



探討大型矽藻 *Ditylum brightwellii* 在不同氮環境下 硝酸運輸基因表現情形

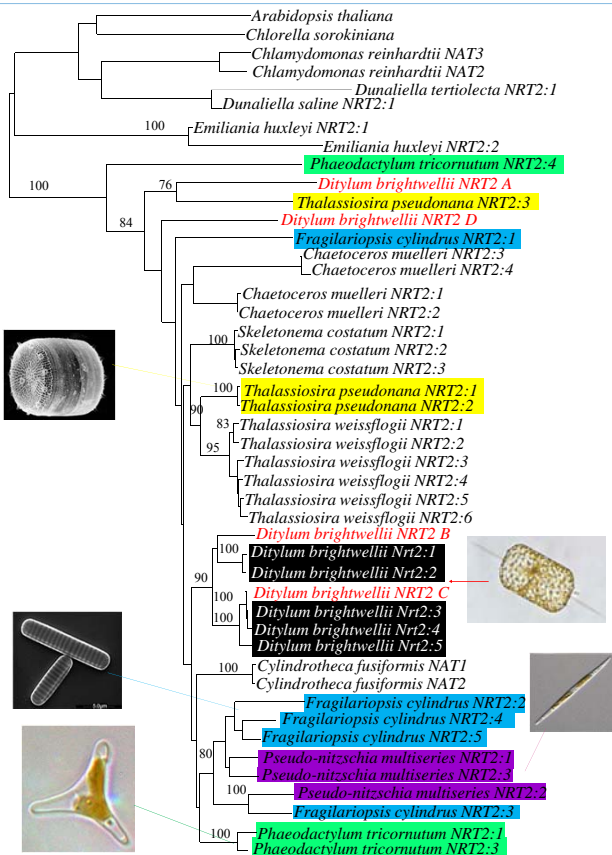
黃思穎¹、康利國¹、張正²

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生物研究所

前言

浮游植物在海洋生態系中扮演重要的初級生產者角色，而在海洋環境中氮營養鹽經常被認為是限制浮游植物生長的主要因素之一。在海洋中主要的無機氮源為銨鹽及硝酸鹽，一般認為在細胞利用氮源方面，小細胞因體型小、體表面積比較大有利於利用銨鹽；相對在大細胞方面因體內具有儲存氮源的胞器，可吸收環境中過多的硝酸儲存於體內，所以經常在硝酸較高的環境中成為優勢種。為探討細胞對於氮源的利用，浮游植物製造膜上的硝酸運輸蛋白 (*NRT2*) 來吸收硝酸，而其基因 (*Nrt2*) 則會因應不同氮源而有不同的表現情形，因此被提出可作為在矽藻中判斷氮源利用情形的指標。此次實驗的矽藻 *Ditylum brightwellii* 為海洋中常見的藻種之一，為矽藻體型中較大，主要常見於沿岸水域，因此利用 *D. brightwellii* *Nrt2* 的表現來比較大型矽藻對不同氮源的利用情形。

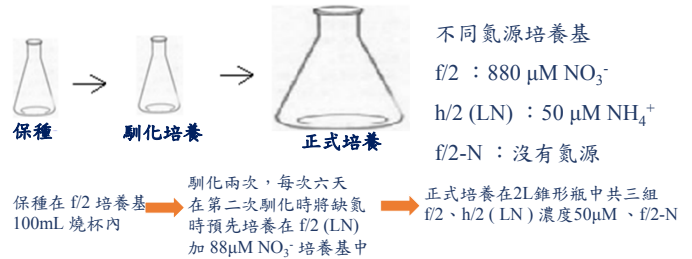
為了探索 *D. brightwellii* *Nrt2* 基因家族，首先利用海洋真核微生物全轉錄體計畫 (Keeling et al, 2014) 中的 *D. brightwellii* 全轉錄體資料庫進行與 *Nrt2* 相似序列的比對，並以實驗室培養的 *D. brightwellii* 再次定序確認，目前共發現 4 條與 *Nrt2* 相似序列，暫時命名為 *Nrt2* A、B、C、D。以胺基酸序列進行親緣關係樹分析，在矽藻模式物種中基本上都有三種以上的 *NRT2* 形式存在，在 *D. brightwellii* 部分 *NRT2* B、*NRT2* C 與之前文獻相似；而 *NRT2* A、*NRT2* D 則是目前文獻中尚未報導的 *NRT2* 基因。



