

以物種專一性引子建立四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫物種鑑定技術

蘇義哲¹ · 李彥宏^{1*} · 何宜慶² · 吳豐成¹

¹農業部水產試驗所東港養殖研究中心

²國立高雄科技大學水產養殖系暨研究所

摘 要

午仔魚中的兩個物種，四絲馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 與多鱗四絲馬鮫 (*E. rhadinum*) 是沿近海漁業及養殖漁業的重要經濟性物種。四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫鑑別特徵主要是藉由側線鱗片數量進行區分，但外觀上仍不易分辨，而魚卵、魚苗及水產加工品更無法藉由外觀進行鑑定，雖然基因定序可以區分兩物種，但時間及成本的花費高。本研究旨在根據四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫細胞色素 c 氧化酶 I (cytochrome c oxidase I, COI) 基因序列上的差異，建立物種專一性引子 (species-specific primer) 技術，依聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 擴增片段的大小不同，即能快速準確鑑定物種。結果顯示物種專一性引子的物種鑑定結果與外觀鑑定及基因定序結果一致，證實物種專一性引子能夠快速準確的鑑定此兩物種。本研究採集之臺灣周邊海域野外午仔魚樣品為多鱗四絲馬鮫，而養殖場取得午仔魚、魚卵及魚苗樣品為四絲馬鮫。無論是基礎研究、種原保存或現場應用皆需快速且準確的檢測方法來進行物種鑑定，本研究將有助於四絲馬鮫屬 (*Eleutheronema*) 魚類的遺傳背景研究、物種資源保護及午仔魚的養殖產業開發。

關鍵詞：四絲馬鮫、多鱗四絲馬鮫、物種專一性引子、物種鑑定、細胞色素 c 氧化酶 I

前 言

四絲馬鮫屬 (*Eleutheronema*) 魚類具有較大鹽度的耐受力，通常存在於河口和河流，以及淺沙或泥灘上的主要沿海海洋棲息地 (Motomura, 2004)，是沿海和近海小型漁業及養殖漁業的重要商業物種，為高經濟價值魚類 (Binh *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2020)，2022 年臺灣馬鮫科魚類生產量約為 12,588 mt，產值約為新臺幣 19 億元 (漁業年報, 2022)。午仔魚大都以生鮮、冷凍、乾燥或鹹魚等商品形式銷售，相較於其他馬鮫種類，因四絲馬鮫體型較大且易受過度捕撈和水質污染影響，四絲馬鮫在熱帶印度-西太平洋範圍內數量迅速減少，已被國際自然保護聯盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 列為瀕危物種 (Motomura *et al.*, 2015)。四絲馬鮫屬包含四絲馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*)、多鱗四

絲馬鮫 (*E. rhadinum*)、三絲馬鮫 (*E. tridactylum*) 等三個物種 (Motomura *et al.*, 2002)，根據測定魚體之測量形質、計數形質及外部形態特徵，可區分三絲馬鮫與其他兩者，但四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫外觀非常接近且不易區分。Bleeker (1862) 最早將其鱗片數多寡、有無犁骨齒板等作為區分四絲馬鮫屬物種的形態特徵，並對四絲馬鮫屬魚類進行分類鑑定 (Motomura, 2004)。文獻指出四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫可透過胸鰭顏色或側線的鱗片數目進行物種區分，四絲馬鮫側線的鱗片數目為 71 – 80 片之間，多鱗四絲馬鮫側線的鱗片數目為 82 – 95 片之間 (Motomura *et al.*, 2002)，或是透過傳統形態學與測量形質數據來區分 (趙等, 2016)，亦可藉由耳石分析微量元素的比率來鑑別野外捕獲或養殖的午仔魚 (Su *et al.*, 2022)。

四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫的棲息區域略有差異，四絲馬鮫多分布於緯度較低區域，印度-西太平洋：波斯灣至巴布亞新幾內亞和澳大利亞北部，多鱗四絲馬鮫多分布於緯度較高區域，日本至南中國海，包括日本、臺灣、中國及越南等沿海 (Motomura *et al.*, 2002; Motomura, 2004)。適合四絲

* 通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁街 67 號; TEL: (08)8324121 轉 285; FAX: (08)8320234; E-mail: yhlee@mail.tfrin.gov.tw

馬鮫生長的溫度為 25.2 – 29.3°C，而適合多鱗四絲馬鮫生長的溫度為 20.4 – 26.9°C (Froese and Pauly, 2024)，因此四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫對環境溫度的耐受性或許有差異。過去文獻中均提到臺灣午仔魚養殖的物種為四絲馬鮫，且以南部地區為主要養殖場域；臺灣新竹外海海域捕獲的野生午仔魚物種大都為多鱗四絲馬鮫 (Su *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2022)。因高緯度地區養殖漁業的發展需求，加上目前在越南已有多鱗四絲馬鮫的相關養殖紀錄 (Binh *et al.*, 2019)，多鱗四絲馬鮫可望成為具潛力的養殖開發物種。

四絲馬鮫 (Atikah *et al.*, 2020; Lakra *et al.*, 2011) 與多鱗四絲馬鮫 (Atikah *et al.*, 2020; Thu *et al.*, 2019) 的粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 上的細胞色素 c 氧化酶 I (cytochrome c oxidase I, COI) 基因序列，已隨著基因定序技術的進步而完全解開。許多文獻利用的 COI 基因 (Xiao *et al.*, 2022; Atikah *et al.*, 2020) 或細胞色素 b (Cytochrome b, CYTB) 基因 (Wang *et al.*, 2014) 的序列差異來鑑定四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫物種及其親緣關係，雖然基因定序方法能區分此兩物種，但時間及成本的花費較高。利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 進行午仔魚物種鑑定的方法，則有楊等 (2019) 設計四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫特異序列擴增 (sequence characterized amplified region, SCAR) 標誌，依據 PCR 產物生成有無進行物種鑑別，四絲馬鮫有產物生成，而多鱗四絲馬鮫則無。

