

櫻花鉤吻鮭基因均質化的危機

曾晴賢、王昱人
新竹清華大學生命科學系

摘要

本研究除了利用同功異構脢電泳法分析台灣櫻花鉤吻鮭的族群遺傳結構，另外，使用 DNA 定序的方法分析台灣櫻花鉤吻鮭的遺傳多樣性。

在同功異構脢電泳分析中，23 個基因座只有一個有遺傳變異，平均觀測(H_o)與平均理論質異度(H_e)為 0 與 0.0115，表示其基因多樣性偏低。利用 F-統計分析結果，族群之近交係數(F_{IS})為 1，顯示台灣櫻花鉤吻鮭傾向於近親交配，族群間變異指數(F_{ST})為 0.081，表示族群幾乎沒有分化。

在粒線體 DNA 序列分析方面，共定序了 12 尾台灣櫻花鉤吻鮭粒線體 DNA 的控制區(D-Loop)。結果發現，12 尾台灣櫻花鉤吻鮭只分成兩個基因型，而且兩種基因型中只有一個鹼基對的變異，遺傳距離僅有 0.001，顯示台灣櫻花鉤吻鮭遺傳多樣性已經相當貧乏。這種基因多樣性貧乏的原因和櫻花鉤吻鮭族群數量稀少，現有棲息的七家灣溪過多攔砂壩切割棲息地導致魚群無交流機會，同時因為大部分河域水溫過高而大多數族群無法繁殖成功所導致。

一、前言

櫻花鉤吻鮭經過十多年的人工繁殖與保育，這段期間整個族群的數量由七十六年的 1800 尾逐年下降到八十四年夏季的 565 尾，八十四年秋季又上升至 2495 尾，八十五年春季原本有 1854 尾（曾，1996），但同年八月又因賀伯颱風帶來的災害而使族群數目又下降至 1200 尾左右。八十六年又因為全球環境受到聖嬰現象的影響，本區的水溫也有升高的現象，魚類繁殖的情況相當差，所以在八十七年普查的時候，新生的幼魚數量相當少，整個族群目前只有六百餘尾。整個族群數量的變化，在近十年來是非常大的，再加上所施行人工復育的影響，整個櫻花鉤吻鮭族群的基因多樣性是否因此而趨向於更貧乏呢？它的族群遺傳結構是否會趨向同質化呢？這是值得我們注意、並加以探討的問題。

過去對於櫻花鉤吻鮭的研究雖然很多，但大多都是偏重於形態、生態與分類地位方面的探討(Behnke,1962)。而關於櫻花鉤吻鮭族群遺傳的研究，有 Okazaki (1986) 以蛋白質電泳分析日本櫻花鉤吻鮭族群結構與遺傳多樣性，以及 Numachi 等人 (1990) 以 RFLP 的技術分析了櫻花鉤吻鮭的遺傳結構。而根據 Numachi 等人 (1990) 的研究發現，所分析的 29 尾櫻花鉤吻鮭 mtDNA 的 RFLP 圖譜完全一模一樣，因此推測櫻花鉤吻鮭正處於萎縮期。但是由於 RFLP 的技術解析度較低，所能解析的程度可能僅在科 (Intrafamily) 內最為適當 (林，1995)，因此我們想用解析度較高的 DNA 定序的方法，分析櫻花鉤吻鮭的遺傳多樣性。

瞭解生物族群遺傳結構最快、最方便的方式便是使用同功異構酵素澱粉凝膠電泳法，估算族群遺傳變異度，並探討變異度之分化與分配。但是由於同功異構酵素電泳分析需要新鮮的標本，用於實驗的個體又無法存活，而且需要大量的個體（每個族群約需要 20-30 尾）以供實驗所需，這對於原本數量就已經非常稀少的櫻花鉤吻鮭也是一個不小的衝擊，因此這種實驗方法是在以前不予以考慮的。但是由於 1996 年 7 月賀伯颱風的侵襲，造成了為數不少的鮭魚自然死亡，有些屍體被沖至河岸，而且非常的新鮮，恰好可以用來作這個實驗，因此實驗室便向雪霸國家公園管理處以及行政院農業委員會申請用這批鮭魚來作遺傳變異分析的實驗。另外，我們也利用每年為做櫻花鉤吻鮭復育工作的同時，以不影響鮭魚生存為前提下，剪下其脂鱗，抽取 DNA，用 PCR 的方法增幅其粒線體 DNA 然後定序，以分析櫻花鉤吻鮭的遺傳多樣性，並 Numachi(1990)與的結果作比較。

