

台灣東北部沿岸海域超微真核綠藻之種類組成研究

陳亮吟¹、林芸琪²、蔣國平^{1,2}

1. 國立臺灣海洋大學海洋環境化學與生態研究所

2. 國立臺灣海洋大學環境生物與漁業科學系

前言

海洋中細胞大小<2 μm的浮游生物，稱之超微浮游生物(picophytoplankton)，其中包含兩大類，其一為行光合作用的藍綠細菌(cyanobacteria)，其二為超微真核植物(photosynthetic picoeukaryotes)。兩者都是廣泛分布在大洋中，雖然超微真核植物數量遠不及藍綠細菌，但貢獻的生物量(biomass)可達到高達76%，在海洋生地化的循環中扮演重要角色(Worden et al. 2004)。Worden and Not(2008)指出超微真核植物是海洋當中的主要基礎生產者，因此了解其種類組成是重要議題。而超微真核浮游生物多樣性調查，最早開始在赤道太平洋，研究結果發現超微真核浮游生物之多樣性很高並且存在許多未知種類(Moon-van der Staay et al. 2001)。接著在全球許多海域包括大西洋(Not et al. 2007, Kirkham et al. 2011)、地中海(Viprey et al. 2008)、極區(Not et al. 2005)、東太平洋(Worden 2006, Shi et al. 2009)、印度洋(Not et al. 2008)都已陸續建立18S rRNA基因多樣性資料庫，唯獨在西太平洋的調查是完全沒有進行調查(Kirkham et al. 2013)。

縱觀全球有關超微真核植物研究，目前研究最詳細的就屬綠藻門(Chlorophyta)-青綠藻綱(Prasinophyceae)-Mamiellales目。而Mamiellales目下包含有Micromonas、Ostreococcus、Bathycoccus及Mantoniella。其中Micromonas是屬於全球廣泛分布的種類，其分布趨勢是沿岸數量比外洋多(Not et al. 2004, Foulon et al. 2008)。目前根據18S rRNA基因可將Micromonas分成5個分支(Slapeta et al. 2006, Worden 2006)，除了在北極地區發現特殊的生態型(Lovejoy et al. 2007)外，其他Micromonas分支在文獻上並沒有指出有明顯區域區隔而是廣泛分佈之廣域性種類。

目前超微真核植物在熱帶與副熱帶海域的研究相當缺乏，也很少有西太平洋海域之相關研究。本研究將利用流式細胞儀針對超微真核植物進行篩選並且使用真核生物18S rRNA基因通用的引子調查超微真核植物。其研究目的是了解西北太平洋副熱帶沿岸海域超微真核植物中的綠藻種類組成，並與親緣關係做進一步探討。最後將種類組成之結果與其他相關文獻進行比較，藉此了解不同Micromonas分支的地理分布。