許多應用於物種鑑定的分子技術已完整開發，包括限制性片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Kumar *et al.*, 2014)、隨機擴增多態性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Yang and Quiros, 1993)、多重聚合酶連鎖反應 (Multiplex Polymerase Chain Reaction, Multiplex PCR) (Ali *et al.*, 2014)、次世代定序 (next-generation sequencing, NGS) (Goodwin *et al.*, 2016)，和物種專一性引子 (species-specific primer) (Dong *et al.*, 2019; Varadinová *et al.*, 2015)。物種專一性引子方法因聚合酶連鎖反應的高專一性和便利性，而成為物種鑑定常用的一種檢測方法，例如：細菌 (Matsuki *et al.*, 1999)、酵母菌 (Muir *et al.*, 2011)、線蟲 (AL-Banna *et al.*, 2004)、

嚙蟲目昆蟲 (Psocoptera) (Zhao *et al.*, 2016)、河豚 (*Takifugu* spp.) (Dong *et al.*, 2019) 等。

從養殖物種的選擇、野生或養殖午仔魚的判別及水產加工品等，皆需快速準確的午仔魚物種鑑定檢測方法，因此開發午仔魚物種快速鑑定技術為必要之務。本研究之物種專一性引子以 COI 基因序列上的鹼基差異進行設計，物種專一性引子與四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫的 DNA 樣品，分別擴增大小不同的 PCR 產物，進而能夠快速準確地鑑別出四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫，此技術將有助於午仔魚的遺傳背景研究、物種資源保護及午仔魚的養殖產業開發。

材料與方法

一、樣品取得、外觀鑑定與 DNA 抽取

本研究從臺灣周遭海域採集野生午仔魚樣品 53 尾 (Fig. 1A)，從養殖場取得養殖午仔魚樣品 19 尾 (Fig. 1B)，皆為黑色胸鰭午仔魚樣品，另自漁市場取得黃色胸鰭午仔魚樣品 4 尾 (Fig. 1C)，大小介於 30 – 33 cm 之間，魚卵則取自水產試驗所東港養殖研究中心 (Fig. 1D)，午仔魚魚苗樣品 20 尾從屏東四間午仔魚種苗場取得 (Fig. 1E)，尖吻鱸 3 尾 (*Lates calcarifer*) 及六絲馬鮫 3 尾 (*Polydactylus sexfilis*)，取得樣品後，分別進行編號、拍照記錄外觀，魚鰭、肌肉組織採樣、魚苗及魚卵儲存於 99% 酒精中，於 -20°C 保存，以備後續分析使用。

外觀形態物種鑑定則透過魚側線鱗片數目等形態學進行物種鑑定，四絲馬鮫側線的鱗片數為 71 – 80 片，多鱗四絲馬鮫側線的鱗片數為 82 – 95 片之間 (Motomura *et al.*, 2002)，且本研究樣本皆可分別落於各數據範圍之內。粒線體 DNA 的萃取則參照動物組織抽取套組 (taco™ DNA/RNA Extraction Kit) 之萃取方法進行，經萃取後的 DNA 樣品保存於 -80°C 冰箱，以備後續實驗使用。

二、粒線體 DNA COI 基因序列分析

根據文獻 (Xiao *et al.*, 2022) 中所提到之四絲馬鮫 COI 基因序列 (accession number: MG816119-28, EF609512-13, MG923346-50) 與多鱗四絲馬鮫

COI 基因序列 (accession number: MG816129-38, MK777485)，從美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (Madden *et al.*, 1996) 基因資料庫中下載 COI 基因序列，並利用歐洲生物資訊研究所 (European Bioinformatics Institute, EBI) 歐洲分子生物學實驗室 (European Molecular Biology Laboratory, EMBL) 網站的多重序列比對軟體 (multiple sequence alignment, MSA) (Kanz *et al.*, 2005) 進行比對，進行四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫 COI 基因序列上的差異分析 (Fig. 2)。

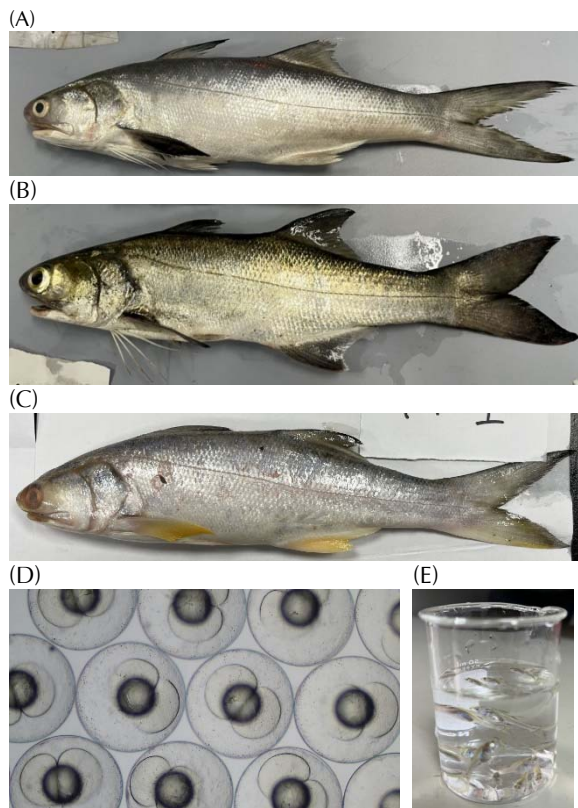


Fig. 1 Samples of this study: *Eleutheronema rhadinum* (A) and *E. tetradactylum* (B) with black pectoral fins. Fourfinger threadfin (C), roe (D), and fry (E) with yellow pectoral fins.

