

生物條碼在魚類胃內含物鑑定之應用

陳淑穎¹、江偉全¹、邵廣昭²、陳文義¹、孫志陸³、蘇偉成⁴、劉燈城⁴

¹水產試驗所東部海洋生物研究中心、²中央研究院生物多樣性研究中心

³台灣大學海洋研究所、⁴水產試驗所

前言

動物界有數百萬種類，並歷經了數億年的演化，因此將動物界分類是個極具挑戰的工作。有鑑於此，如何利用更完備的實驗技術，結合形態描述及鑑定是急迫性需要的工作 (Godfray, 2002; Blaxter, 2003)。早期就認定 DNA 序列具有差異，但將其應用在種類的區分上，是否可直接利用 DNA 判別還是需間接透過蛋白質分析？40 多年前，蛋白質電泳首先被用來鑑定種類 (Manwell and Baker, 1963)，直到大約 30 年以前，大部分的演化研究皆利用核蛋白體 DNA (ribosomal DNA) 的基因序列進行分析 (Woese and Fox, 1977)，並且粒線體 DNA 在 20 世紀 70 年代後期和 80 年代運用於分子分類學研究 (Avice, 1994)。

近期學者提出 DNA 有利於作為分類系統 (Tautz, Arctander et al., 2002; Tautz, Arctander et al., 2003)，是由於 DNA 序列分析在幫助種類鑑定已使用近 30 年，不同的序列已經被用於不同的組群分類。Hebert et al. (2003) 選取鳥類、魚類、昆蟲等各種類群的生物，以尋找一段適合生物物種鑑定用的 DNA 序列，結果發現粒線體的 cytochrome oxidase subunit I (cox1) 基因，其中大約 650 bp 左右的片段，非常適合用來鑑定物種，並

將這段 DNA 序列命名為生命條碼 (Barcode of Life)。這一小片段 DNA 的優點在於其序列的種內差異與種間差異有很明顯的區隔，而且已有萬用引子 (universal primer) 可適用於大部分物種的基因增幅反應，其長短剛好只需要一次定序就能夠取得序列，因此建議使用粒線體 DNA 基因 COI 建立一套全球通用的物種辨識系統 (Global Bioidentification System 或可簡稱 GBS) (Hebert, Cywinska et al., 2003)。每個標本都利用相同一段 DNA 序列，經過累積資料之後完成建檔，那麼每一個物種就都擁有其獨特的訊息，如同超級市場的條碼系統，稱之為「DNA barcode」。序列被比作為一個條碼，其透過序列可判讀種類或是組群的分類。

至目前為止，在生命條碼資料庫 (BOLD, The Barcode of Life Data Systems) 中共已取得 50,582 種生物的生命條碼，總計 524,223 條生命條碼的 DNA 序列。台灣的研究者自 2000 年起，開始著手收集本土物種之冷凍遺傳物質，目前已累積並公布在網站上的冷凍遺傳物質涵蓋約 3,200 種本土動物，超過 8,000 件標本；衍生所得約 2,500 多條的 DNA 生命條碼序列，已直接上傳至 BOLD 資料庫。尤其在海洋魚類的生命條碼研究領域，中研院生物多樣性研究中心在歷經數年來之努力，逐步擴充本土魚類生命條碼資料庫，

台灣周遭海域 3,000 多種的魚類，約半數已有生命條碼的序列。

營養學在生物學領域扮演解釋生態系統結構及確定生態研究方向的重要角色 (Pimm, 2002)。研究動物食性有許多不同方式，包含腸子內含物分析 (Young, Lamb et al., 1997)、排泄物內堅硬物質的鑑定 (Burger, Patten et al., 1999)、組織脂肪酸標記的分析 (Iverson, Field et al., 2004)、組織穩定同位素的分析 (Cherel, Hobson et al., 2007) 及觀察供給飼料成分 (Bowen, Tully et al., 2002)。食性分析的傳統方法是診斷遺體的形態學 (頭足類的喙，魚的耳石和骨骼) 上渣滓的鑑定 (Olesiuk, 1993; Littnan, Arnould et al., 2007)。過去的食性研究，多以行為的觀察或胃內含物的分析等直接的方法來進行，但對移動性高的海洋生物而言，要直接觀察其攝食行為實在太困難；因此，分析胃內含物組成一直是海洋生物食性研究之主流方式 (Pierce and Boyle, 1991)。然而，半消化甚至是已消化之的胃內含物，通常缺乏可辨認之形態特徵，早期即有科學家嘗試利用分子標記 (molecular markers) 研究物種食性，無論是利用抗體的免疫學的方法 (Feller et al., 1979) 或蛋白質的同功酶方法 (Sunderland, 1988)，目前都漸漸被以 PCR 為主的 DNA 鑑定方法所取代。將大型魚類之胃內含物以形態粗分之後，將所得之各式餌料生物，以相對應之 PCR 引子增幅定序，其解析度超過傳統以形態辨識胃內含物之研究 (Sheppard and Harwood, 2005; King et al., 2008)。而且，目前以分子標記或 DNA 生命條碼技術研究食性之進展，已不限於種類之確認，而可以

