

電場逆境及抗生素處理對共生藻生長生理的影響

林王昱傑，吳佳晏，陳美晨，林志旻，王帥皓，林重宏*

大葉大學生物資源學系，彰化縣大村鄉學府路 168 號

*電子郵件: clin@mail.dyu.edu.tw

摘要

蟲黃藻 (Zooxanthellae)，又稱共生藻，是指一種生活在海洋無脊椎動物細胞內，如珊瑚、海葵、和軟體動物細胞內的腰鞭毛藻 (Dinoflagellate)。近年來由於全球溫室效應及環境污染造成珊瑚白化的發生，進而危及珊瑚礁生態系的平衡。目前已知珊瑚白化是珊瑚細胞內蟲黃藻失去藻色素或是蟲黃藻被排出珊瑚體外所造成。我們實驗設計以抗生素 Puromycin 劑量 1 ng / μ L 與 10 ng / μ L，Hygromycin 劑量 800 ng / μ L 與 1600 ng / μ L 處理共生藻 10 天，第三天、第六天、第十天各測試在抗生素產生的逆境下的共生藻適應情形的葉綠素和細胞活性，因為藥劑的濃度無法使共生藻死亡或是抑制共生藻的生長，因此做了第二次的實驗將濃度調整為 Puromycin 劑量 30 ng / μ L 與 60 ng / μ L，Hygromycin 劑量 1600 ng / μ L 與 3200 ng / μ L，發現 Puromycin 抗生素比 Hygromycin 抗生素更能抑制共生藻生長或是傷害共生藻的組織功能和生理功能造成其死亡或是白化現象。電場逆境我們以固定電壓 0、3、6、10，通電 10 分鐘處理，處理共生藻 10 天，第 0 天、第一天、第三天、第六天、第十天各測試在固定電壓通電產生的逆境下的共生藻適應情形的過氧化氫、葉綠素和細胞活性。因此共生藻在接受到電擊之後，葉綠素和細胞活性的測試證明了共生藻並非死亡而產生過氧化氫，是白化現象後產生的。

關鍵字: 共生藻，蟲黃藻，電場，電壓，抗生素

前言

共生(symbiosis)的定義是兩種不同的生物彼此生活在一起，而共生的關係可分為片利共生，互利共生和寄生等。在片利共生和互利共生的情況下，前者中有一方或是後者中雙方皆受益，可是在寄生的狀態下則是一方受益而另一方則是受害的關係。在互利共生最有名的例子是，在海洋中刺胞動物 (cnidarians)與蟲黃藻 (zooxanthellae)兩者共生所形成的珊瑚礁生態環境。由於他們共生行為十分特殊，是蟲黃藻存活在刺胞動物的消化細胞中，又稱為胞內共生 (endosymbiosis)。當共生生物是能行光合作用的藻類或是細菌時，此共生關係便是光和胞內共生。在海洋生物中，行胞內共生的物種包括: (1) 扁形動物門 (Platyhelminthes) 中的渦蟲 (Turbellaria) 的共生生物為扁藻 (Traselmis)。(2) 軟體動物門 (Mollusca) 和 腹足綱 (Gastropoda) 和 雙殼綱 (Bivalvia) 的共生生物是屬於 Symbiodinium 屬中的蟲黃藻。(3) 索動物門中的海鞘 (Ascidacea) 是和原球藻 (Prochloron) 共生生活。(4) 多孔動物門 (Porifera) 為原始的多細胞生物，也可稱為海綿動物門 (Spongia)，一般稱為海綿 (Sponge)，而和海綿共生的生物為藍綠藻 (Cyanobacteria)。(5) 刺胞動物門中的許多生物例如: 珊瑚，海葵，水母和水螅這幾種類型的生物，其中前三種海洋生物的共生藻是屬於渦鞭毛藻 (Dinoflagellata) Symbiodinium 屬的蟲黃藻，而後者生活於淡水中的水螅的共生藻是屬於綠球藻 (Chlorella)。基於刺胞動物和行光合作用的渦鞭毛藻行互利共生的關係，所建立的珊瑚礁是世界上海洋生態系統中孕育海洋生物的棲息地，其特色是具有高等級的生物多樣性、生態複雜性和高初級生產力，並有著重要的美學和商業價值，特別是在漁業、旅遊業、水族觀賞、觀光經濟方面，有其重要的價值。

可是環繞於珊瑚礁周圍的水域是非常貧瘠而無法給予珊瑚和共生藻成長所需的基本養分，此時，渦鞭毛藻扮演提供宿主養分和維持生理狀態中重要的角色。例如:光合作用中所固定碳通常是以甘油和其他簡單的分子形式存在，方便於共生藻運送的速度和數量來滿足宿主呼吸所需要的需求。此外，對於造礁珊瑚，其物理結構的骨架也是靠著共生藻的存在率而提升碳酸鈣沉積的效率 (Coffroth, 2005)。刺胞動物會藉由消化道內胚層細胞來庇護行光合作用的單細胞藻類，而這種共生藻是屬於渦鞭毛藻 (Dinoflagellata) Symbiodinium 屬，通常也被稱為蟲黃藻。而他們兩者所建立被稱為是一種互利共生，共生藻靠著光合作用活性讓宿主刺胞動物產生有機碳。相對的宿主提供共生藻一個保護的場所避免被植物捕食者獵食，和補充所缺乏無機碳、無機磷和無機氮等營養鹽 (Cecile et al, 2009)

