

COI基因條碼在臺灣產蝮蛇科及蝙蝠蛇科蛇種辨識上的應用

Application of Species Identification via Mitochondrial COI DNA Barcoding for Viperidae and Elapidae Species in Taiwan

陳元龍* 林毅倫 林德恩

Yen-Long Chen*, Yi-Lun Lin and Te-En Lin

行政院農業委員會特有生物研究保育中心 55244 南投縣集集镇民生東路1號

Endemic Species Research Institute, Jiji, Nantou, Taiwan

*通訊作者: dragon@tesri.gov.tw

*Corresponding author: dragon@tesri.gov.tw

摘要

利用聚合酶連鎖反應技術，針對臺灣產之6種蝮蛇科及5種蝙蝠蛇科蛇類粒線體COI基因進行局部擴增，獲得一段658個鹼基對之基因序列片段。以Kimura-2-parameter模式計算COI基因序列在種內與種間的遺傳距離，種內遺傳距離介於0.04 ~ 2.40%，種間的遺傳距離介於1.45 ~ 25.48%。另以序列鄰接法及最大簡約法方式建構系統發育樹，兩者呈現的聚類結果並未存在衝突，同種個體皆聚集在同一分支，顯示COI序列可應用於臺灣產蝮蛇科及蝙蝠蛇科之種間鑑別。

Abstract

The PCR technique was used to amplify the partial mtDNA COI gene of 11 species of Viperidae and Elapidae snakes collected from Taiwan. The PCR products were sequenced and 658 bp of COI gene were obtained. The average Kimura-2-parameter genetic distance intra-species was 0.04 ~ 2.40%, and the inter-species was 1.45 ~ 25.48%. The phylogenetic trees estimated by neighbor-joining method and maximum-parsimony method obtained similar results. All 11 snake species showed monophyletic and

every species could be discriminated clearly. It is suggested that the COI barcoding can be used to identify Viperidae and Elapidae snakes species in Taiwan.

關鍵詞：蝮蛇科、蝙蝠蛇科、DNA 分子條碼、細胞色素氧化酶 I

Key words: Viperidae, Elapidae, DNA barcoding, Cytochrome c oxidase subunit I

收件日期：2015 年 10 月 28 日

接受日期：2016 年 03 月 15 日

Received: October 28, 2015

Accepted: March 15, 2016

緒 言

自從Hebert *et al.* (2003a)建立以粒線體細胞色素氧化酶I (cytochrome c oxidase subunit I, 縮寫成COI) 基因為遺傳標記的全球動物辨認系統以來, DNA分子條碼的應用引起很多的迴響與推廣。然而DNA分子條碼的應用不是沒有限制的, 要有效運用DNA分子條碼, 需先針對已確認的物種進行序列資料的建立, 始可進行比對, 目前並沒有針對所有物種皆能適用的DNA分子條碼。COI基因已成功應用在多類物種的鑑定, 例如鱗翅目 (Hebert *et al.*, 2004a; Hajibabaei *et al.*, 2006)、鳥類 (Hebert *et al.*, 2004b)、蜘蛛 (Barrett and Hebert, 2005)、魚類 (Ward *et al.*, 2005)、雙翅目 (Smith *et al.*, 2006)、鼠類 (Robins *et al.*, 2007) 及蛇類 (Dubey *et al.*, 2011) 等等。由於部分技術性原因, 導致兩棲爬蟲類的COI基因較少被定序及使用 (Nagy *et al.*, 2012)。但2008年後, 有研究人員宣稱, 兩棲類的COI基因相關技術問題已逐步克服 (Smith *et al.*, 2008), 因此, 以COI基因當做分子標記, 應用在兩棲爬蟲類的物種鑑定、

