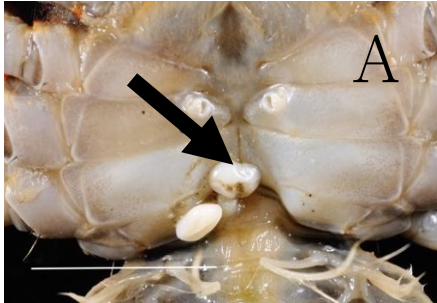


圖 3-3、外體判定依據（見箭頭所指，比例尺：10mm）。A) 白色外囊為未成熟外體；B) 黑色為脫落後柄部殘留痕跡。

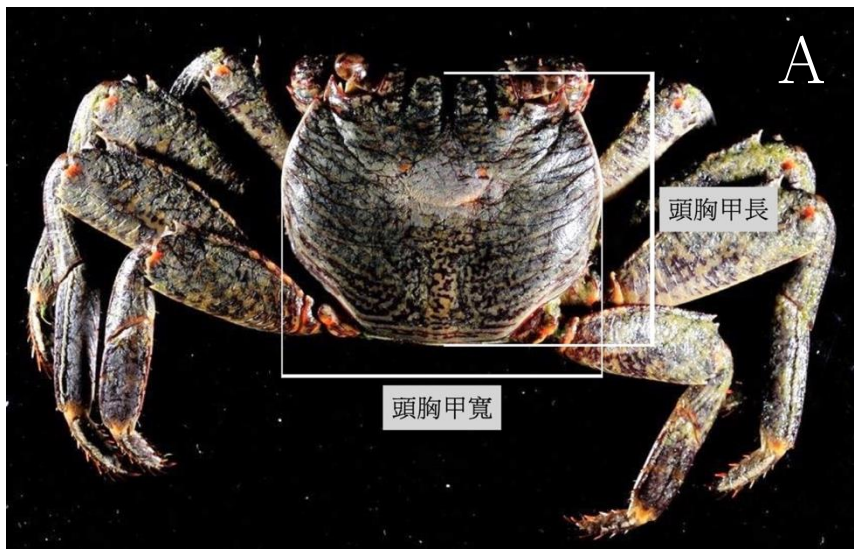




圖 3-4、標本量測示意圖。A) 頭胸甲長、寬量測位置；B) 腹節寬量測位置，羅馬數字為腹節節數。量測依圖內水平與垂直線，雌性化使用之數據為頭胸甲寬與腹節寬（水平線）之比值。

二、內寄生之判定

已知方形大額蟹之胸神經節必定被內體入侵（董子安，2018）。比照同樣方法，藉由自白紋方蟹之胸神經節萃取基因體 DNA 並以扁平多囊蟹奴 18s rRNA 專一性引子進行聚合酶連鎖反應，可確認其被內體入侵之情形。

（一）實驗前解剖

將四對步足剪下。自第四步足基節處伸入剪刀，沿背甲殼緣剪取，並背甲將自後緣剝開，分離前後殼面。撕除黑色的表皮，可見白紋方蟹的器官，去除胃、心臟、多餘的肝胰腺等後，可見圓形的白色胸腺神經節（thoracic ganglia），取下前須將其與周遭神經索分離。胸腺神經節用 PBS 清洗後，置於微量離心管中。

（二）抽取 Genomic DNA

1. 裂解細胞

每份胸腺神經節取 30 mg 以下的組織置於微量離心管中，加入 200 μ l LYS Buffer 和 10 μ l Proteinase K 以利裂解。視樣品數目多寡，可選擇使用不同方法達成均質化組織的目的。

- (1) 小鋼珠搭配微珠型組織研磨器：每管加入 8~10 顆直徑 1.6mm 的小鋼珠，以 Bullet blender 震盪 1 分鐘，靜置於冰上 5 分鐘，重複三次至樣品均質化，看不見組織碎片為止。
- (2) 拋棄式研磨棒搭配手持組織研磨器：使用桌上型震盪混合器和離心機初步混合，

再使用手持組織研磨器搭配拋棄式研磨棒於冰上研磨組織。需注意研磨棒摩擦微量離心管底部會使溫度升高，需短時間多次均質化樣品至看不見組織碎片為止。

夾上防爆夾並置於試管加熱器 60°C 至少 1 小時，每 10 至 15 分鐘需搖晃以利裂解，此過程視情況最多可延長至 3 小時，裂解完成後溶液呈半透明。調整環境溫度至 70°C、20 分鐘，預熱二次蒸餾水。加入 200 μ l 的 EX Buffer 和 210 μ l 的絕對酒精，即可離心萃取。

2. 離心萃取 Genomic DNA

從微量離心管中吸取 700 μ l 的液體至 DNA mini Column 上層，設定離心機條件（6000g, 2min20sec）。離心後將上層移至新的 collection tube，下清液保存於 4°C。原上層加入 500 μ l WS Buffer，相同設定離心兩次，丟棄下清液。再設定（12000g, 3min40sec）離心兩次以去除殘留酒精。將上層 Column 移至新的微量離心管中，以移液器吸取 20 μ l 的二次蒸餾水加於膜上，靜置於冰上等待回溶。

（三）濃度分析

清洗超微量分光光度計（以移液器滴加 2 μ l 的二次蒸餾水後用試鏡紙吸乾，共三次）後再次滴加 2 μ l 的二次蒸餾水作為儀器測量的基準，確認各數值皆為 0 後以試鏡紙吸乾。每次滴加 2 μ l 的待測物（genomic DNA），記錄濃度（ng/ μ L）、A260/A280（介於 1.8~2.2 為佳）、A260/A230 值，以利進行 PCR 反應。

（四）聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction, PCR）

將 PCR 基因擴增機打開待機，設定第一階段為 95°C 維持 1 分鐘；第二階段是 95°C 維持 30 秒；第三階段維持 56°C 維持 30 秒；第四階段回到 72°C 維持 1 分鐘，並回到第一階段重複 34 次。最後保持在 72°C 維持 7 分鐘，最後將其冷卻，完成步驟。

（五）凝膠電泳分析

將 Agarose、0.5X TAE buffer 以重量百分濃度 1.2%的比例加入錐形瓶中，以微波攪拌至沸騰後（完全溶解）。加入溴化乙錠核酸染劑，再將其倒入製膠基座當中，以齒梳留下放置樣本的齒槽，約 30 分鐘後待其凝固後拔出齒梳則凝膠塊製備完成。注意取出凝膠塊時將下方是否有未乾的溶液，如有則擦拭乾淨。

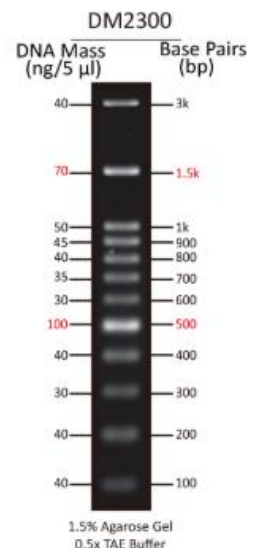


圖 3-5、Marker 光帶之對照表

使用 Pipette 將 1 μ l 的染劑和 5 μ l 的樣本置於 Parafilm 表面，將其汲取量轉到 6 μ l 以上，並來回吸吐使其均勻化。

先將凝膠塊置入電泳池中，將齒槽端放置於電泳池負極端，讓其能夠往正極跑動，並倒入電泳緩衝溶液，再將樣本和 Marker(DM2300 ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder)製入齒槽中，則可開始電泳反應。每 10 到 15 分鐘查看一次電泳情況，確保樣品沒有衝出凝膠範圍。

完成電泳反應後，因為使用了染劑可以看出其大致跑動情況，而此時我們用面紙將其吸乾置於紫外光燈下觀察結果，則可依 Marker 的發光處來對照分析電泳結果。

三、探討雌性化現象統計檢定方法

(一) 頭胸甲相關性檢定：共變數分析

本實驗針對頭胸甲及各腹節之長、寬進行測量。其中，為探討寄生雌性化現象，探討寄生與否對於頭胸甲殼長、寬是否有影響，進行以下共變數分析：

1. 符合組內迴歸係數同質性：交互作用（寄生時期*頭胸甲長）需未達顯著水準（ $p>.05$ ），且共變項（頭胸甲長）需達顯著水準（ $p<.05$ ）。
2. 通過變異數同質性考驗：組內變異數需相同（ $p>.05$ ，未達顯著水準）。
3. 進一步進行共變數分析，排除共變項。

(二) 腹節雌性化檢定

本研究為探討各時期對於腹節雌性化現象之相關性，以腹節寬對於頭胸甲寬比值進行 t 檢定，比較有無外體、寄生與否對於腹節寬之變化是否有影響。除去腹節上端、尾端（第三及第七腹節），以第四、第五、第六腹節進行檢定。

四、其他雌性化現象：寄主卵黃蛋白原 mRNA 表現

(一) 實驗前解剖

解剖與內寄生判定方法相同。取橘黃色肝胰腺組織，取下前需注意是否摻雜其他組織。

(二) 萃取總量 RNA

1. 裂解細胞

每份肝胰腺取約 50 mg~100mg 小塊組織置於微量離心管中，加入 300 μ l Trizol 以利裂解及保護提取之 RNA。均質化組織（見內寄生判定之裂解細胞步驟）後再加入 700 μ l Trizol，並放置於室溫下 5~10 分鐘或是 4°C（冰上）30~60 分鐘以利其充分裂解。

