

第八屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA8-259

作品名稱：藻類培育——仙后水母與其共生藻

姓名：蔡佳宏

關鍵字：仙后水母、共生藻

目 錄

壹、研究動機.....	2
貳、研究目的.....	3
參、研究過程.....	3
肆、研究材料與方法.....	4
伍、結果與討論.....	11
一、仙后水母各項行為及內部組織型態觀察	
二、測試仙后水母趨光性的有無實驗	
三、溶氧量的測定實驗	
四、分離與鑑定仙后水母體內共生藻種類實驗	
五、不同光線對仙后水母共生藻消失速率的影響實驗	
陸、結論.....	26
柒、未來展望與應用.....	26
捌、參考資料.....	27

壹、研究動機

有一次回林邊老家，我和家人沿著堤防散步。無意間，海堤和魚塢間的水灘中數個褐色的圓形物體吸引了我的目光（圖 1、圖 2）。仔細一看，那和臉盆一樣大的物體正規律的縮小、開闔，但一時不知道那到底是甚麼。在詢問過當地人後才知，那是俗稱倒立水母的仙后水母。仙后水母的型態和我們一般看到的水母不甚相同——牠是倒立的，且身上還有著絨毛狀的觸手和藍綠色的凸出物。在上網查過資料後，發現那藍綠色的部份是仙后水母特有的共生藻囊。水母居然有共生藻？共生藻能帶給仙后水母甚麼樣的好處，而水母又能提供共生藻哪些利益呢？

我想在這次的實驗研究中多認識仙后水母，同時深入了解仙后水母與共生藻的相互關係。



圖 1、林邊的魚塢，仙后水母多分布於魚塢旁的水灘中

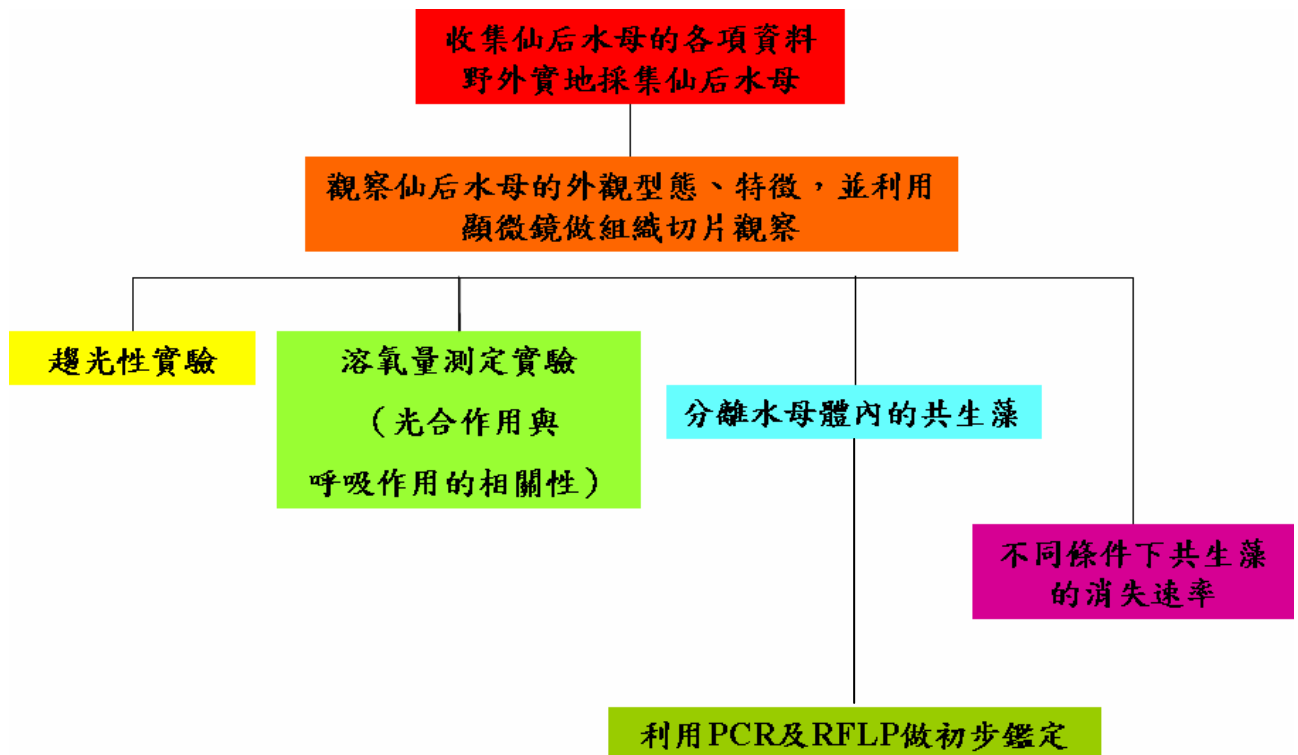


圖 2、水灘中的仙后水母

貳、研究目的

- 一、觀察仙后水母的內部組織型態及各項行為
- 二、測試仙后水母趨光性的有無
- 三、探討仙后水母與共生藻之間相互關係
- 四、分離並鑑定仙后水母體內共生藻的種類
- 五、不同的光線對仙后水母共生藻消失速度的影響

參、研究過程



肆、研究材料與方法

◎ 仙后水母 (*Cassiopeia frondosa*) (又稱車輪水母或倒立水母)

一、分類地位：

動物界

刺絲胞動物門

鉢水母綱

根口目

倒立水母科

Cassiopeia 屬

frondosa 種

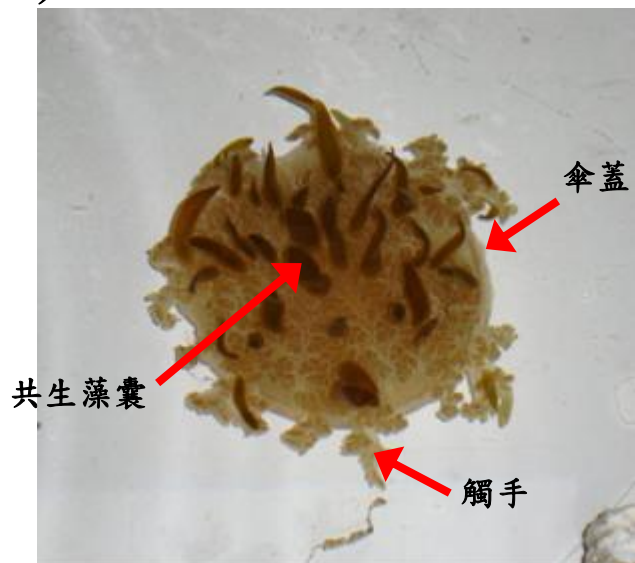


圖 3 特徵介紹

二、分布位置：

主要分布於熱帶與亞熱帶的海域，在台灣則分布於西南海岸海流較小的地方或海水窪地。

三、身體構造特點：

無骨骼、外殼、保護甲，所以非常脆弱，身體是一大塊膠質，主要由含碳量極低的膠原組成，包含了將近 95% 的水。

水母體長 2 至 3 公分到半公尺(依生長環境而定)，體薄，僅有一層細胞組織，所以每一個細胞皆能自行與體外的水進行氣體交換。

傘呈碟狀；具 8 根分枝狀的口腕，口腕末端形成許多絨毛狀突起。體呈褐色、灰色或淺綠色。棲息於沿岸砂質底。

四、運動方式：

平時不常游泳，而是以口面朝上倒立於砂地、石面等平面拍動。

五、營養方式：

獵食對象為水中的浮游生物，而體型較大者甚至能捕食小蝦、小魚。也能利用體內的共生藻做為營養來源。

一、仙后水母各項行為及內部組織型態觀察

在飼養仙后水母期間，觀察到仙后水母的體色在光線較少的地方會逐漸由褐色轉白。我推測仙后水母體內共生藻的數量與光線有相互關係，並利用顯微鏡來觀察仙后水母各部位的組織、共生藻囊及共生藻的分布位置。

二、測試仙后水母趨光性的有無實驗

將長方形的淺盆（25×40×10cm）分成甲、乙、丙、丁四區，並在每一區放置兩隻大小相近的仙后水母（直徑約 10cm），同時將淺盆放置在黑暗的環境中，於甲區的上方設置一檯燈，並每隔兩小時觀察一次水母的移動情形。為了不使溫度改變過於劇烈，影響實驗結果，我在檯燈旁放置小電扇以調節溫度。



四區的照度：

甲區：10300 lux 丙區：5320 lux
乙區：8500 lux 丁區：3610 lux

圖 4 趨光性實驗示意圖

三、溶氧量的測定實驗

將實驗缸以自製洞洞板格成兩區——10 公分的 A 區與 35 公分的 B 區。在 A 區放入沉水馬達和 Do 測定儀的探測棒，B 區則放置 5 隻仙后水母。以攝影機紀錄 Do 的變化量，一共紀錄三天。實驗期間均不餵食。分成四組實驗：