二、材料與方法

(一)、標本採集

櫻花鉤吻鮭只分佈於大甲溪上游七家灣溪河段，而且是保育類動物，故無法採集活魚為標本。由於本實驗室協助雪霸國家公園進行櫻花鉤吻鮭復育的工作，因此向國家公園以及行政院農業委員會申請，利用每年進行人工復育時，撿取產卵後自然死亡的個體，以及用不傷害鮭魚生存的方式剪取其脂鱗及採集一些未受精卵來抽取 DNA 作為實驗的材料。

此外，1996 年 7 月因賀伯颱風來襲，造成了魚群的死亡，且被沖至七家灣溪河岸。由於屍體非常新鮮，故趁此機會向雪霸國家公園管理處及行政院農業委員會申請用作分析櫻花鉤吻鮭族群遺傳分析的材料，因此才利用這批標本進行同功異構酶電泳實驗。

(二)、實驗方法：

1、同功異構酶電泳分析：

- (1)、酵素萃取。
- (2)、電泳膠的備製及電泳實驗。
- (3)、切膠及酵素染色。
- (4)、資料分析。

2、粒線體 DNA 序列分析：

- (1) DNA 萃取
- (2) DNA 引子之設計
- (3) 聚合酶連鎖反應
- (4) DNA 定序
- (5) DNA 序列分析

三、結果與討論

(一)、同功異構酶電泳分析部份

這個實驗所使用的標本是 96 年 7 月因賀伯颱風沖積至七家灣溪河岸而死亡的新鮮鮭魚屍體，一共有二十五尾，分為兩個族群，分別是：觀魚台四尾 (omf1-4) 以及露

營場二十一尾(omf5-25)。這個實驗共分析了 23 種同功異構酶，可以清楚辨識的有 13 種，總共發現有 23 個基因座可以判讀。

在所得的 23 個基因座中，有 22 個基因座在兩個族群中是呈現同質性的 (monomorphism)，分別是：ADH-1、ALD-1、CK-1、CK-2、CK-3、CK-4、CK-5、FUM-1、GPI-1、GPI-2、GPI-3、IDH-1、IDH-2、LDH-1、LDH-2、MDH-1、MDH-2、ME-1、PEP-1、PEP-2、6-PGDH 與 PGM-1，只有基因座 MPI-1 表現出多型性 (polymorphism)。多型性基因座百分比的平均值為 2.15% (0.0%與 4.3%)，每個基因座的平均對偶基因數為 1.0，平均理論質異度 (H_e) 為 0.0115 (0.004 與 0.019)，而平均觀測質異度 (H_o) 為 0。這兩個族群所觀察到的平均觀測質異度皆為 0，而根據哈溫定律所期望的平均理論質異度則分別為 0.004 與 0.019，這與平均觀測質異度相近。由這些結果可以知道，櫻花鉤吻鮭基因型多型性是非常低的。

櫻花鉤吻鮭族群中，FIS (族群內基因的固定指數，估算族群內 H_o 與 H_e 值的差異) 平均值為 1.000，這個值大於零，表示櫻花鉤吻鮭族群內個體傾向於近親交配。而 FIT (為整個族群的基因固定指數，代表的意義與 FIS 相似) 值也是 1.000，與 FIS 值相同，這表示整個族群趨向於近親交配。在族群間變異指數 (FST) 方面，FST 值為 0.081，這表示族群間的變異是非常小的，分化程度很低。

(二)、粒線體 DNA 分析部份

這個實驗所使用的標本是本實驗室利用每年為櫻花鉤吻鮭復育時，剪取其脂鰭所得。實驗總共抽取了 12 尾櫻花鉤吻鮭的粒線體 DNA 供實驗所用，分別是 TFA1、TFB1、TFC1、TFD1、TFE1、TEA1、TEB1、omf1-5。

1、櫻花鉤吻鮭粒線體 DNA 定序結果

利用兩個寡核苷酸引子 pE3 與 pU2，可成功增幅出一段大約 1200-1300bp (base pair) 的櫻花鉤吻鮭粒線體 DNA 片段，其中包含了部份 tRNA-Pro gene、D-loop 及 tRNA-Phe gene，以及 12S rRNA gene 的前段。這段在洋菜膠上呈現單一亮帶 (single band) 的 PCR 產物，經定序分析證實是兩種不同長度片段的混合物，其長度變異的多型性導因於：位於 D-loop 中段出現的一處 poly-T 區域，T 的次數重複十二至十三次不等。反覆的次數在單一個體內呈現多型性，這種異質化 (heteroplasmy) 的現象導致個體內粒線體 DNA 長度的差異。

