

**台灣珊瑚礁常見共生藻藻種種原庫收集與保存
(正式報告)**

學校：國立高雄科技大學

指導教授：洪明昌

學生：王聖豪

研究期程：中華民國108年5月至108年12月

研究經費：新臺幣三萬元

海洋委員會補助研究

中華民國 一零八年 十一月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考，並不代表該會政策，該會保留採用與否之權利。」

目 次

表 次	3
圖 次	4
摘 要	5
第一章 前 言	6
第一節 研究緣起與問題背景	6
第二節 現況分析	7
第三節 研究目的及研究重點	8
第四節 預期目標	9
第二章 研究方法及過程.....	9
第三章 結果與討論.....	17
第四章 結論.....	21
參考資料.....	22

表 次

表一 f/2 培養液配方.....	12
表二 Walne 培養液配方.....	13
表三 G P M培養液配方.....	14
表四 B G - 1 1 培養液配方.....	15

圖 次

圖一：共生藻.....	6
圖二：研究計畫之實驗流程圖	10
圖三：實驗生物	11
圖四：美麗海葵之共生藻於不同培養基與 pH 值海水之生長折線圖.....	17
圖五：萼狀珊瑚之共生藻於不同培養基與 pH 值海水之生長折線圖.....	18
圖六：多指形軟珊瑚之共生藻於不同培養基與 pH 值海水之生長折線圖.....	18
圖七：菟葵之共生藻於不同培養基與 pH 值海水之生長折線圖.....	19

摘要

關鍵詞：珊瑚、共生藻、培養基、pH值

一、研究緣起

目前因環境變遷與海洋污染日益嚴重，導致大量珊瑚白化事件頻繁發生，意即體內共生藻離開珊瑚宿主或是死亡，造成珊瑚礁生態系正逐漸萎縮或消失，雖然許多政策或研究努力探討如何處理海洋環境污染和保育珊瑚礁，卻鮮少聽聞如何復育共生藻或是保存瀕臨消失於台灣的共生藻族群。

二、目的

珊瑚需要共生藻共生以提供足夠能量方能存活並生長，收集與保存台灣常見共生藻種原作為日後共生藻大量培養使用，更有利於未來復育珊瑚礁生態系的各項政策與計畫。

三、研究方法及過程

野外採集或購買的珊瑚、海葵順利飼養在室內循環水系統中，以供給共生藻萃取所需材料。比較不同共生藻類群在不同培養基合併不同 pH 值的海水中的生長速率及存活率變化，找出每種類群最適合的培養條件。

利用三種抗生素ampicillin、kanamycin和 streptomycin搭配使用，建立無菌的單一藻種 clone 培養系統，以達到純種無污染的效果供保種保存使用。

四、重要發現

發現不同共生藻群適合之生長pH值皆不同，最適培養基為Walne與f/2。

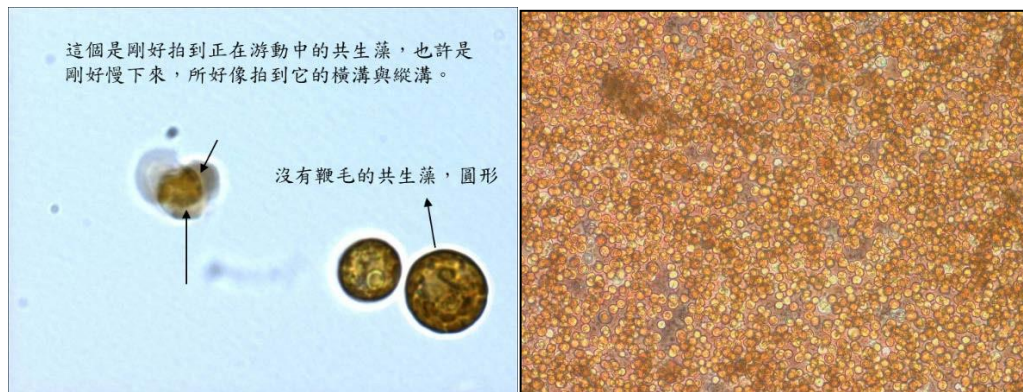
五、結論與展望

本研究計畫目的一收集與保存台灣多樣化的常見共生藻種原。此種原庫的初步成立，除了達到海洋生物多樣性的保存與進展外，甚至可做為未來海洋許多珍貴物種的保存與收集的範本，有助於政策的實施，更將帶領台灣再次突破這海洋共生領域的瓶頸，提供創新且重要的貢獻於世界上，並讓台灣在此領域中占有重要的一席之地。

第一章 前言

第一節 研究緣起與問題背景

珊瑚礁是石珊瑚目的動物形成的一種結構。此結構深深影響其周圍環境的物理、化學及生物因子，造就複雜的生態系統。深海與淺海均有珊瑚礁存在，它們由成千上萬的珊瑚蟲組成碳酸鈣骨骼經歷數百年至數萬年的生長而形成的。珊瑚礁為許多海洋動植物提供適宜的棲息環境，包括蠕蟲、軟體動物、海綿、棘皮動物與甲殼動物、甚至魚類等等，估計約占海洋總物種數目的 25%。大多數石珊瑚必須在大洋的透光層中生長，乃因珊瑚細胞內的共生渦鞭毛藻（簡稱共生藻）需要進行光合作用生產維持生命所需營養及共生關係。共生藻是單細胞微藻的一種，大多呈現金黃色外表如圖一，特別是珊瑚綱生物如石珊瑚和熱帶海葵體內中常見。大多數共生藻都是自營生物，共生關係中會提供宿主碳水化合物如葡萄糖、甘油、胺基酸等光合作用的產物。珊瑚礁生態系統中，共生藻最高可為珊瑚礁提供高達 90% 的能源需求，是主要生產者。同時，珊瑚亦提供共生藻保護、居所、營養（主要是含有氮與含磷有機廢物）與充足二氧化碳供應光合作用。因此珊瑚礁在清澈海水中的生長速度最高，若沒有共生藻與陽光，則珊瑚礁的生長速度非常慢，甚至不能形成，從而說明共生藻在珊瑚礁生態系中的重要地位。然而，目前因環境變遷與海洋污染日益嚴重，導致大量珊瑚白化事件頻繁發生，意即體內共生藻離開珊瑚宿主或是死亡，造成珊瑚礁生態系正逐漸萎縮或消失，雖然許多政策或研究努力探討如何處理海洋環境污染和保育珊瑚礁，卻鮮少聽聞如何復育共生藻或是保存瀕臨消失於台灣的共生藻族群。由於珊瑚需要共生藻共生以提供足夠能量方能存活並生長，收集與保存台灣常見共生藻種原作為日後共生藻大量培養使用，更有利於未來復育珊瑚礁生態系的各項政策與計畫。因此，本研究欲收集並保存台灣常見共生藻種原，甚至希望建立大量培養不同種共生藻的方法，觀察不同培養與營養條件對共生藻的生長影響，希望提供科學依據，為未來藻種保存的使用作準備。