材料方法

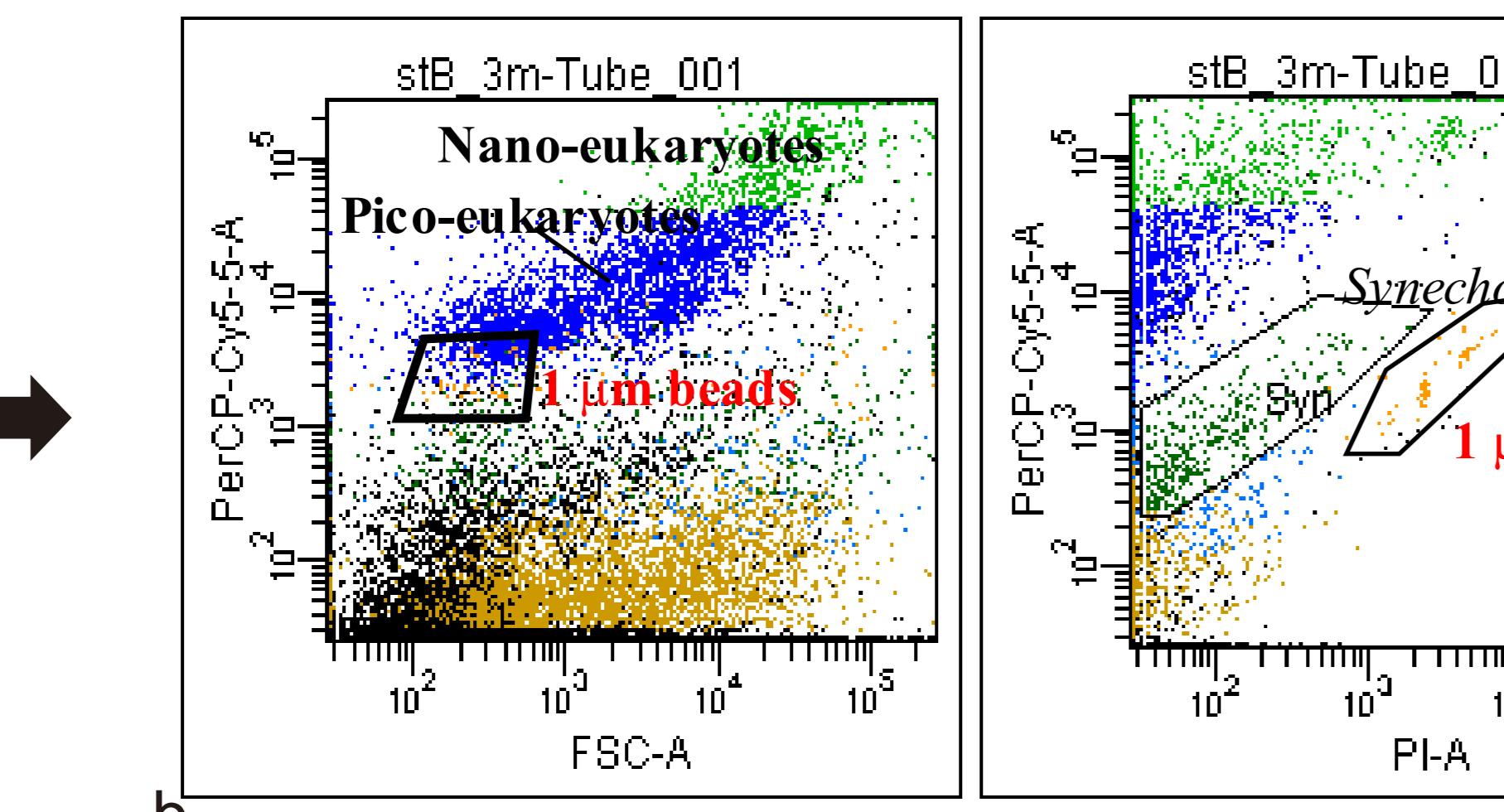
