

九孔種貝血淋巴免疫相關指標的季節性變化

許晉榮

行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心

摘 要

軟體動物的免疫力高低通常會與季節變化及週年的生殖周期有關，貝類的大量死亡潮也多半會出現在牠們免疫力下降的季節。本研究即在調查九孔種貝血淋巴免疫指標的季節性變化及其與環境因子間的關係，期間自 2008 年 3 月到 2009 年 5 月。研究發現九孔種貝血淋巴液中的蛋白質濃度、總血球數、血青素含量、鹼性磷酸酶及酚氧化酶活性，在 10 月到隔年 1 月的生殖季時都比非生殖季時低；由皮爾生相關分析結果也顯示，大部份的免疫指標都與水溫呈現正相關 ($P < 0.05$)。依此結果推論，水溫及性腺發育所產生協同作用的影響可能對此指標的變化扮演重要的角色。

關鍵詞：九孔、季節變化、免疫力

前 言

在自然環境下，貝類的免疫反應經常會有季節性的變動，這或許是由某些環境因子的變化，如鹽度、氨-氮、水溫和 pH 值等所引起，也可能與生物個體內部能量儲存、代謝，或性腺發育及生殖季節有關 (王等, 2006; 陳及楊, 2007)。疾病的產生是宿主 - 環境 - 病原三要素相互作用的結果，當貝類因為環境變動而使得自身的免疫力下降，對病原的抵抗力自然就減弱，因此經常就會出現季節性大量死亡的情形，太平洋牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 的夏季大量死亡 (summer mortality) 就是最好的例子 (毛等, 2005; Cho and Jeong, 2005; Li *et al.*, 2009a)。太平洋牡蠣在生殖季時，體內儲存的肝糖、蛋白質等能量大量耗用於性腺發育上 (毛等, 2005; Patrick *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009a)，再加上溫度升高所產生的共同作用，使得與免疫力有關的蛋白質生產受到抑制，淋巴細胞總數與吞噬能力也下降，以致在生產後，種貝受到病原攻擊時，死亡率會顯著增高，就是所謂的夏季死亡潮 (Ishikawa *et al.*, 1999; Cho

and Jeong, 2005; Li *et al.*, 2007, 2009a,b)。而三倍體 (triploid) 的牡蠣因為性腺不發達，能量較少耗用在生殖細胞發育上，和正常二倍體 (diploid) 牡蠣比較起來，免疫力相對較強，夏季死亡率也較低 (Gagnaire *et al.*, 2006; Duchemin *et al.*, 2007)。類似週年性免疫力下降的情形也見於其他的雙殼貝，如澳洲石牡蠣 (*Saccostrea glomerata*) (Peters and Raftos, 2003)、貽貝 (*Mytilus edulis* 及 *M. trossulus*) (Cartier *et al.*, 2004) 等。

在鮑類，Travers *et al.* (2008) 發現歐洲鮑 (*Haliotis tuberculata*) 也會發生夏季死亡潮的現象。歐洲鮑在生殖季時，同樣會因為配子生成 (gametogenesis) 而耗損儲存的能量，使得免疫力下降，無法有效地對抗高溫時盛行的弧菌感染，遂出現夏季死亡潮。臺灣主要養殖的鮑類是九孔 (*H. diversicolor*)，牠在臺灣已有三十餘年的養殖歷史，以往也曾為國內的水產業帶來巨大的經濟效益，然而近幾年來卻因為貝苗發生落板現象，而使得成貝養殖受到影響，整體養殖產業逐漸出現衰退 (楊等, 2003)。造成落板的原因，主要還是與疾病感染有關，現已知病原物包括弧菌 (如溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*、腸炎弧菌 *V. parahaemolyticus*) (Lee *et al.*, 2001) 及疱疹樣病毒 (herpes-like virus) (Chang *et al.*, 2005)。

*通訊作者 / 台南縣七股鄉三股村海埔四號, TEL: (06) 788-0461 轉 219; FAX: (06) 788-1597; E-mail: bporgy12@yahoo.com.tw

目前雖然 Cheng *et al.* (2004a, b, c, d, e) 已經調查過溶氧、鹽度、亞硝酸 (nitrite)、水溫及氨氮對於九孔免疫力及抗腸炎弧菌能力的影響；王等 (2007) 也分析過底泥懸浮物對九孔免疫力的抑制；但該些研究的分析都是短期的 (最長 8 天)，未長時間週年的監測能量代謝與免疫活性因子的變化，因此無法如歐洲鮑及貽貝之研究，可以分析季節變化或生殖季節對貝類免疫力的協同作用 (synergistic impacts) 的影響 (Ishikawa *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2007)。因此，本研究嘗試調查九孔種貝不同季節免疫因子的變化情況，了解其是否會因為生殖季節而有明顯的改變？是否又與養殖環境水質有關？此結果有助於建立優良種貝的養殖適當環境與條件。

