

16s rRNA 片段序列於台灣黑鰻苗品種鑑定之應用

Using PCR analysis of the mitochondrial 16S rRNA partial sequence to identify Genus *Anguilla* other than Japanese eel (*Anguilla japonica*) in Taiwan

黃瀛生^{12*} 張格銓¹ 黃尉東^{2#} 劉富光^{3#}

¹行政院農業委員會 水產試驗所 淡水繁養殖研究中心 (彰化縣鹿港鎮海埔里海埔巷 106 號)

²大葉大學 分子生物科技學系 (彰化縣大村鄉學府路 168 號)

³行政院農業委員會 水產試驗所 (基隆市和一路 199 號)

fuliu@mail.tfrin.gov.tw

摘要

傳統之物種分類主以外觀形質作為鑑定之依據，如鑑定對象為殘缺標本、幼生或產製品時，或魚類生長初期之多次形態變換階段，如以此等方式鑑定之準確度則有限。鰻魚成長分為柳葉期(Leptocephalus)、玻璃體期(Glass eel)、幼鰻(Elvers)、黃鰻(Yellow eel)及銀鰻(Silver eel)等數個階段，先前均以體全長及身體各形質長度之比例及脊椎骨數作為分類依據，然此有限之條件下，鑑定極可能發生錯誤，故現已利用 DNA 序列分析技術以為鑑定分類之依據。利用鱸鰻、太平洋雙色鰻及呂宋鰻之肌肉組織萃取 genomic DNA 後，以 PCR 增幅粒線體 16S rRNA 並定序，比對 NCBI 資料庫後可準確鑑定出不同種類之鰻魚，演化樹分析亦顯示不同種鰻魚之分群亦異。前述技術可準確鑑定台灣現有鰻魚之種類，並可應用於生態方面之研究，以為鑑定之依據。

Keywords: genes *Anguilla*, mtDNA16S rRNA, Identify

前言

日本鰻(*A. japonica*)為台灣產值最高之淡水養殖魚種，其種苗來源完全仰賴野外捕撈。而台灣除日本鰻(又稱白鰻)外，尚有鱸鰻(*A. marmorata*)、太平洋雙色鰻(*A. bicolor pacifica* Tzeng & Tabeta 1981)、西里伯斯鰻(*A. celebesensis*; 曾，1982)及呂宋鰻(*A. luzonensis* Watanabe, Aoyama & Tsukamoto, 2009)等四種，其中以鱸鰻最為常見(曾，1983)。捕撈白鰻苗時常混獲(bycatch)上述四種鰻苗，因為其尾部有黑色素堆積，坊間統稱為黑鰻，早期因為鰻魚價格較低及鱸鰻被列為保育物種等因素，大多直接棄置。然近年來，因種苗捕撈量嚴重不足，替代鰻種之養殖逐漸興起，亦開始有相關產製品於市面銷售。對於產製品與魚苗而言，使用分子鑑定輔助傳統分類法，已廣被採用。

材料及方法

1. 試驗材料：由行政院農業委員會水產試驗所淡水繁養殖研究中心處取得，鱸鰻、太平洋雙色鰻及呂宋鰻各 3 尾共 9 尾之肌肉組織，置於 1.5ml 之 eppendorf 於-80°C 保存。
2. genomic DNA 萃取：將肌肉組織研磨後加入 MasterPure DNA Purification Kit (EPICENTRE) 按照步驟完成所有反應後加入 Isopropanol 將溶液中的 gDNA 沈澱並以高速離心機 4°C 10000rpm/min 的條件下離心沈澱，再以酒 75%精沖洗兩次後至於室內自然風乾 6 小時，後加入 1X TE Buffer 溶解，靜置至隔天，再以 NanoDrop 2000 (Thermo) 核酸分析儀測定濃度後保存於-80°C 備用。
3. mtDNA 16S rRNA 之 PCR 試驗：選擇特異性引子 L1854: 5'-AAACCTCGTACCTTTTGCAT-3' (Forward) 及 H3059: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' (Reverse) (Miya and Nishida, 1996; Aoyama et al., 2000)。將此對引子與 gDNA 進行 PCR 反應，以增幅 16S rRNA 長度約 1.3 kb 之片段。反應試液包括：1 µl 細胞 DNA 全液 (25 ng/µl)，1 µl 10 mM dNTP，1 µl 10 µM L1854，1 µl 10 µM H3059，5 µl Reaction Buffer (10X)，0.2 µl Super-Therm (5U/µl)及無菌水 40.8 µl，總體積 50 µl。PCR 反應機型為 MyCycler thermal cycler (Bio-Rad)。增幅反應條件為：變性 (denaturation) 94°C，5 分鐘，接著進行 30 個循環的變性 (denaturation) 94°C，30 秒，黏合 (annealing) 52°C，30 秒及延長 (extension) 72°C，1 分鐘，最後再於 72°C 延長 7 分鐘後，降至 4°C 終止反應。
4. 序列分析：16S rRNA 之 PCR 產物委託昕穎生醫技術股份有限公司定序後，選取共識序列以供比對與分析。蒐集 NCBI 資料庫的黑鰻鰻線序列資訊(AB021760、AB021757 與 HQ1979307) 與本實驗 16S rRNA 片段序列資訊，以 seaview 4 軟體進行比對與分類，分類後將各樣本進行序列差異比對。