圖一，共生藻。左圖為 1000X 的顯微鏡觀察，可發現共生藻共生藻呈現圓形，無鞭毛，非共生藻則呈現葫蘆形，並具有鞭毛可游動；右圖為 10X 的顯微鏡觀察，顯示大量培養的共生藻可在人為培養液中以高密度的數量生長與存活。

第二節 現況分析

一、珊瑚礁胞內共生 (endosymbiosis)

熱帶海域由於躍溫層 (thermocline) 的產生，致使表層海水與下層充滿營養鹽的海水無法混合。上層的營養鹽被耗盡後，因而無法補充致使大多數基礎生產者—浮游性植物，無法維持高族群量，基礎生產力低落。然而，高生產力及高生物多樣性的珊瑚礁生態系是個例外。造礁珊瑚與渦鞭毛藻之間的珊瑚礁生態系是一個成功演化的實證 (Stanley, 2006)，從三疊紀晚期 (約二億年前) 就已經存在 (Stanley and Swart, 1995)。渦鞭毛藻除與珊瑚共生外，也與其他海洋生物如腔腸動物海葵、水母與軟體動物砗磲貝等行共生關係，因而稱作共生藻 (zooxanthellae)。

牠們與宿主細胞之間的交互作用稱為“胞內共生”，如圖一所示，共生藻直接棲息於內胚層細胞內的共生小體 (symbiosome) 中。對共生藻而言，安全地棲息在宿主細胞內可避免受到掠食者襲擊，還能從宿主獲得生命所需無機物如二氧化碳 (aqueous CO_2) 與銨 (NH_4^+) (Trench, 1993; Yellowlees *et al.*, 2008)，並且宿主也從中獲利。超過 90% 的共生藻光合作用產物已知會轉移到宿主細胞內，供其使用 (Hallock and Schlager, 1986; Trench, 1993; Yellowlees *et al.*, 2008)，加速珊瑚鈣化 (Vandermeulen *et al.*, 1972; Scott and Jitts, 1977; Wooldridge, 2010)，促進珊瑚礁體的構築，兩者是互利共生關係。此一複雜的共生關係使珊瑚能扮演基礎生產者的角色，也增加珊瑚於熱帶貧瘠海域的競爭力，同時提供各式各樣的棲地與食物給其他海洋生物生長、繁殖，產生富饒的珊瑚生態系。

二、共生藻的分類與形態特徵

共生藻的型態分為兩種類型，共生型與非共生型。非共生型，也就是游離態的共生藻，在電子顯微鏡下的外觀類似裸甲藻，有兩條鞭毛分別從橫溝與縱溝延伸出來，用於海水中游動，細胞壁則由大大小小的萼板 (thecal plate) 組成，不同於一般高等植物的細胞壁，如圖二所示 (Hansen and Daugbjerg, 2009)。相比於非共生型，共生型共生藻的型態外觀改變相當巨大，除了鞭毛似乎消失了，體型也從原來游離態的葫蘆型轉變成圓球型，如圖三所示。兩種型態之間的劇烈差別，使共生藻在分類學上，比其他常見的渦鞭毛藻更加難以捉摸及定義。目前來說，能與腔腸動物行胞內共生的共生渦鞭毛藻皆隸屬於 *Symbiodinium* 屬，除了部分種類有明確之種名，其他則用“類群 (clade)”來做分類。共生藻的分類係由八個不同的類群所組成，分別是 A~H 類群 (Baker, 2003)。過去的科學家認為特定類群的共生藻只會專一地與某一特定種類的腔腸動物進行共生。然而，現今利用專一性引子進行 PCR 檢測的結果則發現非常有趣的現象，同一種珊瑚可以同時跟多種共生藻類群進行共生，但只有特定某種類群會是珊瑚體內最典型、最豐富，也是最主要的共生藻族群，而其他類群的共生藻則會以非常低，甚至幾乎無法偵測到的密度，存活於珊瑚體內 (Mieog *et al.*, 2007)。這個現象可能暗示彈性地

選擇與不同種類的共生藻共生，應是常出現在腔腸動物裡的共生策略模式；亦或是共生藻與任一種類腔腸動物宿主的共生建立模式都是很類似的，以致於不同種類的共生藻都能順利存活在腔腸動物體內。上述這兩項推論不禁讓人懷疑共生藻與宿主細胞之間，一定有特殊的交互作用發生在共生藻棲息的共生小體上，利用共生小體做為媒介，傳遞訊息引導胞內共生的完成及維持。這些交互作用必定與共生關係的建立、維持與崩解的機制有關。然而，現今對此胞器的分子調控機制，仍然尚未清晰，這也是本研究非常感興趣且想要一探究竟，加以解答的問題。