類緣關係及親緣地理等相關研究, 未來應會逐漸增加, 不過現階段比起其他分子標記仍相對較少。

臺灣本島陸域的蛇類超過40種 (向等, 2012), 其中蝙蝠蛇科 (Elapidae) 蛇類有5種, 分別為羽鳥氏帶紋赤蛇 (*Sinomicrurus hatori*)、梭德氏帶紋赤蛇 (*Sinomicrurus sauteri*)、雨傘節 (*Bungarus multicinctus*)、環紋赤蛇 (*Sinomicrurus macclellandi*) 及眼鏡蛇 (*Naja atra*); 蝮蛇科 (Viperidae) 蛇類有6種, 分別為百步蛇 (*Deinagkistrodon acutus*)、龜殼花 (*Protobothrops mucrosquamatus*)、鎖鏈蛇 (*Daboia siamensis*)、菊池氏龜殼花 (*Trimeresurus gracilis*)、瑪家山龜殼花 (*Ovophis monticola*) 及赤尾青竹絲 (*Trimeresurus stejnegeri*), 皆屬於毒蛇; 在這11種蛇類當中, 除赤尾青竹絲 (*T. stejnegeri*) 外, 其餘10種皆為政府公告之保育類野生動物 (行政院農業委員會2014年7月2日農林務第1031700771號公告)。由於傳統上認為蛇類入藥對人體具有某些特殊療效及滋補, 特別是越毒的蛇效果越好的不當觀念, 導致蛇類 (特別是毒蛇) 仍然面臨龐大的獵捕壓

力，並製成產製品違法銷售；因此，利用分子生物學的技術，能以更快速、準確的方法鑑定保育類比例逾9成的蝮蛇科及蝙蝠蛇科蛇種，在保育行政的實務上，有其必要性。然而野生蛇類活體不易發現並捕捉，因此其DNA組織樣本的蒐集相對困難，本研究利用公民科學的概念，透過參與臉書社群平台--四處爬爬走（路殺社，網址：<https://www.facebook.com/groups/roadkilled/?fref=ts>）的民眾，在蒐集路死蛇類資料的同時，將取得的動物屍體，製成標本保存供做其他研究外，並採取、保存其組織，進行COI基因的定序分析，除可充實臺灣本土蛇類之分子條碼系統，並評估其作為本土蛇類蝮蛇科及蝙蝠蛇科鑑定物種的可行性。

材料與方法

一、DNA樣本蒐集

蒐集2014~2015年路殺社志工協助撿拾路死及其他管道（如自行撿拾、捕捉或本中心急救站收容個體）獲得之蛇類屍體樣本，或本中心歷年所採集之爬蟲類所製浸液標本，採集組織進行DNA萃取及純化。

二、DNA萃取、增幅及定序

取蛇類肌肉組織用Puregene DNA抽取純化試劑組（Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA）依建議程序抽取gDNA保存於TE緩衝溶液中備用。以PCR（聚合酶連鎖反應）進行選用COI基因序列之增幅放大，選用的引子為廣用引子Vf1d（5'-TTCTCAACCAACCACAA R GAYATYGG-3'）及Vr1d（5'-TAGACTTCTGG GTGGCCRAARAAYCA-3'）（Ivanova *et al.*, 2006）。COI的PCR擴增在25 μ l的反應溶液中

進行。在25 μ l的反應溶液中，包含9.5 μ l去離子水，1 μ l的樣本基因組DNA（50-100ng extracted genomic DNA），各1 μ l的10 mM正反兩股廣用引子，12.5 μ l的Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED（Ampliqon），最後25 μ l反應液總濃度各0.4 mM dNTPs，1.5 mM MgCl₂，0.2U Taq DNA polymerase。反應條件為94°C預變性5 min，94°C 30 s，45~48°C 30 s，72°C 1 min，35個迴圈，然後72°C延伸5 min。PCR產物會用1% agarose gel 電泳與ethidium bromide染色檢測，使用Micro-Elute DNA Clean/Extraction Kit（GeneMark, Taiwan）將PCR產物純化並溶於10 μ l去離子水。純化PCR產物用ABI Model 3100 DNA sequencer（Applied Biosystem, USA）及BigDye terminator cycle sequencing reagent（Applied Biosystem, USA）定序。將定序結果利用BioEdit v7.2.5（Hall, 1999）程式進行拼接，手工校對樣本序列，最後通過所有序列的比對和比較確定每一個體可用的公共區段。

