

# 臺灣海域產花鱸亞科魚種親緣關係探討

白浩廷<sup>1,3</sup>、陳柏璋<sup>1</sup>、蕭聖代<sup>2</sup>、謝佳宏<sup>3</sup>、陳高松<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 水產試驗所企劃資訊組、<sup>2</sup> 海洋漁業組、<sup>3</sup> 中國文化大學森林暨自然保育學系

## 前言

花鱸主要棲息於珊瑚礁區，多為群游性，以浮游生物為食，夜間會躲在珊瑚礁的洞穴裡。在分類上屬於鱸目 (Perciform)、鮨科 (Serranidae)、花鱸亞科 (Anthiinae)，約有 21 屬 170 種，大多分布於印度洋-太平洋 (Indo-Pacific) 海域 (Nelson, 2006)。在臺灣周圍海域的花鱸亞科魚種，曾被記錄者約有 9 屬 25 種，分屬於姬鮨屬 (*Tosana*)、寬身花鱸屬 (*Serranocirrhitus*)、齒花鱸屬 (*Odontanthias*)、金花鱸屬 (*Holanthias*)、菱齒花鱸屬 (*Caprodon*)、月花鮨屬 (*Selenanthias*)、棘花鱸屬 (*Plectranthias*)、擬花鱸屬 (*Anthias*) 及珠斑鮨屬 (*Sacura*)，其中以棘花鱸屬的種類最多。

花鱸因物種數繁多、體色及體型變化大，加上多數種類具有雌雄雙型的外部形態變異，增加了以外觀鑑定花鱸魚種的困難度。此外，其地理分布廣泛，要收集該亞科的完整樣本實屬不易，也因此導致在分類與親緣關係的研究上產生許多分歧。近年來分子生物技術的普及發展，許多鮨科相關的親緣關係假設紛紛被提出，其中，有的結果與傳統形態分類一致，有的卻大相逕庭，代表本科魚類親緣演化關係的複雜程度。曾有學者表示，目前鮨科的系統分類僅是將該科魚

種以看似有序的方式置入不同的分類位階，未來仍需要更多的研究投入，才能釐清箇中複雜的親緣關係。

前人研究顯示，蛋白質、細胞核 DNA (nuclear DNA)、粒線體 DNA (mt DNA) 及 RNA 等分子的胺基酸或鹼基序列之分子資料，可用來比較與分析族群間的分子特徵 (molecular character)。粒線體 DNA 擁有一套獨立的遺傳物質，遺傳特性為單套，由母系遺傳，不受有性生殖干擾，基因體相對較細胞核 DNA 小，核苷酸變異速度快，演化速率大約為細胞核 DNA 的 5–10 倍，因此被廣泛應用於親緣演化關係、族群遺傳結構與生物地理相關研究 (Castro et al., 1998)。動物粒線體 DNA 的基本特徵為：1 個非編碼控制區、2 個 ribosomal RNA 基因、22 個 transfer RNA 基因與 13 個蛋白質基因 (包含 7 個 NADH dehydrogenase 次單位體、2 個 ATP synthetase、3 個 cytochrome oxidase 次單位體、1 個 cytochrome b gene) (Anderson et al., 1981)。依據生物種類以及不同的基因演化速率，各有適合之基因可被作為遺傳標誌，常被應用者包括有：12S ribosome RNA (12S rRNA)、16S ribosome RNA (16S rRNA)、cytochrome c oxidase subunit I (*COI*)、*Cyt b* 等。已有許多研究使用 *COI*、12S rRNA、16S rRNA、*Cyt b* 等粒線體 DNA 進行石斑魚亞科

(Epinephelinae) 魚種的親緣關係探討 (Craig et al., 2001, 2007; Ding et al., 2013; Ma et al., 2016)。惟在臺灣花鱸除了在 1993 年以形態特徵進行分類後 (沈等, 1993)，即不曾再有探討花鱸亞科魚種親緣關係之相關研究。爰此，本研究於臺灣沿近海域採集花鱸，並利用粒線體 DNA 分析探討花鱸亞科魚種的親緣演化關係。