一般而言，細胞會藉由攝食的行為來捕抓胞外的物質。這物質有可能是病原體、細菌或是細胞彼此之間分泌的微細分子等。此時細胞膜會開始內凹或是向外的方式伸出偽足抓取到胞外顆粒分子，經由細胞內所產生的囊泡來運送到特定位置，然而運送過程中會有大大小小不同類型的囊泡來進行融合，或是釋放消化酵素來將胞外分子給分解，這些反反覆覆看似複雜性所連貫再一起的動作稱之為胞飲作用 (endocytosis) (Mellman, 1996)。對於在胞內微生物研究中，這些微生物包括細菌、原生動物、真菌和藻類在消化細胞內生存和宿主維持共生的狀態，進入到細胞內必然會遭受到酵素的攻擊而被消化殆盡。有可能演化成在吞噬溶酶體 (phagolysosome) 中存活，有可能在未成熟的胞噬小體中存活並且持續繁殖，有可能把胞噬小體的膜溶解掉，逃脫出來而在細胞質內生長 (Heinzen et al., 1996)。由於這些方法使共生藻類可以存活在宿主細胞內不被消化掉，不遭受到酵素的攻擊，但在某些情況下可能是共生藻的生長速度快以致於很難被宿主給消化掉 (Hohman et al., 1982)。

共生藻主要是以利用宿主所釋放的代謝廢物來作為營養來源，來提供共生藻生長所需要的二氧化碳、氮鹽和磷酸鹽，因為這些無機營養物質溶解在珊瑚礁環境中含量很低，所以必須透過這種方式來提供所需要的養分。在刺胞動物體內共生狀態彼此共存在低營養的情況下，必須藉由攝食動作來分解和消化胞外分子來補充雙方之間所需要的養分和成長。而當刺胞動物無法提供外援食物的時候，此時共生藻會慢慢出現營養不足的現象，(1)共生藻的細胞分裂明顯下降，(2)葉綠素a含量逐漸降低，(3)碳和氮的比值會增加，(4)共生藻在刺胞動物所含的族群數會大量下滑。當珊瑚或是其他動物因為外在因素失去共生藻時，會使體內大量累積的氨 (ammonia)。正常來說共生藻會吸收宿主所釋放的氨來轉換成氨基酸，再送回去給宿主利用。不管是由共生藻光合作用所產生的或是攝食分解所獲得的，都會促進宿主吸收氨的能力和降低從胺基酸轉變成氨的產生，這些過程有對於動物本身來維持氨的恆定 (Cook et al., 1988)。共生藻執行光合作用的時候會釋放甘油和有機酸，而共生藻行光合作用所產生的碳之化合物有助於動物行呼吸作用所需要的碳源。氮循環比較具有生化複雜性，因為涉及宿主和共生藻之間營養物質的轉換，首先，宿主會產生含氮廢棄物會轉送到共生藻，之後共生藻會將含氮廢棄物轉換成有用氮之化合物再送回去給宿主使用。刺胞動物是眾所皆知對於氨有很高的產率，因為呼吸作用會大量將胺基酸進行脫氨的化學反應以至於釋放大量的氨，而共生藻本身又可以吸收氨，藻類共生作用產物主要都是非含氮之化合物，但還是有少量的胺基酸被釋放。珊瑚有自營性和異營性，在貧瘠的海水中靠著共生藻行光合作用的產物給予珊瑚宿主本身，然而，許多研究也證實異營性的珊瑚也非常活躍，靠著捕抓海水中的浮游生物進行著固碳作用形成碳酸鈣來建構本身骨架 (Wang and Douglas, 1998)。

在海洋中共生藻與各宿主所建立的共生關係對於海洋生態給予了很豐富的生態環境與豐富的生物多樣性。但是共生藻遇到了長時間的環境改變脅迫下，不管是溫度，或是強光，會失去色素、離開宿主、甚至死亡，所以實驗假設以不同的方式給予是當的脅迫使共生藻產生組織功能和生理功能上的改變，這只是初步的兩個實驗，然而之後實驗想進一步了解的是，當宿主與共生藻所建立的共生關係被脅迫給瓦解時，會產生什麼路徑，會走向哪一個路徑，對於組織功能有何影響，使宿主與共生藻的共生生態轉變為白化，在細胞、蛋白質與酵素是如何調控這些脅迫帶來的傷害，如何作用，或是探討基因在脅迫下是與抗氧化有所關聯的基因而被誘導出來。

材料與方法

共生藻培養

本研究以分離自美麗海葵, *Aiptasia pulchella* Carlgren 的共生藻為材料，方便取樣和容易飼養，實驗室內飼養的共生藻是從海生館所取得，養於三角錐形瓶中分別標記為共生藻A和共生藻B，放於培養箱中，溫度設定為 24°C左右，而光照時間為 12 小時和黑暗時間為 12 小時為週期，照度(lux) 2900。

抗生素處理

以抗生素 Puromycin劑量(P) 1, 10, 30 及 60 ng/μL, Hygromycin劑量(H) 800, 1600 及 3200 ng/μL 處理共生藻 10 天，於第三天、第六天、第十天各測試在抗生素產生的逆境下的共生藻適應情形的葉綠素和細胞活性。

電場逆境

研究以固定電壓通電處理對共生藻生長生理的影響。藻經固定電壓 0、3、6、10，通電 10 分鐘處理，處理共生藻 10 天,第 0 天、第一天、第三天、第六天、第十天各測試在固定電壓通電產生的逆境下的共生藻