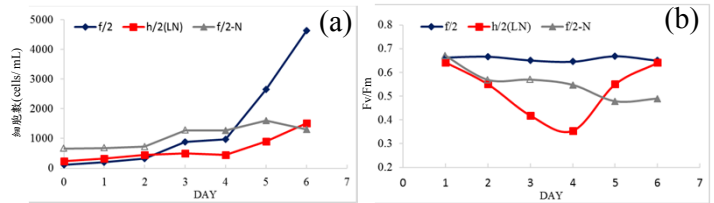
圖(一)利用胺基酸序列所建構之親緣關係樹。構樹所參考的序列來自 (Song and Ward, 2007) 文獻內所提供之藻種編號與實驗室藻種定序的結果。背景有黃色、藍色、綠色及紫色的矽藻為基因組全解的矽藻模式物種，黑色背景為序列資料庫中 *D. brightwellii* 已發表之序列，紅色字體為利用實驗室藻種重新定序出的四種形式。

參考文獻

- Keeling, P. J., Burki, F. H. M., Wilcox, B. Allam, E. E., Allen, L. A., Amaral-Zettler, et al. 2014. The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): Illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing. *PLoS Biol* 12(6): e1001889.
- Song, B., and B. B. Ward. 2007. Molecular cloning and characterization of high-affinity nitrate transporters in marine phytoplankton. *J. Phycol.* 43:542-552
- Kang, L. K., S. P. L. Hwang, H. J. Lin, P. C. Chen, and J. Chang. 2009. Establishment of minimal and maximal transcript levels for nitrate transporter genes for detecting nitrogen deficiency in the marine phytoplankton *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 45:864-872.

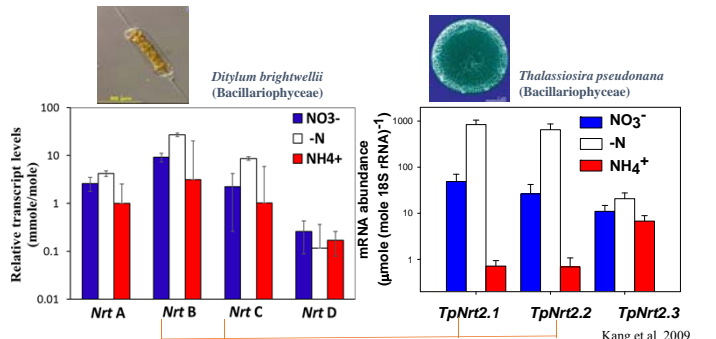


圖(二)矽藻 *D. brightwellii* 培養流程



圖(三)矽藻 *D. brightwellii* 在不同氮源培養基中之生長狀況。
(a) 培養細胞數生長情形 (b) 光合作用效率 (Fv/Fm) 變化情形

培養實驗顯示 *D. brightwellii* 在以硝酸鹽為氮源的培養基中有較高生長率；而培養在以銨為氮源下，培養初期停滯生長，在第四天後才逐漸增加，這顯示細胞生長明顯受到銨的抑制；將細胞轉到缺氮條件下，則發現細胞仍可持續生長增加 2.4 倍，顯示細胞可能利用體內儲存氮源持續生長。以光合作用效率 (Fv/Fm) 來判斷細胞的健康狀況，培養在以硝酸為氮源的培養基中，Fv/Fm 維持在較高平穩的狀態平均為 0.66；而以銨為氮源中則發現在培養前幾天 Fv/Fm 持續下降到 0.35，第四天後回復到 0.64；而在缺氮部分則是隨著培養天數逐漸下降，由細胞數及 Fv/Fm 顯示在第四天後受到氮源不足限制。



圖(四)矽藻 *D. brightwellii* 與 *T. pseudonana* 在不同氮源下 *Nrt2* 基因家族之表現情形。

將 *D. brightwellii* 培養在不同氮源下利用即時定量 PCR 觀察硝酸基因家族之表現情形。培養在以硝酸為氮源下 *Nrt2* B 及 *Nrt2* C 有表現，在缺氮則分別提高 2 倍及 3 倍之表現量，培養在以銨為氮源下表現量則明顯被抑制，此一基因表現模式與 *T. pseudonana* *Nrt 2.1*、*Nrt2.2* 表現模式相似，但表現量變化範圍約 1/100 倍；相對 *Nrt2* A 及 *Nrt2* D 的基因表現情形較不受氮源影響，維持在相對穩定表現量。由此顯示細胞較大 *D. brightwellii* 對 *Nrt2* 基因調節相對於小細胞 *T. pseudonana* 較不敏感，可能與 *D. brightwellii* 生長受銨鹽限制有關，仍有待進一步實驗來確認 *D. brightwellii* 對銨的利用情形。