
開發台灣鮭魚的分子標記

受委託者：國立台灣海洋大學

研究主持人：郭金泉

研究助理：徐德華

內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告

中華民國九十五年十二月

第一章 緒論

陸封型台灣鮭魚（櫻花鉤吻鮭；*Oncorhynchus masou formosanus*）為台灣特有的珍稀魚類。據推測，它是冰河時期為躲避嚴寒或迷途而到台灣。後來，由於冰河消退、氣溫上升、河川變遷、襲奪、棲地改變、陸封或迷失歸途等因素，台灣鮭魚無法再洄游至大海，滯留於台灣逐漸演化為陸封鮭魚，是分佈於地球北半球最南端的鮭科魚類。因其地理位置的獨特性，台灣鮭魚在日本領台時期就被列為天然紀念物刻意保護。但自20世紀40年代以來，因為人類活動頻繁，破壞棲地、污染水質和過度獵撈等因素，使得台灣鮭魚的分佈範圍和數量銳減。目前生存區域僅限於大甲溪上游支流七家灣溪上游五公里的範圍內，族群數量急劇變動，數量最少時甚至僅存三百餘尾。鑒於台灣鮭魚在保育生物、生物多樣性保護和生物學研究中的重要意義，政府保育單位將其奉為“國寶”魚優先進行保護。近年來，在雪霸國家公園的努力下，逐步改善棲地環境，並進行台灣鮭魚的人工繁殖復育放流，使得鮭魚的族群數量有某程度的恢復。然而，台灣鮭魚族群數量本來就較少，又因為每年颱風山洪等天然災變，使得族群數量起伏變動頻繁，此時極易發生遺傳瓶頸效應、導致遺傳漂變和近交衰退，造成群體中某些對偶基因喪失多樣性，遺傳變異程度下滑，族群的演化潛力和適應環境變化的能力也隨之降低。因此，深入研究其遺傳多樣性，瞭解台灣鮭魚的基因結構，是估算其族群演化潛力，提供管理者擬定保育策略的重要資訊。

隨著分子生物學技術的快速發展，在保育遺傳學的研究領域中日益廣泛的使用各種分子標記，用以估算族群的遺傳多樣性及親緣關係；例如隨機擴增多樣性 DNA(RAPD)、限制性片段長度多樣性(RFLP)、擴增酶切片段長度多樣性(AFLP)、微衛星標記(SSR; simple sequence repeat)和數量可變串聯重複(VNTR; minisatellite)、粒線體 DNA(mt DNA)序列分析等技巧。其中 AFLP 標記被認為是最靈敏有效的分子標記之一，它結合了 RFLP 的準確性和聚合酵素鏈鎖反應(PCR)的高效性，具有所需樣本量少、實驗結果穩定可靠、再現性高、多樣性

檢出率高等優點，非常適合做為分析族群遺傳多樣性的工具。目前研究台灣鮭魚遺傳多樣性的報告極為有限，為提供更確實可靠的數據做為保護台灣鮭魚遺傳多樣性的理論根據，本研究承接去年的計畫成果，同樣利用 AFLP 分子標記技術，再一次調查同河段台灣鮭魚族群的遺傳多樣性，並比較二年調查結果的異同，分析其代表的意義。

第二章 前人研究

2.1 遺傳標記的應用與發展

早期生物分類學家以形態、解剖、行為、生態等資料作為分類的依據。到了1960年代，由於遺傳、生物化學、細胞學、分子生物學等的蓬勃發展，闡明遺傳學的分子基礎後，蛋白質、去氧核糖核酸、核糖核酸等，就成了研究族群遺傳結構及分類單元間親緣關係的有效工具，並逐漸成為研究物種分類及生物演化的重心。DNA分類學（DNA taxonomy）或稱分子遺傳分類(molecular taxonomy)儼然成形。理想的遺傳標記（genetic marker）應該具有多樣性高、遺傳穩定、遺傳方式簡單、能檢測整個基因組、不受內外環境影響、操作經濟、簡單等基本特性。由於形態學標記及細胞學標記的訊息量小，在基因表現的過程又受到生物體與環境的交互作用影響，在使用上有時頗受限制。而生化標記如蛋白質及同功異構酶 (Isozyme electrophoresis)等分析結果又受採取分析部位的不同而異，不甚穩定、或易受環境因素之影響，並且不是每一種蛋白質均可利用分析，後轉譯之修飾亦可造成酶型之不同，無法確實的表現出基因本質上的變異。DNA分子標記則是在DNA層次上直接反應出遺傳變異，具有訊息量大、遺傳穩定的特點，又因為許許多多樣性標記在非基因表現的區域上，所以不會受到環境及基因表現與否的影響，在某時候是最為理想的遺傳標記。

