



# Comparison of oligotrich ciliate composition under two different methods

劉溫馨<sup>1\*</sup>、蔡昇芳<sup>2</sup>、陳韋廷<sup>1</sup>、蔣國平<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>國立臺灣海洋大學海洋環境與生態研究所

<sup>2</sup>國立臺灣海洋大學海洋中心

寡毛綱纖毛蟲種類組成及數量變化，一般以Lugol's iodine solution固定，於倒立式顯微鏡下觀察形態，並區分為 *Strombidium*、*Strobilidium*、*Mesodinium*、*Tontonia*和 *Tintinnid* 五大類。本實驗以新方法調查種類組成，並同時探討外部形態與分子序列所得鑑定結果是否有差異，本研究於台灣東北沿岸採集樣本，並進行拍照、紀錄大小，作為鑑定依據。隨後將蟲體進行single-cell PCR，所得序列為分子辨種依據。發現兩鑑定種類之方法所得結果有極大差異。此結果顯示僅依外部形態作為分類依據並應用於生態研究，呈現的結果具有一定程度的誤差。

## 前言

海洋中之微小動物性浮游生物以寡毛綱(Oligotricha)纖毛蟲為主要優勢種，可消耗水體間基礎生產量的4-60% (Verity, 1985)。纖毛蟲種類繁多，且此微生物群聚會隨著不同的生物與非生物因子影響而改變(Fuhrman et al., 2006)。為了對海洋生態系有更進一步的了解，種類鑑別是必須進行的研究。然而傳統顯微鏡觀察，僅依蟲體外部形態特徵作為纖毛蟲的辨種依據並在此條件下區分為五大類。由於Aunger (2008)提出single-cell PCR法，因此本研究探討此方法應用於生態研究之可行性，並嘗試了解兩辨種方法是否存在著鑑定差異。

## 材料與方法

採樣後於倒立式顯微鏡下紀錄蟲體形態、大小及拍照。之後以毛細管將單一蟲體挑起進行PCR以獲得序列，並於NCBI比對SSU rDNA基因序列對應之種類。

## 結果與討論



圖一、倒立式顯微鏡下所辨識之五大類寡毛綱纖毛蟲：(A) *Strombidium* spp.、(B) *Strobilidium* spp.、(C) *Mesodinium* spp.、(D) *Tontonia* spp.、(E) *Tintinnid*。

表一、為16個單一細胞樣本。以倒立式顯微鏡下觀察外部特徵之分類，與SSU rDNA序列之種類比較。以桃紅色標記的則是形態分類與定序結果不符。

編號	形態	SSU rDNA
3	<i>Mesodinium</i>	<i>Myrionecta rubra</i>
5	<i>Mesodinium</i>	<i>Myrionecta rubra</i>
11	<i>Strombidium</i>	<i>Strombidium oculatum</i>
16	<i>Strombidium</i>	<i>Spirotontonia taiwanica</i>
17	<i>Mesodinium</i>	Uncultured eukaryote
18	<i>Mesodinium</i>	<i>Myrionecta rubra</i>
21	<i>Strombidium</i>	<i>Williophrya maedai</i>
22	<i>Mesodinium</i>	<i>Myrionecta rubra</i>
24	<i>Mesodinium</i>	<i>Mesodinium rubrum</i>
33	<i>Mesodinium</i>	<i>Mesodinium</i> cf.
34	<i>Mesodinium</i>	Uncultured eukaryote
35	<i>Strombidium</i>	<i>Spirotontonia taiwanica</i>
36	<i>Mesodinium</i>	<i>Myrionecta rubra</i>
37	<i>Mesodinium</i>	<i>Myrionecta rubra</i>
38	<i>Strombidium</i>	<i>Spirotontonia taiwanica</i>
41	<i>Strombidium</i>	<i>Spirotontonia taiwanica</i>