三、共生藻的萃取與培養基的選擇

從不同的無脊椎動物和常見生物宿主分離出共生藻通常在液體培養基（添加 f/2 medium 的海水或人造海水 ASP8a）中建立和維持，但缺點是易於產生難以去除的大量污染物。其中，已有研究透過抗生素使用與反覆稀釋來消除一些污染，然而這個過程耗時且不一致(Andersen and Kawachi, 2005)。此外尚有得到純種藻類細胞群的問題，傳統方法分離單顆藻類細胞（用以建立 clone 或作為轉基因細胞）涉及使用毛細管，因此分離超細玻璃移液管中的細胞是相對困難的(Guillard and Andersen, 2005)。另一種用來選擇出單一轉基因藻類細胞群方式是利用置於液體培養基上的洋菜膠進行 clone 的培養，但該方法需要每天添加新鮮液體培養基和抗生素(Lohuis *et al.*, 1998)，除繁瑣外也容易產生污染。洋菜膠雖常規用於培養微藻，但很少用於甲藻(Schoenberg *et al.*, 1980; Guillard and Andersen, 2005)，更不用提是共生渦鞭毛藻的培養。為解決此問題，在碑礫貝 *Tridacna crocea* 的研究有提出在洋菜膠製成的盤子上塗抹宿主的均質液，可有效促進共生藻的生長，並且該研究也順利分離出 clade C 與 D 的新型共生藻(Ishikura *et al.*, 2004)。顯然，在共生藻的萃取上尚未有研究確切指出如何萃取能降低或甚至去除可能的汙染。亦同時，在培養基的選擇上也較少論述，大多皆採用 f/2 medium 進行培養，尚無其他可能的培養基選擇，因此值得進行開發。

第三節 研究目的及研究重點

收集與保存台灣常見共生藻種原，並建立大量培養共生藻的方法。

珊瑚礁生態系最重要的生產者就是共生渦鞭毛藻，近年氣候變遷與劇烈氣候變異，造珊瑚白化事件頻繁發生，也就是第二次珊瑚大白化事件。白化事件致使大量共生藻離開珊瑚或海葵宿主，散佈於海水水層中變成其他生物的餌料，因此台灣許多珍貴或尚未研究透徹的共生藻可能因此而喪失，為求能讓珊瑚需要的共生藻生物多樣性能持續存在，收集與保存台灣常見共生藻種原作為日後共生藻大量培養使用，除非常必要外，更有利於未來復育珊瑚礁生態系的各項政策與計畫。

第四節 預期目標

因此研究計畫書預計要完成四項目標，詳細如下：

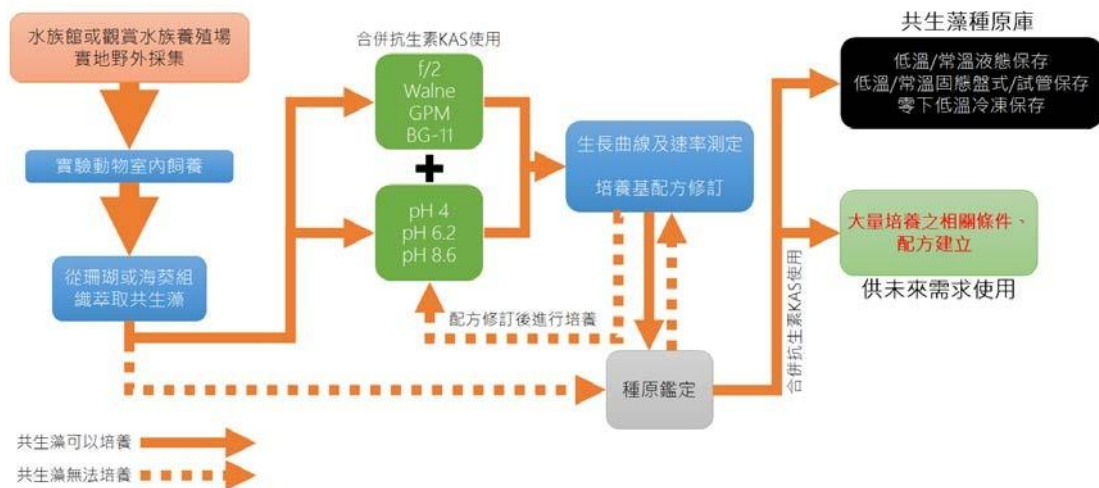
1. 收集 6 種以上台灣常見珊瑚或海葵等腔腸動物並即進行飼養以提供共生藻萃取使用。
2. 收集 3 種以上共生藻種原，並以 16S rRNA 序列作為鑑種依據。
3. 建立純種無細菌污染的共生藻藻種clones。
4. 建立 2 種以上適合大量培養共生藻的培養基配方及培養條件。

以上四要點若能順利執行，才能達成本研究計畫目的一收集與保存台灣多樣化的常見共生藻種原。此種原庫的初步成立，除了達到海洋生物多樣性的保存與進展外，甚至可做為未來海洋許多珍貴物種的保存與收集的範本，有助於政策的實施，更將帶領台灣再次突破這海洋共生領域的瓶頸，提供創新且重要的貢獻於世界上，並讓台灣在此領域中占有重要的一席之地。

第二章 研究方法及過程

實驗設計

本研究旨在收集、保存以及建立台灣許多珍貴或尚未研究透徹的共生藻類群，以求保存珍貴的共生藻種原及生物多樣性。為求能讓珊瑚需要的共生藻生物多樣性持續，供做日後相關共生藻研究領域及海洋生物政策使用，故目標期以透過篩選、純化及大量培養而完成。為達此目標，本研究首先選擇 6 種腔腸動物為實驗生物。種類如下，美麗海葵(*Aiptasia pulchella*)、菟葵(*Zoanthidae* spp.)、葷狀珊瑚(*Fungiidae* spp.)、多指形軟珊瑚(*Sinularia polydactyla*)、草皮珊瑚(*Pachyclavularia* spp.)和軸孔珊瑚(*Acropora* spp.)。預計可獲取 clade B1、C1、C3 與 D 四種，共生藻的取得來源是由從共生態的腔腸動物體內萃取出來，並加入含有抗生素之海水進行培養。此外，並進行野外採集或從各大水族館及養殖場獲得常見台灣珊瑚、海葵，以便後續飼養及進行共生藻抽取。新鮮抽取出的共生藻若能順利存活將立刻培養於 Walne、GPM、BG-11 和 f/2 共四種培養基中，並各自分成 pH 4、6.2 與 8.6 三種條件培養，觀察 4 週，判斷並修正找出最佳生長速率的培養基配方與條件。隨後，成功培養的共生藻則進行藻種 DNA 鑑定，確定屬於哪一種共生藻類群。若共生藻無法在萃取後存活，將搜尋文獻以及其他相同類群的配方進行培養，若能嘗試成功則一起進行大量培養與種原保存驗證配方與實驗條件，留做未來利用。種原保存採取三種模式，常溫/低溫合併液態/固態保存方式，以及低溫凍存（由於共生藻含有大量水分，此方法較不易成功，但仍回嘗試）液態保存是使用液態培養基做短時間培養保存；固態保存是將共生藻塗膜於洋菜膠盤上（9-cm 盤或 10-ml 試管）至於低溫凍存採用甘油或 DMSO 添加進行保存於-80℃或液態氮中，待 1 週、1 個月後分別進行測定是否可回復生命活力。詳細流程如下圖所示：