2. 離心萃取 RNA

靜置後設定 (4°C, 12000g, 10min) 條件離心，為分離 RNA 與高分子物質，棄不溶沈澱團塊、將上清液移至另一微量離心管中。管中加入 200 μ l 氯仿，震盪混勻約 45 秒，並靜置 5~10 分鐘。此步驟須於通風櫃中進行。靜置後設定 (4°C, 12000g, 15min) 條件離心，離心後可見樣品分三層，最上層黃色或無色部分水相約 600 μ l，內含總量 RNA。將此層移至另一微量離心管中，吸取時共取 400 μ l，分以 200 μ l 移液器吸兩次，避免水層沾取其他物質。

再來，加入異丙醇以沉澱出水相中的 RNA (可見白色絮狀環圈 RNA。量少一圈，量多呈一環層狀)，震盪混勻後於室溫下靜置 30 分鐘或是 4°C (冰上) 30~60 分鐘。靜置後設定 (4°C, 12000g, 20min) 條件離心，離心後可見凝膠球狀白色微透明物黏附於管底、壁，即為 RNA 沉澱。棄上清，加入約 700 μ l~900 μ l 75%酒精洗滌沉澱，並將輕輕將沉澱彈起，使其不再附著於管底。再次設定 (4°C, 12000g, 10min) 條件離心，去除上層乙醇。

靜置於室內乾燥 5~10 分鐘。此步驟可於淨化工作檯操作，將微量離心管顛倒置放，以利乾燥、殘留液體流出，但不可乾燥太久，否則下一步驟不易溶解。加入約 30~50 μ l DEPC 水等待回溶。

(三) 濃度分析

使用儀器與內寄生判定方法相同。為後續實驗需 RNA 總量 1mg，因此利用 1000 (ng) / 濃度 (ng/ μ L)，得 RNA 所需體積。其體積須為 8 μ L (不足，以 1%DEPC 水取代之)。

(四) 反轉錄作用

利用 M-MLV Reverse transcription(Promega)將總量 RNA 反轉錄為 cDNA，參考所附說明書之方法處理。取由前述濃度分析計算出所需的 RNA、1%DEPC 水體積。再加入 1 μ L 隨機引子 (random primers)、足夠量 1% DEPC 水使總體積達 14 μ L，並於 70°C 反應 5 分鐘。置於冰上冷卻，避免二級結構回復。

加入 1 μ L RNasin® Plus RNase Inhibitor(25 units)、5 μ L M-MLV RT 5x reaction buffer、1.25 μ L dNTP、1 μ L M-MLV RT(H-)，加入 0.1% DEPC 水使總體積達到 25 μ L。混合均勻置於 37°C 下反應 60 分鐘，待反應結束後取得 cDNA 樣品可直接進行聚合酶連鎖反應。

(五) 進行聚合酶連鎖反應、凝膠電泳分析

利用反轉錄所得之 cDNA 進行，使用方蟹科卵黃蛋白原專一性引子，步驟與內寄生判定方法相同。

伍、研究結果

一、採集情形

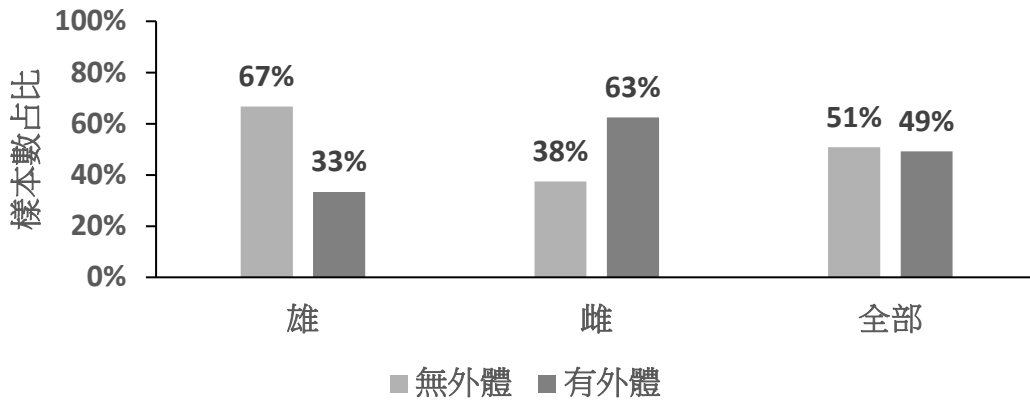


圖 4-1、白紋方蟹遭外寄生情況比率

本研究自 2020 年 8 月至 2021 年 5 月採得十足目個體共 113 隻。其中除無法辨認之樣本，採得白紋方蟹雄蟹 27 隻、雌蟹 32 隻，共 59 隻。

採集時利用肉眼可見之外體進行初步分類。如圖 4-1，白紋方蟹雄蟹外寄生比率為 33%、雌蟹為 63%，整體外寄生比率為 49%。

二、探討扁平多囊蟹奴是否為寄生於白紋方蟹蟹奴種

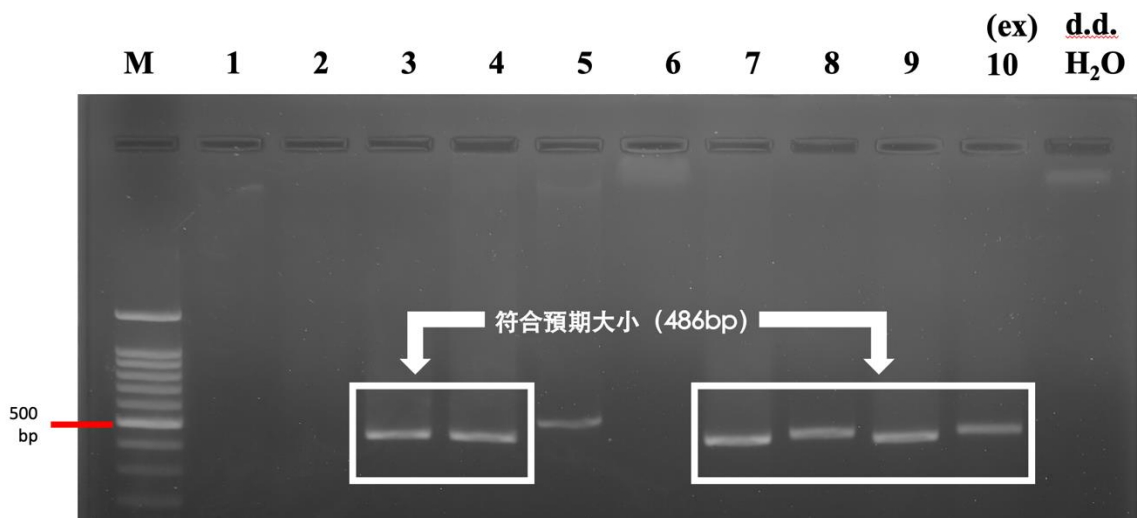


圖 4-2、白紋方蟹胸神經節經扁平多囊蟹奴 18s rRNA 專一性引子 PCR 電泳膠圖。Lane1~10 均為白紋方蟹胸神經節 DNA 樣本，Lane1~9 為不具外體動物、10 為具外體 (ex) 動物。負控制組以二次蒸餾水 (d.d. H₂O) 為樣本。M 為 DNA 大小標誌。

見圖 4-2，Lane10 為具外體之白紋方蟹的胸神經節，其條帶吻合複製子預期大小 (486 bp)，為扁平多囊蟹奴寄生於白紋方蟹實際證據。Lane3~5、7~9 也具明顯可見條帶，為遭受內體入侵之證據，為內寄生時期；Lane1、2、6 不具條帶，為無受寄生的白紋方蟹。Lane5 位置雖偏上，但大致位於相同位置，因此可推測其之胸腺神經節同受內體入侵，而其複製片段經 DNA 定序後，顯示為扁平多囊蟹奴 18s rRNA 基因序列。負控制組無條帶，表示實驗未受到污染。

三、探討白紋方蟹實際受扁平多囊蟹奴寄生情形

(一) 寄生盛行率統計

除已知具有外體之白紋方蟹，以扁平多囊蟹奴 18s rRNA 專一性引子進行剩餘白紋方蟹樣本內寄生判定，部分樣本因神經節損毀不列入統計。本研究使用白紋方蟹樣本數為雄蟹 27 隻、雌蟹 32 隻，共 59 隻。