## 材料與方法

### 一、樣本採集

2012–2016 年間，於基隆、釣魚台、臺東、澎湖等樣點 (圖 1)，以船釣方式採集或在當地魚市場購買花鱸樣本。

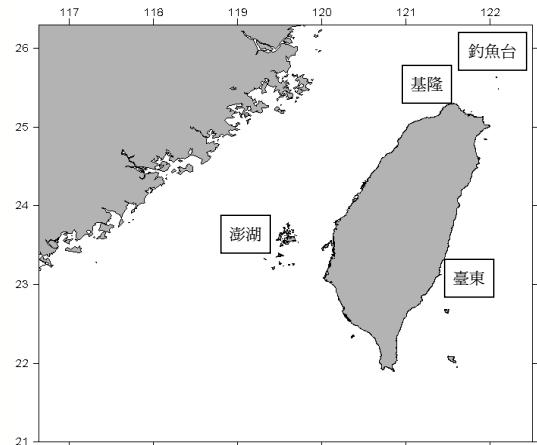


圖 1 本研究之花鱸樣本的採集點，包含基隆、釣魚台、臺東、澎湖等

### 二、Genomic DNA 萃取

取約 2 mm 大的肌肉組織，用剪刀剪碎，置於 1.5 ml 離心管中，加入 300  $\mu$ l cell lysis solution 以及 1.5  $\mu$ l proteinase K solution (20 mg/ml)，於 55°C 乾浴震盪 3 小時或直接乾浴一整晚，至組織顆粒完全溶解後，加入 1.5  $\mu$ l

RNA solution (20 mg/ml)，於 37°C 乾浴震盪 30 分鐘，取出 sample 冷卻至室溫，再加入 100  $\mu$ l protein precipitation solution，強力震盪 20 秒，並在室溫中以  $11,4324 \times g$  離心 12 分鐘，將含 DNA 之上層液倒入新的 1.5 ml 離心管，加 300  $\mu$ l 100% 2-Propanol，翻轉 50 次，在室溫中以  $1,4324 \times g$  離心 7 分鐘，倒掉上層液，將離心管倒置於乾淨之吸水紙上吸掉殘留液體，加入 300  $\mu$ l 70% 乙醇，翻轉數次，清洗 Pellet，在室溫中以  $1,4324 \times g$  離心 5 分鐘 (固定離心管方向，使 DNA 沉澱在固定位置)，倒掉 70% 乙醇並置於 55°C 乾浴 15 分鐘，烘乾 DNA，再加入 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O，放置室溫中一整晚，定時輕彈離心管，幫助 DNA 之分散溶解，而後將 DNA 保存於 -20°C 的冰櫃中。

### 三、粒線體 DNA 增幅與定序

粒線體 DNA 片段利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術大量增幅，使用

COI 引子：

FISH-BCL (5'-TCAACYAATCAYAAAGAT ATYGGCAC-3')

FISH-BCH (5'-TAAACTTCAGGGTGACCA AAAAATCA-3')

16S 引子：

16Sar (5'-CGCCTGTTAACAAAAAT-3')

16Sbr (5'-CCGGTTTGAACTCAGATCA CGT-3')

將萃取的 DNA 加入引子後，利用 GeneAmp PCR System 2400 機器內進行 PCR 反應，每次循環的流程如下，變性：94°C、30 秒，使 DNA 雙股解開成單股；黏合：52°C、

30 秒，使引子與模板股 DNA 鍊合至正確位置；延伸：72°C、60 秒，讓 DNA 聚合酶依照模板上的密碼，開始將核酸原料 (dNTP) 一個個接上，合成一股新的 DNA 片段，連續重覆 40 次。使用 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 進行定序。

#### 四、膠電泳檢測

取 5  $\mu$ l 之 DNA 粗萃取液，混合 1  $\mu$ l loading dye，載入 2% 瓊脂凝膠 (agarose gel) 膠電泳片 (以 agarose 融入 1  $\times$  TBE buffer，其中 TBE buffer (含有 0.089 M Tris、0.089 M boric acid、0.002 M pH 8.0 的 EDTA)，電泳約 30 分鐘，將膠片置入濃度約 10  $\mu$ g/ $\mu$ l 溴化

乙銠 (ethidium bromide, EtBr) 溶液中染色約 20 分鐘，取出後用清水退染 10 分鐘，以紫外燈照相系統 (Hitachi Image VDS System, Hitachi Co., Tokyo) 照相並存檔，藉以確認 DNA 增幅之片段大小。

## 五、DNA 序列分析

使用 BioEdit Sequence Alignment Editor 程式校對 DNA 序列，以 MEGA6 套裝軟體中之 Clustal W 程式進行 DNA 序列之排序，並計算遺傳距離，利用 Neighbor-joining method 建構親緣關係樹 (phylogenetic tree) (圖 2)。

