

行政院農業委員會林務局農業管理計畫

106年度細部計畫

106林管-1.1-保-13(5)

臺灣鯨豚擱淺模式分析

期末報告

全程計畫：自 103年1月1日 至 106年12月31日

本年度計畫：自 106年1月1日 至 106年12月31日

國立自然科學博物館生物學組

姚秋如

協同研究人員

黃祥麟

工作人員

洪巧芸、黃冠慈、吳佩蓉

中華民國106年12月

(一) 本計畫擬解決問題

台灣的鯨豚擱淺組織網自民國85年成立以來，積達20年以上的擱淺資料，已有次以上的擱淺事件記錄，目前有29種以上的鯨豚在台灣出現。本提案擬以此擱淺資料庫與各學術蒐藏單位之自然史典藏品為科學研究基礎，整合與鯨豚擱淺相關的生物與非生物因子，如鯨豚物種、性別、族群生活史、族群遺傳組成、季節、擱淺地區的環境資訊等，利用地理資訊系統、統計及分子生態學方法，探討台灣鯨豚擱淺的生物、遺傳多樣性，及鯨豚擱淺的時、空特性與變化，期望能了解並歸納本地鯨豚的擱淺模式。

(二) 本年度計畫目標：

1. 整理校對科博館藏之海豚科骨骼標本，補充缺失之擱淺記錄，必要實進行分子實驗件性物種及性別。
2. 針對科博館小抹香鯨科標本物種鑑定疑慮，進行型態與分子遺傳分析，了解其物種及遺傳多樣性，並分析本科擱淺海岸點位外之近海水域水文特性。
3. 以DNA多基因座遺傳訊息，探討台灣與鄰近水域之江豚與中華白海豚族群之族群遺傳結構。

(三) 實施方法與步驟：

1.整理校對海豚科骨骼標本，補充缺失之擱淺記錄：本年度重點將針對國立自然科學博物館藏之海豚科骨骼標本之物種、性別、體長、擱淺地點之經緯度等進行研究勘誤，方法包含骨骼標本清理、頭骨型態檢視與測量、分子性別鑑定、生命條碼研究等。待確認資料正確無誤後，將該館佚失之鯨豚資料補登至TCSN資料網站。

2.台灣水域小抹香鯨科之擱淺特性分析：小抹香鯨科(Kogiidae)為台灣北部與西部水域較常見的小型齒鯨類，被認為很少進行長距離迴游，因此可能存在地區性族群，但在台灣的族群遺傳資料少。我們在過去TCSN擱淺資料庫校對過程中發現，本科雖僅2個物種(*Kogia sima* 侏儒抹香鯨 和 *K. breviceps* 小抹香鯨)，物種誤判或是不詳者相對多。本年度擬針對國立自然科學博物館之典藏骨骼標本，配合其中可用之遺傳物質樣本，進行標本整理分析、與生命條碼研究，並結合已發表之Kogiidae DNA資訊，分析台灣水域小抹香鯨科之物種與族群遺傳多樣性。此外，我們也會針對小抹香鯨科擱淺位點外之水域進行水文環境資料之蒐集(包含水深、水表溫度、及葉綠素a等)，以了解本科擱淺熱點海岸相近海域之相對水文環境特性。

3. 以DNA多基因座遺傳訊息，探討台灣與鄰近水域之江豚與中華白海豚族群之族群遺傳結構：針對104年度及105年度建構之中華白海

豚與江豚之基因資料庫所缺失的個體，每個體各進行至少8個以上之基因定型或序列，期望建構完整資料庫後，探討台灣與鄰近水域之江豚與中華白海豚族群間之族群變異、基因交流和分化過程。

(四)本年度工作成果

(I). 擱淺鯨豚標本資料處理、標本製作及典藏研究：

106年度進行19隻擱淺鯨豚剖檢，其中有江豚17隻，發現有難產、頭骨破裂與肋骨多處骨折個體各一隻；另外為中華白海豚2隻，都是未曾生產雌豚，檢視其胃袋，均無發現內容物。本年度亦指導或協助本館暑期實習生或大專院校研究生，總計有東華大學2人、中原大學1人、亞洲大學2人、成功大學1人、台南大學2人與中山大學2人，總計10位學生參與鯨豚自然史典藏研究工作，共完成6隻江豚骨骼標本，並將自然史樣本提供中山大學及東華大學研究生進行論文研究。