表二、外部形態分類結果之判別率。僅有 *Mesodinium* 及 *Tintinnid* ciliate 沒有誤判，而其他三種皆有誤判之可能。

形態	<i>Strombidium</i> (13)	<i>Strobilidium</i> (2)	<i>Mesodinium</i> (14)	<i>Tontonia</i> (3)	<i>Tintinnid</i> (1)
<i>Strombidium</i>	7 (53.8%)	0	0	0	0
<i>Strobilidium</i>	0	0	0	0	0
<i>Mesodinium</i>	0	1 (50%)	14 (100%)	0	0
<i>Tontonia</i>	4 (30.8%)	1 (50%)	0	1 (33%)	0
<i>Tintinnid</i>	2 (15.4%)	0	0	1 (33%)	1 (100%)

## 結論

1. 目前已32條SSU rDNA序列中，有9條定序結果(28.1%)與顯微鏡下觀察結果不符。
2. *Tintinnid*容易受到固定刺激，造成蟲體外殼特徵脫落。
3. 由表一及表二可知，除 *Mesodinium* spp.、*Tintinnid* 外，其他三大類僅以其外部形態區分有誤判的可能。

圖二、寡毛綱纖毛蟲18S rDNA序列之ML建構之親緣演化關係樹。

# 以倒立式顯微鏡判別寡毛類纖毛蟲種類組成之準確性—與 18s rDNA 比較之結果

劉溫馨<sup>1\*</sup>、蔣國平<sup>1</sup>、蔡昇芳<sup>2</sup>

1. 國立臺灣海洋大學海洋環境與生態研究所 2. 國立臺灣海洋大學海洋中心

寡毛亞綱纖毛蟲種類組成及數量變化，一般以 Lugol's iodine solution 固定，於倒立式顯微鏡下觀察形態，並區分為 *Strombidium*、*Strobilidium*、*Mesodinium*、*Tontonia* 和 *Tintinnida* 五大類。為探討外部形態與分子序列所得鑑種結果是否有差異，本研究於台灣東北沿岸採集樣本，並進行拍照、紀錄大小及數量，作為鑑種依據。隨後將蟲體進行 single-cell PCR，所得序列為分子辨種依據。發現兩鑑定種類之方法所得結果有極大差異。據外部形態辨識為 *Strombidium* 屬的無殼類纖毛蟲，其序列呈現為 *Tintinnopsis* 屬的有殼類纖毛蟲。推測蟲體於固定前受到刺激而逃離殼外，因此於倒立式顯微鏡下並未發現其外殼特徵，而歸類於 *Strombidium* 屬。此結果顯示僅依外部形態作為分類依據並應用於生態研究，呈現的結果具有一定程度的誤差，尤其在有殼類纖毛蟲為優勢種的環境下更為嚴重。

關鍵字：纖毛蟲、18s rDNA、single-cell PCR

## Comparison of oligotrich ciliate composition and abundance under two different methods

Wen-Hsin Liu<sup>1\*</sup>, Kuo-Ping Chiang<sup>1</sup>, Sheng-Fang Tsai<sup>2</sup>

1. Institute of Marine Environment and Ecology, National Taiwan Ocean University

2. Center of Excellence for the Oceans, National Taiwan Ocean University

In the traditional studies on the composition and abundance of oligotrich ciliates, the Lugol's iodine fixation method is used for the measurement and identification of the oligotrichs, i.e. *Strombidium*, *Strobilidium*, *Mesodinium*, *Tontonia*, and *Tintinnida*. To compare the results from two different methods, i.e., traditional morphological identification under the microscopy and molecular information via single-cell sequence, we examined oligotrichs collected from the coastal waters of northeastern Taiwan by non-acid Lugol's iodine fixation method. We photographed, recorded shape, and measured size of each cell, then transferred each cell under the inverted microscope to an eppendorf.

There are significant differences between traditional and molecular methods in the identification of oligotrichs. Some aloricate oligotrich ciliates identified as the group of the genus *Strombidium* according to morphological characteristics are showed to be the loricate group of the genus *Tintinnopsis* according to molecular sequencing, indicating that *Tintinnopsis* ciliates could escape from their lorica under certain stress, e.g., when being fixed. The results show that the traditional morphological identification may provide erroneous information if the oligotrich assemblage is dominated by loricate ciliates.

Key words: ciliate, 18s rDNA, single-cell PCR