

2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050021

參展科別 動物學

作品名稱 The critical role of the first discovered detached pharynges during the successful predation of Penghu Oyster Leech

得獎獎項 大會獎：二等獎
出國正選代表

就讀學校 國立科學工業園區實驗高級中學

指導教師 揭維邦

作者姓名 鄧敬蓉、蘇映蓉、葉祉佑

關鍵詞 marine flatworms、
Stylochus (Imogine) orientalis、
novel behavior

作者簡介



我是鄧敬蓉(左一)，就讀竹科實中，高二時在因緣際會下投入科展的行列，雖然過程曲折，但是所幸有隊友們的互相幫助，老師的指導、學長姐的幫忙與父母的支持，我們才得以一路過關斬將。這段研究過程充滿驚奇，並且為我帶來滿滿的收穫！

我是葉祉佑(左二)，就讀竹科實中三年級數理資優班，高二時和同學們一起投入專題研究，透過進行實驗來解決澎湖牡蠣被蚵蛭捕食的危機。過程中我們曾經徬徨迷惑，但所幸在老師、同學的相互切磋鼓勵下突破困境，過關斬將，並一路從分區晉升到全國，再飛往國際!!

我是蘇映蓉(右二)，目前就讀國立竹科實中，高二時很幸運能夠加入生物專題的行列，也因此能夠一窺生物世界的奧秘並經歷了許多自己未曾想過會經歷的奇幻旅程。一路上受到許多人的幫忙，更因此深深愛上了這個領域，要感謝的人太多了，不如就謝天吧！

摘要

澎湖牡蠣養殖受扁形動物危害嚴重但缺乏相關研究。本研究首次採集活體澎湖蚵蛭 *Stylochus (Imogine) orientalis splendida* Bock, 1913 進行捕食行為研究。觀察澎湖蚵蛭捕食過程分為攻擊期、捕食期和消化期，並首次報導攻擊期中發現新型的離體咽。離體咽具負趨光性 ($P < 0.01^{**}$) 能朝向牡蠣殼內暗處移動，使其開閉殼頻率與死亡率增加。離體咽也顯著影響文蛤死亡率 ($P < 0.01^{**}$)，20 條以上離體咽即可導致文蛤死亡率 60% 以上，造成文蛤外套膜萎縮，且與數量呈高度正相關 ($R^2 = 0.964$)，外套膜切片顯示離體咽可導致外套膜肌肉變細且形成許多空洞。經離體咽均質和硫酸銨沉澱法萃取蛋白質後，通過 SDS 蛋白質電泳比較澎湖蚵蛭離體咽、咽、與其他部位的粗萃物，分離出目標蛋白質，以 MALDI-TOF 質譜儀分析分子量約為 10 kDa。證據顯示離體咽是蚵蛭成功捕食牡蠣的重要關鍵，亦是海洋扁蟲從未被報導過的新行為。

Abstract

The oyster farming fields have been endangered by marine flatworms for more than 40 years in Penghu, Taiwan. However, relevant research is lacked. In this study, alive flatworms *Stylochus (Imogine) orientalis splendida* Bock, 1913, were first collected from Penghu for predation behavior investigation. Three stages during predation of Penghu Oyster Leech were observed, including attacking period, predation period and digestive period. The attacking period is first reported by this study, while novel detached pharynges are also first discovered from our video records. The detached pharynges can move toward the dark inside the shell of oyster (negative phototaxis, $P < 0.01^{**}$), by which the frequency of shell opening and closing as well as mortality are both increased. The detached pharynges also significantly affected the death rate of clam ($P < 0.01^{**}$). Addition of 20 detached pharynges can cause the clam mortality more than 60%. The detached pharynges can also cause shrinkage of the clam mantle ($R^2 = 0.964$), and the dissections show evidences that the mantle tissue are damaged and became thinner than control group. By comparing crude extracts collected from the detached pharynges, pharynges, and the other parts in Penghu Oyster Leech by SDS-PAGE, we considered a group of proteins, uniquely existed in detached pharynges and pharynges, to be the target proteins. After protein extraction by homogenization and ammonium sulfate precipitation, the target proteins can be obtained and their molecular weights were further confirmed to be approximately 10 kDa by MALDI-TOF mass spectrometer. Both the target proteins and the crude extract of detached pharynges resulted in increased shell opening range in clams, which was similar to the function of detached pharynges in our previous observation.

壹、前言

研究動機

世界各地都有扁蟲危害牡蠣養殖的案例，其中多以 *Stylochus* 屬的海扁蟲（多歧腸目扁形動物）為主，例如美國佛羅里達州沿岸的牡蠣養殖業遭受嚴重扁蟲危害，當地以“oyster leech”稱之 (Menzel *et al.*, 1966, Littlewood & Marsbe 1990, Newman *et al.*, 1993)。臺灣的牡蠣養殖業亦受扁蟲危害。根據澎湖農漁局統計，澎湖的牡蠣養殖業於 2017 年產值達 1.7 億元，但由於俗稱「蚵蛭」的扁蟲捕食超過半數的牡蠣，較嚴重地區損失甚至高達 90% 以上，因而對牡蠣族群造成嚴重威脅。我們親自造訪澎湖訪問當地養殖戶並查詢文獻資料，發現相關基礎研究十分缺乏，不禁引起我們的好奇：移動緩慢且身軀柔軟的蚵蛭，為何能夠捕食外殼堅硬的牡蠣，並將肉體全部吞食？為了進一步了解蚵蛭與探討其捕食行為機制，我們採集澎湖牡蠣養殖區內的蚵蛭進行捕食行為研究，期望未來能解決蚵蛭所帶來的災情。

研究目的

- 一、分析澎湖蚵蛭的捕食行為。
- 二、比較牡蠣和文蛤被蚵蛭攻擊時的反應。
- 三、提出並驗證假說「離體咽是蚵蛭的捕食構造」。
- 四、探討蚵蛭的離體咽對文蛤外套膜的影響。
- 五、組織切片觀察咽和離體咽。
- 六、探討蚵蛭的離體咽對活體文蛤的影響。
- 七、離體咽成分分析與目標蛋白質活性測試。

貳、研究過程與方法

一、研究動物、設備與器材

(一) 澎湖蚵蛭 *Stylochus (Imogine) orientalis splendida* Bock, 1913

蚵蛭屬於多歧腸目的扁形動物。扁形動物 (Phylum Platyhelminthes) 為動物界中體制較原始低等的生物，身體結構具有三大特徵：無體腔 (Acoelomate)、三胚層 (Triploblastic)，以及兩側對稱 (Bilateral)。多歧腸目腸腔僅一個開口，食物由咽部進入，腸腔具大量分枝(徐&林，1979、李，1990)。

蚵蛭背面多呈紅褐色或棕色，佈滿白色及褐色的小斑點，體緣密佈白色細紋。腹面則為白色，身形橢圓，自由伸縮時呈不規則狀。成蟲大小長 1 至 7 公分，寬 1 至 5 公分。平均厚約為 0.3 至 0.5 公分。蟲體背、腹面特徵請見圖 1 (Bulnes *et al.*, 2005, Gammoudi *et al.*, 2009)。

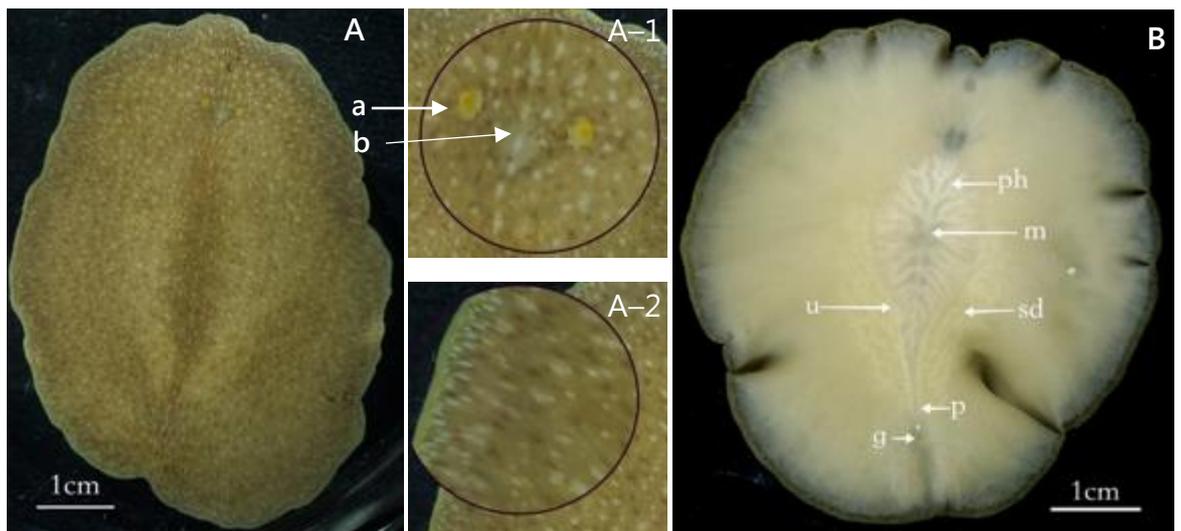


圖 1 A 澎湖蚵蛭背面觀：a 黃色圓錐狀觸角、b 腦；A-1 觸角與腦放大圖；A-2：體表細緣放大圖；
B 澎湖蚵蛭腹面觀：口(m)、咽喉褶(ph)、輸精管(sd)、子宮(u)、陰莖(p)、生殖孔(g)

(二) 標本製作

藥品與器材	用途
培養皿、水彩筆、濾紙	固定蚵蛭
70%酒精棉片、消毒刀片、鑷子	切割組織
10%福馬林	保存標本
90%酒精	保存標本

(三) 組織切片

藥品與器材	用途
酒精、二甲苯、石蠟	製作臘帶
蘇木精-伊紅染色 (H & E 染色)	將細胞各部位進行染色
切片機	切片
加熱板	融化石蠟
水彩筆、1000ml 燒杯、培養皿	收集蚵蛭的離體咽

(四) SDS-PAGE

器材	器材
鑄膠套件 (含電泳玻片及氧化鋁片)	垂直電泳槽 (Hoefer SE-250 平板式垂直電泳槽)
0.75mm 間隔條	10 well 樣本梳
電源供應器	微量針管