三、DNA COI 基因引子設計

四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫粒線體 DNA COI 基因序列經 MSA 軟體比對，根據在 COI 基因序列上鹼基相同的區域，設計了四絲馬鮫及多鱗四絲馬鮫 COI 基因共用引子一組 (ERET COI F primer: 5'-GGCGTTAACCCGCGCTTTTATAGATTTC-3' 及

ERET COI R primer: 5'-GGTTTAACCCGCGAT TTCACCTTGAC-3')(Table 1)。四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫 ERET COI 引子委由生技公司 (基龍米克斯) 進行商業合成。

四、物種專一性引子設計

四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫 COI 基因序列經 MSA 軟體比對，根據物種間基因序列上的鹼基差異進行引子設計，共設計了 ERET 1 及 ERET 2 兩組引子，每組物種專一性引子中包含了三條引子，針對四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫基因鹼基上的差異，設計兩條正向物種專一性引子，以及序列一致區域設計一條共用的反向引子 (Fig. 3)，將此三條引子為一組合，一同進行 PCR 反應。ERET 1 物種專一性引子序列為：ET 1 F primer: 5'-TGACTC CTCCCCCTTCCTTCTTACTC-3'、ER 1 F primer: 5'-TCTATCTAATCTTTGGGGCATGAGCTGGG-3'、ERET 1 R primer: 5'-GCGTGGGCAAGGTTT CCTGCTAAAGG-3'；ERET 2 物種專一性引子序列為：ET 2 F primer: 5'-CCTAGTCACGGCCGTA TTAATTCTTCTA-3'、ER 2 F primer: 5'-TGACTCC TCCCGCCCTCTTTCTTTCTT-3'、ERET 2 R primer: 5'-CCTCTGGGTGACCAAAGAATCAGAATA-3' (Table 1)，透過膠體電泳檢測，根據 PCR 產物的大小不同進而區分四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫，物種專一性引子委由生技公司 (基龍米克斯) 進行商業合成。

五、PCR 條件及膠體電泳

粒線體 DNA COI 的 PCR 條件為分別取 10 μ L 的 Master Mix (KAPA KK1024 KAPA Taq Ready Mix, Merck) 及 10 μ L 去離子水，再加入 ERET COI 引子各 1 μ L，最後再加入 1 μ L 的 DNA 樣本至 PCR 反應管內 (約 23 μ L)。將上述 PCR 反應管置於 PCR 儀器中設定升降溫程序。PCR 循環包括在 94°C 下加熱 5 分鐘的起始步驟，隨後依 95°C 加熱 30 秒、59°C 加熱 30 秒、72°C 加熱 1 分 30 秒此循環，經 35 個循環後，最後在 72°C 下加熱 7 分鐘。

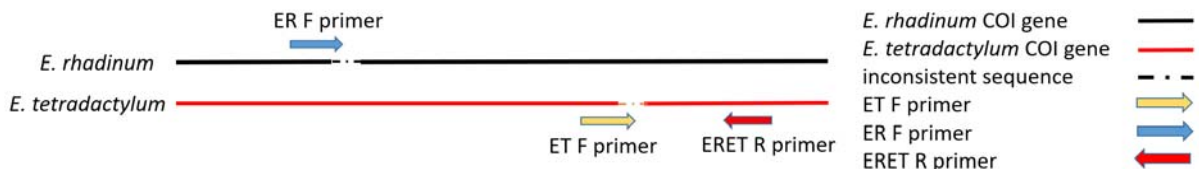
ERET 1 及 ERET 2 物種專一性引子的 PCR 條件為分別取 10 μ L 的 Master Mix (KAPA

Table 1 The primers of this study

Primer	5'-----3'	Primer size (mer)	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
ERET COI F	GGCGTTAACCCGCGCTTTTAGATTTCG	27	59	1800
ERET COI R	GGTTTAACCCGCGATTTCACCTTGAC	26		
ET 1 F	TGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTC	27	61	110
ER 1 F	TCTATCTAATCTTTGGGGCATGAGCTGGG	29		364
ERET 1 R	GCGTGGGCAAGGTTTCCTGCTAAAGG	26		
ET 2 F	CCTAGTCACGGCCGTATTACTTCTTCTA	28	61	164
ER 2 F	TGACTCCTCCCGCCCTCTTTCTTCTT	27		421
ERET 2 R	CCTCTGGGTGACCAAAGAATCAGAATA	27		

Fig. 2 Partial mtDNA COI gene sequences of *E. tetradactylum* and *E. rhadinum* in multiple sequence alignments. An asterisk (*) indicates a consistent base. Accession numbers MG816119-28, EF609512-13, and MG923346-50 are mitochondrion COI gene sequences of *E. tetradactylum*, accession numbers MG816129-38, and MK777485 are mitochondrion COI gene sequences of *E. rhadinum*.

ET-MG816125.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816125.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816120.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816121.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816122.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816123.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816124.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816126.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816128.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG923346.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG923348.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG923349.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG923350.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG923347.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816119.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-MG816127.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-EF609512.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ET-EF609513.1	TTTCCCGCATAAACACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTACTCCTCCTA
ER-MK777485.1	TTTCTCGAATGAATAACATGAGTTTCTGACTCCTCCCCCTTCCTTCTTCTCCTA
ER-MG816134.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816138.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816130.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816133.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816135.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816131.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816132.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816136.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816137.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA
ER-MG816129.1	TTCCCTCGAATGAATAACATAAGCTTTGACTCCTCCCACCCTCTTCTTCTTCTCCTA

**Fig. 3** Schematic of ERET 1 and ERET 2 species-specific primer designs.

KK1024 KAPA Taq Ready Mix, Merck) 及 10 μ L 去離子水, 再加入 ERET 物種專一性引子各 1 μ L, 最後加入 1 μ L 的 DNA 樣本至 PCR 反應管內 (約 24 μ L)。將上述 PCR 反應管置於 PCR 儀器中設定升降溫程序。PCR 升降溫程序包括在 94°C 下加熱

5 分鐘的起始步驟, 隨後依 95°C 加熱 30 秒、61°C 加熱 30 秒、72°C 加熱 30 秒此循環, 經 35 個循環後, 最後在 72°C 下加熱 7 分鐘。

配置 1.5% 濃度的電泳膠體, 將 PCR 產物樣本添加 DNA 染劑 (DNA VIEW TT-DNA01, 圖爾

思生技公司) 注入電泳膠體孔槽中, 以 100 bp DNA ladder (DM001-R500, GeneDireX™) 為對照, 以電壓 100 V 進行電泳 20 分鐘, 再將膠體放置於紫外光燈箱中, 以相機拍攝 DNA 條帶。