圖二，研究計畫之實驗流程圖。

為達成本研究目的，依據實驗設計設有五項要點需完成並驗證，分別如下：

1. 野外採集或購買的珊瑚、海葵順利飼養在室內循環水系統中，以供給共生藻萃取所需材料。
2. 以專一性引子針對共生藻 16S rRNA 的 ITS 區域進行定序，藉以鑑別出各種獲取到的共生藻類群，以便後續實驗進行。
3. 比較不同共生藻類群在不同培養基合併不同 pH 值的海水中第 1 至第 4 週的生長速率及存活率變化，找出每種類群最適合的培養條件。
4. 利用 KAS 三種抗生素搭配使用，建立無菌的單一藻種 clone 培養系統，以達到純種無汙染的效果供保種保存使用。
5. 闡述 pH 值與培養基的不同，進而影響共生藻培養成功與否。

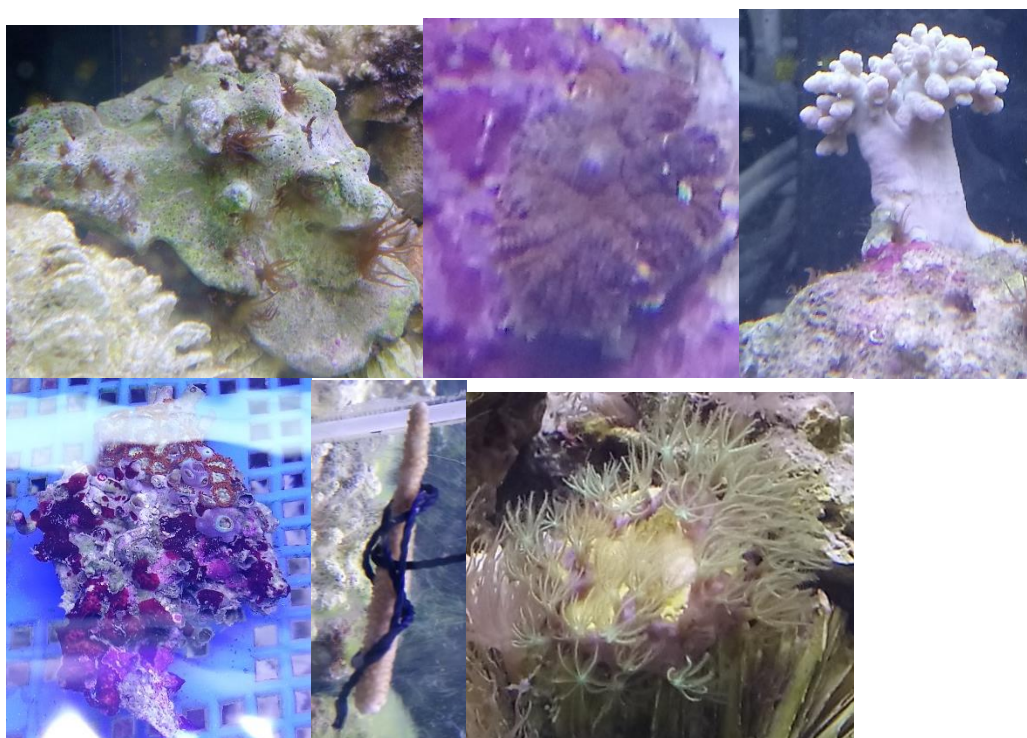
透過這五項要點的解惑，可有助於 pH 值與培養基對共生藻生長速率與存活率的影響，希望為復育台灣沿海珊瑚礁生態生物多樣性與共生藻的研究，提供科學依據與材料。

實驗生物取得與維持

本研究預計先行採用的共生藻宿主為美麗海葵 (*Aiptasia pulchella*)、菟葵 (*Zoanthidae* spp.)、葷狀珊瑚 (*Fungiidae* spp.)、多指形軟珊瑚 (*Sinularia polydactyla*)、草皮珊瑚 (*Pachyclavularia* spp.) 和軸孔珊瑚 (*Acropora* spp.) 皆為水族館購入，將所取得的珊瑚與海葵飼養在 90 cm × 40 cm × 45 cm、水體體積為 120 公升的強化玻璃纖維水族缸中，海水鹽度維持在 30 psu、水溫 26-28 °C、pH 8.0-8.5 之間，光照採 LED 燈白光及藍光，光照週期為白天 14 hr／夜晚 10 hr。

共生藻的取得來源是直接由從共生海葵體內隔離出來，將活的共生海葵以均質機 (HSIANGTAI, Model#HG-300) 進行均質，轉速為 4,000 rpm。均質完成後，將海葵均質液靜置 10 秒，使大部分未破碎完全的組織碎塊沉底，再將上層咖啡色混濁的上清液取出並進行低速離心來獲得共生藻團塊，接著進行洗滌，將共生藻團塊加入到新鮮海水中重新懸浮起來，然後再次低速離心，有助於除大部分殘留的海葵宿主細胞跟碎屑，此步驟重覆五