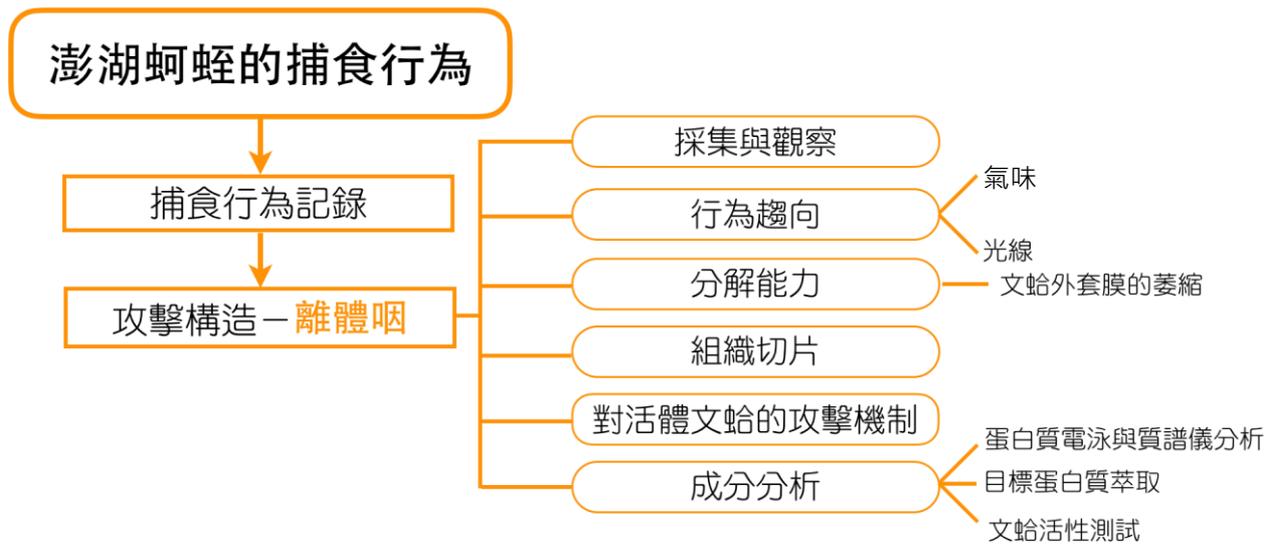
(五) 13% Separating Gel

配方	用量
ddH ₂ O	0.400mL
30% mix of Acrylamide & Bis	2.600mL
3M Tris+0.3%SDS	2.000mL
Glycerol	0.900mL
10% APS	0.060mL
TEMED	0.002mL

(六) 5% Stacking Gel

配方	用量
ddH ₂ O	2.290mL
30% mix of Acrylamide & Bis	0.670mL
3M Tris+0.3%SDS	1.000mL
10% APS	0.040mL
TEMED	0.004mL

二、實驗架構圖



三、研究過程

(一) 蚵蛭的飼養與觀察

從澎湖牡蠣養殖區採集蚵蛭，並建立標本保存。經由長時間錄影方式分析蚵蛭的捕食行為【實驗一】，進而發現蚵蛭攻擊時的特殊構造—離體咽。

(二) 離體咽的研究

1. 離體咽的觀察：觀察離體咽的產生方式、外形、運動與時效性【實驗二】，並探討離體咽的行為趨向，觀察雙殼貝類的肉塊氣味與光線是否會影響其移動方向【實驗三】。
2. 探討離體咽的作用機制：統計離體咽造成文蛤外套膜的萎縮情形，並進行外套膜的組織切片觀察離體咽的攻擊效果【實驗四】。將離體咽放置在活體文蛤上以探討離體咽的作用機制【實驗五】。
3. 離體咽的組織切片：經由切片觀察離體咽的組織型態【實驗六】。
4. 成分分析：分析並萃取離體咽中的蛋白質以測試成分及其功能【實驗七】。

四、研究方法

【實驗一】捕食行為記錄

1. 目的：分析蚵蛭的捕食行為。
2. 器材：飼養缸、海水、JVC 錄影機、檯燈。
3. 步驟：
 - (1) 在實驗缸中注入 2 公升、鹽度 32‰ 的海水。
 - (2) 實驗缸中放 5 隻蚵蛭和 2 隻牡蠣 (文蛤)。
 - (3) 架設四台錄影機於實驗缸四側，並對焦在牡蠣 (文蛤) 殼上，連續錄製 12 小時 (圖 2-3)。
 - (4) 分析錄製的影片，以小時為單位，記錄牡蠣閉殼的時間與頻率與蚵蛭的攻擊行為。



圖 2 攝影機架設 (俯視)



圖 3 攝影機架設 (側面)

【實驗二】離體咽的觀察

1. 目的：觀察蚵蛭的離體咽。
2. 器材：解剖用具、水彩筆、培養皿、鑷子、顯微鏡、JVC 錄影機、載玻片 (圖 4)。
3. 步驟：
 - (1) 將蚵蛭放在裝有海水的培養皿中，以水彩筆輕輕擠壓其腹面，待其自動產生咽。
 - (2) 用鑷子夾取在培養皿裡斷裂的咽條，放置在培養皿中進行錄影觀察。



圖 4 取咽工具

【實驗三】離體咽的選擇實驗

(一) 氣味的選擇實驗：

1. 目的：觀察文蛤肉塊的氣味是否會影響其移動方向。
2. 器材：解剖刀、水彩筆、培養皿、燒杯、檯燈 (紅、白光)、JVC 錄影機。
3. 步驟：
 - (1) 在試管中線處放置離體咽，並在左側 (封閉端) 放置文蛤肉塊。
 - (2) 將試管平放於一裝有 3 L 清水的水盆底部。
 - (3) 用光度計量測水盆的亮度，確保試管受光均勻。

(4) 1 小時後，統計移動至中線左側和右側的離體咽數目。

(5) 重複 15 次。

(二) 光線的選擇實驗

1. 目的：觀察光線亮暗是否影響其移動方向。

2. 器材：培養皿、黑色塑膠袋、檯燈、
光度計、暗室。

3. 步驟：

(1) 將培養皿以黑色塑膠袋包覆並倒入 20 mL
鹽度 32 ‰ 的海水。

(2) 以黑色隔板將培養皿均分成兩區塊，
其中一側予以照光，另一側則保持黑暗，
並記錄兩側的光度 (圖 5)。

(3) 將十五條離體咽置放於隔板下方，並將
容器放置於暗室中 (圖 6)。

(4) 一個小時後統計兩側離體咽的數量。

(5) 重複 15 次。



圖 5 實驗架設

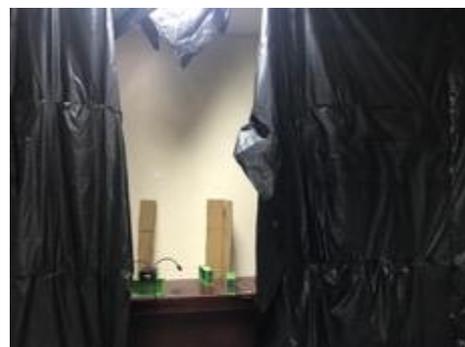


圖 6 暗室

【實驗四】離體咽對文蛤外套膜的影響

(一) 觀察

1. 目的：觀察並分析離體咽造成文蛤外套膜的萎縮情形。

2. 器材：解剖刀、水彩筆、培養皿、燒杯、檯燈 (紅、白光)、JVC 錄影機、
ImageJ 影像分析軟體。

3. 實驗設計：比較 5、10、15、20、30 條離體咽對文蛤外套膜萎縮程度的影響。

4. 步驟：

(1) 以解剖刀、鑷子剖開文蛤並去除殼內肉體。

(2) 取咽，同【實驗二】離體咽的觀察。

(3) 用鑷子夾取在培養皿裡斷裂的咽條，將其刮附在殼內壁的外套膜上。

(4) 將文蛤放入裝有 500 mL 鹽度 32 ‰ 海水的燒杯中進行 12 小時的錄製。

- (5) 利用軟體 ImageJ 計算選取範圍面積和統計像素質，估算實驗前與實驗後外套膜所佔外殼的面積百分比，以計算外套膜的萎縮程度。

(二) 外套膜組織切片

1. 目的：觀察外套膜組織的受損情形。
2. 步驟：（步驟詳見附錄）。

【實驗五】切片觀察

1. 目的：切片染色觀察咽組織與離體咽。
2. 步驟：（步驟詳見附錄）。

【實驗六】離體咽對活體文蛤的攻擊機制

1. 目的：觀察離體咽對文蛤的影響，並統計離體咽數量與文蛤死亡率的關係。
2. 器材：解剖刀、水彩筆、培養皿、燒杯、檯燈（紅、白光）、JVC 錄影機。
3. 實驗設計：

本實驗將文蛤置於以下三種情形觀察：對照組、無咽的蚶蛭組與離體咽組(圖 7)。此外，離體咽組分別統計數量為 0 條、5 條、10 條、20 條、25 條、30 條的離體咽與文蛤死亡率的關係。



圖 7 實驗設計圖：A 對照組；B 無咽的蚶蛭組；C 離體咽組

4. 無咽的蚶蛭準備方法：

將解剖刀對準蚶蛭身體下半部的外側垂直下刀，避免切到中央的咽組織與生殖腺，以免原蟲體化解死亡。並確定無咽肉體離開原蟲體後是否能維持運動。

【實驗七】離體咽蛋白質成分分析及其功能測試

(一) 蛋白質成分分析

1. 目的：運用硫酸銨鹽類使蛋白質聚集沈澱，分離離體咽中可能的有效蛋白質。
2. 器材：研鉢、磨杵、離心管、磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS)、移液器、蛋白質電泳槽、離心濃縮管 (3 kDa cut-off & 30 kDa cut-off)、質譜儀 (MALDI-TOF)。
3. 步驟：
 - (1) 分別收集離體咽、咽組織、及咽組織以外的蚶蛭蟲體組織，以 PBS 沖洗，以 13 krpm 在 4°C 下離心 15 分鐘，收集下層組織。組織分別加入液態氮冷凍，再用磨杵磨碎。再加入 PBS (約 1-2 mL)，以 13 krpm 在 4°C 下離心 15 分鐘，取上清液，即為蛋白質粗萃液。
 - (2) 以 13% Tricine-SDS PAGE 進行蛋白質電泳分析，比較不同組織中蛋白質成分的異同。
 - (3) 取咽組織蛋白質粗萃液，循序加入硫酸銨，以硫酸銨沈澱法分離其中蛋白質，再將目標蛋白質用離心濃縮管濃縮與移除硫酸銨。
 - (4) 取目標蛋白質樣品進行蛋白質電泳分析，以及送測分子量。

