

中華民國第四十八屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 生物(生命科學)科

040719

探討中國與台灣北部七星鯉（*Channa asiatica*）的遺傳多樣性

學校名稱：國立基隆女子高級中學

作者：  高二 陳玳婷  高二 蔡欣妤  高二 張芮綺  高二 廖彥綾	指導老師：  王晨帆  郭麗香
---	-----------------------------

關鍵詞： 七星鯉、遺傳多樣性、粒腺體細胞色素 b 基因

## 摘要

本次科展以粒線體細胞色素 *b* 基因作為分子遺傳標誌，試圖探討中國大陸與臺灣北部地區七星鱧 (*Channa asiatica*) 的遺傳多樣性。來自北臺灣三處七星鱧族群的 12 條 cyto *b* 序列可歸納出 2 個新紀錄單型 (Cas01 和 Cas02)。以鄰聚法重建的七星鱧親緣關係樹，支持將臺灣和中國大陸的 3 個單型區分成兩群演化系群，分別是台灣北部的 NT 系群和中國廣東省的 CG 系群。兩系群間的平均遺傳距離為 4.61%，仍屬於種內的遺傳變異。臺灣北部深澳坑和瑞芳鎮採集的黄褐色七星鱧皆屬於 Cas01，而貢寮鄉採集的墨綠色七星鱧皆屬於 Cas02。兩單型在 1141 個鹼基位址中只有 1 個變異位址，位在第 55 個鹼基位址。臺灣北部三處七星鱧族群內均無任何遺傳多樣性 ( $h=0$ ,  $\pi=0$ )，而存在於族群間的遺傳多樣性也是偏低 ( $D_{xy}=0.000587$ )。

## 壹、研究動機

在高一基礎生物的課程中，我們了解生物多樣性 (biodiversity) 的概念可分成三個層次，由小至大依序為遺傳多樣性 (genetic diversity)、物種多樣性 (species diversity) 及生態系多樣性 (ecosystem diversity)。其中遺傳多樣性是指同一物種內，不同個體間基因組成的差異程度。遺傳多樣性愈高的物種，表示個體間性狀的差異較大，可提高該物種對環境變遷的適應力，反之遺傳多樣性愈低的物種，適應環境變化的能力愈差。老師在課程中有提及不同族群內的同種個體在長期隔離或是棲地環境不同的情況下，有助於提高該物種的遺傳多樣性。課後我們想對生物遺傳多樣性有更深入的了解，於是進一步和老師討論是否能研究學校鄰近地區某種生物的遺傳多樣性？在老師的建議下，我們選擇以七星鱧 (*Channa asiatica*) 這種臺灣原生的初級性淡水魚作為科學展覽的研究物種。

七星鱧 (*Channa asiatica*)，分類上屬於硬骨魚綱 (Osteichthyes)；鱸形目 (Perciformes)；鱧科 (Channidae)；鱧屬 (*Channa*)。七星鱧在臺灣閩南話俗稱「鮎鮠」；中國大陸俗稱「月鱧」；英名俗稱亞洲蛇頭魚或是小蛇頭魚 (Asian snakehead or small snakehead)，最大體長可達 30 公分左右，身體直且長呈圓筒型，缺腹鰭，體側有 8 至 10 條「 $\surd$ 」字形暗色橫帶，尾柄具有圓形斑紋，口大，上下頷具有銳利的細齒，頭部似蛇頭，扁平被有大型鱗片。七星鱧屬於初級性淡水魚種，生活史均在純淡水水域中完成，棲息於河流、池塘或是沼澤中，夜間活動為主，以小型魚、蝦及無脊椎動物為食，是凶猛的肉食性魚類，屬於淡水生態系中的高階消費者。七星鱧分布於臺灣宜蘭、台北到台南以北，中國大陸南方各省及海南島亦產此魚。臺灣原生鱧科魚類除七星鱧外，還有斑鱧 (*Channa maculata*)，閩南話俗稱為「雷魚」。斑鱧體型較七星鱧大且具腹鰭，最大體長可達 60 公分左右 (曾，1986；沈 等，1993；陳 等，1999；鄭 等，2007)。

根據老師的童年記憶，約二十年前七星鱧曾是基隆市郊區溪流、池塘及灌溉溝渠中常見的肉食性魚類。可是現今基隆市及臺灣各地的七星鱧族群數量已經急遽下降，推測可能的原因為：一、人為建設大量地破壞七星鱧的棲息地。二、兩種外來大型鱧科魚類：小盾鱧 (*Channa macropeltes*)；俗稱「魚虎」和線鱧 (*Channa striata*)；俗稱「泰國鱧」的競爭性排除效應 (competitive exclusion) (陳 等，2003；臺灣特有生物保育中心網頁；鄭 等，2007)。

雖然七星鱧不是台灣特有種淡水魚，但在臺灣獨特的島嶼隔離效應下，臺灣七星鱧族群與鄰近亞洲地區的七星鱧族群勢必存在長期的地理隔離，族群間基因交流的機會極低，因此我們推測臺灣七星鱧的遺傳組成極有可能是臺灣島所特有的基因庫 (gene pool)。假設當臺灣野外的七星鱧族群不幸全部滅絕，即代表臺灣特有的七星鱧基因庫也將永遠消失，這是很難用復育外來七星鱧個體所能彌補的損失。過去文獻並未探討過臺灣七星鱧的遺傳多樣性，再加上今天不研究，以後可能就無法詳細研究的急迫性！因此我們和老師決定選用粒線體細胞色素 *b* 基因 (mitochondrial cytochrome *b* gene；簡稱 mtDNA cyto *b*) 作為分子遺傳標誌 (molecular genetic marker)，研究中國大陸廣東省與臺灣北部七星鱧族群的遺傳變異程度。

## 貳、研究目的

一、在長期的地理隔離作用下，我們想瞭解現今中國大陸和臺灣北部的七星鱧族群在 mtDNA cyto *b* 序列是否存在顯著的遺傳變異？

- 可能結果1. 有顯著的遺傳變異 → 兩地分屬不同的演化系群 (evolutionary lineage)
- 可能結果2. 有遺傳變異，但不顯著 → 兩地屬於相同演化系群內的不同單型 (haplotype)
- 可能結果3. 無遺傳變異 → 兩地屬於相同演化系群內的相同單型 (haplotype)

二、我們從文獻和網路資料發現中國大陸與臺灣北部的七星鱧個體在體色模式 (color pattern) 有明顯的差異 (詳見圖一)，我們想瞭解兩地不同體色的七星鱧個體在 mtDNA cyto *b* 序列是否存在顯著的遺傳變異？

- 可能結果1. 有顯著的遺傳變異 → 不同體色屬於不同的演化系群
- 可能結果2. 有遺傳變異，但不顯著 → 不同體色屬於相同演化系群內的不同單型
- 可能結果3. 無遺傳變異 → 不同體色屬於相同演化系群內的相同單型

三、我們注意到臺灣北部三處七星鱧族群的個體在頭部外形、大小及體色上也有明顯的不同 (詳見圖二)，因此我們想瞭解在臺灣北部這麼小的地理區內，不同形態的七星鱧個體在 mtDNA cyto *b* 序列是否存在顯著的遺傳變異？

- 可能結果1. 有顯著的遺傳變異 → 小地理區內存在不同的演化系群 (重大發現！)
- 可能結果2. 有遺傳變異，但不顯著 → 不同形態屬於相同演化系群內的不同單型
- 可能結果3. 無遺傳變異 → 不同形態屬於相同演化系群內的相同單型