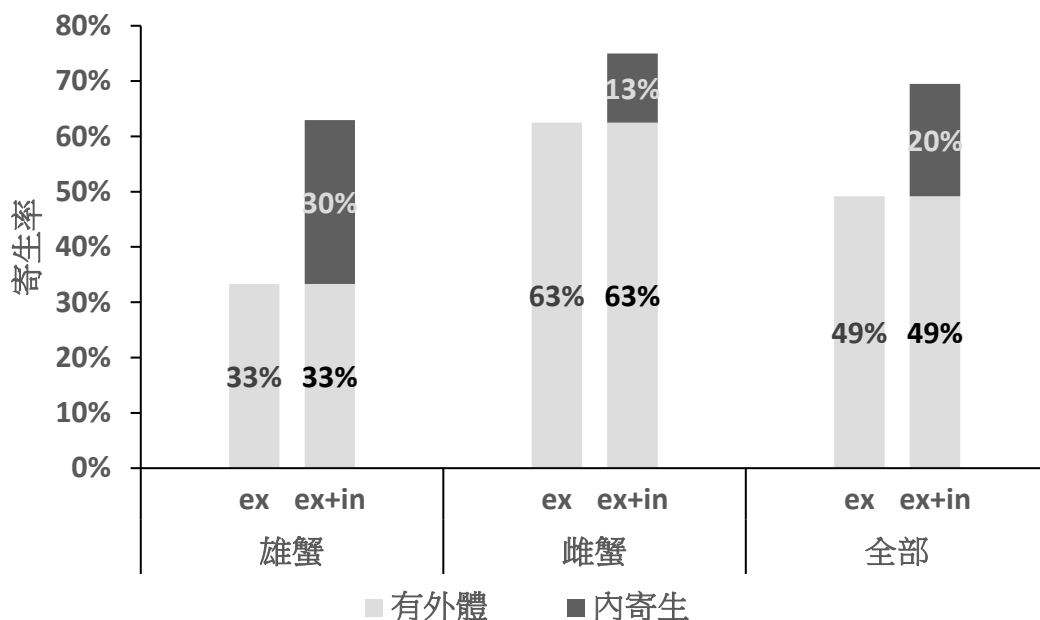


圖 4-3、白紋方蟹寄生盛行率於計入內寄生樣本前、後之比較。表示：ex，以有無外體區分之寄生率；ex+in，加入內寄生時期後總寄生率。

如圖 4-3，以有無外體區分，雄蟹受外寄生比率為 33%、雌蟹為 63%，總外寄生率為 49%。加入內寄生時期後，雄蟹寄生率提升為 63%，增加內寄生比率 30%；雌蟹則提升為 76%，增加內寄生比率 13%。總寄生率加入內寄生時期後達到 69%。

(二) 寄主性別偏好性

表 1、蟹奴對於寄主性別選擇性卡方檢定

單純以有無外體區分是否受寄生			加入內寄生判定後				
	無外體	有外體	總和	無寄生	有寄生	總和	
雌性	18	9	27	雌性	10	17	27
雄性	12	20	32	雄性	8	24	32
總和	30	29	59	總和	18	41	59
Actual X^2	4.98 (達顯著, 偏好雌性)			Actual X^2	1.00 (未達顯著差異)		

如表 1，依照原先判定方法，蟹奴對於寄主性別偏好雌性 (Actual $X^2 = 4.98 > Expected X^2 = 3.84$ ，具顯著差異)。加入內寄生判定後，蟹奴對於寄主性別則不具偏好性 (Actual $X^2 = 1.00 < Expected X^2 = 3.84$ ，不具顯著差異)。

四、探討雄性白紋方蟹於各寄生時期雌性化現象

(一) 雄性白紋方蟹各時期頭胸甲長、寬關係

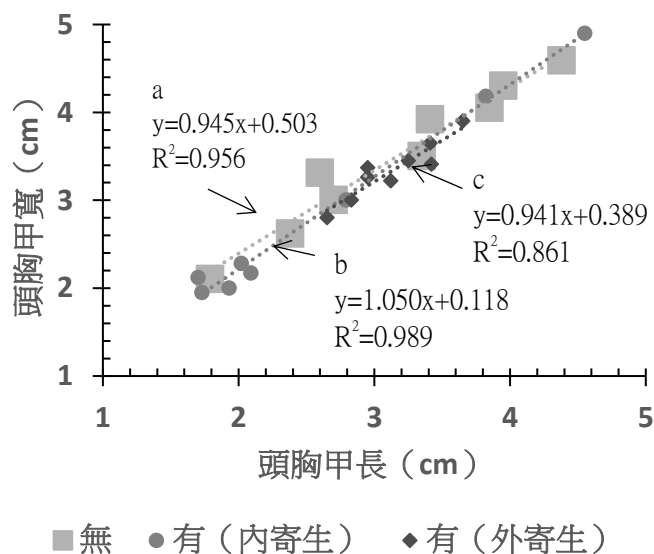


圖 4-4、雄性白紋方蟹寄生各時期頭胸甲長、寬相關性散布圖。雄性無寄生 (正方形, a)、雄性內寄生時期 (圓形, b)、雄性外寄生時期 (菱形, c)。樣本數 (隻): 無寄生 9、內寄生 8、外寄生 9。

共變數分析結果：

1. 符合組內迴歸係數同質性：交互作用未達顯著水準 ($p=0.4291>.05$)、共變項達顯著水準 ($p=<.001$)。
2. 通過變異數同質性考驗：組內變異數未具顯著差異 ($p=0.661>.05$)。
3. 排除共變項後，三者平均數分別為 3.303、3.219、3.175。結果顯示甲長、寬均與寄生時期無相關性 ($p=0.134>.05$)，但甲長、寬呈正相關 (如圖 4-4 R^2 值)。

(二) 雄性白紋方蟹各時期對於腹節雌性化的影響

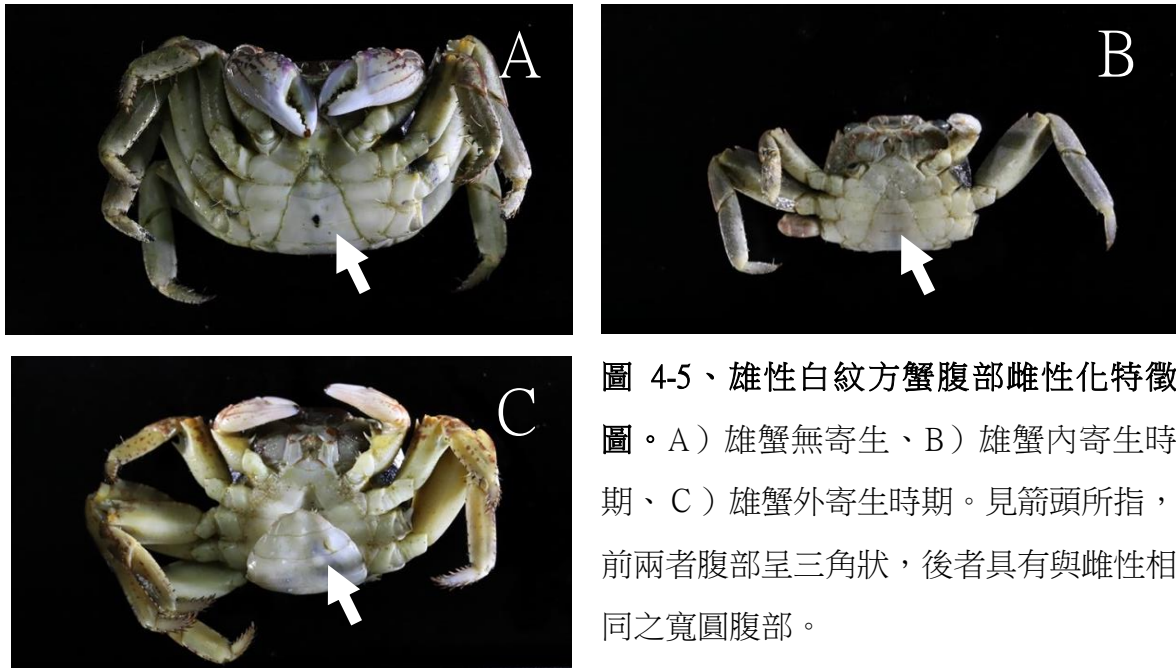


圖 4-5、雄性白紋方蟹腹部雌性化特徵圖。A) 雄蟹無寄生、B) 雄蟹內寄生時期、C) 雄蟹外寄生時期。見箭頭所指，前兩者腹部呈三角狀，後者具有與雌性相同之寬圓腹部。

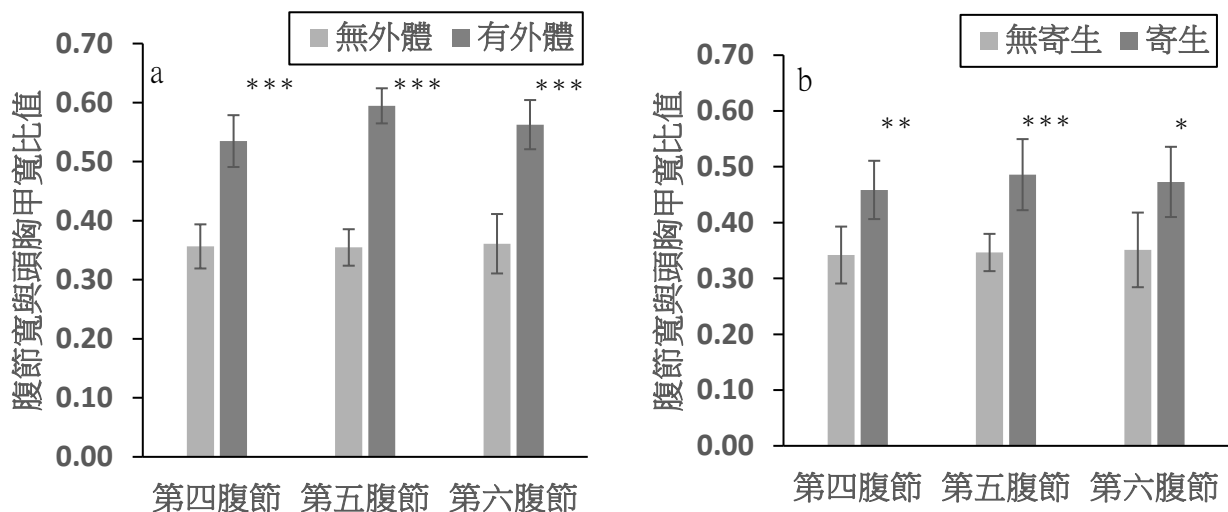


圖 4-6、雄性白紋方蟹腹節比於各受寄生時期比較。a) 以外體區分；b) 以內體區分有無寄生。*, **, ***表示差異水準 $\alpha = 0.05, 0.01, 0.001$