次。洗滌完成的共生藻團塊以適當的共生藻數目培養在 24 孔細胞培養盤中，並加入含有抗生素及濃縮培養液的海水來進行培養，並且每隔三天添加一次。共生藻培養溶液中使用的抗生素為 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin、50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin、50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin，其目的是為了抑制細菌生長或移除海水中的菌類。培養數週後，以倒立顯微鏡進行鏡檢，確認沒有細菌或黴菌污染後，再將含有共生藻的海水培養液轉移到 T75 flask 中，置放於裝有燈照設備的恆溫植物培養箱裡進行培養。培養箱溫度為 26 $^{\circ}\text{C}$ 、光照週期為白天 14hr／夜晚 10 hr，光照強度為 80 ~ 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。共生藻轉移到 T75 flask 後，每 10 天補充一次培養濃縮液，並檢測共生藻海水培養溶液的鹽度，務必維持鹽度在 35 psu 以下，避免共生藻白化死亡。以分光光度計測定共生藻海水培養溶液的 OD₆₀₀ 數值來監測共生藻的生長速率，當 OD 值超過 1.4 以上時，表示共生藻族群數目生長速率已達平原期，可進行繼代培養。



圖三，實驗生物。

左上圖為美麗海葵，中上圖為蕈狀珊瑚，右上圖為多指形軟珊瑚，

左下圖為菟葵，中下圖為軸孔珊瑚，右下圖為草皮珊瑚。

海水與培養基配置

海水由水族館購買，使用氫氧化鈉與鹽酸調整 pH 值後經高溫高壓滅菌。本次實驗用培養基之配方如下

表一、f/2 培養液配方

藥品名稱		每公升加入量	
貯備液 I	NaNO ₃	75	g
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5	g
	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	30	g
	蒸餾水	1000	ml
貯備液 II	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15	g
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36	g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O (9.8 g/L dH ₂ O)	1.0	ml
	a ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (6.3 g/L dH ₂ O)	1.0	ml
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (22.0 g/L dH ₂ O)	1.0	ml
	CoCl ₂ ·6H ₂ O (10.0 g/L dH ₂ O)	1.0	ml
	MnCl ₂ ·4H ₂ O (180.0 g/L dH ₂ O)	1.0	ml
	蒸餾水	1000	ml
貯備液 III	蒸餾水	1000	ml
	Vitamin B ₁₂ (1.0 g/L dH ₂ O)	1.0	ml
	Biotin (0.1 g/L dH ₂ O)	10.0	ml
	Vitamin B ₁	200	mg
使用量	海水	1000	ml
	貯備液 I	1	ml
	貯備液 II	1	ml
	貯備液 III	0.5	ml

表二、Walne 培養液配方

藥品名稱		使用量	
貯備液 I	NaNO ₃	100.00	g
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	20.00	g
	Na ₂ EDTA	45.00	g
	H ₃ BO ₃	33.60	g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.36	g
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.30	g
	貯備液 II	1	g
	蒸餾水	1,000	ml
	蒸餾水		
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.0	g
貯備液 III	蒸餾水	100	ml
	維生素 B ₁₂	10	mg
	維生素 B ₁	200	mg
貯備液 IV	蒸餾水	100	ml
	Na ₂ SiO ₃	6.589	g
使用量	海水	1,000	ml
	貯備液 I	1	ml

	貯備液 III	0.1	ml
	貯備液 IV(矽藻用)	1	ml

表三、GPM 培養液配方

藥品名稱	每公升加入量	
KNO ₃	202	mg
K ₂ HPO ₄	35	mg
維生素		
B ₁ (Thiamine)	1011	μg
H(Biotin)	2	μg
B ₁₂ (Cyanocobalamin)	1	μg
微量金屬		
Na ₂ EDTA	48.4	mg
FeCl ₃ 6H ₂ O	1.45	mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	4.31	mg
ZnCl ₂	0.312	mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.22	mg
H ₃ BO ₃	34.19	mg
土壤抽出液	15	ml

表四、BG-11 培養液配方

藥品名稱	每公升加入量	
NaNO ₃	1.5	g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.04	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	g
Citric Acid (檸檬酸)	0.006	g
Ferric ammonium citrate (檸檬酸鐵銨)	0.006	g
EDTA	0.001	g
Na ₂ CO ₃	0.02	g
A5+Co solution	1	ml
蒸餾水	1,000	ml
微量元素溶液A5		
H ₃ BO ₄	2.86	g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81	g
ZnSO ₄	0.222	g
Na ₂ MoO ₄	0.39	g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49.4	g

共生藻的生長評估

新鮮萃取出共生藻分別以三重複至放入有不同 pH 值海水的細胞培養盤中，培養 4 週。三重複的方式目的在減少誤差，測量時會以照相系統進行拍照與計算共生藻數目，避免人為目測計算錯誤。實驗培養期間固定在每日 16:00 紀錄，使用血球計數盤計算數量的變化。

統計分析

利用每日計算出的共生藻數目，使用折線圖分析生長變化。

共生藻藻種鑑定

活的海葵先以 4,000 rpm 的轉速均質後，隔離出來的共生藻團塊會以新鮮滅菌過的海水洗滌三次，然後再使用含有 0.02 % SDS 的滅菌海水快速洗滌三次，這步驟是為了去掉動物宿主海葵 RNA 的汙染，而離體培養的游離態共生藻只需要用新鮮滅菌海水洗滌三次。無論是共生藻或是游離態的共生藻，皆以在洗滌完成後直接放入液態氮裡急速冷凍，然後再將事先在 -20 °C 預冷好的研鉢與杵也浸泡在液態氮中，接著加入共生藻團塊在液態氮裡研磨成粉狀，最後以 10 ml TriZol 試劑搭配濕重 0.3 g 的共生藻團塊之比例，添加入研鉢當中與共生藻粉狀顆粒混合，因為溫度極低的關係，TriZol 液體會連同共生藻粉末一起結凍，需再用杵進行研磨，磨成粉狀後，邊混均邊等待其回溫後變成液體狀後，一樣依照 TriZol 試劑組的 RNA 抽取步驟進行共生藻 RNA 萃取，以獲得 total 16S rRNA。萃取出來的 RNA 皆經由分光光度計測定濃度、OD_{260/280} 與 OD_{260/230} 比值來確定品質，並且以 1 % 洋菜膠進行電泳分析，隨後再進行 PCR 以獲得 PCR 產物進行定序，並根據 NCBI 資料庫進行序列比對，確定共生藻的類群。PCR 中使用的引子序列為 ss3z (5'-AGCACTGCGTCACTCCGAATAATTCACCGG-3'