(二) 萃取液功能測試

1. 目的：利用活體文蛤檢測離體咽萃取液及目標蛋白質是否具有有與離體咽相似的功能。
2. 器材：注射針筒、文蛤、目標蛋白質萃取液、離體咽萃取液、PBS 緩衝溶液。
3. 實驗設計：對照組 (插針但無注入樣品)、PBS 組、離體咽組、目標蛋白質組。
4. 步驟：
 - (1) 用解剖刀在文蛤殼開一小縫隙，再用針頭注入樣品 1mL 至殼內 (圖 8)。
 - (2) 將文蛤放入 20 mL 鹽度 32 ‰海水的燒杯中錄影 12 小時，觀察其反應。



圖 8 針筒注射

參、研究結果與討論

【實驗一】捕食行為記錄

(一) 蚵蛭的捕食過程

1. 攻擊期

蚵蛭於牡蠣前緣射出白色的枝狀構造，會導致牡蠣殼無法閉緊，進而促使牡蠣外殼顫動 (圖 9 A、B)。攻擊時間約為 4-8 小時。經過一段時間，白色枝狀構造會斷裂進到殼內或是被蚵蛭收回至體內。



圖 9 攻擊期：A 細長枝狀構造；B 枝狀構造簡圖；C 枝狀構造斷裂

2. 捕食期

蚵蛭的攻擊會使牡蠣與文蛤閉殼能力逐漸失去作用，等到牡蠣無法閉殼，蚵蛭會爬入牡蠣殼內將組織包起，形成球狀 (圖 10 A、B)。

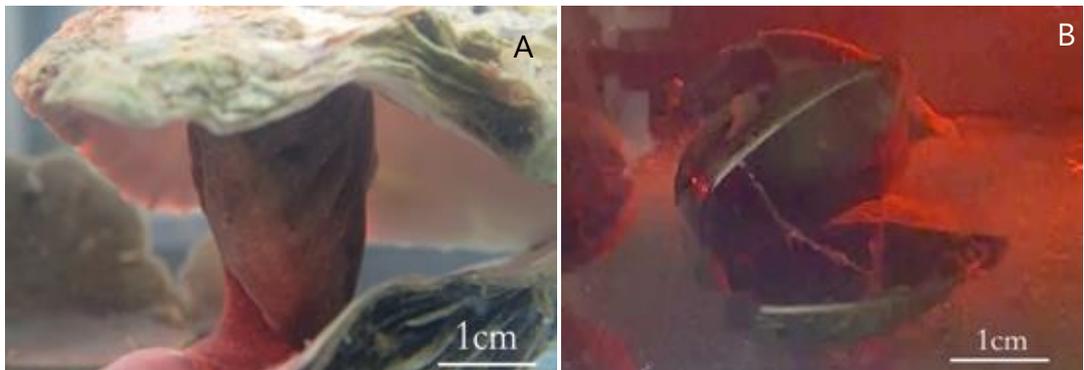


圖 10 捕食期：A 捕食牡蠣；B 捕食文蛤

3. 消化期

蚵蛭完全覆蓋住牡蠣或文蛤組織，並利用腹側的腺體進行消化 (圖 11 A、B)。

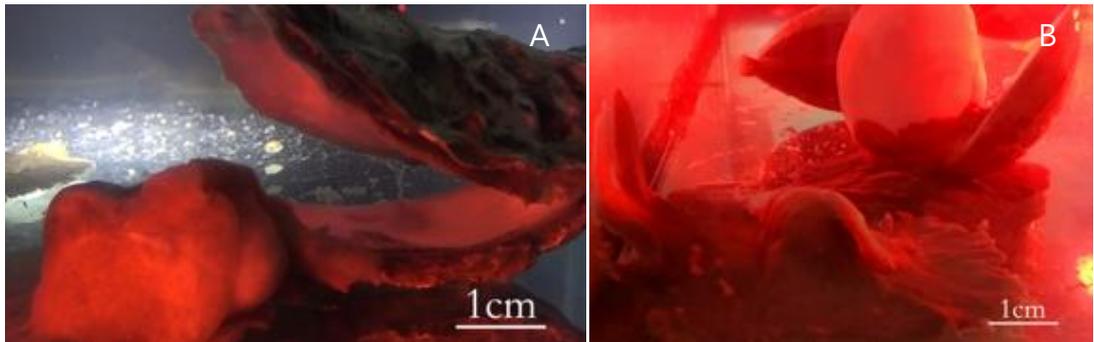


圖 11 消化期：A 消化牡蠣；B 消化文蛤

(二) 被捕食者的反應

1. 牡蠣閉殼頻率統計

經過統計，正常養殖狀況的牡蠣的閉殼頻率約為每小時 0 或 1 次。根據捕食行為的分析，蚵蛭的攻擊時約為 4 至 8 小時，分析牡蠣死亡前四小時內的閉殼頻率。受蚵蛭攻擊的牡蠣，其死亡前四個小時的閉殼頻率會急劇增加，在死亡前兩個小時達最大閉殼頻率，約為對照組的 40 倍。之後牡蠣的閉殼頻率會急速降低 (圖 12)。

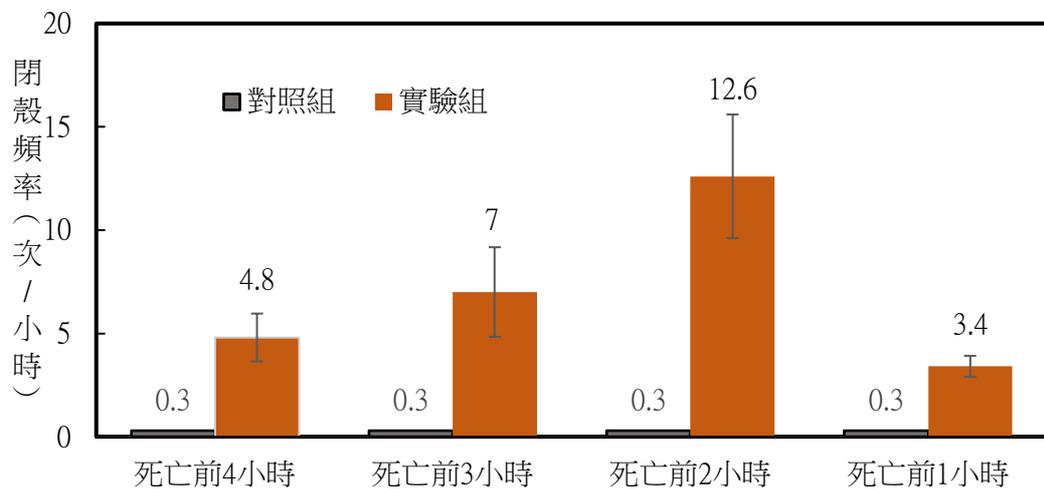


圖 12 牡蠣閉殼頻率統計長條圖(誤差值：平均標準差)

2. 牡蠣與文蛤的反應

受攻擊的牡蠣與文蛤會產生相似的反應，其中又以下列兩項較為顯著：開殼幅度上的變化與產生碎屑物。隨著兩者的閉殼能力逐漸失效，開殼幅度因而增加。此外牡蠣以及文蛤皆會產生外觀類似組織的碎屑物 (表 1)。由於文蛤的外殼較為平整，體型大小較為平均，為了方便觀察與大量統計，在之後的實驗以文蛤取代牡蠣作為觀察對象。

表 1 牡蠣與文蛤的反應

	牡蠣	文蛤
外殼	外殼顫動、開殼幅度增加	開殼幅度增加
產生物	白色碎屑物 (圖 13 A)	白色絲狀物 (圖 13 B)

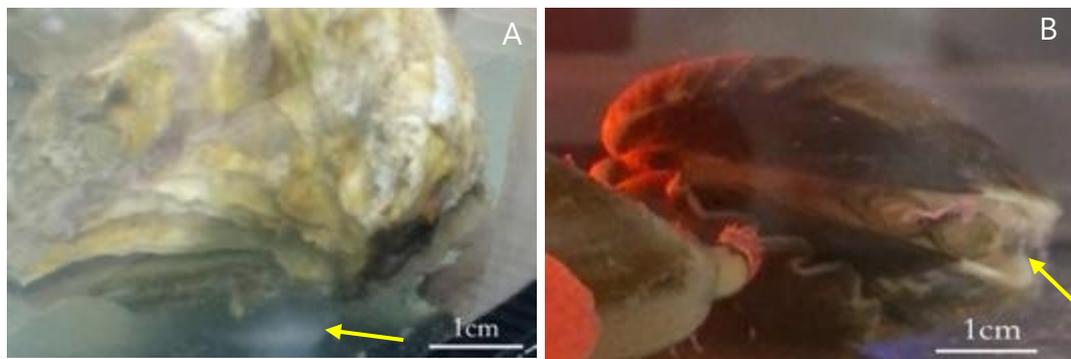


圖 13 產生白色分泌物：A 牡蠣產生白色碎屑物；B 文蛤產生白色絲狀物 (箭頭所示)

(三) 小結：

本研究經長時間縮時攝影觀察蚵蛭的捕食行為，將攝食行為首先分成三期—攻擊期、捕食期、消化期 (圖 9-11)。其中的攻擊期具有重要意義，所佔時間最長，促使牡蠣失去閉殼能力，蚵蛭才得以完成捕食。期間蚵蛭射出白色枝狀構造使牡蠣外殼顫動最終失去閉殼能力，蚵蛭得以爬入殼內進行攻擊，這段捕食行為過程為首次發現與記錄 (圖 9)。

本研究發現蚵蛭在實驗室中對文蛤亦具有相似的捕食過程。野外未曾有過蚵蛭捕食文蛤的行為記錄，蚵蛭捕食文蛤的行為為文獻中的首次發現，此記錄可用於後續測試中以文蛤取代牡蠣用 (表 1、圖 9)。

【實驗二】離體咽的觀察

(一) 產生方式

【實驗一】發現蚵蛭於攻擊期發射出的枝狀構造具有重要功能，在捕食過程得以突破牡蠣與文蛤的雙殼保護機制。經由影片分析，發現蚵蛭的咽與枝狀構造外觀相似且具有斷裂性，因此建立假說「離體咽是蚵蛭的捕食構造」並設計接下實驗以探討其攻擊機制。