圖一、科博館暑期實習同學參與江豚解剖及採樣。此為7月28日與中興大學生科系吳生海老師實驗室共同解剖。



圖二、藉由解剖鯨豚及製作骨骼標本，大專實習生及研究生可從中學習海洋哺乳動物的組織、構造及型態特徵。



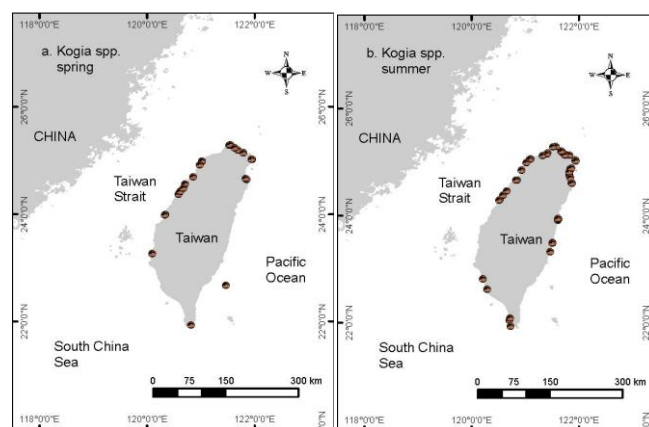
圖三、學生藉由檢視胃臟內含物，藉由初步觀察可以了解鯨豚的食物種類多樣性，並依胃含物類群分別保存以做為後續食性生態研究用。

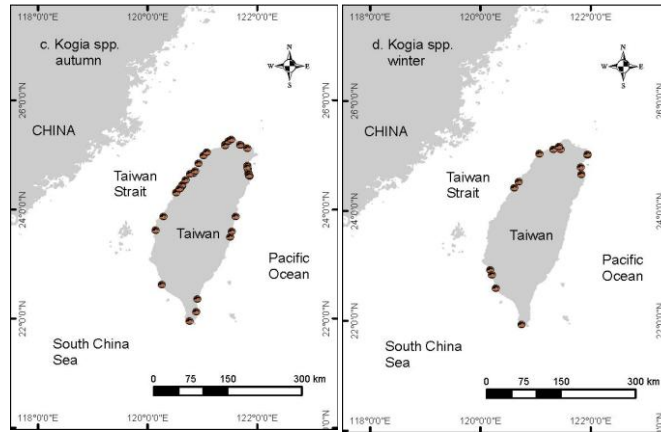


圖四、藉由檢視及量測外型特徵，以及解剖後觀察內部結構及寄生蟲寄生部位等，可以了解鯨豚進入水中生活的型態適應結構與其在海洋生態系中所擔當的角色。

(II). 以歷年小抹鯨科擱淺資料結合海洋遙測資料進行整合分析

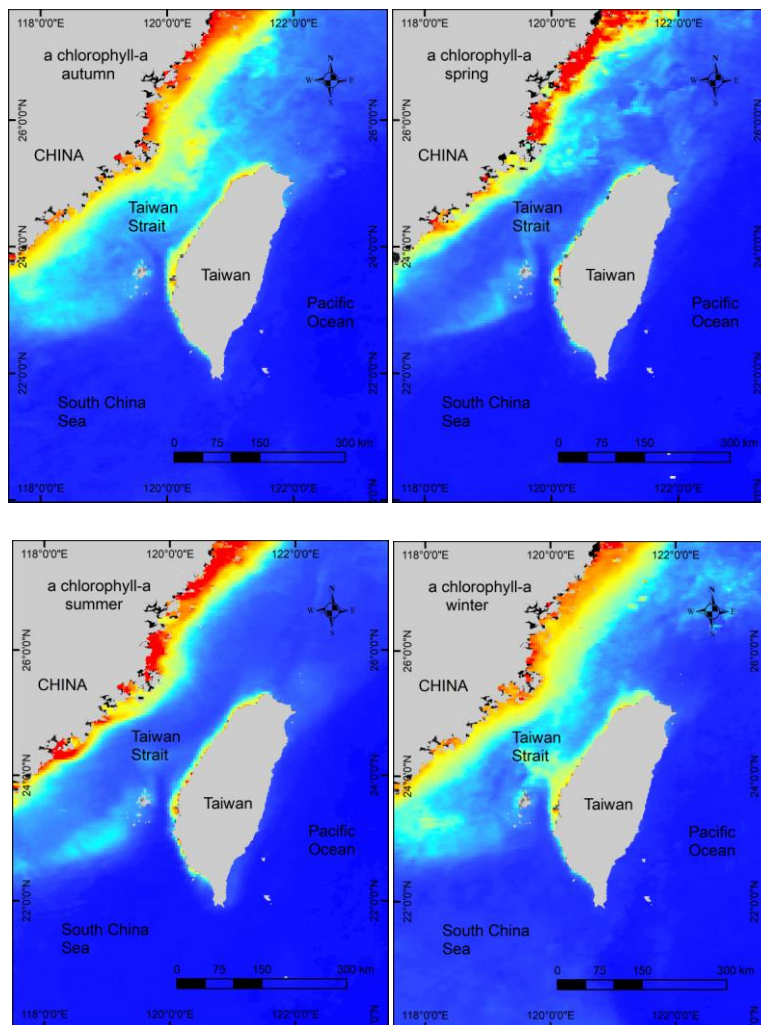
共整合分析超過300筆擱淺資料、並且利用公開海洋水文資料包含海水表溫、鹽度、葉綠素a、以網格視覺化將這些水文資料，探討在不同季節與年度間，此類群的擱淺趨勢。