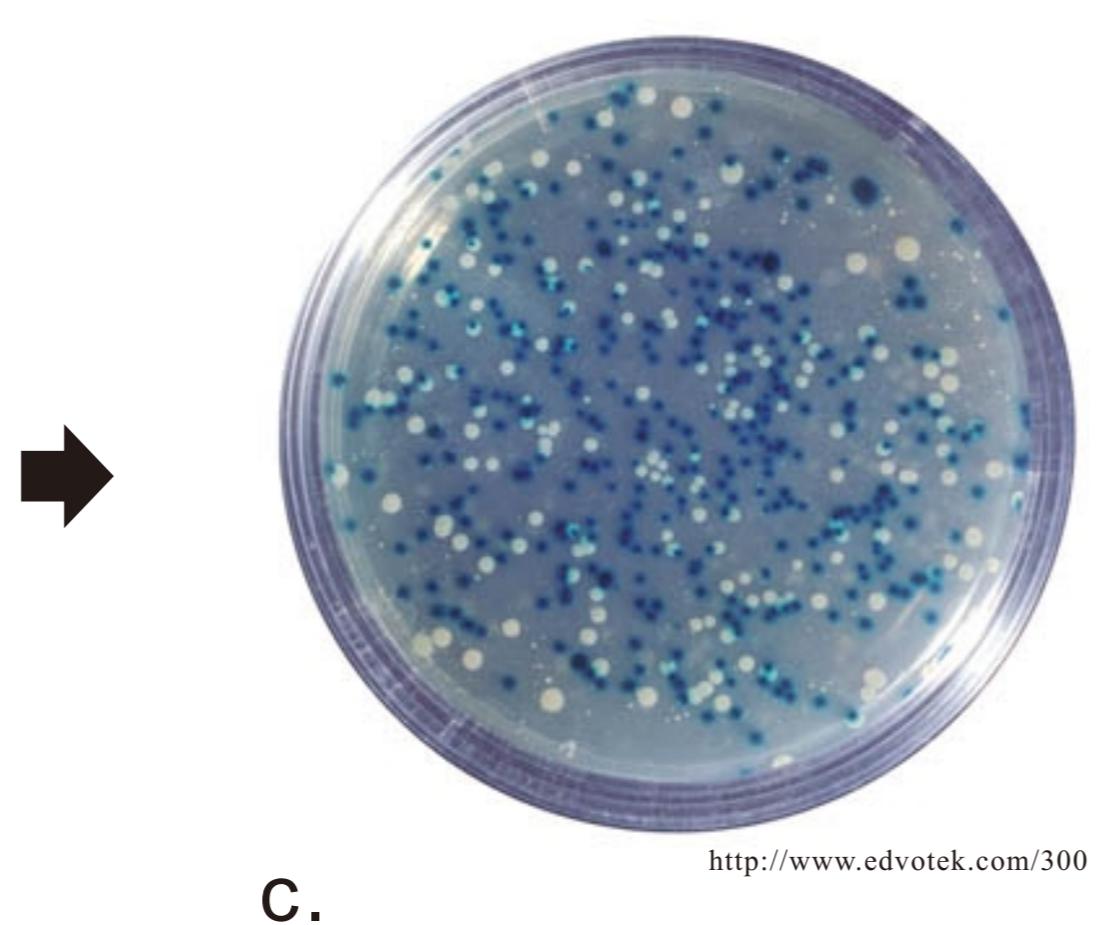