適應情形的過氧化氫、葉綠素和細胞活性。

葉綠素含量分析

吸取 1.5mL 的藻液，置於微量離心管，並將其震盪。離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘。移除上清液，然後加入 500 μ L ddH₂O 清洗兩次，震盪，充分混勻，離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘。加入 500 μ L 的萃取液丙酮:Dimethyl sulfoxide (9:1, vol/vol)，震盪、離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘。離心完後回收上清液到新的微量離心管，這個步驟重覆三次。放入分光光度計(U-2800 spectrophotometer HITACHI)測定吸光值，波長分別為 630 nm、645 nm、663 nm、750 nm。葉綠素 a 及葉綠素 c 的計算公式如下:

$$C_{E,a}=11.85 (\text{Abs } 664)-1.54 (\text{Abs } 647)-0.08 (\text{Abs } 630)$$

$$C_{E,c}=24.52 (\text{Abs } 630)-7.60 (\text{Abs } 647)-1.67 (\text{Abs } 664)$$

細胞活性分析

吸取 500 μ L 的藻液置於微量離心管，並將其震盪。離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘，去除上清液。加入 180 μ L，1 x PBS 溶液清洗，並震盪、離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘，去除上清液，重複清洗兩次，最後加入 60 μ L，1 x PBS 溶液，並震盪。藻液和 trypan blue 染劑以 10 μ L 及 10 μ L 比例混合，震盪靜置 5 分鐘。取 15 μ L 的混合液，以血球細胞計數器觀察紀錄。觀察到的共生藻數分成棕色(還活著的)、藍色(已死亡被染劑染色的)，棕色數量/(棕色+藍色總數)表示細胞活性，數值越大，表示細胞具有活性。

過氧化氫含量分析

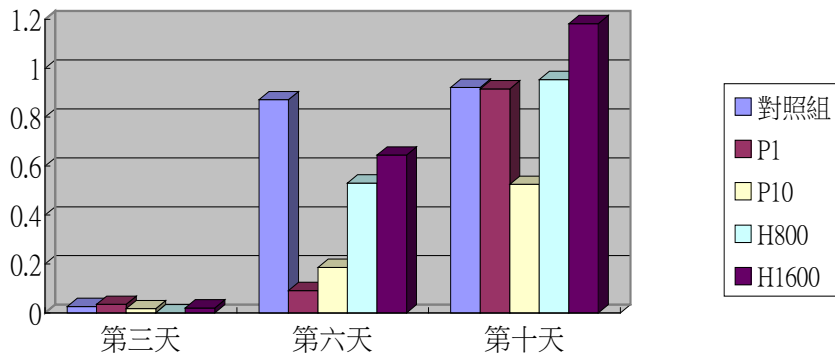
吸取細胞活性分析之上清液 10 μ L，放入微量離心管中。依序加入 240 μ L 的 0.1% trichloroacetic acid (TCA)，250 μ L 的 Potassium phosphate buffer, 0.1 M，1 mL 的 1M KI (碘鉀)，混合震盪，避光一個小時後，以分光光度計測定吸光值，波長為 390 nm。

結果與討論

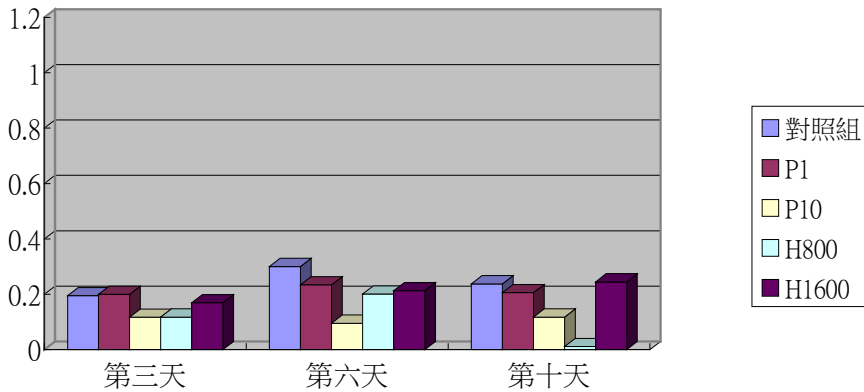
本研究以分離自美麗海葵，*Aiptasia pulchella* Carlgren 1943 的共生藻為材料，研究以抗生素 puromycin 和 hygromycin 處理對共生藻生長生理的影響。我們一開始設計實驗藥劑的濃度是 Puromycin 1 及 10 ng/ μ L、Hygromycin 800 及 1600 ng/ μ L，但是在葉綠素的測試中發現不管是葉綠素 a 或是葉綠素 c 會隨時間越長而增加，這表示了，我們添加了抗生素到試管中，不但沒有使共生藻死亡或是抑制共生藻的生長，反而共生藻在這樣的環境中生長得很好，在細胞活性的測試中共生藻的細胞也沒有明顯的受到傷害導致死亡(圖 1)。因此我們抗生素藥劑的濃度提升至 Puromycin 30 及 60 ng/ μ L、Hygromycin 1600 及 3200 ng/ μ L，實驗結果可以看到 P30 和 P60 與上一次實驗的 P1 和 P10 不管在於葉綠素 a、c 或是細胞活性中都有明顯的被抑制，反觀兩次添加 Hygromycin 的實驗組卻沒有太大差異(圖 2)。結果顯示 Puromycin 抗生素濃度達 30 及 60 ng/ μ L 具有抑制共生藻生長的現象，表示其中的共生藻可能遭受傷害導致死亡或是白化，細胞活性的下降則表示細胞有死亡的情形。Hygromycin 抗生素處理對共生藻生長並無抑制的現象，與對照組比較則顯示有促進共生藻的生長。

研究以電場固定電壓通電處理對共生藻生長生理的影響，藻分別經固定電壓 0, 3, 6, 10 伏特通電 10 分鐘，於不同天數測定藻色素含量及細胞活性(trypan blue 染劑)。在葉綠素的測試中，我們發現 0V 和 3V 的葉綠素表現是呈現因為時間越長然而葉綠素的量呈現越低，照理說 0V 不應該如此，我們預期是 0V 應該會維持在第一次測試時的高數值，誤差應該不至於那麼的懸殊，但是在 3V、6V、10V 的數據顯示上稍微符合預期，可以看到圖表中不管是葉綠素 a 或是葉綠素 c 的含量，經固定電壓 3V、6V、10V 處理後，幾乎是測試不到含量或是因時間越長含量逐漸降低(圖 3)。細胞活性的結果，顯示共生藻仍具有細胞活性，因為染劑並無進入細胞(圖 3)。葉綠素 a 含量的分析顯示共生藻已經白化。

A.
mg/L



B.
mg/L



C.