六、基因定序及分析

分別將所擴增的 PCR 產物從電泳膠體切出後, 委由生技公司 (基龍米克斯) 進行基因定序, 採用 Chromas 軟體查看序列峰形圖及編輯, 利用 NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) 比對軟體, 將定序結果與 NCBI 基因資料庫進行序列比對。

結果與討論

四絲馬鮫大都洄游在熱帶區域, 多鱗四絲馬鮫主要在亞熱帶至溫帶地區 (Motomura *et al.*, 2002; Motomura, 2004), 四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫適合的環境溫度不同 (Froese and Pauly, 2024)。目前臺灣午仔魚養殖物種為適合熱帶區域之四絲馬鮫, 大都在臺南以南的地區戶外養殖, 以減少冬季寒流所帶來的影響, 為因應高緯度地區養殖漁業的發展需求, 適合亞熱帶至溫帶地區生長的多鱗四絲馬鮫, 可望成為高緯度地區的養殖開發物種, 目前多鱗四絲馬鮫在越南已有相關的養殖紀錄 (Binh *et al.*, 2019), 當臺灣也進行多鱗四絲馬鮫養殖, 屆時午仔魚物種鑑定需求也會隨之增加。四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫主要的鑑別特徵是藉由側線鱗片數量進行區分, 但實務上仍不易分辨, 而魚卵、魚苗及生鮮加工品更是無法藉由外觀進行鑑定, 雖然基因定序可以區分, 但花費的時間及成本較高, 為避免放養錯誤的午仔魚物種, 造成經濟上的損失, 本研究藉由物種專一性引子的特異性, 建立快速鑑定午仔魚物種的方法。

首先依據四絲馬鮫側線的鱗片數 (多為 71 – 80 片), 多鱗四絲馬鮫側線的鱗片數 (為 82 – 95 片) (Motomura *et al.*, 2002) 及其他特徵等外觀形態學進行物種鑑定, 確認本研究採集之午仔魚樣品 (Fig. 1A, B) 分別為多鱗四絲馬鮫與四絲馬鮫。

依據文獻所引用之四絲馬鮫 COI 基因序列 (accession number: MG816119-28, EF609512-13,

MG923346-50) 與多鱗四絲馬鮫 COI 基因序列 (accession number: MG816129-38, MK777485) (Xiao *et al.*, 2022), 利用多重序列比對軟體進行種內與種間的基因相似度分析, 結果顯示種內的基因相似度約為 95% 以上, 而種間基因相似度則約為 86% 左右。本研究根據四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫的 COI 基因之保守序列 (conserved sequences) (Fig. 2) 設計共用 ERET COI 引子 (Table 1), 四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫分別經 ERET COI 引子所擴增之基因片段全長約為 1,800 bp (Fig. 4)。經基因定序比對後, 四絲馬鮫樣品之 PCR 產物與四絲馬鮫 COI 基因序列 (accession number: MG816119.1) 比對, 相似度達 100% (Fig. 5A), 而與多鱗四絲馬鮫基因序列 (accession number: MK777485.1) 比對, 相似度僅達 86.34%。多鱗四絲馬鮫樣品之 PCR 產物與多鱗四絲馬鮫 COI 基因序列 (accession number: MK777485.1) 比對, 相似度達 100% (Fig. 5B), 而與四絲馬鮫基因序列 (accession number: MG816119.1) 比對, 相似度僅達 86.51%, 本研究 COI 基因序列比對結果與外觀形態的物種鑑定結果一致, 再次確認樣品分別為四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫。

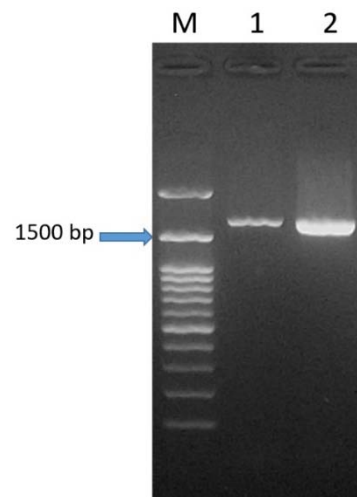


Fig. 4 PCR results of *E. rhadinum* and *E. tetradactylum* mtDNA COI gene. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *E. rhadinum* (1,800 bp), Lane 2: *E. tetradactylum* (1,800 bp).

物種專一性引子的設計, 以 Xiao *et al.* (2022) 中所提及之四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫 COI 基因序列, 進行序列比對後再以物種間的鹼基差異 (Fig. 2) 設計 ERET 1 及 ERET 2 這兩組物種專一性引