1. 有無外體對腹節雌性化的影響（圖 4-6-a）

為探討有無外體是否為影響腹節雌性化因素，進行無外體、有外體樣本腹節比比較。假設顯著水準 $\alpha = .05$ ，統計量如下。

雄性無外體、有外體之第四腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.36 ± 0.04 、 0.53 ± 0.04 ，採用變異數相等 ($p = 0.419 > .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p < .001$)。

雄性無外體、有外體之第五腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.35 ± 0.03 、 0.59 ± 0.03 ，採用變異數相等 ($p = 0.291 > .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p < .001$)。

雄性無外體、有外體之第六腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.36 ± 0.05 、 0.56 ± 0.04 ，採用變異數不相等 ($p = 0.018 < .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p < .001$)。

依據第四、第五、第六腹節之結果，皆顯示有無外體對於雄性腹節寬具有影響。

2. 有無寄生對腹節雌性化的影響（圖 4-6-b）

此為利用扁平多囊蟹奴 18s rRNA 專一性引子之方法區分有無寄生之結果。為探討有無寄生是否為影響腹節雌性化因素，進行加入內寄生時期後非寄主、寄主（含內寄生）腹節比比較。假設顯著水準 $\alpha = .05$ ，統計量如下。

雄性非寄主、寄主之第四腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.34 ± 0.05 、 0.46 ± 0.05 。採用變異數相等 ($p = 0.339 > .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p = 0.01$)。

雄性非寄主、寄主之第五腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.35 ± 0.03 、 0.49 ± 0.06 ，採用變異數不相等 ($p = 0.01 < .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p = 0.001$)。

雄性非寄主、寄主之第六腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.35 ± 0.07 、 0.47 ± 0.06 ，採用變異數相等 ($p = 0.487 > .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p = 0.023 < .05$)。

依據第四、第五、第六腹節之結果，皆顯示有無寄生對於雄性腹節寬具有影響。

比較前述以有無外體和有無寄生區分的結果，若以有無寄生作為區別，雌性化特徵較原先以有無外體分類之結果不顯著，顯示內寄生樣本腹節較接近無寄生型態。

為驗證上述推論，將內寄生時期獨立出來，分別進行內、外寄生腹節差異性統計，以及無、內寄生腹節差異性統計。假設顯著水準 $\alpha = .05$ ，統計量如下。

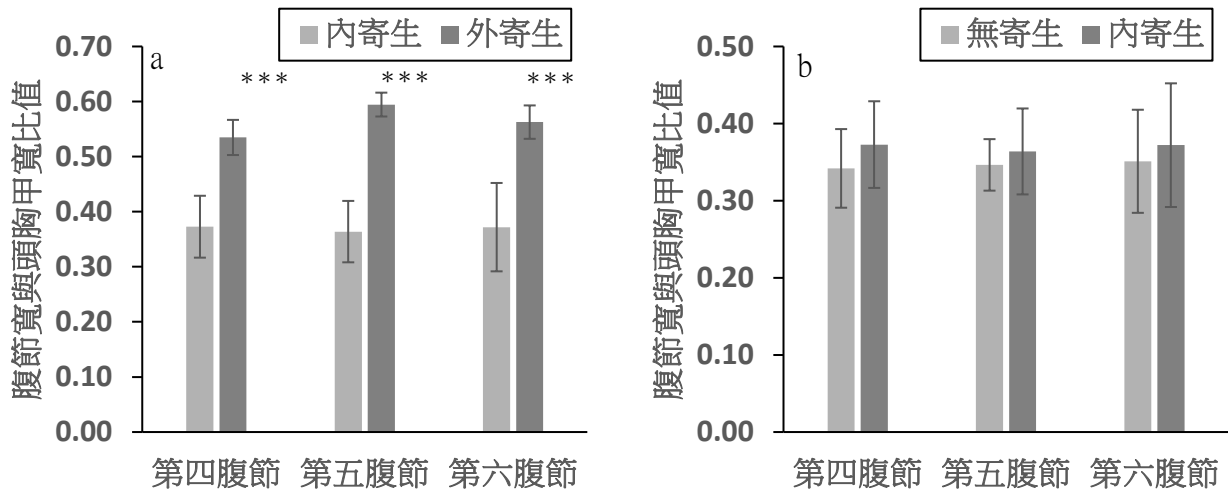


圖 4-7、雄性白紋方蟹腹節比於各受寄生時期比較。a) 內寄生、外寄生時期比較、a) 無寄生、外寄生時期比較。*, **, ***表示差異水準 $\alpha = 0.05, 0.01, 0.001$

3. 比較內、外寄生時期對腹節雌性化的影響 (圖 4-7-a)

雄性內寄生、外寄生時期寄主之第四腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.37 ± 0.06 、 0.53 ± 0.03 ，採用變異數相等 ($p = 0.446 > .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p < .001$)。

雄性內寄生、外寄生時期寄主之第五腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.36 ± 0.06 、 0.59 ± 0.02 ，採用變異數相等 ($p = 0.104 > .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p < .001$)。

雄性內寄生、外寄生時期寄主之第六腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.37 ± 0.08 、 0.56 ± 0.03 ，採用變異數不相等 ($p = 0.072 < .05$) 之對照檢定，結果具顯著差異 ($p = .001$)。

其結果證實內、外寄生時期腹節寬具有顯著差異，腹節寬與外體有無相關。

4. 比較無、內寄生時期對腹節雌性化的影響 (圖 4-7-b)

雄性無寄生、內寄生時期寄主之第四腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.34 ± 0.05 、 0.37 ± 0.06 ，採用變異數相等 ($p = 0.956 > .05$) 之對照檢定，結果不具顯著差異 ($p = 0.443 > .05$)。

雄性無寄生、內寄生時期寄主之第五腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.35 ± 0.03 、 0.36 ± 0.06 ，採用變異數相等 ($p = 0.170 > .05$) 之對照檢定，結果不具顯著差異 ($p = 0.570 > .05$)。

雄性無寄生、內寄生時期寄主之第六腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.35 ± 0.07 、 0.37 ± 0.08 ，採用變異數相等 ($p = 0.885 > .05$) 之對照檢定，結果不具顯著差異 ($p = 0.676 > .05$)。

其結果證實無、內寄生不具顯著差異，腹節寬與受寄生與否無關。

(三) 其他雌性化現象：雄性樣本具肝胰腺卵黃蛋白原基因表現



如圖 4-8，Lane1 具明顯條帶，為雌性白紋方蟹，其肝胰腺為卵黃蛋白原（vg）合成主要部位，因此為卵黃蛋白原合成用 mRNA 表現之證據。Lane2 為雄性動物，同樣具有明顯條帶、亦具有卵黃蛋白原表現。

圖 4-8、白紋方蟹肝胰腺組織經寄主卵黃蛋白原專一性引子 RT-PCR 電泳膠圖。Lane1、2 為白紋方蟹肝胰腺 RNA 樣本，Lane1 為雌性白紋方蟹、Lane2 為雄性動物。

四、探討雌性白紋方蟹於各寄生時期外觀影響

(一) 雌性白紋方蟹各時期頭胸甲長、寬關係

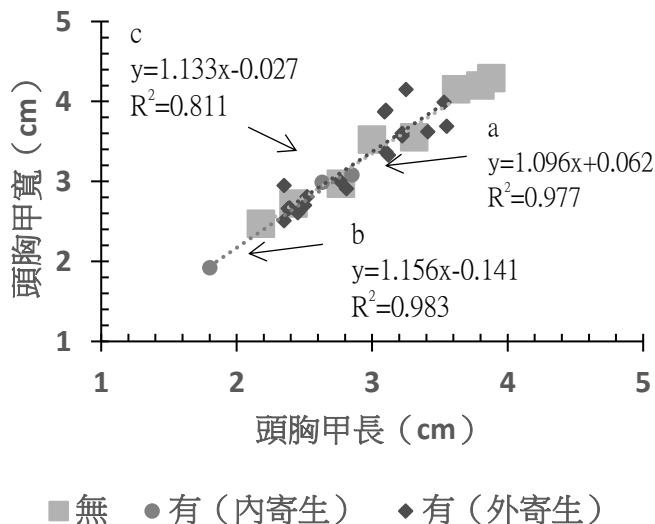


圖 4-9、雌性白紋方蟹寄生各時期頭胸甲長、寬相關性散布圖。雌性非寄主（正方形，a）、雌性內寄生時期（圓形，b）、雌性外寄生時期（菱形，c）。樣本數（隻）：無寄生 8、內寄生 3、外寄生 19。