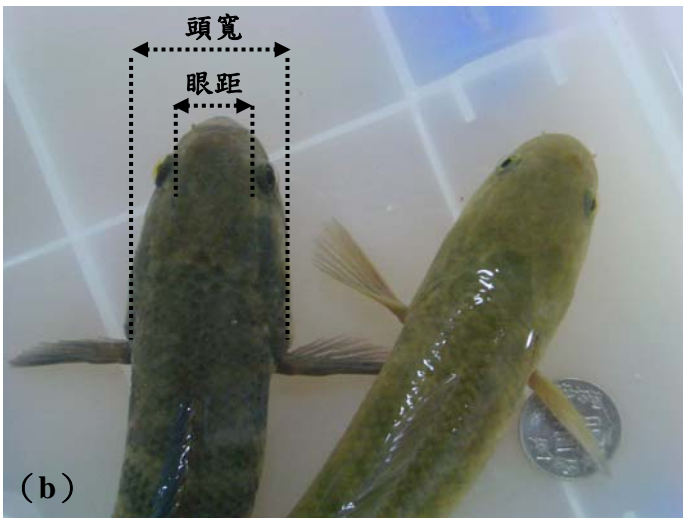
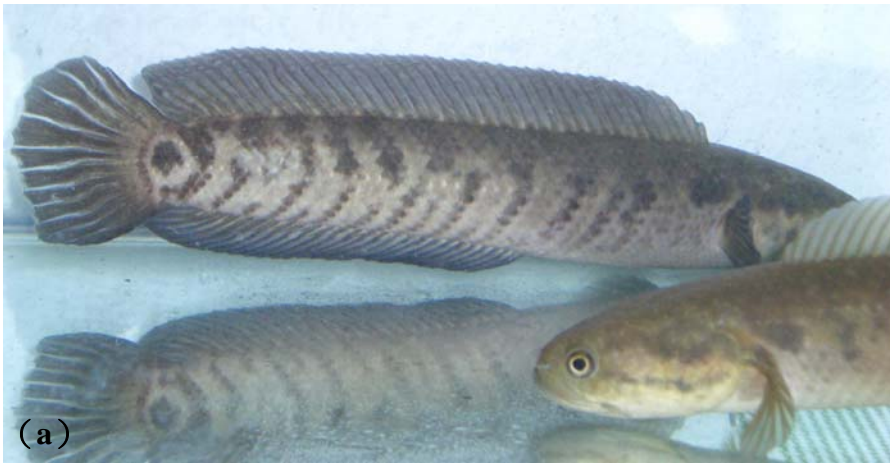
四、我們以 cyto *b* 序列的變異程度，定量臺灣北部三處七星鱧族群內及族群間的遺傳多樣性。



圖一、(a) 為中國大陸產的七星鱧，體表布滿閃閃發亮的小白點。

(黃 等，2004；圖片來源附於參考資料)。

(b) 為臺灣北部瑞芳鎮產的七星鱧，體表無發亮的小白點。



圖二、(a) 下方和 (b) 右方為臺灣北部深澳坑與瑞芳鎮產的七星鱧，體色呈黃褐色，眼距及頭寬較小。  
 (a) 上方和 (b) 左方為臺灣北部貢寮鄉產的七星鱧，體色呈墨綠色，眼距及頭寬較大。  
 (註：兩尾七星鱧全長均約 28 公分左右。)

## 參、實驗藥品及器材

### 一、藥品

1. Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems, USA)
2. PCR-M Clean up System Kit (Viogene, USA)
3. Proteinase K (20 mg/ml)
4. 100% Isopropanol
5. 70% Ethanol
6. 90% Ethanol
7. 10 X PCR reaction buffer
8. 10 mM dNTP mixture
9. 10  $\mu$  M primers
10. *Taq* polymerase (5 u/  $\lambda$ )
11. 1% TAE- agarose gel
12. 1 X TAE buffer
13. EtBr (Ethidium Bromide)
14. ddH<sub>2</sub>O

### 二、器材

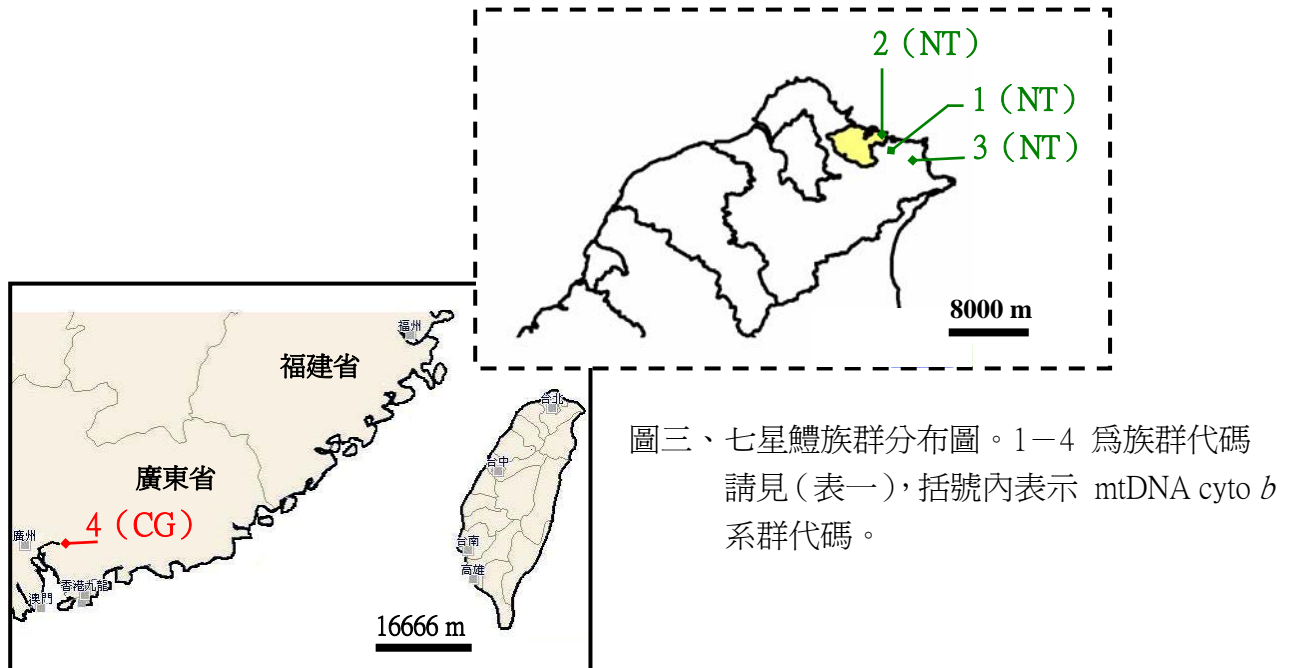
1. 微量吸放器
2. 微量吸管
3. 微量管
4. 聚合酶鏈鎖反應器
5. 高速離心機
6. 桌上型離心機
7. 電源供應器
8. 電泳槽
9. 乾浴加熱槽
10. 紫外線照膠器
11. 電磁爐
12. 血清瓶
13. 製膠器具
14. 量筒
15. 燒杯
16. 鑷子
17. 解剖剪
18. 解剖刀
19. 手套
20. 電腦
21. DNA 序列分析軟體

## 肆、研究方法

### 一、採集七星鱧樣本

以釣魚法和捕撈法自臺灣北部 3 處水域，共計採集 12 尾七星鱧（圖三，表一）。

（註：大陸廣東省七星鱧及斑鱧的 cyto *b* 序列下載自 NCBI 資料庫。）



表一、研究物種的採集地點、族群名稱、樣本數量及萃取DNA的組織來源。

研究物種	採集地點 (未實際採集點)	族群名稱及代碼 (NCBI 序列代碼)	樣本數量	萃取 DNA 的組織來源
七星鱧 ( <i>C. asiatica</i> )	1. 台北縣 瑞芳鎮	1. Rui fang ; RF	活體 (3)	尾鰭
	2. 基隆市 深澳坑	2. Shen ao keng ; SAK	活體 (4)	尾鰭
	3. 台北縣 貢寮鄉	3. Gong liao ; GL	活體 (2) 酒精標本 (3)	尾鰭 肌肉
	4. (中國大陸 廣東省)	4. (AF480933)	缺	缺
斑鱧 ( <i>C. maculata</i> )	1. 基隆市 仁愛市場	缺	酒精樣本 (2)	肌肉
	2. (中國大陸 廣東省)	(AF479271)	缺	缺

### 二、選擇合適的遺傳標誌

(一) 為什麼選擇 mtDNA ?

1. 因為脊椎動物的 mtDNA 為母系遺傳的單套染色體，所以選用 mtDNA 作為遺傳標誌，在實驗操作上比選用細胞核內 DNA 來的容易，並可直接定序 PCR 產物。
2. mtDNA 的複製過程缺乏修正機制，演化速率約比細胞核內 DNA 快上十倍。

(二) 為什麼選擇 mtDNA cyto *b* 基因？

mtDNA cyto *b* 為編碼基因 (coding gene)，可表現 cytochrome *b* 作為電子傳遞鏈中的電子載體，是非常重要的功能性基因。

1. 理論上 cyto *b* 應該屬於非常保守的基因，但是在 cyto *b* 遺傳密碼 (genetic code) 的第三個位置卻常出現同義性突變 (synonymous mutation)，簡單的說 cyto *b* 上絕大多數的鹼基突變並不會改變所對應的胺基酸，因此 cyto *b* 的演化速率並不會比 mtDNA 上的非編碼片段 (non-coding region) 慢。
2. cyto *b* 比 mtDNA 上的非編碼片段容易進行序列比對 (alignment)。

### 三、製備七星鱧 cyto *b* 序列的實驗流程

(一) 萃取七星鱧尾鰭細胞 (活體) 與 肌肉細胞 (酒精浸置標本) 的總量 DNA (表一)



(二) 設計引子對 (primers)