材料與方法

本實驗是由 2008 年 3 月一直進行到 2009 年 5 月，共 15 個月，每個月隨機採樣九孔 10 ~ 15 隻 (開始是 2 年齡，隔年是 3 年齡)，量取殼長、體重與肥滿度 (condition factor) ($BW/TL^3 \times 10^6$)，同時測量養殖池水之溫度、鹽度、pH 值、總氨 - 氮 (total ammonia-nitrogen, TAN-N) 及亞硝酸 - 氮值 (NO_2-N)。

抽取之血淋巴液先測定總血球數 (total hemocyte count)，分析方法如丁等 (1996)，從每一個血淋巴液樣本中抽出 100 μ L 加入 300 μ L 含 10% 的福馬林固定液，再於顯微鏡下使用血球計數盤計算血球數，然後再換算為 1 mL 血淋巴液的總血球數。剩下之血淋巴液在 4 $^{\circ}$ C 下以 5,000 \times g 離心 15 分鐘後，取上清液，冷凍於 -85 $^{\circ}$ C 中，供日後分析血中蛋白質及血青素 (hemocyanin) 濃度、酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 及酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 等免疫酵素活性。

血中蛋白質是以蛋白質折射器直接測定 (Atago, Japan)。血青素含量之測定方式參考 Ragg and Taylor (2006) 測量 *H. iris* 血青素之方法，將 100 μ L 的血淋巴液與 900 μ L pH 8.8 的緩衝液 (EDTA 10 mmol/L, glycine 50 mmol/L) 混合，在空氣中搖晃使其與氧化合後，置入分光光度計，以波長 346 nm 測量其吸光值，消光係數以銅離子

濃度為基準 ($E_{mM\ Cu\ 1\ cm} = 11.42$)。因為血青素中，每兩個銅離子均結合一個氧分子，所以用 $E_{mM\ Hcy\ 1\ cm} = 22.84$ 計算血青素值。血糖及酸性、鹼性磷酸酶均以商用套組測定。血糖的測試套組混合液中含有葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase)、過氧化酶 (peroxiase) 及還原態 o-Dianisidine，與葡萄糖在 37 $^{\circ}$ C 下培養 30 分鐘後會生成咖啡色氧化態 o-Dianisidine，以 12 N 的硫酸終止反應後會形成穩定之粉紅色產物，再於分光光度計波長 540 nm 下測定 (Sigma, USA)。酸性磷酸酶是以 1-naphthyl phosphate 為受質，在 37 $^{\circ}$ C 培養下，水解生成之 1-naphthol 再與 4-chloro-2-methylphenyl diazonium salt 反應，轉成 azo dye，在分光光度計 405 nm 下讀取吸光值變動，經由該測試套組所提供之公式換算求其活性，單位為 U/L (Randox, U.K.)。鹼性磷酸酶則利用 *p*-nitrophenylphosphate 當受質，同樣在 37 $^{\circ}$ C 培養下，於波長 405 nm 下測定 *p*-nitrophenol 的生成，經由該套組所提供之公式換算求其活性，單位為 U/L (Randox, U.K.)。酚氧化酶活性則依 Chen *et al.* (2005) 之法修改測定，以 L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 為酵素受質，將上清液與 0.1 mol/L potassium phosphate 緩衝液 (pH 6.0) 及 0.01 M L-DOPA 等量混合，等待 5 分鐘後，在波長 490 nm 波長下讀取吸光值變動 5 分鐘，以 $O.D_{490nm}$ 對反應時間作圖，每 min^{-1} 增加 0.001 定度為一酵素活性單位 (U)。

溫度、鹽度均以溫度計及鹽度計 (Atago, Japan) 測定；pH 值則以酸鹼值測定儀測定 (Suntex, Taiwan)。總氨 - 氮及亞硝酸 - 氮值測定均利用分光光度計測定，總氨 - 氮值利用 phenolhypochloride 法測定， NH_4^+ 在鹼性作用下會轉成 NH_3 ， NH_3 與 phenol 形成 indophenol blue，再以 sodium nitroprusside 放大其反應效果，經分光光度計以波長 640 nm 測定之 (陳, 1983)；亞硝酸 - 氮值則利用測試水在酸性溶液中與 sulfanilamide 形成 diazonium 化合物，再與 N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine 形成粉紅色的 azo 化合物，於波長 520 nm 下測定之 (陳, 1983)。

用於分析不同月份免疫指標的樣品數不同，分析總血淋巴球數的樣品數為 6 ~ 7 個，分析蛋白質、酸性、鹼性磷酸酶及酚氧化酶活性之樣品數均為 10 個，分析血青素則為 10 ~ 14 個。各組數