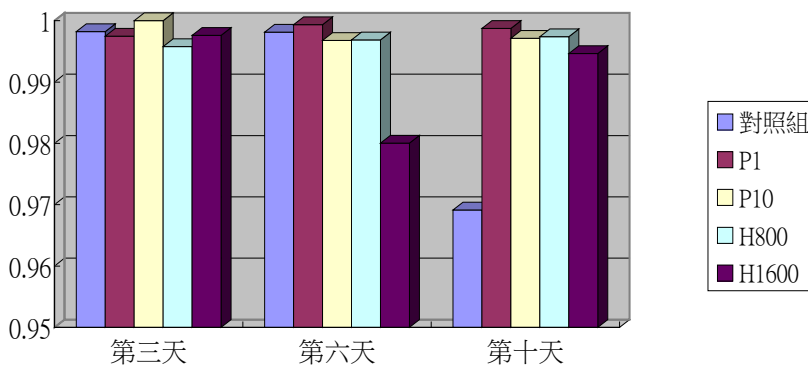
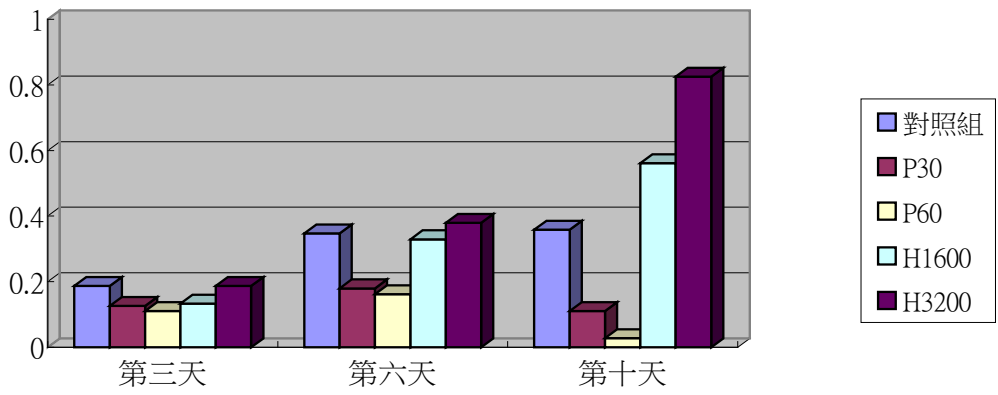


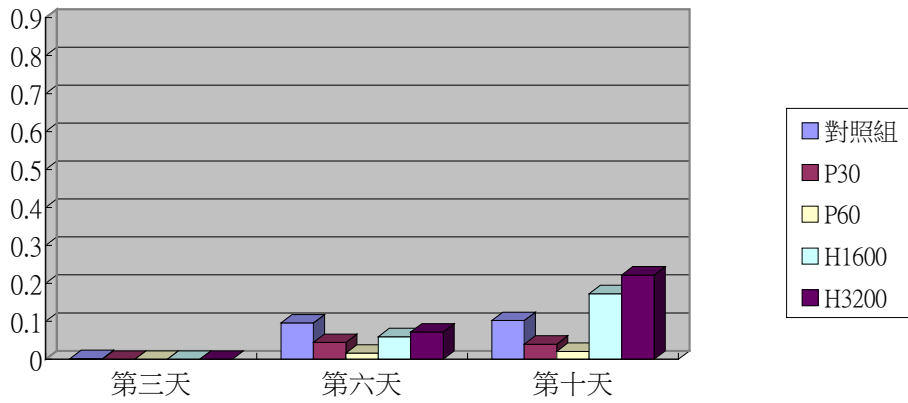
圖 1. 抗生素對共生藻生長的影响。 A. 葉綠素a的變化量 (mg/L)。 B. 葉綠素c的變化量 (mg/L)。 C. 細胞活性分析。共生藻分別以 puromycin 劑量 1 及 10 ng/μL (P1 及 P10) 及 hygromycin 劑量 800 及 1600 ng/μL (H800 及 H1600) 和處理。比較葉綠素的變化量為吸取 1.5mL 的藻液，經丙酮:Dimethyl sulfoxide (9:1, vol/vol) 萃取液 1.5mL，萃取藻色素，以波長 630, 647, 663 及 750nm，分析吸光值並計算葉綠素含量。細胞活性分析為藻液和 trypan blue 染劑以 1:1 的比例混合後，以血球細胞計數器觀察紀錄。觀察到的共生藻數分成棕色(還活著的)、藍色(已死亡被染劑染色的)，棕色數量/(棕色+藍色總數)表示細胞活性，數值越大，表示細

胞具有活性。

A.
mg/L



B.
mg/L



C.