2.2 AFLP分子標記

近年不斷有學者提出新的DNA分子標記，茲將目前最常用的四種分子標記（RFLP、RAPD、AFLP和SSRS）比較整理如(表1)。一個理想的分子標記必須具備下列條件：(1)為DNA的直接表現，在生物體各組織、各發育階段都可檢測，不受季節、環境等限制，也不存在表達與否的問題；(2)標記數量極多，除特殊位點之標記外，均勻分佈於整個基因組；(3)符合孟德爾遺傳定律；(4)DNA的多樣性高，自然存在許多等位對偶變異；(5)標記表現為共顯性的特點，可區分異

型接合體或同型接合體；(6)能明確辨別等位對偶基因；(7)標記具再現性，在實驗室間重複性高；(8)檢測方法簡單、快速、自動化；(9)開發成本與使用成本低廉；(10)非侵入性，盡量不傷害樣本生物。然而，目前尚無任何一種分子標記技術可滿足以上所有的要求，因此需視研究的主題選用合適的分子標記。其中由 Vos 等在 1995 提出的擴增片段長度多樣性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技術，為新一代之分子標記，具有所需樣本量少、實驗結果穩定可靠、再現性高、多樣性檢出率高等優點，非常適合用於基因可能趨於同質，且尚不知其基因組序列的台灣鮭魚之遺傳多樣性研究。

AFLP 原理系將基因組 DNA (genomic DNA) 經過二種特定限制核酸內切酶處理，再與特定之接合子 (adapter) 接合，作為擴增 DNA 片段的範本，另外設計能配合接合子的引子對 (primer)，並在末端上分別增加 2~3 個選擇性核苷酸的特定引子，進行 PCR 反應。選擇性引子對 (selective primer) 能識別具有特異配對順序的特定 DNA 片段，然後將擴增片段 DNA 在高解析度的序列分析膠^前 前人研究以其呈現不同的 DNA 片段條帶作為 DNA 指紋。其涵義為每一物種的基因組 DNA，若在限制核酸內切酶的辨識位點發生改變，則酶切後的片段數量與大小均不相同，可以做為評估生物遺傳差異的方式。

除了測定物種基因多樣性之外，AFLP 亦非常適合應用在分子育種，並做為種原鑒定、基因標定及建構遺傳圖譜的工具，目前已經被使用在鮭魚的數量性狀基因座定位 (QTL mapping) (Liu et al. 1998)；在建構白蝦的 AFLP 遺傳圖譜上 (Pe'reza 2004)。在 Wang 等 (2004) 的研究中，發現 6 種對蝦各自具有的特殊 AFLP 片段 (基因座)，這些特殊的基因標記片段，可解決對蝦在幼苗時期，以外觀形態不易分辨的問題。另外在王等 (2004) 的研究中，開發出篩選鋸緣青蟹性別的特殊 AFLP 片段，並成功將此片段定序，並依此設計其引子對。若利用 AFLP 技術篩選不同性狀或物種的差異片段，並將之定序，可發展成 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) 標記，在物種鑑別及特定形質之育種研究上發揮莫大的功用。

表1、各種分子標記的特性比較 (Modify form Hanlon et al. 1999)

	RFLP	RAPD	AFLP	SSRs
Marker characteristics				
Variability (多樣性) ⁽¹⁾	+	++	+++	+++
Reproducibility(再現性) ⁽²⁾	++	++	+++	+++
Technical ease(技術難度) ⁽³⁾	+	+++	++	+
Precision(可靠性) ⁽⁴⁾	++	+	++	++
Development time(發展時間) ⁽⁵⁾	Middle	Short	Short	long
Equipment costs(設備需求) ⁽⁶⁾	high	Low	High	Med.-High

+ : fair ; ++ : good ; +++ : better

- (1) Inherent capacity of a marker to reveal variation (see Powell et al. 1996)
- (2) Reproducibility refers to the ability to obtain the same genetic result for the same sample in repeated assays.
- (3) The level of skill required to obtain accurate genetic data once an assay has been developed
- (4) Differs from “reproducibility” in that a reproducible genetic result may not accurately reflect the diversity present within the sample because of effects, such as epistatic effects with RAPAs (Heun & Helentjaris, 1993) or failure to amplify alleles (null alleles in SSRs). It can also be difficult to assess this category because different loci or alleles obtained from the same technique can also vary.
- (5) The time required to develop genetics assays and procedures for optimal performance. This can be shortened if primers/probes can be transferred from close relatives.
- (6) The financial requirements to prepare a laboratory to a satisfactory level for such analyses. These can differ depending on the separation and visualization processes chosen for the particular marker.