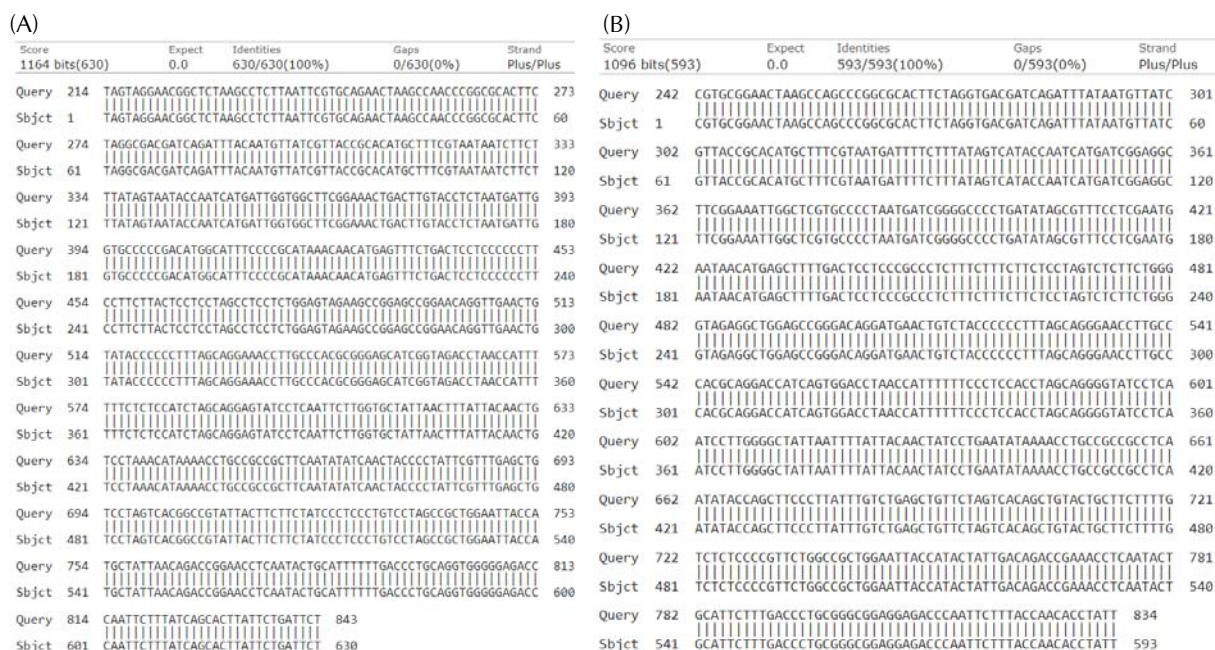


Fig. 5 (A) Sequence alignment results of *E. tetradactylum* PCR product with ERET COI primer expressed 100% identification with *E. tetradactylum* COI gene (accession number: MG816119.1). (B) Sequence alignment result of *E. rhadinum* PCR product with ERET COI primer expressed 100% identification with *E. rhadinum* COI gene (accession number: MK777485.1).

子 (Table 1)，因物種專一性引子的高專一性，ET 1 F 及 ET 2 F 引子只能與四絲馬鮫 DNA 樣品結合而生成 PCR 產物，無法與多鱗四絲馬鮫 DNA 結合，而 ER 1 F 及 ER 2 F 引子只與多鱗四絲馬鮫的 DNA 樣品結合而生成 PCR 產物，無法與四絲馬鮫 DNA 結合，且 ET 1 F & 2 F 與 ER 1 F & 2 F 引子設計與 DNA 模板結合的位置不同 (Fig. 3)，導致擴增的 PCR 產物大小不同進而鑑定物種，例如：使用 ERET 1 物種專一性引子進行物種鑑定，當檢測樣品 PCR 產物長度為 364 bp 時，則該檢測樣品物種為多鱗四絲馬鮫；而當檢測樣品 PCR 產物長度為 110 bp 時，該檢測樣品物種為四絲馬鮫 (Fig. 6A)。使用 ERET 2 物種專一性引子進行物種鑑別，當檢測樣品 PCR 產物長度為 421 bp 時，該檢測樣品物種為多鱗四絲馬鮫；而當檢測樣品 PCR 產物長度為 164 bp 時，該檢測樣品物種為四絲馬鮫 (Fig. 6B)，並可藉由兩組引子的鑑定結果交叉比對，避免誤判。

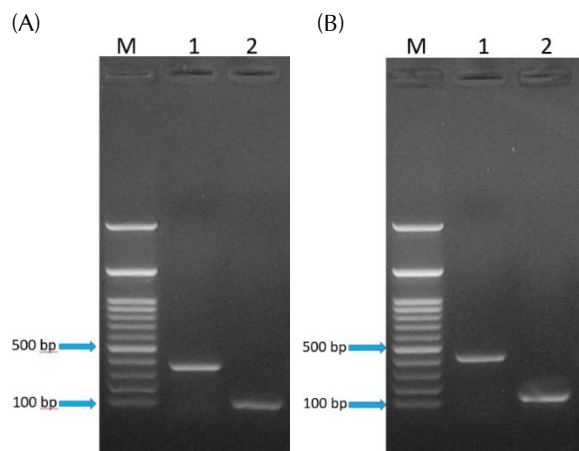


Fig. 6 Species identification results of species-specific primer ERET 1 and ERET 2. (A) Lane M: 100 bp ladder; Lane 1: 364 bp PCR product of *E. rhadinum* with ERET 1 primer; Lane 2: 110 bp PCR product of *E. tetradactylum* with ERET 1 primer. (B) Lane M: 100 bp ladder; Lane 1: 421 bp PCR product of *E. rhadinum* with ERET 2 primer; Lane 2: 164 bp PCR product of *E. tetradactylum* with ERET 2 primer.

將 ERET 1 及 ERET 2 所擴增 PCR 產物進行基因定序比對，結果顯示經 ERET 1 引子所擴增之四絲馬鮫 PCR 產物與四絲馬鮫基因序列 (accession number: EF609513.1) 比對相似度達 98% (Fig. 7A)，而與多鱗四絲馬鮫基因序列

(accession number: MK777485.1) 比對，比對結果則沒有發現特定的顯著相似性。經 ERET 1 引子所擴增之多鱗四絲馬鮫 PCR 產物與多鱗四絲馬鮫基因序列 (accession number: MK777485.1) 相似度達 99% (Fig. 7B)，而與四絲馬鮫基因序列 (accession number: EF609513.1) 比對相似度僅達 86%。

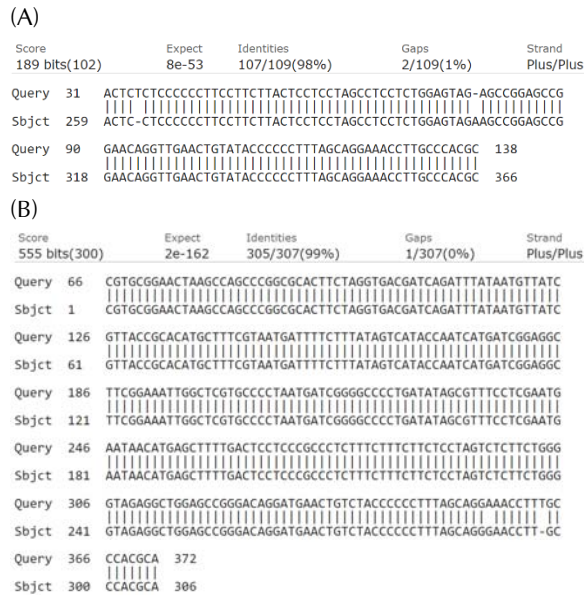


Fig. 7 (A) Sequence alignment results of *E. tetradactylum* PCR product with ERET 1 primer expressed 98% identification with *E. tetradactylum* COI gene (accession number: EF609513.1); (B) Sequence alignment result of *E. rhadinum* PCR product with ERET 1 primer expressed 99% identification with *E. rhadinum* COI gene (accession number: MK777485.1).