※24 小時照光（以 T5 燈作為光源，利用小電扇和魚缸加熱器控制溫度在攝氏 27—28 度之間）

(1) 有水母 (2) 無水母

※0 小時照光（利用魚缸加熱器控制溫度在攝氏 27—28 度之間）

(4) 有水母 (3) 無水母



圖 5 實驗裝置圖

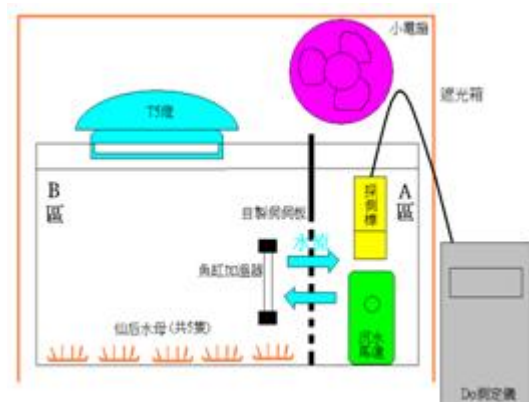


圖 6 實驗裝置示意圖

四、分離與鑑定仙后水母體內共生藻種類實驗

本實驗一共分成四個部分，分別為DNA萃取、PCR、電泳純化及RFLP。以下依序列出實驗步驟：

(一) **DNA萃取** (使用 AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (圖 7), 內含 Buffer G-A、RNaseA、Buffer G-B、Buffer DV (add 2ml Buffer DV-A before using) Buffer W1、Buffer W2 (add 100% ethanol before using)、1.5ml/2ml microfuge tube、Spin-filter、miniprep column))

細胞裂解與均質

1. 用解剖剪刀將仙后水母剪半，放置於研鉢中。
2. 加入液態氮使組織凍結，並磨碎組織。
3. 加入 700 μ l Buffer G-A 和 1.2 μ l RNase A 快速研磨 30 秒。
4. 取部份組織碎末移入 2 ml Microfuge tube 中，並以 Buffer G-A 補足體積量至 650 μ l。
5. 以 65°C 水浴 15 分鐘。

分層去除蛋白質與有機層

6. 加入 400 μ l Buffer G-B 和 1 ml Buffer DV 搖勻。
7. 以轉速 12000g 離心 2 分鐘。
8. 盡可能吸除所有的上層液。
9. 加入 1 ml Buffer DV 搖勻。
10. 以轉速 12000 g 離心 2 分鐘。



圖 7

下層液澄清

11. 盡可能吸除所有的上層液。
12. 取一個 Spin-filter 置於另一 2 ml Microfuge-tube 中。
13. 將下層液吸出置於 Spin-filter 中。
14. 以轉速 12000 g 離心 1 分鐘。
15. 取下 Spin-filter，加入 400 μ l Buffer BV 並搖勻。

DNA 洗提

16. 取一個 Miniprep column 置於另一 2 ml Microfuge-tube 中。
17. 將步驟 15. 的液體取出置於 Miniprep column 中。
18. 以轉速 12000 g 離心 1 分鐘。
19. 取出 Miniprep column，倒掉 Microfuge-tube 中的液體。
20. 將 Miniprep column 置回，加入 500 μ l Buffer W1。
21. 以轉速 12000 g 離心 1 分鐘。
22. 取出 Miniprep column，倒掉 Microfuge-tube 中的液體。
23. 將 Miniprep cloumn 置回，加入 700 μ l Buffer W2。
24. 以轉速 12000 g 離心 1 分鐘。
25. 重複步驟 22. 23. 24. 一次。
26. 取出 Miniprep column，倒掉 Microfuge-tube 中的液體，再將 Miniprep column 置回。

- 27.以轉速 12000 g 離心 1 分鐘。
- 28.在 Miniprep column 中加入 200 μ l 的滅菌水。
- 29.靜置於室溫中 1 分鐘。
- 30.以轉速 12000 g 離心 1 分鐘。
- 31.取出 Miniprep column，Microfuge-tube 中的液體即為 DNA 溶液。
- 32.以分光光度計檢驗 DNA 濃度。

(二) **PCR**

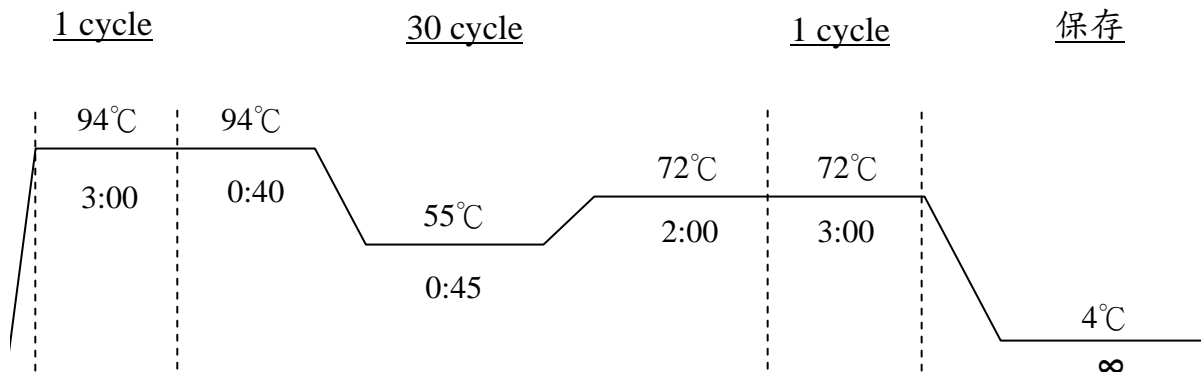
將以下藥劑混合：

- | | |
|---|------------------|
| 1. H ₂ O | up to 50 μ l |
| 2. 10 \times PCR Buffer | 5 μ l |
| (Storage Buffer : 50 mM Tris-HCl ,
1mM EDTA , 1mM DTT , 50%(v/v)glycerol) | |
| 3. dNTP Mixture (2.5mM each) | 4 μ l |
| 4.Primer | |
| SS5Z | 10 pmol |
| SS3Z | 10 pmol |
| 6. Template DNA | < 500ng |
| 7. TaKaRa Taq TM (5units/ μ l , by TaKaRa BIO INC.) | 0.25 μ l |



圖 8 DNA 增幅裝置

共 50 μ l，置於 DNA 增幅裝置 (圖 8)，設定如下：



所使用的 Primer (引子)：

SS5Z 5'-GCAGTTATARTTTATTTGATGGTYRCTGCTAC-3'

SS3Z 5'-AGCACTGCGTCAGTCCGAATAATTCACCGG-3'

(By Rowan and Powers,1991)

(三) 電泳純化

Gel 製作

1. 秤取 0.3 g 的 Agarose 加入 20 ml 的 TAE。
2. 利用微波爐加熱至 Agarose 完全溶解。
3. 將 Agarose 溶液倒入安裝好梳狀物的 gel 成型盤。
4. 靜置約 30 分鐘待 gel 冷卻凝固。
5. 取下梳狀物，將 gel 取出置於電泳槽中。

電泳分離

6. 將 TAE 加入電泳槽至淹過 gel 約 1 公分。
7. 在 sample 中加入 1/5 倍重量的 Loading Dye 混合均勻。
8. 將 sample 輕輕的加入 well 中。
9. 取 5 μ l Marker(Bio-100TM DNA Ladder, by Protech Technology Enterprise Co.,Ltd) 和 1 μ l Loading Dye 混合均勻。
10. 將 Marker 輕輕的加入 well 中。
11. 打開電泳槽電源。
12. 待 BPB 移動 2/3 個 gel 的長度後(約 30 分鐘)停止電泳並取出 gel。
13. 將 gel 浸泡於 Ethidium bromide 中 30 分鐘。
14. 取出 gel 移至 UV 透視器中照射 UV 燈並擷取影像。

切膠純化 (使用 QIAquick Gel Extraction Kit, 內含 Buffer QG, Buffer PE, 2ml collection tube(附 column))

15. 將 gel 至於 UV 切膠台上。
16. 開啟 UV 燈，用切割刀盡速切下欲採集純化的片段(1500 bp)。
17. 取一 2 ml 離心管秤重，再將片段置入離心管中並秤重，計算 DNA 片段的重量。
18. 將 Buffer QG 以片段重的 3 倍體積量加入離心管中。
19. 以 50°C 水浴 10 分鐘，每隔 2 分鐘搖勻一次。
20. 將 Isopropanol 以與片段等重的一倍體積量加入離心管中混合均勻。
21. 將步驟 6 的溶液置於 2 ml collection tube 的 column 中。
22. 以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘。
23. 倒掉 2 ml collection tube 中的液體，在 column 中加入 0.5 ml Buffer QG 並靜置 1 分鐘。
24. 以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘。
25. 倒掉 2 ml collection tube 中的液體，在 column 中加入 0.75 ml Buffer PE 並靜置 5 分鐘。
26. 以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘。
27. 倒掉 2 ml collection tube 中的液體。
28. 以轉速 13000 rpm, 25 °C 離心 1 分鐘。
29. 取下 column 置於另一 1.5 ml 的離心管中。
30. 加入 30 μ l 的滅菌水並靜置 1 分鐘。
31. 以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘。

32. 取下 column，並用電泳法檢視離心管中的液體是否為所需的 DNA。

33. 將 sample 保存於 -20 °C

(四) RFLP

使用 *Sau* 3AI、*Taq* I 兩種限制酶：

(一) *Sau* 3AI 的配置：

1. 10×buffer	1 μl
2. 100×BAS	0.1 μl
3. DNA	5 μl
4. H ₂ O	4.3 μl
5. <i>Sau</i> 3AI	0.5 μl
Total	10 μl

Sau 3AI 的實驗組以 37 °C 水浴一小時

(二) *Taq* I 的配置

1. 10×buffer	1 μl
2. 100×BAS	0.1 μl
3. DNA	5 μl
4. H ₂ O	4.3 μl
5. <i>Taq</i> I	0.5 μl
Total	10 μl