共變數分析結果：

1. 符合組內迴歸係數同質性：交互作用未達顯著水準（ $p=0.967>.05$ ）、共變項達顯著水準（ $p=<.001$ ）。
2. 通過變異數同質性考驗：組內變異數未具顯著差異（ $p=0.172>.05$ ）。
3. 排除共變項後，三者平均數分別為 3.248、3.207、3.272。結果顯示甲長、寬均與寄生時期無相關性（ $p=0.865>.05$ ），但甲長、寬呈正相關（如圖 4-9 R^2 值）。

(二) 雌性各時期腹節特徵比較

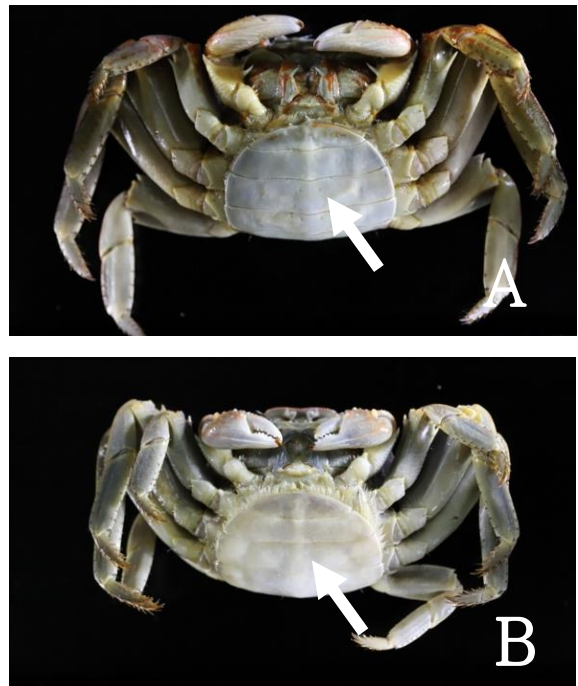
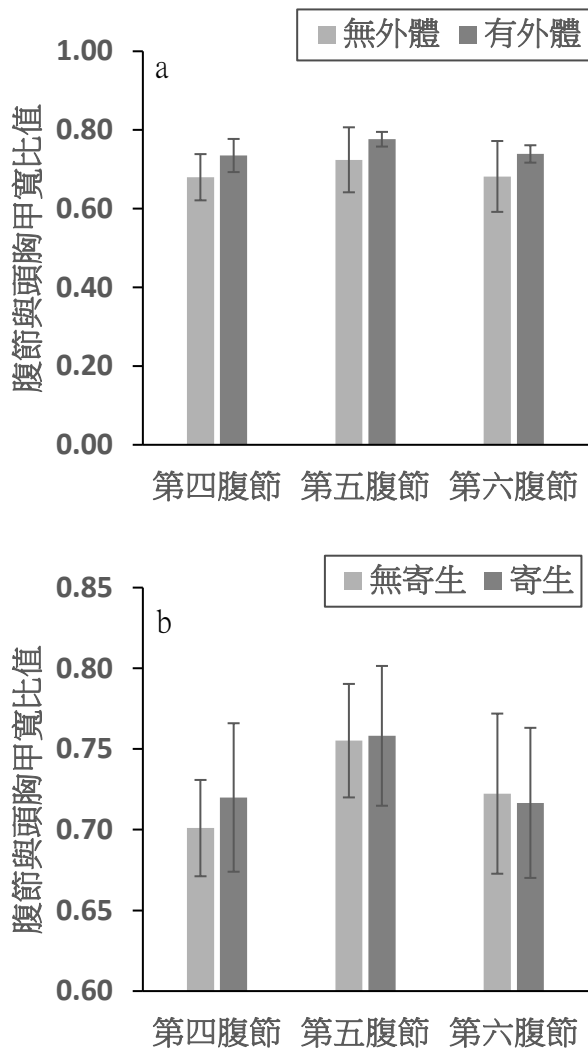


圖 4-10、雌性白紋方蟹腹部雌性化特徵圖。A) 雌蟹無寄生、B) 雌性外寄生時期。兩者腹部皆呈寬圓外觀，並無差異。

圖 4-11、雌性白紋方蟹腹節比於各受寄生時期比較。a) 以外體區分；b) 以內體區分有無寄生。*, **, ***表示差異水準 $\alpha = 0.05, 0.01, 0.001$

1. 有無外體對雌蟹腹節的影響 (圖 4-11-a)

假設顯著水準 $\alpha = 0.05$ ，第四、第五、第六腹節之結果皆為不具顯著差異，顯示雌性腹節寬不受有無外體影響。統計量如下。

雌性無外體、有外體之第四腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.68 ± 0.06 、 0.74 ± 0.04 。採用變異數相等 ($p = 0.705 > 0.05$) 之對照檢定，結果為不具顯著差異 ($p = 0.138 > 0.05$)。

雌性無外體、有外體之第五腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.72 ± 0.08 、 0.78 ± 0.02 ，採用變異數相等 ($p=0.058 > .05$) 之對照檢定，結果為不具顯著差異 ($p=0.161 > .05$)。

雌性無外體、有外體之第六腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.68 ± 0.09 、 0.74 ± 0.02 ，採用變異數相等 ($p=0.036 > .05$) 之對照檢定，結果為不具顯著差異 ($p=0.133 > .05$)。

2. 有無寄生對雌蟹腹節的影響 (圖 4-11-b)

假設顯著水準 $\alpha = .05$ ，第四、第五、第六腹節之結果皆為不具顯著差異，顯示雌性腹節寬不受有無寄生影響。統計量如下。

雌性寄主、非寄主之第四腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.70 ± 0.03 、 0.72 ± 0.05 。採用變異數相等 ($p=0.378 > .05$) 之對照檢定，結果為不具顯著差異 ($p=0.495 > .05$)。

雌性寄主、非寄主之第五腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.76 ± 0.04 、 0.76 ± 0.04 ，採用變異數相等 ($p=0.520 > .05$) 之對照檢定，結果為不具顯著差異 ($p=0.995 > .05$)。

雌性寄主、非寄主之第六腹節寬與頭胸甲寬之比值平均分別為 0.72 ± 0.05 、 0.72 ± 0.05 ，採用變異數相等 ($p=0.770 > .05$) 之對照檢定，結果為不具顯著差異 ($p=0.910 > .05$)。

陸、討論

一、扁平多囊蟹奴寄生於白紋方蟹分子證據

見圖 4-2，由於 18s rRNA 專一性引子在白紋方蟹身上的蟹奴種仍能作用，且在瓊脂電泳時，其大小吻合複製子預期大小 (486 bp)，並經定序確認。因此可以透過此分子證據確認寄生於白紋方蟹上的蟹奴種即為扁平多囊蟹奴。

表 2、研究方法比較

	塗子萱 (2007)	徐珩閔 (2014)	董子安 (2018)、本研究
方法	顯微觀察幼蟲形態	切片觀察外體內腸系膜、儲精巢	扁平多囊蟹奴 18s rRNA 專一性引子
比較	在發現外體的情況下，才能進行寄生與否確認和蟹奴品種，且可能較主觀		以分子證據證明，將不易被肉眼觀察到的內寄生時期納入討論

二、扁平多囊蟹奴於白紋方蟹寄生情形低估

確認寄生於白紋方蟹為扁平多囊蟹奴後，本研究進一步探討扁平多囊蟹奴於白紋方蟹實際寄生情形。見圖 4-3，整體而言，加入內寄生時期後，本研究所得白紋方蟹受扁平多囊蟹奴總寄生率為 69%，較單純考慮外寄生時期上升 20%。文獻指出扁平多囊蟹奴寄生比率受風浪、地形（水域開放程度）、季節影響（Liu & Lutzen, 2000；塗子萱，2007）；但因本研究樣本數較少、各地樣本數量差異過大，且無法確認各地環境因子，故不針對上述因素討論。

在不考慮各地環境因子差異下，Liu 與 Lutzen (2000) 所得總寄生率為 39.2%，其所利用的依據為有無外體。比較本研究所得 69%，可證實單以肉眼判斷是否有受到寄生與實際情形有所出入，實際受寄生比率大於肉眼可見外寄生比率。

根據結果可知白紋方蟹實際受寄生樣本數占比高。扁平多囊蟹奴已知寄主種類有白紋方蟹、中型方蟹 *G. intermedius*、長足方蟹 *G. logitarsis*、細紋方蟹 *G. tenuicrustatus*、方形大額蟹及平分大額蟹 *M. messor*，其中又以白紋方蟹為主，Liu 與 Lutzen (2000) 指出因其棲地較其他種與水域接觸時間較長，可能較容易受寄生。本研究則認為，除此因之外，白紋方蟹棲地因近年來為預防海岸線倒退，大肆放置消波塊而大幅增加，且白紋方蟹不為經濟物種、人為捕捉較少，又目前扁平多囊蟹奴僅知於台灣，因此寄生於白紋方蟹也有助於扁平多囊蟹奴族群穩定性。

三、雌性寄主發展出外體比例高於雄性寄主

再來，分別就雌、雄蟹討論。見圖 4-3，雄蟹內寄生佔雄蟹整體比率為 30%；雌蟹內寄生佔雌蟹整體比率僅 13%。比較僅考慮外寄生、加入內寄生時期後寄生率，雄蟹實際受寄生率明顯增加、雌蟹受寄生率則較無明顯變化。見表 1，比較單以有無外體區分、及加入內寄生時期後以有無寄生區分之寄主選擇偏好性，前者顯示其具偏好雌性，後者則無。這些數據顯示，雌性寄主被寄生後，發展出外體的比例高於雄性寄主。