結果

樣品經比對 16S rRNA 定序後，選擇共識序列長度約 850bp，以 NCBI 資料庫 BLAST 發現三種鰻魚樣本分別與資料庫中之 AB021760、AB021757 與 HQ1979307 序列資訊相似度達 99%~100%，續以 SEAVIEW 4.0 軟體校準後發現，本次試驗之鱸鰻樣本序列與 AB021760 序列並無差異(相同百分比 100%)，而太平洋雙色鰻與 AB021757 具 3~5 個變異位點(相同百分比 99.4~99.8%)，呂宋鰻樣本中僅 M2 與 HQ1979307 具 10 個變異位點(相同百分比 98.8%) (表 1)。使用 Neighbor-joining method 所得之演化樹(phylogenetic tree)結果顯示 (圖 1)，三種鰻魚各自分群，意即使用 16S rRNA 作為鰻魚分類依據為一成熟且值得信賴之方法。

結論

以往文獻認為台灣原有 4 種鰻魚(genus *Anguilla*)分佈，其中日本鰻分類為溫帶鰻種，其他三種鰻屬於熱帶鰻種(Tesch, 2003)。Watanabe 等人(2009)與 Teng 等人(2009)分別發表了新種呂宋鰻(又稱黃氏鰻)，所以應該有五種鰻魚(張等, 2011)。其中白鰻因為在鰻苗時期尾部不會形成黑色素堆積，所以很容易被區分出來，太平洋雙色鰻(又稱短鰭鰻)因為背鰭起點幾乎與肛門口同位

置，又尾點黑色素堆積位置與其他鰻魚不同(圖 2)，故於鑑定上極易被區分，而鱸鰻、呂宋鰻之身體型態與以往被鑑定確認之西里伯斯鰻極相似(表 2)。鱸鰻背鰭起點至肛門間距/體全長之比例(ADL/%TL)遠高於另外兩種，故可利用此特徵鑑定出鱸鰻。而西里伯斯鰻跟呂宋鰻不管在外觀或身體形質上均無法有效分辨，故鑑定魚苗時，無法分辨這兩種魚類(Leander *et al.*, 2012)，而鰻魚產製品更加難以分辨。游本研究之結果顯示，使用粒線體 16s rRNA 片段序列鑑定台灣現有之鰻魚種類為一準確之方式，此可應用於台灣鰻魚之生態研究及鰻魚產製品，以為鑑定之依據。