我們將十二尾櫻花鉤吻鮭的此特定增幅 DNA 片段完全加以定序，並全部進行互補股的檢查工作，檢查時重複讀取的片段長度佔全長的 80% 以上。poly-T 重複以基本數 12 次為計，則定序得到的 DNA 總長度為 1073bp。為便於進行比對，敘述各功能區或變異點之相關位置，參考台灣纓口鰱的排序方式將定序所得結果編碼。將 D-loop 輕股的 5' 端定為 1，往 Cty b gene 方向為負、往 12S rRNA 方向為正，同時將 poly-T heteroplasmy 取最簡化的重複次數 (十二次) 編排。得到的編碼如下：

tRNA-Pro gene -17~-1
D-loop 1~1011
tRNA-Phe gene1012~1056

如同大多數動物的粒線體基因組 (Saccone et al., 1987)，櫻花鉤吻鮭目前已有的定序片段在輕股 G A T C 的使用比例方面亦呈現低 G、C 使用率的情況。1073 個已定序輕股鹼基對之中 G 只有 173 個，約佔 16.1%。而 A、T、C 的使用率則分別為 30.8% (330 個)、29.5% (317 個)、23.5% (253 個)。

2、櫻花鉤吻鮭族群內個體變異

本實驗中所進行定序的十二尾台灣族群經過序列比對，發現共可分為二種基因型，分別為基因型 omf3 與基因型 TFA1。基因型之間的變異只有一處鹼基的互換（substitution），除了前述異質化重複片段區域所造成的長度差異外，並無插入（insertion）或短缺（deletion）的現象發生。就互換的性質而言，唯一的互換是轉換（transition），並非顛換（transversion），是 T、C 之間的轉換，發生的位置是在 D-loop。

就基因型與魚隻的數量分配情形而言，共有十一條魚屬於基因型 TFA1，只有一條魚屬於基因型 omf3。在定序的 12 尾櫻花鉤吻鮭中，只有兩種基因型，而且兩個基因型之間只有發生一處的轉換，可見在台灣族群內的歧異度非常的貧乏，以 MEGA 分析軟體中 Distance 的功能以 Kimura two-parameter 的方法計算其遺傳距離，結果是 0.001。

（三）、櫻花鉤吻鮭基因多型性的分析

由同功異構酶電泳分析的結果來看，在櫻花鉤吻鮭族群中所分析的 23 個基因座中，其中的 22 個是呈同質性的，只有一個基因座表現出有多型性，由此可以看出櫻花鉤吻鮭的基因多型性很貧乏。F-統計分析中，FIS、FIT 的值都為 1，這可能表示族群內受到近親交配的影響非常的大，因此使得族群的基因趨於僵化。FST 的值為 0.081，即族群間只有 8.1% 的變異，FST 的值偏低，這表示族群間分化的程度低。由於所分析的兩個族群樣本數差異很大（四尾與二十一尾），因此 0.081 的 FST 值極有可能是由於樣本數的差異所造成的，實際上的值應該會更接近零、甚至可能為零。

另外，由 mtDNA 定序的結果來看，十二尾櫻花鉤吻鮭只有分成兩個基因型 TFA1 與 omf3，兩個基因型中只有一個鹼基對發生變異，基因型之間的遺傳距離為 0.001，這個值是非常小的。這與 1990 年 Numachi 等人用 RFLP 技術分析櫻花鉤吻鮭粒線體 DNA 的結果相似。Numachi 等人共分析了 29 尾櫻花鉤吻鮭的 mtDNA，結果這 29 尾櫻花鉤吻鮭的基因型都相同，也就是說基因呈現均質的現象、無多樣性。由上述的結果可知，櫻花鉤吻鮭的遺傳多樣性可以說是非常的貧乏。

我們知道遺傳的多樣性會因為基因漂變、瓶頸效應與近親交配而下降（Meffe and Vrijenhok, 1988；Meffe, 1990），而櫻花鉤吻鮭遺傳多樣性的如此的貧乏可能有兩個原因：（1）因為族群數量下降造成的瓶頸效應（Numachi, 1990）；（2）櫻花鉤吻鮭魚群的分布情形並不平均，主要族群分布於上下兩個極端地區，中段因為棲地惡化以及數座攔砂壩的阻隔，族群已經被切割成數個更小的族群，增加了近親交配的機率，導致族群內長期近親交配的結果。

