

台灣石鱚的族群遺傳結構

曾美珍、蔣鎮宇、王建平

國立成功大學生物系 台南市東區大學路一號

摘要

台灣石鱚分佈於台灣西部主要河川，為台灣特有的初級性淡水魚類，由於受到水系及山系的隔離，基因交流受阻，故其族群可能有區域性分化的現象。由最近保育生物學的研究顯示，很多野生動物族群由於棲地喪失或分裂而面臨滅絕，所以必須發展合理的保育策略，而正確評估族群遺傳結構是有效經營管理的基礎。本研究乃根據 RAPD 指紋法，利用 10 個引子，偵測台灣石鱚在 10 個河系的族群遺傳變異，數據分析顯示族群間地理距離和遺傳距離呈正相關，並符合 **Isolation by distance** 的假說，不論是族群內或族群間均維持著基因的歧異度，在各河系內具有特定的遺傳標記，以分歧分類學原理重建台灣石鱚族群間的親緣關係，結果顯示台灣石鱚已有分化分群的現象，雖然台灣石鱚目前沒有滅絕之虞，但保護健全的自然族群則為保育工作之要務。

關鍵詞:台灣石鱚，分歧分類學，遺傳標記，距離隔離，隨機擴大多型性核酸。

緒言

台灣地區的淡水魚類約有 220 餘種，過去大多著重在分類學上的探討及各溪流中之魚種分佈的調查，近年來由於攔砂壩之興建、集水區的開發、引入外來種等等，人為對棲地的干擾破壞，嚴重的影響到溪流魚類族群的生存，為了保護水族生態系統的生物歧異度，首先必須了解物種的族群遺傳結構。

台灣石鱚 (*Acrossocheilus paradoxus*) 為台灣特有之初級性淡水魚，在分類地位上是屬於鯉科 (Cyprinidae)、光唇魚屬 (*Acrossocheilus*)，其吻端圓鈍，腹部略白，有兩對鬚，體側有 7 條黑色橫帶，幼魚比成魚明顯。在以往的研究中主要著重在分類地位的探討，近年來對其生態及生理上的研究漸多 (彭 1993)。台灣石鱚分佈於台灣東北部及西部的 14 條主要河川，自平地至海拔 1,500 公尺的溪流中，喜棲息於水域的底層，繁殖期為每年 4 月初至 9 月底

或 10 月，生殖季節的長短因年因地而異，並且在同一生殖季節中可產卵多次 (邱 1996)。

台灣石鱚其外部形態具多型性，加上分類學者的觀點差異，造成許多同種異名的發表。最早由斯文豪氏 (Swinhoe 1866) 在台灣採得標本，其後由貢德氏 (Günther 1868) 命名為 *Barbus paradoxus*。其後 Regan (1908) 根據 Dr.A.Moltrecht 於日月潭採得標本，發表了 *Gymnostomus formosanus*。Oshima (1919) 以 *Gymnostomus formosanus* 共有兩對長觸鬚有別於 *Gymnostomus* 屬的一對短鬚而另立新屬 *Acrossocheilus*。Oshima 將 *Barbus paradoxus* 移至 *Barbodes* 屬，改名為 *Barbodes paradoxus* (Oshima, 1919)。Oshima (1920) 以 Matsuda 採集自屏東縣的模式種標本 *Lissochilichthys matsudai*，立新屬 *Lissochilichthys*。Herre and Myers (1931) 認為 *Acrossocheilus*、*Barbodes* 及

Lissochilichthys 三屬都應歸併入 *Lissochilus* 屬；但由於 *Lissochilus* 已經在更早前被命為一種軟體動物的屬名，故不合於命名法。沈 (1993) 於所主編的台灣魚類誌時，認為體色、身高等變異可能是種內個體差異或是由於死亡、固定而改變，而將 *B.paradoxus*、*Acrossocheilus formosanus*、*G.labiatus* 及 *L.matsudai* 等種群合併為 *Acrossocheilus paradoxus*。宋 (1993) 以電泳同功酵素 (isozyme)、數值分類法及主成份分析法研究，認為 *A.labiatus* 與 *A.formosanus* 雖然型態上有變異，應為同一物種。