Taq I 的實驗組以 65 °C 水浴一小時

水浴後再分別以電泳法，利用限制酶切位不同而裁切出不同長短的 DNA 片段的特性判斷共生藻所屬分支 (clade)。

五、不同光線對仙后水母共生藻消失速率的影響實驗

分成四組進行實驗：24 小時照光（以下簡稱大光）、24 小時微光（以下簡稱少光）、24 小時 T5 燈照射（以下簡稱 T5）、24 小時無照光（以下簡稱無光）。

在四個實驗魚缸中加入海水並安裝好外掛式濾水器。每個實驗組各放入一隻仙后水母，並依實驗組的不同架設不同的光源。

四組實驗組照度：

- (1) 大光：13200 lux
- (2) 少光：5800 lux
- (3) T5：5370 lux
- (4) 無光：0 lux



圖 9
尚未加蓋的四個實驗組，由左至右依序為無光、T5、少光及大光

四個實驗組加蓋自置恆溫遮光箱並安裝溫度計與架設電風扇，四組實驗溫度控制在 33°C。

每日以單眼相機以固定光圈量及人工光線照射，拍攝並記錄四組實驗組中水母的變化。實驗一共進行九天。



圖 10 加蓋恆溫遮光箱的實驗組

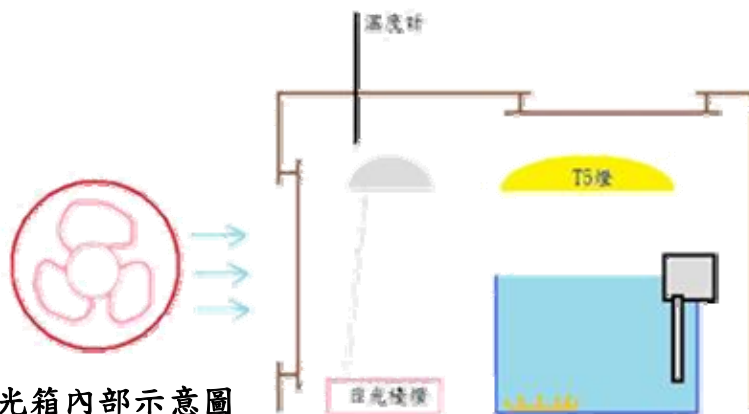


圖 11 實驗組及恆溫遮光箱內部示意圖

伍、結果與討論

一、行為觀察結果與討論

觀察仙后水母的攝食行為、自我保衛（毒液）以及倒立運動。

◎攝食行為

仙后水母平時不常游泳，而是以口面朝上倒立於砂地、石地等平面拍動，所以較不會像其他水母一般主動獵食，而是以傘蓋的開闔製造水流（圖 12、圖 13）

（← 箭頭為水流方向）

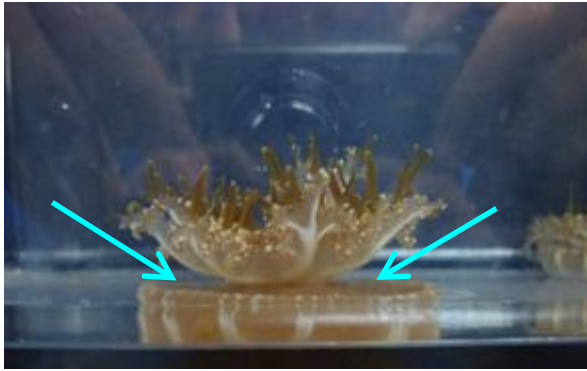


圖 12
傘蓋一張，海水被吸入傘蓋內，獵物便跟著水流流入傘蓋

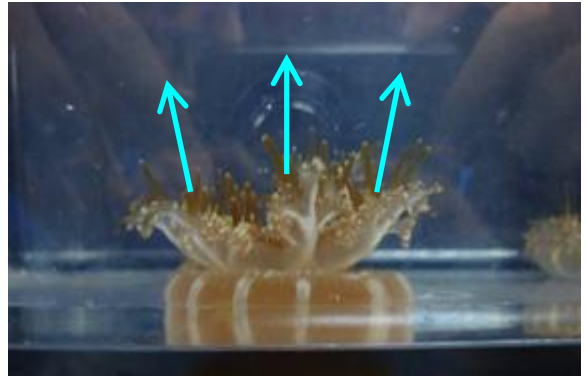


圖 13
傘蓋一闔，將水向上排出，而觸手就像漁網一樣，將流經的獵物濾出

若為大型獵物，觸手上的刺絲細胞會把先將獵物麻痺，再從外部移至胃腔消化吸收，若獵物型態較小，則利用觸手中的消化管運輸到胃腔，或是直接由觸手上的細胞分解吸收。

◎自我保衛——毒液的釋出

當仙后水母受到刺激時，會從觸手處噴出絲狀毒液（見圖14），例如接觸到不同溫度或較不潔的海水時。毒液具有黏性，並使碰觸到毒液的微生物或豐年蝦死亡。

絲狀毒液



圖 14 釋出毒液

◎倒立運動

仙后水母和其他種水母最大的差異便是其倒立的型態，故也被稱為倒立水母。仙后水母一旦受水流或外力而脫離依附的平面，其泳動的方式會使水母體重回倒立的形式，平貼在平面上。



在野外，我也發現少數並非倒立的仙后水母。其型態和一般的倒立水母相反，是以觸手向下，傘蓋朝上且外翻。由於共生藻是分布在仙后水母全身（詳見仙后水母的組織與共生藻的分布），只需光線充足，這些可能因外力而無法翻轉回來的仙后水母依然能生存。

傘蓋外翻，觸手朝下的仙后水母



◎仙后水母的組織與共生藻的分布觀察結果與討論

仙后水母的組成結構並不複雜，主要是由組織細胞、刺絲細胞與和其共生的藻類所組成。

※組織細胞

仙后水母的組織細胞就算離開本體，也能存活一段時間。這是在顯微鏡下的一塊仙后水母組織，並觀察到它仍在活動（不停的翻轉）（圖 15）。

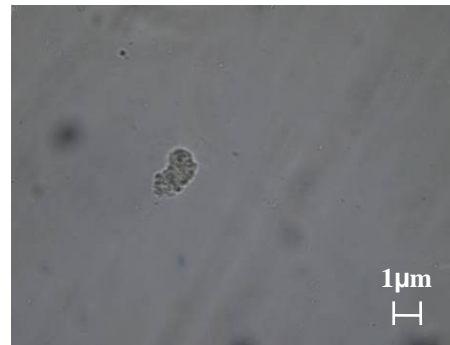


圖 15
組織細胞

※刺絲細胞

刺絲細胞形態類似蝌蚪，長條處為刺絲，圓球處為毒囊，攻擊獵物時，會先將刺絲刺入獵物體內，毒液則從毒囊經刺絲擠入獵物體內，麻痹獵物（圖 16）。在觸手中也發現由數十顆刺絲細胞組成刺絲胞團。

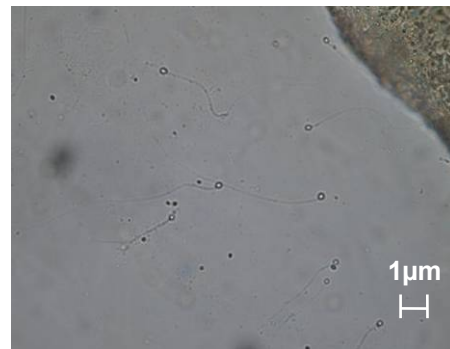


圖 16
刺絲細胞

※共生藻

共生藻分布在仙后水母的各處組織，並由數個到十幾顆藻聚集形成藻點。如果仙后水母移動至光線充足的環境時，共生藻便會開始分裂生殖，圖中便是藻囊中的共生藻。當共生藻大量繁殖之後，便會沿著觸手中的消化管流至水母的胃腔，成為仙后水母的营养來源（圖 17）。

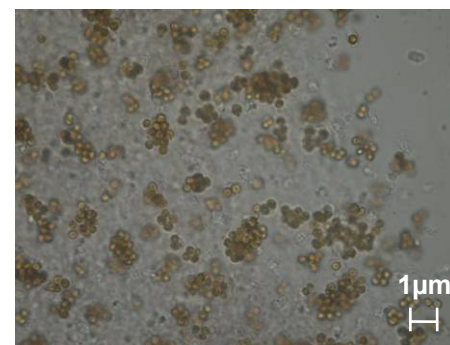


圖 17
共生藻

我們用顯微鏡分別觀察仙后水母的觸手及共生藻囊（圖 18、圖 19），並發現其中都有共生藻存在。

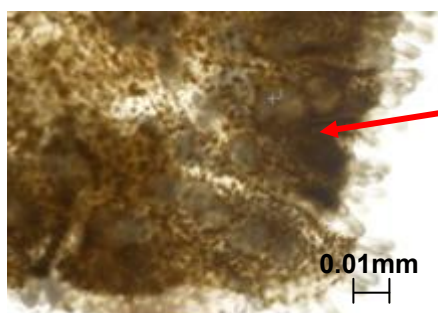


圖 18 觸手切片



圖 19 共生藻囊切片

(1) 觸手微觀

從觸手的玻片標本中，我發現共生藻以數顆到數十顆集合組成藻點鑲嵌在組織中，主要分布在絨毛以外的口腕中。這個發現證實共生藻並不單分布於共生藻囊中。仙后水母為了讓共生藻能更旺盛的進行光合作用，便將共生藻轉移至其本體能接觸到光線的地方，使之能大量分裂生殖。我也發現，仙后水母會以大量繁殖的共生藻為食，就像農夫把玉米種在環境良好、光線充足的地方，以得到最大的產量，供農夫食用，達到互利的共生關係。另外，觸手中的刺絲細胞也以數十顆組成的刺絲胞團分布在觸手中。