蚵蛭腹部具密佈的咽，呈白色樹枝狀排列(李, 1990) (圖 14)。從錄製的影片中發現，蚵蛭腹側的咽會向外輻射白色半透明的分支(圖 15 A)，而且蚵蛭可以自行操控咽的伸縮。咽具有斷裂性，當咽回縮時定義形成的斷裂組織為 **離體咽** (圖 15 B)。此外，我們在實驗室中利用水彩筆擠壓，亦可觀察到蚵蛭的咽從腹側翻出，並收集斷裂的離體咽進行實驗 (圖 16 A、B)。



圖 14 蚵蛭咽分佈圖 (虛線圈)

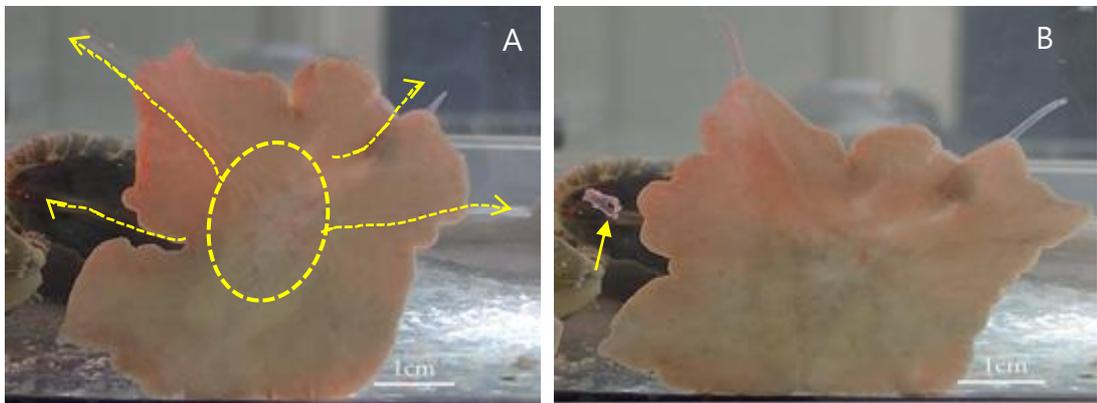


圖 15 影片觀察：A 咽位置圖；B 形成離體咽 (箭頭所示)

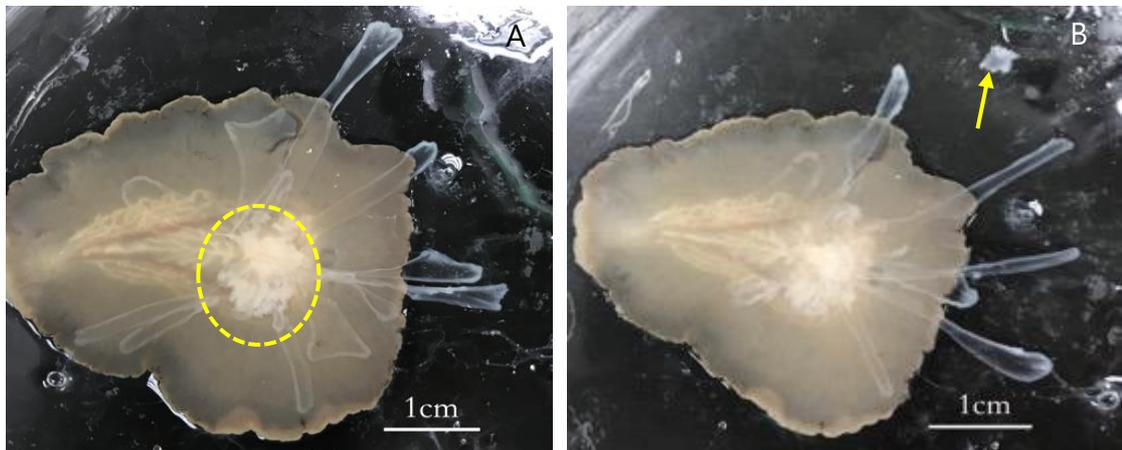


圖 16 實驗室觀察：A 咽位置圖 (虛線圈)；B 形成離體咽 (箭頭所示)

(二) 離體咽的外形與運動

離體咽的外觀呈白色半透明，兩端較膨大，呈薄膜狀，其長度視脫離時而定，並無定值 (圖 17)。離體咽雖然脫離母體，但是可以藉由兩端伸縮來移動 (圖 18)，其運動能力具有時效性，約莫十二小時後會蜷縮成顆粒狀 (圖 19)。具有黏性的離體咽會趨向移動到殼的邊緣。



圖 17 離體咽



圖 18 離體咽可自行運動



圖 19 蜷縮成顆粒狀

(三) 小結：

前人多採用野外觀察的方式紀錄蚵蛭的行為，然而因為觀察時數不足，加上缺少在實驗室長期錄影觀察，因而無法記錄蚵蛭完整的捕食過程。本研究藉由縮時攝影發現長達六小時以上的攻擊過程與離體咽 (圖 15、16)。由於蚵蛭攻擊期射出的枝狀構造可以在斷裂後離開蚵蛭本體，再藉由伸縮運動進到牡蠣殼內進行攻擊，突破雙殼貝類堅硬外殼的保護機制，因而我們定義其為離體咽 (圖 17)。

【實驗三】離體咽的選擇實驗

(一) 氣味的選擇實驗

表 2 牡蠣與文蛤的反應 (n：觀察值 N：樣本數)

區域	n	N	P	χ^2
靠近肉	10	15	未達顯著	1.667
遠離肉	5			

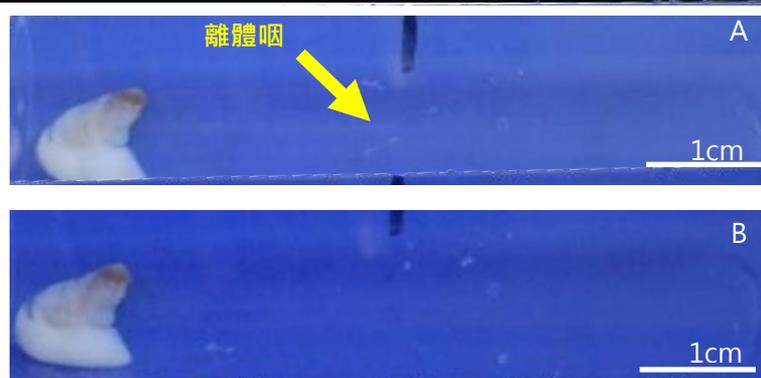


圖 20A 實驗前；B 實驗後

(二) 光線的選擇實驗

表 3 亮暗區平均亮度

區域	光量子通量密度	光度
亮區	0.437 ± 0.011	28.73 ± 0.836
暗區	0.039 ± 0.003	1.53 ± 0.165

表 4 卡方適合度檢定 (n：觀察值 N：樣本數)

區域	n	N	P	χ^2
亮區	1	15	<0.01	11.168
暗區	14			

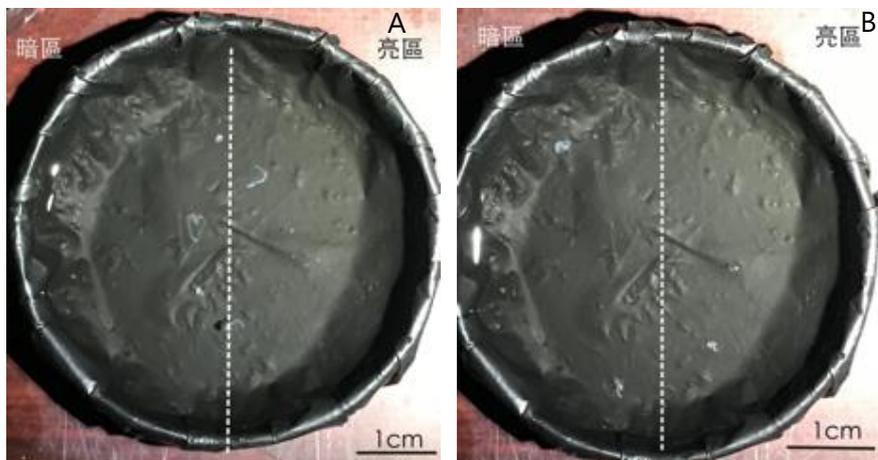


圖 21 A 實驗前；B 實驗後

(三) 小結：

本實驗發現離體咽斷裂後具有獨立自主伸縮移動的能力，其移動方向對文蛤肉體氣味並無顯著偏好 (表 2)，但是受到光線的亮暗程度顯著影響。離體咽具有負趨光性 ($P < 0.01^{**}$) (表 4)，實驗過程發現離體咽會趨向移動到培養皿未照光的一側，並且依附在黑色塑膠袋上方 (圖 21)，因而推測其是利用光線明暗來選擇攻擊方向，藉由負趨光性由牡蠣殼外移動到光線明顯較暗的殼內，對離體咽能成功進入到牡蠣殼內進行攻擊有極大的幫助。

【實驗四】離體咽對文蛤外套膜萎縮的影響

(一) 離體咽對文蛤外套膜的萎縮

放置在外套膜上的離體咽會造成外套膜的萎縮，組織會片狀剝離且向上翻起，另外會產生白色的顆粒狀物 (圖 22 箭頭所示)。

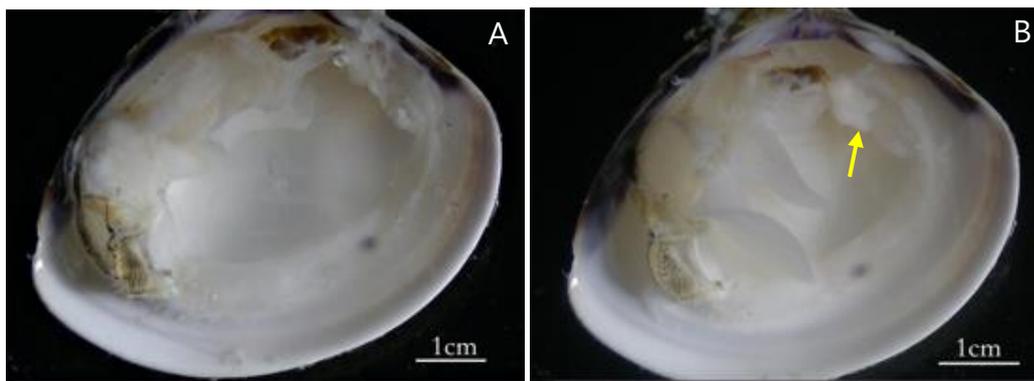


圖 22 A 實驗前；B 實驗後：外套膜萎縮並產生顆粒狀物 (箭頭所示)