經 ERET 2 引子所擴增之四絲馬鮫 PCR 產物與四絲馬鮫基因序列 (accession number: MG816126.1) 比對，序列一致相似度達 100% (Fig. 8A)，而與多鱗四絲馬鮫基因序列 (accession number: MK777485.1) 比對則沒有發現特定的顯著相似性。經 ERET 2 引子所擴增之多鱗四絲馬鮫 PCR 產物與多鱗四絲馬鮫基因序列 (accession number: MK777485.1) 比對，序列相似度達 99% (Fig. 8B)，與四絲馬鮫基因序列 (accession number: MG816126.1) 比對，比對結果則沒有發現特定的顯著相似性。根據電泳及定序結果，證實本研究設計之物種專一性引子能夠有效、快速與正確的區分四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫此兩物種。

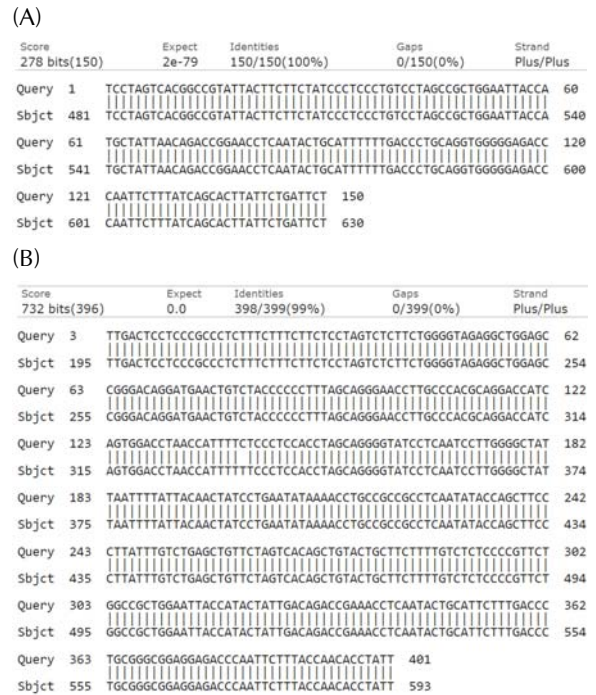


Fig. 8 (A) Sequence alignment results of *E. tetradactylum* PCR product with ERET 2 primer expressed 100% identification with *E. tetradactylum* COI gene (accession number: MG816126.1). (B) Sequence alignment result of *E. rhadinum* PCR product with ERET 2 primer expressed 99% identification with *E. rhadinum* COI gene (accession number: MK777485.1).

為測試物種專一性引子的應用性，採集不同胸鰭顏色 (Fig. 1A、1B 及 1C) 的午仔魚樣品、魚卵 (Fig. 1D)、四間魚苗繁殖場的魚苗樣品 20 隻 (Fig. 1E) 及其他魚種進行物種鑑定，結果顯示本研究自臺灣南部養殖場取得午仔魚樣品為四絲馬鮫，而臺灣周遭海域多批次收集之野外捕獲午仔魚樣品皆為多鱗四絲馬鮫，並無四絲馬鮫混雜其中，此檢測結果與先前的午仔魚研究一致 (Su *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2022)。魚卵及魚苗樣品經 ERET 1 (Fig. 9A) 及 ERET 2 (Fig. 9B) PCR 物種鑑定結果皆為四絲馬鮫，基因定序比對後結果亦同。

文獻指出可依據多鱗四絲馬鮫為黑色胸鰭，四絲馬鮫為黃色胸鰭來區分兩物種 (Motomura, 2004)，本研究針對不同胸鰭顏色午仔魚樣品進行取樣，以物種專一性引子 ERET 1 (Fig. 10A) 及 ERET 2 (Fig. 10B) 進行物種鑑定，結果顯示本研究中之黑色與黃色胸鰭之午仔魚樣品皆為四絲馬鮫，基因定序比對結果亦相同，實驗結果證實胸鰭

顏色並不適宜作為午仔魚物種的鑑別指標。在尖吻鱸 (*Lates calcarifer*) 及六絲馬鮫 (*Polydactylus sexfilis*) 樣品以物種專一性引子 ERET 1 及 ERET 2 進行 PCR 擴增，結果皆無 PCR 產物生成，因此物種專一性引子對四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫的物種鑑定具有高專一性。針對四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫物種鑑定，雖有文獻設計 SCAR 標誌方法，依據 PCR 產物的生成有無，作為四絲馬鮫與其親緣物種鑑定的分子標記 (楊等, 2019)，但此方法易受聚合酶鏈式反應活性或樣品 DNA 品質影響，且無法利用基因序列比對驗證。

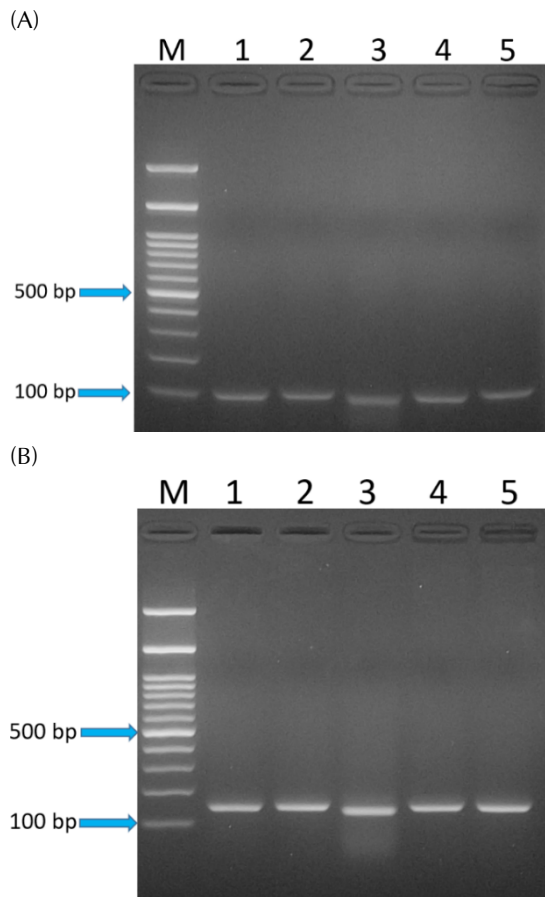


Fig. 9 Variety identification of different fourfinger threadfin farms roes and fry with ERET 1 and ERET 2 primer. All were *E. tetradactylum*. (A) PCR results of farmed fourfinger threadfin roes and fry with ERET 1 primer, Lane 1: Roes, Lane 2-5: fourfinger threadfin fry of different breeding farms. (B) PCR results of farmed fourfinger threadfin roes and fry with ERET 2 primer, Lane 1: Roes, Lane 2-5: fourfinger threadfin fry of different breeding farms.