1. 我們從 NCBI (National center for biotechnology information) 資料庫下載中國廣東省七星鱧及斑鱧的 cyto *b* 序列 (白等, 2003) 和其他 12 種鱸形目魚類的 mtDNA 序列，再利用 DNA 序列分析軟體進行分析比對後，我們發現鱸形目魚類在 cyto *b* 前後的基因都是 Glu-tRNA 和 Thr-tRNA 基因 (圖四, 表二)
2. 我們先從 Glu-tRNA 相對保守的片段，設計出引子1 (SH-cyto 1)，再從 Thr-tRNA 相對保守的片段，設計出引子2 (SH-cyto 2) (圖四)。  
SH-cyto 1 : 5' AAC, CAG, GAC, YAA, TGG, CTT, G 3'  
SH-cyto 2 : 5' GGT, TTA, CAA, GAC, CGG, CGC, TC 3'



(三) 測試引子黏合的溫度梯度

先設定引子黏合溫度的範圍介於 50°C ~ 60°C，再由 PCR 反應器自動由低至高依序分成 50°C、50.7°C、51.9°C、53.7°C、56.1°C、58.0°C、59.2°C 及 60°C。

(註：引子黏合的最佳溫度為 56.1°C，請參見結果二。)



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

PCR 反應條件如下所示：

95°C, 5分 → 95°C, 30秒 → 56.1°C, 30秒 → 72°C, 1分30秒 → 72°C, 10分 → 4°C, 不限  
重複 35 次循環



(五) 純化 PCR 產物後，送至國立臺灣大學醫學院進行 cyto *b* 雙向定序。

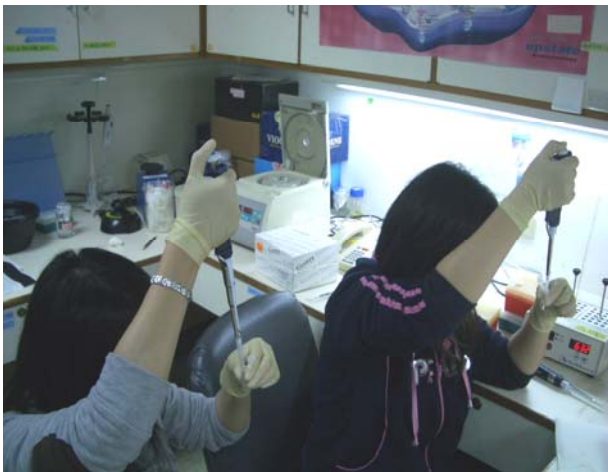
(六) 實驗過程剪輯



剪下七星鱧的尾鰭組織，進行總量DNA萃取。



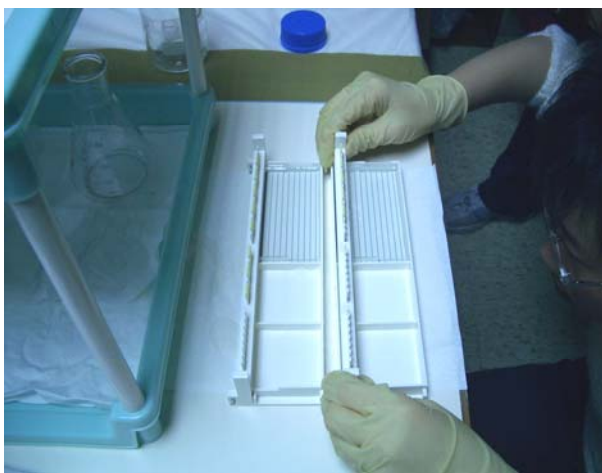
以剪刀將七星鱧的尾鰭組織均質化。



小心翼翼地吸取 Isopropanol，以免吸到 DNA。



小心翼翼地混合 PCR 反應所需的藥品。



聚精會神地製作 1% TAE- agarose gel。

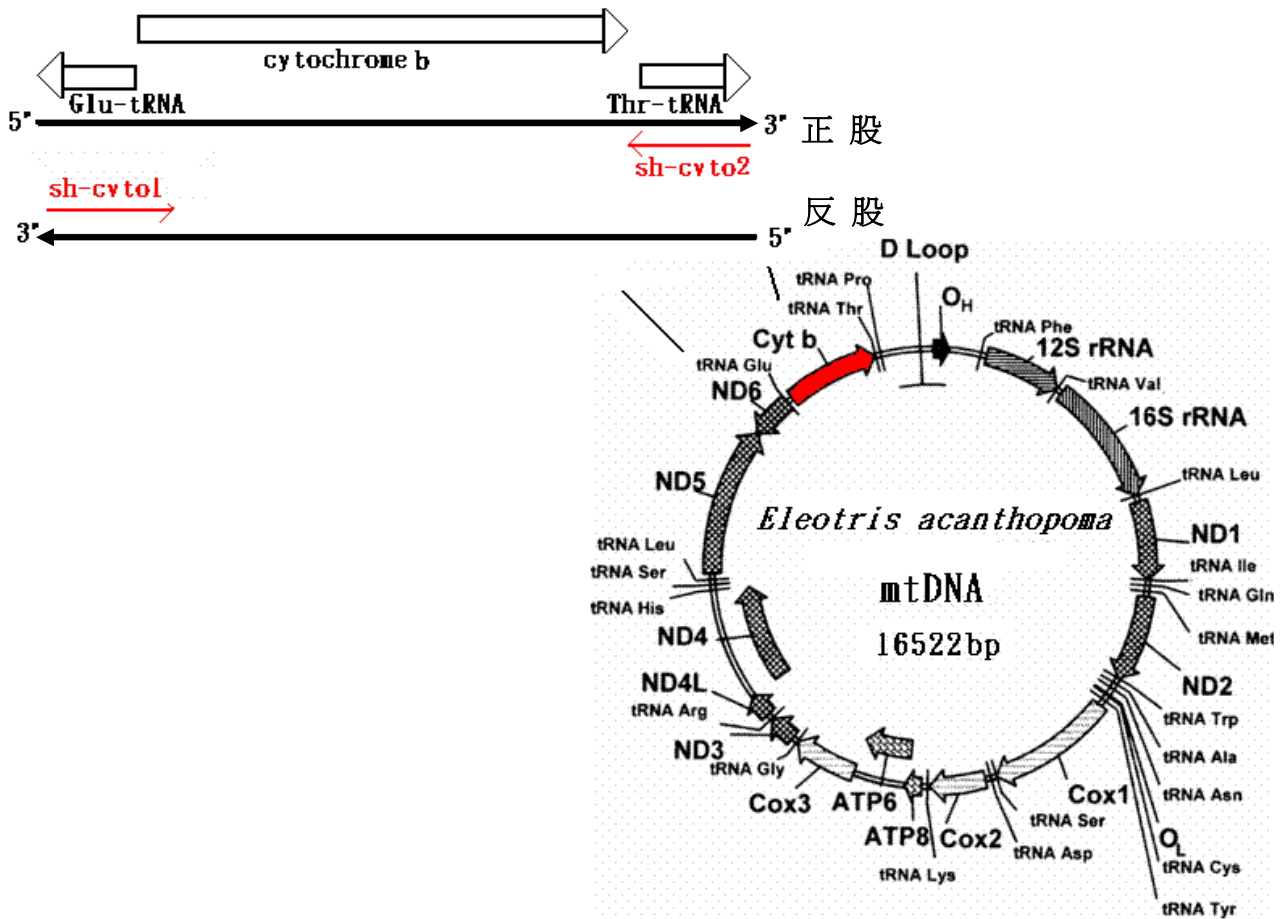


聚精會神地將 PCR 產物注入膠片內。



表二、下載自NCBI資料庫內16種鱸形目魚類的 mtDNA 序列。12種包括完整的 Glu-tRNA – cyto *b* – Thr-tRNA 序列，4種只含有部分序列。

