

中華民國第四十六屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

第三名

040706

粗首蠟遺傳多樣性與形態變異之研究

學校名稱：基隆市私立聖心高級中學

作者： 高二 粘閔智 高二 邱瓏臻	指導老師： 王晨帆
-------------------------	--------------

關鍵詞：粗首蠟、遺傳多樣性、形態變異

壹、摘要

本研究以粒線體細胞色素乙基因作為分子遺傳標誌，試圖瞭解臺灣西部地區粗首鱸 (*Opsariichthys pachycephalus*) 種內之遺傳多樣性。98 條完整的序列樣本可歸納出 27 個單型，其中有 25 個是新紀錄單型。以鄰聚法重建粗首鱸種內之親緣關係樹，支持將 27 個單型區分成兩群演化系群，分別是粗首鱸 A 系群和粗首鱸 B 系群。A、B 系群間的平均遺傳距離為 4.89%。

10 處粗首鱸族群內的平均單型歧異度 (mean $h = 0.417 \pm 0.114$) 和平均核苷酸歧異度 (mean $\pi = 0.00126 \pm 0.00042$) 都偏低，表示粗首鱸族群內的遺傳變異甚小。反觀粗首鱸族群間的平均核苷酸歧異度 (mean $D_{xy} = 0.0245$) 和平均遺傳分化指數 (mean $F_{st} = 0.764$) 甚高，說明粗首鱸族群間存在高度的遺傳分化且族群間基因交流受到限制。分子變方分析結果指出粗首鱸的族群遺傳結構應分成屏東地區與非屏東地區，兩地區間的遺傳變異約佔整體遺傳變異的 89.5%，且所有族群間幾乎沒有基因交流 ($\Phi_{ST} = 0.98, p < 0.001$)。

根據粗首鱸 A、B 系群在外部形態與內部骨骼形狀之差異，可將粗首鱸種內形態變異區分為 A 型 (即 A 系群) 和 B 型 (即 B 系群)。B 型僅分布於屏東地區之溪流，而 A 型則廣泛分布於非屏東地區之溪流。A 型眼睛瞳孔上方有一紅色區塊，B 型則為黃色區塊。A 型側線鱗片數 (A 系群絕大多數個體 ≥ 50) 較 B 型多 (B 系群絕大多數個體 < 50)。

貳、研究動機

高一基礎生物 (全) 冊介紹過遺傳多樣性 (genetic diversity) 的概念，若某物種內的遺傳多樣性愈高，則該物種適應環境變動的能力愈佳，但要如何研究物種內的遺傳多樣性呢？高三生物 (下) 冊在演化章節提及親緣關係 (Phylogeny) 愈近之物種，在特定基因的 DNA 序列差異愈小。經由老師的補充說明，我們瞭解族群遺傳學家也會選用合適的 DNA 片段作為分子遺傳標誌 (molecular genetic marker) 來研究物種內的遺傳多樣性，透過族群遺傳學理論分析某物種在不同族群內、族群間所有個體其特定遺傳標誌之 DNA 鹼基變異，有助於我們瞭解該物種是否存在不同的演化系群 (evolutionary lineage)、族群間基因交流 (gene flow) 是否順暢及可能的族群遺傳結構 (population genetic structure)。

初級淡水魚類 (primary freshwater fishes) 是指生活史完全侷限在淡水水域內之魚種。初級淡水魚種的擴散能力受到很強的地理限制，其物種內遺傳多樣性常會高於擴散不受限制的海水魚物種，故初級淡水魚類可視為研究族群遺傳學的理想材料。Perdices *et al.* (2004, 2005) 以粒線體細胞色素乙基因 (mitochondrial cytochrome *b* gene; 本文往後簡稱 mtDNA cyto *b*。) 作為遺傳標誌探討中國大陸地區 *Zacco platypus* 及 *Opsariichthys bidens* 兩種鯉科魚類種內之遺傳多樣性，發現 *Z. platypus* 可區分出四型 mtDNA cyto *b* 演化系群，而 *O. bidens* 則有五型，但是文獻中並未探討不同 mtDNA cyto *b* 系群在外部形態或內部骨骼形狀是否也存在明顯的分化。

粗首鱨 (*Opsariichthys pachycephalus*) 為臺灣特有之初級淡水魚。分類上屬於鯉科 (Cyprinidae)；馬口魚屬 (*Opsariichthys*)，分布於臺灣西部各河川中上游及其支流，幼魚食性為雜食性，成魚偏肉食性 (曾，1986；陳 等，1999)。Wang *et al.* (2006) 以完整的 mtDNA cyto *b* 基因；全長1140 鹼基對 (bp) 分析東亞地區馬口魚屬魚類之親緣關係，發現馬口魚屬魚類種間 cyto *b* 基因的遺傳距離約為 9% - 20%，而在臺灣南北兩處粗首鱨族群種內遺傳距離為 4.5%，證明粗首鱨種內具有相當程度的遺傳分化。根據上述研究報告，粗首鱨種內至少存在兩型 mtDNA cyto *b* 系群 (暫稱：A、B 系群。)，但由於該研究對粗首鱨的採集點和樣本數有限，因此我們想要增加採集點及樣本數研究粗首鱨種內的遺傳多樣性及不同系群間的外部形態與內部骨骼形狀是否也有分化。

參、研究目的

- 一、粗首鱨種內除了 A、B 系群外，是否還存在其他系群。
- 二、量化粗首鱨族群內與族群間之遺傳變異。
- 三、粗首鱨可能之族群遺傳結構。
- 四、粗首鱨不同系群間之外部形態是否有分化。
- 五、粗首鱨不同系群間之內部骨骼形狀是否有差異。

肆、實驗材料、藥品及器材

一、實驗物種

粗首鱨 (*Opsariichthys pachycephalus*)

二、製備粗首鱨 mtDNA cyto *b* 序列所需藥品及器材

藥品：Genomic DNA Purification Kit (Gentra System, USA)

PCR-M Clean up System Kit (Viogene, USA)

Proteinase K (20 mg/ml) 100% Isopropanol 70% Ethanol

90% Ethanol 10 X PCR reaction buffer 2.5 mM dNTP mixture

Taq polymerase 1.2% agarose gel 1 X TBE buffer

EtBr (Ethidium Bromide) ddH₂O

器材：微量吸放器 (Pipetman) 微量吸管 (Tip) 電磁加熱攪拌器

高速離心機 桌上型離心機 聚合酶鏈鎖反應器

恆溫箱 酒精燈 燒杯

解剖剪 解剖刀 鑷子

電腦 DNA 序列分析軟體

三、粗首鱨形態分析所需藥品及器材

藥品：50% Ethanol 70% Ethanol 15% Formalin

0.1M NaOH 0.01M NaOH 紅色茜素 (alizarin red)

甘油

器材：保麗龍板 直尺 燒杯

量筒 解剖剪 鑷子

針灸針 針、線 酒精燈

解剖顯微鏡 游標尺 數位相機

電腦 統計分析軟體

伍、研究步驟及方法

一、採集粗首鱨樣本 (註1)

以釣魚法自臺灣西部地區 14 處水域，共採集 98 隻粗首鱨個體 (圖一，表一)。

二、製備 mtDNA cyto *b* 基因序列之流程 (註1, 2)

(一) 萃取粗首鱨肌肉細胞之總量 DNA。

(二) 進行聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 放大 mtDNA cyto *b* 基因。

(三) 純化 PCR 產物後，以 ABI 373 自動定序儀進行雙向 cyto *b* 序列定序。

三、mtDNA cyto *b* 基因序列之整理、排序比對 (alignment) 及 序列分析

- (一) 以 DNASTAR 套裝軟體之 SeqMan II 程式將正向及反向各約 700 bp 的 DNA 序列組合 (assembling) 成一條完整的 cyto *b* 序列，並以人工檢查有無錯誤。
- (二) 以 Clustal X 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) 軟體進行 cyto *b* 序列比對 (alignment)。
- (三) 以 BioEdit vers. 5.0.9 軟體 (Hall, 1999) 進行 cyto *b* 序列編排。
- (四) 以 DNAsp vers. 4.0 軟體 (Rozas *et al.*, 2003) 分析 98 條完整 cyto *b* 序列可區分出幾個 cyto *b* 單型 (haplotype)。
- (五) 以 MEGA vers. 2.1 軟體 (Kumar *et al.*, 2001) 分析四種鹼基在 cyto *b* 單型所佔之比例，再採用 Kimura 二參數模式 (Kimura 2-parameter model; Kimura, 1980) 計算單型間的遺傳距離。
- (六) 繪製轉換 (Transition, Ts) 和顛換 (Transversion, Tv) 對未校正遺傳距離 (p-distance) 之散布圖，檢測 Ts 和 Tv 是否已達飽和狀態。

四、重建粗首鱸 mtDNA cyto *b* 基因之親緣關係樹

- (一) 以下載自 GenBank 由 Wang *et al.* (2006) 所發表的 AY958196 和 AY958188 兩條 *Zacco* sp. cyto *b* 序列作為重建粗首鱸親緣關係樹之外群 (outgroup)。
- (二) 以 MEGA vers. 2.1 軟體內建之鄰聚法 (neighbor-joining method) 並選用 Kimura 二參數模式為校正參數進行重建粗首鱸之親緣關係樹，再進行 10000 次重排 (bootstrap) 以檢驗親緣關係樹之可信度。

五、分析粗首鱸族群內、族群間之遺傳多樣性及其族群遺傳結構

- (一) 為瞭解粗首鱸系群內之遺傳變異是否為中性突變，我們以 DNAsp vers. 4.0 軟體進行 *Tajima's D* 檢測。若 *Tajima's D* 值統計上不顯著，表示遺傳變異屬於中性突變。
- (二) 為瞭解粗首鱸族群內之遺傳多樣性，我們以 DNAsp vers. 4.0 軟體計算粗首鱸族群內之單型歧異度 (haplotype diversity within population, *h*) 及核苷酸歧異度 (nucleotide diversity within population, π)。
- (三) 為瞭解粗首鱸族群間之遺傳多樣性，我們以 DNAsp vers. 4.0 軟體計算粗首鱸族群間之核苷酸歧異度 (nucleotide diversity among populations, *D_{xy}*) 及遺傳分化指數 (*F_{st}* index)。
- (四) 為瞭解粗首鱸可能之族群遺傳結構，我們以 Arlequin vers. 2.000 (Schneider *et al.*, 2000) 軟體進行分子變方分析 (Analysis of molecular variance, AMOVA) 檢測不同分群之遺傳變異程度，若分群間所佔遺傳變異百分比最高且 Φ_{CT} 值最大者即為最有可能之族群遺傳結構，其中 Φ_{CT} 值為分群間的遺傳分化指數， Φ_{SC} 值為分群內族群間的遺傳分化指數， Φ_{ST} 值為所有族群間的遺傳分化指數。我們欲以 AMOVA 檢測是否能將粗首鱸遺傳結構劃分成：(1) 北區、中區和南區或是 (2) 屏東區和非屏東區。