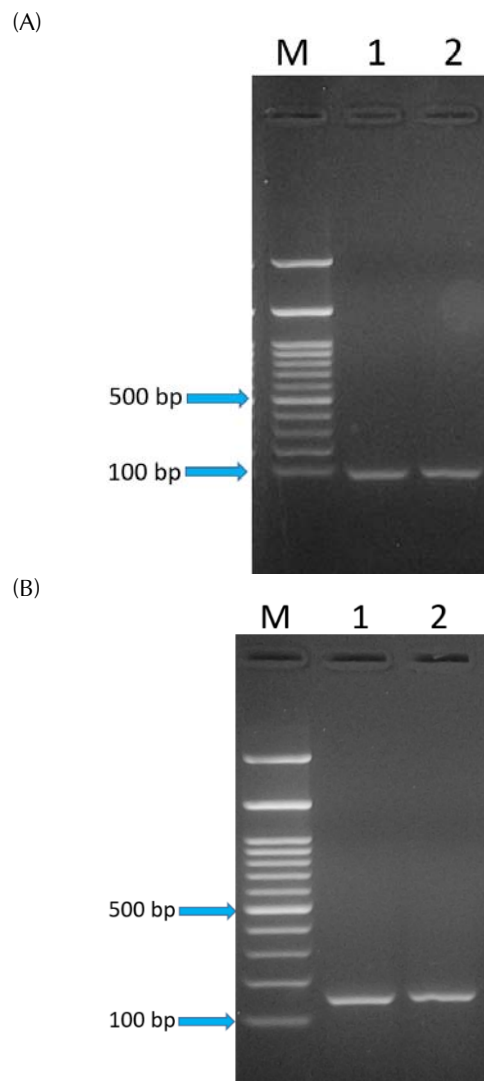


Fig. 10 Variety identification of black or yellow pectoral fin fourfinger threadfin with ERET 1 and ERET 2 primer. Both were *E. tetradactylum*. (A) PCR results of black or yellow pectoral fins of ERET 1, Lane 1: PCR result of black pectoral fin sample; Lane 2: PCR result of yellow pectoral fin sample. (B) PCR results of black or yellow pectoral fins of ERET 2, Lane 1: PCR result of black pectoral fin sample; Lane 2: PCR result of yellow pectoral fin sample.

四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫的外觀鑑別不易區分，魚卵、魚苗及生鮮加工品更是無法藉由外觀進行鑑定，且基因定序花費的時間及成本較高，本研究藉由物種專一性引子 ERET 1 及 ERET 2 的高專一性及再現性，建立快速鑑定午仔魚物種的方法，無論魚卵、魚苗或生鮮加工品皆能快速鑑別，此四絲馬鮫與多鱗四絲馬鮫物種鑑定技術將有助於馬鮫屬魚類的族群遺傳研究、物種資源管理及午仔魚的養殖產業開發。