針對一物種內的不同族群間及族群內的基因庫內的遺傳組成及變異及組成與演化因子之間的相關，並加以研究的稱為族群遺傳學 (黃 1996)，大部份的生物族群，因受到不同的演化機制作用影響，例如：天擇 (natural selection)、突變 (mutation)、基因流傳 (gene flow)、遺傳漂變 (genetic drift) 或交配型式 (system of mating)，使族群內及族群間呈現不同的遺傳變異分佈情形，而此一遺傳變異的分佈即是物種的族群遺傳結構 (Hamrick 1982)。

初級性淡水魚類的遷移或擴散主要是靠著淡水水系之間的交流，除了河川襲奪之外，甚少出現自然擴散的情形 (Sakaizumi 1986)。陸封型的魚類又由於其生活的水系受山系的隔離，阻絕了族群間的基因交流，會在各自的溪流中形成獨立的族群，其遺傳變異就可能出現區域性分化的現象 (林 1996)。由保育生物學的研究顯示，很多野生族群目前因棲地的喪失或分裂而面臨滅絕，所以保育學者必須在物種絕滅之前，發展出合理的保育策略，而正確地評估族群結構是有效經營管理的第一步。

由於分子遺傳技術的發展，DNA 指紋法近年來被運用於野生動物之生態及保育的相關研究 (Amos and Pemberton 1993)，而由於 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技術敏感度高，因此常被用來偵測個體或族群間的遺傳變異 (Fani et al. 1993)。本實驗的目的即利用 RAPD 指紋法偵測台灣石鱚族群內及族群間的遺傳變異，探討其族群結構，並以分歧分類學原理重建族群間的親緣關係，

並提出保育策略之建議。

材料與方法

一、取樣地點及方法

(一) 採集地點

台灣石鱚分佈於台灣西部平地至海拔 1,500 公尺的溪流中，為了解台灣石鱚在溪流間的遺傳變異，本研究於不同河系的中、下游進行取樣，在台灣的主要河川中，共選取 10 個河系。在北部地區，有蘭陽溪、新店溪、外雙溪、頭前溪和後龍溪等 5 個河系。在中部地區，包括大甲溪、濁水溪 2 個河系。在南部地區，則選取曾文溪和高屏溪 2 個河系，其中高屏溪河系的支流荖濃溪及東港溪各別選取一個採樣點，總共採集了十個族群 (圖 1)。

(二) 取樣方法

在採樣點中採用釣取法或用手抄網撈取，每個河系的族群選取二個個體，置於水袋中，攜回實驗室處理分析。

二、分子技術

(一) DNA 的萃取和定量

取魚體的肝臟，於液態氮下研磨至粉末狀；Genomic DNA 之分離採取 phenol / chloroform 的萃取法 (Blin and Stafford, 1976)；並利用分光光度計測其吸光值 (A_{260})，定量後保存於 -20°C 下。

(二) RAPD

本實驗聚合鏈鎖反應 (polymerase chain reaction ; PCR) 之反應條件參考 Williams (1987)，每管的反應溶液總體積為 $25\mu\text{l}$ ；溶液的成份包括 30 ng DNA ， $2.5\mu\text{l MgCl}_2$ (2M)， $2.5\mu\text{l dNTP}$ (10mM)， $2.5\mu\text{l 2pm primer}$ (為 10-mer 的單股 DNA，商業合成)， $2.5\mu\text{l 10x reaction buffer}$ 及 1U 聚合酵素 (*Taq polymerase*, Promega)，並覆蓋 mineral oil，防止溶液於反應過程中受熱蒸發；再移到 PCR 溫度循環儀 (thermalcycler)，進行以下設定流程：(a) 94°C 完全變性 (complete denaturing) 3min，(b) 92°C 變性

(denaturing) 20 秒, (c) 36°C 黏合 (annealing) 45sec, (d) 72°C 1 分 30sec 進行延伸聚合反應 (extension), (e)重複(a)-(d)步驟 45 循環, (f) 最後 72°C 4min 使作完全之延伸, 儲存於 4°C 下; 本實驗使用 10 組不同的引子 (表一) 進行反應, 將反應產物用 2% NuSieve agarose gel 於 1x TBE buffer 中以 50V 電泳 4hr, 並以 Etd-Br 染色, 在紫外燈下顯色及照相, 並比較條帶的多型性及變異。