學名	中文俗名	Accession number	mtDNA genome	Glu-tRNA	cyto <i>b</i>	Thr-tRNA
<i>Odontobutis platycephala</i>	平頭沙塘鱧	NC010199	17588 bp	14948-15015 bp	15021-16161 bp	16162-16233 bp
<i>Lutjanus rivulatus</i>	海雞母笛鯛	NC009869	16511 bp	14313-14381 bp	14388-15528 bp	15529-15600 bp
<i>Coreoperca kawamebari</i>	川目少鱗鰱	NC009868	16488 bp	14285-14353 bp	14358-15498 bp	15499-15570 bp
<i>Monodactylus argenteus</i>	銀鱗鯧	NC009858	16542 bp	14314-14382 bp	14387-15527 bp	14387-15527 bp
<i>Parapristipoma trilineatum</i>	三線雞魚	NC009857	16546 bp	14346-14414 bp	14419-15559 bp	15560-15632 bp
<i>Eleotris acanthopoma</i>	蓋刺塘鱧	NC004415	16522 bp	14317-14385 bp	14390-15530 bp	15531-15602 bp
<i>Acanthogobius hasta</i>	長身鯊	NC006131	16663 bp	14296-14364 bp	14369-15509 bp	15510-15581 bp
<i>Rhyacichthys aspro</i>	溪鱧	NC004414	16518 bp	14309-14377 bp	14385-15525 bp	15526-15597 bp
<i>Micropterus salmoides</i>	大嘴黑鱸	NC008106	16484 bp	14304-14372 bp	14377-15517 bp	15518-15589
<i>Lates calcarifer</i>	金目鱸	NC007439	16535 bp	15179-15247 bp	15252-16392 bp	16396-16464 bp
<i>Anabas testudineus</i>	攀鱸	AY763727	缺	缺	1-1143 bp	1146-1173 bp
<i>Macropodus opercularis</i>	蓋斑鬥魚	AF519698	缺	缺	1-1155 bp	1155-1173 bp
<i>Channa maculata</i>	斑鱧	AF479271	缺	缺	1-1197 bp	缺
<i>Channa asiatica</i>	七星鱧	AF480933	缺	缺	1-1245 bp	缺



圖四、以蓋刺塘鱧 (*Eleotris acanthopoma*) 的粒線體基因組圖譜 (mtDNA genome map) 說明七星鱧 cyto *b* 的前後基因為 Glu-tRNA 與 Thr-tRNA 基因。PCR 反應進行時，圖中的引子 SH-cyto 1 會黏合在反股，使DNA聚合酶以反股當模版進行複製，反之引子 SH-cyto 2 會黏合在正股，使DNA聚合酶以正股當模版進行複製。

#### 四、mtDNA cyto *b* 序列的整理、比對及分析

- (一) 以 DNASTAR 套裝軟體的 SeqMan II 程式檢視同一個體各約 800 鹼基的正向及反向序列，再比對相同的鹼基的位址後，將兩序列組合成 (assembling) 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 軟體 (Thompson *et al.*, 1997) 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) 進行 cyto *b* 單型 (haplotype) 分析。
- (五) 以 MEGA vers. 2.1 軟體 (Kumar *et al.*, 2001) 分析 cyto *b* 單型中四種鹼基的比例，並採用 p-distance 和 Kimura 2-parameter model，簡稱 K-2-p (Kimura, 1980) 兩種模式，分別計算各單型間的遺傳距離 (genetic distance) 和平均遺傳距離。
- (六) 繪製轉換 (Transition, Ts) 和顛換 (Transversion, Tv) 對 p-distance 的散布圖，檢測 Ts 和 Tv 是否已達飽和狀態。

## 五、重建七星鱧 mtDNA cyto *b* 的親緣關係樹

- (一) 自 NCBI 資料庫下載由白 (2003) 所發表的七星鱧 (AF480933) 和斑鱧 (AF479271) 兩條 cyto *b* 序列，AF480933 可加入重建七星鱧親緣關係樹的內群 (in-group)，而 AF479271 和實驗所得的斑鱧 cyto *b* 序列則作為外群 (out-group)。
- (二) 以 MEGA vers. 2.1 內建的鄰聚法 (neighbor-joining method) 重建七星鱧 cyto *b* 親緣關係樹。我們選用 Kimura 2-parameter model 作為校正參數，再進行 10000 次重排 (bootstrap) 檢驗親緣關係樹的可信度。

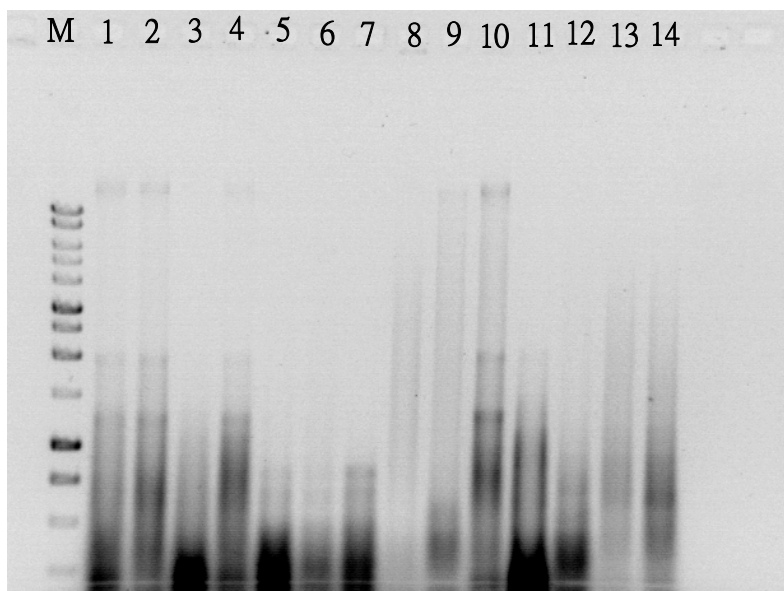
## 六、分析臺灣北部七星鱧族群內及族群間的遺傳多樣性

- (一) 為瞭解臺灣北部 3 處七星鱧族群內的遺傳多樣性，我們以 DNAsp vers. 4.0 計算族群內的單型歧異度 (haplotype diversity within population,  $h$ ) 及核苷酸歧異度 (nucleotide diversity within population,  $\pi$ )。
- (二) 為瞭解臺灣北部 3 處七星鱧族群間的遺傳多樣性，我們以 DNAsp vers. 4.0 計算族群間的核苷酸歧異度 (nucleotide diversity among populations,  $D_{xy}$ ) 及遺傳分化指數 (Fst index)。

# 伍、研究結果

## 一、DNA 電泳膠片圖

- (一) 萃取七星鱧總量 DNA 的結果



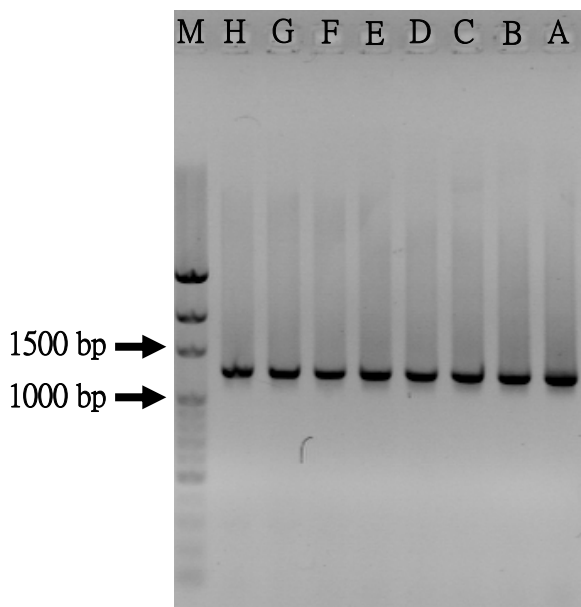
圖五、七星鱧總量 DNA 的電泳膠片圖。M 為 1kb marker，1~14 依序為 RF01、RF02、RF03、SAK01、SAK02、SAK03、SAK04、GL01、GL02、GL03、GL04、GL05、Cma01 及 Cma02。

(註：RF=瑞芳鎮、SAK=深澳坑、GL=貢寮鄉、Cma01~02=斑鱧樣本)

## (二) 測試引子黏合溫度的結果

由圖六可知 H~A 皆有 PCR 產物，故引子在 50°C ~60°C 的範圍內皆能黏合。

由圖六可知 PCR 產物的片段大小位於 1500 bp ~1000 bp，符合 *cyto b* 的片段大小 (*cyto b* 全長為 1141 bp)。我們決定以 56.1°C 作為引子的黏合溫度。