仙后水母在捕食獵物時，會先用刺絲細胞將獵物麻醉，再利用觸手上的絨毛從外部將大型獵物移動至胃腔消化。若為小型獵物，則由其觸手中的消化管進行輸送。

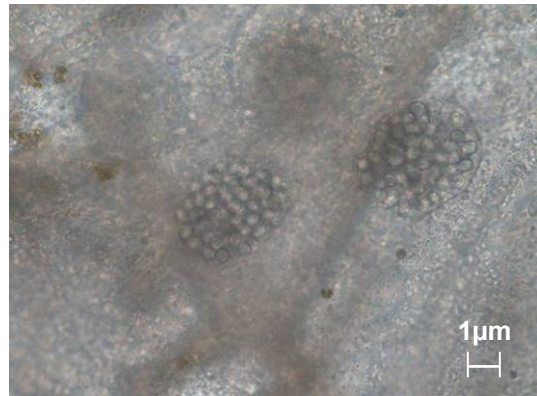


圖 20 觸手中的刺絲胞團



圖 21 觸手絨毛

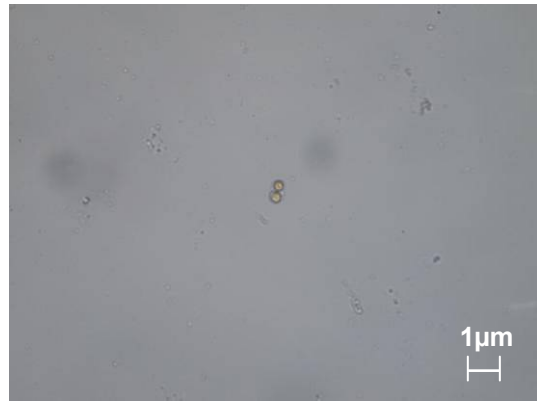


圖 22 從組織脫落，剛分裂生殖的共生藻

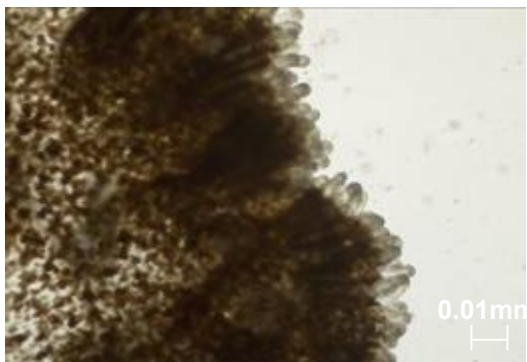


圖 23 尚未白化的觸手

共生藻以藻點的形式鑲嵌在組織中



圖 24 白化後的觸手

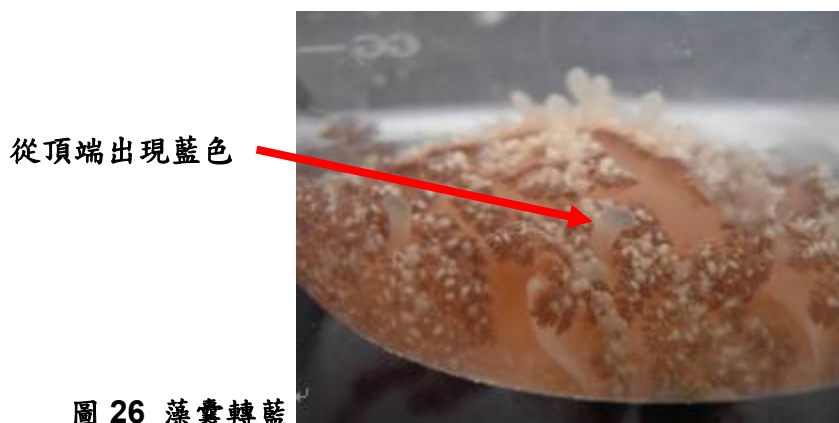
共生藻已消失，但仍可見到刺絲胞團

(2) 共生藻囊

共生藻囊為一囊狀組織，為仙后水母用以存放共生藻而發展出的構造，分布在八根口腕上。在野外實地調查中發現，棲息於水灘中的水母有兩種類型：一為全身呈深褐色，藻囊小（約為 0.5 公分）且為淡黃色（經解剖後發現，這些黃褐色的部分均為共生的褐藻，而水母本身的體色則有白、黃、黃綠及藍白色……等）；另一種則水母體色偏白，觸手呈白色，藻囊肥大（約 3~5 公分）且呈寶石藍色（有些則因為體色偏黃而使藻囊呈綠色）。



為什麼再同一個環境中會有這種差異呢？我將兩種水母帶回實驗室飼養（室內的窗戶旁），在經過一段時間後，深褐色的水母顏色轉淡，且藻囊逐漸發育變大，並從頂端開始出現藍色。



這個發現改變了我以為這兩種水母為不同品種的想法。我取下藍色藻囊進行解剖，發現藻囊呈藍色的原因是因為藻囊內面的一層藍色濾光膜。而共生藻也以藻點的形式鑲嵌在藻囊的組織中，而非儲存在藻囊的囊內。

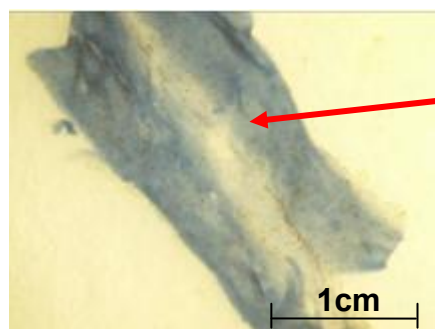


圖 27 縱切攤開的藻囊
內面為藍色濾光膜

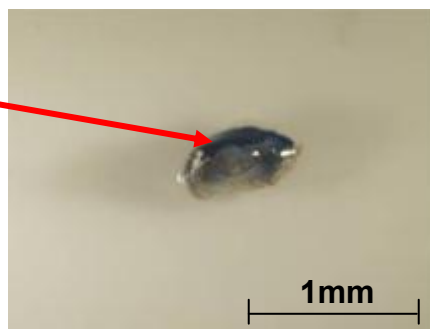


圖 28 橫切的藻囊
可看到藻點鑲嵌在組織中

綜合以上幾點，我發現仙后水母有一套非常特殊的「保留共生藻」機制。由於藍光為最適合植物行光合作用及成長的光線（波長約 450 nm，這也是為何養殖和共生藻共生的生物需照射藍白燈（T5、T8 燈）的原因），一旦仙后水母發現環境中的光線不足，除了會尋找並移動到光源充足的地方之外（詳見趨光性實驗），仙后水母體內的藍色濾光膜細胞也會開始分裂活化，使藻囊內面從頂部開始向下轉藍，有些水母甚至連傘蓋的部分也會變成藍色（端看不同的水母會有不一樣的情形）。這層藍色的濾光膜能將白色的可見光轉變為藍光，照射在共生藻上達到藍白燈的效果，使藻類不至於消失的太快。若光線恢復充足，仙后水母又會變回褐色（共生藻增加）。而寶石藍色的仙后水母具有觀賞價值，但須注意給予的光線不能太強，以避免共生藻活化造成水母變回褐色。