三、序列分析

使用DnaSP v5（Librado and Rozas, 2009）軟體分析所有樣本COI基因公共區段序列鹼基組成與變異點位情況；另利用Mega 6.06（Tamura *et al.*, 2013）軟體，以Kimura-2-parameter模式計算該基因序列在臺灣產蝮蛇科及蝙蝠蛇科之種內與種間的遺傳距離，並以黃頰蛇科（Colubridae）之青蛇（*Cyclophiops major*）為外群，以支序系統分類法中的序列鄰接（neighbor-joining method--NJ）法及最大簡約法（maximum-parsimony method--MP）建構系統發育樹，採用bootstrap檢驗（1,000次）計算系統樹每一分支的支持度。

結果與討論

本研究總計蒐集、定序並分析臺灣地區蛇類共3科12種54個組織樣本，包括蝮蛇科6種26個組織樣本、蝙蝠蛇科5種27個組織樣本及作為外群分析使用的青蛇 (*C. major*) 1個組織樣本；PCR產物定序所得之COI序列，將正反向序列進行校對、拼接後，去除引子，獲得一段長度為658個鹼基之COI基因同源序列，該段序列未發現插入或鹼基缺失，所有序列已公布於GenBank，相關蛇種、採集地及GenBank登錄編號見表1。

分析蝮蛇科及蝙蝠蛇科53個樣本COI基因公共區段序列658鹼基之組成，發現有254個變異位點，404個保守點位；A、T、C、G鹼基平均含量分別為26.2%、28.4%、29.7%、15.7%。其中A + T 含量（54.6%）高於G + C（45.4%）含量，表現出AT偏倚特徵。

以Kimura-2-parameter模式計算COI基因序列在臺灣產蝮蛇科及蝙蝠蛇科之種內與種間的遺傳距離（表2、表3），結果顯示，種內的遺傳距離介於0.04 ~ 2.40%，其中赤尾青竹絲 (*T. stejnegeri*) 為2.40%，明顯大於其他蛇種。種間的遺傳距離，介於1.45 ~ 25.48%（蝮蛇科種間差異介於13.48 ~ 23.62%，蝙蝠蛇科種間差異從1.45 ~ 19.80%），羽鳥氏帶紋赤蛇 (*S. hatori*) 與梭德氏帶紋赤蛇 (*S. sauteri*) 種間差異僅1.45%，其餘蛇種之間差異介於13.48 ~ 25.48%。

以青蛇(*C. major*)為外群，將包括臺灣產蝮蛇科及蝙蝠蛇科共54隻個體，分別用序列鄰接法及最大簡約法方式建構系統發育樹（圖1、圖2）。由序列鄰接系統發育樹可見，2科11種蛇類分屬於2大支系，同1科的蛇種聚在一起，分別形成蝮蛇科及蝙蝠蛇科2大支系，同一大支系下，同種聚在一起形成同一分支，且分支的支持度相當高，除羽鳥氏帶紋赤蛇(*S. hatori*)為92%與梭德氏帶紋赤蛇(*S. sauteri*)為93%外，其

餘皆可達100%，同種個體的聚集趨勢十分顯著，即同一物種下的任一個體可以基於658個鹼基的公共重合區段序列與其他物種的個體很明顯的區分；最大簡約法系統發育樹亦呈現類似的結果。將兩個系統發育樹比對，未發現種內個體的聚類結果存在衝突，說明系統發育樹可靠。

赤尾青竹絲(*T. stejnegeri*)具有較大的種內遺傳距離，可能與赤尾青竹絲(*T. stejnegeri*)自歐亞大陸擴散分布至臺灣島的過程有關；Creer *et al.* (2001)分析臺灣的赤尾青竹絲(*T. stejnegeri*)粒線體細胞色素b (cytochrome b) 基因，將臺灣島上的族群分為2群，分別為北部群及其他群（兩者在東海岸有分布重疊現象），並進行地理類緣關係的研究，認為臺灣自上新世由歐亞大陸分離出來之後，島上的赤尾青竹絲(*T. stejnegeri*)至少經過一次自歐亞大陸拓殖至臺灣島的事件；檢視本研究赤尾青竹絲(*T. stejnegeri*)的6個樣本，亦可發現類似分群的情形，其中2個採自北部的樣本，與其他4個來自中部、南部及東部的樣本，其COI定序的結果亦呈現較大的差異，在系統發育樹呈現2個群聚分支。

