



臺灣海域產花鱸亞科魚種親緣關係探討

白浩廷^{1,3}、陳柏瑋¹、蕭聖代²、謝佳宏³、陳高松¹

¹水產試驗所企劃資訊組、²海洋漁業組、³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 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。

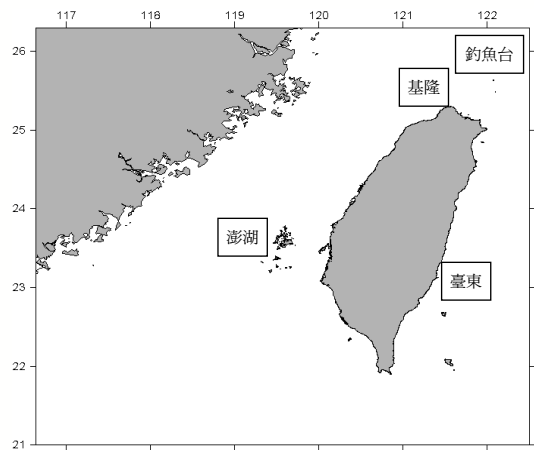


圖 1 本研究之花鱸樣本的採集點, 包含基隆、釣魚台、臺東、澎湖等

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 μ l cell lysis solution 以及 1.5 μ 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 μ 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 μ l protein precipitation solution, 強力震盪 20 秒, 並在室溫中以 $11,432 \times g$ 離心 12 分鐘, 將含 DNA 之上層液倒入新的 1.5 ml 離心管, 加 300 μ 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 μ 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 μ l ddH₂O, 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'-CGCCTGTTTAACAAAAAT-3')

16Sbr (5'-CCGGTTTTGAACTCAGATCA
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℃、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 μ l 之 DNA 粗萃取液，混合 1 μ 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 μ g/ μ l 溴化

乙錠 (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)。

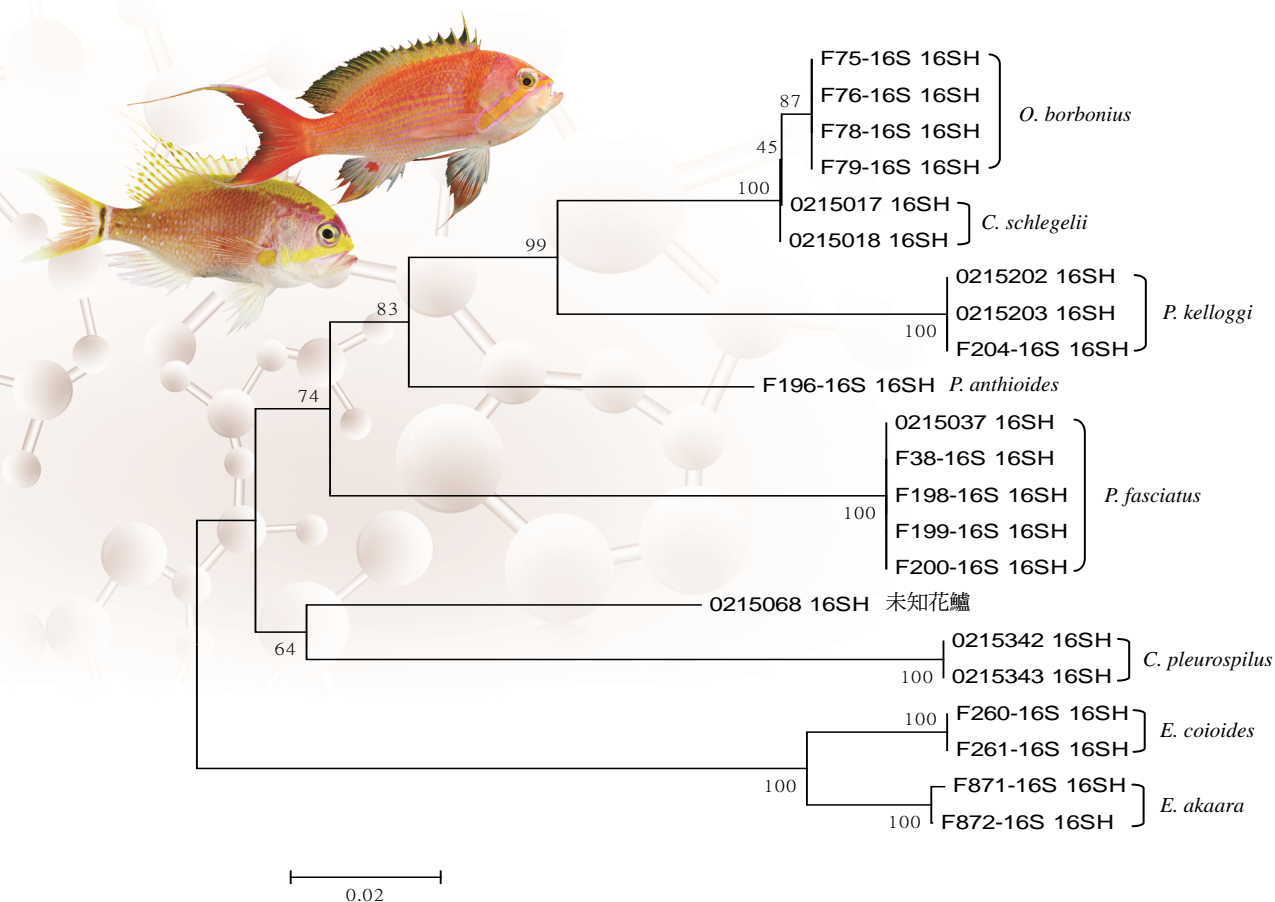


圖 2 利用 16S rRNA 基因序列繪製之親緣關係樹

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鰭條，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