參考文獻

- 曾萬年(1982)，記灣新紀錄之西里伯斯鰻鰻線。生命科學第 19 期，57~66。
- 曾萬年(1983)，台灣產鰻線之種類識別及其生產量。中國水產，366:16-23。
- 張格銓、黃瀛生、劉富光(2011) 台灣到底有幾種鰻線？水產電子報第 66 期。
- Aoyama J., N. Mochioka, T. Otake, S. Ishikawa, Y. Kawakami, P. Castle, M. Nishida, K. Tsukamoto(1999) Distribution and dispersal of anguillid leptocephali in the western Pacific Ocean revealed by molecular analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 188: 193-200.
- Aoyama, J., S. Watanabe, M. Nishida and K. Tsukamoto (2000) Discrimination of catadromous eel species, genus *Anguilla*, using PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 16S rRNA domain. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 129: 873–878.
- Leander N. J., K. N. Shen, R. T. Chen and W. N. Tzeng (2012) Species composition and seasonal occurrence of recruiting glass eels (*Anguilla* spp.) in the Hsiukuluan river, eastern Taiwan. *Zoological studies*, 51: 59-71.
- Miya, M. and M. Nishida (1996) Molecular phylogenetic perspective on the evolution of the deep-sea fish genus *Cyclothone* (Stomiiformes: Gonostomatidae). *Ichthyol Res.*, 43: 375-398.
- Teng H.Y., Y.S. Lin, C.S. Tzeng. 2009. A new *Anguilla* species and a reanalysis of the phylogeny of freshwater eels. *Zool. Stud.* 48: 808-822.
- Tesch FW. (2003). *The eel*, 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell Science.
- Tzeng, W. N. and O. Tabeta (1983) First record of the short-finned eel *Anguilla bicolor pacifica* elvers from Taiwan. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 49: 27-32.
- Watanabe, S., J. Aoyama, K. Tsukamoto (2009) A new species of freshwater eel *Anguilla luzonensis* (Teleostei: Anguillidae) from Luzon Island of the Philippines. *Fish. Sci.*, 75: 387-392.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP007239> (2/11/2012)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB021757> (2/11/2012)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ1979307> (2/11/2012)
- <http://www.fishbase.org/summary/Anguilla-marmorata.html> (2/11/2012)

表 2、台灣產四種鰻魚之各項分類形質依據比較

Species	No. of vertebrae	ADL/% TL	reference
<i>A. marmorata</i>	100~110	16.3	FISHBASE
<i>A. bicolor pacifica</i>	107~110	0.2	Tzeng & Tabeta, (1981)
<i>A. luzonensis</i>	103~107	10.4	Watanabe <i>et al.</i> , (2009)
<i>A. celebesensis</i>	101~110	10.1	曾 (1982)