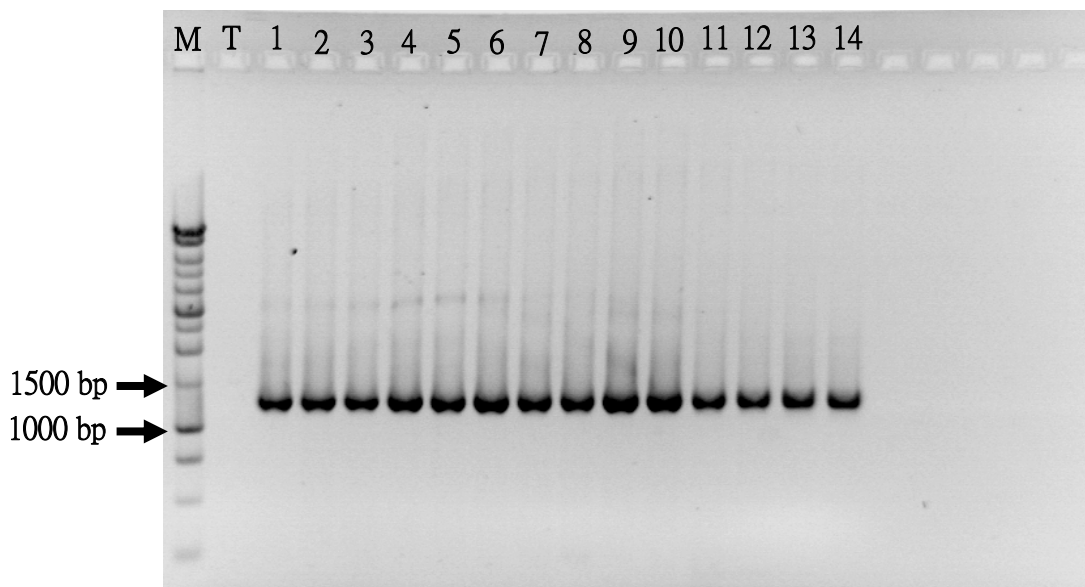


圖六、檢視引子黏合溫度的電泳膠片圖。M 為 100 bp marker，H~A 依序為 50°C、50.7°C、51.9°C、53.7°C、56.1°C、58.0°C、59.2°C 及 60°C。

## (三) 檢視 PCR 產物的結果

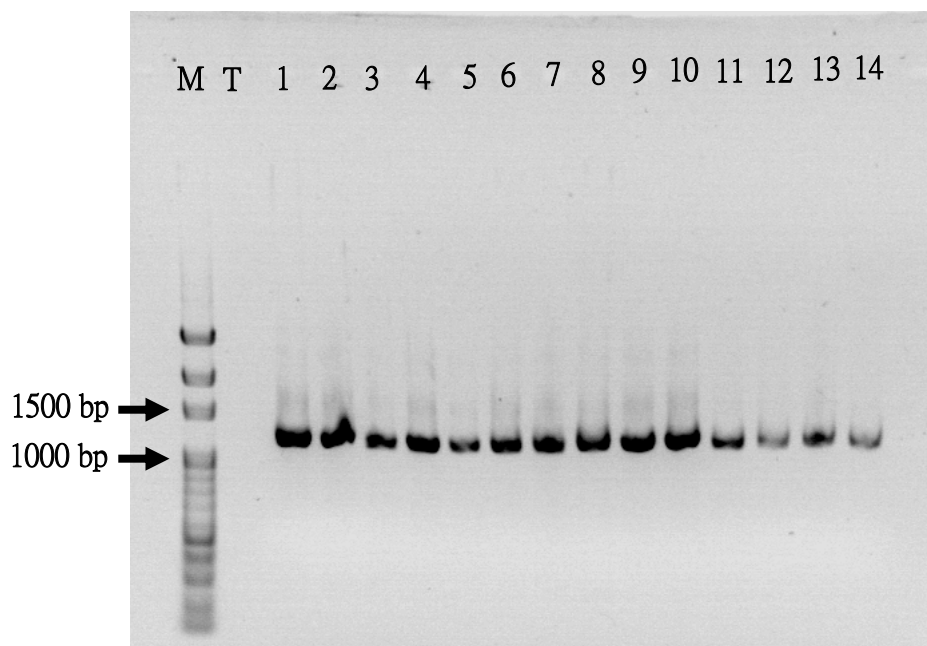
圖七中的 T (對照組：未加DNA樣本) 沒有PCR產物，可知PCR實驗過程未受污染。

由圖七可知PCR產物的片段大小位於1500 bp ~1000 bp，符合 *cyto b* 的片段大小。



圖七、檢視 PCR 產物的電泳膠片圖。M 為 1kb marker，T 為對照組，1~14 依序為 RF01、RF02、RF03、SAK01、SAK02、SAK03、SAK04、GL01、GL02、GL03、GL04、GL05、Cma01 及 Cma02。

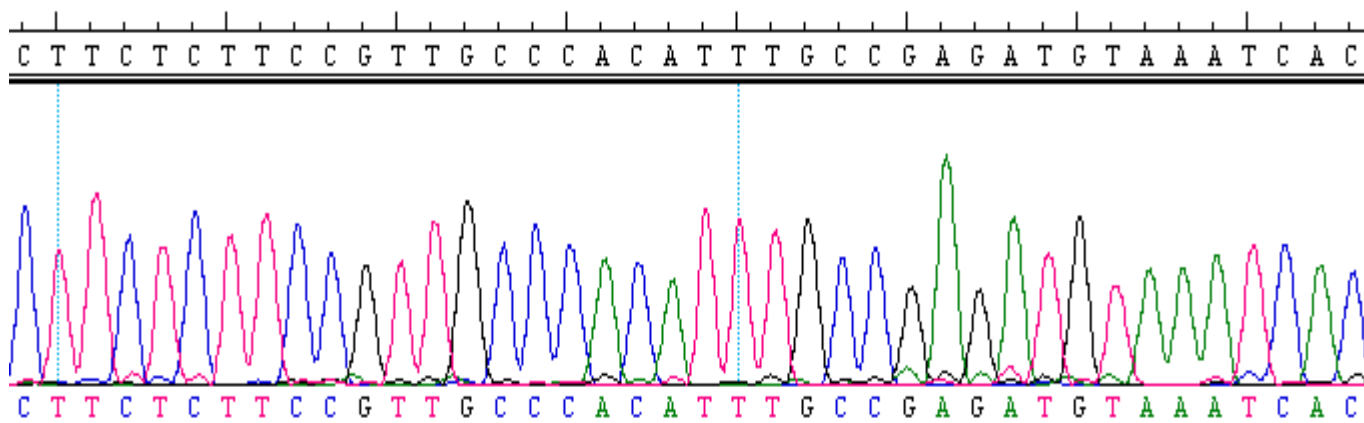
#### (四) 檢視純化 PCR 產物的結果



圖八、檢視純化 PCR 產物的電泳膠片圖。M 為 100 bp marker，T 為對照組，1~14 依序為 RF01、RF02、RF03、SAK01、SAK02、SAK03、SAK04、GL01、GL02、GL03、GL04、GL05、Cma01 及 Cma02。

#### 二、純化 PCR 產物的定序結果

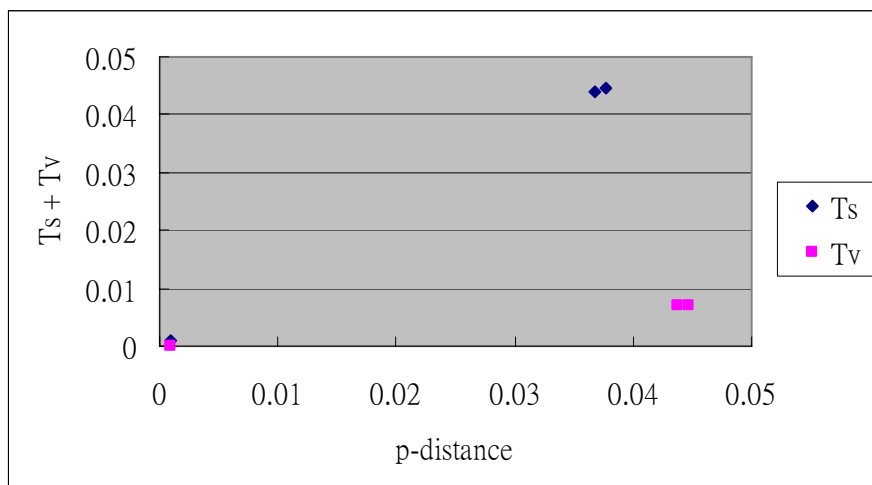
我們將 12 尾七星鱧及 2 尾斑鱧個體，合計 28 個樣本送至中研院分生所定序，定序結果良好（圖九）。以 SeqMan II 程式整理後，可得到 14 條 *cyto b* 序列進行後續分析。