六、分析粗首鱸不同 mtDNA cyto *b* 系群外部形態測量形質及計數形質

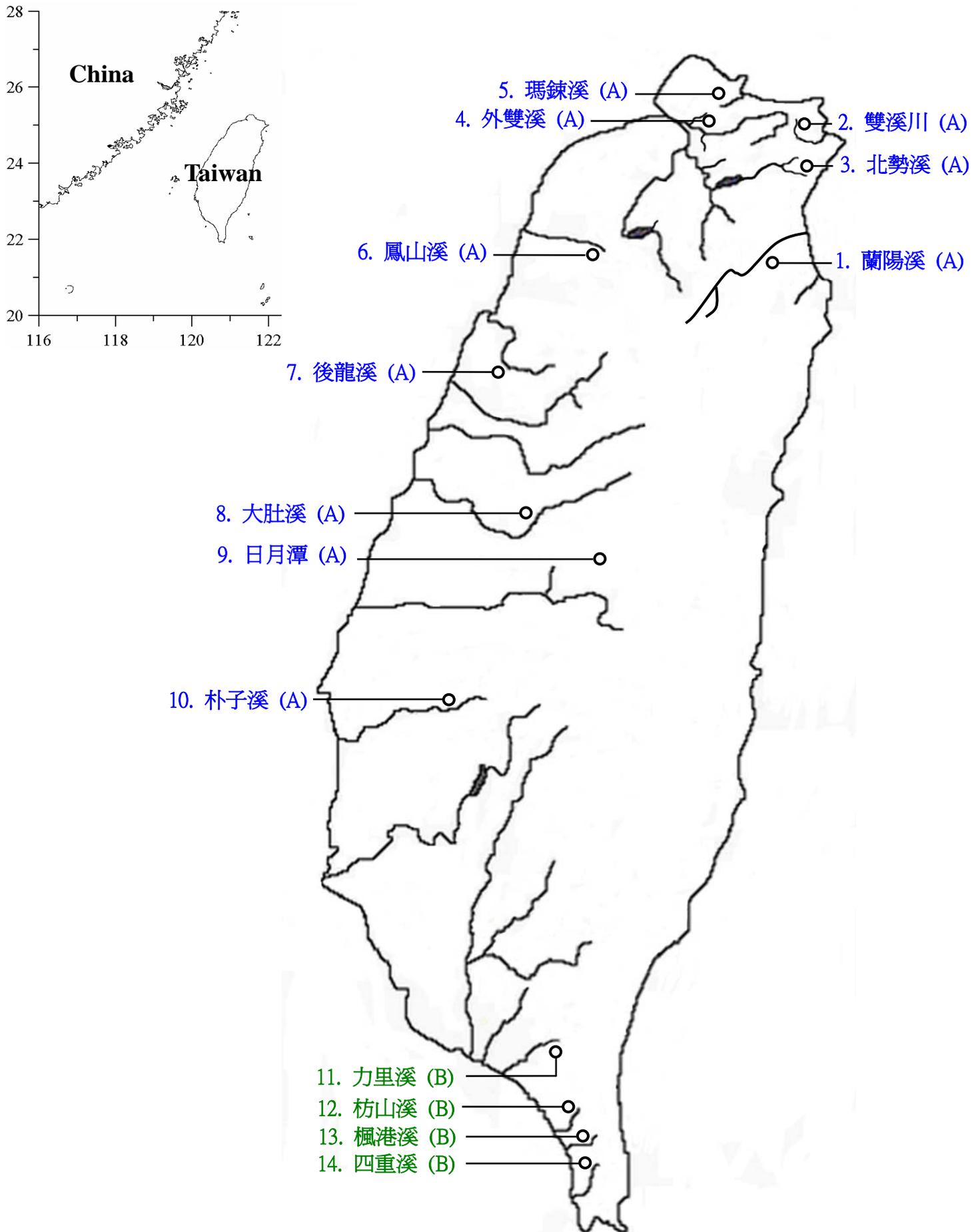
- (一) 本研究自粗首鱸外部形態選取 19 種測量形質 (metric characters) (內容詳見圖二)。自不同系群選取標準長大於 60 mm 之個體，拍攝一張平面圖輸入電腦後，再以 Image J 1.34s 軟體 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) 將照片上的比例尺 (10 mm) 轉換為像素並校正計算出照片上 17 種測量形質之長度。眼間距和頭寬是以游標尺測量之。
- (二) 分別把吻端長、眼徑、上顎骨長、眼間距及頭寬除以頭長進行標準化並乘以 100%。
- (三) 分別把體高、尾高、背鰭基部長、臀鰭基部長、胸鰭最長之鰭條長、背鰭最長之鰭條長、腹鰭最長之鰭條長、臀鰭最長之鰭條長、胸鰭前長、背鰭前長、腹鰭前長、臀鰭前長除以標準長進行標準化並乘上 100%。
- (四) 以變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 檢測粗首鱸不同系群 18 種測量形質 (標準長除外) 之平均值是否有顯著差異。我們以 Statistica vers. 6.0 軟體 (StatSoft, 2001) 進行變異數分析。
- (五) 本研究自粗首鱸外部形態選取 8 種計數形質 (meristic characters) (內容詳見圖三)，檢測粗首鱸不同系群 8 種計數形質是否有差異。

七、比較粗首鱸不同 mtDNA cyto *b* 系群之內部骨骼形狀差異

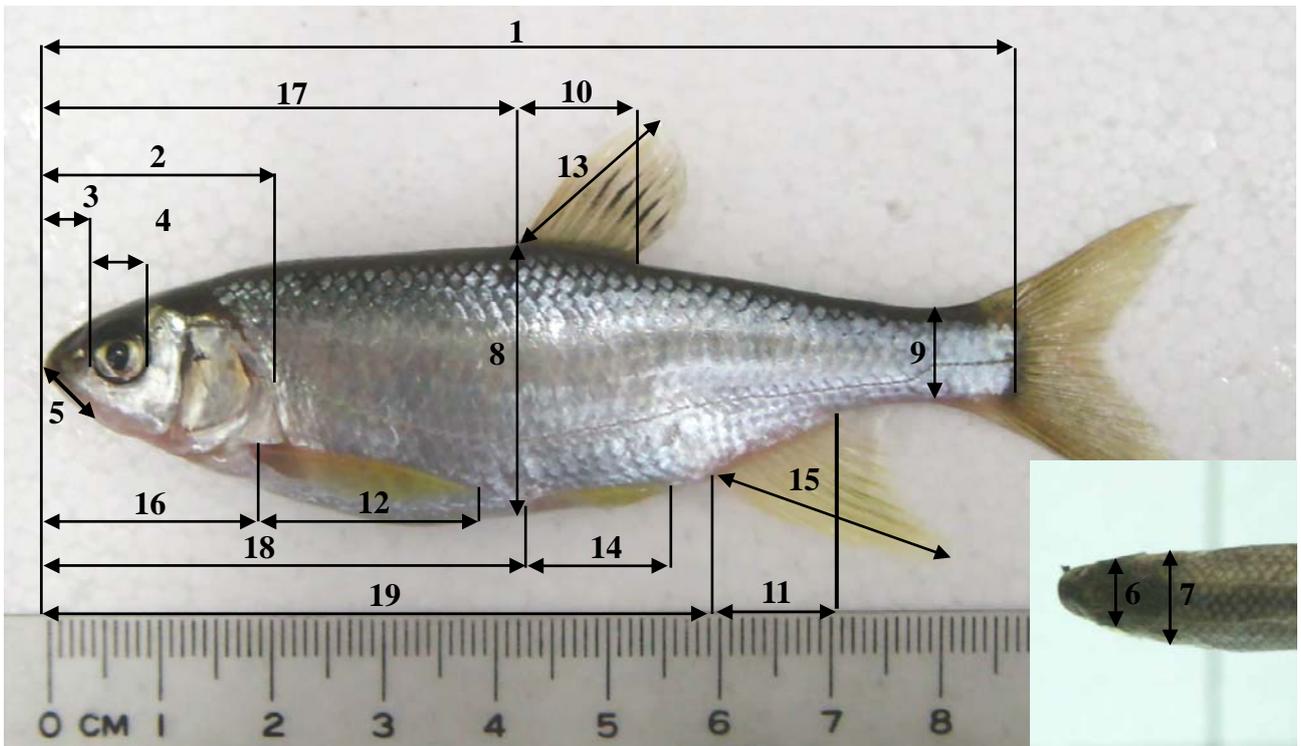
本研究選取粗首鱸前上顎骨 (premaxilla)、上顎骨 (maxilla) 及咽頭齒 (pharyngeal tooth) 分析不同系群的內部骨骼形狀差異。

註1、在分區科展前，本研究所使用的粗首鱸樣本和 cyto *b* DNA 序列均是由某研究員所提供，**後續實驗步驟三至步驟七皆由參展師生獨力完成。**

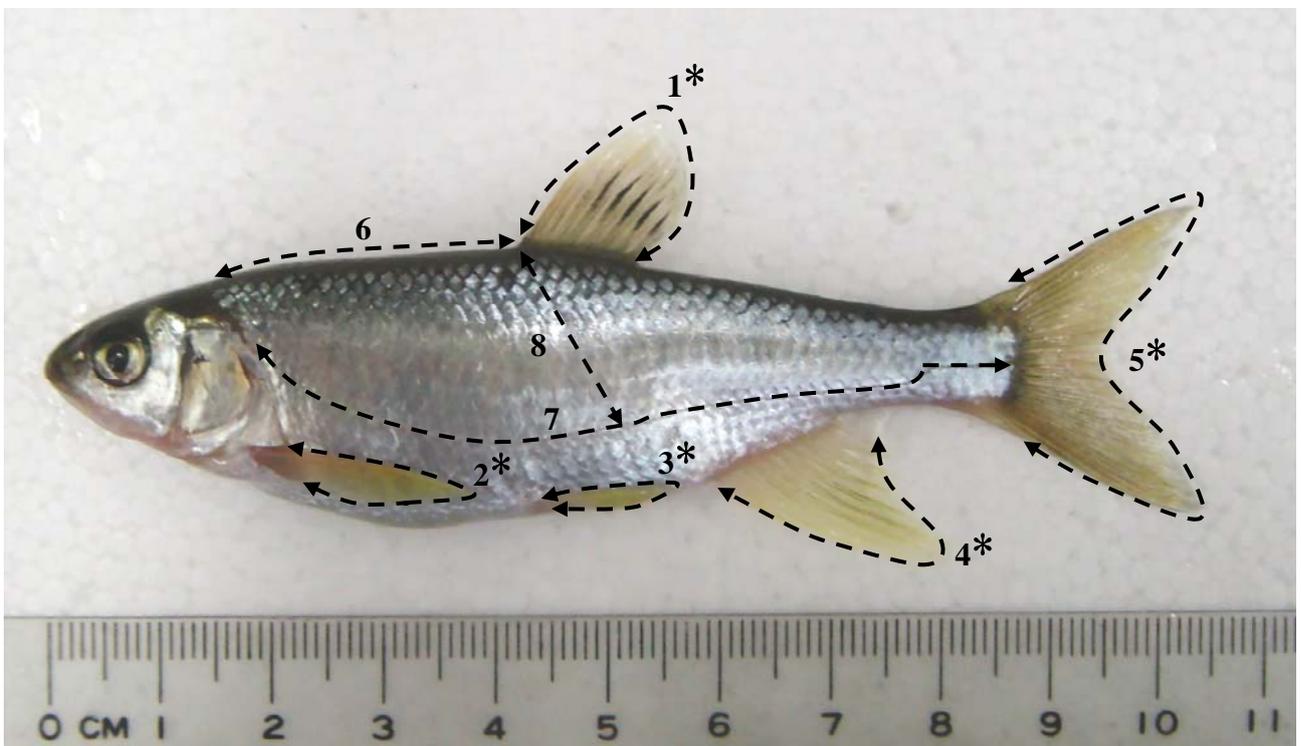
註2、分區科展結束後，評審教授們建議我們應該要做做看步驟二等實驗，因此指導老師安排我們去中研院生物多樣性中心某研究室親自操作萃取粗首鱸 DNA 樣本、進行 PCR 及 DNA 膠體電泳等實驗。PCR 引子及 PCR 反應條件 (Wang *et al.*, 2006) 和詳細實驗流程，請見作者現場呈述。



圖一、14 處粗首鱧族群分布圖，括弧內表示 mtDNA cyto *b* 系群種類。



圖二、本研究選用的 19 種測量形質 (metric characters)：(1) 標準長；(2) 頭長；(3) 吻端長；(4) 眼徑；(5) 上顎骨長；(6) 眼間距；(7) 頭寬；(8) 體高；(9) 尾高；(10) 背鰭基部長；(11) 臀鰭基部長；(12) 胸鰭最長之鰭條長；(13) 背鰭最長之鰭條長；(14) 腹鰭最長之鰭條長；(15) 臀鰭最長之鰭條長；(16) 胸鰭前長；(17) 背鰭前長；(18) 腹鰭前長；(19) 臀鰭前長。註：(6) 眼間距和 (7) 頭寬是以游標尺測量之。



圖三、本研究選用的 8 種計數形質 (meristic characters)：(1) 背鰭鰭條數；(2) 胸鰭鰭條數；(3) 腹鰭鰭條數；(4) 臀鰭鰭條數；(5) 尾鰭鰭條數；(6) 背鰭前鱗數；(7) 側線鱗數；(8) 側線上鱗數。註：* 表示鰭條數包括不分枝鰭數條與分枝鰭條數。