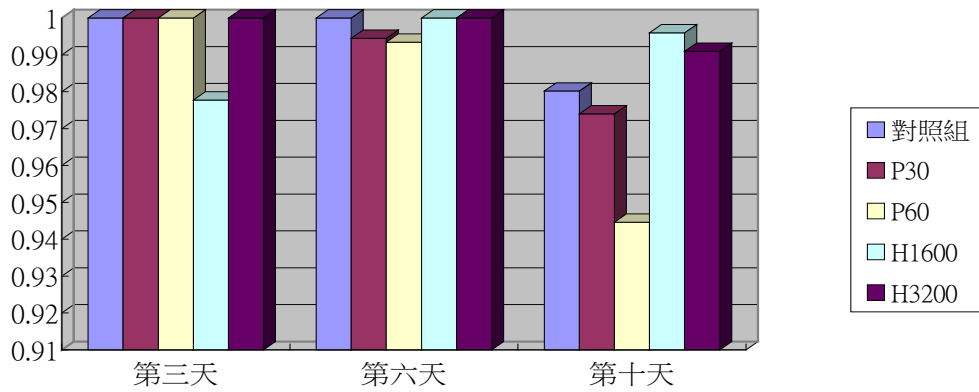
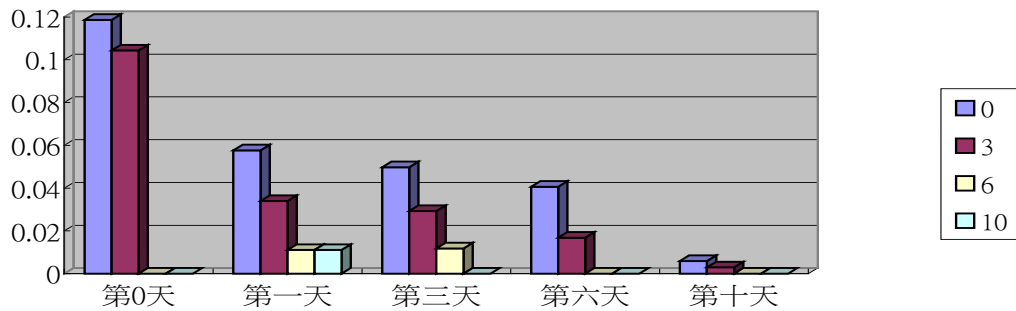


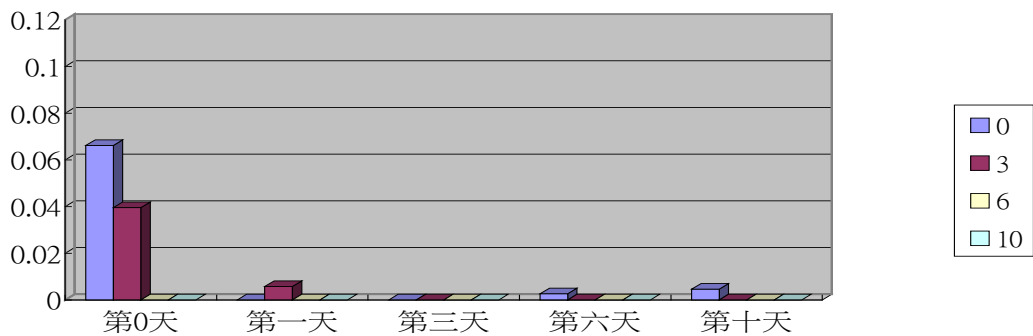
圖 2. 抗生素對共生藻生長的影响。A. 葉綠素a的變化量 (mg/L)。B. 葉綠素c的變化量 (mg/L)。C. 細胞活性分析。共生藻分別以 puromycin 劑量 30 及 60 ng/ μ L (P30 及P60) 及 hygromycin劑量 1600 及 3200 ng/ μ L (H1600 及H3200)和處理。

進一步分析電擊後，海水培養液過氧化氫含量的變化，圖 4 顯示，海水培養液(對照組)接受到電擊後也會產生出過氧化氫，原本我們預期共生藻經電極處理後，因為步入白化或是死亡才會有過氧化氫的產生。雖然與預期不同，但是海水的過氧化氫除了 0V 之外，所含有的過氧化氫含量會隨時間漸漸消散，這部分也對應到實驗組的部分，從第 0 天到第一天都是逐漸減少的趨勢然而到了第三天之後會發現過氧化氫的測試出的濃度開始增加，在 6V 和 10V 的含量上，與我們預期的結果有一些符合，因為共生藻在接受到電擊之後，開始步入白化之後產生的過氧化氫，在第六天和第十天 6V 和 10V 的增加更是明顯，但是在第一天、第三天和第六天的 0V 3V 測試到的數據卻與預期不同。並不是因為受到電擊而大量死亡，導致過氧化氫大量增加。因此葉綠素和細胞活性的測試證明了共生藻並非死亡而產生過氧化氫，也證實即使藻色素體受到傷害，使共生藻呈現白化現象，但是細胞仍未死亡。然而葉綠素分解共生藻白化後，我們不敢斷定共生藻細胞會不會因為時間慢慢修復，而使細胞內的葉綠素含量增加甚至回復到未受到電擊時的狀態，這一件事是值得觀察的。圖 5 顯示共生藻以固定電壓 3 伏特，分別通電 0, 3, 6, 10 分鐘，培養 10 天數後，分析其細胞活性及照相，可以看出共生藻呈現棕色藻體，白化藻體 (染劑無進入細胞) 及藍色藻體 (細胞已經死亡)。

A.



B.



C.