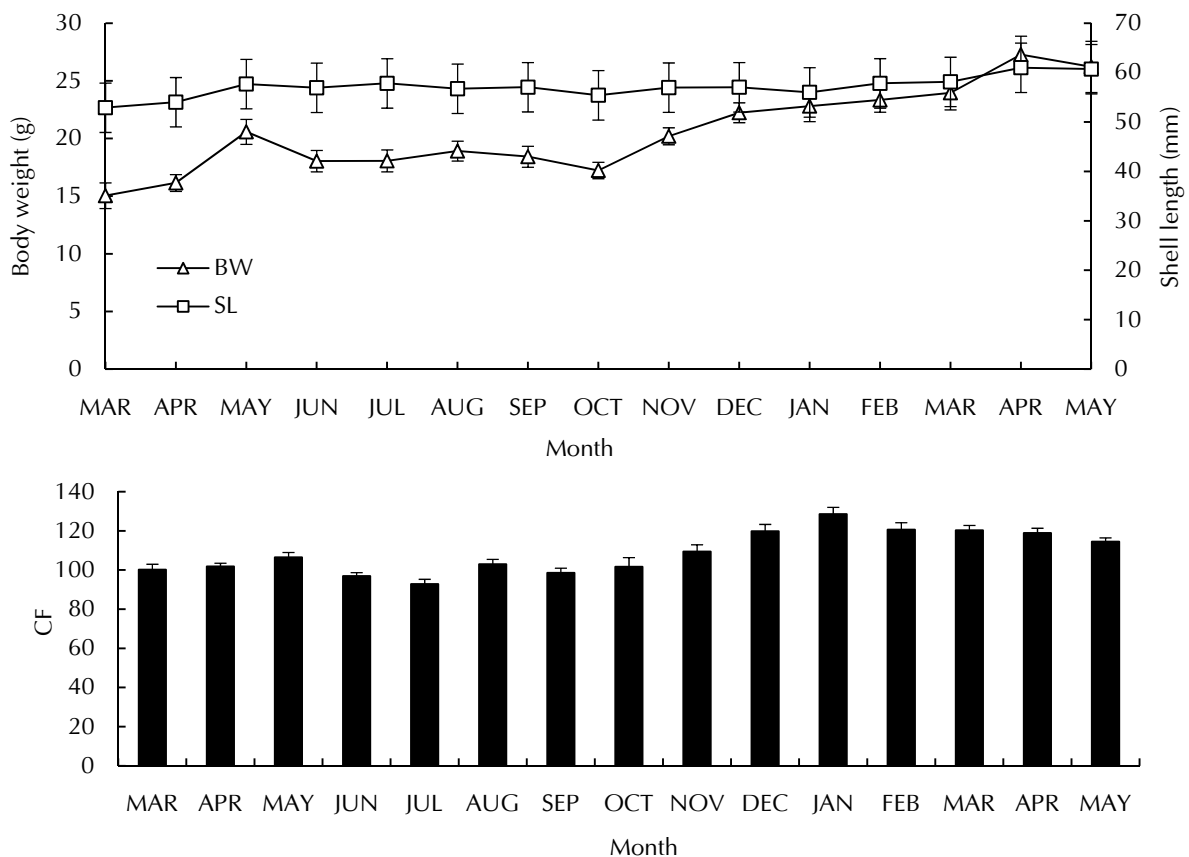


Fig. 1 Body weight, shell length (upper), and condition factor (below) of the sampled abalone broodstock from March, 2008 to May, 2009.

值先以變方分析 (one-way analysis, ANOVA) 檢驗，若達 5% 顯著差異，則再以特奇氏公正顯著差異法 (Tukey's honestly significant difference test, HSD) 加以檢定。九孔不同月份血淋巴係數與體型及水質因子變數之線性相關以皮爾生相關係數 (Pearson correlation coefficient, r) 進行分析 (Zar, 1999)。

結 果

從 2008 年 3 月到 2009 年 5 月，採樣九孔的體重、體長及肥滿度，變動如 Fig. 1 所示。15 個月中，池水溫度、鹽度、pH 值、氨-氮及亞硝酸-氮的變化如 Fig. 2。水溫由最冷的 18 °C (1 月) 到最高的 30 °C (夏季，6~9 月)；鹽度則由冬季 (乾季，1~4 月) 的接近 35 psu 到夏季 (7~9 月，雨季) 的 26~28 psu；pH 值在 7.65~8.05 之間；氨-氮及亞硝酸-氮值的變化則在 0.01~0.08 ppm 及 < 0.01~0.062 ppm 之間。