參考文獻

- 漁業署 (2022) 中華民國臺灣地區漁業年報. 行政院農業部漁業署, 臺北.
- 趙優, 莊平, 張濤, 趙峰 (2016) 中國沿海多鱗四指馬鮫與四指馬鮫型態與遺傳位點差異分析. 海洋與湖沼, 47(1): 108-114.
- 楊翌聰, 李活, 劉錦上, 鄭佩明, 龐德彬, 蒙子寧, 林浩然 (2019) 四指馬鮫、多鱗四指馬鮫種間差異的DNA條形碼分析及SCAR標記開發. 中山大學學報(自然科學版), 58(4): 60-67.
- Al-Banna, L., A. T. Ploeg, V. M. Williamson and I. Kaloshian (2004) Discrimination of six *pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. J. Nematol., 36(2): 142-146.
- Ali, M. E., M. A. Razzak and S. B. A. Hamid (2014) Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects -a review. Food Anal. Methods, 7: 1933-1949.
- Atikah, N., Y. Esa, M. Rozihan, M. Ismail and I. Kamaruddin (2020) Phylogenetic analysis revealed first report of *Eleutheronema rhadinum* lineage in the coastal waters of Malaysia. J. Environ. Biol., 41: 1424-1431.
- Binh, T. T., N. D. Vinh and T. T. K. Ngan (2019) Effect of density and rations on survival rate and growth performance of *Eleutheronema rhadinum* captive breeding. Aqua. Sci. Fish. Abs. (ASFA), 9-14.
- Bleeker, P. (1862) Notice ichthyologique (I-X). Versl. Akad. Amsterdam, 14: 123-141.
- Dong, C. M., Y. J. Park, J. K. Noh, E. S. Noh, C. M. An, J. H. Kang, J. Y. Park and E. M. Kim (2019) Development of species-specific PCR primers for the rapid and simultaneous identification of the six species of genus *Takifugu*. Dev. Reprod., 23(4): 367-375.
- Froese, R. and D. Pauly Editors. (2024) FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org (02/2024)
- Goodwin, S., J. D. McPherson and W. R. McCombie (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat. Rev. Genet., 17(6): 333-351.
- Kanz, C., P. Aldebert, N. Althorpe, W. Baker, A. Baldwin, K. Bates, P. Browne, A. van den Broek, M. Castro, G. Cochrane, K. Duggan, R. Eberhardt, N. Faruque, J. Gamble, F. G. Diez, N. Harte, T. Kulikova, Q. Lin, V. Lombard, R. Lopez, R. Mancuso, M. McHale, F. Nardone, V. Silventoinen, S. Sobhany, P. Stoehr, M. A. Tuli, K. Tzouvara, R. Vaughan, D. Wu, W. Zhu and R. Apweiler (2005) The EMBL nucleotide sequence database. Nucleic Acids Res., 33(Database issue): D29-33.
- Kumar, D., S. Singh, N. S. Karabasanavar, R. Singh and V. Umapathi (2014) Authentication of beef, carabeef, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial cytb gene. J. Food Sci. Technol., 51(11): 3458-3463.
- Lakra, W. S., M. S. Verma, M. Goswami, K. K. Lal, V. Mohindra, P. Punia, A. Gopalakrishnan, K. V. Singh, R. D. Ward and P. Hebert (2011) DNA barcoding Indian marine fishes. Mol. Ecol. Resour., 11: 60-71.
- Madden, T. L., R. L. Tatusov and J. Zhang (1996) Applications of network BLAST server. Meth. Enzymol., 266: 131-141.
- Matsuki, T., K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda and H. Oyaizu (1999) Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. Appl. Environ. Microbiol., 65(10): 4506-4512.
- Motomura, H., Y. Iwatsuki, S. Kimura and T. Yoshino (2002) Revision of the Indo-West Pacific polynemid fish genus *Eleutheronema* (Teleostei: Perciformes). Ichthyol. Res., 49: 47-61.
- Motomura, H. (2004) Threadfins of the world (family Polynemidae): an annotated and illustrated catalogue of polynemid species known to date. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes, 117(3): 13-19.
- Motomura, H., K. Matsuura, J. Bishop and F. Kaymaram (2015) *Eleutheronema tetradactylum*. The IUCN Red List of Threatened Species, e.T46087646A57168342.
- Muir, A., E. Harrison and A. Wheals (2011) A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. FEMS Yeast Res., 11(7): 552-563.
- Su, N. J., Y. S. Lu, C. H. Wang, C. H. Liao, W. C. Chiang and C. T. Tseng (2020) Age determination for juvenile fourfinger threadfin (*Eleutheronema rhadinum*) by using otolith microstructure and length data obtained from commercial fisheries off northwestern Taiwan. Fish. Res., 227: 105560.
- Su, N. J., L. C. Huang, C. H. Wang and Y. C. Chang (2022) Using otolith microchemical analysis to identify farmed fourfinger threadfin and wild caught East Asian fourfinger threadfin in western waters off Taiwan. J. Fish. Soc. Taiwan, 49(1): 51-58.

- Thu, P. T., W. C. Huang, T. K. Chou, N. Van Quan, P. Van Chien, F. Li, K. T. Shao and T. Y. Liao (2019) DNA barcoding of coastal ray-finned fishes in Vietnam. PLoS ONE, 14(9): e0222631.
- Varadínová, Z., Y. J. Wang, Z. Kučerová, V. Stejskal, G. Opit, Y. Cao, F. J. Li and Z. H. Li (2015) COI barcode based species-specific primers for identification of five species of stored-product pests from genus *Cryptolestes* (Coleoptera: Laemophloeidae). B. Entomol. Res., 105(2): 202-209.
- Wang, J., P. Sun and F. Yin (2014) Low mtDNA Cytb diversity and shallow population structure of *Eleutheronema tetradactylum* in the East China Sea and the South China Sea. Biochemical. System. Ecology., 55: 268-274.
- Xiao, J., S. Lyu, T. H. Iqbal, S. Hajisamae, K. W. K. Tsim and W. X. Wang (2022) Molecular phylogenetic and morphometric analysis of population structure and demography of endangered threadfin fish *Eleutheronema* from Indo-Pacific waters. Sci. Rep., 12(1): 3455.
- Yang, X. and C. Quiros (1993) Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor. Appl. Genet., 86(2-3): 205-212.
- Zhao, Z. H., B. Y. Cui, Z. H. Li, J. Fan, Q. Yang, Z. Kučerová, V. Stejskal, G. P. Opit, Y. Cao and F. Li (2016) The establishment of species-specific primers for the molecular identification of ten stored-product psocids based on ITS2 rDNA. Sci. Rep., 6: 21022.

Primer Design for Species Identification of *Eleutheronema tetradactylum* and *Eleutheronema rhadinum*

Yi-Che Su¹, Yan-Hong Lee^{1*}, Hsuan-Ching Ho² and Feng-Cheng Wu¹

¹Tungkang Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

²Department and Graduate Institute of Aquaculture, National Kaohsiung University of Science and Technology

ABSTRACT

The two species of fourfinger threadfin fish, *Eleutheronema tetradactylum* and *Eleutheronema rhadinum*, are economically important species in coastal fisheries and aquaculture. They are primarily distinguished by the number of lateral line scales, rather than appearance alone. Additionally, the fish eggs, fry, and processed aquatic products cannot be identified based on appearance. Although gene sequencing can distinguish between the two species, it is time-consuming and costly. This study aims to develop species-specific primers based on the differences in the cytochrome c oxidase I (COI) gene sequences between *E. tetradactylum* and *E. rhadinum*. The two species can be identified quickly and accurately by amplifying different fragment sizes through polymerase chain reaction. The results showed that species identification using species-specific primers was consistent with both morphological identification and gene sequencing, demonstrating that the primers can achieve fast and accurate species identification. Field samples of threadfin fish collected from the waters around Taiwan were identified as *E. rhadinum*, while samples of threadfin fish, eggs, and fry obtained from aquaculture farms were identified as *E. tetradactylum*. A fast and accurate detection method is necessary for species identification in basic research, germplasm conservation, or field applications. This study contributes to the genetic background research, species resource conservation, and aquaculture industry development of *Eleutheronema* threadfin fish..

Key words: *Eleutheronema tetradactylum*, *Eleutheronema rhadinum*, species-specific primers, species identification, cytochrome c oxidase I (COI)

*Correspondence: No. 67, Fongyu St., Tungkang, Pingtung 92845, Taiwan. TEL: (08) 832-4121 ext. 275; FAX: (08) 832-0234; E-mail: yhlee@mail.tfrin.gov.tw