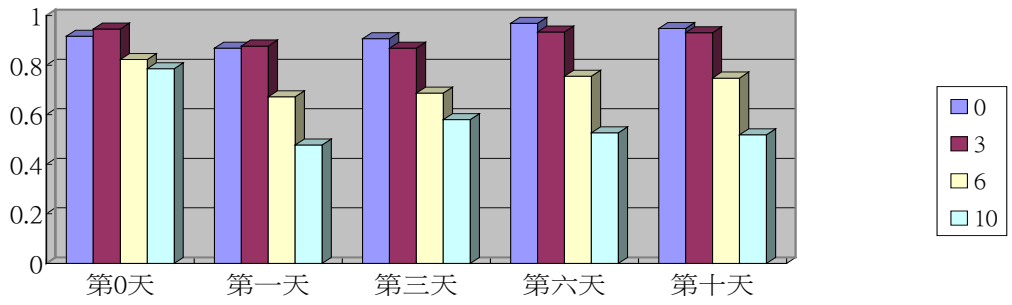
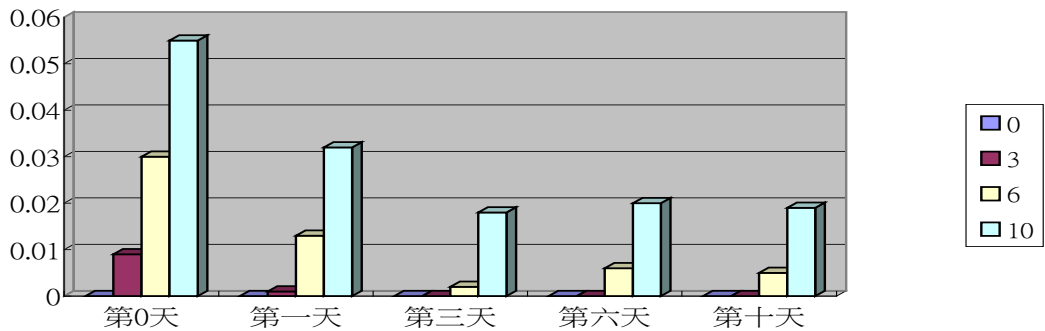


圖 3. 固定電壓對共生藻生長的影响。藻以固定電壓 0, 3, 6, 10 伏特通電 10 分鐘處理，培養適當天數後，分析藻色素及細胞活性。A. 藻葉綠素 a 含量 (mg/L)。B. 藻葉綠素 c 含量 (mg/L)。C. 細胞活性。

共生關係為共生藻行光合作用所合成的有機碳會送到珊瑚宿主，給予宿主所需要的碳和能量，對於共生藻而言，共生藻受到珊瑚良好的保護同時又吸收宿主攝食之後所產生的二氧化碳和氨。藉由共生藻和刺胞動物宿主一來一往的互助關係，在這樣的共生條件下雖然可以提供宿主本身大量生長和繁殖利益(特別是對於珊瑚宿主有益的共生藻) (Wooldridge, 2010)。

A.



B.

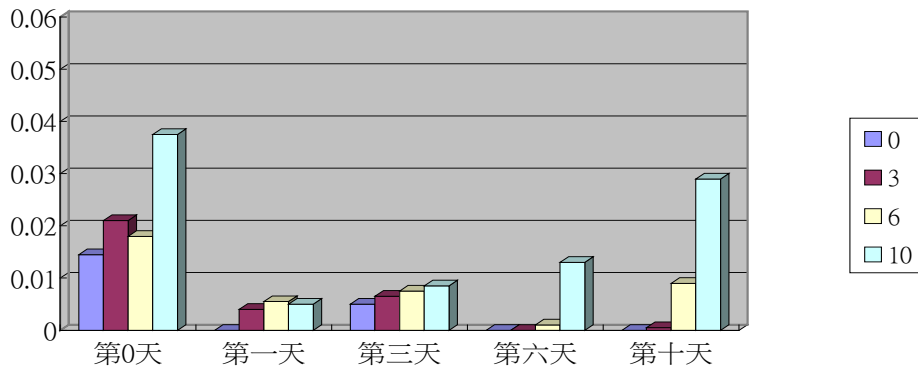


圖 4. 固定電壓海水培養液中過氧化氫的含量。藻以固定電壓 0, 3, 6, 10 伏特通電 10 分鐘處理，培養適當天數後，分析培養液中過氧化氫的含量(μmole)。A. 海水培養液對照組，不含共生藻。B. 實驗組含共生