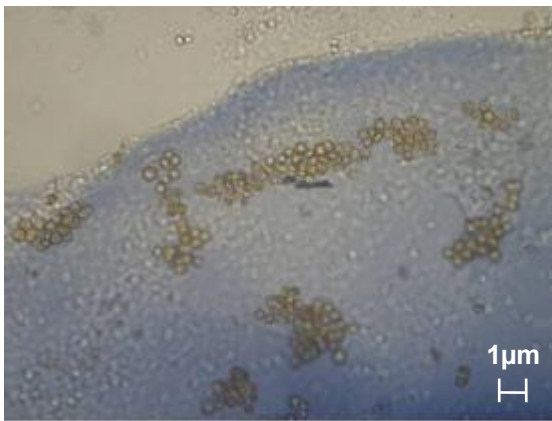


圖 29 複式顯微鏡下的濾光膜及共生藻

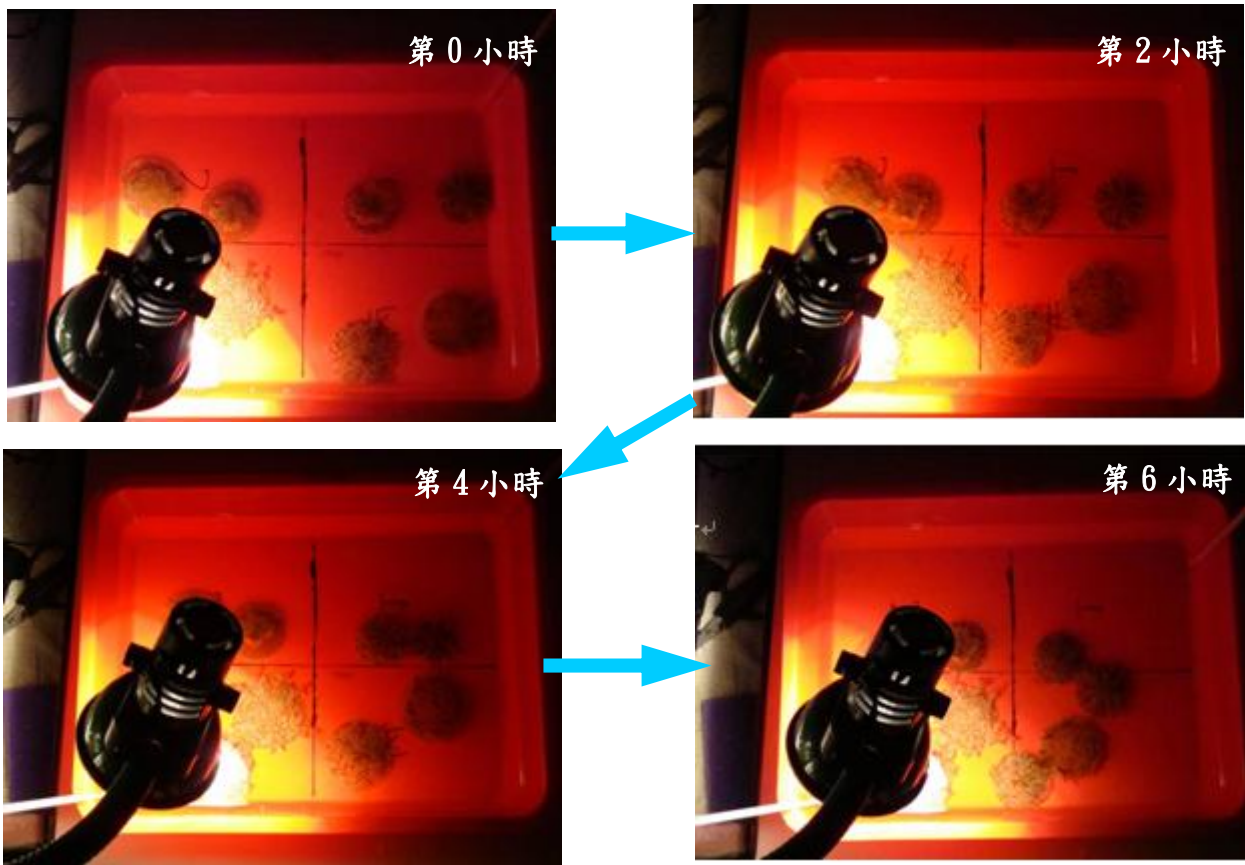


圖 30 褐色水母的藻囊
尚未轉藍，但已有大量的共生藻
分布於其中

二、趨光性實驗結果與討論

在飼養仙后水母期間，觀察到仙后水母會群聚在養殖缸中照射到陽光的區域。同時在光線較少的地方水母體顏色會由褐色漸變成白色，我推測仙后水母的活動行為及水母體內共生藻的數量有關，並設計以下實驗。

在經過了三次實驗後發現：仙后水母會移動到較靠近光源的地方，也就是光線較強的位置。



我推論仙后水母為了讓共生藻能在最佳的照光環境中進行光合作用，而移動至光線較強的區域。由於我在飼養期間發現，如果仙后水母長期處在陽光較少的環境中時，共生藻會離開水母體，仙后水母便由原本的褐色（圖 31）漸漸轉為白色（圖 32）。故我研判仙后水母為了要讓共生藻留在自己體內，而移動到光線充足的水域，且水母體顏色與共生藻的有無有關係。



圖 31 白化前的仙后水母

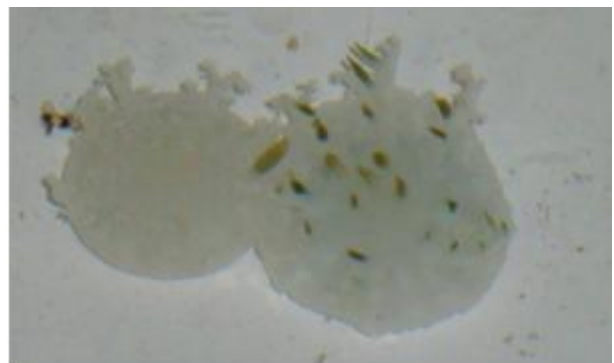
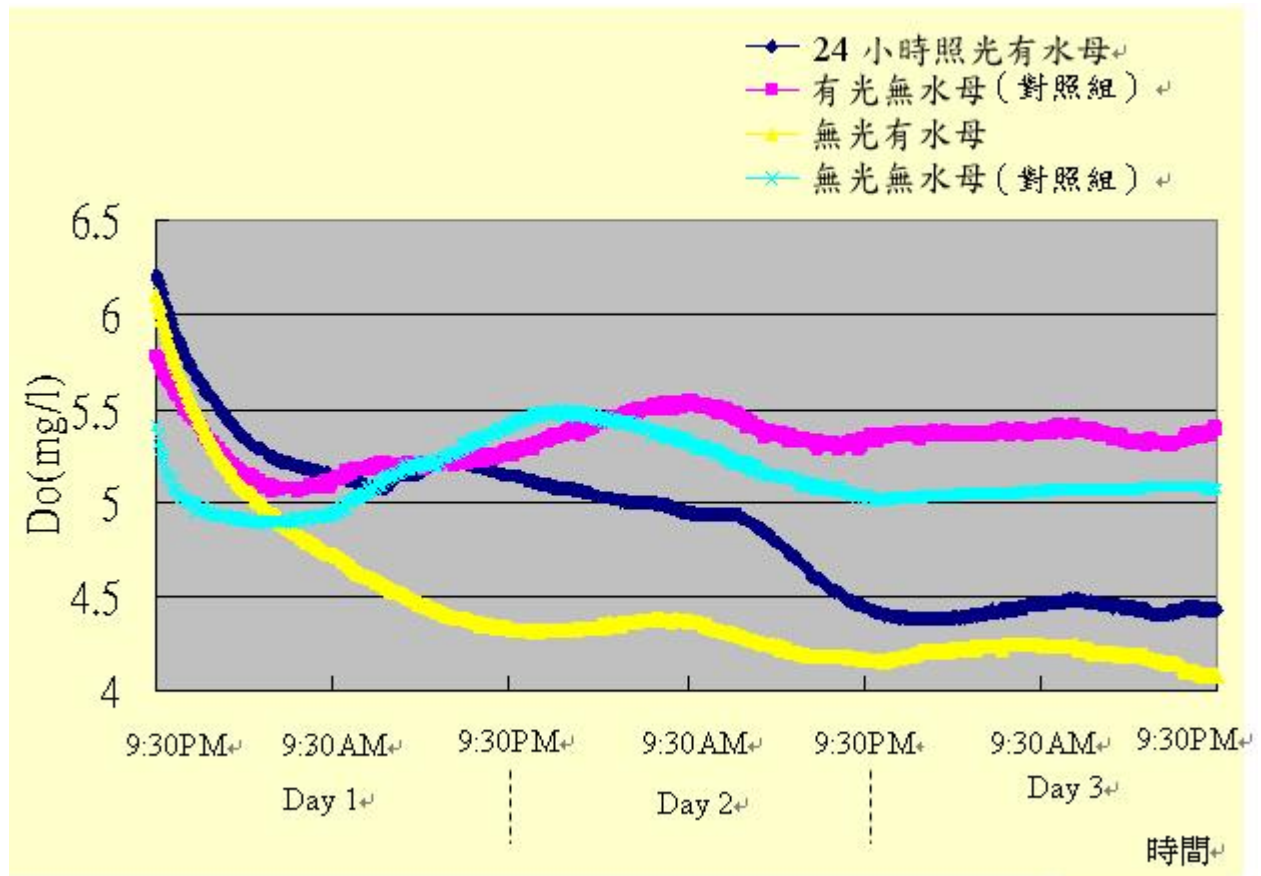


圖 32 白化的仙后水母

三、溶氧量測定實驗結果與討論

光照的有無對共生藻行光合作用有影響。如果共生藻有行光合作用，其所產生的氧氣便能補充仙后水母所消耗水體中的氧氣。故我以測量水中的溶氧量來判斷其行光合作用的旺盛程度，並和對照組比較。在本實驗的四個組別中，每次都更換新的海水，並連續收集三天的資料，進行比較與分析。



由以上實驗結果可知，有水母存在的實驗組消耗水體的氧氣量較多，而其中「無光有水母」曲線的下降程度又比「有光有水母」的曲線來得大，代表無光的情況下，水母本身及共生藻都需要利用水體中的氧氣，所以氧氣消耗較多，溶氧量降為四者最低。再者有光照，仙后水母體內的共生藻還能行光合作用並釋出氧氣，提供給藻類自身及仙后水母利用。在第一天 9:30PM 至 9:30AM，四者溶氧量均急遽降低。我推測其原因為一開始加入新的海水於魚缸中，達到了打氣的效果，讓水體溶氧量增加。但隨著時間經過，這些被融入的氧氣便會逐漸散回空氣中。由以上討論出：由於共生藻行光合作用所產生的氧氣會補充仙后水母所消耗的氧氣，使水中的溶氧下降的程度較沒有光而無法行光合作用的實驗組合緩。在結果中，有光照的情形下，或許是因為光照來源 T5 燈所提供的光線相較於陽光而無法使共生藻行光合作用的效率達到最大，所以相較之下仍會下降。

四、共生藻鑑定結果與討論

由於在野外實地調查時發現到共生藻囊為藍色的藍色仙后水母和全身成褐色的褐色仙后水母，於是兩種水母（以下簡稱藍色水母和褐色水母）均取其共生藻進行鑑定。利用 DNA 模板上限制酶切口位置不同來判斷共生藻所屬分支（clade）。