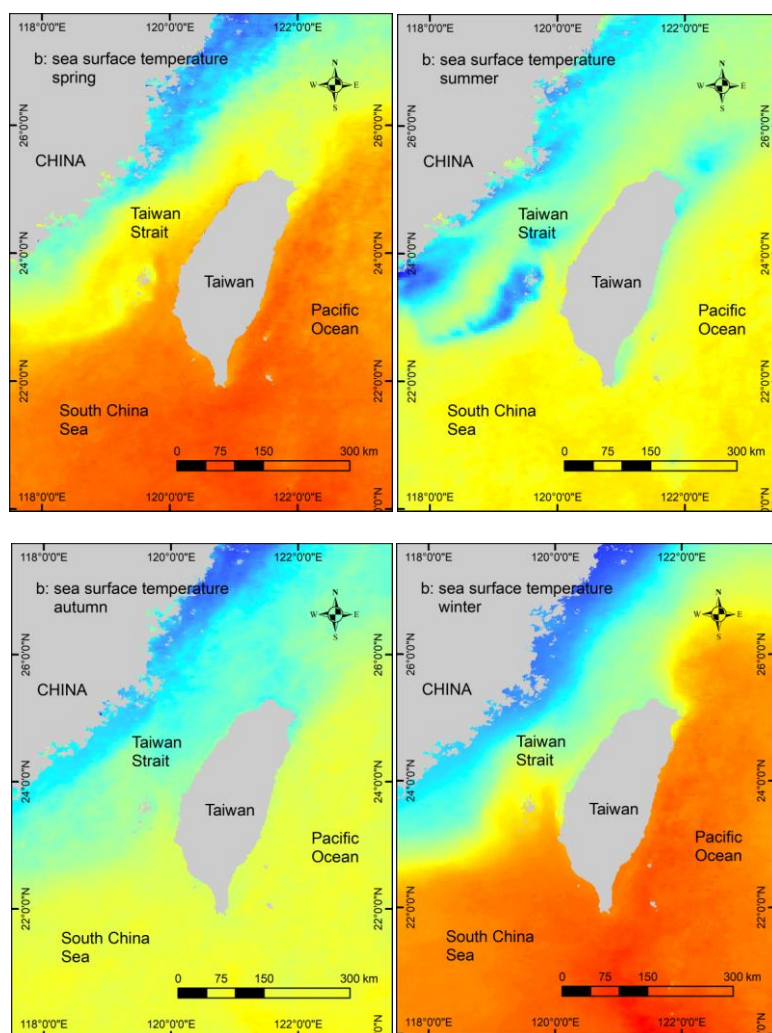


圖五、台灣水域小抹香鯨科在不同季節的擱淺分布圖。

由圖五可看出夏秋兩季是小抹香鯨科擱淺較頻繁的季節。因此再以水文資料之葉綠素a及水溫的季節變化檢視，



圖六、台灣水域四季之葉綠素a之變化圖。



圖七、台灣水域四季之海水溫度變化圖。

圖案中紅色代表的是高葉綠素或高溫，藍色的區域則代表相對的低葉綠素或低溫。可發現此科在相對較低葉綠素a及水溫變化較小的季節時，較常發現擱淺，其原因值得深入探討。

此外，本年度共完成小抹鯨科兩物種，侏儒抹香鯨與小抹香鯨，各五隻樣本之粒線體DNA控制區與COI基因序列定序，總共20個DNA序列資料，並且進行兩物種各自在台灣水域內的種內多樣性指數分析，同時亦比較台灣樣本其他水域之DNA序列差異。