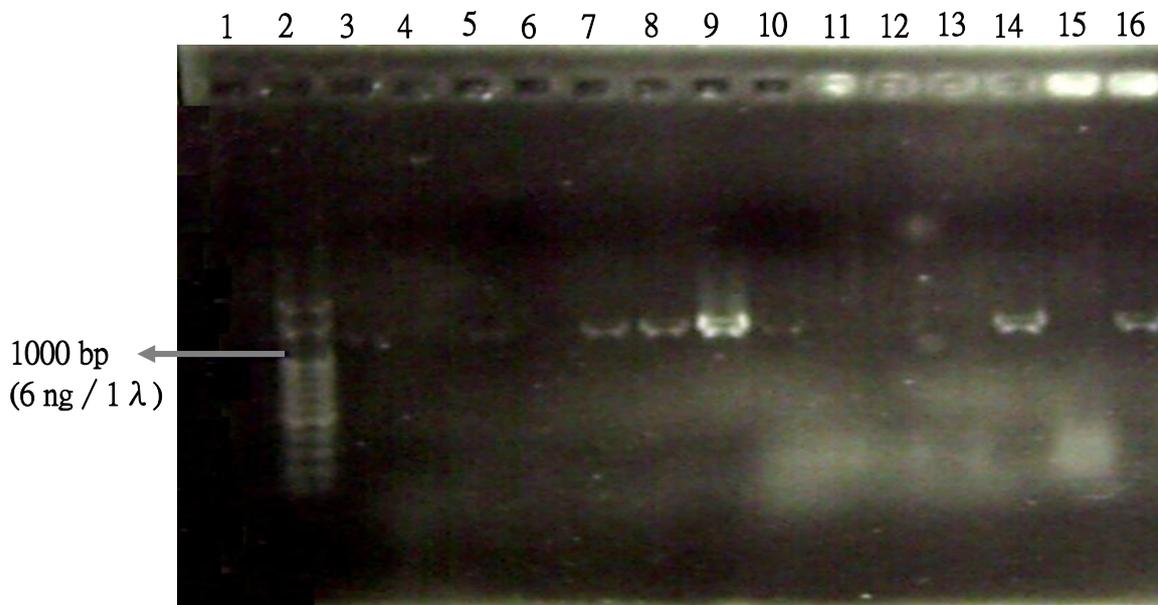
陸、研究結果

一、萃取粗首鱧 DNA、檢測 PCR 產物及定量 PCR 產物之結果



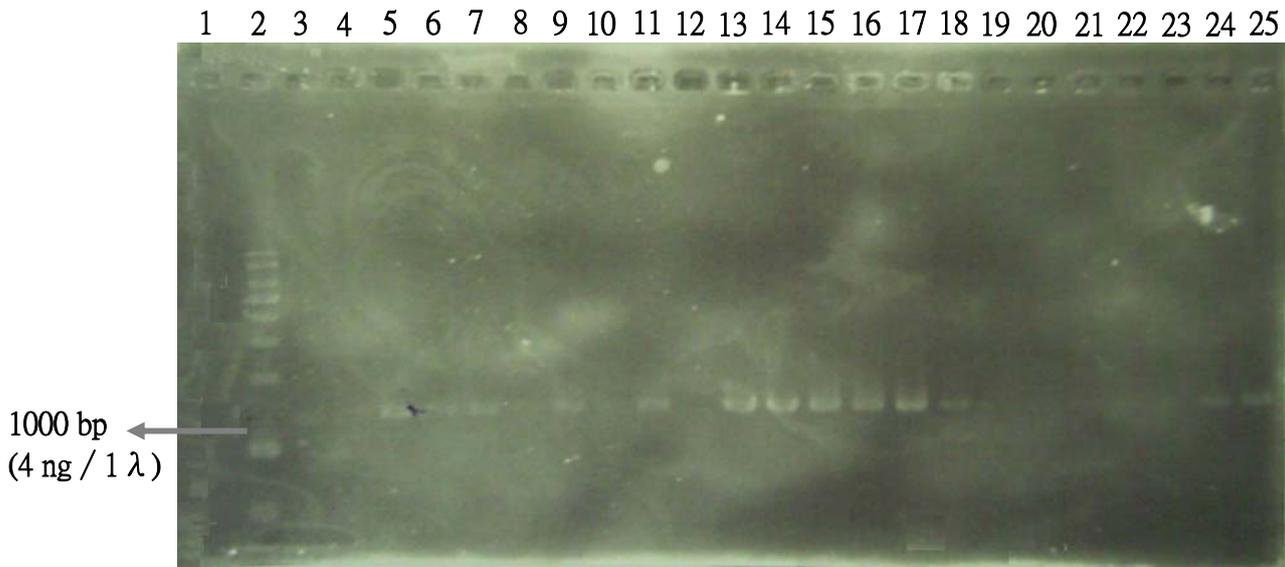
圖四、檢測基隆河下游支流外雙溪 (WS) 粗首鱧 DNA 樣本之電泳圖。

Lane 1: WS01 Lane 2: WS03 Lane 3: WS04 Lane 4: WS05
Lane 5: WS06 Lane 6: WS07 Lane 7: WS08 Lane 8: WS09
Lane 9: WS10



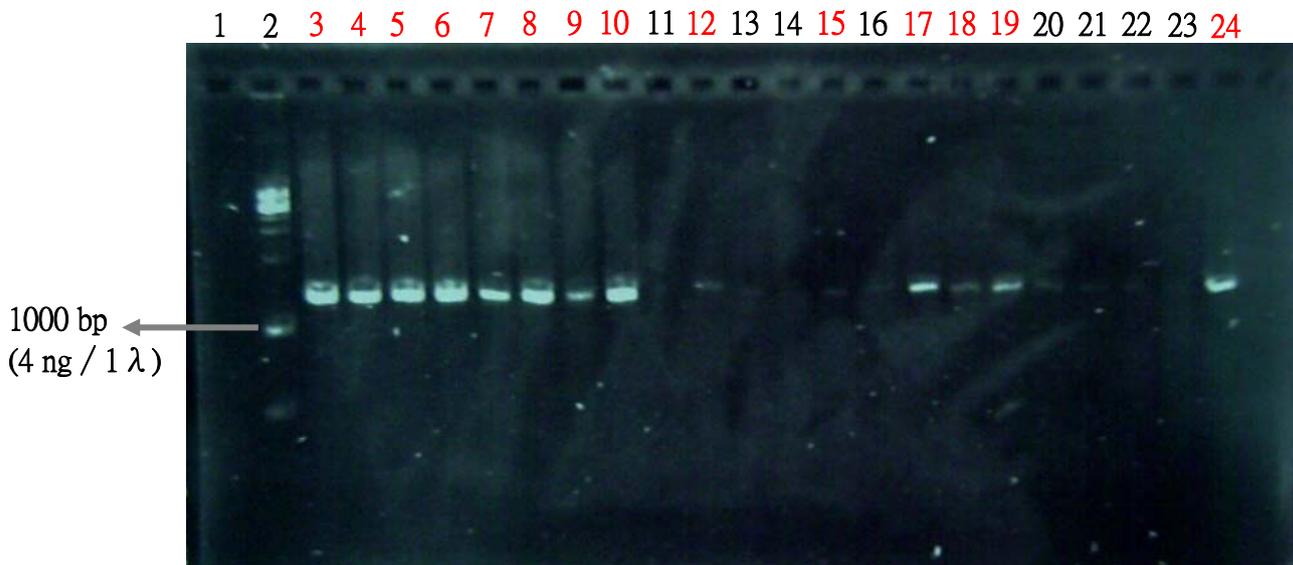
圖五、檢測大肚溪 (DD)、朴子溪 (PZ) 及鳳山溪 (FES) 粗首鱧 PCR 產物之電泳圖。

Lane 1: Control Lane 2: 100 bp marker Lane 3: DD06 Lane 4: DD07
Lane 5: DD08 Lane 6: DD15 Lane 7: DD17 Lane 8: DD21
Lane 9: PZ03 Lane 10: FES01 Lane 11: FES02 Lane 12: FES04
Lane 13: FES06 Lane 14: FES08 Lane 15: FES09 Lane 16: FES10



圖六 檢測基隆河 (WS) 鳳山溪 (FES) 大肚溪 (DD) 粗首鱧 PCR 產物之電泳圖。

Lane 1: Control	Lane 2: 1kb marker	Lane 3: WS01	Lane 4: WS03
Lane 5: WS04	Lane 6: WS05	Lane 7: WS06	Lane 8: WS07
Lane 9: WS08	Lane 10: WS09	Lane 11: WS10	Lane 12: WS11
Lane 13: FES01	Lane 14: FES02	Lane 15: FES04	Lane 16: FES06
Lane 17: FES09	Lane 18: DD03	Lane 19: DD04	Lane 20: DD06
Lane 21: DD07	Lane 22: DD08	Lane 23: DD15	Lane 24: DD19
Lane 25: DD20			



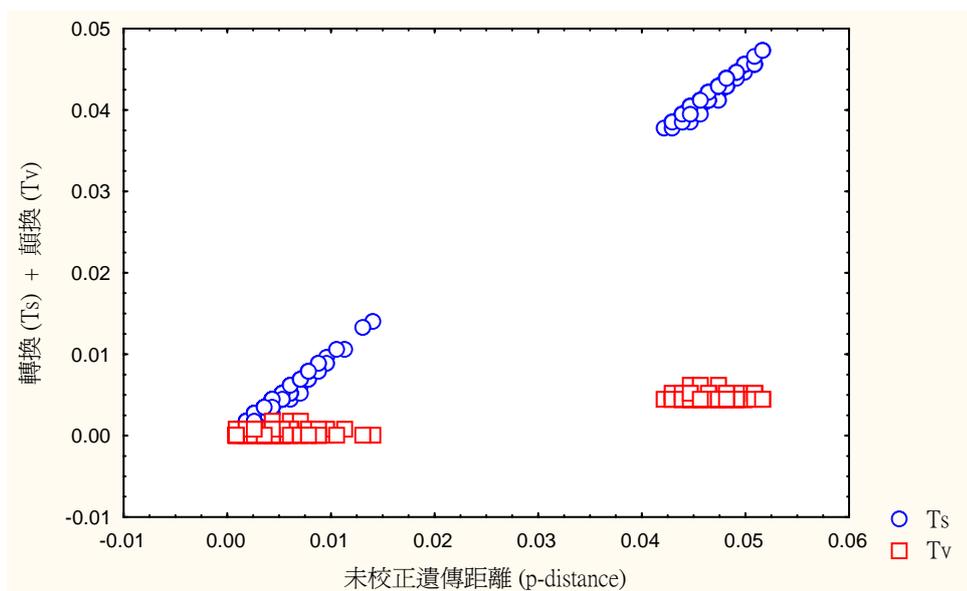
圖七、定量 FES、PZ、DD 及 WS 等地粗首鱧 PCR 產物之電泳圖。

Lane 1: Control	Lane 2: 1kb marker	Lane 3: FES01	Lane 4: FES02
Lane 5: FES04	Lane 6: FES06	Lane 7: FES08	Lane 8: FES09
Lane 9: FES10	Lane 10: PZ03	Lane 11: DD03	Lane 12: DD06
Lane 13: DD08	Lane 14: DD15	Lane 15: DD17	Lane 16: DD19
Lane 17: DD20	Lane 18: DD21	Lane 19: WS04	Lane 20: WS05
Lane 21: WS06	Lane 22: WS07	Lane 23: WS09	Lane 24: WS10

(紅色 Lane number 表示該粗首鱧樣本定序結果良好，得到完整的 cyto *b* 序列。)