首先使用 AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit 將 DNA 從細胞中萃取出來。



圖 33 經研磨後的仙后水母

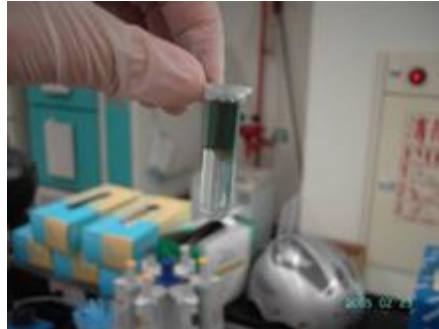


圖 34 步驟 7.的產物，可見到綠色的脂質層



圖 35 加入 Buffer DV 後的產物



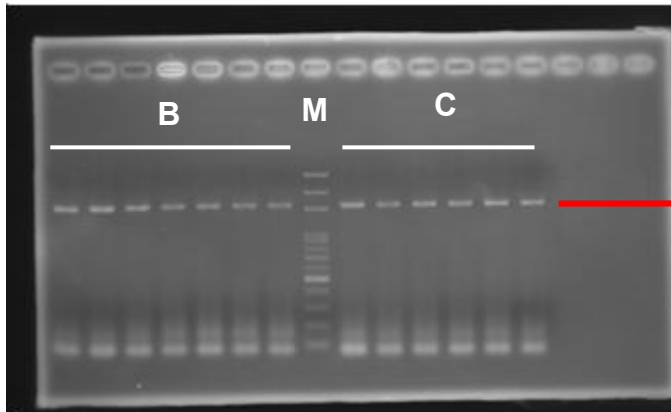
圖 36 離心後含 DNA 的溶液

將產物以分光光度器檢測其 DNA 濃度。利用 DNA 與蛋白質對不同波長光線的吸光值進行判定（DNA 會吸收 A260（波長為 260nm）；蛋白質會吸收 A280（波長為 280nm）。兩者比值須在 1.8~2.0 之間以表示產物中確實已將 DNA 萃取出來）以下為藍色與褐色水母萃取 DNA 後產物進行檢測的結果：

	藍色水母	褐色水母
A260	0.073	0.109
A280	0.038	0.058
比值	1.897	1.864
濃度 (ng/μl)	185	275

由於產物中的 DNA 為藻類原始的長鏈 DNA，於是使用 PCR 將欲拿來進行鑑定的片段大量複製。而 PCR 所使用的 primer 則為 *Rowan R* 和 *Power DA* 所設計，通用於共生藻類的鑑定，可做為複製共生藻具異變性的 ITS 序列的引子。

PCR 後產物進行電泳 (圖 37)。



1500 bp

圖 37 電泳後的 PCR 產物
(使用 UV 透視器)
(藍色水母以 B 示，
褐色水母以 C 表示，
marker 以 M 表示)

由圖 37 中顯示，所複製的 DNA 片段長約為 1500 bp。將這個片段切下後使用 QIAquick Gel Extraction Kit 進行純化。純化後取 3 μ l 進行電泳檢驗 (圖 38)。



圖 38 電泳檢驗

(藍色水母以 B 表示，褐色水母以 C 表示，
marker 以 M 表示)

RFLP 被使用於探討生物族群變異，利用此技術可以知道 *Symbiodinium* spp. 渦鞭毛藻生物族群變異，然後區分成 clade (演化上的分支)。將產物加入限制酶進行 RFLP，可將 DNA 裁切成不同長度的片段，以電泳法將裁切後不同長短的 DNA 片段分離，再進行比對。

本實驗中使用兩種限制酶 (*Sau 3AI*、*Taq I*) 分別進行反應與比照。對照 (中山大學 楊雅雯, 2001 印度太平洋石珊瑚之共生藻的親緣分析與共生多型性), *Sau 3AI* 的實驗組所呈現出的明帶和 *Sau 3AI* 模擬限制酶切譜 (Yu et al., 2000) 中的 clade C

或 clade E 符合 (865 bp/500 bp)。同時使用另一種限制酶 *Taq I* 來進行確認，並於對照 *Taq I* 模擬限制酶切譜 (Yu et al.,2000) 後，其明帶與 clade C 符合 (890 bp/710 bp)。由兩者進行比較，判定藍色和褐色水母體內共生藻均屬 clade C。

參照中山的論文，發現在台灣海域發現的也多為 *Symbiodinium* clade C 的共生藻種。

1、*Sau 3AI*

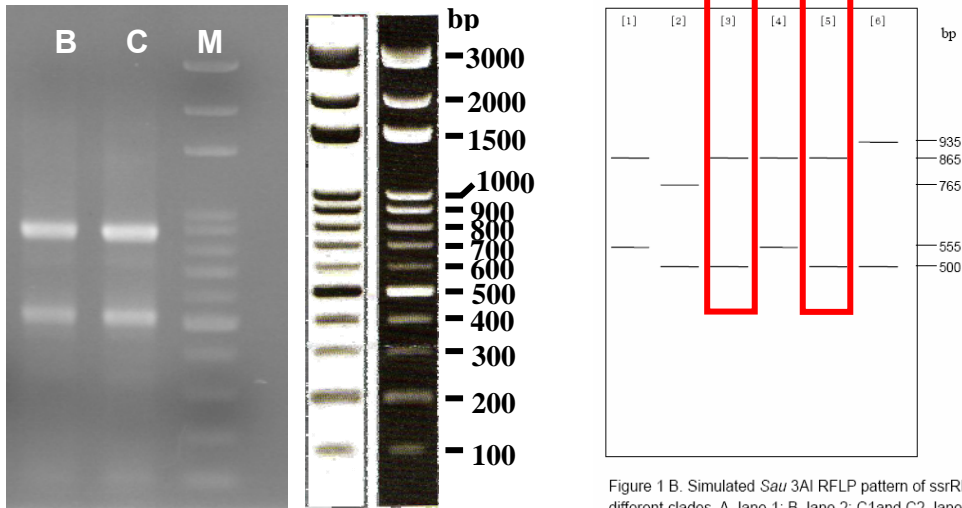


Figure 1 B. Simulated *Sau 3AI* RFLP pattern of *ssrRNA* gene among different clades. A, lane 1; B, lane 2; C1 and C2, lane 3; C3, lane 4; E1, lane 5; E2, lane 6.

圖一B、定序後的DNA序列，利用電腦模擬共生藻各系群的*Sau 3AI*限制酶切譜 (Yu et al.,2000)

2、*Taq I*

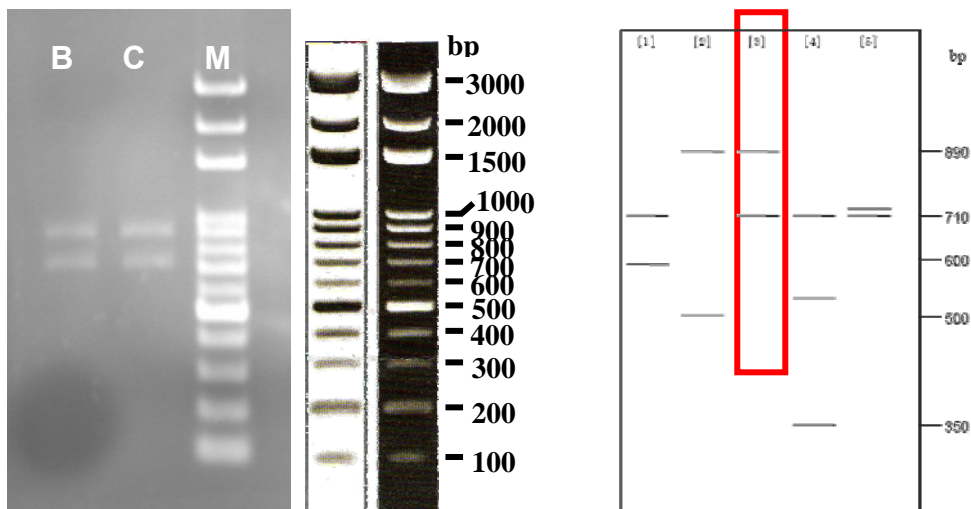


Figure 1 A. Simulated *Taq I* RFLP pattern of *ssrRNA* gene among different clades. A, lane 1; B, lane 2; C1 and C3, lane 3; C2, lane 4; E, lane 5.