本研究認為，其可解釋為寄生於雌蟹較容易發展出外體，推論如下：外體含有扁平多囊蟹奴卵巢，主要功能為育卵。其育卵過程中，除自行製造所需養份、物質外，也會利用螃蟹產生育卵相關物質。而雌蟹在其生殖過程中同為育卵角色，相較於雄蟹，雌蟹本身已有針對育卵行為產生相關物質及作用機制，能直接使蟹奴外體接受營養和保護，故蟹奴外體較得以順利發展。同時，雌蟹腹部較雄蟹寬且圓，且內部長有附肢使蟹卵易於附著，為外體提供了較好的保護和空間。反之雄蟹腹部狹小，故本研究認為扁平多囊蟹奴進入寄主體內後，需先

經歷一段較長的內寄生時期，使雄蟹雌性化，以利於外體發展，未來也希望能設計實驗證實此推測。

另外，本研究並未發現外體與抱卵同時發生，僅有一樣本抱卵與內寄生同時發生之情形；Liu 與 Lutzen (2000)、塗子萱 (2007) 則皆僅發現兩、三個外體與抱卵同時發生之情形。以前述寄生於雌蟹較容易發展出外體解釋，可視為外體與育卵機制相同，若是同時發生，可能會造成外體所需育卵相關物質分配不均，不利於扁平多囊蟹奴族群發展，因此僅有少數情況發生。因此，這些數據顯示，蟹奴可能分泌化學性物質，抑制寄主卵巢成熟。

四、雄性白紋方蟹於各寄生時期腹節雌性化現象

接下來，本研究探討雄性白紋方蟹寄生雌性化現象。見圖 4-4，經檢定後可得知寄生之不同階段，對於甲殼增長速度無影響；且甲殼長、寬呈正相關性，顯示增長速率一致。因此本研究以腹節寬與甲殼寬之比值，進行各時期腹節雌性化關聯探討。

比較有無外體是否為影響腹節雌性化因素，其結果皆顯示有無外體對於第四、第五、第六腹節寬皆具有顯著影響（圖 4-6-a）。加入內寄生時期後，比較有無寄生是否為影響腹節雌性化因素，其結果同樣顯示有無寄生對於第四、第五、第六腹節寬皆具有顯著影響（圖 4-6-b）。然而，比較兩者，後者顯著性下降。此可推論為外體有無與腹節雌性化較為相關，然而受寄生樣本涵蓋外寄生樣本，又外寄生樣本占多數比例，因此仍具顯著差異性。

因此，進一步以內寄生時期，分別與無寄生、外寄生時期進行比較。其結果顯示內、外寄生時期腹節比具顯著差異（圖 4-7-a）；無、內寄生時期腹節比則不具顯著差異（圖 4-7-b），此印證前述以有無外體、寄生區分之結果。顯示相較於有無寄生，外體為腹節雌性化主因，而雄性具寬圓腹節此一特徵明顯顯露於外寄生時期。

比對雌性白紋方蟹於各寄生時期外觀影響，見圖 4-10、圖 4-11，雌蟹無寄生、外寄生之外觀，其皆呈寬圓腹部外觀；就統計結果而言，不論以有無外體區分、或以有無寄生區分，對雌蟹腹部皆無影響。

針對上述，可推論雄性腹節雌性化目的為保護外體，與雌蟹育幼、抱卵行為相似。見圖 1-2 蟹奴之生活史，外體為內體發展成熟後，組織膨大發展而成。由內體組織到顯露出外體此一過程，外體需待螃蟹剛換殼、甲殼尚未硬化時才可寄主自體內突出，因此會經過一次蛻殼。比較內寄生與外寄生時期，內寄生時期尚未經歷蛻殼，仍保持與寄生前相同之甲殼特

徵，如圖 4-5，屬三角狀；蛻殼後，其新殼受到蟹奴作用機制，轉變為具寬圓腹部之外型，因此此一特徵明顯顯露於外寄生時期，與外體出現較相關。

蟹奴於寄主作用機制推測可能與促雄性腺（Androgenic gland）有關。促雄性腺為雄性甲殼類特有內分泌腺，雌性無此腺體。其作用使雄性螃蟹具較大的螯足、三角型腹節外觀，以及腹節生殖肢（styli）。對應前述腹節雌性化特徵，背後機制可能為此腺體受到抑制、萎縮，使分泌下降，導致寄主類似於無此腺體，因而產生與雌性腹節相同之寬圓外觀。然而，據 Liu 與 Lutzen(2000) 所述，未發現生殖肢改變情形，因此其實際作用為何仍有待進一步驗證。



圖 5-2、外體蛻殼樣本圖

另，本研究於實驗中，觀察到一隻具外體蛻殼現象，如圖 5-2。據述，不同蟹奴種對於寄主影響皆不同。如受 *Sacculina carcini* 寄生，其蛻殼即會受抑制，且外體出現與蛻殼較無相關（塗子萱，2007）；受 *Polyascus polygena* 寄生的肉球近方蟹蛻殼次數則不減反增（徐珩閔，2014）。因此針對蛻殼原因、時期、腹節雌性化是否適用於其他蟹奴種仍待商討。

五、其他雌性化現象：雄性樣本具肝胰腺卵黃蛋白原基因表現

卵黃蛋白（vn）為卵生脊椎、無脊椎動物卵黃的主要成分，是胚胎和幼體早期發育主要營養來源；而卵黃蛋白原（vg）為其前驅物。一般而言，卵黃蛋白僅存於雌性動物中，因此當雄性動物檢測出，表示其出現與雌性相同之作用。

本研究針對雄性樣本進行卵黃蛋白相關 mRNA 表現檢測，見圖 4-8，結果除雌性動物外，雄性動物也同樣具有此 mRNA 作用，顯示其體內出現與雌性相同之分子機制，可視為雌性化另一證據。而本研究目前仍持續累積相關樣本數中。

對於此現象可解釋為受到寄生後，為因應蟹奴發展外體、育卵之目的，除蟹奴本身製造卵黃蛋白供給卵所需營養外，亦會透過寄主體內製造卵黃蛋白提供更多營養，為另一個雌性化現象之一。而蟹奴如何促使雄蟹出現相關作用的機制、時期，仍待進一步研究。

柒、結論與未來應用

本研究自 2020 年 8 月至 2021 年 5 月共進行 17 次採樣，主要採自竹苗地區。其中具蟹奴外體有白紋方蟹一種，共 59 隻，分別為雄蟹 27 隻、雌蟹 32 隻。本研究第一個以白紋方蟹為寄主、利用扁平多囊蟹奴 18s rRNA 進行內寄生判定，得到以下結果。

- 一、首次以分子證據證明白紋方蟹受扁平多囊蟹奴此種類寄生。
- 二、修正先前以有無外體判定扁平多囊蟹奴於白紋方蟹寄生率、雌雄性比偏誤。過去研究皆未考量根頭目具內寄生生活史、低估其寄生率。
- 三、本研究分子證據顯示實際總寄生率為 69%，高於外寄生率；內寄生率則為 20%。寄主雌雄性比為 1:0.7，不具性別偏好性。
- 四、除無寄生、外寄生時期外，本研究加入內寄生時期，探討各寄生階段腹節雌性化現象。
 - (一) 頭胸甲長、寬增長與受寄生與否無顯著相關性。
 - (二) 雄蟹腹部雌性化現象與是否有外體有關、與內寄生時期較無相關。
- 五、本研究觀察得具卵黃蛋白原 mRNA 表現之雄蟹，為另一寄生雌性化現象，並仍持續累積樣本數中，希望探討外體卵巢發育時寄主肝胰腺卵黃蛋白原的表現量改變。
- 六、本研究採得雌蟹內寄生樣本極少，希望進一步探討其背後生物意義。
- 七、本研究仍持續觀察其他雌性化相關表徵，希望增加對於寄生雌性化影響之描述與證據。
- 八、本研究推論多囊扁平蟹奴分泌雌性化因子以雌性化寄主。若能純化，該雌性化因子將具有應用上的價值。

捌、參考資料及其他

一、中文文獻

- (一) 徐珩閔 (2014)。臺灣北部扁平多囊蟹奴寄生於方形大額蟹之狀態與外體發育階段研究 (碩士論文)。取自臺灣博碩士論文知識加值系統。
- (二) 塗子萱 (2007)。扁蟹奴(*Sacculinaplana*)幼蟲發育及白紋方蟹(*Grapsus albolineatus*)遭寄生情形 (碩士論文)。取自華藝線上圖書館。(DOI 10.6342/NTU.2007.01559)
- (三) 董子安 (2018)。以轉錄組分析探討方形大額蟹宿主對扁蟹奴寄生之反應之研究 (未出版之碩士論文)。國立彰化師範大學，彰化市。