第三章 材料與方法

3.1 材料

本研究所用的台灣鮭魚樣品為2004及2005年於繁殖季節(10月到11月),採集自雪霸國家公園台中縣大甲溪上游的支流七家灣溪,一號壩到三號壩之間長約5公里的的河段。以手拋網盡量不傷害魚隻的方式採集30尾體長大小不等(15到26公分)之活魚,立即剪取其脂鰭(幾毫克到十幾毫克),儲放於95%乙醇中,幾度更換乙醇後,帶回實驗室保存於-20°C冷凍櫃。

3.2 粹取樣本基因組DNA

用苯酚/氯仿/異戊醇粹取法粹取台灣鮭魚的基因組 DNA,並經過 1%瓊脂糖凝膠電泳(Agarose gel)檢測 DNA 的完整性。DNA 的濃度用 HITACHI U-2001 或 UVB-1(Apices Scientific Co.,Model EZC-2002)紫外分光光度計測定,並用 ddH₂O 把所有個體的 DNA 樣品濃度調至 50ng/μl。

3.3 AFLP指紋圖譜的建構

根據 Vos 等(1995)提供的 AFLP 方法和步驟,購買並合成試劑,建構 AFLP 指紋圖譜。本實驗的藥品與引子合成皆訂購自上海生工(上海生工生物工程技術服務有限公司,中國上海市松江區茸興路 111 號, Tel:021-57782243/2242),藥品均為分生等級。AFLP 接合子及選擇性引子序列見(表 2)。

表 2、 AFLP 接合子及引子序列

EcoR I 接合子(adapter)	5'-CTCGTAGACTGCGTACC	
	CATCTGACGCATGGTTAA-3'	
Mse I 接合子(adapter)	5'-GACGTGAGTCCTGAG	
	TACTCAGGACTCAT-3'	
預擴增引子對 (pre-amplification primers)		
EcoR I 引子	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'	
Mse I 引子	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'	
選擇性引子對 (selective primers) 6 對		
E-ACG/M-CTG	E-ACG/M-CTC	E-AAG/M-CTC
E-AAG/M-CTG	E-AGC/M-CTG	E-AAG/M-CTT

3.3.1 酶切反應

取基因組 DNA 樣品各 100ng，TruII(10u/μl) 0.1μl，10×Y+/Tango buffer(反應緩衝液)4.0μl，再加 ddH₂O 至反應總體積 20μl。於 PCR 儀中 65°C 酶切 2 小時。再加入 EcoR I(10u/μl) 0.1μl，ddH₂O 1.9μl 於 PCR 儀中 37°C 酶切 2 小時。於 70°C 中放置 15 分鐘，使酶失去活性，4°C 下保存備用。

3.3.2 聚合酶連鎖反應

每份連鎖反應混合液包括：酶切反應產物 5μl，10mM ATP 0.5μl，EcoR I adapter(5uM) 0.5μl，MseIadapter(50uM) 0.5μl，T4 DNA ligase (10u/μl) 0.1μl，再加 ddH₂O 至反應總體積 20μl。於 37°C 下反應 4 小時。置於 4°C 下保存備用。

3.3.3 預擴增反應

反應混合液包括：連接產物 1μl，10×PCR buffer plus Mg₂+ 2μl，dNTP(10mM) 0.4μl，EcoR I preamp primer(10 uM) 0.4μl，Mse I preamp primer(10 uM) 0.4μl，Taq polymerase (5u/μl) 0.1μl。用 Eppendorf 公司生產的 Mastercycle personal

(Eppendorf AG, Germany, Barkhausenweg, 122339 Hamburg Deutschland Telefon + 49 40 53 8010) 進行 PCR 反應。反應條件：首先 94°C 2 分鐘；接著 94°C 30 秒，56°C 60 秒，72°C 60 秒，共 20 個 cycles；置於 4°C 下保存備用。根據 1.5% 瓊脂糖凝膠電泳檢測預擴增產物的品質，該產物用 ddH₂O 稀釋 10 倍，置於 4°C 下保存備用。