Avise (2000) 及Hebert *et al.* (2003b) 提出COI序列的歧異度在同屬不同種間通常大於2%，在種內低於1%，此一物種鑑定的標準即為所謂的鑑種條碼間隔 (barcoding gap)，不過此標準並非絕對，例如Tavares and Baker (2008) 在對60對非常相近的同屬鳥類研究發現，有28.6%的姊妹種對 (sister-species pairs) 種間差異低於2.7%的閾值；在本研究中羽鳥氏帶紋赤蛇 (*S. hatori*) 與梭德氏帶紋赤蛇 (*S. sauteri*) 在種內的遺傳距離分別只有0.28%及0.23%，但種間的遺傳距離差異僅1.45%，然而，根據序列鄰接法及最大簡約法方式所建構系統發育樹，仍能有效的將其區分。因此，在不同的生物類群中，識別分類未知物種或近緣物種的規則或標準閾值，仍有待進一步探究。

表 1a. 本研究採用樣本之蛇種、採集地及 GenBank 登錄編號

Table 1a. Sampling information and GenBank accession number of DNA sequences.

Specimen No.	Species	Locality	GenBank Accession No.
RN0035	<i>Sinomicrurus hatori</i>	Yilan	KP749803
RN0697		Taichung	KP749809
RN0743		Taichung	KP749811
RN1013		Taoyuan	KP749816
RN1270		Nantou	KP749822
RN1455		Yilan	KP772310
RN1552		Taoyuan	KR091860
RN0285	<i>Sinomicrurus sauteri</i>	Taichung	KP749804
RN0726		Kaohsiung	KP749810
RN0745		Kaohsiung	KP749812
RN1581		Taitung	KP749827
RN0296	<i>Bungarus multicinctus</i>	Kaohsiung	KP749805
RN0304		Taitung	KP749806
RN0869		Nantou	KP749814
RN0893		Nantou	KP749815
RN1073		Nantou	KP749818
RN1198		Nantou	KP749820
RN1231		Chiayi	KP749821
RN0611	<i>Sinomicrurus macclellandi</i>	Hsinchu	KP749807
RN0658		Taipei	KP749808
RN0749		Taipei	KP749813
RN1024		Taoyuan	KP749817
RN1167	<i>Naja atra</i>	Tainan	KP749819
RN1293		Taitung	KP749823
RN1294		Taitung	KP749824
RN1298		Taitung	KP749825
RN1570		Changhua	KP749826
00398	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Kaohsiung	KP772288
00400		Taitung	KP772289
00443		Kaohsiung	KP772290
RN1485		Taichung	KP772311

表 1b. 本研究採用樣本之蛇種、採集地及 GenBank 登錄編號

Table 1b. Sampling information and GenBank accession number of DNA sequences.

Specimen No.	Species	Locality	GenBank Accession No.
RN0293	<i>Probothrops</i>	Hsinchu	KP772291
RN0295	<i>mucrosquamatus</i>	Nantou	KP772292
RN0854		Taitung	KP772301
RN0871		Nantou	KP772302
RN0888		Taipei	KP772304
RN0302	<i>Daboia siamensis</i>	Hualien	KP772293
RN0303		Taitung	KP772294
RN1179		Taitung	KP772307
RN0413	<i>Trimeresurus gracilis</i>	Hualien	KP772295
RN0440		Nantou	KP772296
RN0471		Taichung	KP772297
RN0644		Yilan	KP772298
RN1612		Hualien	KR091862
RN0664	<i>Ovophis monticola</i>	Taoyuan	KP772299
RN1347		Nantou	KP772308
RN1371		Nantou	KP772309
RN0723	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	Tainan	KP772300
RN0882		Taitung	KP772303
RN0944		Hualien	KP772305
RN0959		Nantou	KP772306
RN1553		Taoyuan	KR091861
RN1758		Nantou	KR091863
RN0933	<i>Cyclophiops major</i>	Taichung	KT932596

表 2. 11 種臺灣產蝮蛇科及蝙蝠蛇科種內之 COI 基因序列的遺傳距離

Table 2. Intra-species genetic distance of COI gene fragments in 11 Viperidae and Elapidae species.