圖一A、定序後的DNA序列，利用電腦模擬共生藻各系群的*Taq I*限制酶切譜

(Yu et al.,2000)

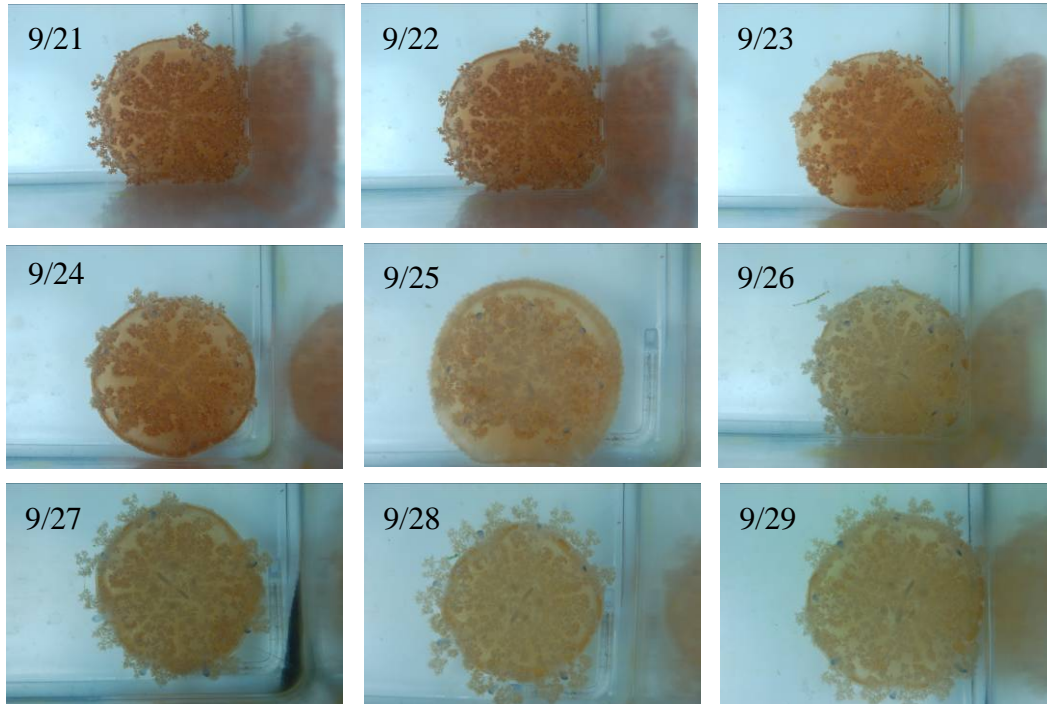
經 RFLP 的結果可初步判定雖然外觀顏色不同 (藍色和褐色)，但其共生的藻種應為 **Symbiodinium clade C**。 *Symbiodinium* spp. 是渦鞭毛藻俗名：共生藻 (zooxanthellae)，但詳細的差異應比較基因定序的結果分析。目前將資料送定序中。

五、共生藻消失速率

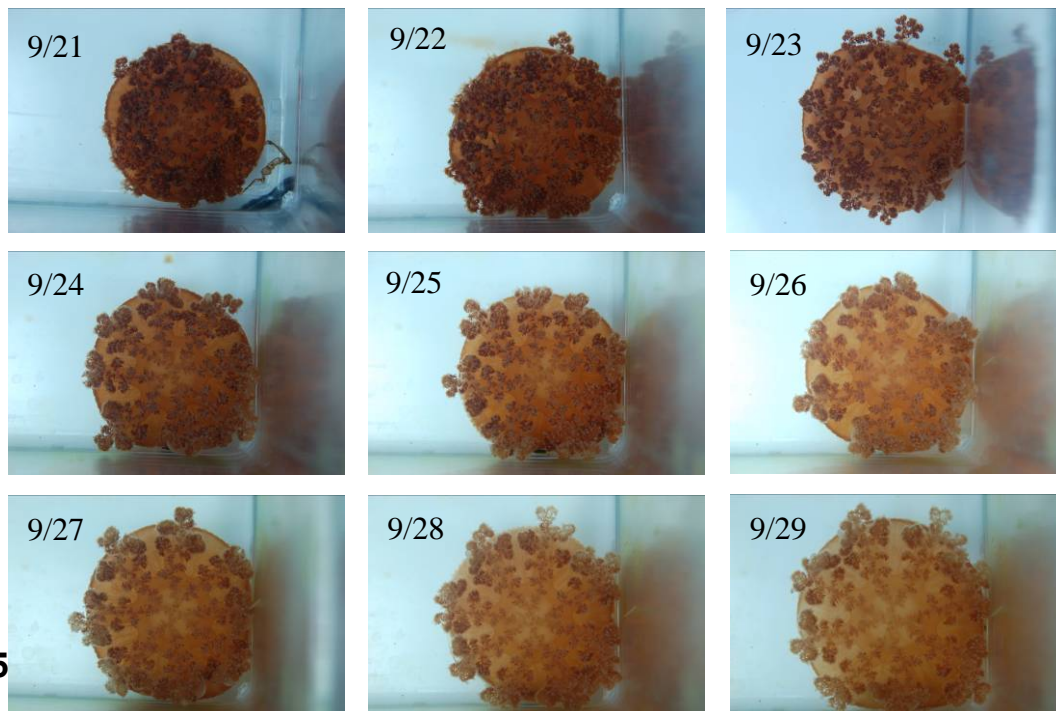
我曾進行過這個實驗三次。第一次因為海水沒有循環造成水母缺氧，在第三天時少光和無光死亡。第二次加裝外掛式濾水器，但因為溫度沒有控制好（四組溫度不一）以及數位相機沒有控制在相同的光圈數而無法在相同的條件下比對。

第三次使用恆溫遮光箱及單眼相機(可調式光圈)，將前兩次實驗的問題解決。以下列出第三次實驗的紀錄。

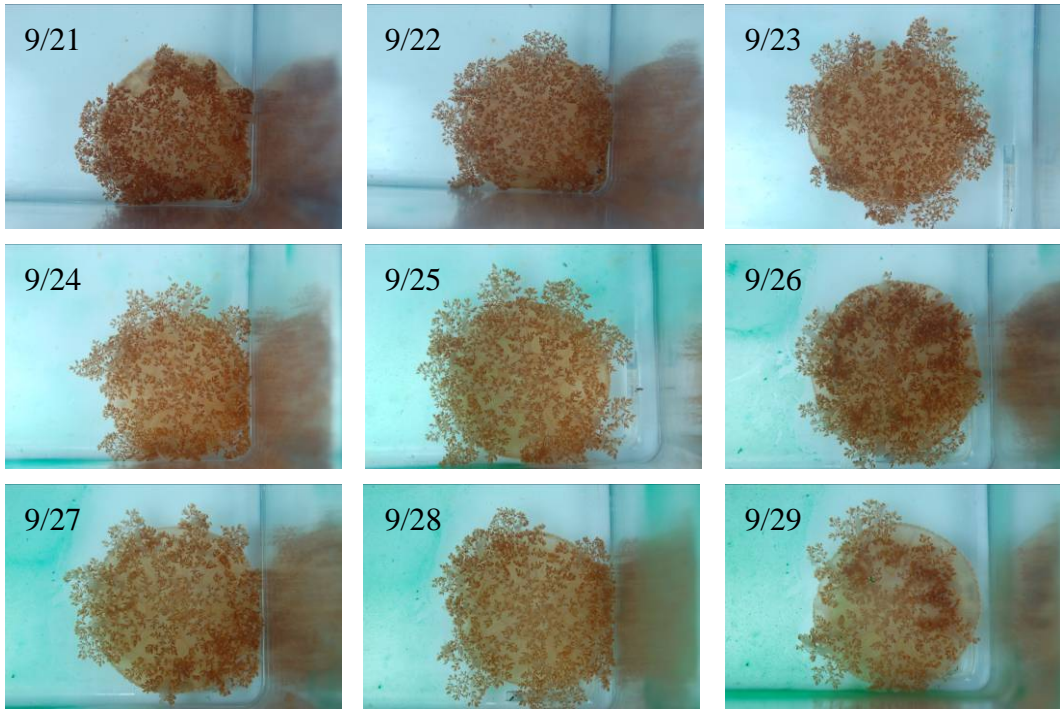
1、大光



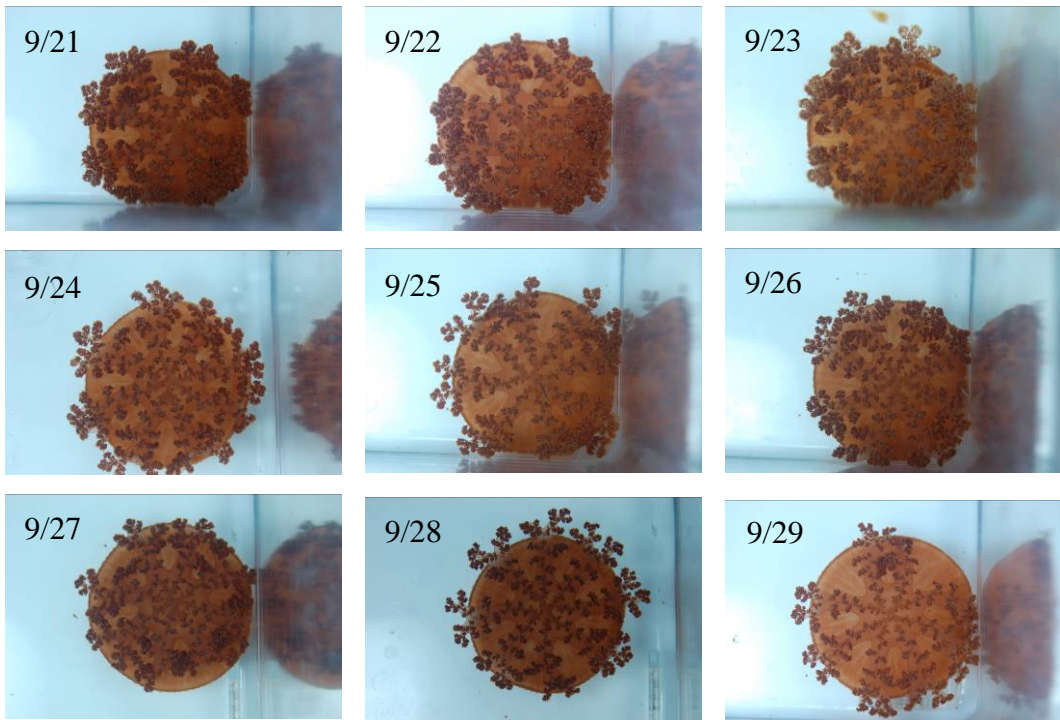
2、少光



3、T5



4、無光



由以上圖示得知：

一、大光在第五天顏色突然轉白，且其觸手上的絨毛並沒有像少光及無光一般縮小，而共生藻囊頂部出現藍色濾光膜。其變淡的速率比同樣觸手絨毛沒縮小的 T5 來得快。

二、少光出現了絨毛縮小（原本絨毛會遮住下面的傘蓋，但絨毛縮小後呈粒狀，下面的傘蓋也顯現出來）、顏色變淡的情形，但這兩種變化均比同樣有這些改變的無光還要慢出現，絨毛縮小的程度也比較小，且沒有藍色濾光膜出現。其變淡的程度比無光大(可看到四個胃腔)。