二、mtDNA cyto *b* 基因序列分析之結果

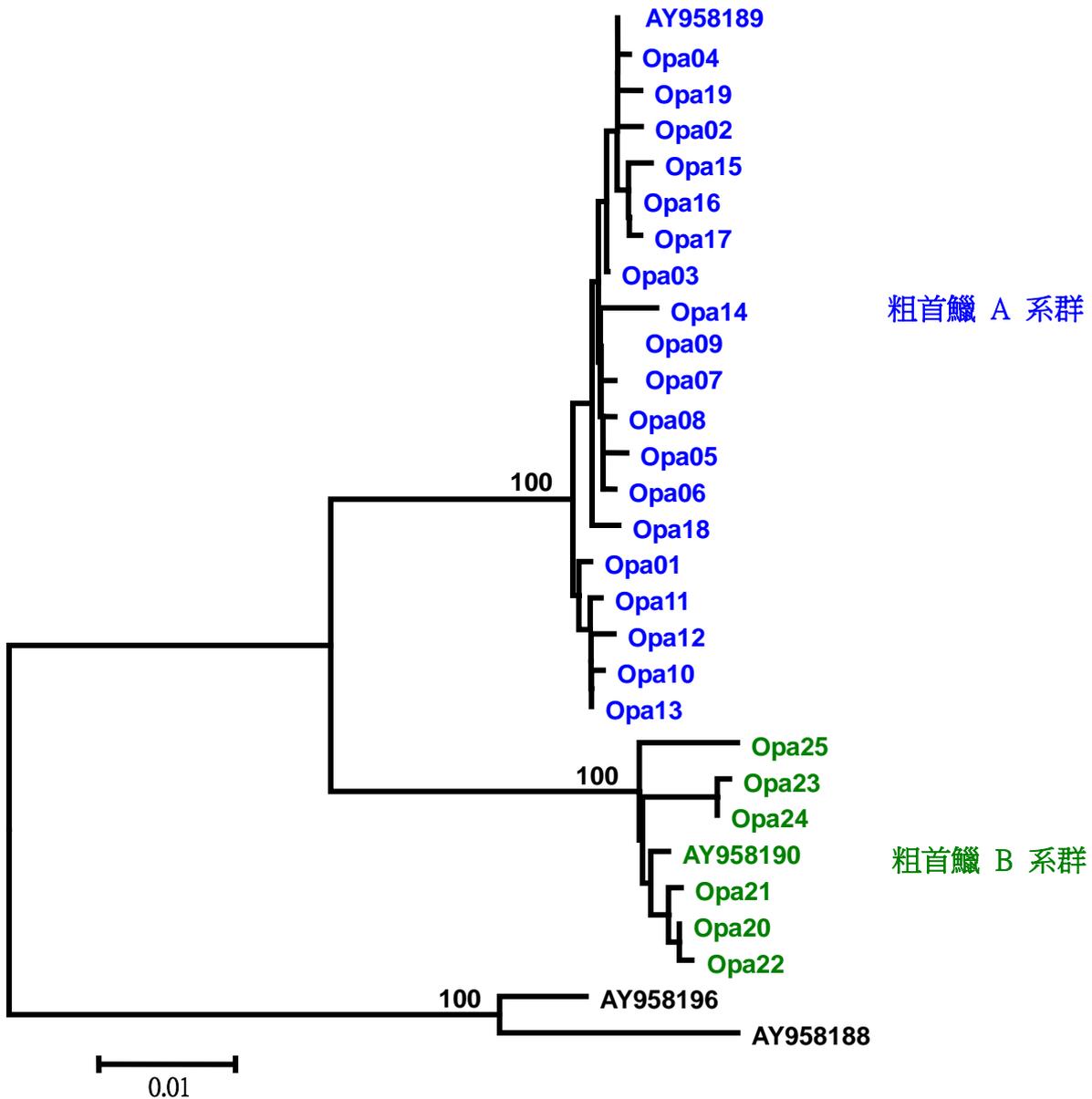
- (一) 總計整理出 98 條完整的粗首鱧 cyto *b* 序列 (全長 1140 bp)，其中 14 條序列來自我們的實驗成果 (圖七)。全部序列間的鹼基變異屬於中性突變 ($Tajima's D = 1.942^{ns}$) (表一)。所有序列可歸納出 27 個單型，其中 25 個是新紀錄單型 (Opa 01- Opa 25)，另外 2 個單型跟 Wang *et al.* (2006) 所發表的粗首鱧 cyto *b* 序列一樣，分別為 AY958189 和 AY958190。
- (二) 27 個單型 T、C、A 和 G 四種鹼基的比例分別為：30.5%、28.3%、24.8% 和 16.5%，G 所佔的比例偏低是魚類 mtDNA cyto *b* 序列的特徵。
- (三) 27 個單型在 1140 鹼基位址中可發現 86 個變異位址 (variable sites)，其中包含 61 個簡約訊息位址 (parsimony-informative sites) 和 25 個單獨變異位址 (singleton sites)。約有 91.8% 簡約訊息位址集中在密碼子的第三個位置 (56/61)，這是因為密碼子第三個位置其鹼基之突變多屬於同義性突變 (synonymous mutation)。
- (四) 27 個單型間的遺傳距離介於 0.09% - 5.44%；平均遺傳距離為 2.23%。由圖八可知單型間絕大部分的鹼基變異屬於轉換 (Ts)，且轉換 (Ts) 未達飽和狀態而顛換 (Tv) 已達飽和狀態。



圖八、轉換 (Ts) 和 顛換 (Tv) 對未校正遺傳距離 (p-distance) 之散布圖。藍色點為 Ts，紅色點為 Tv。

二、粗首鱧 mtDNA cyto *b* 基因之親緣關係樹

- (一) 以鄰聚法重建粗首鱧 mtDNA cyto *b* 基因之親緣關係樹支持將 27 個單型區分成兩群不同的演化系群，分別是粗首鱧 A 系群和粗首鱧 B 系群。其中主要分支點的 bootstrap 值均為 100，表示我們建構之親緣關係樹具有很高之可信度 (圖九)。粗首鱧 A、B 系群間之平均遺傳距離為 4.89%。
- (二) 粗首鱧 A、B 系群內的遺傳變異為中性突變，A 系群包括 20 個單型，而 B 系群只有 7 個單型，可是 B 系群內確有較高的核苷酸歧異度 ($\pi = 0.00696 \pm 0.00048$) 這是因為 B 系群內雖然單型數較 A 系群少，但各單型間的鹼基變異度較 A 系群大 (表一)。
- (三) 粗首鱧 B 系群侷限分布於屏東地區，而 A 系群則廣泛分布於非屏東地區。



圖九、以鄰聚法重建粗首鱧之 mtDNA cyto *b* 親緣關係樹。主要分支點上方數字為 bootstrap 值，AY958196 和 AY958188 為外群。

三、粗首鱧族群內之遺傳多樣性

- (一) 雙溪川 (SS)、外雙溪 (WS)、日月潭 (SM) 和力里溪 (LL) 4 處粗首鱧族群內序列數偏低，均低於 4 條，故不列入分析 (表一)。
- (二) 剩餘 10 處族群，有 7 處族群內序列間之鹼基變異屬於中性突變 (表一)。
- (三) 剩餘 10 處族群，則以大肚溪 (DD) 族群內的遺傳多樣性最高 ($h = 0.900 \pm 0.161$, $\pi = 0.00491 \pm 0.00110$) (表一)。
- (四) 10 處粗首鱧族群內之平均基因歧異度 (h) 和平均核苷酸歧異度 (π) 分別為 0.417 ± 0.114 及 0.00126 ± 0.00042 ，表示粗首鱧族群內的遺傳變異度偏低。
- (五) 個別族群以 LY、MS、HL 和 DD 有較高的 h 值；平均為 0.747 ± 0.145 ，但 π 值仍偏低；平均為 0.00204 ± 0.00050 ，說明這些族群雖然族群內有較多的單型，但各單型間鹼基的變異程度卻不高 (表一)。
- (六) 未發現任何族群內同時存在粗首鱧 A 系群和粗首鱧 B 系群 (圖一和表一)。

表一、14 處粗首鱸族群之採集地點、cyto *b* 序列樣本數 (*N1*)、測量形質樣本數 (*N2*)、計數形質樣本數 (*N3*)、單型數 (*Nh*)、特有單型數 (*Nuh*)、cyto *b* 系群 (*Lineage*)、單型歧異度 (*h*) 及核苷酸歧異度 (π) 及 *Tajima's D* 值。SD 表示標準差；# 表示無法計算；ns 表示無顯著差異 ($p > 0.05$)。

採集地點	族群代碼	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>Nh</i>	<i>Nuh</i>	<i>Lineage</i>	<i>h</i> ± SD	π ± SD	<i>Tajima's D</i>
1. 蘭陽溪 (Lanyang R.)	(LY)	15	13	13	6	4	A	0.714 ± 0.116	0.00157 ± 0.00038	- 0.606 ^{ns}
2. 雙溪川 (Shuangshi R.)	(SS)	1	0	0	1	1	A	#	#	#
3. 北勢溪 (Baishi R.)	(BS)	8	7	7	1	0	A	0	0	#
4. 外雙溪 (Waishuangshi R.)	(WS)	2	0	0	2	0	A	1.000 ± 0.500	0.00088 ± 0.00044	#
5. 瑪鍊溪 (Masu R.)	(MS)	10	6	6	4	2	A	0.733 ± 0.120	0.00080 ± 0.00019	- 0.507 ^{ns}
6. 鳳山溪 (Fengshan R.)	(FES)	10	3	3	1	0	A	0	0	#
7. 後龍溪 (Houlong R.)	(HL)	8	7	7	4	4	A	0.643 ± 0.184	0.00088 ± 0.00034	- 1.535 ^{ns}
8. 大肚溪 (Dadu R.)	(DD)	5	1	1	4	3	A	0.900 ± 0.161	0.00491 ± 0.00110	1.193 ^{ns}
9. 日月潭 (Sunmoon L.)	(SM)	1	1	1	1	0	A	#	#	#
10. 朴子溪 (Puzi R.)	(PZ)	4	0	0	2	2	A	0.500 ± 0.265	0.00307 ± 0.00163	- 0.817 ^{ns}
cyto <i>b</i> A 系群		64	38	38	20			0.854 ± 0.030	0.00283 ± 0.00029	- 1.518^{ns}
11. 力里溪 (Lili R.)	(LL)	1	1	1	1	0	B	#	#	#
12. 枋山溪 (Fangshan R.)	(FAS)	14	10	8	4	3	B	0.495 ± 0.151	0.00123 ± 0.00045	- 0.934 ^{ns}
13. 楓港溪 (Fenggang R.)	(FG)	11	10	11	2	2	B	0.182 ± 0.144	0.00016 ± 0.00013	- 1.128 ^{ns}
14. 四重溪 (Sichong R.)	(SH)	8	8	8	1	1	B	0	0	#
cyto <i>b</i> B 系群		34	29	28	7			0.786 ± 0.035	0.00696 ± 0.00048	1.625^{ns}
所有族群		98	67	66	23			0.913 ± 0.014	0.02358 ± 0.00148	1.942^{ns}

四、粗首鱧族群間之遺傳多樣性及其族群遺傳結構

- (一) SS、WS、SM 和 LL 4 處粗首鱧族群內 cyto *b* 序列數低於 4 條，故不列入計算族群間之 D_{xy} 和 F_{st} 值。
- (二) 10 處粗首鱧族群間的平均遺傳分化指數 (F_{st} index) 為 0.764，說明粗首鱧族群間基因交流受到很大的限制。 F_{st} 值範圍介於 0 和 1 之間，0 表示族群間基因交流完全不受限制，1 表示族群間完全沒有基因交流 (表二)。
- (三) 10 處粗首鱧族群間之平均核苷酸歧異度 (D_{xy}) 為 0.0245 約為族群內之平均核苷酸歧異度 ($\text{mean } \pi = 0.00126$) 的 19 倍，表示粗首鱧種內 cyto *b* 序列之遺傳變異大多存在於族群間而非族群內 (表二)。
- (四) 分子變方分析 (Analysis of molecular variance, AMOVA) 結果指出將粗首鱧的族群遺傳結構區分為屏東區與非屏東區時，兩地區間的遺傳變異最大，約佔全部遺傳變異之 89.54%，表示粗首鱧種內絕大部分的遺傳變異來自於屏東區與非屏東區之間。根據不同階層之遺傳分化指數，說明粗首鱧在地理區間 ($\Phi_{CT} = 0.805$; $p < 0.001$)、地理區內不同族群間 ($\Phi_{SC} = 0.895$; $p < 0.001$) 或所有族群間 ($\Phi_{ST} = 0.980$; $p < 0.001$) 的基因交流均受到很大的限制 (表三)。