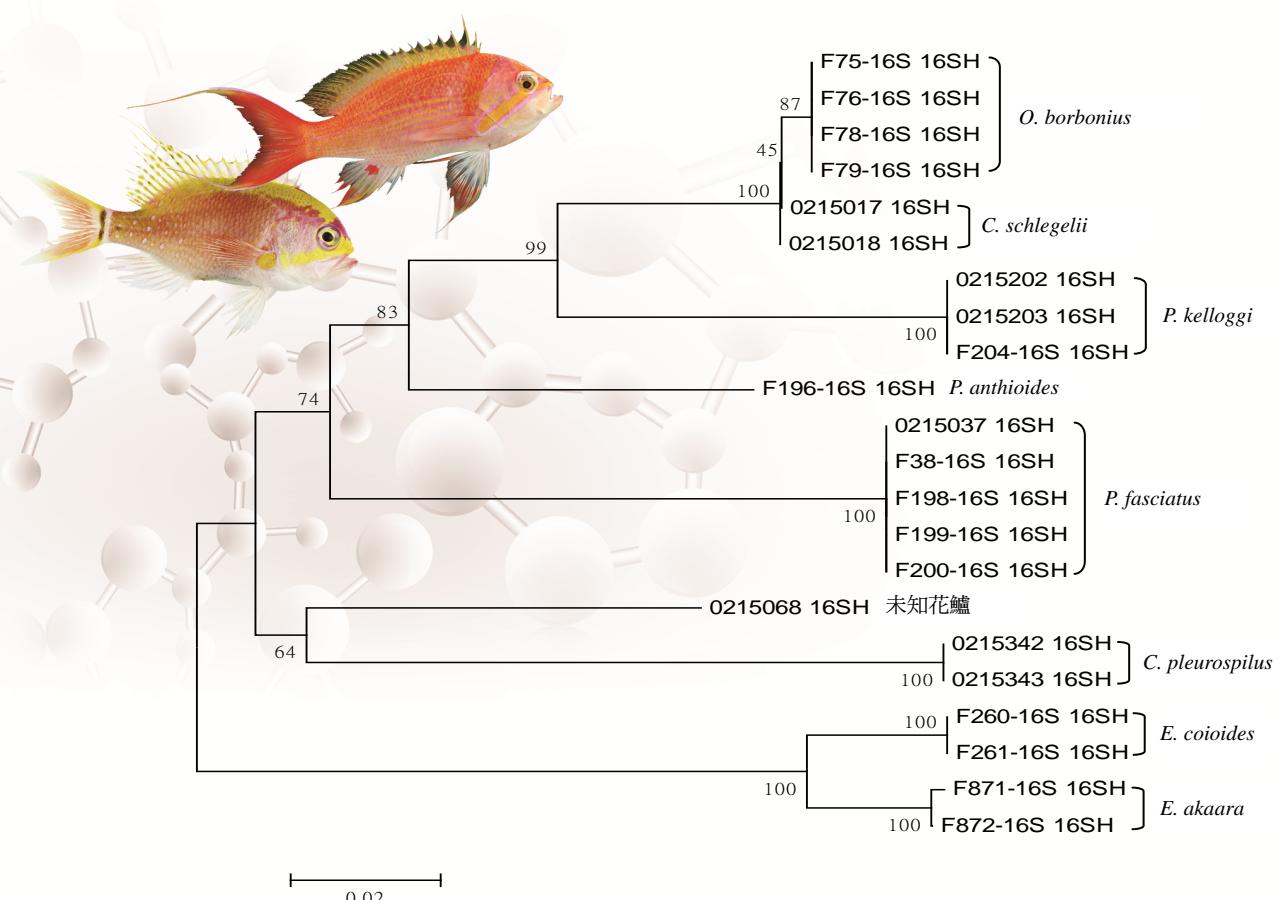


圖 2 利用 16S rRNA 基因序列繪製之親緣關係樹

## 結果與討論

### 一、採集結果

本研究採集 5 屬 7 種之花鱸亞科及鮨亞科 (Serraninae) 之黑點小花鱸 (*Chelidoperca pleurospilus*) 樣本共 48 尾，其中以花斑金花鱸 (*Odontanthias borbonius*) 樣本數最多 (22 尾)，條紋擬花鱸 (*Pseudanthias fasciatus*) 的 15 尾次之 (表 1)，種類數遠低於目前在臺灣已有紀錄的 25 種，未來需加強採樣頻度或與透過與其他學術單位或博物館合作，希望能蒐集到該亞科的所有物種，以進行花鱸亞科完整親緣關係之探討。

### 二、PCR 實驗結果

本研究使用被廣泛應用於魚類的 *COI* 與 16S rRNA 引子進行 PCR 實驗，結果發現僅有 16S rRNA 基因片段可被順利增幅，*COI* 基因片段均無法成功增幅，顯示花鱸亞科魚種的 *COI* 基因可能有序列的差異，未來將進一步探討。Zhuang 等 (2013) 的報告亦曾指出，粒線體 *ND2* 基因較 *COI* 基因更適合作為石斑魚屬 (*Epinephelus*) 之生命條碼 (barcode of life) 基因。