三、T5 的改變最小，只有傘蓋的部分變為透明，其觸手絨毛既沒縮小，轉淡速率也為四者當中最慢的。

四、無光的觸手絨毛縮小程度最大，速率也比同樣縮小的無光快，並在接觸到光線時會有劇烈的反應（開始四處游動，傘蓋鼓起而無法倒立在平面上），而這種反應持續到安定的時間並不一，通常介在 20 至 30 分鐘。藻囊頂部沒有出現藍色濾光膜，轉淡的程度比少光低但比較早發生（第二天）。

綜合以上幾點，我發現判定仙后水母是否接受到充足的光線除了可利用變淡的程度以外也能以絨毛縮小的程度來推斷。若仙后水母照沒有射到充足的光時，其觸手絨毛便會縮小，而縮小程度愈大代表光源愈不足。由上面的圖示中，大光和 T5 雖然都變淡了，但其絨毛均沒縮小。

然而，顏色的深淺（共生藻的多寡影響水母體色的深淺：共生藻多，水母體呈深褐色；共生藻少，水母體色則較淡）理應會因光線照度大小而呈現大光 > 少光 > T5 > 無光，但經由實驗後卻發現結果呈 T5 > 無光 > 少光 > 大光。由於在飼養仙后水母時，沒有照射到光線的水母會有顏色轉淡和體型、絨毛縮小的情況發生。水母體型變小的原因為營養不足，造成以消耗其自身組織做為養分來源。由這次的實驗中，無光及少光均出現絨毛縮小的情形，則為開始消耗自身組織的表現。若取少光和無光做比較，可發現無光的絨毛縮小程度比少光大，但顏色較深。

我推測仙后水母在判斷光源不足以使共生藻繁殖時，會先以消耗自身組織做為防止不再分裂生殖的藻類過度的消失的緩衝。少光由於仍受到光線的照射，其消耗本體的程度較無光的為低，但相對其消耗共生藻的程度也會比較大。大光顏色的轉變更為明顯。雖然大光所照射的光線照度為最大，但太強的光線反而抑制了共生藻的生長，使共生藻繁殖的速率無法趕上消耗的速率，且由於有光照，仙后水母便研判無需以消耗自身組織來做為養份來源，故其絨毛並沒有縮小的情形。而 T5 的照度雖比不過大光，但其所照射的燈源為最適合藻類生存的藍光，致使共生藻繁殖速率接近被消耗的

速率，故水母體顏色變化為四者最小，絨毛縮小程度也為最低。

共生藻囊內的藍色濾光膜也因不同的照光環境而影響其是否出現。在大光中，藍色濾光膜在第三天便已出現，但其他三者均沒有。我推測 T5 已受到藍白燈的照射造成仙后水母判定無須使濾光膜細胞活化，而少光和無光則因仙后水母判定光源太弱而沒有濾光膜的生成。

此部分結果一開始並不如預期的假設，光強可促使藻類進行光合作用，水母應該生長良好，亦即不會造成白化的現象。但結果剛好相反，過強的光照反而抑制藻類的生長，而使共生藻繁殖速率低於消失速率。由此可知，適當地光照強度可讓藻類行光合作用，過高反而不利其生長繁殖。後續我可以繼續加強此部分的實驗，利用固定光源，不同的光照強度，監測水母體內共生藻數的變化、生殖方式的改變，以及水母體生長的變化，如此可知環境的變化，對水母造成的影響。

在第二次的實驗中，我發現溫度也會對共生藻的存在與否造成影響。將水母裝進燒杯後置於冰塊中使水溫降至 4°C 一小時。



圖 39 降溫之前

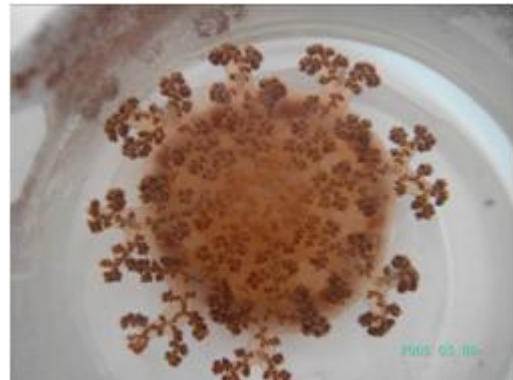


圖 40 降溫之後

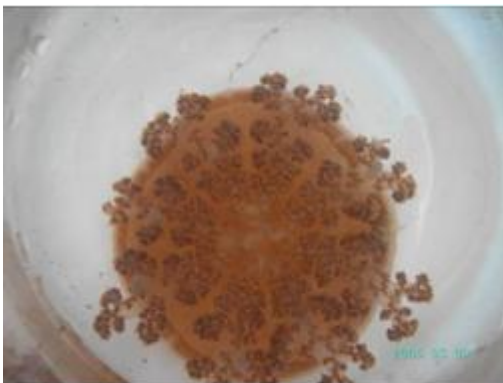


圖 41 降溫後過一天

由圖中可知，低溫會使仙后水母極劇的轉淡及絨毛縮小。除此之外，傘蓋也明顯的鼓起，但一天後顏色又趨恢復。這表示共生藻在消失後會恢復回仙后水母中，而這是否代表共生藻有回復性，或藻類被逐出水母體後又重返？有待以後的實驗的發現。

陸、結論

在仙后水母的行為及內部組織觀察中，發現在觸手處俱有刺絲細胞和絨毛可捕捉獵物，而大量的共生藻以藻點的形式鑲嵌在觸手及共生藻囊的組織中。

共生藻囊在光線不足時會使藍色濾光膜活化，讓共生藻得以更有效率的進行光合作用。

趨光性的實驗中，證實仙后水母會移動到適合共生藻行光合作用、繁殖的環境（光源處），以利共生藻生長。

溶氧量的測定實驗中，我發現共生藻行光合作用會釋出氧氣以供仙后水母與藻類本體使用。

藻類的 RFLP 鑑定判斷共生藻屬於 clade C。

共生藻消失速率實驗則可證明仙后水母對不同光源的環境會有不同的反應，並確實需要適當地光照以利共生藻行光合作用。

根據以上實驗，我們可以發現仙后水母和共生藻之間有著相當密切的互利共生關係。仙后水母會主動移至光線充足的水域，在光線不足時也會產生藍色濾光膜製造適合藻類生存的藍光或以消耗自身組織來減緩共生藻消失的程度，運用各種機制使共生藻能生存。而因環境良好而大量繁殖的共生藻也能提供成為仙后水母的营养來源。

柒、未來展望

仙后水母是一種特殊卻很少人研究的生物。在這次的研究中，我進一步的了解仙后水母和共生藻之間的關係，並發現仙后水母確實會選擇適合的環境，讓共生藻生存，並發展出許多機制來使藻類能處在一個合適的環境中。

在將來，我希望能研究仙后水母和共生藻之間是否存在著專一性的共生，並加強觀測光線強度對仙后水母體內共生藻數量的影響，測試不同環境下仙后水母的反應與共生藻的消失與否，找出最適合共生藻生長的光強度，並尋找這種共生藻是否能運用於製作藥品或其他的應用。

捌、參考資料

一、書籍資料

1. Cynthia Needham、Mahon Hoagland、Kenneth A. McPherson、Bert Dodson
觀念生物學 天下文化書坊 2008年
2. 鍾楊聰、張立雪編譯
分子生物學 偉明圖書有限公司 2003年
3. 鄧德豐編譯
生物技術實驗原理與方法 睿昱出版社
4. 中山大學 楊雅雯
2001 印度太平洋石珊瑚之共生藻的親緣分析與共生多型性

二、網站資料

1. 仙后水母簡介
Cassiopea andromeda, Introduced Marine Species of Hawaii Guidebook
http://www2.bishopmuseum.org/HBS/invertguide/species/cassiopea_andromeda.htm 2009/3/12
2. 珊瑚介紹
Untitled Document
<http://vm.nthu.edu.tw/science/shows/nuclear/coral/know/start.html> 2009/3/12
3. 仙后水母特徵
台灣魚類資料庫 (農委會)
<http://fishdb.sinica.edu.tw/chi/importpic.php?id=C07> 2009/3/12

三、特別感謝

- | | |
|------------------------|-------|
| 1. 鴻祺精密企業行 | 蕭舜鴻先生 |
| 2. 國立海洋物博物館 生物管理部/助理技師 | 張惠婷小姐 |
| 3. 國立海洋物博物館 | 段文宏老師 |
| 4. 東華大學海洋生物科技研究所碩士生 | 許博詠先生 |

附錄一 八八水災對仙后水母產地的影響

水災前



水災後



這次莫拉克風災造成林邊地區重大的災害。大量的淤泥與積水將仙后水母的生長環境破壞殆盡。而根據當地居民表示，仙后水母都被洪水沖到海裡。要到多久水母才會重回這塊土地呢？