表二、上半部為 10 處粗首鱧族群間之核苷酸歧異度 (D_{xy})，下半部為 10 處粗首鱧族群間之遺傳分化指數 (F_{st} index)。

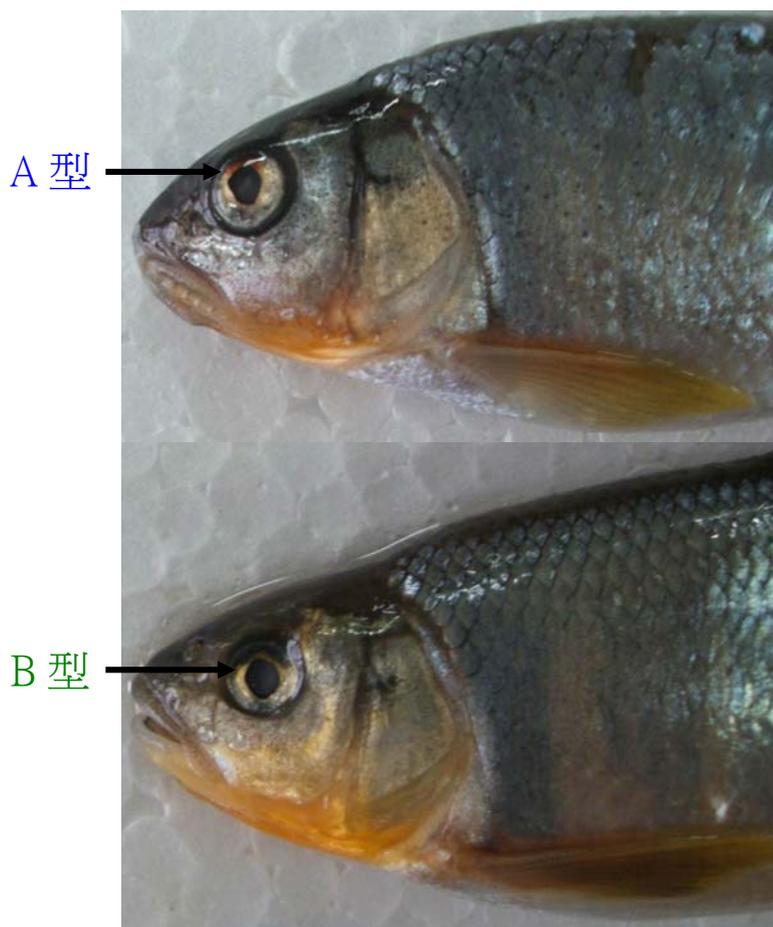
	LY	BS	MS	FES	HL	DD	PZ	FAS	FG	SH
LY		0.0016	0.0021	0.0009	0.0044	0.0040	0.0039	0.0454	0.0476	0.0484
BS	0.520		0.0004	0.0018	0.0040	0.0039	0.0029	0.0462	0.0484	0.0492
MS	0.429	0.089		0.00219	0.0044	0.0043	0.0033	0.0467	0.0488	0.0496
FES	0.161	1.000	0.818		0.0040	0.0035	0.0037	0.0445	0.0466	0.0474
HL	0.723	0.889	0.809	0.889		0.0067	0.0064	0.0447	0.0468	0.0494
DD	0.194	0.364	0.336	0.300	0.566		0.0062	0.0469	0.0491	0.0499
PZ	0.401	0.462	0.412	0.588	0.690	0.355		0.0456	0.0477	0.0485
FAS	0.969	0.987	0.978	0.986	0.976	0.935	0.953		0.0080	0.0105
FG	0.982	0.998	0.990	0.998	0.989	0.948	0.966	0.914		0.0133
SH	0.984	1.000	0.992	1.000	0.991	0.951	0.968	0.942	0.994	

表三、分子變方分析 (AMOVA) 之結果。** 表示有顯著差異 ($p < 0.001$)

欲分析之遺傳結構	遺傳變異來源	遺傳變異 (%)	不同階層之遺傳分化指數
北區、中區和南區	地理區間	75.93	$\Phi_{CT} = 0.759^{**}$
	地理區內不同族群間	21.51	$\Phi_{SC} = 0.894^{**}$
	所有族群內	2.56	$\Phi_{ST} = 0.974^{**}$
屏東區和非屏東區	地理區間	89.54	$\Phi_{CT} = 0.805^{**}$
	地理區內不同族群間	8.43	$\Phi_{SC} = 0.895^{**}$
	所有族群內	2.04	$\Phi_{ST} = 0.980^{**}$

五、粗首鱨 A、B 系群之外部形態差異

(一) 粗首鱨 A、B 系群依據眼睛瞳孔上方之色塊可分成 A、B 兩型 (圖十)。

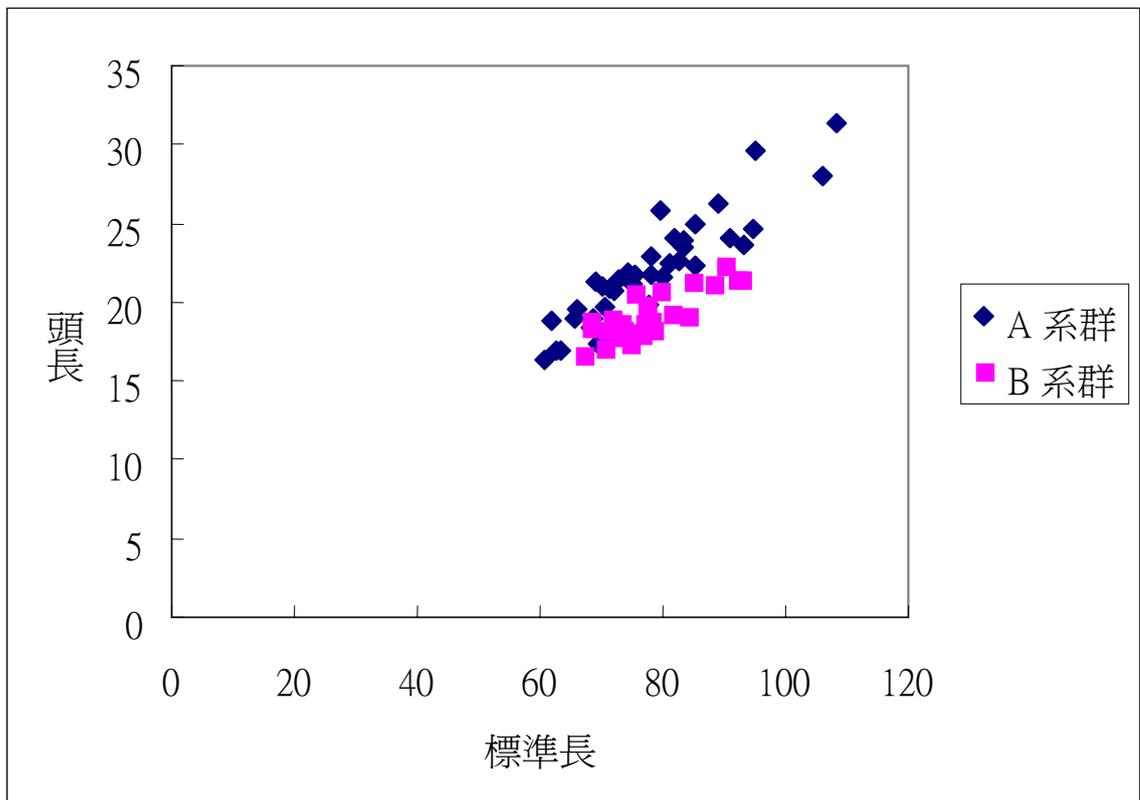


圖十、粗首鱨 A 型 (A 系群) 瞳孔上方色塊呈橘紅色, B 型 (B 系群) 則為黃色。

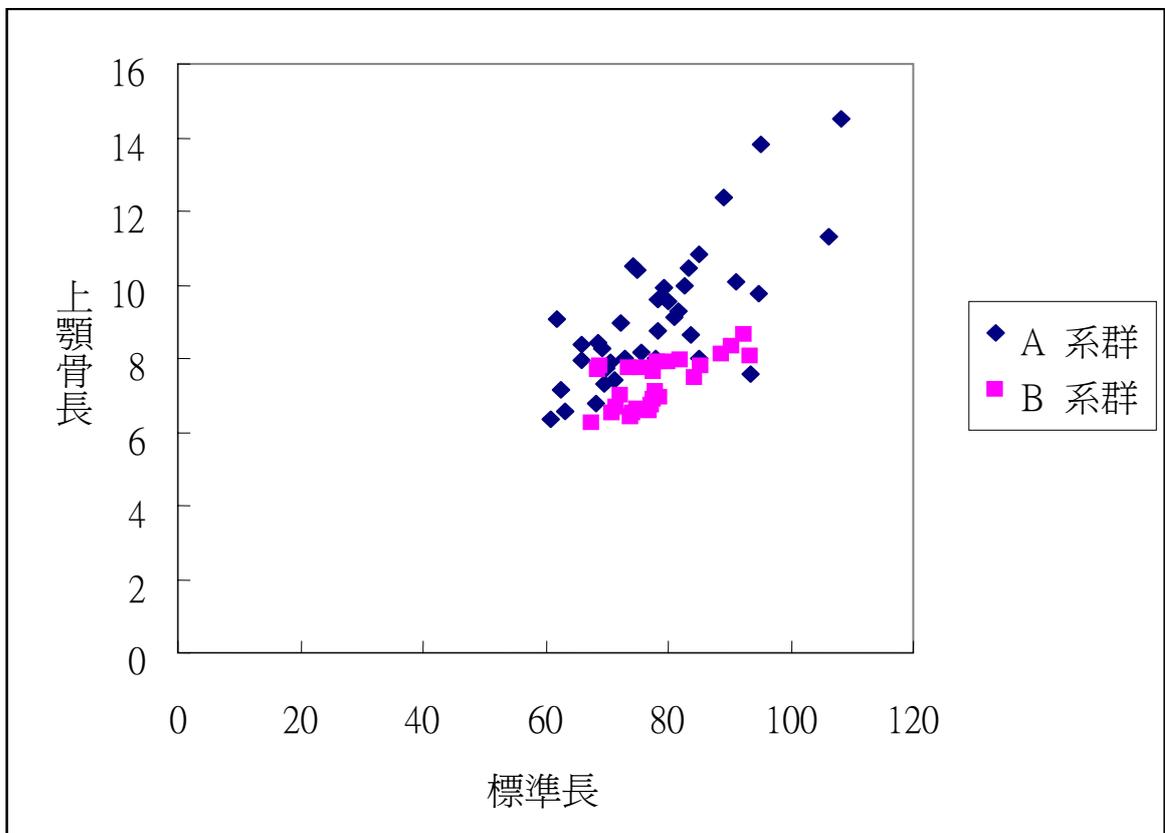
(二) 表四列出可區別粗首鱨 A、B 系群之 8 種測量形質, 其中粗首鱨 A 系群的上顎骨長和頭長均比 B 系群長, 所以容易從口裂和頭部大小來區別粗首鱨 A 型與 B 型 (圖十一與圖十二)。

表四、以變異數分析 (ANOVA) 檢測粗首鱨 A、B 系群 18 種測量形質之結果, 僅列出具顯著差異 ($p < 0.05$) 測量形質之平均值 \pm 標準差 (單位: %)。

具顯著差異之測量形質	A 系群 (樣本數=38)	B 系群 (樣本數=29)	A-B	F 值	P 值
眼徑 (% 頭長)	29.32 \pm 2.20	27.94 \pm 1.94	A > B	7.23	0.009
上顎骨長 (% 頭長)	41.29 \pm 4.05	39.08 \pm 2.66	A > B	6.49	0.013
眼間距 (% 頭長)	30.00 \pm 3.16	31.96 \pm 2.79	A < B	7.01	0.010
頭寬 (% 頭長)	39.91 \pm 3.72	42.41 \pm 2.61	A < B	9.46	0.003
頭長 (% 頭長)	28.12 \pm 1.80	24.57 \pm 1.39	A > B	77.81	0.000
體高 (% 標準長)	26.84 \pm 1.44	28.87 \pm 1.85	A < B	25.72	0.000
背鰭基部長 (% 標準長)	11.53 \pm 1.08	12.69 \pm 1.24	A < B	16.63	0.000
胸鰭前長 (% 標準長)	25.29 \pm 2.43	23.68 \pm 1.35	A > B	10.37	0.002



圖十一、粗首鱧 A、B 系群 標準長對頭長之散布圖。



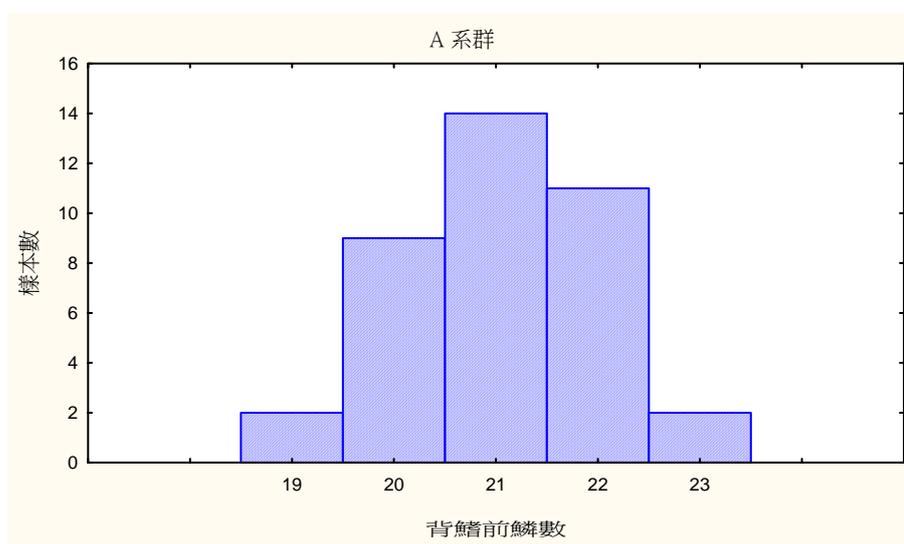
圖十二、粗首鱧 A、B 系群 標準長對上顎骨長之散布圖。

(三) 粗首鱯 A、B 系群在背鰭鰭條數、胸鰭鰭條數、腹鰭鰭條數、臀鰭鰭條數和尾鰭鰭條數相當穩定。(表五)