與 ss5z(5'-GCAGTTATARTTTATTTGATGGTYRCTGCTAC-3')。

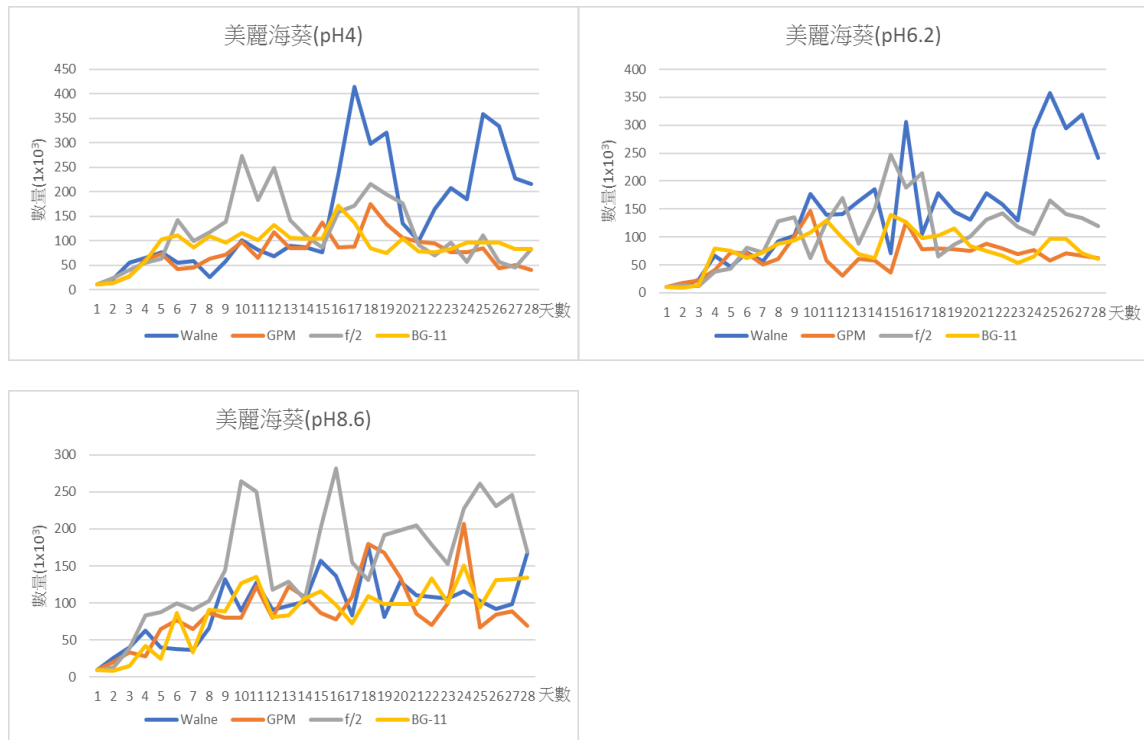
第三章 結果與討論

實驗生物的養殖

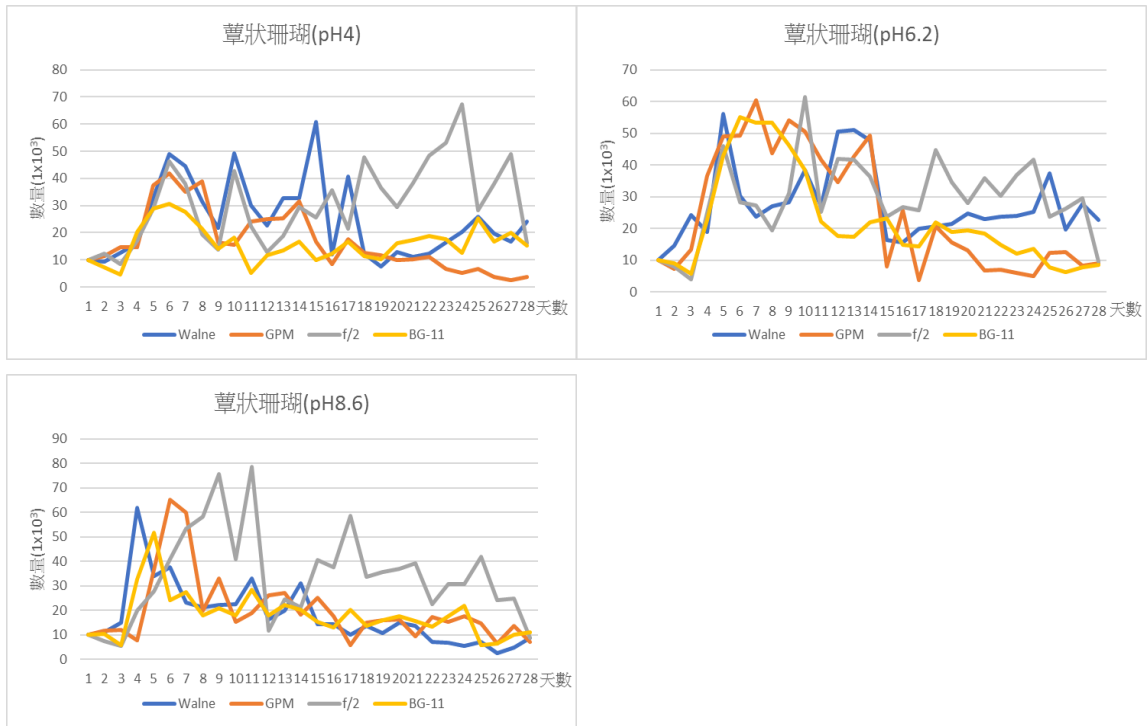
美麗海葵、菟葵、葦狀珊瑚、多指形軟珊瑚、草皮珊瑚和軸孔珊瑚，目前皆飼養 3 個月以上，除了多指形軟珊瑚之外，其餘珊瑚與海葵皆可存活。