進一步到對各種餌料生物在胃內含物中出現頻度的相對量化推估 (Jarman et al., 2004; Nejstgaard et al., 2008)。

本研究主要目的是利用生命條碼鑑定台灣東部海域雨傘旗魚 (*Istiophorus platypterus*) 胃內含物，針對缺乏可辨認生物形態特徵的半消化胃內含物，探討雨傘旗魚與餌料生物間之食性連結，解析台灣東部雨傘旗魚在海洋食物網中複雜的組成分子與其彼此間攝食關係。

材料與方法

一、樣本採集

本項研究所採用的雨傘旗魚胃內含物係於 2009 年 4—9 月，每月至少 1 次至台東縣成功區漁會市場進行採樣，採集的標本漁獲來源包含流刺網、延繩釣、拖釣及鏢旗魚法。於魚市場先量取雨傘旗魚的體重及體長並記錄捕獲地點及漁法，爾後將採得之胃內含物樣本立即攜回實驗室計算其尾數及重量，並將採集樣本保存於 -80°C (圖 1)。

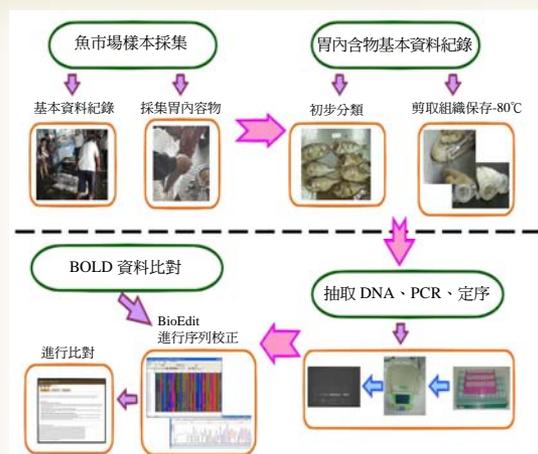


圖 1 實驗流程

二、DNA 萃取、PCR

取部分胃內含物組織約 20 mg，利用 DNA 萃取套組 (Genomic DAN Mini Kit) 進行 DNA 萃取。藉由粒線體 DNA 之大量增幅，取得 COI 基因片段，PCR 反應所使用的引子 (Ward, Zemlak et al., 2005) 為 FishF1 (5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCA C3') 和 FishR1 (5'TAGACTTCTGGGT GGCCAAAGAATCA3')，FishF2 (5'TCGACT AATCATAAAGATATCGGCAC3')和 FishR2 (ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGA3')，其擴增之片段大小為 650 bp。以聚合酶連鎖反應器進行 DNA 增幅反應，反應結束以 4°C 保存 PCR 產物。將 PCR 產物進行電泳，以確認 DNA 是否擴增成功。將成功增幅之 PCR 產物送去基隆米克斯生物科技股份有限公司進行純化並定序。定序完成之基因序列，利用全球生命條碼資料庫 (BOLD; barcode of life data system) 進行比對，將序列與資料庫中之 COI 序列做比對，根據序列之相似度判別比對至物種。利用 BOLD 資料庫比對方法之判定標準，乃依據 Ratnasingham and Hebert (2007) 報告，若是序列歧異度小於 1% (即相似度 $\geq 99\%$)，則可比對到種的層級；若是無法比對到種的層級，但歧異度小於 3% (即相似度 97–99%，不包含 99%)，雖無法比對到種，但仍可比對到屬之層級。