藻。

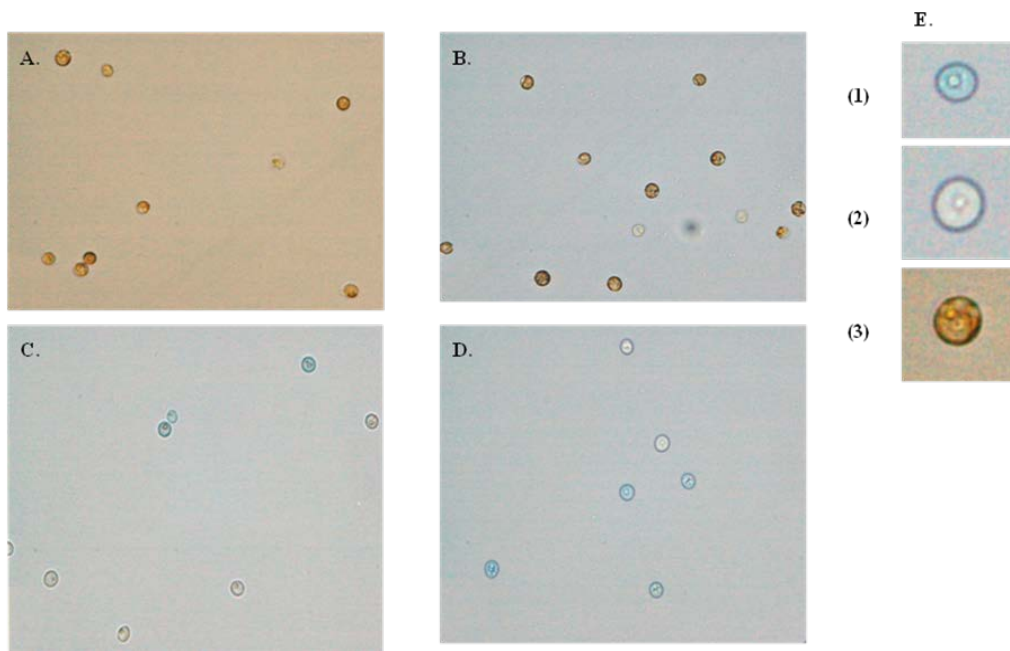


圖 5. 固定電壓對腰鞭毛藻細胞活性的影響。共生藻以固定電壓 3 伏特，分別通電 0, 3, 6, 10 分鐘，培養 10 天數後，分析其細胞活性。**A.**通電 0 分鐘。**B.** 通電 3 分鐘。**C.** 通電 6 分鐘。**D.** 通電 10 分鐘。**E.** 不同活性的細胞。(1). 藻細胞死亡，呈藍色。(2).藻白化，染劑無法進入細胞。(3). 正常藻，呈棕色。

白化的定義簡單而言就是珊瑚宿主和共生藻之間的共生關係被破壞或是被終止，因為失去大量的共生藻或是共生藻的本身藻色素被降解，而這些共生藻物種具有葉綠素 a、葉綠素 b、C2，在加上各種類胡蘿蔔素，特別是甲藻素是屬於棕色，除非宿主本身的動物組織含有大量其他色素存在，不然皆會呈現出透明組織或是白色的碳酸鈣骨架形式存活，所以大部分看到的顏色都是來自藻類。導致珊瑚白化可能受到環境和疾病的影響，以疾病的影響來說，因為感染的過程中導致組織損傷或是生理功能改變，而以環境來說可能是受到惡劣環境擾動產生一些壓力表現，就環境來細說可能因素有鹽度的改變、海水溫度的起伏變化、可見光(輻射)，會干擾生理功能或是組織損壞，生物皆有一個自己能忍受的惡劣環境的範圍值，不管是溫度、鹽度、光照都有一個忍受範圍，如果過度的改變，導致共生藻無法負荷，共生藻會改變生理功能、或是組織遭受到傷害而死去、或是選擇離開宿主，使著宿主呈現白化的現象(Douglas, 2003; Rosenberg et al., 2008; Weis, 2008)。生理適應機制是在長期演化過程中表現出來的抵抗環境變化的一種保護機制，在環境威脅強度較輕且持續時間較短時的情況下，可以透過生理上的保護機制來適應環境的變化(Jones et al., 1998; Warner et al., 1999)。就生理適應機制來說，主要是透過葉黃素循環、螢光色素、活性氧清除系統、紫外線吸收物質MAAs、產生熱休克蛋白來適應。

光是光合作用的能量來源，在一般的情況下，光合作用機構中所吸收到的光能量可以透過光的化學能量來轉換成不同能量，過程中可能會有能量上的消散，所以在強光下非輻射能量的消散，即是主要依賴葉黃素循環的能量消散過程則成為防禦過度強光的光照對於行光合作用機構的破壞。葉黃素循環在強光下可以保護共生藻免受到氧化作用和光抑制，而所謂的葉黃素循環是指葉黃素中的三個組織分別是 1. 葉黃素 (xanthophylls) 2. 硅甲藻黃質(diadinoxanthin) 和硅藻黃質 (diatoxanthin) 依光照條件的改變並相互轉化，在弱光的情況下，這一種互相轉化並不會發生，而在強光的情況下，當光能太多有過剩時，含有雙環氧的葉黃素就會在去環氧化酶的催化下，通過中間的硅甲藻黃質轉化為去環氧的硅藻黃質，硅藻黃質的含量隨過剩的光能增加而增加，並可使過剩光能轉變成熟能消散掉。這種循環存在於藻類葉綠體的類囊體膜上，而熱耗散的增加會導致光化學能量轉換效率下降，但是卻在防禦過剩光能對光合作用機構的破壞中具有主要的保護作用。

許多研究表明珊瑚色素發出的螢光可能是珊瑚光保護中另一種重要的機制。珊瑚組織中共生藻的生

物數量與珊瑚的螢光色素含量呈現正相關，這表示了珊瑚螢光色素的含量越高，珊瑚組織裡面的共生藻生物數量也就會越高，而對珊瑚來說抵抗環境變化的抗性也就越強，所以說珊瑚的螢光色素含量非常的豐富的話，珊瑚就越不容易發生白化現象，這表明了珊瑚的螢光色素對於共生藻有相當的重要性和重要的保護性，但是螢光色素在高溫的情況下也非常容易變性。

Mycosporine like aminoacids (MAAs) 在海洋生物體內發現的有多達 50 種之多，而其最大吸收光的光譜值約在 310~360 nm，因此包括了UVA與UVB紫外線的範圍。珊瑚的抗紫外線物質可能是由珊瑚組織中的共生藻所提供，而珊瑚中的MAAs 能被大部份波長的光線穿過，MAAs 能夠有效的吸收紫外線，將紫外線所帶來的能量以熱能的形式釋散出去，也不會產生一些對於本身有傷害的中間物，比如說是自由基，所以MAAs被當作為珊瑚組織細胞中的遮光物質能夠有效的保護珊瑚本身和珊瑚組織中的共生藻免受受到紫外線的傷害。