分析離體咽數量與萎縮程度的關係，計算實驗前與實驗後外套膜所佔文蛤殼的面積百分比以求得外套膜的萎縮程度(圖 23)。放置 15 條離體咽的外套膜萎縮程度約為對照組的 8 倍。離體咽的數量對外套膜萎縮的程度呈高度線性相關 ($R^2 = 0.964$) (圖 24)。

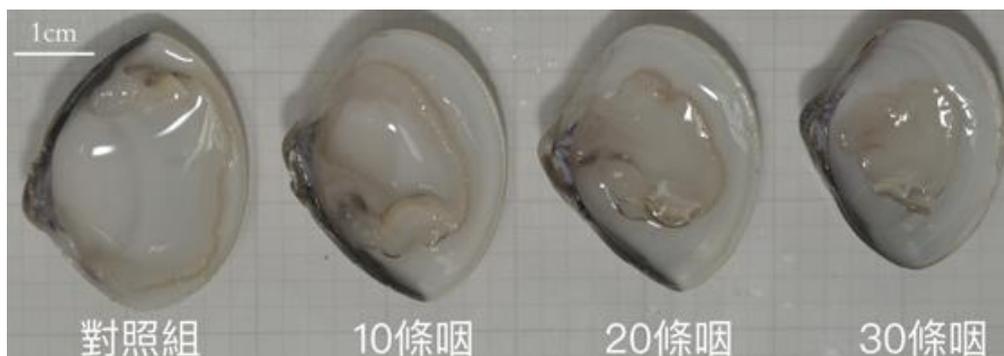


圖 23 離體咽的數量與對文蛤外套膜萎縮程度的比較

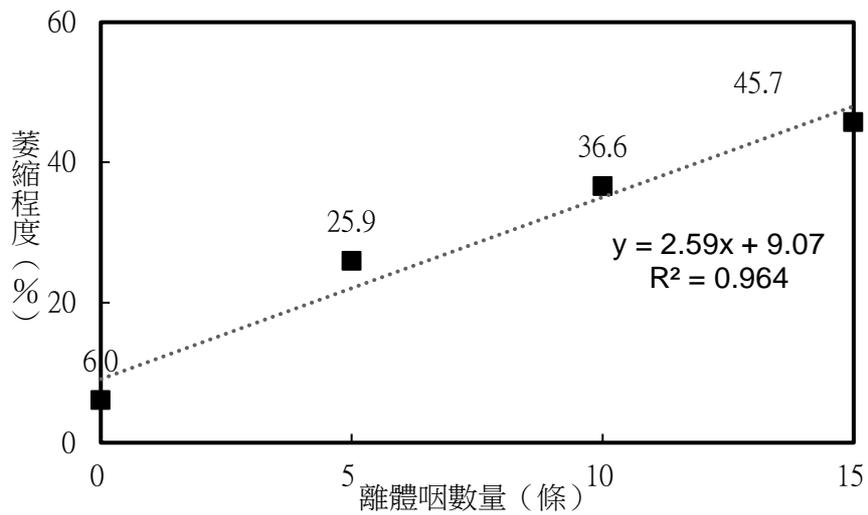


圖 24 文蛤外套膜萎縮程度散佈圖

(二) 組織切片

經由組織切片觀察文蛤外套膜的受損情形，發現離體咽會使外套膜組織變得疏鬆破碎，產生大面積撕裂及許多空洞（表 5）。外套膜的萎縮程度得作為離體咽作用程度的衡量指標（圖 25、26）。

表 5 外套膜組織切片

	肌肉組織分佈	肌肉間孔隙	肌肉纖維
對照組	緻密且交錯排列	肌肉交疊形成的長條孔隙 分布均勻且面積較小	較粗且排列緊密
實驗組	疏鬆且有大面積撕裂	肌肉被分解產生的圓形孔隙 分布不均且面積較大	較細且破碎分離

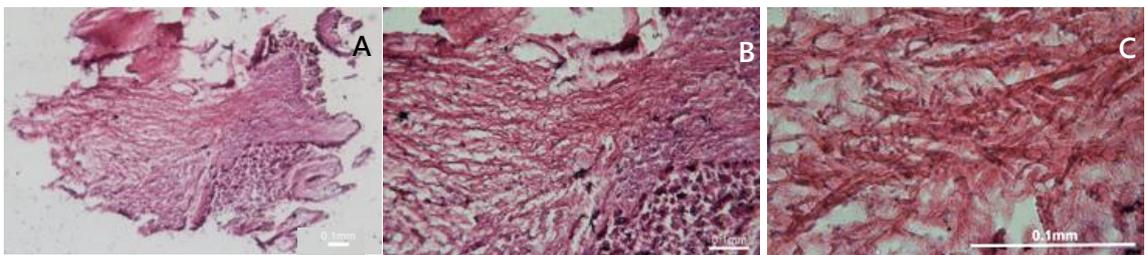


圖 25 對照組：A 40 倍；B 100 倍；C 400 倍

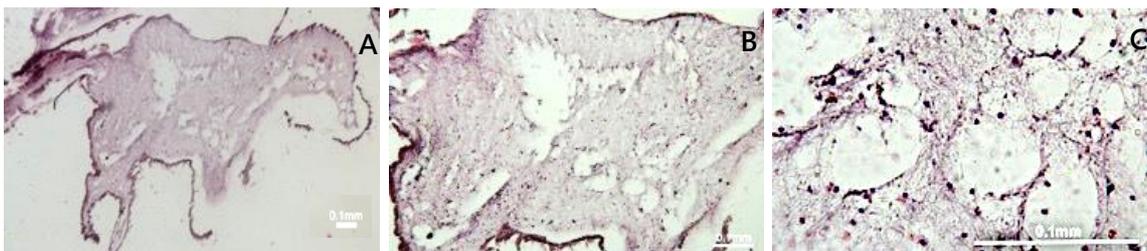


圖 26 實驗組：A 40 倍；B 100 倍；C 400 倍

(三) 小結：

離體咽的數量對文蛤外套膜萎縮程度呈高度正相關 ($R^2=0.964$) (圖 24)，切片觀察萎縮的外套膜具有多處撕裂且肌肉組織變細，顯示離體咽具有分解肌肉的功能 (表 5，圖 25、26)，推測離體咽具有分解肌肉蛋白質的酵素，進而使牡蠣開殼幅度增加，利於蚵蛭進行捕食，為體外捕食行為的全新發現。

此實驗不僅可藉外套膜萎縮程度分析離體咽作用效果，也可降低實驗成本且增加重複性，為雙殼貝類被捕食的行為研究建造全新範例。日後的研究可以此為基礎，利用文蛤外套膜萎縮或分解的程度作為衡量指標，利用化學分析檢測離體咽的成分。

【實驗五】切片觀察

(一) 咽的組織切片

咽主要有兩部分組成，一部分呈緻密折疊狀 (圖 27 A 處)，由細長的肌肉組織折疊而成，外層被較疏鬆的網狀結締組織包覆，其上的細胞核分佈密集 (圖 28)。咽的另一部分呈疏鬆顆粒狀

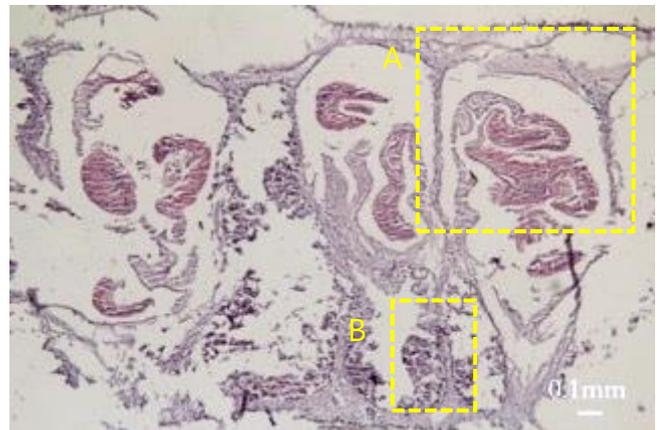


圖 27 咽組織切片

(圖 27 B 處)，主要由兩種飽滿圓球形細胞組成，推測為分泌型細胞，分佈在結締組織的樹枝狀分枝的末段。第一種數量較少，呈大顆橢圓球狀，半徑 $6.90 \pm 0.0081 \mu\text{m}$ (圖 29 C 處)。第二種分佈密度較高，呈小顆葡萄球狀，半徑 $2.71 \pm 0.0018 \mu\text{m}$ (圖 29 D 處)。

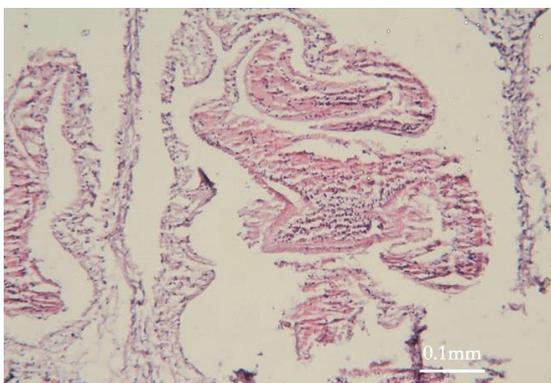


圖 28 緻密折疊狀的肌肉組織

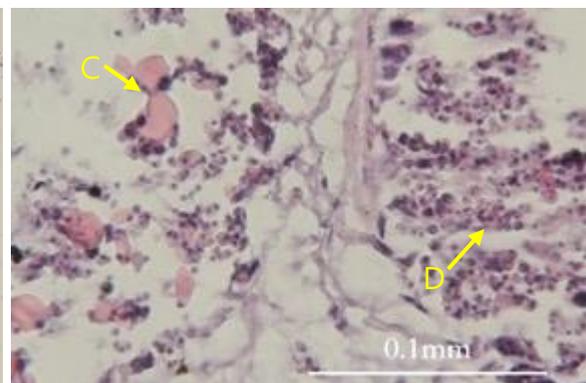


圖 29 咽組織分泌型細胞：

C 大顆橢圓球狀；D 小顆葡萄球狀

(二) 離體咽的組織切片

離體咽的組織呈細長狀，主要由疏鬆的結締組織與肌肉組織組成。此外在邊緣處具有斷裂的痕跡 (圖 30 箭頭所示)。另外離體咽和咽本體都具有飽滿的分泌型細胞 (圖 31 箭頭所示) 可以證實離體咽為咽本體的分支。