十五個月內，九孔種貝血淋巴液中蛋白質、血青素、總血球數、酸性與鹼性磷酸酶及酚氧化酶活性的變化如 Fig. 3，除了酸性磷酸酶變化較無規律外，其他五種指標較高的數值出現在 2008 年的 6、7 月。蛋白質、總血球數、鹼性磷酸酶及酚氧化酶活性都在 8 月份開始下降，血青素的含量則在 9 月份才開始下降，這五種指標的最低值多出現在 10 月到隔年的 1 月間，而這剛好是當年臺南地區九孔的繁殖排卵季節。

九孔種貝之血淋巴指標與體型變數及水質環境變數的皮爾生相關係數列於 Table 1。九孔種貝的蛋白質含量與肥滿度呈現正相關；另外，蛋白質、總血球數、鹼性磷酸酶及酚氧化酶活性都與水溫呈現正相關，這個結果顯示水溫愈高，九孔的免疫指標也較高，其中，總血球數、酚氧化酶與水溫的相關係數 r 達 0.65 與 0.66，高於極顯著水準 ($P < 0.01$) 之 0.62 (Table 1)。

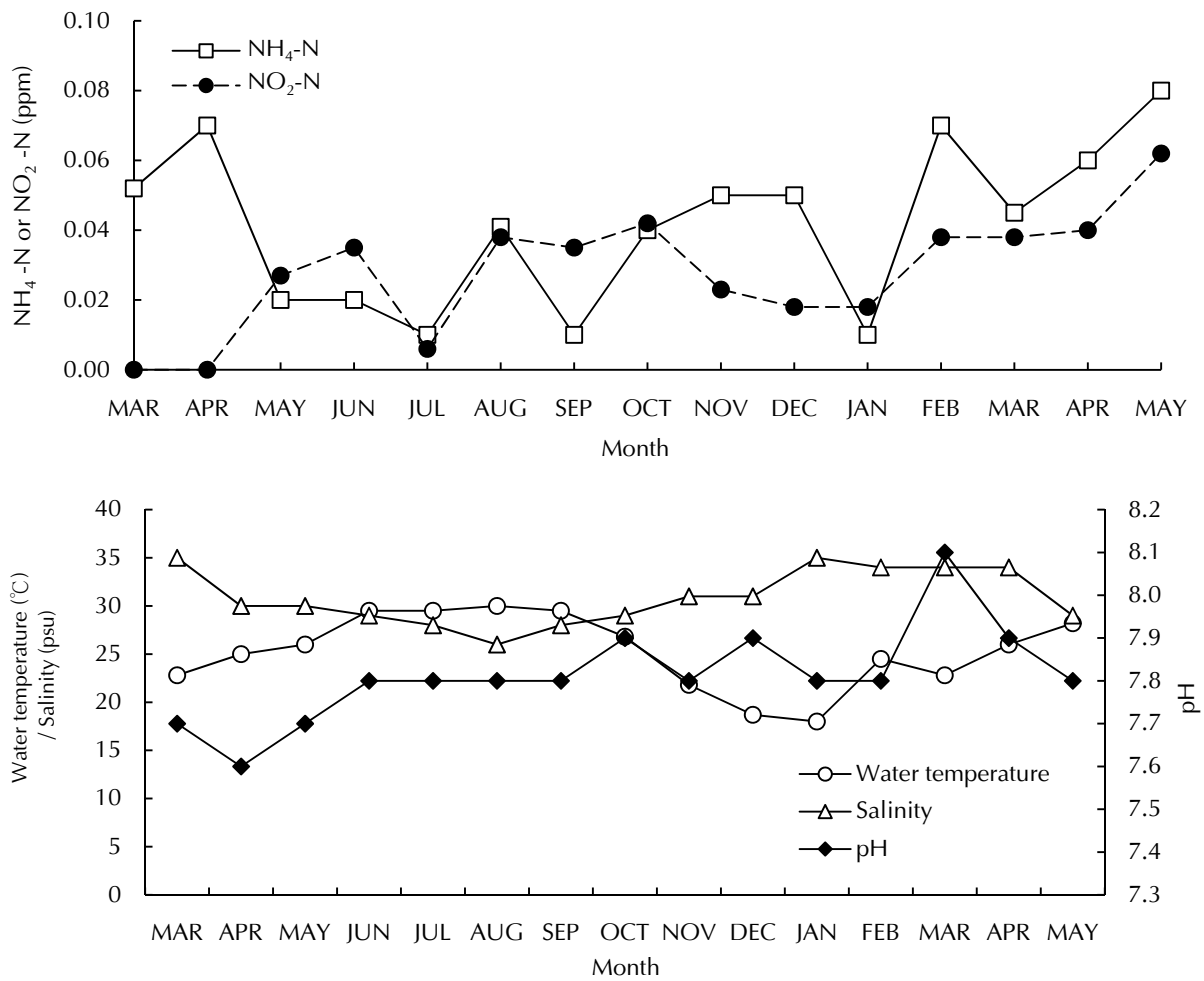


Fig. 2 Changes in NH₄-N, and NO₂-N (upper), water temperature, salinity, pH value (below) of ponds from March, 2008 to My, 2009.