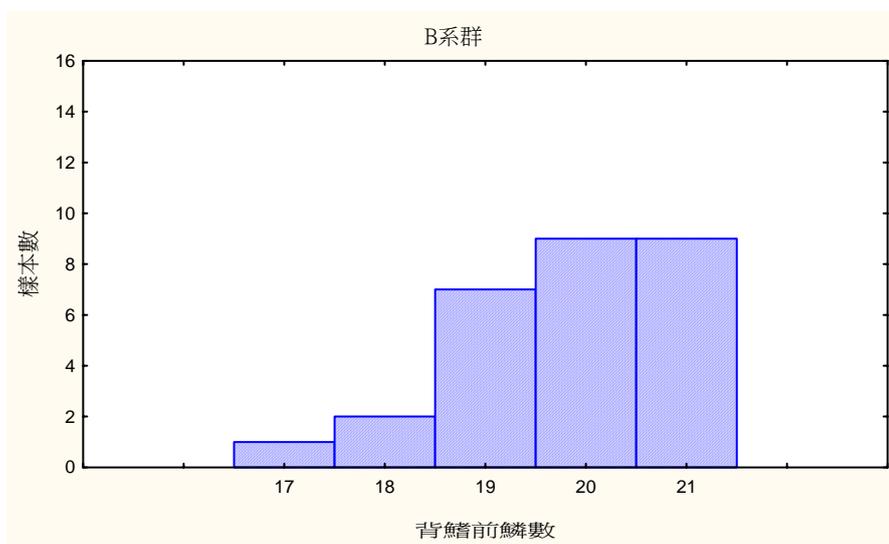
表五、粗首鱯 A、B 系群背鰭鰭條數、胸鰭鰭條數、腹鰭鰭條數、臀鰭鰭條數和尾鰭鰭條數。n 表示樣本數；i 表不分枝鰭條數；阿拉伯數字表分枝鰭條數。

泳鰭之不分枝與分枝鰭條數	A 系群 (n= 38)	B 系群 (n= 28)
背鰭鰭條數	iii + 7	iii + 7
胸鰭鰭條數	i + 13 (n=22) or 14 (n=16)	i + 12 (n=2) or 13 (n=10) or 14 (n=14) or 15 (n= 2)
腹鰭鰭條數	i + 7 (n=6) ~ 8 (n=32)	i + 8 (n= 28)
臀鰭鰭條數	iii + 9	iii + 9
尾鰭鰭條數	i + 17 + i	i + 17 + i