圖九、七星鱧 *cyto b* 的部分定序圖形。圖形可以清楚地區別出 A、T、C 及 G，並未有嚴重的背景干擾出現。

### 三、七星鱧 cyto *b* 序列的分析結果

- (一) 總計整理出 14 條完整的 cyto *b* 序列 (全長 1141 bp)，其中 12 條為七星鱧序列，另外 2 條為斑鱧序列。12 條七星鱧序列可歸納出 2 個新紀錄單型 (Cas 01~02) 2 條斑鱧序列可歸納出 1 個新紀錄單型 (Cma 01) (圖十一，附錄一)。
- (二) cyto *b* 全長 1141 bp 可對應 380 個胺基酸 (1140/3)，而第 1141 個鹼基為 T，T 經轉錄成為 mRNA 上的 U，經由修飾作用在 mRNA 的 3' 端加上多個腺嘌呤 (poly A tail) 就形成終止密碼子-UAA。
- (三) Cas 01、Cas 02 和 AF480933 三個七星鱧單型在 T、C、A 和 G 四種鹼基的比例分別為：28.9%、31.6%、25.9% 和 13.6%，G 所佔的比例偏低是魚類 cyto *b* 序列的特徵。
- (三) 臺灣北部特有的 Cas 01 及 Cas 02 兩個七星鱧單型，在 1141 個鹼基位址中只有 1 個變異位址 (variable sites)，位在第 55 個鹼基位址。Cas 01 第 55 個位址為 A，所對應的第 19 個胺基酸為異白胺酸 (Isoleucine, I)，而 Cas 02 第 55 個位址為 G，所對應的第 19 個胺基酸為纈胺酸 (Valine, V)，屬於非同義性突變 (non-synonymous mutation) (附錄一)。
- (四) Cas 01、Cas 02 和 AF480933 三個七星鱧單型，在 1141 個鹼基位址中可發現 51 個變異位址，其中包括 1 個簡約訊息位址 (parsimony-informative sites) 和 50 個單獨變異位址 (singleton sites)。13.7% (7/51) 的變異位址位於密碼子的第一位置，密碼子的第二位置沒有任何變異，86.3% (44/51) 的變異位址位於密碼子的第三位置，這說明 cyto *b* 大部分鹼基變異都累積在密碼子的第三位置。51 個變異位址只造成 6 (6/380) 個胺基酸位址變異，這說明 cyto *b* 大部分的鹼基變異多屬於同義性突變 (374/380)。
- (五) 三個七星鱧單型間未校正的遺傳距離介於 0.09~4.47%；平均為 2.98% (表三)。由圖十可知單型間絕大部分的鹼基變異屬於轉換 (Ts)，且轉換未達飽和狀態而顛換 (Tv) 已達飽和狀態。



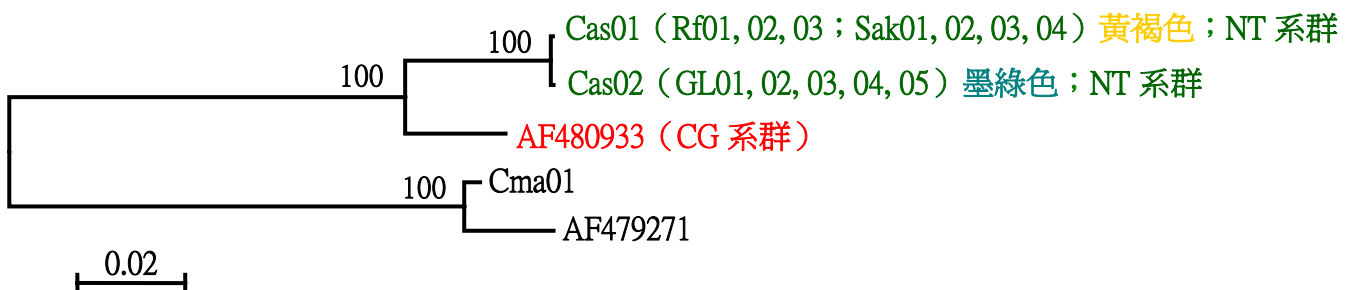
圖十、轉換 (Ts) 和 顛換 (Tv) 對未校正遺傳距離 (p-distance) 的散布圖。

#### 四、七星鱧 mtDNA cyto *b* 的親緣關係樹

- (一) 以鄰聚法所重建的七星鱧 mtDNA cyto *b* 親緣關係樹支持將七星鱧 3 個單型區分成兩群不同的演化系群，分別是台灣北部的 NT 系群和中國廣東省的 CG 系群。NT 系群包括單型 Cas01 和 Cas02，CG 系群只有單型 AF480933。在親緣關係樹中的主要分枝點，其 bootstrap 值均為 100，這表示我們建構的七星鱧 cyto *b* 親緣關係樹具有很高的可信度（圖十一）。
- (二) 對照七星鱧和斑鱧種間的平均遺傳距離為 16.65% (p-distance) 和 19.89% (K-2-p)，可知七星鱧 NT 和 CS 系群間的平均遺傳距離為 4.43% (p-distance) 和 4.61% (K-2-p)，還是屬於種內的遺傳變異，不過兩系群具有一定程度的遺傳分化（表三）。
- (三) 臺灣北部深澳坑和瑞芳鎮採集的黃褐色七星鱧個體皆屬於 Cas01，而貢寮鄉採集的墨綠色七星鱧個體皆屬於 Cas02，故兩種體色的七星鱧皆為 NT 系群（圖十一）。

表三、分別以 p-distance 與 K-2-p 計算 Cas01 (NT)、Cas02 (NT)、AF480933 (CG)、Cma01 (斑鱧) 及 AF479271 (斑鱧) 五種單型彼此間的遺傳距離 (%)。

K-2-p p-distance	Cas01 (NT)	Cas02 (NT)	AF480933 (CG)	Cma01 (斑鱧)	AF479271 (斑鱧)
Cas01 (NT)	—	0.09%	4.65%	18.76%	20.13%
Cas02 (NT)	0.09%	—	4.56%	18.88%	20.25%
AF480933 (CG)	4.47%	4.38%	—	17.94%	19.30%
Cma01 (斑鱧)	16.30%	16.38%	15.69%	—	1.96%
AF479271 (斑鱧)	17.35%	17.44%	16.74%	1.93%	—



圖十一、以鄰聚法重建的七星鱧 mtDNA cyto *b* 親緣關係樹。括號內為七星鱧單型所對應的個體，主要分支點上方數字為 bootstrap 值，Cma01 與 AF479271 為外群。

## 五、臺灣北部三處七星鱧族群內的遺傳多樣性

由表四可知個別七星鱧族群內都是相同單型，故無任何遺傳變異。若合併三個族群為臺灣北部地區族群，族群內的遺傳多樣性仍偏低 ( $h=0.53$ ,  $\pi = 0.00046$ )

表四、臺灣北部七星鱧族群的採集地點、族群代碼、樣本數 ( $N$ )、單型數 ( $Nh$ )、特有單型數 ( $Nuh$ )、單型種類 (Haplotype)、系群種類 (Lineage)、單型歧異度 ( $h$ ) 和核苷酸歧異度 ( $\pi$ )。

採集地點	族群代碼	$N$	$Nh$	$Nuh$	Haplotype	Lineage	$h$	$\pi$
台北縣瑞芳鎮	RF	3	1	0	Cas01	NT	0	0
基隆市深澳坑	SAK	4	1	0	Cas01	NT	0	0
台北縣貢寮鄉	GL	5	1	1	Cas02	NT	0	0
臺灣北部地區	NT	12	2	2	Cas01-02	NT	0.53	0.00046

## 六、臺灣北部三處七星鱧族群間的遺傳多樣性

(一) 因為瑞芳鎮和深澳坑有完全相同的 Cas01 單型，故族群間的  $F_{st}=0$ 。反觀瑞芳鎮和貢寮鄉 與 深澳坑和貢寮鄉的兩種配對組合，族群間完全沒有相同的單型，故族群間的  $F_{st}=1$ 。 $F_{st}$  值範圍介於 0 和 1 之間，0 表示族群間完全沒有遺傳分化，可能是族群間基因交流完全不受限制所造成。1 表示族群間有顯著遺傳分化，可能是族群間完全沒有基因交流所造成 (表五)。

(二) 三處七星鱧族群間的平均核苷酸歧異度 ( $D_{xy}$ ) 為 0.000587，表示臺灣北部七星鱧族群間 cyto *b* 序列的遺傳多樣性偏低。

表五、上半部為台灣北部三處七星鱧族群間之核苷酸歧異度 ( $D_{xy}$ )，下半部為台灣北部三處七星鱧族群間遺傳分化指數 ( $F_{st}$  index)

$F_{st}$ \ $D_{xy}$	RF	SAK	GL
RF	—	0	0.00088
SAK	0	—	0.00088
GL	1	1	—



## 陸、討論

### 一、臺灣北部與中國大陸七星鱧分屬不同 *cyto b* 演化系群的成因

約五百萬年前歐亞大陸板塊和菲律賓海板塊互相擠壓，造成最初的臺灣島自海底抬升，直到兩百多萬年前臺灣島大致成形。最初的台灣並沒有純淡水魚，不過地質史上數次的冰河期會造成海平面下降，使臺灣海峽出現陸橋，透過亞洲大陸河系和臺灣河系在陸橋會合的機會，於是乎亞洲大陸上的初級性淡水魚才有可能遷徙至臺灣島，但是每次冰河期結束後緊接而來的間冰期卻會造成海平面上升使陸橋消失，於是乎臺灣和亞洲大陸之間的初級性淡水魚又開始處於長期的地理隔離狀態，直到下一次冰河期才有基因交流的機會（王，2005）。