圖1. 材料方法流程圖(a)採樣地點及測站位置B站(121.81°E, 25.15°N), D站(121.85°E, 25.23°N), 採樣深度為表層和葉綠素極大層(deep chlorophyll maximum; DCM)。兩側站之間距離約8公里。(b)2012年7月1日B站表層樣本之流式細胞儀分析。FSC-A為前方散射，指細胞大小；PerCP-Cy5-5-A為紅色螢光，是葉綠素在藍色激發光下所發的紅色螢光；PI-A為橘色螢光，是藻紅素在藍色激發光下所發的橘色螢光。篩選目標為含有紅色螢光，且大小在1 μm螢光標示珠子上下的藍色部分，其餘淺綠色為細胞較大的自營性真核生物；深綠色為Synechococcus。(c)將純化後的目標基因片段放入載體進行接合作用(Ligation)，再放入勝任細胞(*Escherichia coli* DH5-α)進行轉型作用(Transformation)。之後挑選培養基上可能載體帶有目標基因的白色菌落。



c.

結果

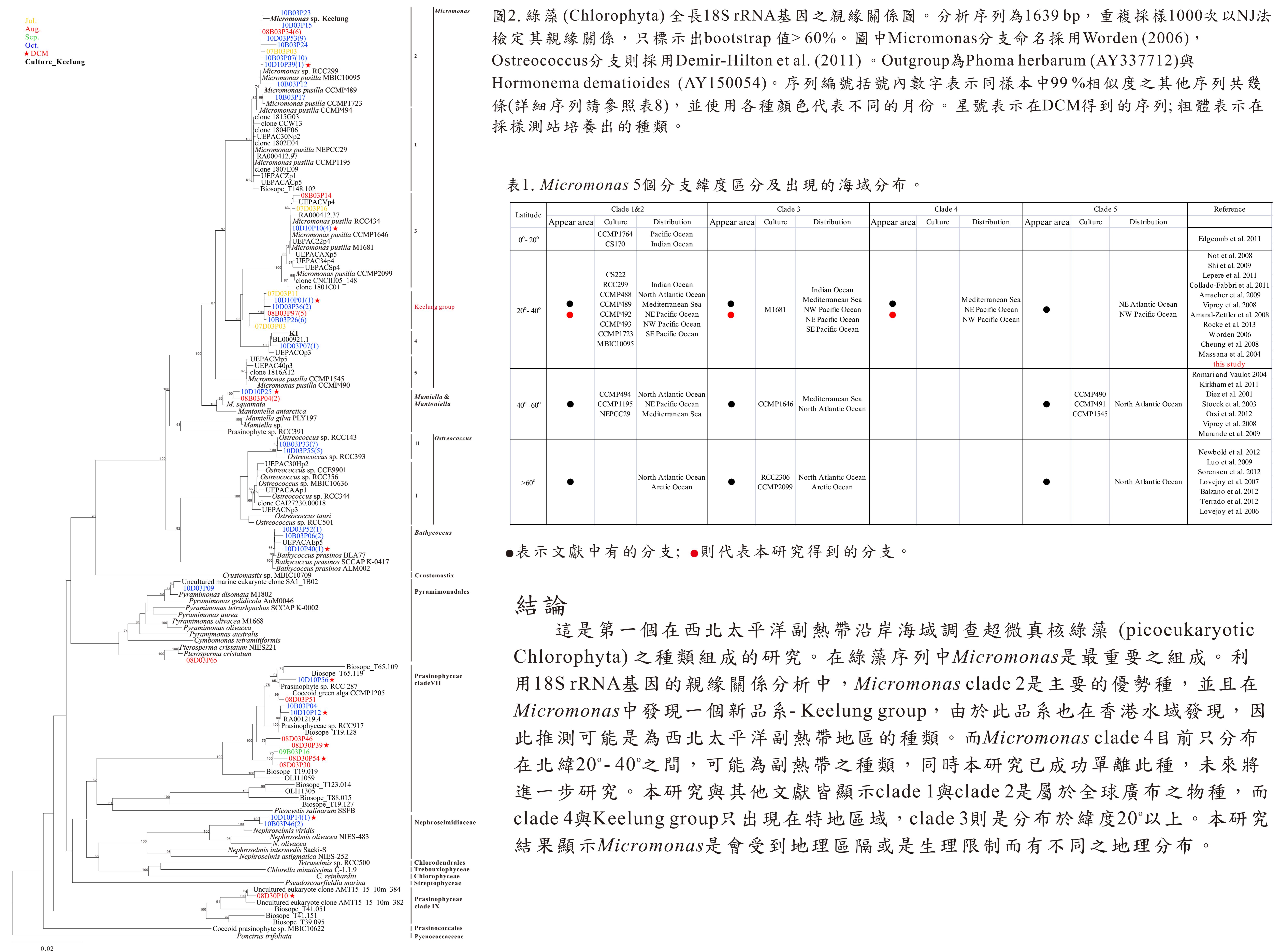


圖2. 綠藻(Chlorophyta)全長18S rRNA基因之親緣關係圖。分析序列为1639 bp，重複採樣1000次以NJ法檢定其親緣關係，只標示出bootstrap值>60%。圖中Micromonas分支命名採用Worden(2006)，Ostreococcus分支則採用Demir-Hilton et al. (2011)。Outgroup為Phoma herbarum(AY337712)與Hormonema dematiooides(AY150054)。序列編號括號內數字表示同樣本中99%相似度之其他序列共幾條(詳細序列請參照表8)，並使用各種顏色代表不同的月份。星號表示在DCM得到的序列；粗體表示在採樣測站培養出的種類。