雖然台灣族群內的基因多樣性非常低，只有兩種基因型，而且兩個基因型之間只有一個鹼基對的變異。但是這個變異對於瀕臨絕種的櫻花鉤吻鮭卻有非常重要的意義，這個變異代表著台灣族群的基因尚未到達完全均質化的地步；換句話說，就是台灣族群尚具有遺傳的多樣性。雖然櫻花鉤吻鮭的基因仍有些微的多樣性，但對於整個族群而言依然是非常的貧乏，這是進行保育工作時所必須注意的問題。

（四）、櫻花鉤吻鮭的保育

遺傳的多樣性代表著物種適應環境的潛力，由於瀕臨滅絕的物種其遺傳多樣性通常很貧乏，所以在進行保育工作方面，如何的保持、甚至增加物種的遺傳多樣性，以增加物種對環境變異的適應能力，就顯得非常重要。本實驗的結果顯示，櫻花鉤吻

鮭的遺傳多樣性雖然貧乏，但仍有些許的多樣性。所以，如何保存這個多樣性便是今後保育工作需要努力的方向。

台灣族群中唯一有變異的個體為 omf3，這個標本是在 96 年賀伯颱風後在觀魚台所撿到的個體。由於受到颱風的影響，造成溪水暴漲，故在觀魚台採集到的標本極有可能是由上游地區被溪水沖下來的。也就是說，omf3 這個個體原本應該生活在七家灣溪的上游地區（二號壩以上）。根據曾（1996）對於櫻花鉤吻鮭族群數量與生態調查，可以發現二號壩以上的河段，鮭魚的數量明顯的多於二號壩以下的河段。另外，根據本實驗室另外一位研究生楊正雄所進行的實驗—水溫變化對櫻花鉤吻鮭族群的影響，發現下游較高的水溫與較大的溫差對於櫻花鉤吻鮭的繁殖與卵的孵化有負面的影響（楊，1997）。因此可以說，七家灣溪上游的河段比較有利於鮭魚的生長與繁殖，同時數量上也比較多，所以上游地區族群的遺傳多樣性應該會比較高。

進行保育工作時的重點應該是要加強下游族群與上游族群間的基因交流，使得遺傳多樣性可以在族群內擴散。所以在進行人工繁殖的工作時應該（1）選擇繁殖成功率低的下游族群為種魚，以增加下游地區族群的數量；（2）由於攔砂壩的阻隔，使得下游族群無法與上游族群進行基因交流，因此進行人工放流時應該將部份的魚苗放流至上游地區，以增加族群間基因交流的機會。

四、參考文獻

- 王昱人，1997，台灣鉤吻鮭與日本櫻花鉤吻鮭遺傳多樣性之研究，清華大學生命科學所碩士論文，65 頁。
- 林思民，1995，青將魚粒線體去氧核糖核酸控制區之研究，國立清華大學生命科學研究所碩士論文
- 曾晴賢，1996，櫻花鉤吻鮭族群數量和生態調查，內政部營建署雪霸國家公園管理處。
- 曾晴賢，1998，櫻花鉤吻鮭族群生態調查和育種場位址評估，內政部營建署雪霸國家公園管理處印行。
- 曾晴賢，1998，櫻花鉤吻鮭族群監測和生態調查（一），內政部營建署雪霸國家公園管理處印行，79 頁。
- 楊正雄，1997，水溫對櫻花鉤吻鮭的影響，國立清華大學生命科學系碩士班碩士論文。
- 戴永禎，1992，台灣櫻花鉤吻鮭之族群生態學研究，國立台灣大學動物學研究所博士論文，121 頁。
- Behnke, R. J., T. P. Koh, and P. R. Needham. 1962. Status of landlocked salmonid fishes of Formosa with a review of *Oncorhynchus masou* (Brevoort). *Copeia* 1962: 400-407.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 1993. MEGA: *Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 1.02*. Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Meffe, G. K. 1990. Genetic approaches to conservation of rare fishes: examples from North American desert species. *J. Fish Biol.* 37: 105-112.
- Meffe, G. K. and R. C. Vrijenhoek. 1988. Conservation genetics in the management of desert

fishes. *Conv. Biol.* 2: 157-169.

Numachi, K. I., T. Kobayashi, K. H. Chang, and Y. S. Lin. 1990. Genetic identification and differentiation of the Formosan salmon, *Oncorhynchus masou formosanus*, by restriction analysis of mitochondrial DNA. *Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica* 29(3): 61-72.

Okazaki, T. 1986. Genetic variation and populations structure in masu salmon *Oncorhynchus masou* of Japan. *Bull. Japan. Soci. Sci. Fish.* 52(8): 1365-1376.