我們的研究結果非常符合上述的論點，因為臺灣北部和中國大陸廣東省的七星鱧分屬不同的 *cyto b* 演化系群，兩系群間的遺傳距離為 4.43% 約為七星鱧和斑鱧種間遺傳距離（16.65%）的四分之一，這樣程度的遺傳變異應該是兩七星鱧族群受到長期隔離機制作用下所造成的結果，因此我們推論中國大陸的七星鱧一旦有機會拓殖到臺灣後，臺灣北部和中國大陸南方七星鱧族群間再有基因交流的機會並不高，所以造就今日臺灣北部和中國大陸的七星鱧分屬不同的 *cyto b* 演化系群。

### 二、臺灣北部不同體色七星鱧的遺傳分化程度

我們以 mtDNA *cyto b* 作為遺傳標誌可以清楚地區分出臺灣北部黃褐色七星鱧皆為單型 Cas01，而墨綠色七星鱧皆為單型 Cas02，但是兩單型間只有一個鹼基變異位址，故兩種體色的七星鱧仍屬同一 NT 系群。一個鹼基位址的變異算不算是顯著的遺傳分化呢？如果我們能增加臺灣北部地區七星鱧族群的採樣點！當樣本數目增大時，也支持族群內不是只有單型 Cas01（黃褐色），就是只有單型 Cas02（墨綠色），即說明就算只有一個位址的變異，也可以支持臺灣北部地區七星鱧有明顯的族群分化。可是現在要找到更多的七星鱧族群，也是有一定的困難度。

不同體色七星鱧在 *cyto b* 的遺傳變異偏低，可原因能是 *cyto b* 在七星鱧的突變速率不夠快速，累積的變異也不夠多，導致我們看不到預期的變異程度，所以我們可以改用 mtDNA 上的其他基因或是體染色體上一些和體色表現有關的基因作為遺傳標誌，說不定可以偵測到更顯著的遺傳變異。

我們也試著搜尋 NCBI 現有的資料庫，看看有無可利用的序列可供分析，很幸運地找到七星鱧和斑鱧的粒線體 ND2 基因序列分別是 AB197848 和 AB196282。ND2 為編碼基因全長 1043 bp，可對應 347 個胺基酸。分析後我們發現 ND 2 在種間的遺傳距離為 18.5%（193/1043）相較於 *cyto b* 種間的遺傳變異 16.65%（187/1141）只多了 6 個鹼基變異位址，說明粒線體上不同的編碼基因，在七星鱧和斑鱧種間所累積的變異位址差距並不大。因此我們合理的預測就算改用 ND2 基因當遺傳標誌時，偵測到臺灣北部不同體色七星鱧的遺傳變異還是會跟使用 *cyto b* 基因一樣極低！我們推測造成這種現象的可能成因是黃褐色和墨綠色七星鱧族群形成

地理隔離的年代，應該是在臺灣地質史上的晚期。

鄭（2007）曾研究過七星鱧先天的行為模式，因為鄭和我們有相同的科展指導教師，所以我們和鄭所使用的實驗材料是同一批七星鱧活體。根據鄭的科展報告和老師的說明，我們發現一個非常有趣的現象，採集自瑞芳鎮的黃褐色七星鱧個體（Cas01 單型）在沒有水管時會將土堆挖出一個坑洞躲藏；而採集自貢寮鄉的墨綠色七星鱧個體（Cas02 單型）在沒有水管時則不會挖土。這個結果證實不同體色七星鱧具有不同的先天行為模式，即支持不同體色七星鱧具有顯著遺傳分化，因為動物先天的本能行為都是由某些特定的基因所決定！或許未來我們可以設計相關的實驗方法，檢測不同體色七星鱧間是否存更多不同的先天行為模式？

### 三、臺灣北部三處七星鱧族群的遺傳多樣性偏低的成因

臺灣北部三處七星鱧族群內均無任何遺傳變異（ $h=0$ ， $\pi=0$ ），而存在於族群間的遺傳變異也是非常低（ $D_{xy}=0.000587$ ）。可能的原因有下列兩點：第一點、七星鱧族群的採集點及個體樣本數過少，使我們只發現少部分的 *cyto b* 單型，無法反映出七星鱧實際的遺傳多樣性。事實上七星鱧為食肉性魚種，屬於淡水生態系中能量塔頂端的消費者，個體數量本來就比一般常見的雜食性魚類少，再加上現在要在野外找到有七星鱧的水域並不容易，老師說他也是找很久才找到這三處七星鱧族群，所以造成七星鱧遺傳多樣性偏低的主因可能以第二點的機率較高。

第二點、七星鱧棲息地在幾十年間大量消失和外來種大型鱧科魚類的競爭性排除效應（competitive exclusion）可能才是造成七星鱧遺傳多樣性大量喪失的主因（鄭等，2007）。根據老師的口述，基隆市深澳坑附近一口有七星鱧的野塘變成了汽車駕訓班，一條有七星鱧的野溪變成了垃圾掩埋場的下水道，一口有七星鱧的野塘變成了泰國鱧（外來種）的地盤。所以當我們花費更多時間、物力及財力收集較多臺灣北部地區的七星鱧樣本進行後續研究，結果很有可能還是遺傳多樣性偏低。

### 四、未來展望

根據前人的研究，一些臺灣特有的溪流性淡水魚，例如臺灣鬚鱨（*Candidia barbatus*）和粗首鱨（*Opsariichthys pachycephalus*）在臺灣北部、中部及南部都存在不同的 *cyto b* 演化系群，而且南部和北部系群的遺傳變異接近 4.9%（粗首鱨）和 9.8%（臺灣鬚鱨）（王，2005；粘等人，2006）。而七星鱧屬於平原性魚類棲息於池塘、湖泊及沼澤等靜態水域，對水質的溶氧量要求低，遷移能力較佳。因此我們未來想收集臺灣中部及南部的七星鱧樣本進行更完整的研究，檢測臺灣島上的七星鱧和溪流性魚類是否有類似的 *cyto b* 系群分佈模式？

## 柒、結論

- 一、成功設計出放大鱧屬魚類 mtDNA cyto *b* 的 PCR 引子對
- 二、發現2個臺灣七星鱧的新紀錄單型 (Cas 01, Cas 02) 和1個臺灣斑鱧的新紀錄單型 (Cma 01)
- 三、七星鱧 cyto *b* 的親緣關係樹支持將 3 個單型區分成兩群演化系群，分別是台灣北部的 NT 系群和中國廣東省的 CG 系群。NT 系群包括單型 Cas01 和 Cas02，CG 系群只有單型 AF480933。
- 四、黃褐色七星鱧皆屬於單型 Cas01，而墨綠色七星鱧皆屬於單型 Cas02，但 Cas01 和 Cas02 在 cyto *b* 序列只有一個位址的鹼基變異。
- 五、臺灣北部三處七星鱧族群內和族群間的遺傳多樣性皆偏低。

## 捌、參考資料

- 一、高一基礎生物，趙大衛 主編，翰林出版社出版
- 二、高三生物（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、沈世傑，1993，臺灣魚類志。臺灣大學動物學系出版
- 五、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。
- 六、白俊杰、葉星、簡清、羅建仁，農業生物技術學報，2003，11（3）：325~326
- 七、黃光中、楊文學、張貽順，〈河北漁業〉2004 年第 4 期（總第 136 期）。
- 八、王晨帆，2005，台灣鬚鱨（鯉形目：鯉科）的親緣地理及形態變異之研究。國立臺灣大學動物學研究所碩士論文
- 九、粘閩智、邱瓏臻、王晨帆，粗首鱨遺傳多樣性與形態變異之研究。中華民國第四十六屆中小學科學展覽會
- 十、鄭仕群、王晨帆，2007，鮎鰻（*Channa asiatica*）的形態、棲地及行爲模式研究。中華民國第四十七屆中小學科學展覽會
- 十、臺灣特有生物保育中心網頁  
[http://enanimal.tesri.gov.tw/main/animal\\_sub.asp?item=3&Icategory=4&id=831](http://enanimal.tesri.gov.tw/main/animal_sub.asp?item=3&Icategory=4&id=831)
- 十一、大陸七星鱧照片  
<http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.cfm?ID=7756&what=species>
- 十二、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）