(三) 數據分析

利用條帶之有無計算台灣石鱚族群內及族群間的遺傳距離, 並以 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Program, MEGA, Version 1.01 (Kumar *et al.* 1993)中 Neighbor-joining method 構築親緣演化樹。

結果與討論

一、台灣石鱚族群間具高度的遺傳變異

由 RAPD 條帶多型性 (如圖 2) 所得之數據結果, 分析台灣石鱚十個河系族群間的變異性分佈情形, 顯示在 18 個個體中就包含了 17 種不同的基因型, 只有東港溪二個個體的基因型相同 (表 2), 可見不論是個體間或族群間都具有遺傳變異存在, 並保有基因的歧異度。在各河系間則具有特定的遺傳標誌, 例如 M2 條帶只出現於曾文溪的族群; M29 條帶只存在於大甲溪的族群。所以位於不同地理區域的族群, 當其族群間的基因交流受到物理或生態上的限制時, 其遺傳組成可能會出現很大的差異。

在鄰近河系有較高的機會發生河川襲奪而產生族群交流, 但台灣河川獨立出海, 各河系間交流的機會很小, 因此族群分化的能力主要應來自於天擇的壓力。而各河系的族群在不同的環境下承受不同的天擇壓力, 因此出現了不同的遺傳變異, 距離較相近的河系其生態環境及地質史也較相似, 因此河系間的遺傳變異性分佈也較相同, 例如: M9 條帶及 M30 條帶只分佈於蘭陽溪及淡水河地理環境較相近之族群; M20 只存在於曾文溪和高屏溪河系之族群, 這些都是明顯的遺傳標誌, 在在顯示出族群間的關係及演化的歷史。本實驗之數據, 分析後利

用 Neighbor-joining method 構築族群間的親緣關係 (圖 3), 由此圖顯示各河系均獨立成一類, 證明台灣石鱚族群間已有明顯的分化現象了; 只有淡水河與蘭陽溪的族群並無法很清楚的將之區別, 推測其原因可能由於兩條河川被隔離的時間很短, 因此仍具有相似的遺傳變異性分佈; 也可能由於取樣不夠多, 因此難以顯示出兩河系之差異。

二、台灣石鱚的生物地理學研究

由於台灣南北氣候不同, 環境互異, 淡水魚類一般會具有生態上或地理上的區域性。台灣石鱚為台灣特有種, 分佈於西部 14 條主要河川中, 由本研究結果可以得知台灣石鱚遺傳變異性分佈型式, 可分為以後龍溪為界的南、北二大群集 (圖 3), 南部群集包括了高屏溪、曾文溪、大甲溪和濁水溪; 北部群集包括了蘭陽溪、淡水河、頭前溪和後龍溪。陳 (1994) 根據褐吻蝦虎在台灣的分佈情形, 將台灣的淡水魚類動物地理區劃分出六個動物地理區, 包括 1) .東部地區即中央山脈以東的溪流流域; 2) .南部地區即中央山脈以西, 濁水溪以南的溪流流域; 3) .中、北部地區即中央山脈以西, 濁水溪以北的溪流流域; 4) .恆春半島區; 5) .蘭嶼區; 6) .綠島區。而台灣石鱚南、北群集的劃分相當於上述地理區的南部地區及中、北部地區; 而外島區目前沒有台灣石鱚出現的記錄。

為探討本省淡水魚類的起源和分佈現象, 曾 (1986) 利用相似度分析及根據地質史資料, 提出在更新世以前, 台灣是大陸的一部份, 直到更新世中期後, 臺灣島和亞洲大陸曾有數次的分離和再相連的時期, 其間有”台灣堆”的陸橋相連, 在不同的時期, 魚類沿著南北兩側的水系分佈到臺灣島上。

為探討台灣石鱚的起源, 本實驗做了地理距離和遺傳距離的數據分析 (表 3), 結果顯示出明顯的正相關, 舉例而言, 新店溪的族群和後龍溪的族群間的遺傳距離是 15, 和曾文溪的族群間的遺傳距離是 18, 顯示地理距離愈近的族群有較低的遺傳距離, 符合 Isolation by distance 的假說, 也就是說地理距離愈近的族群, 愈容易發生基因流傳的情形或具有較相近的演化歷史, 因此遺傳組成較相似;