Table 1 Pearson's correlation coefficients (*r*) of hemolymphatic parameters to body size and water quality variables

Parameter/body size and water quality	Total hemolymph protein	Total hemocyte count	Hemocyanin	Acid phosphatase	Alkaline phosphatase	phenoloxidase
Body weight	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Shell length	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Condition factor	0.52*	NS	NS	NS	NS	NS
Water temperature	0.53*	0.65**	NS	NS	0.55*	0.66**
Salinity	NS	NS	NS	NS	NS	NS
pH value	NS	NS	NS	NS	NS	NS
NH ₄ -N	NS	NS	NS	NS	NS	NS
NO ₂ -N	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

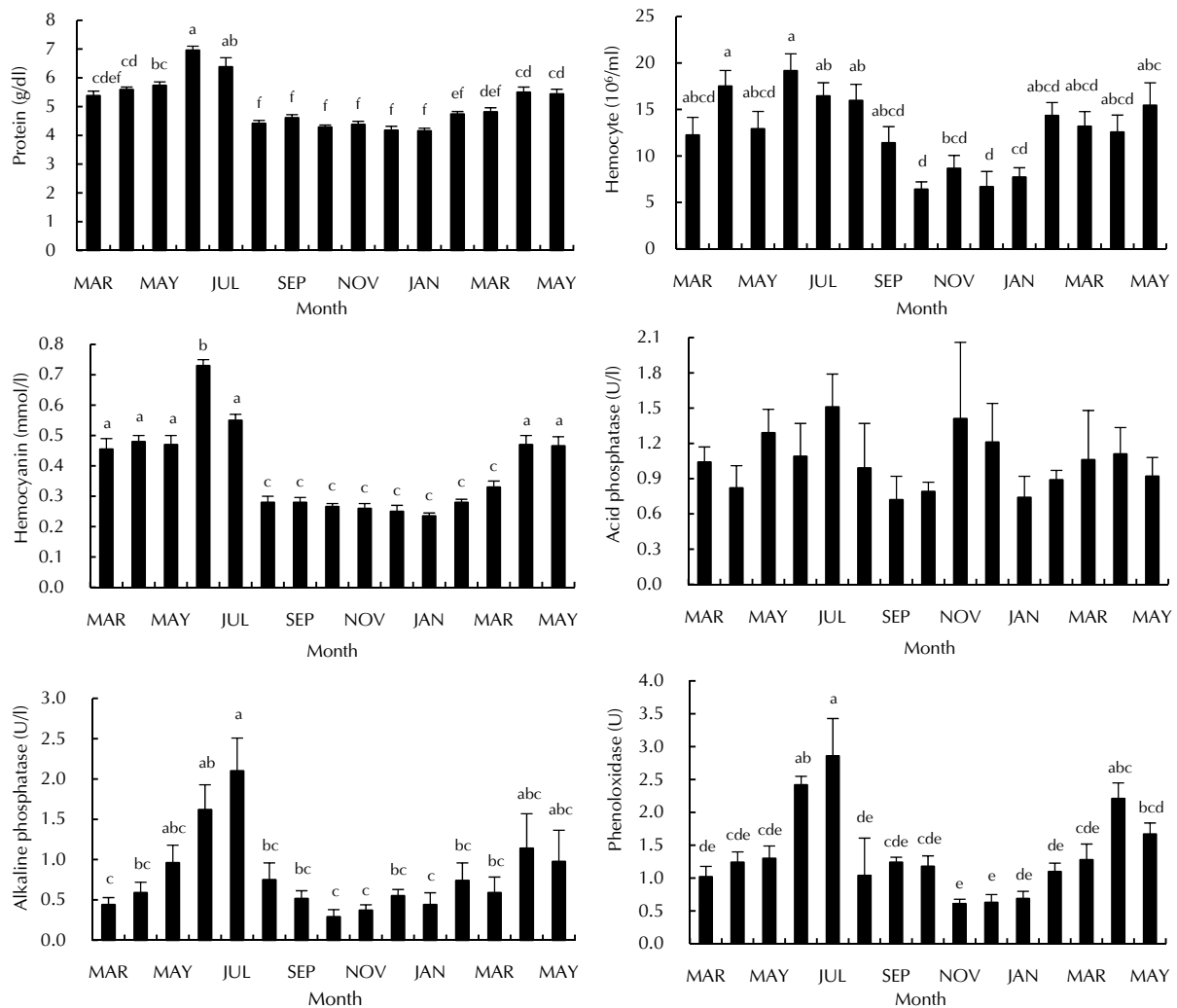


Fig. 3 Changes in immune parameters of the abalone broodstock from March, 2008 to May, 2009. Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$).