(四) 根據圖十三和圖十四，粗首鱯 A、B 系群在背鰭前鱗數差異不大。

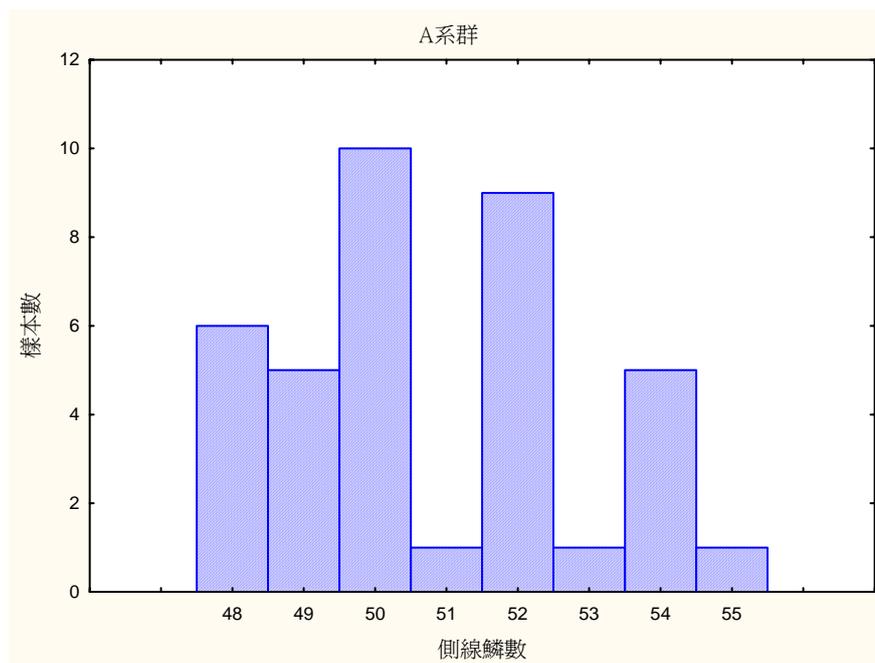


圖十三、粗首鱯 A 系群個體在不同背鰭前鱗數之分布頻率。

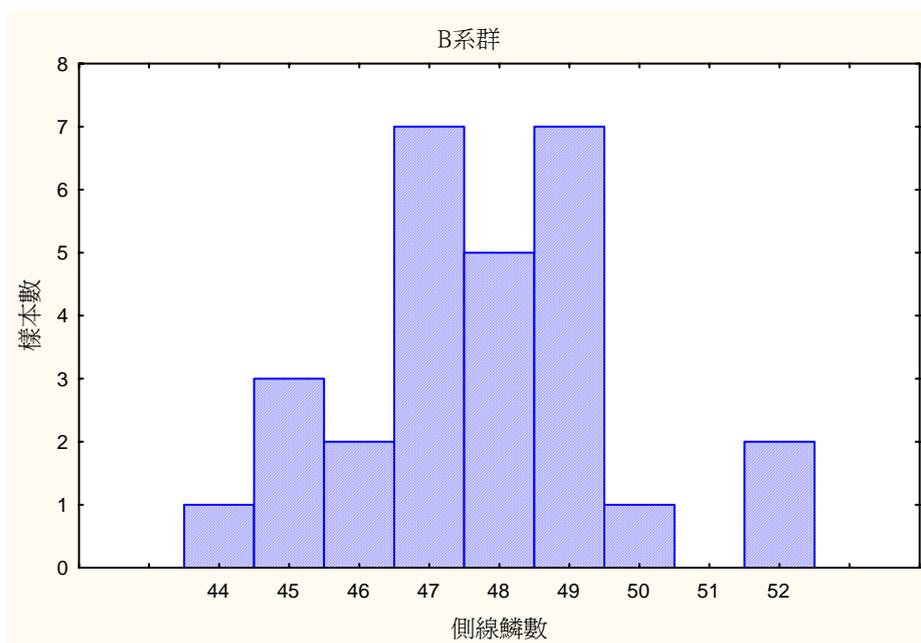


圖十四、粗首鱯 B 系群個體在不同背鰭前鱗數之分布頻率。

(五) 根據圖十五和圖十六，粗首鱧 A 系群大部分個體側線鱗數 ≥ 50 ，B 系群則 < 50 。

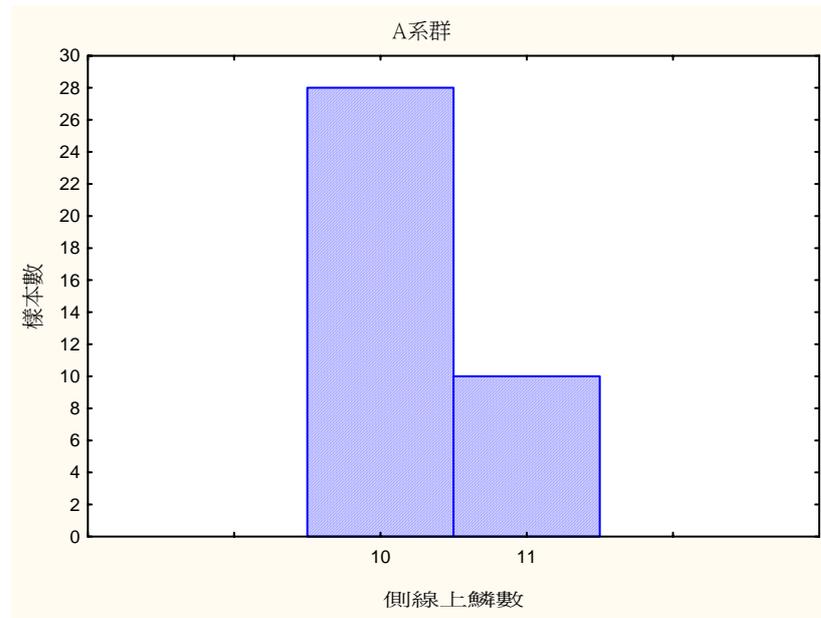


圖十五、粗首鱧 A 系群個體在不同側線鱗數之分布頻率。

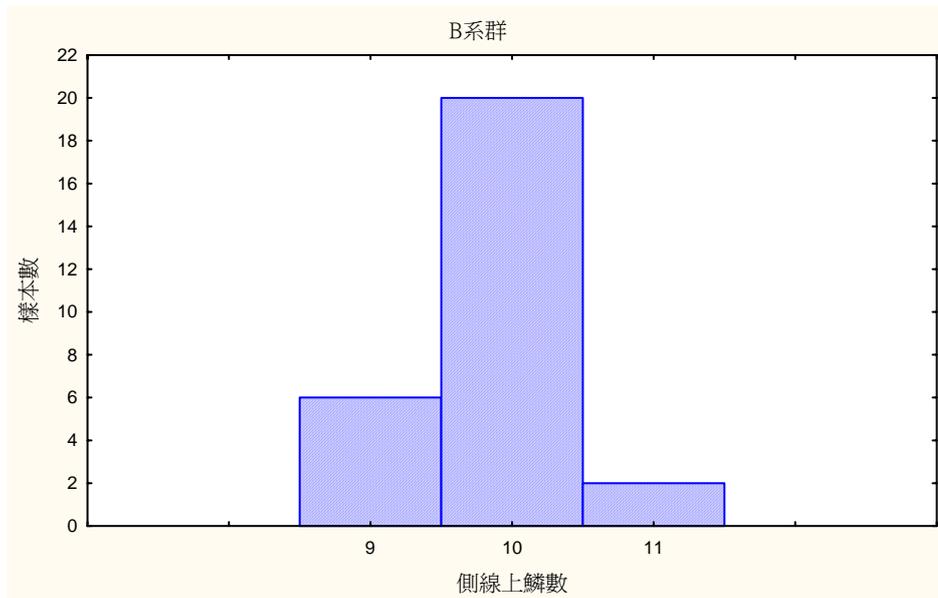


圖十六、粗首鱧 B 系群個體在不同側線鱗數之分布頻率。

(六) 根據圖十七和圖十八，粗首鱧 A、B 系群在側線上鱗數差異不大。

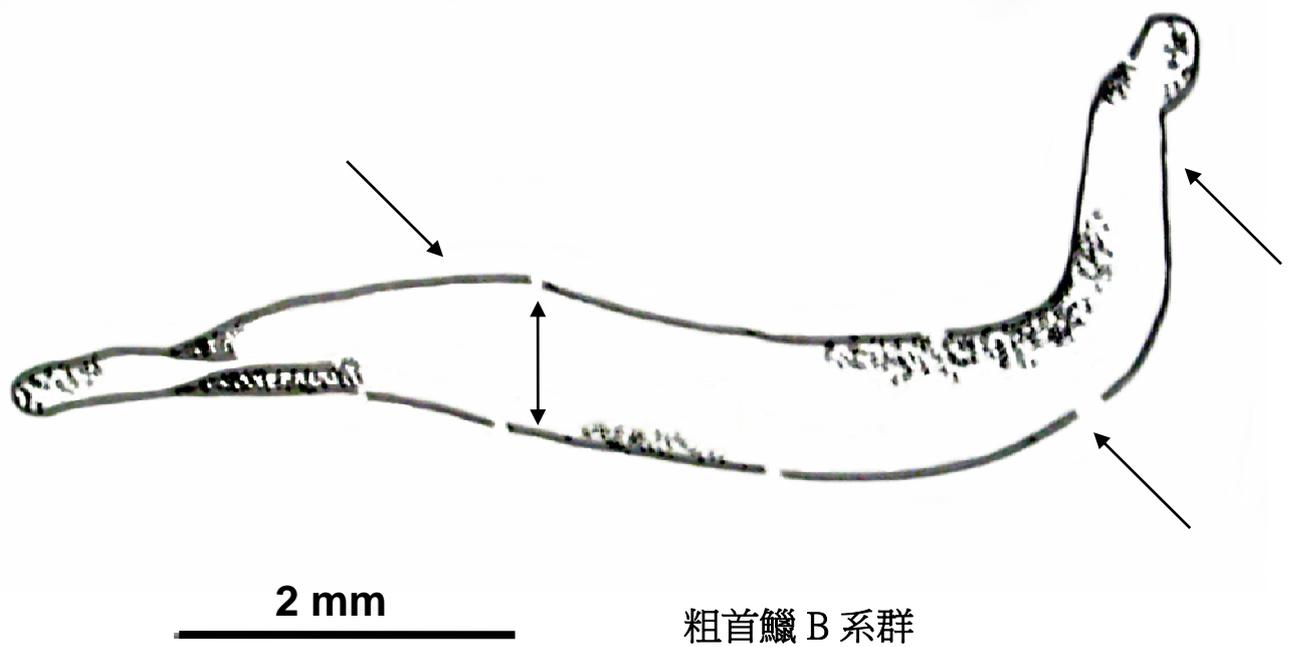
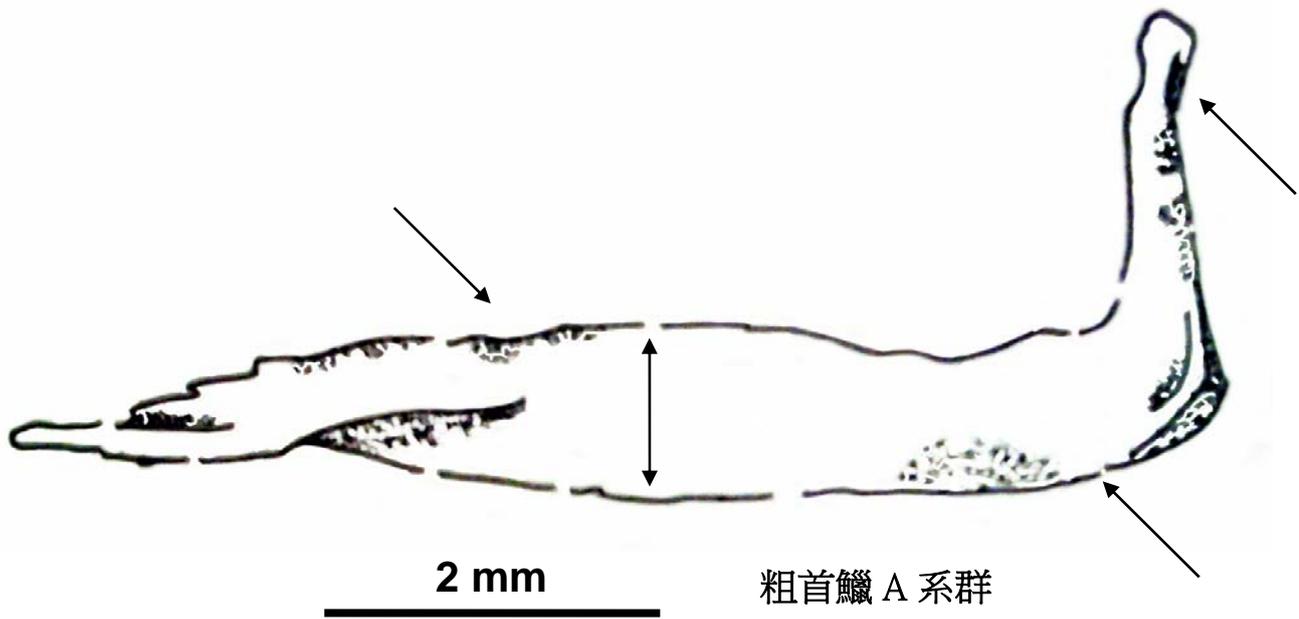


圖十七、粗首鱧 A 系群個體在不同側線上鱗數之分布頻率。

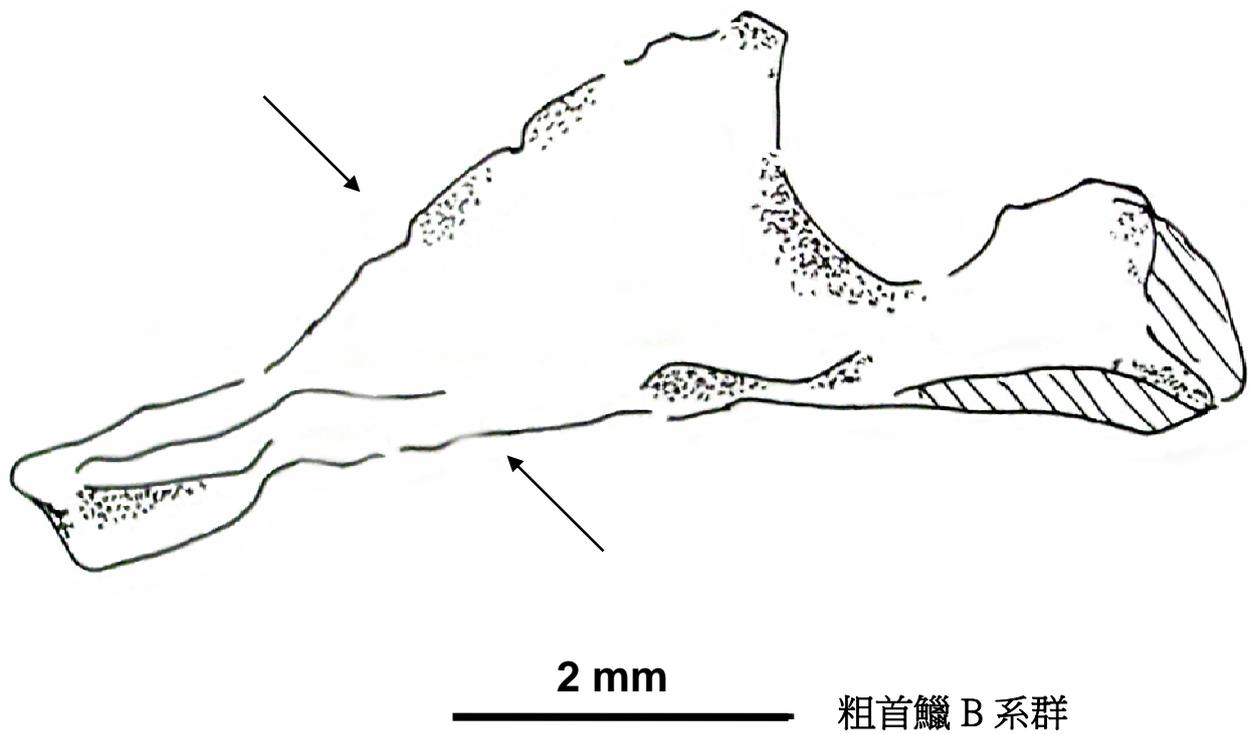
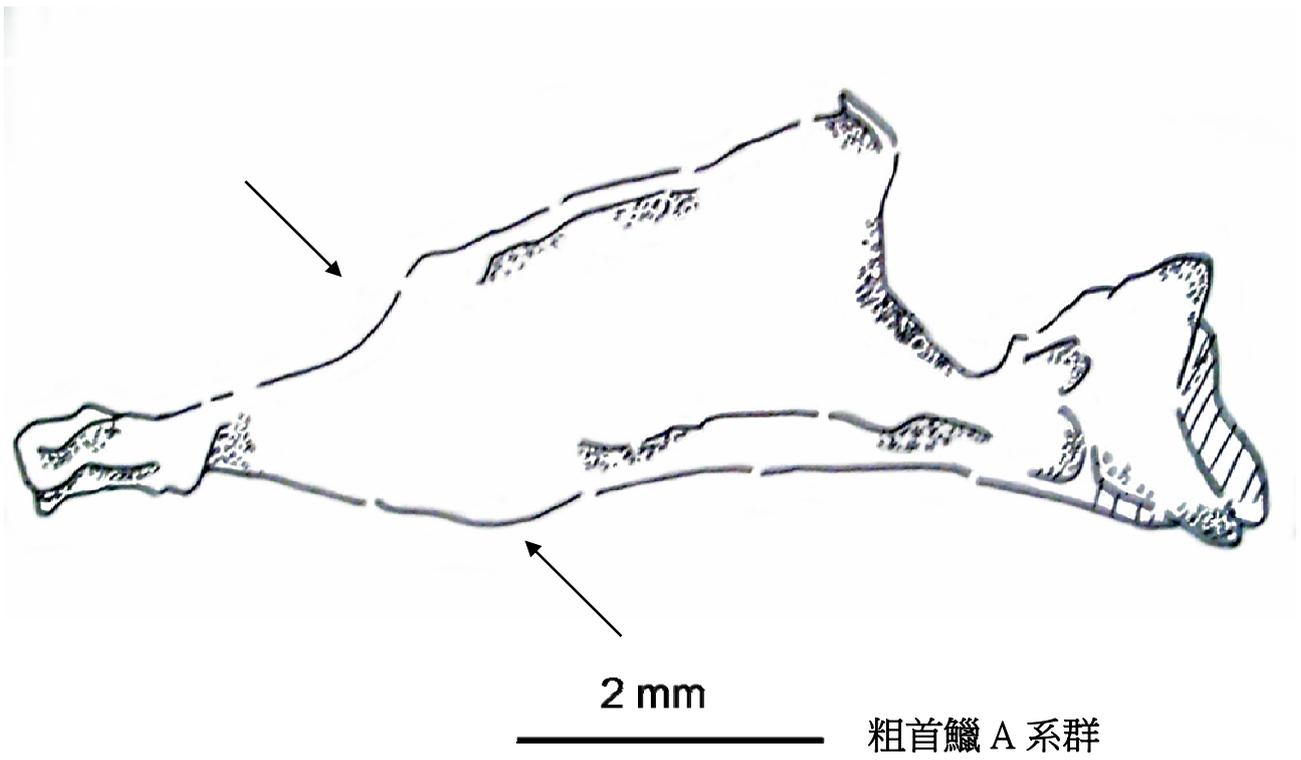