而地理距離愈遠的族群，發生基因流傳的機會較小，遺傳組成變異較大，因此族群間的遺傳距離會與地理距離形成正相關。但由目前的地理環境而言，台灣河川獨立出海，各河系族群間交流不順暢，所以造成 *Isolation by distance* 的情形可能得追溯到中央山脈未隆起前，各水系族群間應該有充份的交流，由結果顯示台灣石鱚族群只有在相鄰的族群間才具有較小的遺傳距離，所以推測基因流傳的方向應該是 *One-dimensional* (Slatkin 1985)，而河川襲奪可能就是造成族群間基因交流的主要原因；台灣原可能只有南、北兩大水系，因為地形改變，山脈隆起，而使得河川改道，並形成獨立出海的河系，因此由結果推測台灣石鱚的遺傳變異性分布情形和台灣地理上演變過程有著密切的關係存在，實值得更進一步深入的探討。

結論

台灣石鱚由 RAPD 的遺傳變異分佈情形，發現族群間之遺傳變異度仍高，並且其野外族群仍維持相當數量，尚無滅絕之虞。然而由於水系的阻隔，各河系間交流的機會漸小，因此族群分化的能力主要應來自於隔離效應，另一方面各河系的族群可能在不同的環境下承受不同的天擇壓力而出現了高度遺傳分化、區域性特化的現象，由本研究結果顯示無論在遺傳組成上或族群數量上，台灣石鱚具有健全而穩定的族群，而針對保育工作而言，保護像台灣石鱚這樣優勢而健全的物種，比起“復育”稀有、瀕臨絕滅物種的重要性，並不遜色。

誌謝

感謝許桂菁協助野外採集及 DNA 的萃取。

引用文獻

沈世傑。1993。台灣魚類誌。國立臺灣大學動物學系。
宋武修、李信徹、于名振。1993。以電泳法決定台灣兩種光唇魚屬魚類之分類地位。中央研究院

動物研究所集刊 32(2): 127-139。
邱慈暉。1996。台灣石鱚之生物學研究。國立成功大學生物學研究所碩士論文。
林弘都。1996。台灣地區台灣鏟頰魚族群遺傳結構之研究。國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。
陳義雄。1994。台灣產褐吻蝦虎相似種群系統分類的研究。國立中山大學海洋資源研究所碩士論文。
曾晴賢。1986。臺灣淡水魚類的分佈。台灣省立博物館半月刊 39(2):127-146。
黃生。1996。突變與中性選擇。生命科學 39 (1) : 69-77。
彭弘光。1993。石鱚對生態環境適應能力研究。水產研究 1(2): 25-30。
Amos, B. and J. Pemberton,. 1992. DNA fingerprinting in non-human populations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2: 857-860.
Blin, N. and D. W. Stafford. 1976. A general method for isolation high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucl. Acid Res.* 3:2303-2308.
Fani, R., G. Damiani, C. Diserio, E. Gallori, A. Grifoni, and M.Bazzicalupo.1993.Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Mol. Ecol.* 2:243-250.
Günther, A. 1868. Catalogue of the Physostomi in the Collection of the British Museum. V. 7:3-372.
Hamrick, J. L. 1982. Plant population genetics and evolution. *Amer. J. Bot.* 69:1685-1693.
Herre, A. W. and G. S. Myers. 1931. Fishes from southeastern China and Hainan. *Lingnan Sci. J.* 10 (2&3): 233-254.
Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics Analysis, Version 1.01. The Pa State Univ.
Oshima, M. 1919. III. Contributions to the study of the fresh water fishes of the island of Formosa. *Ann. Carn. Mus.* V.12: 169-328, Pls: XLVIII-LIII.