結果與討論

一、雨傘旗魚胃內含物鑑定

採樣雨傘旗魚個體共計 244 尾，空胃率

46.72%，將含有胃內含物的雨傘旗魚之胃內含物利用生物條碼進行魚種鑑定，其餌料生物組成如表 1 所示，魚類總計鑑定出 11 科 29 種。

二、消化程度差異

於不同季節 (4–9 月) 採集的胃內含物分析結果顯示，雨傘旗魚的主要攝食魚類為白帶魚 (*Trichiurus lepturus*)、大眼鯛 (*Priacanthus macracanthus*) 及圓花鰹 (*Auxis rochei*)。將其胃內含物依消化程度差異做等級區分 (表 2)，消化程度 1：體表接近完整只有些微魚皮被消化；消化程度 2：外觀還有些微肉黏附於魚骨頭上；消化程度 3：外觀幾乎為碎屑。經由生物條碼鑑定分析結果，在消化等級 1–3，根據其序列之相似度判別比對皆可有效分類至物種，即相似度 $\geq 99\%$ 。

三、分類物種的重要性

台灣東部常見的鰹類包含正鰹、巴鰹、扁花鰹及圓花鰹，是游經東部大洋性魚類的主要餌料生物之一。若只是利用傳統形態分類學 (表 3) 只能分類為鰹類，無法有效區分其類別。本研究於 4–9 月採集樣本，經由 DNA 分析 106 個胃內含物樣本，結果鰹類佔有 27.4%，其中圓花鰹於鰹類樣本中高達 82.8%。此結果證實，此季節雨傘旗魚覓食無選擇性，乃因 4–9 月亦是東部鰹類為圓花鰹的主要產季。

雨傘旗魚為東部主要的經濟魚類，然而近年來其漁獲量及每年盛漁期季有變動的趨勢，對於雨傘旗魚食性進行探討除可了解雨傘旗魚在台灣東部海域之生態區位，亦可釐清是否由於此海域餌料生物變動所導致。利

用生物條碼準確的進行胃內含物分析，對於其食性及生物位階的探討更具代表性，然而經由本實驗可知半消化或消化過度的雨傘旗魚胃內含物皆可有效利用 COI 進行鑑定。於往後進行實驗時會將胃內含物分為 3 個等級，等級 2 與等級 3 利用分子生物鑑定，等級 1 則利用外觀形態進行判定即可。利用分子生物學進行鑑定仍有些許物種無法有效鑑定到種類，因此需再加強對此附近海域生物進行 COI 的定序，提高資料庫的樣本量，對

於往後生物條碼的應用將更完備。由胃內含物 DNA 鑑定種類組成顯示，台灣東部雨傘旗魚主要攝食對象為魚類及頭足類，攝食對象與環境餌料生物豐度與組成有密切相關。本研究 4-9 月胃內含物經由 DNA 分析結果顯示，主要之攝食魚種主要為圓花鰹及白帶魚等表層大洋性魚類，未來可以佐以雨傘旗魚標識放流之研究成果，進一步探討雨傘旗魚行為特徵及洄游生態習性與環境餌料生物之關連性。

表 1 雨傘旗魚胃內含物的種類

科名	中文名	相似度 (%)	科名	中文名	相似度 (%)
烏魴科	小鱗烏魴	99.53	鯖科	巴鰹	100
鱆科	紅尾圓鱆	100		正鰹	100
	無斑圓鱆	99.84		齒鱈	100
	頷圓鱆	91.62		圓花鰹	99.6
	泰勃圓鱆	100		黃鰭鮪	100
鮫科	黃小沙丁	98.84		棘鱈	100
鱈科	鬼頭刀	100		扁花鰹	100
眼眶魚科	眼眶魚	100		日本馬加鱈	99.53
帶鱈科	黑刀魴	100		白腹鱈	100
	紫金魚	99.69		圓花鰹	100
大眼鯛科	大眼鯛	100		四齒鮫科	滑皮兔頭鮫
鶴鱺科	寬尾鶴鱺	100	克氏兔頭鮫		92.28
	鱷形叉尾鶴鱺	99.84	帶魚科	白帶魚	100
	扁鶴鱺	100			

表2 以形態區分消化程度

消 化 程 度	白帶魚	相似度(%)	大眼鯛	相似度(%)
1		99.53		99.67
2		99.68		99.68
3		100		99.68

表3 鯷類外觀形態、消化形態及 DNA 比對結果

種 類	外觀形態	消化形態	相似度(%)
正 鯷			100
巴 鯷			100
扁花鯷			100
圓花鯷			99.6