圖十八、粗首鱧 B 系群個體在不同側線上鱗數之分布頻率。

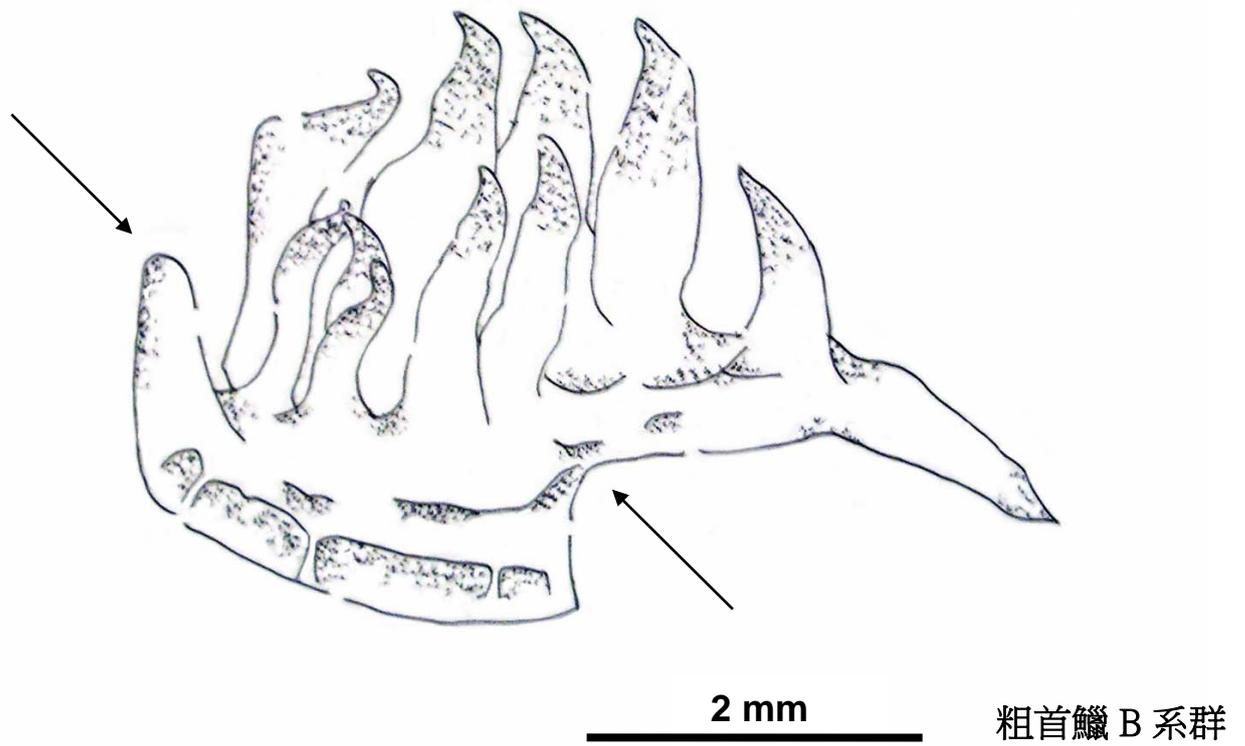
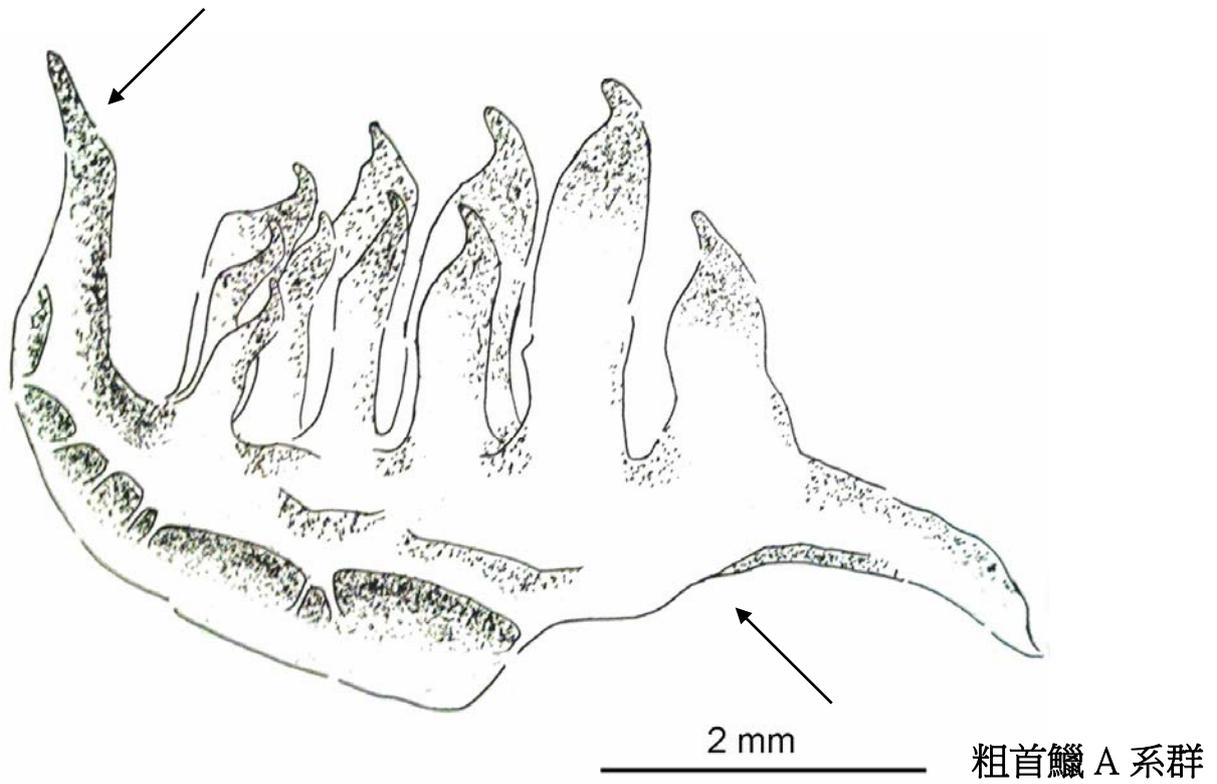
(七) 根據圖十九、圖二十和圖二十一 粗首鱘 A、B 系群在前上顎骨、上顎骨及咽頭齒之骨骼形狀有些許差異可區分出 A、B 兩型。



圖十九、粗首鱘 A、B 系群 右前上顎骨 腹面觀，箭頭方向為差異處。



圖二十、粗首鱯 A、B 系群 右上顎骨 腹面觀，箭頭方向為差異處。



圖二十一、粗首鱯 A、B 系群 右咽頭齒 腹面觀，箭頭方向為差異處。

柒、討論

(一) 粗首鱨 A 型和粗首鱨 B 型是不是同一物種？

粗首鱨種內的遺傳分化相當大，可區分為粗首鱨 A 系群和粗首鱨 B 系群，系群間的遺傳距離為 4.89%。同時我們也證實粗首鱨 A、B 系群在外部形態及內部骨骼形狀也有分化的現象，稱為粗首鱨 A 型 (A 系群) 和粗首鱨 B 型 (B 系群)。那麼粗首鱨可以分成兩個有效物種嗎？

第一、因為跟粗首鱨同屬之魚類其種間 mtDNA cyto *b* 序列變異範圍介於 9% - 20% (Wang *et al.*, 2006)，所以 4.89% 序列變異仍屬於種內的變異範圍。

第二、粗首鱨 A 型和粗首鱨 B 型可能也是屬於種內的形態變異，因為粗首鱨 A、B 型在前上顎骨、上顎骨及咽喉齒的骨骼形狀雖然有差異，但骨骼的基本樣式卻是相似的，以產於日本的 *Zacco temminckii* 和 *Zacco sieboldii* 兩相近物種為例，兩者在 mtDNA cyto *b* 序列變異為 12.84%，屬於種間的變異範圍 (Wang *et al.*, 2006)。此外，兩者在咽喉齒齒式上的差異 (圖二十二) (Hosoya *et al.*, 2003) 也比粗首鱨 A、B 型 (圖二十一) 明顯。

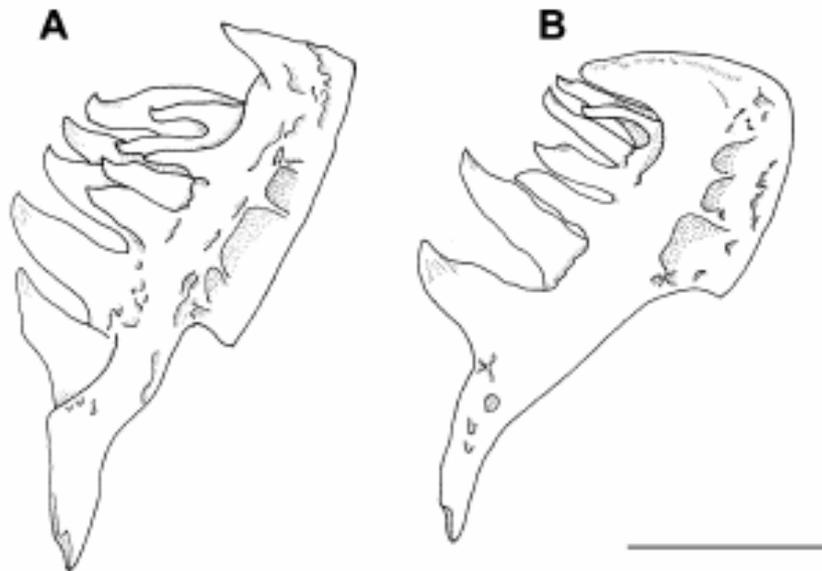


Fig. 2. Ventrolateral view of left pharyngeal bones of *Zacco sieboldii*, FAKU 115716, 91.3 mm SL (A), and *Z. temminckii*, FAKU 115899, 93.7 mm SL (B). Bar 2 mm

圖二十二、A 為 *Z. sieboldii* 左咽喉齒之腹面觀，B 為 *Z. temminckii* 左咽喉齒之腹面觀 (引用 Hosoya *et al.*, 2003 發表文獻)

第三、我們應該考慮生物種概念，若近似物種之間沒有生殖隔離表示同種，反之有生殖隔離表示不同種，這應該是最直接有力的證據。因此粗首鱨 A 系群和粗首鱨 B 系群是否有生殖隔離存在？是值得深入研究的主题。可惜在自然的情況下，我們未發現有粗首鱨 A、B 系群共域的水域，只能以人為的方式進行雜交實驗。

總結上述三點，我們認為粗首鱨 A 型和粗首鱨 B 型屬於種內的遺傳變異，兩者仍是同一物種。除非有關於粗首鱨 A、B 型雜交實驗的新數據出現，證明兩者有生殖隔離存在。

(二) 粗首鱨之遺傳多樣性

本研究發現粗首鱨族群內的遺傳變異甚低，但族群間確有很高的遺傳分化。這種模式說明每處粗首鱨族群能保持各自獨特的遺傳變異，但族群間卻鮮少有機會進行基因交流，所以我們才能在苗栗後龍溪發現四個其他溪流所沒有的 mtDNA cyto *b* 序列單型 (表一)。初級淡水魚類的自然限制就是終其一生只能在同一水域生活，所以同種的初級淡水魚其遺傳變異大部分都累積在族群間或不同地理區間，以粗首鱨為例，其族群遺傳結構分成屏東區和非屏東區時，地區間的遺傳變異最大，這是因為屏東地區四個族群內的 7 個單型皆屬於 B 系群，而非屏東地區十個族群內的 20 個單型皆屬於 A 系群，所以地區間的遺傳變異會最大。

(三) 保育粗首鱨遺傳多樣性之策略

由於粗首鱨是溪釣活動裡主要的對象魚種之一，也是山產店的一道名菜 (炸溪哥)，因此人為的獵捕活動可能會造成野外粗首鱨個體銳減造成物種內基因多樣性降低，另外不當的放流活動也有可能打破目前粗首鱨自然族群的遺傳結構，試想萬一有好事者把屏東地區的粗首鱨個體放流至非屏東地區的溪流裡會發生什麼事？

總結上述可能造成粗首鱨遺傳多樣性降低的危機都跟人類活動有關，因此我們應該宣導釣魚活動結束後，把多數釣獲的魚放生，到山區旅遊不要吃山產店的溪產，拒絕沒有事先考慮生態及遺傳背景的溪魚放流活動。

捌、結論

- 一、新紀錄 25 個粗首鱨 mtDNA cyto *b* 單型 (Opa01- Opa25)。
- 二、粗首鱨可區分出粗首鱨 A 系群 和 粗首鱨 B 系群。
- 三、粗首鱨族群內的遺傳變異甚低，但族群間確有很高的遺傳分化。
- 四、粗首鱨的族群遺傳結構可分成屏東地區和非屏東地區。
- 五、粗首鱨 A 系群和粗首鱨 B 系群在外部形態和內部骨骼形狀也有分化的現象。

玖、參考文獻

- 一、高中基礎生物 (全) 冊 施河 主編 南一書局出版
- 二、高中生物 (下) 冊 施河 主編 南一書局出版
- 三、曾晴賢，1986，台灣的淡水魚類。台灣省政府教育廳出版
- 四、陳義雄、方力行，1999，台灣淡水及河口魚類說。屏東海洋生物博物館出版
- 五、Hosoya, K., Ashiwa, H., Watanabe, M., Mizuguchi, K. & Okazaki, T. (2003) *Zacco sieboldii*, a species distinct from *Zacco temminckii* (Cyprinidae). *Ichthyological Research*, 50, 1- 8
- 六、Perdices A., Cunha C. & Coelho M. M. (2004) Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) population on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 192-203.
- 七、Perdices A, Sayanda D, Coelho MM (2005) Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 920 - 927.
- 八、Wang HY, Wang CF, Du SY, Lee SC (2005) New insights on molecular systematics of opsariichthid fishes based on cytochrome b sequencing. *Journal of Fish Biology* (accepted).
- 九、本次科展所使用的免費 DNA 分析軟體都能在下列網址下載
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html> (註：DNAstar套裝軟體非免費軟體)

拾、誌謝

- 一、感謝前中央研究院動物所李信徹研究員提供粗首鱨標本和 cyto *b* DNA 序列。
- 二、感謝中央研究院生物多樣性研究中心珊瑚礁生態暨演化實驗室提供分子實驗設備，並慷慨地支付定序費用。

評 語

040706 粗首蠟遺傳多樣性與形態變異之研究

1. 本研究全省粗首蠟在不同河川領域族群間之遺傳多樣式。
2. 本研究立論正確，依制式分生物學之方法用粒腺體 DnA 為列為據，結果指出本省粗首蠟約可分 A、B 兩大族群，是相對重要之發現。