表一、台灣水域小抹香鯨科兩個物種各五隻各體之COI基因DNA序列多型性比較。

	侏儒抹香鯨	小抹香鯨
Number of polymorphic (segregating) sites, S	5	23
Number of Haplotypes, h	3	5
Haplotype (gene) diversity, H_d	0.75	1
Variance of Haplotype diversity	0.068	0.074
Standard Deviation of Haplotype diversity	0.186	0.272
Nucleotide diversity, P_i : 0.00229	0.00229	0.01052

我們發現侏儒抹香鯨的COI基因DNA的種內變異較低，而小抹香鯨的種內遺傳多樣性較高。

而比較台灣樣本其他水域同種之COI基因DNA序列差異，發現台灣的侏儒抹香鯨與大西洋水域隻侏儒抹香鯨差異相當大，達8%左右，我們是否應將他們視為同一物種，有待未來以更多型態及遺傳數據探討其地理變異與分類地位。



圖八、以台灣之一隻侏儒抹香鯨COI序列(紅色標字)與BOLD(Barcode Of Life Data System)資料庫比對後由其系統建構之物種鑑定樹(BOLD TaxonID Tree)。

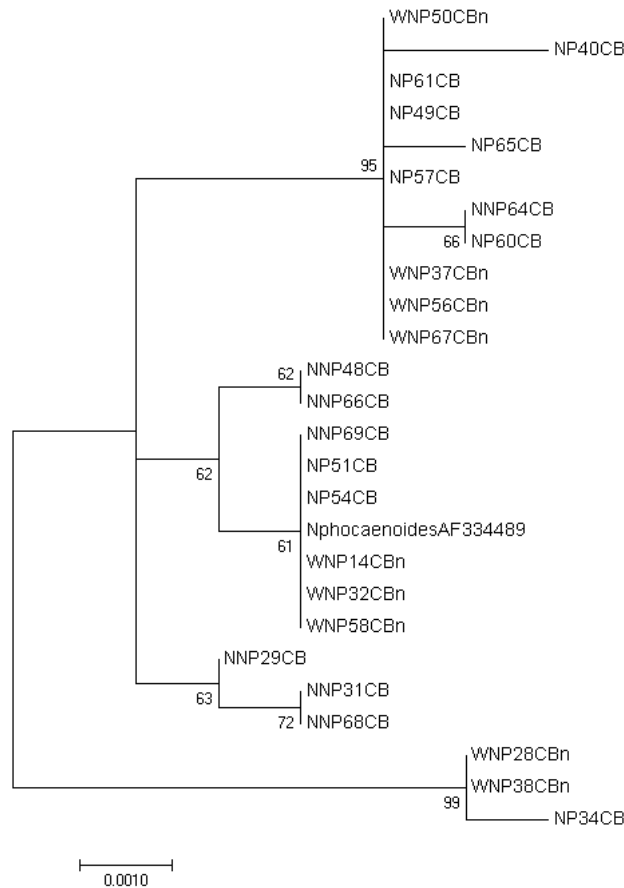
(III) 中華白海豚與江豚標本之牙齒切片以進行年齡估算

本年度清點本館典藏、缺少年齡鑑定資料之江豚標本，加上本年度擱淺的標本，完成15件江豚牙齒切片與年齡分析；此外，亦完成本年度蒐藏之兩隻中華白海豚的牙齒切片。每隻各體均經過3次獨立判讀年齡輪組以估算該隻動物的年齡。結果發現這些海豚年齡範圍最小0.5歲，最年長個體則因其牙髓腔已經癒合，僅能判斷其大於21歲。