### 三、定序分析

本研究定序出 5 屬 7 種共 18 尾花鱸亞科魚類粒線體 DNA 中 16S rRNA 基因片段 (表 1)，經序列比對後，發現其中一個體在初步的形態鑑定上歸類為花斑金花鱸，但經過 DNA 序列比對後，該個體卻與其他花斑金花鱸的序列相差甚遠，暫時將其歸類為未知花鱸。有可能是因為雌雄雙型而造成誤判，有待未來待蒐集更多個體，進行形態與形態比

對，並使用其他的遺傳標誌來協助鑑定。

### 四、遺傳距離計算與分析

經 MEGA6 套裝軟體計算遺傳距離的結果顯示，金花鱸屬的花斑金花鱸與菱齒花鱸屬的施氏花鱸 (*Caprodon schlegelii*) 親緣關係最近 (0.004)，赤鮨屬的黑點小花鱸與棘花鱸屬的東花鱸 (*Plectranthias kelloggi*) 親緣關係最遠 (0.186) (表 2)。比對本研究與蔡 (2014) 利用 16S rRNA 粒線體 DNA 進行擬鱸科親緣關係分析的遺傳距離數據，發現花斑金花鱸和施氏花鱸的遺傳距離數值極小，未來除加入更多的遺傳標誌來進行分析外，也應重新檢視形態特徵，確認其分類的正確性。

### 五、Neighbor-joining method 親緣樹與形態特徵親緣樹比對分析

Neighbor-joining method 親緣關係樹 (圖 2) 係用石斑魚亞科作為外群，分析結果與沈 (1993) 利用形態特徵進行歸類的結果大致近似。如親緣關係最相近的花斑金花鱸與施氏花鱸，形態上的最大差別為有無絲狀鮨條，其餘特徵皆相近；鋤骨皆為倒 V 型的東花鱸與花鱸也確實分為同一屬。雖然有許多關係契合，但由於仍然缺少該亞科下的許多物種的樣本，因此還無法提出完整的親緣關係。未來可與其他博物館及標本典藏機構合作，藉由標本交換、借用或者國際合作等方式，取得所需的花鱸標本。

## 結語

臺灣四面環海，海岸線長達 1,100 餘公里，擁有複雜多樣的海岸環境。地理位置上位處熱帶與亞熱帶交界處，又恰巧位於珊瑚

三角 (Coral triangle) 的北端，再加上黑潮、大陸沿岸流與南中國海水團等不同洋流在此交會，造就了極高的海洋生物多樣性。花鱸亞科魚種是臺灣沿近海珊瑚礁生態系的主要棲息魚種之一，惟全球暖化造成珊瑚礁白化現象加劇，因而導致花鱸棲息地被破壞而逐漸消失，雖然目前尚未出現立即滅絕的危機，但不代表可以輕忽問題的嚴重性。本研

究初步了解臺灣產花鱸亞科魚種的分類現況，未來還可利用其遺傳結構或連通性作為劃設海洋保護區的依據之一。另外，花鱸鮮豔多樣化的外表，使其深具成為海水觀賞魚的潛力，如能建立人工繁養殖技術與量產模廠，推廣至觀賞水族市場，將可達成經濟與環境保育雙贏的目標。

表 1 本研究採樣之臺灣產花鱸亞科及鮨亞科魚種

屬名	種名	中名	採集地
<i>Caprodon</i>	<i>schlegelii</i>	施氏花鱸	釣魚台
<i>Chelidoperca</i>	<i>pleurospilus</i>	黑點小花鱸	基隆
<i>Odontanthias</i>	<i>borbonius</i>	花斑金花鱸	臺東、澎湖
	<i>katayamai</i>	片山氏金花鱸	臺東
<i>Pogonoperca</i>	<i>punctata</i>	斑點黑鱸	澎湖
<i>Plectranthias</i>	<i>anthioides</i>	花花鱸	臺東
	<i>kelloggi</i>	東花鱸	臺東
<i>Pseudanthias</i>	<i>fasciatus</i>	條紋擬花鱸	臺東、澎湖
		未知花鱸	澎湖

表 2 臺灣產花鱸亞科魚種之遺傳距離

種類	Ob	Cs	Cp	Cps	Pf	Pk	Pa
Ob	-						
Cs	0.004	-					
Cp	0.180	0.177	-				
Cps	0.155	0.170	0.180	-			
Pf	0.150	0.145	0.184	0.160	-		
Pk	0.088	0.084	0.186	0.162	0.182	-	
Pa	0.108	0.104	0.176	0.148	0.139	0.126	-

Ob：花斑金花鱸；Cs：施氏花鱸；Cp：黑點小花鱸；Cps：未知花鱸；Pf：條紋擬花鱸；Pk：東花鱸；Pa：花花鱸