二、英文文獻

- (一) Hoeg, J. (1995). The biology and life cycle of the Rhizocephala (Cirripedia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75(3), 517-550.
- (二) Hoeg, J. T., Rees, D. J., Jensen, P. C., & Glenner, H. (2019). Unravelling the evolutions of the rhizocephala: a case study for molecular-based phylogeny in the parasitic Crustacea. In *Parasitic Crustacea*. (pp. 387-419). Springer: Cham.
- (三) Liu, H., & Lutzen, J. (2000). Asexual reproduction in *Sacculina plana* (Cirripedia: Rhizocephala), a parasite of six species of grapsid crabs from Taiwan [special section]. *Zoologischer Anzeiger*, 239(3), 277-287.
- (四) Waiho, K., Glenner, H., Miroljubov, A., Noever, C., Hassan, M., Ikhwanuddin, M., & Fazhan, H. (2020). Rhizocephalans and their potential impact on crustacean aquaculture. *Aquaculture*, 531, 735-876. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735876

附錄

一、採集總表

表 3、2020 年 8 月至 2021 年 5 月本研究各月別採集十足目種類與數量（數字為採集數量）

學名	中文俗名	2020 年				2021 年				總數	寄生率
		8 月	9 月	10 月	11 月	2 月	3 月	4 月	5 月		
<i>Charybdis feriatus</i>	鏽斑蟳	4	1	0	0	0	0	0	0	5	0%
<i>Gaetice depressus</i>	平背蜞	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0%
<i>Grapsus albolineatus</i>	白紋方蟹	11	22	2	9	3	24	0	9	80	69%
<i>Hemigrapsus penicillatus</i>	絨毛近方蟹	3	4	0	0	0	5	0	0	12	0%
<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	肉球近方蟹	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0%
<i>Ocypode ceratophthalmus</i>	角眼沙蟹	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0%
<i>Ozius rugulosus</i>	皺紋團扇蟹	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0%
<i>Uca arcuata</i>	弧邊招潮蟹	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0%
	其他待鑑定									6	0%

二、扁平多囊蟹奴幼蟲觀察

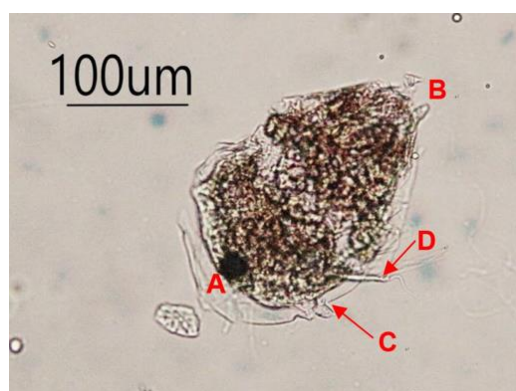


圖 6-1、扁平多囊蟹奴幼蟲永久封片標本。本研究建立標本，參考塗子萱（2007）對幼蟲發育之研究，鑑定其為無節幼蟲，構造如圖。A，無節幼蟲眼點（naupliar eye）；B，尾差（furcal rami）；C，測額角（frontal horns）；D，附肢，推測為第二觸角（antenna）。

已知扁平多囊蟹奴無節幼蟲經四個齡期，耗時約 50~57 小時後將發育成為腺介幼蟲，並藉由幼蟲體長來分辨性別和所屬齡期（塗子萱，2007）。經測量，推測本幼蟲標本體長約 224.2 μm ，屬於雌性幼蟲於第一齡期的體長，因此推測幼蟲標本屬雌性（Female），第一齡

期 (Stage I)。觀察其構造，其眼點佔據部分比例，主要功能為感知光線 (塗子萱，2007)，因此趨光性明顯，與觀察線點相同。

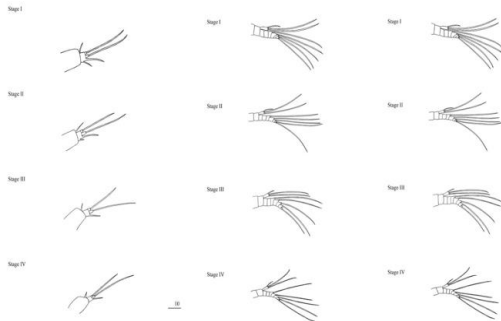


圖 6-2、扁平多囊蟹奴無節幼蟲附肢的描繪 (塗子萱，2007)

扁平多囊蟹奴幼蟲共有三對附肢，分別為第一觸角 (antennule)、第二觸角 (antenna)、大顎 (mandible)。根據其相對位置與附肢的外表型態，我們推測D點所指應為第一附肢。如圖 5-6，可發現 Stage I 的第一觸角分岔數目明顯少於第二觸角和大顎。我們認為其附肢符合此項特徵且比照位置，與扁平多囊幼蟲身上位置相近，故推測其應為第一觸角。

【評語】 052007

1. 此作品的研究目的清楚且聚焦，邏輯亦合理，研究內容具鄉土及教材之相關性，其結果對相關研究領域具有部分貢獻。
2. 過去已有類似的相關研究，雖研究策略及結果有部分的改善，但創意有限，沒有預期外的發現，其新穎性略嫌不足。
3. 此研究所使用的方法大致合理可行，多數資料的數據分析有使用統計方法及顯著性檢定，以確定不同組別之間是否具有顯著性差異。然而 PCR 的實驗，未提及是否具三重複或僅一次性實驗。雄性樣本具肝胰腺卵黃蛋白原基因表現的研究，是此作品的一個亮點，但樣本數過少且沒有定量控制組，無法排除是否受其他因子干擾所導致。此外，樣本分為雌雄性及有無體外寄生等類別，整體樣本數較為不足，實驗設計上需多加注意。
4. 簡報資料編排合理，圖表內容大致清晰，但內容較不豐富。