Species	Distance
<i>Sinomicrurus sauteri</i> (n=4)	0.0023
<i>Sinomicrurus hatori</i> (n=7)	0.0028
<i>Bungarus multicinctus</i> (n=7)	0.0004
<i>Sinomicrurus maccllellandi</i> (n=4)	0.0025
<i>Naja atra</i> (n=5)	0.0018
<i>Trimeresurus stejnegeri</i> (n=6)	0.0240
<i>Deinagkistrodon acutus</i> (n=4)	0.0018
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i> (n=5)	0.0086
<i>Daboia siamensis</i> (n=3)	0.0020
<i>Trimeresurus gracilis</i> (n=5)	0.0064
<i>Ovophis monticola</i> (n=3)	0.0144

註：n 為樣本數。

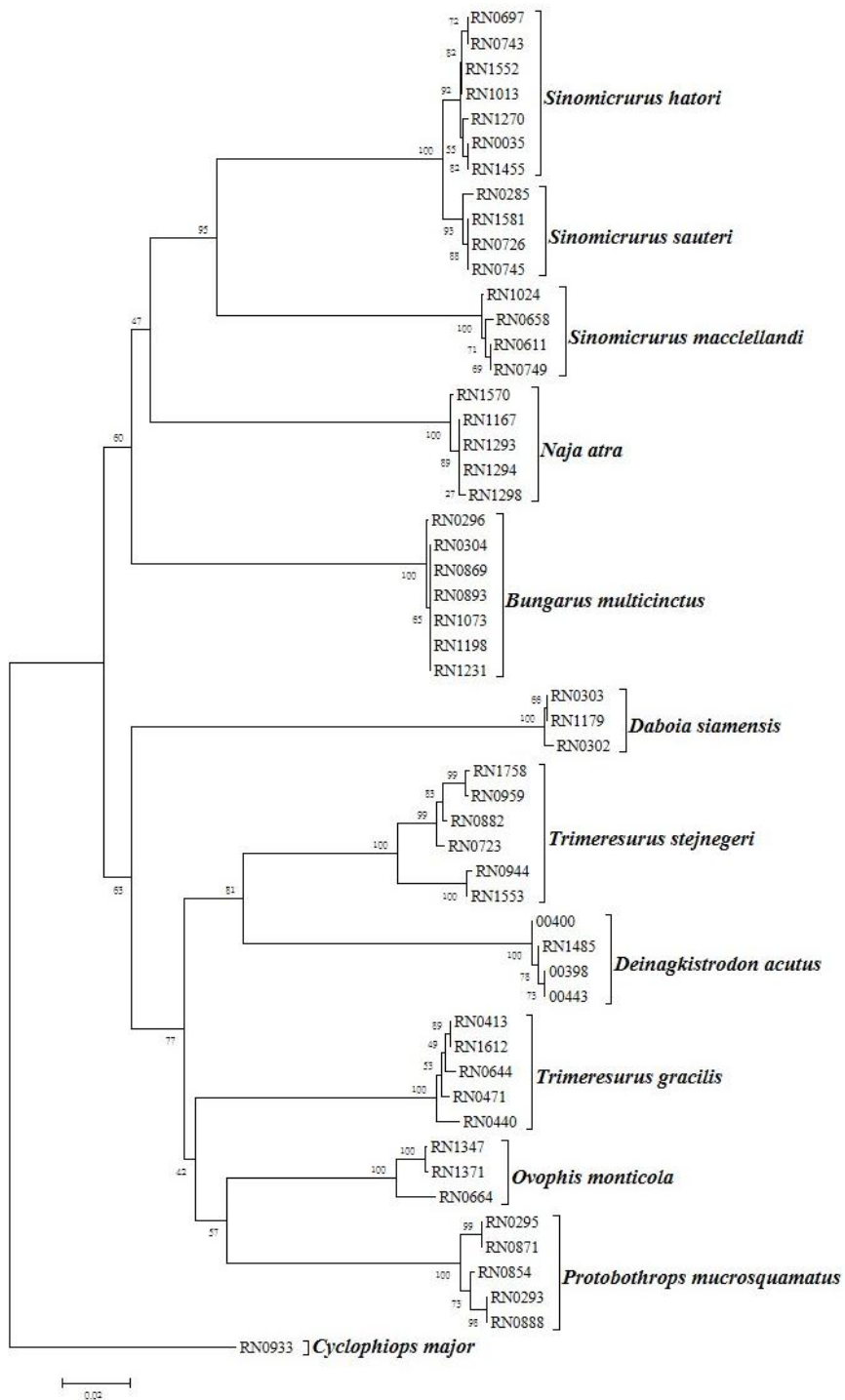


圖 1. 臺灣產蝮蛇科及蝰蛇科 COI 基因序列建構的序列鄰接 (NJ) 系統發育樹

Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree based on COI gene sequences of 11 snake species.