3.3.4 選擇性擴增反應

取 5 μ l 預擴增稀釋混合液，10 \times PCR buffer plus Mg₂₊ 2 μ l，EcoRI 引子 (27.8ng/ μ l) 0.4 μ l，MseI 引子 (27.8ng/ μ l) 0.4 μ l，Taq polymerase 0.2 μ l、加 ddH₂O 至總體積為 20 μ l。PCR 反應條件：先 94°C 2 分鐘，再 94°C 30 秒，65°C 30 秒，(每 cycle 溫度降低 1°C)，72°C 60 秒，10 個重複迴圈後變為：94°C 30 秒，56°C 30 秒，72°C 60 秒，26 個 cycles。反應結束後用 1.5% 瓊脂糖電泳檢測預擴增產物的品質。擴增反應產物保存於 4°C 備用。

3.3.5 變性聚丙烯醯胺凝膠電泳與銀染

採用 ATTO 公司的 AE-6145 電泳儀(附錄 3)(ATTO Technology, Inc. 155 CrossPoint Parkway Amherst, New York 14068, USA。Tel: 716-691-1999 Fax 716-691-9353)。以 6% 的變性聚丙烯醯胺凝膠(Denaturing polyacrylamide) (Sambrook 2000)、1 \times TBE 緩衝液進行電泳。電泳完畢後，固定(fixation)、銀染(staining)、顯色(developing)步驟修改自 (Merril et al. 1979)。固定液 (fixing solution) 配方為：20ml Acetic acid+1980 ml ddH₂O，固定時間：30 分鐘以上；銀染液 (silver staining solution) 配方：3ml Formaldehyde+10g AgNO₃+400 μ l 1%Na₂S₂O₃ 加 ddH₂O 至 2000ml，染色 30 分鐘以上；顯影液 (Developing solution)：3ml Formaldehyde+10g NaOH 加 ddH₂O 至 2000ml。

3.4 數據處理

分別以 1 和 0 代表每個個體在某一遷移率處有或無擴增片段(譜帶)出現，

將上述獲得的 AFLP 指紋圖譜轉換成 1 和 0 構成的數字矩陣，在 Microsoft Excel 中以 Visual Basic 語言編製的程式（王等 2000），計算各個群體出現的所有遷移率不同的擴增片段數目、多樣性片段（譜帶）數目及其比例、群體內擴增片段的相似系數、群體內的遺傳距離等各項參數，並對每個個體的擴增圖譜一一進行比較，計算出基因型（即一個個體擴增譜帶的組合型式）數。

1. 多樣片段比例 = (多樣片段數量/檢出片段總數) × 100%
2. 顯性基因型頻率: $P_d = n_i/n$, n_i 為位點 i 上有帶的個體數, n 為總個體數。
3. 遺傳距離 (Genetic distance ; D) = $-\ln S$
4. 相似系數 (相關性; Relatedness): 按 Lynch (1990) 的公式計算, 即: $S_{ij} = 2 N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。式中 S_{ij} 為相似系數, N_{ij} 為個體 i 與 j 共有的片段的數量, N_i , N_j 分別為個體 i 與 j 各具有片段的數量。
5. 預期雜合度: 將每個 AFLP 擴增條帶看作一個基因位點, 並假設群體處於 Hardy-Weinberg 平衡狀態。不出現擴增條帶的個體為隱性純合體, 據此可算出各個位點的顯性基因與隱性基因頻率, 進而可計算出群體的預期雜合度: $H_e = 1 - \sum P_i^2$, P_i 為單個位點上的等位元基因的頻率。預期雜合度採用軟體 POPGEN1.32 (Yeh et al. 1997) 計算。
6. 歸類分析 (Assignment): 由 AFLP data analyzer 計算出遺傳距離, 輸入 MEGA3.1 (Kumar et al. 2003) 軟體中, 用 NJ 及 UPGMA 方法進行歸類分析, 構建歸類圖 (相關性樹狀圖; relatedness tree)。