(IV). 亞洲地區中華白海豚及江豚族群遺傳結構分析

本年度共進行包含台灣海峽、珠江口、黃渤海與廣西之江豚與白海豚樣本共158隻，每個體以9個新的STR基因座定型與2個粒線體DNA基因座(COI 與cytochrome b)序列定序為基準進行實驗及資料分析，扣除過於腐爛個體DNA品質不佳無法基因定型及定序外，成功數量共412個。由上述資料庫並加上過去已獲得之黃渤海江豚同源資料，分析此二物種的遺傳分化狀況與族群遺傳多樣性。族群遺傳結構資料分析詳述如下：獲得所有個體的微衛星基因座的基因型後，以GenAlEx 6.5軟體(Peakall and Smouse 2012)計算其各別的對偶基因數量、異結合度(觀察到的異結合度(observed heterozygosity, H_o) and 期望的異結合度(expected heterozygosity, H_e))。以MLRelatedness軟體來檢測各基因座之間是否偏離哈溫平衡(Hardy-Weinberg

equilibrium, HWE), 演算程式的參數設定為Randomization number:10000。由於無效對偶基因(null allele)的存在, 會影響到後續族群遺傳結構分析的結果, 因此以Micro-Checker version 2.2 軟體(Van Oosterhout et al. 2004)檢測無效對偶基因頻率(null allele frequency)。若發現有基因座存在無效對偶基因, 則會對其基因型使用軟體中Brookfield (1996)的方法進行校正。隨後將校正後的基因型, 以GenAlEx 6.5軟體進行遺傳分化程度分析及分子變異分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)。在遺傳結構分化方面, 以計算分析兩兩族群間的遺傳分化指數 F_{ST} (Meirmans and Hedrick 2011)代表分化程度。初步結果顯示: 粒線體DNA 兩個基因(COI和cytochrome b), 均無法釐清兩種海豚種內各族群間的差異, 有些異地區個體甚至享有共同的單套型(參考 圖九, 以兩種江豚的COI基因DNA序列分析為例)。然而微衛星體DNA基因座則有較快的演化速率, 以中華白海豚的兩兩族群比較後, 發現廣西族群與其他三個族群(香港、台灣、金門)的差異較大, 而後三者間並無顯著差異。江豚則呈顯示寬脊與窄脊族群間有顯著遺傳分化, 且窄脊族群的遺傳多樣性較低, 此結果與控制區序列的分析結果相同。上述兩種海豚的研究成果, 未來將各撰寫文稿, 擬投至同儕審查期刊發表。



圖九、以寬脊與窄脊江豚之粒線體DNA 細胞色素b基因序列經最大似然法(Maximum Likelihood method)演算所產生之親緣關係圖。以此DNA片段無法鑑別兩種江豚的遺傳差異。以下為演算時所利用的模式及最高的似然率值-The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model . The tree with the highest log likelihood (-3670.0579) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches.

(VI). 研究論文發表

同儕審查論文：2篇

1. 姚秋如、張豈銘、曾建仁。2017。鯨豚擱淺組織網與鯨豚生態探究。 台灣林業 43(2):73-79.

2. SL Huang, JJ Wang and Yao CJ* . Habitat protection actions for the Indo-Pacific humpback dolphin: baseline gaps, scopes and resolutions for the Taiwanese subspecies. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* . DOI: 10.1002/aqc.2875 (SCI, *為通訊作者)

參考文獻

- Brookfield J. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5:453-455.
- Brookfield J. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5:453-455.
- Edward G, EG Brede, P Long, S Zefania, M Rabenandrasana, T Sze'kely and M Bruford. 2010. PCR primers for microsatellite loci in a Madagascan waterbird, the Sakalava Rail (*Amaurornis olivieri*). *Conservation Genetic Resources* 2:273-277.
- Fu YX and WH Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Hasegawa M, H Kishino, and T Yano. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174.
- Hudson RR, DD Boos and NL Kaplan. 1992a. A statistical test for detecting population subdivision. *Mol. Biol. Evol.* 9: 138-151.
- Hudson RR, M Slatkin and WP Maddison. 1992b. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589. Hudson RR. 2000. A new statistic for detecting genetic

- differentiation. *Genetics* 155: 2011-2014.
- Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16:111-120.
- Kumar S, G Stecher and K Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis, Version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, doi:10.1093/molbev/ msw054.
- Librado P, and J Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Meirmans PG and PW Hedrick. 2011. Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources* 11:5-18.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Patel S, J Waugh, CD Millar and DM Larmbert. 2010. Conserved primers for DNA barcoding historical and modern samples from New Zealand and Antarctic Birds. *Molecular Ecology Resources*: 10(3):431-8. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02793.x.
- Peakall R and PE Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539.
- Tajima F . 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Van Oosterhout C, WF Hutchinson, DP Wills and P Shipley. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.