討 論

貝類的防禦系統主要是透過先天免疫系統 (innate immune system) 來對抗外來病原的入侵 (Bachère *et al.*, 1995; 劉與麥, 2003; Hooper *et al.*, 2007)。其中, 總血球數的多寡及多種免疫酵素的活性經常被用來顯示貝類的免疫力與健康狀況 (Bachère *et al.*, 1995; 劉與麥, 2003; 劉等, 2003; Cheng *et al.*, 2004a,b,c,d,e; Hooper *et al.*, 2007; 許, 2008)。而血青素在甲殼類及貝類體內, 除了與輸送氧氣、能量儲存、滲透壓維持有關外, 最近被發現具有酚氧化酶活性和抗菌功能, 也是重要的免疫因子 (Decker and Jaenicke, 2004; Siddiqui *et*

al., 2006; 章等, 2007)。另外, 蛋白質在某些染病的貝類血淋巴中濃度經常會較高, 此可能與貝類需要合成較高量的抗菌蛋白有關 (Ordás *et al.*, 2000)。因此, 在本實驗中, 我們測定這些血淋巴液中的介質來了解九孔季節性免疫能力的變化。而本實驗的結過也顯示, 就像其他的軟體動物, 九孔的免疫力也呈現季節性的變化。

本實驗中養殖池的溫、鹽度、pH 值、氨氮及亞硝酸氮值週年變化, 均在一般九孔養殖允許範圍內 (楊等, 2003; 楊, 2005)。我們以龍鬚菜餵食九孔, 養殖池又採流水式, 池中含氮廢物本來就低, 亞硝酸-氮及氨-氮最高值僅在 0.062 ppm 與 0.08 ppm。而 Cheng *et al.* (2004c,e) 調查不同濃度

亞硝酸-氮及氨-氮短期處理(5天)對九孔免疫力的影響,顯示影響九孔的最小亞硝酸-氮值濃度及氨-氮分別為096 ppm及1.08 ppm,皆高於本實驗期間所測值。另由皮爾生係數分析顯示,實驗期間所測得亞硝酸-氮及氨-氮的濃度不會影響九孔的生理、免疫因子,因此上述兩含氮物質的濃度在實驗期間皆在安全範圍內。由各項環境因子與免疫力的關係來看,很明顯溫度是其中最重要的影響因子(Table 1)。本實驗中,九孔種貝淋巴液中的免疫因子,例如總血球數、血青素含量、鹼性磷酸酶及酚氧化酶活性等的變化,最高值出現在溫度較高的6、7月(30°C),爾後多自8月開始下降,最低值則出現在10月(27°C)到隔年的1月(18°C)間。之前的學者由九孔性腺發育過程的組織切片來判斷,在到達排卵盛期前會有一段性腺成熟期(曾與林,1976;巫與戴,1995)。本實驗九孔的排配子期在2008年10月到隔年的1月,雖然我們並未進行組織切片或性腺係數(gonad index, GI)的檢驗,但由貝類體內的肝醣、蛋白質等儲存會在性腺成熟期下降(毛等,2005; Patrick *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009a),由本研究淋巴液中蛋白質及葡萄糖(結果未顯示)的下降來推斷,8月到9月應是九孔性腺發育的成熟期。這段期間因為能量的耗損及溫度的影響,九孔的免疫力相對地是較低的。這種在冬季產卵期免疫力下降的情形,和太平洋牡蠣(Ishikawa *et al.*, 1999; Cho and Jeong, 2005; Li *et al.*, 2007, 2009a,b)及歐洲鮑(Travers *et al.*, 2008)免疫力在夏天產卵期減弱的情形比較,在季節、月份上雖然不同,但都在生殖季時發生的情況卻是相同的。

在臺灣,九孔的弧菌感染主要發生在夏季(Lee *et al.*, 2001),而疱疹樣病毒則通常在冬末低水溫時讓九孔發病(Chang *et al.*, 2005)。在Cheng *et al.* (2004d)的5天短期處理實驗中,20°C短期處理九孔時,其總血淋球數、噬菌能力、酚氧化酶活性都會高於32°C處理者,但呼吸爆(respiratory burst)低於後者,此似乎顯示九孔在處於適溫範圍外的高溫或低溫都將造成免疫力下降。但本實驗水質環境因子與九孔免疫力相關度分析結果,低溫期的各生理、免疫因子達最低值,而高溫季節具有較高的測值,顯示本實驗期間之水溫並未超過最高點,但在冬季明顯降至最適低溫