## 玖、致謝

特別感謝國立臺灣大學臨床醫學所分子演化研究室的支持與鼓勵！

## 拾、附錄

### 七星鱧 Cas01 單型

1 ATGGC AAATC TACGA AAAAC ACACC CCCTC CTA~~A~~A AATCG CAAAC GACGC  
51 TCTCA TTGAC TTACC AACCC CAACA AGCAT TTCAG CATGA TGAAA CTTCG  
101 GCTCC CTCTT AGGAC TATGC CTTGT GGCAC AGATT ATCAC AGGAC TCTTC  
151 CTTGC AATAC ATTAC ACAGC TGACA TCACC ACAGC CTTCT CTTCC GTTGC  
201 CCACA TTTGC CGAGA TGTA~~A~~ ATCAC GGCTG ACTAA TCCGC AACCT CCACG  
251 CCAAC GGCGC ATCCT TTTTC TTCAT TTGTA TTTAC CTTCA CATTG GACGT  
301 GGCCT ATACT ACGGC TCCTA CCTCT ACAA GAAAC ATGAA ACATC GGAGT  
351 AATTC TCCTA CTTCT AGTAA TAATA ACTGC TTTCG TAGGC TATGT CCTAC  
401 CCTGA GGACA AATAT CTTTC TGAGG GGCCA CTGTA ATTAC CAACC TTCTC  
451 TCCGC CATCC CCTAC GTGGG CAACA TGCTC GTAGA ATGAA TCTGA GGGGG  
501 GTTTT CAGTA GACAA TGCAA CTCTC ACCCG TTTTT TCGCC TTCCA CTTC  
551 TATTC CCCTT TCTAA TTGCA GCCTT CACAA TCATT CACCT TTTAT TTCTT  
601 CACGA AACAG GCTCA ACCAA CCCTG TTGGC CTA~~A~~A CTCAG ATGCA GACAA  
651 AATCC CCTTT CACCC CTA~~C~~T TTTCA TACAA AGACC TTTTA GGTTT CGCAA  
701 TCCTC TTAAT TGCCC TCATT TCCCT GTCAT TATTT GCCCC AAACC TTTTA  
751 GGAGA CCCTG ACAAT TTTAC CCCCC CCAAT CCACT AGTCA CCCCT CCCCCA  
801 CATCA AGCCA GAATG ATACT TCCTT TTCGC CTATG CCATC TTACG ATCAA  
851 TCCCT AACAA ACTAG GAGGT GTTCT CGCTC TACTA GCCTC CATCT TAGTC  
901 CTAAT GCTTG TACCA ATCCT ACACA CCTCC AAACA ACGAA GCCTC ACATT  
951 TCGAC CCCTT ACTCA ACTAC TCTTC TGACT CTTAG TCGCT GACGT AATTA  
1001 TCCTC ACCTG AATTG GAGGC CTTCC AGTAG AACAC CCCTA CGTCG TTATT  
1051 GGACA AATCG CCTCC TTCCT TTATT TCTTC CTATT TCTAT TCCTA ATTCC  
1101 TCTAT CAGGC TGACT AGAAA ATAAA GCCCT AAAAT GATCC T

註：紅色鹼基為第 55 個位址

## 七星鱧 Cas02 單型

1 ATGGC AAATC TACGA AAAAC ACACC CCCTC CTAAA AATCG CAAAC GACGC  
51 TCTCG TTGAC TTACC AACCC CAACA AGCAT TTCAG CATGA TGAAA CTTCG  
101 GCTCC CTCTT AGGAC TATGC CTTGT GGCAC AGATT ATCAC AGGAC TCTTC  
151 CTTGC AATAC ATTAC ACAGC TGACA TCACC ACAGC CTTCT CTTCC GTTGC  
201 CCACA TTTGC CGAGA TGATA ATCAC GGCTG ACTAA TCCGC AACCT CCACG  
251 CCAAC GGCGC ATCCT TTTTC TTCAT TTGTA TTTAC CTTCA CATTG GACGT  
301 GGCCT ATACT ACGGC TCCTA CCTCT ACAA GAAAC ATGAA ACATC GGAGT  
351 AATTC TCCTA CTTCT AGTAA TAATA ACTGC TTTCG TAGGC TATGT CCTAC  
401 CCTGA GGACA AATAT CTTTC TGAGG GGCCA CTGTA ATTAC CAACC TTCTC  
451 TCCGC CATCC CCTAC GTGGG CAACA TGCTC GTAGA ATGAA TCTGA GGGGG  
501 GTTTT CAGTA GACAA TGCAA CTCTC ACCCG TTTTT TCGCC TTCCA CTTCC  
551 TATTC CCCTT TCTAA TTGCA GCCTT CACAA TCATT CACCT TTTAT TTCTT  
601 CACGA AACAG GCTCA ACCAA CCCTG TTGGC CTAAA CTCAG ATGCA GACAA  
651 AATCC CCTTT CACCC CTA CTACT TTTCA TACAA AGACC TTTTA GGTTC CGCAA  
701 TCCTC TTAAT TGCCC TCATT TCCCT GTCAT TATTT GCCCC AAACC TTTTA  
751 GGAGA CCCTG ACAAT TTTAC CCCCC CCAAT CCACT AGTCA CCCCT CCCCA  
801 CATCA AGCCA GAATG ATACT TCCTT TTCGC CTATG CCATC TTACG ATCAA  
851 TCCCT AACAA ACTAG GAGGT GTTCT CGCTC TACTA GCCTC CATCT TAGTC  
901 CTAAT GCTTG TACCA ATCCT ACACA CCTCC AAACA ACGAA GCCTC ACATT  
951 TCGAC CCCTT ACTCA ACTAC TCTTC TGACT CTTAG TCGCT GACGT AATTA  
1001 TCCTC ACCTG AATTG GAGGC CTTCC AGTAG AACAC CCCTA CGTCG TTATT  
1051 GGACA AATCG CCTCC TTCCT TTATT TCTTC CTATT TCTAT TCCTA ATTCC  
1101 TCTAT CAGGC TGACT AGAAA ATAAA GCCCT AAAAT GATCC T

註：紅色鹼基為第 55 個位址

## 斑鱧 Cma01 單型

1 ATGGC AAACC TACGA AAGAC TCACC CCCTC CTAAA AATCG CAAAC GACGC  
51 ACTAA TCGAC CTACC CACCC CCTCA AGTAT CTCAG CATGA TGAAA CTTCG  
101 GCTCC CTATT AGGAC TTTGC CTAGT AGCAC AAATT ATCAC CGGAC TATTC  
151 CTCGC CATGC ACTAC ACATC CGACA TTA CTACT ACAGC TTTT CATCC GTCGC  
201 CCACA TTTGC CGAGA CGTGA ACTAC GGCTG ACTCA TCCGA AACCT CCATG  
251 CCAAC GGC GC ATCTT TCTTT TTCAT CTGCA TCTAC CTCCA TATCG GACGA  
301 GGCCT GTACT ACGGC TCCTA CCTCT ATAAA GAAAC ATGAA ACGTC GGC GT  
351 TGTCT TATTA CTCCT GGTCA TAATA ACTGC TTTCG TTGGC TATGT CCTCC  
401 CCTGA GGACA GATGT CTTTC TGAGG GGCCA CCGTT ATCAC CAACC TCCTT  
451 TCAGC TGTCC CCTAC GTAGG AAACA TGCTT GTAGA GTGAA TCTGA GGCGG  
501 ATTTT CAGTT GATAA CGCCA CCCTT ACCCG ATTCT TCGCC TTCCA CTTC  
551 TATTC CCGTT TCTAA TTGCA GCCTT CACAA TCATT CACCT ATTAT TCCTC  
601 CACGA GACCG GTTCA ACCAA CCCAG TGGGC CTAAA CTCAG ACGCA GACAA  
651 AATCC CCTTC CACCC CTACT TCTCT TATAA AGACC TCCTA GGCTT TGCTA  
701 TTCTT CTAAT TACCC TCATC TCTCT ATCCC TATTC GCCCC CAACC TCTTA  
751 GGAGA CCCAG ACAAC TTCAC CCCCC CTAAC CCACT AGTCA CACCA CCCC  
801 TATCA AACCA GAATG AACT TCCTA TTCGC CTACG CCATC CTGCG ATCCA  
851 TTCCC AACAA GCTAG GGGGC GTACT CGCAC TGCTA GCCTC CATCC TG GTT  
901 CTTAT GCTAG TCCCA ATCCT CCACA CCTCC AAACA ACGAA GCCTT ACATT  
951 CCGAC CACTC ACCCA GCTAT TATTC TGACT TCTGG TTGCA GATGT AATCA  
1001 TCCTT ACCTG AATCG GAGGC CTGCC TGTAG AGCAC CCCTA CGTTG CCATC  
1051 GGACA AGTCG CCTCT TTCCT TTA CTACT TCTCC CTCTT CCTAG TATTT ATCCC  
1101 CCTAT CAGGC TGACT GGAAA ATAAA GCCCT GAAAT GATCT T

**【評語】** 040719

能利用分子科技論證物種在地理隔離之分化情節，誠值嘉勉，但若綜合形態與分子特徵之分析來論述尤佳。  
樣本數加多，有利於分析及解釋數據。