建立適合培養共生藻的培養基配方及條件

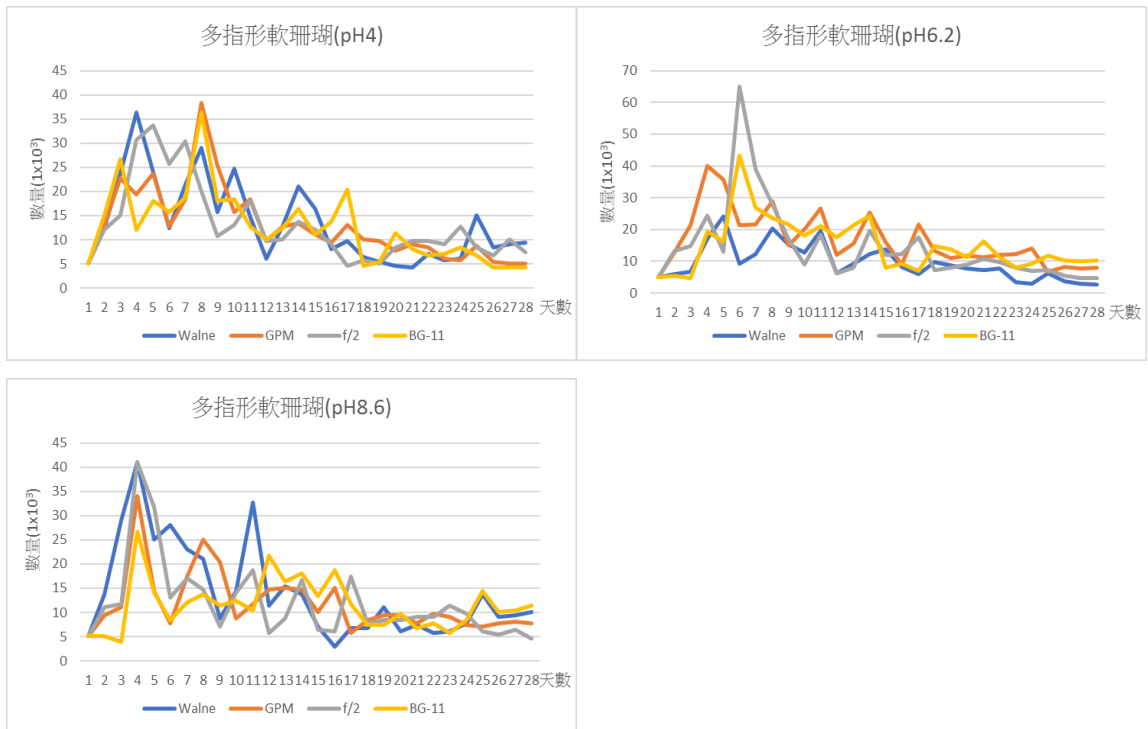
將美麗海葵、菟葵、葦狀珊瑚和多指形軟珊瑚取出的共生藻分別培養於不同 pH 值的海水與培養基中，進行三重複，培養 4 週，每日記錄數量與觀察生存狀況



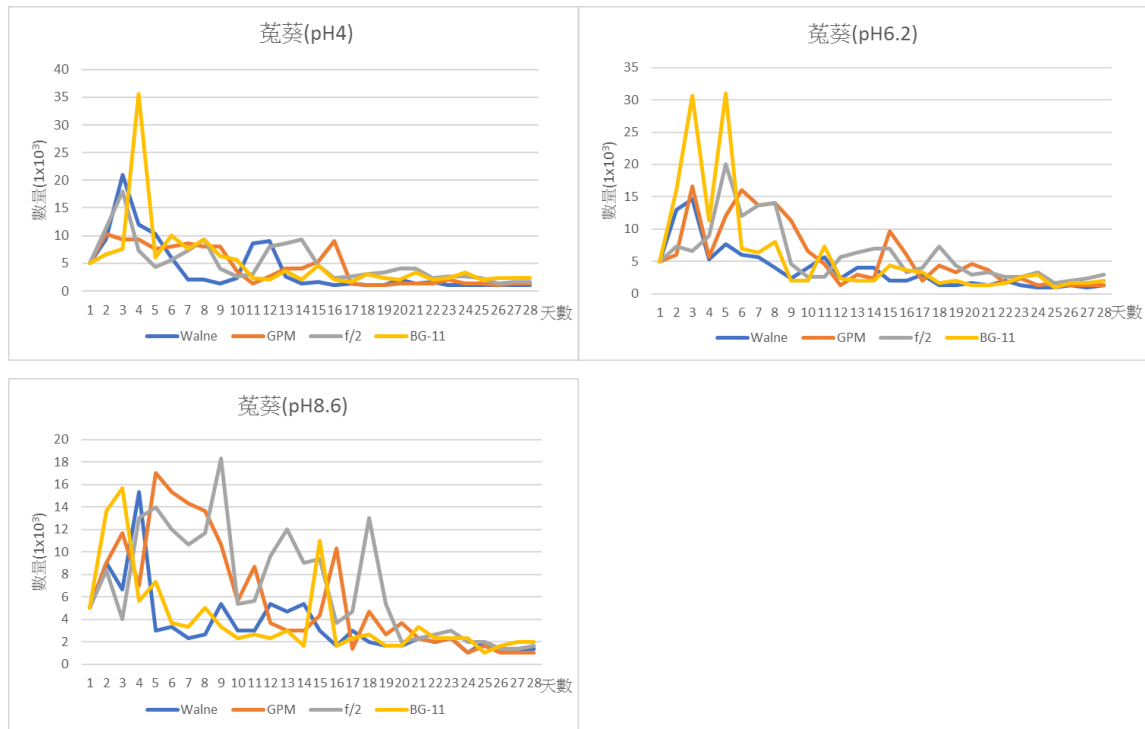
圖四，美麗海葵之共生藻於不同培養基與 pH 值海水之生長折線圖



圖五，草狀珊瑚之共生藻於不同培養基與 pH 值海水之生長折線圖



圖六，多指形軟珊瑚之共生藻於不同培養基與pH值海水之生長折線圖



圖七，菟葵之共生藻於不同培養基與 pH 值海水之生長折線圖

建立純種無污染的共生藻藻種

每3天添加抗生素與培養基之下培養的共生藻，已能達到無污染培養環境。

收集 3 種以上共生藻種原，並以 16S rRNA 序列作為鑑種依據

依據文獻判斷，已收集共生藻 clade B1、C1、C3 與 D 四種。

第四章 結論

實驗生物的養殖狀況

實驗計畫選擇的六種實驗生物，美麗海葵、葎狀珊瑚、多指形軟珊瑚、菟葵、草皮珊瑚和軸孔珊瑚，除了多指形軟珊瑚皆可存活在實驗建立起的環境條件中，因此還需了解什麼原因使多指形軟珊瑚無法存活。