點,而造成明顯下降。另外,溫度下降使得九孔種貝在秋、冬的性腺成熟期及排配子,能量耗用於生殖活動也是造成免疫下降的另一因素,這或許是因為生殖季時,貝類體內性激素,如兒茶酚胺(catecholamines)或雌性素(17 β -estradiol, E₂)等變動所造成的影響(Gagnaire *et al.*, 2006; Duchemin *et al.*, 2007)。此種免疫因子的活性下降可能與抗病毒能力下降有關。在魚類,母魚可經由傳遞抗體、補體(complement)或其他的免疫因子至胚胎而提高卵或幼魚的抗病力(Mulero *et al.*, 2007),但貝類的母體免疫對幼貝抗病力的影響仍不清楚。種貝因為免疫力下降,對病毒有較弱的抵抗力,是否也會透過母方效應(maternal effect)進而影響九孔苗對病毒的抵抗力,而較易落板呢?是否能利用免疫促進物質(immustimulants),如葡聚多糖(glucan)(曾,2006)或中草藥(Xue *et al.*, 2008)等,在適當時機施用,以增強種貝的免疫力?這顯然都是值得進一步探討的研究課題。

綜合上述,九孔的生理、免疫力顯然會因季節改變而有所變動。九孔在秋、冬生殖季時的免疫力都比非生殖季時低,因此對於低溫時盛行的病原,如疱疹樣病毒可能會有較差的抵抗力。在此建議漁民在進行人工繁殖時需多加注意,以減少損失。

謝 辭

本研究經費承行政院農業委員會98農科-10.3.1-水-A3(4)經費補助,本中心葉主任信利及劉君誠、柯進輝、吳承憬三位先生之協助,本所水產養殖組張錦宜副研究員及國立高雄海洋科技大學海洋生物技術系蔡志明助理教授、東華大學自然資源與環境學系黃文彬副教授等對本文初稿之指正,特此一併致謝。

參考文獻

- 丁秀雲, 李光友, 翟玉梅 (1996) 皺紋盤鮑經誘導後血淋巴液中一些因子變化的研究. 海洋與湖沼, 27(4): 362-367.
- 毛玉澤, 周毅, 楊紅生, 袁秀堂, 文海翔, 王如才 (2005) 長牡蠣(*Crossostrea gigas*)代謝率的季節變化及其與夏季死亡關係的探討. 海洋與湖沼, 36: 445-451.

- 王文琪, 徐申波, 姜令緒, 張玉娜, 李建 (2006) 雙殼類生物免疫力的研究進展. 海洋科學, 30(9): 69-74.
- 王廣軍, 謝駿, 余德光, 烏蘭, 胡朝瑩 (2007) 雜色鮑對底泥懸浮物脅迫的生理響應. 大連水產學院學報, 22: 352-356.
- 巫文隆, 戴仁祥 (1995) 臺東成功海域九孔螺的生殖生態研究. 貝類學報, 19: 51-60.
- 許晉榮 (2008) 不同年齡九孔的免疫力比較. 水產研究, 16(2): 59-65.
- 陳建初 (1983) 氮及其化合物. 水質分析, 九大圖書公司, 臺北, 85-103.
- 陳慕雁, 楊紅生 (2007) 貝類生態免疫研究進展. 海洋科學集刊, 48: 140-152.
- 章躍陵, 羅藝, 彭宣憲 (2007) 血藍蛋白功能研究新進展. 海洋科學, 32(2): 77-80.
- 曾子渝 (2006) 葡聚多糖對台灣鮑非特異免疫之影響. 國立台灣海洋大學 碩士論文, 基隆, 127 pp.
- 曾萬年, 林芳郁 (1976) 九孔生殖腺成熟之組織學研究. 中國貝誌, 3: 35-45.
- 楊鴻禧 (2005) 九孔. 臺灣農家要覽-漁業篇, 第三版, 財團法人豐年社, 臺北, 319-328.
- 楊鴻禧, 李榮涼, 陳敏隆, 丁雲源 (2003) 臺灣南部九孔幼生病害原因之調查研究. 九孔種苗生產疾病害防治(丁雲源, 楊鴻禧主編), 行政院農業委員會水產試驗所編印, 基隆, 79 pp.
- 劉世良, 麥康森 (2003) 貝類免疫系統和機理的研究進展. 海洋學報, 25: 95-105.
- 劉志鴻, 牟海津, 王清印 (2003) 軟體動物免疫相關酶研究進展. 海洋水產研究, 24: 86-90.
- Bachère, E., E. Mialhe, D. Noël, V. Boulo, A. Morvan and J. Rodriguez (1995) Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology. Aquaculture, 132: 17-32.
- Cartier, S., J. Pellerin, M. Fournier, E. Tamigneaux, L. Girault and N. Lemaire (2004) Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. Aquaculture, 241: 633-654.
- Chang, P. H., S. T. Kuo, S. H. Lai, H. S. Yang, Y. Y. Ting, C. L. Hsu and H. C. Chen (2005) Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis supertexta* in Taiwan. Dis Aquat. Org., 65: 23-27.
- Chen, H., K. Mai, W. Zhang, Z. Liufu, W. Xu and B. Tan (2005) Effects of dietary pyridoxine on immune responses in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. Fish Shellfish Immunol., 19: 241-252.
- Cheng, W., C. H. Li and J. C. Chen (2004a) Effect of dissolved oxygen on the immune response *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture, 232: 103-115.
- Cheng, W., F. M. Jung and J. C. Chen (2004b) The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. Fish Shellfish Immunol., 16: 295-306.
- Cheng, W., I. S. Hsiao and J. C. Chen (2004c) Effect of nitrite on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Dis. Aquat. Org., 60: 157-164.
- Cheng, W., I. S. Hsiao, C. H. Hu and J. C. Chen (2004d) Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Shellfish Immunol., 17: 235-243.
- Cheng, W., I. S. Hsiao, C. H. Hu and J. C. Chen (2004e) Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Shellfish Immunol., 17: 193-202.
- Cho, S. M. and W. G. Jeong (2005) Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 244: 383-387.
- Decker, H. and E. Jaenicke (2004) Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. Dev. Comp. Immunol., 28: 673-687.
- Duchemin, M. B., M. Fournier and M. Auffret (2007) Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture, 264: 73-81.
- Gagnaire, B., P. Soletchnik, P. Madec, P. Geairon, O. Le Moine and T. Renault (2006) Diploid and triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. Aquaculture, 254: 606-616.
- Hooper, C., R. Day, R. Slocombe, J. Handlinger and K. Benkendorff (2007) Stress and immune response in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. Fish Shellfish Immunol., 22: 363-379.
- Ishikawa, H., K. G. takahashi and K. Mori (1999) Annual changes in maturation of the gonad and phagocytic activity in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ongawa Bay, Miyagi Prefecture. Suisanzoshoku, 47: 519-525.
- Lee, K. K., P. C. Liu, Y. C. Chen and C. Y. Huang (2001)