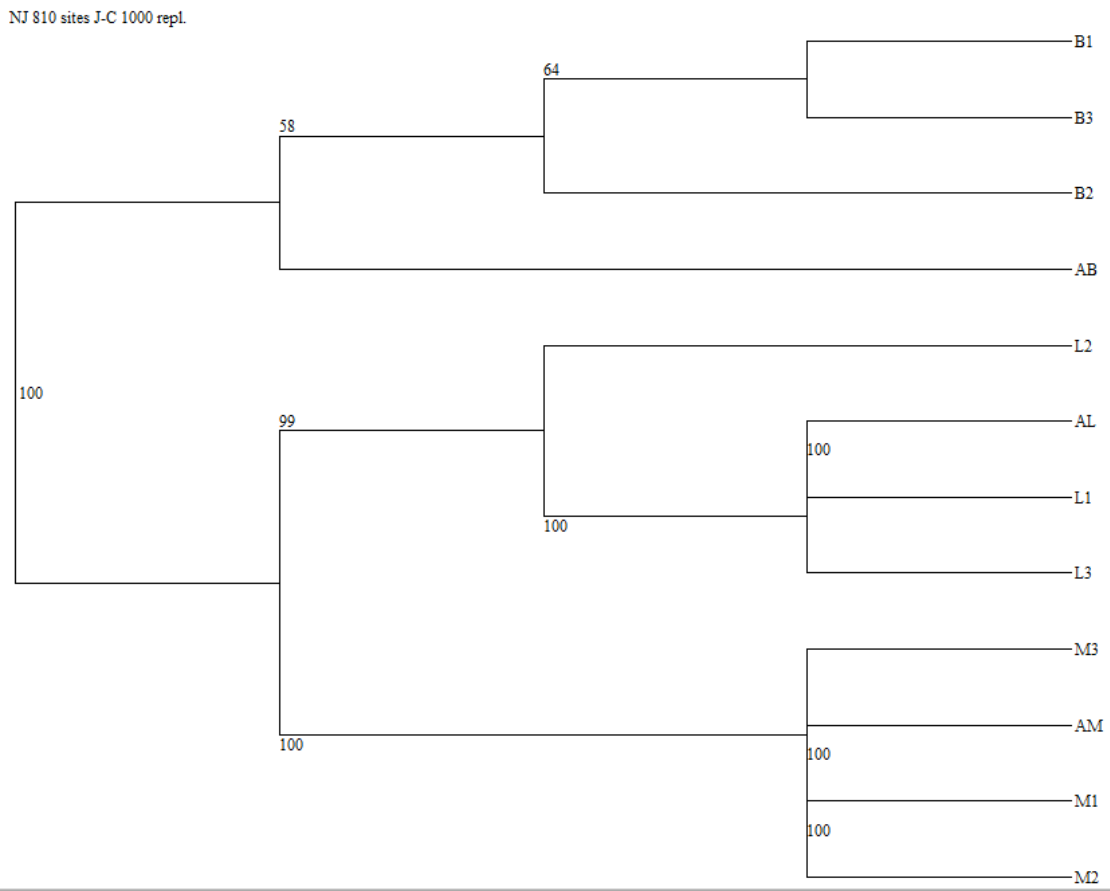


圖 1、演化樹(phylogenetic tree)顯示三種鰻魚之分群狀態

AM (NCBI accession No. AP007239) & M1~3: *A. marmorata*, AB (NCBI accession No. AP007239) & B1~3: *A. bicolor pacifica*, AL (NCBI accession No. AP007239) & L1~3: *A. luzonensis*)

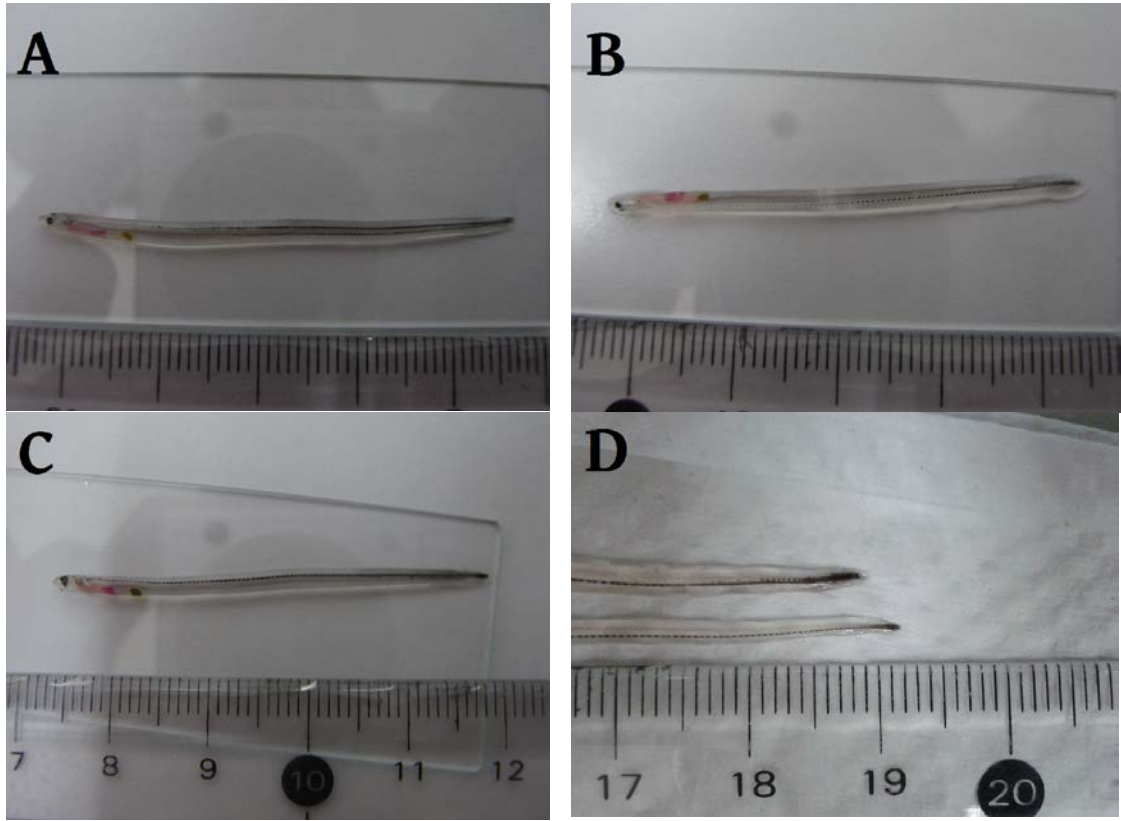


圖 2、A 鱸鰻，B 太平洋雙色鰻，C 呂宋鰻，D 鰻苗尾點位置比較圖，其他鰻(上)黑色素集中於尾柄上，太平洋雙色鰻(下)黑色素集中於尾鰭末端。