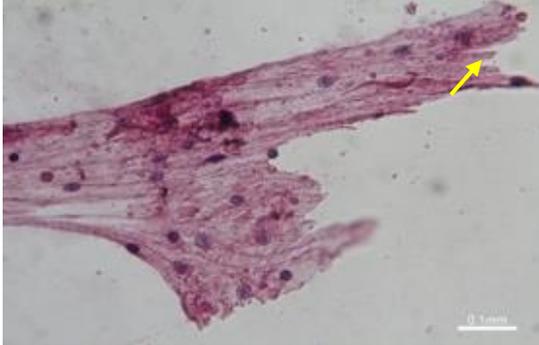


圖 30 離體咽的組織圖



圖 31 離體咽的分泌型細胞 (箭頭所示)

(三) 小結：

切片發現離體咽主要由肌肉組織與兩種分泌型細胞構成 (圖 30、31)，推測前者有助於伸縮和斷裂，後者能分泌酵素以分解肌肉組織，與攻擊期蚵蛭能突破牡蠣雙殼保護機制有關。切片觀察進一步佐證離體咽造成外套膜肌肉組織的萎縮。離體咽的捕食行為，在動物行為研究中極為罕見且具重要研究意義。其成分非常值得進一步進行蛋白質分析。

【實驗六】離體咽對文蛤的攻擊機制

(一) 離體咽的作用模式

離體咽會藉由伸縮移動到殼緣，經過一段時間，文蛤的殼會微張開，外套膜露出，離體咽會附著在外套膜邊緣 (圖 32 A)。隨著文蛤閉殼能力逐漸失效，離體咽藉由文蛤的開閉殼與斧足的伸縮被運送進去。離體咽可相連在文蛤上下殼 (圖 32 B)，藉由拉張伸縮使外套膜脫離，並同時分解組織使之完全脫離外殼 (圖 32 C)。

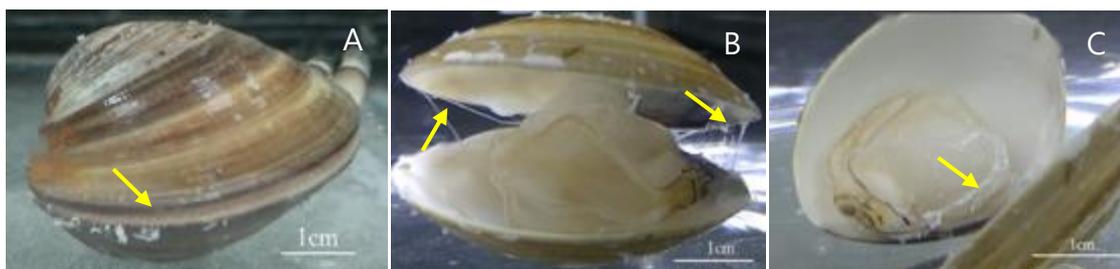


圖 32 離體咽的作用模式：A 附著在外套膜；B 連接在上下殼；C 分解組織

(二) 文蛤的反應

離體咽作用一段時間後，文蛤的開殼幅度會增加而且外套膜向外露出 (圖 33 A 箭頭所示)，並且產生白色濃稠的絲狀物 (圖 33 B)，其上會附著離體咽。此外，文蛤伸出斧足的頻率會增加，試圖排除外物。(圖 33 C)。



圖 33 文蛤的反應：A 伸出外套膜 (箭頭所示)；B 吐出白色絲狀物；C 伸出斧足

3. 實驗結果

離體咽使文蛤開殼，外套膜脫離 (圖 34 A)，造成組織被部分分解，產生顆粒狀物 (圖 34 B)，最終造成文蛤的死亡，使組織完全脫離外殼 (圖 34 C)。



圖 34 實驗結果：A 開殼、外套膜脫離 (箭頭所示)；B 產生顆粒狀物；C 組織完全脫離

(三) 獨立性卡方檢定

根據獨立性卡方檢定，比較有無離體咽對文蛤的死亡具有顯著差異 ($\chi^2 = 17.37, P < 0.01^{**}$)。對照組與無咽的蚶蛭不會造成文蛤的死亡。

表 6 獨立性卡方檢定 (Chi-squared Test)

	<i>n</i>	χ^2	<i>P</i>
離體咽	15	17.37	<0.01

(四) 離體咽數量對文蛤死亡率的影響

計算放置在文蛤殼緣的離體咽數量。在實驗過程中，離體咽無固定的移動方向，有些離體咽會移動到容器底部，無法對文蛤產生攻擊行為。經過統計，十條以下的離體咽不會造成文蛤的死亡。數量十條以上，其數量對死亡率呈線性正相關 ($R^2=0.87$) (圖 35)。

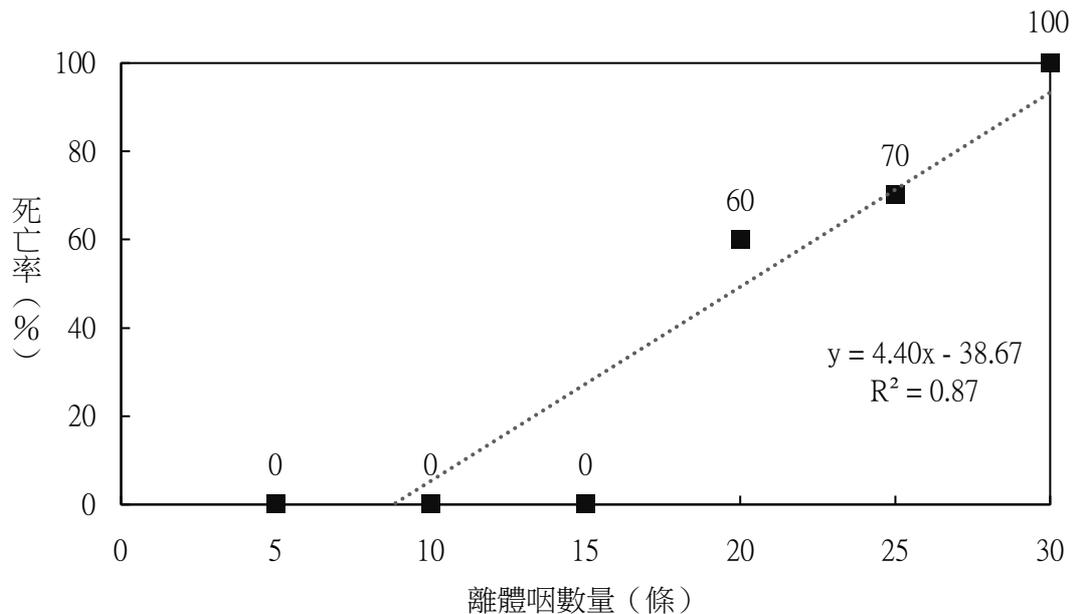


圖 35 離體咽數量對文蛤死亡率散佈圖

(五) 小結：

實驗證明 30 條以上的離體咽可以單獨造成文蛤的死亡，與文蛤死亡呈正相關 ($R^2=0.87$) (圖 35)，進而充分說明了離體咽是蚵蛭進行體外捕食行為最主要的攻擊構造，為本研究的假說提供一重要證據。

離體咽為體外攻擊行為的全新發現，因其脫離母體後仍具有移動能力，得以進到雙殼貝類的殼內，藉由分解肌肉組織，使文蛤無法抵抗，因此開殼死亡且組織完全脫離外殼 (表 6，圖 32-34)。離體咽的發現得以突破先前研究，完整解釋蚵蛭的捕食行為。

【實驗七】 離體咽蛋白質成分分析及其功能測試

(一) 離體咽電泳分析

從蛋白質電泳膠片 (圖 36) 可看出離體咽 (樣品 1-3) 和咽組織 (樣品 6 和 8) 之蛋白質萃取液在分子量 10-15 kDa 位置有最明顯的色帶 (圖 36 方框所示)，而蚵蛭肉體組織 (樣品 4、5、7) 在相對位置則無明顯暗帶，顯示離體咽和咽組織中含有異於蚵蛭肉體的蛋白質，分子量落在 10-15 kDa 之間。

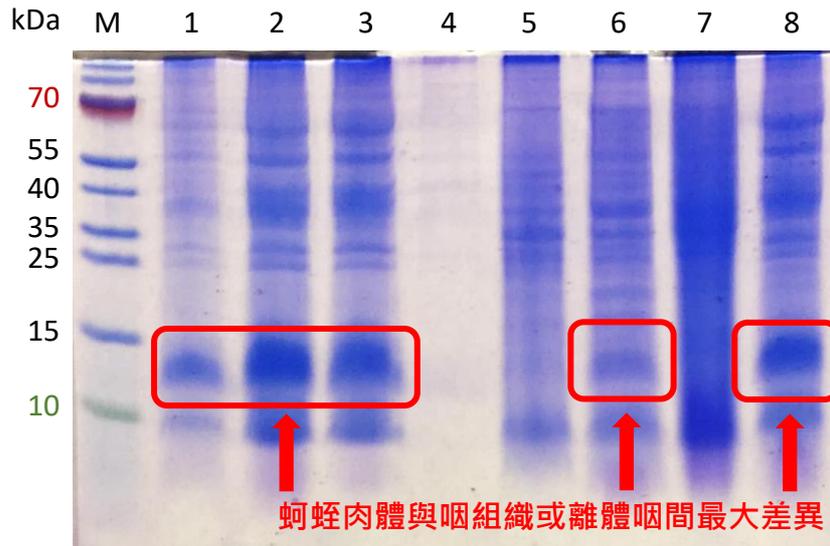


圖 36 咽與離體咽蛋白質電泳圖：

樣品 1 離體咽萃取後的固形物；樣品 2 離體咽萃取液 (第一次)
樣品 3 離體咽萃取液 (第二次)；樣品 4 蚵蛭肉體採樣萃取液
樣品 5 死亡蚵蛭肉體萃取液；樣品 6 死亡蚵蛭咽組織萃取液
樣品 7 硬化蚵蛭肉體萃取液；樣品 8 硬化蚵蛭咽組織萃取液