作品簡報



胸奴纏余，難辨雌雄

以聚合酶連鎖反應檢驗蟹奴寄生率及雄蟹雌化的關聯

蟹奴：寄生雌性化



A：受蟹奴寄生螃蟹外觀

♂：雄蟹外觀、♀：雌蟹外觀



寄生階段



研究目的

- 一、探討扁平多囊蟹奴是否為寄生於白紋方蟹蟹奴種
- 二、探討白紋方蟹實際受扁平多囊蟹奴寄生盛行率
- 三、探討各寄生階段雄性白紋方蟹寄生雌性化現象

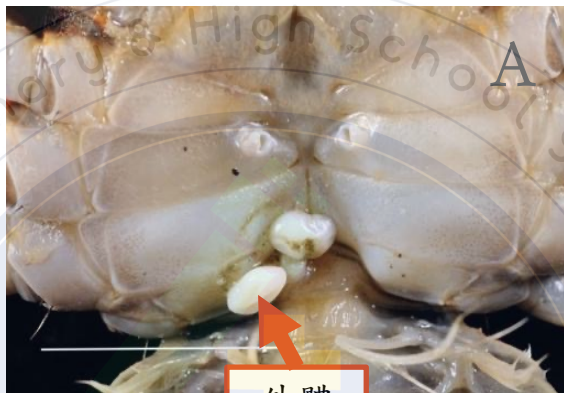


A：白紋方蟹外觀圖

B：扁平多囊蟹奴外體圖

寄生階段區辨

有外體



外體



黑色脫落痕跡

無外體

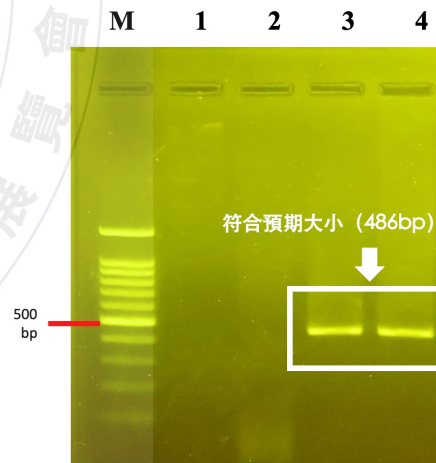
內寄生

無寄生

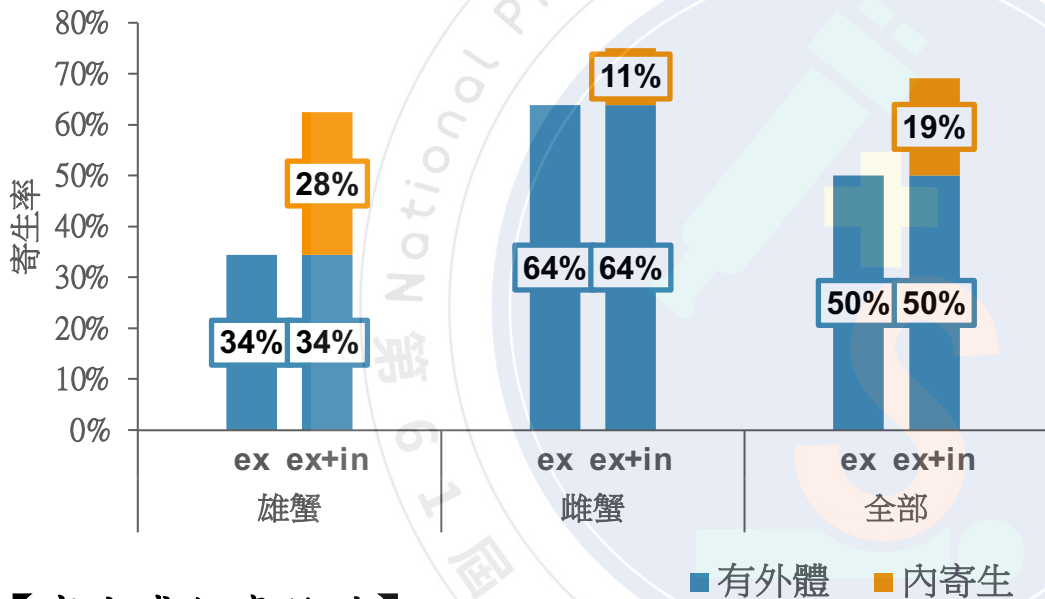


胸神經節萃取DNA

扁平多囊蟹奴
18s rRNA專一性引子



結果一、扁平多囊蟹奴於白紋方蟹寄生情形低估



【寄生盛行率統計】

ex, 僅以外體區分之寄生率; ex+in, 加入內寄生時期後寄生率。

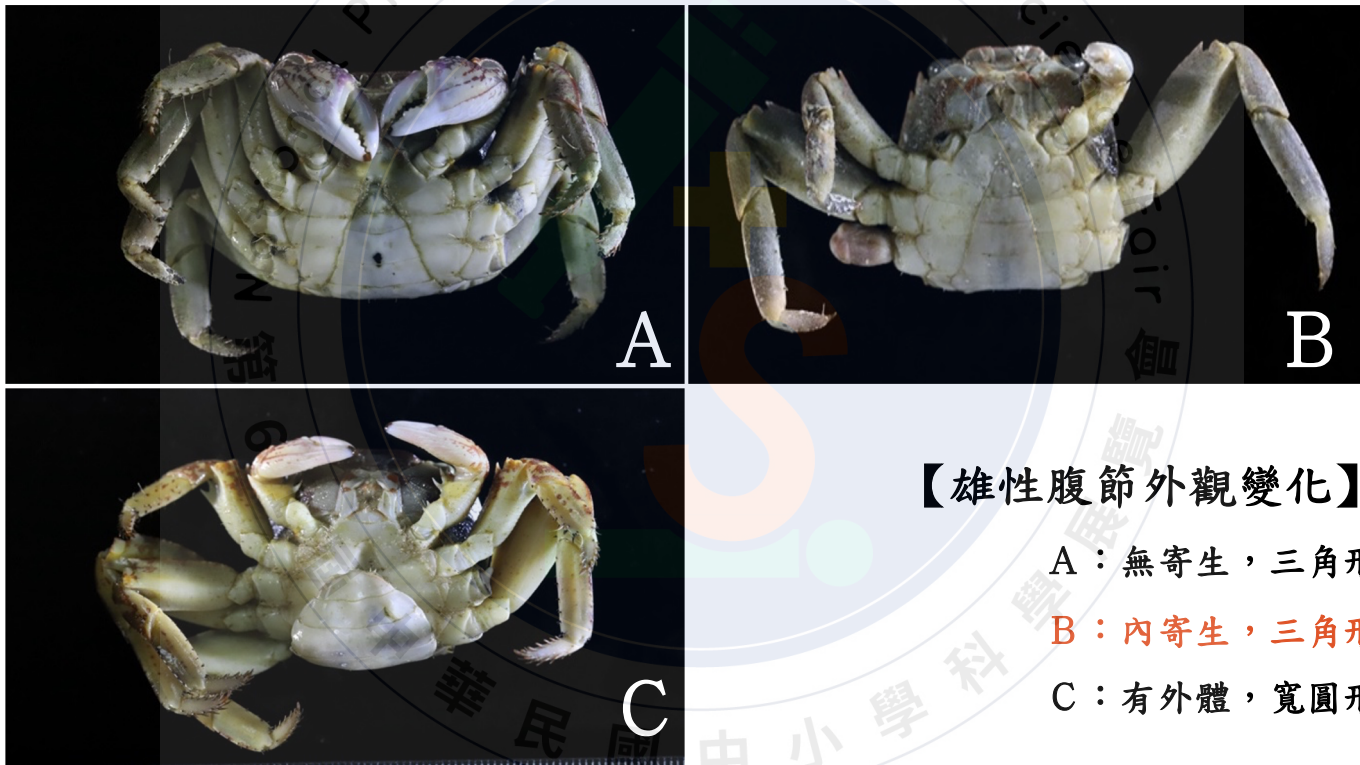
得總寄生率為69%, 內寄生率為19%

【寄主性別偏好性統計】

蟹奴對於寄主性別選擇性			
	無寄生	有寄生	總和
雄性	12	20	32
雌性	9	27	36
總和	21	47	68
Actual X ²	1.24 (未達顯著差異)		

單純以有無外體區分			
	無外體	有外體	總和
雄性	21	11	32
雌性	13	23	36
總和	34	34	68
Actual X ²	5.90 (達顯著, 偏好雌性)		

結果二、腹節雌性化與外體出現有關



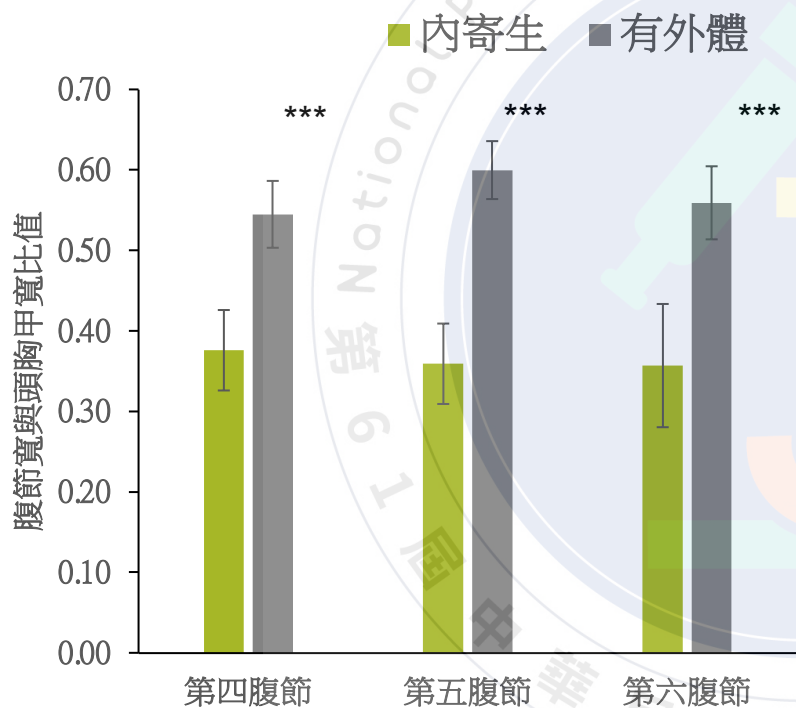
【雄性腹節外觀變化】

A：無寄生，三角形

B：內寄生，三角形

C：有外體，寬圓形

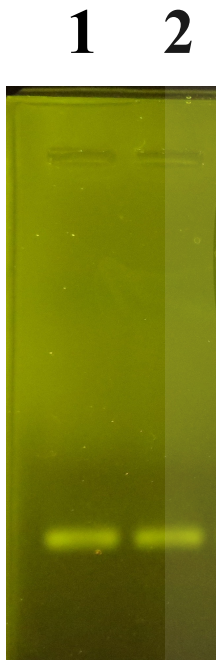
結果二、腹節雌性化與外體出現有關



【雄性白紋方蟹腹節比於各受寄生階段比較】

外體為影響腹節雌性化主因，
非有無受寄生

結果三、雄蟹表現卵黃蛋白原基因



【白紋方蟹肝胰腺組織經寄主卵黃蛋白原專一性
引子 RT-PCR電泳膠圖】

Lane1、2為白紋方蟹肝胰腺cDNA樣本，Lane1為雌性白紋方蟹、
Lane2為雄性。

討論

1. 外體為腹節雌性化主因，目的類似雌蟹抱卵行為

- 1) 雄性內寄生佔雄性整體28%
- 2) 雌性內寄生僅佔雌性整體11%
- 3) 外體發展偏好雌性

雌蟹體較利於外體發展：
具有抱卵行為產生相關的物質
及作用機制、腹部較雄蟹寬
且圓，且腹部長有附肢

2. 另一雌性化現象：雄蟹卵黃蛋白原表現

結論

- 一、首次以分子證據證明其受扁平多囊蟹奴此種類寄生。
- 二、修正先前白紋方蟹受扁平多囊蟹奴之寄生率偏誤。
總寄生率加入內寄生樣本後為69%，高於具外體比率
加入內寄生率19%
- 三、外體為影響腹節雌性化主因。
- 四、初步觀察得一具卵黃蛋白原mRNA表現之雄蟹。

重要參考文獻

- (一) 徐珩閔 (2014) 。臺灣北部扁平多囊蟹奴寄生於方形大額蟹之狀態與外體發育階段研究 (碩士論文) 。取自臺灣博碩士論文知識加值系統。
- (二) 塗子萱 (2007) 。扁蟹奴(*Sacculinaplana*)幼蟲發育及白紋方蟹(*Grapsus albolineatus*)遭寄生情形 (碩士論文) 。取自華藝線上圖書館。(DOI 10.6342/NTU.2007.01559)
- (三) 董子安 (2018) 。以轉錄組分析探討方形大額蟹宿主對扁蟹奴寄生之反應之研究 (未出版之碩士論文) 。國立彰化師範大學，彰化市。
- (四) Liu, H., & Lutzen, J. (2000). Asexual reproduction in *Sacculina plana* (Cirripedia: Rhizocephala), a parasite of six species of grapsid crabs from Taiwan [special section]. *Zoologischer Anzeiger*, 239(3), 277-287.