表1. *Micromonas* 5個分支緯度區分及出現的海域分布。

Latitude	Clade 1&2			Clade 3			Clade 4			Clade 5			Reference
	Appear area	Culture	Distribution	Appear area	Culture	Distribution	Appear area	Culture	Distribution	Appear area	Culture	Distribution	
0°- 20°		CCMP1764 CS170	Pacific Ocean Indian Ocean										Edgecomb et al. 2011
20°- 40°	●	CS222 RCC299 CCMP488 CCMP492 CCMP493 CCMP1723 MBIC1095	Indian Ocean North Atlantic Ocean Mediterranean Sea NE Pacific Ocean NW Pacific Ocean SE Pacific Ocean	●	M1681	Indian Ocean Mediterranean Sea NE Pacific Ocean NW Pacific Ocean	●			Mediterranean Sea NE Atlantic Ocean NW Pacific Ocean	●	NE Atlantic Ocean NW Pacific Ocean	Not et al. 2008 Shi et al. 2009 Lepere et al. 2011 Collado-Fabre et al. 2011 Amacher et al. 2009 Viprey et al. 2008 Arman-Zettler et al. 2008 Rocke et al. 2013 Cheung et al. 2006 Massana et al. 2004 this study Romari and Vaulot 2004 Kirkham et al. 2011 Diez et al. 2001 Stoeck et al. 2003 Orsi et al. 2012 Viprey et al. 2008 Marandé et al. 2006
40°- 60°	●	CCMP494 CCMP195 NEPCC29	North Atlantic Ocean NE Pacific Ocean Mediterranean Sea	●	CCMP1646	Mediterranean Sea North Atlantic Ocean	●			●	CCMP490 CCMP491 CCMP1545	North Atlantic Ocean	Niebold et al. 2012 Luo et al. 2009 Sorensen et al. 2012 Lovejoy et al. 2007 Balzano et al. 2012 Ternado et al. 2012 Lovejoy et al. 2006
>60°	●		North Atlantic Ocean Arctic Ocean	●	RCC2306 CCMP2099	North Atlantic Ocean Arctic Ocean	●			●		North Atlantic Ocean	Not et al. 2008 Shi et al. 2009 Lepere et al. 2011 Collado-Fabre et al. 2011 Amacher et al. 2009 Viprey et al. 2008 Arman-Zettler et al. 2008 Rocke et al. 2013 Cheung et al. 2006 Massana et al. 2004 this study Romari and Vaulot 2004 Kirkham et al. 2011 Diez et al. 2001 Stoeck et al. 2003 Orsi et al. 2012 Viprey et al. 2008 Marandé et al. 2006

●表示文獻中有的分支；●則代表本研究得到的分支。

結論

這是第一個在西北太平洋副熱帶沿岸海域調查超微真核綠藻(picoplanktonic Chlorophyta)之種類組成的研究。在綠藻序列中Micromonas是最重要之組成。利用18S rRNA基因的親緣關係分析中，Micromonas clade 2是主要的優勢種，並且在Micromonas中發現一個新品系-Keelung group，由於此品系也在香港水域發現，因此推測可能是為西北太平洋副熱帶地區的種類。而Micromonas clade 4目前只分布在北緯20°-40°之間，可能為副熱帶之種類，同時本研究已成功單離此種，未來將進一步研究。本研究與其他文獻皆顯示clade 1與clade 2是屬於全球廣布之物種，而clade 4與Keelung group只出現在特地區域，clade 3則是分布於緯度20°以上。本研究結果顯示Micromonas是會受到地理區隔或是生理限制而有不同之地理分布。