(二) 目標蛋白質純化

取咽組織萃取物以硫酸銨沉澱法分離蛋白質，結果顯示可能的目標蛋白質落在 80% 硫酸銨上清液中，再以 30 kDa cut-off 離心濃縮管移除硫酸銨，並進行蛋白質電泳分析和質譜儀分析。從蛋白質電泳膠片 (圖 37) 可看出前述分子量落在 10-15 kDa 之間的目標蛋白質 (樣品 7-9)，可以 30 kDa cut-off 離心濃縮管移除硫酸銨的方式取得，另外也發現另一群分子量更小的蛋白質 (約 10 kDa) 在 80% 硫酸銨造成的沉澱物中，經由 30 kDa cut-off 離心濃縮管處理，亦可拿到高純度蛋白質 (樣品 4-6)。

進一步以 MALDI-TOF 質譜儀分析目標蛋白質樣品，測得目前的純化物中有四個主要峰值 (圖 38)，之後需要再進一步分離與鑑定。

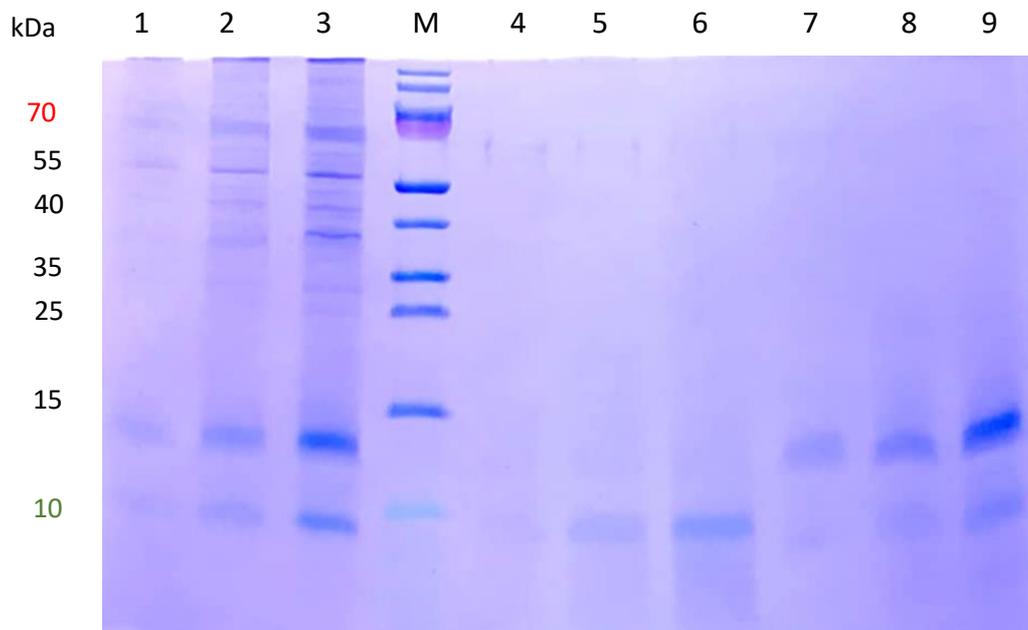


圖 37 離體咽與目標蛋白質電泳圖：

樣品 1-3：離體咽萃取液 1 μ l、2 μ l、4 μ l

樣品 4-6：對照蛋白質 2 μ l、4 μ l、8 μ l

樣品 7-9：目標蛋白質 2 μ l、4 μ l、8 μ l

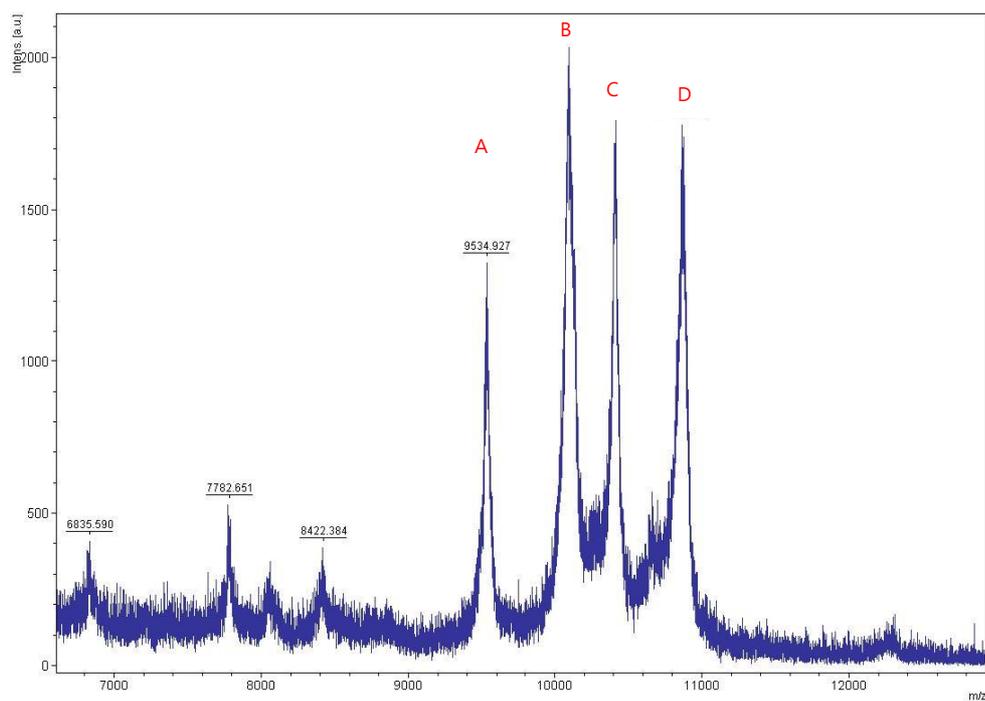


圖 38 目標蛋白質質譜分析：

分子量在 10kDa 處有四處高峰依序為

A : 9534.927 ; B : 10100.094 ; C : 10413.161 ; D : 10871.655 Da

(三) 活性測試

對照組與 PBS 組與在十二小時後並未大幅度開殼。離體咽萃取液組與目標蛋白質組的開殼幅度增加且會大幅度伸出斧足擺動，其中又以離體咽萃取液組的反應最為激烈，此外於燒杯底部會產生白色的碎屑 (圖 39)。

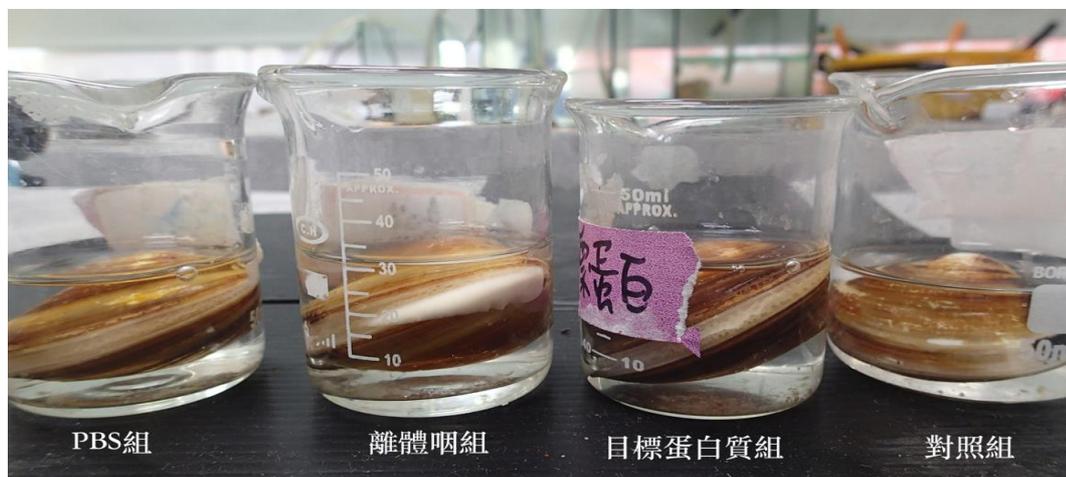


圖 39 文蛤活性測試

(四) 小結：

透過蛋白質電泳及質譜儀分析，推測能夠致使牡蠣死亡、活體文蛤開殼及其外套膜萎縮的成分，是一群分子量約為 10 kDa 的蛋白質 (圖 36 - 38)。再將目標蛋白質對文蛤進行功能測試，結果顯示對照組及注入 PBS 溶液皆不會造成文蛤大幅度開殼，但離體咽的萃取物質與目標蛋白質則皆會造成文蛤開殼、伸出外套膜與斧足 (圖 39)，產生與受到離體咽本體攻擊時相似的激烈反應，初步推測離體咽內含的一群特有蛋白質為攻擊牡蠣和文蛤的關鍵成分。

經由目前的蛋白質初步萃取與分析，有助於瞭解離體咽所含的功效成分，日後需要再進行更精確的純化，找到真正的作用物質，並且尋找抑制活性蛋白質的方法，可望對蚵蛭防治做出具體貢獻。

肆、結論與應用

一、首次記錄蚵蛭捕食行為的三個時期

近四十年來，國內外學者主要研究扁形動物的再生與生殖行為，捕食行為的相關研究較少。原因可能在於蚵蛭的攻擊時間長達 4 至 8 小時，需用縮時攝影才較容易觀察到完整的過程，又因先前研究尚未發現蚵蛭有離體咽可代替本體進入牡蠣殼內進行攻擊，因此認為難以錄製到蚵蛭在殼內的捕食過程。

本研究透過長時間錄影與分析，得以記錄其捕食行為，並將蚵蛭的攝食過程分成三個階段—攻擊期、捕食期和消化期。在攻擊期，蚵蛭在牡蠣的前緣射出白色的枝狀構造進入殼內，牡蠣外殼顫動且開殼幅度增加，最終失去閉殼能力。蚵蛭的枝狀構造使牡蠣失去閉殼能力，蚵蛭才能爬入殼內進行捕食，為首次的發現。

二、文蛤替代實驗的成功

本實驗使用另一種雙殼貝類—文蛤進行觀察，發現蚵蛭攻擊牡蠣和文蛤都會射出枝狀構造，此枝狀構造是由咽組織伸長後斷裂所形成，故命名為**離體咽**。此外，牡蠣和文蛤對離體咽攻擊時具有相似的反應：兩者的開殼幅度都會增加，並且產生屑狀物，之後失去閉殼能力，終被蚵蛭全部吞食。文蛤的替代實驗進一步證實離體咽能使獵物組織被部份分解且失去閉殼能力。蚵蛭於攻擊期射出的離體咽對雙殼貝類應具有相似的作用。