珊瑚與共生藻在高溫的誘導情況下，珊瑚與共生藻本身體內會分泌出熱休克蛋白(應激蛋白)，熱休克蛋白是珊瑚與共生藻抵抗環境變化脅迫另一種重要的防禦機制。熱休克蛋白會參與細胞內中酶的活性調控，具有細胞內抵抗氧化作用，因此可以減少自由基對組織細胞的傷害和維持細胞的正常功能。

植物大多普遍存在活性氧清除機制，當受到環境的改變脅迫下，會產生許多種抗氧化酵素類，如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶 (catalase, CAT) 等等的，來清除植物體內過多的活性氧和自由基，用以避免對組織機構的傷害。雖然珊瑚屬於腔腸動物，但是在珊瑚和共生藻共生的機制下，當珊瑚遭受到環境改變的脅迫時(高溫、強光、鹽度等等)，珊瑚體內會分泌出各種抗氧化的酶，來清除珊瑚體內的活性氧和自由基，讓珊瑚宿主不受到環境改變的脅迫所產生的有害物質(活性氧、自由基、MDA)的傷害，SOD的多樣性正是由環境改變對於珊瑚的選擇壓力而被誘導出來的，這樣有利於珊瑚和共生藻對環境改變脅迫的適應力。

本研究報告分析 puromycin 及 hygromycin 抗生素及固定電壓等逆境對共生藻生長的影響。以抗生素 puromycin 處理，濃度達 60 ng / μ L，可有效抑制共生藻的生長，如共生藻葉綠素的降解，進而細胞死亡。抗生素 hygromycin，濃度達 3200 ng / μ L，對共生藻並無逆境影響，卻有促進細胞生長的現象。對共生藻施以固定電壓 3 伏特，通電 10 分鐘處理，對細胞即有負面影響。共生藻受到逆境，造成葉綠素的降解，形成白化藻體，部分白化藻體經細胞活性分析 (trypan blue 染劑)，顯示其細胞膜仍然具有活性，因此是否白化藻體仍有機會恢復到完整活性？本研究結果將有助於共生藻遭受逆境時，細胞生理、訊息傳遞、程式細胞凋亡等分析，另外提供以共生藻為材料，進行基因轉殖研究之基本資料。

參考文獻

- Cecile, S.,Philippe,G,Emeline,D.,Denis,A. And Paola,F.,(2009) Comprehensive EST analysis of symbiotic sea anemone,*Anemonia viridis*.*BMC Genomics*.10.
- Coffroth,M.A.,(2005) Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*.*Protist*.156,19-34.
- Cook, C., D'Elia,C .and Muller-Parker,G.,(1988)Host feeding and nutrient sufficiency for zooxanthellae in the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Marine Biology*.98,253-262.
- Douglas, A.,(2003) Coral bleaching—how and WHY? *Marine Pollution Bulletin*.46,385-392.
- Heinzen,R.A.,Scidmore,M.A.,Rockey,D.D.and Hackstadt,T.,(1996) Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*.*Infection and immunity* 64(3), 796-809.
- Hohman, T.C., McNEIL, P.L and Muscatine, L.,(1982) Phagosome-lysosome fusion inhibited by algal symbionts of *Hydra viridis*. *The Journal of Cell Biology*.94, 56.
- Jones, R., Hoegh Guldberg, O., Larkum, A. And Schreiber, U .,(1998) Temperature induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant, Cell and Environment*.21, 1219-1230.
- Mellman,I.,(1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annual review of cell and developmental biology*.12,575-625.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. and Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 5,355 -362.
- Wang,J.and Douglas,A.,(1988) Nitrogen recycling or nitrogen conservation in an alga-invertebrate symbiosis? *Journal of experimental biology*.201,2445.
- Warner ME, Fitt WK, Schmidt GW (1999) Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant

of coral bleaching. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8007–8012.
Weis, V.M., (2008) Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *The Journal of Experimental Biology*. 211, 3059-3066.
Wooldridge, S.A.,(2010) Is the coral algae symbiosis really mutually beneficial, for partners? *BioEssays*.32,615-625.

Effects of electrical field and antibiotics on the growth of a dinoflagellate, *Symbiodinum sp.*

Jay Lin Wang, Judy Wu, Justing Chen, Chin-Min Lin, Peter Wang, Chorng-Horng Lin*

Department of Bioresources, DaYeh University, 168 University Rd, Changhwa 515, Taiwan

*Email: clin@mail.dyu.edu.tw

The dinoflagellate symbiotic algae that lives in marine invertebrates, including corals, sea anemones, mollusks, and other taxa generally is described as zooxanthellae. Symbiotic association with coral is important for the coral reef ecosystem, since studies on the coral bleaching which is related to the increasing sea surface temperature show that it is the defect in symbiosis, either the coral lose the zooxanthellae or the pigments in zooxanthellae are disappear. In order to study the physiological responses of dinoflagellates under stress, we have applied antibiotics, puromycin and hygromycin, and electrical fields on the growth of the dinoflagellates by chlorophyll assay and trypan blue stain. For antibiotics study, the algae showed inhibitory growth by the application of puromycin, 60 ng / μ L after 10 days. Interestingly the algae showed the enhanced growth by hygromycin, 3200 ng / μ L. For the stress of electrical field, the algae were applied by voltages, 0, 3, 6, 10 for 10 minutes and followed the incubation for 10 days. The results showed that chlorophyll a was significantly decreased after 10 days, and the cell vitality assay showed 50% of the algae were dead (blue). Thus the electrical impact caused the algae lost the plastids, then eventually the cells would die or recover.

Keywords: dinoflagellate, zooxanthellae, electrical field, voltage, antibiotics