- Oshima, M. 1920. Notes of freshwater fishes of Formosa with descriptions of new genera and species. Proc. Acad. Nat. Sci. Phil. 72: 120-135, Pls: III-V.
- Regan, C. T. 1908. Descriptions of new fishes from lake Candidius Formosa, collected by Dr. A. Moltrecht. Ann. Mag. Nat. Hist. 8(2): 358-360.
- Sakaizumi, M. 1986. Genetic diversity and evolution in wild populations of the medaka *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae). Modern Aspects of Species. pp. 161-179.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. Ann. Rev. Ecol. Syst. 16: 393-430.
- Williams, J. F. 1987. Optimization strategy for the polymerase chain reaction. Bio Tech. 7: 762-767.
- Sakaizumi, M. 1986. Genetic diversity and evolution in wild populations of the medaka *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae). Modern Aspects of Species.

圖 1、本實驗台灣石鱻的採集點。1.蘭陽溪 2.新店溪 3.外雙溪 4.頭前溪 5.後龍溪 6.大甲溪 7.濁水溪 8.曾文溪 9.老濃溪 10.東港溪.

圖 2、RAPD 的多型性。A 為利用引子 98 所得 RAPD 的結果。B 為利用引子 28 所得 RAPD 的結果。箭頭所指處為出現變異的位置。

圖 3、利用 Neighbor-joining method 分析十個河系族群所得之親緣關係圖。

Population Structure Of *Acrossocheilus paradoxus* Günther (Cyprinidae)

Mai-Chen Tseng^{1,2}, Tzen-Yuh Chiang¹, and Jiang-Ping Wang¹

¹Department of Biology, Cheng-Kung University.

²Corresponding author.

ABSTRACT

Acrossocheilus paradoxus is a primary freshwater fish endemic to streams of western Tainan. Genetic structure of *A. paradoxus* was examined by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting method. Ten random 10-mer primers were screened for RAPD markers, and gave clear and consistent amplified products, which were used to assay the individuals collected from 10 streams. The RAPD data showed a positive correlation between genetic distances and geographical distances, supporting the model of isolation by distance. Genetic differentiation was mostly ascribed to low gene flow caused by geographical isolation. Comparison of the RAPD bands and the reconstructed phylogeny indicated that high genetic diversity existed within and between the populations of *A. paradoxus*.

Keywords : *Acrossocheilus paradoxus*, RAPD, cladistics, genetic marker, isolation by distance.

Table 1. Sequences of primers used for the experiments.

Table 2. Data matrix of polymorphic RAPD bands. +/- indicates presence/absence of the band scored. (1, Lanyang River ; 2,3, Hsintien River ; 4, Waishiang River ; 5,6, Touchien River ; 7,8, Houlong River 9,10, Tachia River ; 11,12, Choshui River ; 13,14, Tsengwen River ; 15,16, Laonung River ; 17,18, Tungkan River ; 30 variable bands were amplified using ten primers: M22-24, primer 12 ; M14, M17-18 primer 18 ; M15-16, primer 28 ; M8-10, primer 44 ; M4-6, primer 72 ; M1-3, primer 78 ; M27-30, primer 80 ; M11-13, primer 94 ; M25-26, primer 98 ; M19-21, primer 100)。

Table 3. Pairwise genetic distances among individuals of *A. paradoxus* based on RAPD polymorphisms (OTU1, Lanyang River ; 2,3, Hsintien River ; 4, Waishiang River ; 5,6, Touchien River ; 7,8, Houlong River ; 9,10, Tachia River ; 11,12, Choshui River ; 13,14, Tsengwen River ; 15,16, Laonung River ; 17,18, Tungkan River.

圖一、本實驗台灣石𩚰的採集點。1.蘭陽溪 2.新店溪 3.外雙溪 4.頭前溪 5.後龍溪 6.大甲溪 7.濁水溪 8.曾文

溪 9.老濃溪 10.東港溪.

Figure 1. Map showing the collection sites of *A. paradoxus* at ten rivers in this study. (1,Lanyang River ; 2,Hsintien River ; 3,Waishiang River; 4,Touchien River; 5,Houlong River; 6,Tachia River; 7,Choshui River; 8,Tsengwen River; 9,Laonung River ; 10,Tungkuang River).

圖二、RAPD 的多型性。A 為利用引子 98 所得 RAPD 的結果。B 為利用引子 28 所得 RAPD 的結果。箭頭所指處為出現變異的位置。

Figure 2. RAPD polymorphic bands based on amplification using primers 98 (A) and 28 (B).Black arrows indicate variable sites.