本研究以文蛤取代牡蠣作為觀察對象，有利於統計與分析蚵蛭的捕食行為。蚵蛭的離體咽會造成文蛤外套膜的萎縮，且由切片可看出多處肌肉被分解，顯示離體咽所含化學成分可以促使外套膜肌肉萎縮且被分解。文蛤的替代實驗具有重要意義與指標性，藉由比較外套膜的萎縮程度可以分析離體咽作用的效果。往後的研究，可參考此以文蛤作為替代的實驗設計，具備降低實驗成本與提高實驗樣本重複次數等優點。另外，這個實驗設計也為雙殼貝類被捕食的行為研究建立一全新的範本。

三、首次發現離體咽的離體捕食行為

離體咽在一般狀態下因呈白色半透明狀，且移動非常緩慢，故在野外難以用肉眼直接觀察。本研究於實驗室內經長時間縮時錄影，以及在適當的燈光照射角度下觀察到蚵蛭會從腹側向四面八方輻射出枝狀的咽，並且定義斷裂形成的構造為離體咽。影片中發現離體咽多朝陰暗處移動，沒有發揮攻擊作用的離體咽則沉至缸底。離體咽的作用時間約莫十二小時，最後蜷縮成顆粒狀。

在錄製的影片中觀察到蚵蛭在接觸其他蚵蛭的離體咽後並不會產生任何反應，故推測離體咽的產生不是扁蟲之間相互防禦的行為。離體咽可藉由伸縮移動到牡蠣或文蛤殼內，代替蚵蛭本體進行攻擊。攻擊期與離體咽的發現可以解釋蚵蛭如何突破牡蠣的雙殼保護機制，並且建立蚵蛭捕食的行為模式。蚵蛭於牡蠣未防備時，將離體咽射入，離體咽因為負趨光性而進入到較黑的殼內，使牡蠣開殼幅度增加並且組織被分解，利於蚵蛭進行捕食。

蚵蛭的咽具有緻密折疊狀的肌肉組織與兩種分泌型細胞。蚵蛭進行攻擊時，可以向外輻射大量分枝的咽，其末端的分泌型細胞便可以分泌化學物質，作用在獵物上。在攻擊期，離體咽所分泌的化學物質可以分解組織，使牡蠣外殼顫動並且失去閉殼能力。根據文獻（揭、郭，2014；Newman, 1997），咽所含的化學物質也具有消化功能，可以分泌消化酵素分解獵物。

離體咽末端不平整且具有撕裂的痕跡，推測咽伸縮時，會扯斷部分的肌肉組織，使其斷裂產生離體咽。離體咽脫離本體後可以藉由肌肉組織的伸縮移動，並且利用分泌型細胞所含的物質進行攻擊。

四、離體咽體外攻擊機制的重要性

活體文蛤的實驗可以佐證假說「離體咽是蚵蛭捕食的構造」且據以分析離體咽攻擊的模式。離體咽最先接觸到文蛤殼內的外套膜，將麻痺與分解的物質傳送進去，使文蛤的開殼幅度增加，並且產生白色絲狀與顆粒狀物，數量充足的離體咽可以單獨作用使文蛤開殼並且死亡。離體咽的發現可以完整解釋蚵蛭的捕食行為，由於有小而多的離體咽先藉由負趨光性移動到殼內，並且釋放化學物質，使組織受損，雙殼貝類因而無法閉殼，蚵蛭才能進入並完成捕食。離體咽的離體作用機制為體外攻擊行為的全新發現。

Newman & Cannon (2003)曾對攝食海鞘的海扁蟲進行報導，說明其會伸出管狀咽部進入海鞘體內吸食體液 (Newman & Cannon, 2003)。而本研究所發現的澎湖蚵蛭的離體咽，則是一從未被報導過的全新發現，為動物界中體外捕食、消化的案例增添一筆，對扁形動物行為研究具有很重要的意義！

五、初步分離出離體咽中的活性物質為一群分子量約為 10 kDa 的蛋白質

經由蛋白質電泳與質譜儀分析，初步分析出離體咽中可能具有攻擊作用的有效成分為一群分子量約為 10 kDa 的蛋白質。經由活體文蛤測試，發現給予目標蛋白質會讓文蛤產生與遭受離體咽攻擊時相似的反應。未來希望能透過更精確的化學分析，純化出活性物質，同時找出抑制的方法，並實際應用在牡蠣養殖上，以求能找到蚵蛭的防治方法。

伍、參考資料

一、論文

- (一) 徐瑞雲、林曜松 (1979)。危害牡蠣之扁蟲(*Stylochus inimicus*)的生物學研究
- (二) 李坤瑄 (1990)。東方食蚵扁蟲(*Stylochus orientalis* Bock,1903)(Platyhelminthes : Turbellaria)的生殖週期與交配行為研究。
- (三) Bulnes, V. N., Faubel, A., & Park, J. K. (2005). Two new marine species from South Korea with remarks on the family Stylochidae (Acotylea, Polycladida, Plathelminthes). *Journal of Natural History*, 39(23), 2089-2107.
- (四) Gammoudi, M., Tekaya, S., & Norena, C. (2009). Contribution to the knowledge of acotylean polyclads (Platyhelminthes, Polycladida) from Tunisian coasts. *Zootaxa*, 2195, 43-60.
- (五) Littlewood, D. T. J., & Marsbe, L. A. (1990). Predation on cultivated oysters, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding), by the polyclad turbellarian flatworm, *Stylochus* (*Stylochus*) *frontalis* Verrill. *Aquaculture*, 88(2), 145-150.
- (六) Newman, L. J., Cannon, L. R. G., & Govan, H. (1993). *Stylochus* (*Imogene*) *matatasi* n. sp.(Platyhelminthes, Polycladida): pest of cultured giant clams and pearl oysters from Solomon Islands. *Hydrobiologia*, 257(3), 185-189.
- (七) Schägger H.(2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. 1(1):16-22.
- (八) Wingfield P (2001). "Protein precipitation using ammonium sulfate". *Current Protocols in Protein Science*. Appendix 3, A.3F.1 - A.3F.8.

二、書籍

- (一) 揭維邦、郭世杰 (2014)。海洋舞者：臺灣的多岐腸海扁蟲 國立海洋生物博物館
- (二) Menzel, R. W., Hulings, N. C., & Hathaway, R. R. (1966) Oyster abundance in Apalachicola Bay, Florida in relation to biotic associations influenced by salinity and other factors. *Gulf and Caribbean Research, 2(2)*, 73-96.
- (三) Newman, L. & Cannon, L. (2003) Marine Flatworms. The World of Polyclads. Csiro Publishing. Collingwood, Australia, 97 pp.
- (四) Bock S.(1913) Studien ueber Polycladen, 128-136.

三、網站

林慧貞(2015年09月16日)·可怕扁蟲讓蚵殼淪空包澎湖漁民損失上百萬，
取自 <https://www.newsmarket.com.tw/blog/75906/>

附錄-切片流程

(一) 脫水

1. 將浸泡在福馬林的標本置於放有濾紙的培養皿內並以乾淨的解剖刀切取組織
2. 將切取好的組織放入清水中浸泡（使福馬林溶出）
3. 依序浸泡在 30%、50%、70%、95%、99.5%的酒精中

(二) 滲蠟

1. 置於 99.5%酒精與二甲苯 1：1 混合溶液中 5 分鐘
2. 置於二甲苯中 2 次，各 5 分鐘（每次可更換藥品）
3. 置於二甲苯與石蠟 1：1 混合溶液中 20~30 分鐘（置於 45°C 的烘箱中）
4. 置於石蠟中浸泡 30 分鐘以上（石蠟置於 56~60°C 的真空烘箱中）

(三) 包埋

1. 將不鏽鋼包埋盒置於 40~50°C 的加熱版上並放入適量乾淨石蠟加熱至完全熔化
2. 將不鏽鋼包埋盒從加熱版上取下，放在準備好的海報紙上，加入標本
3. 待不鏽鋼包埋盒底部的石蠟開始凝固時，用鑷子調整標本位置及角度
4. 待石蠟表面凝固，放上以酒精燈些微加熱過的石蠟固定器並倒入熔化的石蠟
5. 待石蠟表面再次凝固時，將不鏽鋼包埋盒放入 -20°C 的冷凍庫中冷卻約 5 分鐘
6. 待石蠟完全凝固時，用鑷子後端撬開石蠟，使之與不鏽鋼包埋盒脫離

(四) 切片

1. 將石蠟塊置於切片機上，並用刀片切取石蠟塊，使之與切片機刀片平行
2. 調整刀座，使之與石蠟塊相當接近，並開始切
3. 在玻片加熱台上放置乾淨載玻片並加熱至 37°C 並將臘帶平鋪其上

(五) 染色

1. 將含蠟帶的載玻片浸入二甲苯中 2 次，各 3 分鐘
2. 將含蠟帶的載玻片浸入無水酒精中 2 次，各 3 分鐘
3. 將含蠟帶的載玻片依序浸入 90%、80%、70%、50%的酒精中，各 3 分鐘
4. 將含蠟帶的載玻片浸入清水中 1 分鐘（去除酒精）
5. 將含蠟帶的載玻片浸入蘇木精中約 15 秒~3 分鐘（顯微鏡下視染色效果而定）
6. 將含蠟帶的載玻片浸入流動的水中清洗
7. 將含蠟帶的載玻片浸入 70%的酒精中 30 秒
8. 將含蠟帶的載玻片浸入伊紅中 1~3 分鐘（在顯微鏡下視染色效果而定）
9. 將含蠟帶的載玻片依序浸入 80%、90%、99.5%的酒精中
10. 將含蠟帶的載玻片浸入二甲苯中 2 次，每次各 3 分鐘
11. 標本封片

【評語】 050021

1. 此研究探討澎湖蚵蛭的捕食行為及其生態行為，以及離體咽對牡蠣和文蛤外套膜的攻擊。此作品的實驗設計周延，研究主題與探討的問題明確。
2. 對離體煙的攻擊行為觀察入微、描述文蛤與離體咽的組織學很詳細。bioassay 確定了 10kDa 蛋白質造成外套膜損傷，可再加強研究此蛋白質組成上的功能。
3. 此研究在應用上的價值應多方思考，可能有生醫領域上的應用。