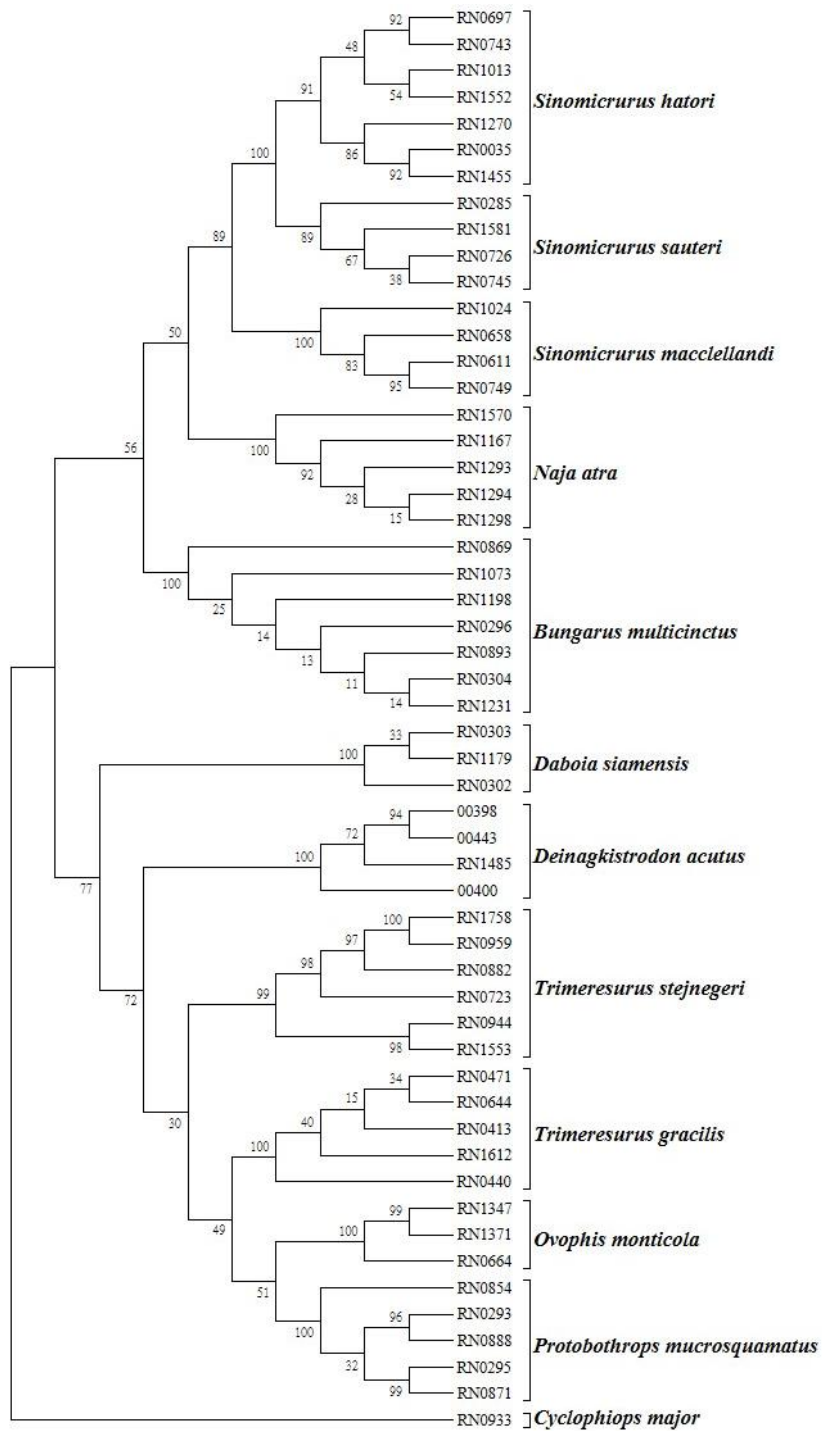


圖 2. 臺灣產蝮蛇科及蝙蝠蛇科 COI 基因序列建構的最大簡約 (MP) 系統發育樹

Fig. 2. Maximum-parsimony phylogenetic tree based on COI gene sequences of 11 snake species.

結 論

2個物種間核苷酸序列的差異性，是檢驗DNA分子條碼有效與否的首要條件 (Hebert *et al.*, 2004a, Hebert *et al.*, 2004b)，本研究利用部分COI基因的658個鹼基序列進行比較分析，可明確區分臺灣產的蝮蛇科及蝙蝠蛇科等11種蛇種53個樣本，系統發育樹呈現的分支聚集結果與形態鑑定的分類結果相符，因此，本研究所採用的部分COI基因片段，應可作為DNA分子條碼實際應用於臺灣地區蝮蛇科及蝙蝠蛇科蛇種的辨識。

誌 謝

本研究相關經費由行政院農業委員會特有生物研究保育中心提供 (計畫編號：103農科-13.9.3-生-W7)。另感謝蔡奇立博士、陳昱凱先生、陳志耘小姐、林彥博先生、陳頤靜小姐、莊育達先生、湯秋松先生及路殺社成員在樣本蒐集、實驗過程及資料上傳的協助，謹致謝忱。

引用文獻

- 向高世、李鵬翔、楊懿如。2009。臺灣兩棲爬行類圖鑑。貓頭鷹出版社。
- Avice, J. C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Barrett, R.D.H. and P.D.N. Hebert. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. Canadian Journal of Zoology 83: 481-491.
- Creer, S., A. Malhotra, R. S. Thorpe and W. H. CHOU. 2001. Multiple causation of phylogeographical pattern as revealed by nested clade analysis of the bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*) within Taiwan. Molecular Ecology 10: 1967-1981.
- Dubey, B., P. R. Meganathan and I. Haque. 2011. DNA mini-barcoding: An approach for forensic identification of some endangered Indian snake species. Forensic Science International: Genetics 5: 181-184.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. deWaard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B 270: 313-321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham and J. R. deWaard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B 270: S96-S99. doi 10.1098/rsbl.2003.0025.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen and W. Hallwachs. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 14812-14817.
- Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak and C. M. Francis. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology

- 2(10): e312. doi:10.1371/journal.pbio.0020312.
- Hajibabaei, M., D. H. Janzen, J. M. Burns, W. Hallwachs and P. D. N. Hebert. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 968-971.
- Ivanova, N. V., J. R. deWaard and P. D. N. Hebert. 2006. An inexpensive automatization-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998-1002.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Nagy, Z. T., G. Sonet, F. Glaw and M. Vences. 2012. First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. *PLoS ONE* 7(3): e34506. doi:10.1371/journal.pone.0034506.
- Robins, J. H., M. Hingston, E. Matisoo-Smith and H. A. Ross. 2007. Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* 7: 717-729.
- Smith, M. A., N. E. Woodley, D. H. Janzen, W. Hallwachs and P. D. N. Hebert. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3657-3662.
- Smith, M. A., N. A. Jr. Poyarkov and P. D. N. Hebert. 2008. COI DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources* 8: 235-246. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01964.x.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- Tavares, E. S. and A. J. Baker. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolutionary Biology* 8:81. doi:10.1186/1471-2148-8-81.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last and P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1847-1857.