- The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *J. Thermal Biol.*, 26: 585-587.
- Li, Y., J. G. Qin, C. A. Abbott, X. Li and K. Benkendorff (2007) Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oyster. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 293: R2353-R2362.
- Li, Y., J. G. Qin, X. Li and K. Benkendorff (2009a) Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture*, 286: 64-71.
- Li, Y., J. G. Qin, X. Li and K. Benkendorff (2009b) Spawning-dependent stress responses in Pacific oyster *Crassostrea gigas*: A simulated bacterial challenges in oyster. *Aquaculture*, 293: 164-171.
- Mulero, I., A. Garcíá-Ayala, J. Meseguer, and V. Mulero (2007) Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: a review. *Aquaculture*, 268: 244-250.
- Ordás, M. C., A. Ordás, C. Beloso and A. Figueras (2000) Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 597-609.
- Patrick, S., N. Faury and P. Goulletquer (2007) Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture*, 252: 328-338.
- Peters, R. and D. A. Raftos (2003) The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture*, 223: 29-39.
- Ragg, N. L. C. and H. H. Tayler (2006). Oxygen uptake, diffusion limitation, and diffusing capacity of the bipectinate gills of the abalone, *Haliotis iris* (Molluca: Prosobranchia). *Comp. Biochem. Physiol.*, 143A: 299-306.
- Siddiqui, N. I., R. F. Akosung and C. Gielens (2006) Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 348: 1138-1144.
- Travers, M. A., N. Le Goïc, S. Huchette, M. Koken, and C. Paillard (2008) Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 800-808.
- Xue, J., Y. Xu, L. Jin, G. Liu, Y. Sun, S. Li and J. Zhang (2008) Effects of traditional Chinese medicine on immune responses in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish Shellfish Immunol.*, 24: 752-758.
- Zar, J. H. (1999) *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall International, Inc. Upper Saddle River, NJ.

Seasonal Effects on Hemolymphatic Immune Parameters in Small Abalone (*Haliotis diversicolor*)

Jinn-Rong Hseu

Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The immune activity of mollusk is correlated with seasonal changes and reproductive cycle. Mass mortality of mollusk is often observed in certain seasons when the mollusk's immune activity depresses. Herein, the study investigated the seasonal effects on immune parameters of the broodstock of small abalone, *Haliotis diversicolor*, and the correlation between the parameters and environmental variables from March, 2008 to May, 2009. The results indicated that the total hemolymph protein, total hemocyte count, hemocyanin, and activities of alkaline phosphatase and pheoloxidase in hemolymph during the reproductive season, October to January, were lower than those during the non-reproductive season. Result of the Pearson correlation analysis showed that most of the immune parameters were positive correlated with water temperature ($P < 0.05$). Based on the results, it suggested that water temperature and gonadal maturation could produce synergistic impacts on immune parameters.

Key words: seasonal changes, immune activity, small abalone