建立適合培養共生藻的培養基配方及條件

六種實驗生物中，只有美麗海葵、葎狀珊瑚、多指形軟珊瑚、菟葵能順利分離培養，因此將其培養4週後，得出以下的生長與存活結果：

美麗海葵：三種pH值環境之下以pH8.6為最適合，培養基為Walne最適合。

葎狀珊瑚：三種pH值環境之下以pH4為最適合，培養基為f/2最適合。

多指形軟珊瑚：三種pH值環境之下以pH8.6為最適合，培養基為Walne最適合。

菟葵：三種pH值環境之下以pH4為最適合，培養基為BG-11最適合。

因此找出最適合培養共生藻之培養基為Walne和f/2，pH值則皆不同。

建立純種無污染的共生藻藻種

使用抗生素下營造的環境，發現到每三天添加一次的狀況下，無法持續維持無污染狀態，原因為產生抗藥性與生長空間不足等因素，因此在4天內，必須進行繼代培養，即可提高培養成功率。

收集 3 種以上共生藻種原，並以 16S rRNA 序列作為鑑種依據

依據文獻判斷，已收集共生藻 clade B1、C1、C3 與 D 四種，未來還需要更多研究鑑定。

未來展望

未來目標研發改良出可使各種珊瑚海葵之共生藻生長存活之培養基，同時找出不同培養基與 pH 值的最佳配合條件，將有助於更了解共生藻培養條件，將對於未來培養共生藻具有重大貢獻。

參考資料

Andersen, R. and M. Kawachi, 2005. Traditional microalgae isolation techniques. pp: 83-100.

Baker, A.C., 2003. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, ecology, and biogeography of symbiodinium. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 34: 661-689. Available from <http://www.jstor.org/stable/30033790>.

Guillard, R.R.L. and R.A. Andersen, 2005. Purification methods for microalgae.

Hallock, P. and W. Schlager, 1986. Nutrient excess and the demise of coral reefs and carbonate platforms. Palaios, 1(4): 389-398. Available from <http://palaaios.sepmonline.org/cgi/content/abstract/1/4/389>.

Hansen, G. and N. Daugbjerg, 2009. Symbiodinium natans sp. Nov.: A “free-living” dinoflagellate from tenerife (northeast-atlantic ocean)1. Journal of Phycology, 45(1): 251-263. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00621.x>. DOI 10.1111/j.1529-8817.2008.00621.x.

Ishikura, M., K. Hagiwara, K. Takishita, M. Haga, K. Iwai and T. Maruyama,

2004. Isolation of new symbiodinium strains from tridacnid giant clam (*Tridacna crocea*) and sea slug (*Pteraeolidia ianthina*) using culture medium containing giant clam tissue homogenate. *Marine Biotechnology*, 6(4): 378-385. Available from <https://doi.org/10.1007/s10126-004-1800-7>. DOI 10.1007/s10126-004-1800-7.

Lohuis, M.R. Te and D.J. Miller, 1998. Genetic transformation of dinoflagellates (amphidinium and symbiodinium): Expression of *gus* in microalgae using heterologous promoter constructs. *The Plant Journal*, 13(3): 427-435. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-313X.1998.00040.x>. DOI 10.1046/j.1365-313X.1998.00040.x.

Mieog, J.C., M.J.H. Oppen, N.E. Cantin, W.T. Stam and J.L. Olsen, 2007. Real-time pcr reveals a high incidence of symbiodinium clade d at low levels in four scleractinian corals across the great barrier reef: Implications for symbiont shuffling. *Coral Reefs*, 26(3): 449-457. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-007-0244-8>. DOI 10.1007/s00338-007-0244-8.

Schoenberg, D.A., R.K. Trench and C. Smith David, 1980. Genetic variation in symbiodinium (=gymnodinium) *microadriaticum freudenthal*, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. II. Morphological variation in symbiodinium *microadriaticum*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 207(1169): 429-444. Available from <https://doi.org/10.1098/rspb.1980.0032> [Accessed 2019/03/19]. DOI 10.1098/rspb.1980.0032.

Scott, B.D. and H.R. Jitts, 1977. Photosynthesis of phytoplankton and zooxanthellae on a coral reef. *Marine Biology*, 41(4): 307-315. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/BF00389097>. DOI 10.1007/bf00389097.

Soffer, N., 2009. Practical applications for symbiodinium grown on solid media: Culturing, fluorometry and transformations.

Stanley, G.D., 2006. Photosymbiosis and the evolution of modern coral reefs. Science, 312(5775):857-858. Available from

<http://www.sciencemag.org/content/312/5775/857.short>

DOI 10.1126/science.1123701.

Stanley, G.D. and P.K. Swart, 1995. Evolution of the coral-zooxanthellae symbiosis during the triassic; a geochemical approach. Paleobiology, 21(2): 179-199. Available from

<http://paleobiol.geoscienceworld.org/content/21/2/179.short>.

Trench, R.K., 1993. Microalgal-invertebrate symbioses - a review. Endocytobiosis and Cell Research, 9(2-3): 135-175. Available from citeulike-article-id:511409.

Vandermeulen, J.H., N.D. Davis and L. Muscatine, 1972. The effect of inhibitors of photosynthesis on zooxanthellae in corals and other marine invertebrates. Marine Biology, 16(3): 185-191. Available from

<http://dx.doi.org/10.1007/BF00346940>. DOI 10.1007/bf00346940.

Wooldridge, S.A., 2010. Is the coral-algae symbiosis really 'mutually beneficial' for the partners? BioEssays, 32(7): 615-625. Available from

<http://dx.doi.org/10.1002/bies.200900182>. DOI 10.1002/bies.200900182.