第四章 結果

4.1 基因組DNA及預擴增反應結果

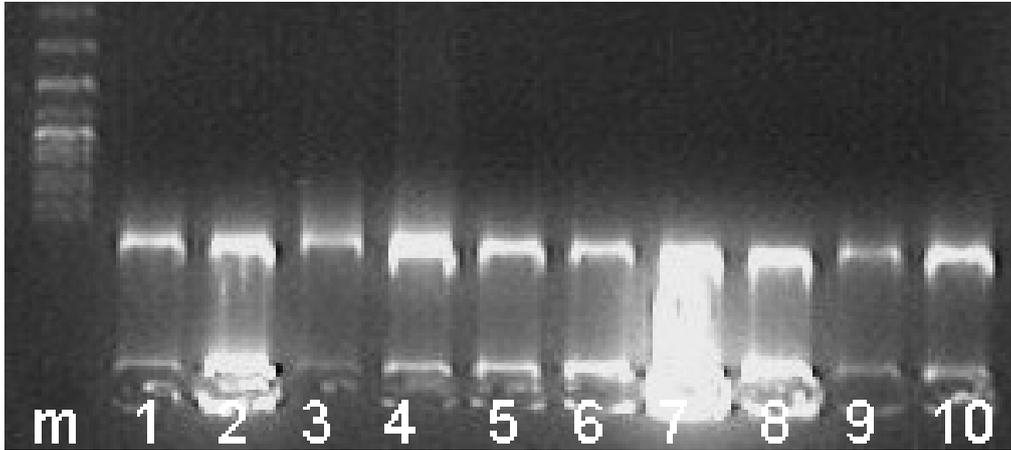


圖 1、基因組 DNA 的 1%瓊脂糖凝膠電泳圖。數字代表台灣鮭魚樣品編號，m 為 100bp DNA marker。

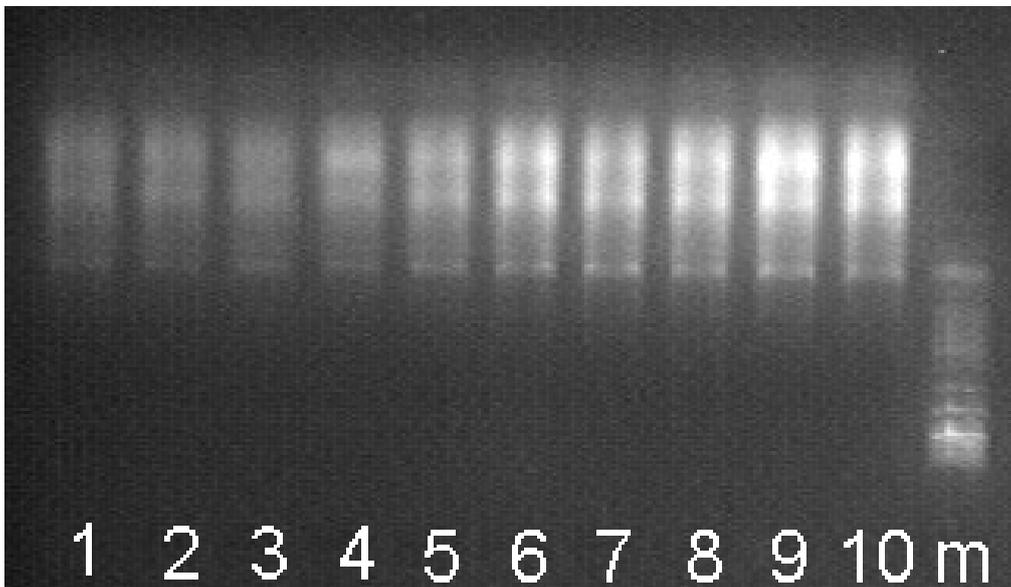


圖 2、部分預擴增產物的 1%瓊脂糖凝膠電泳圖。數字代表台灣鮭魚樣品編號，m 為 100bp DNA marker。

4.2 台灣鮭魚的AFLP擴增條帶和多樣性檢出結果

用6對不同選擇性引子，在30尾台灣陸封型鮭魚的DNA樣品中(其中2尾沒有擴增成功)，檢出了291個不同的擴增片段,其中225個片段(77.3%)為族群群體的全部個體共有，其餘66個片段(22.7%)僅見於部分族群個體，表現多樣現象。各對引子擴增出的基因型(一個個體擴增譜帶的組合型式)數目式與標本數目不一致(表3)。

表 3、不同選擇性引子對台灣鮭魚的擴增結果

引 子	樣本數	檢出位點	多樣位點 N
E-AAG/M-CTC	28	52	6(11.5%)
E-AGC/M-CTG	28	66	25(37.9%)
E-AAG/M-CTT	28	41	16(39.0%)
E-ACG/M-CTG	28	33	12(36.4%)
E-AAG/M-CTG	28	68	3(4.4%)
E-AGC/M-CAT	28	31	6(19.4%)

AFLP 標記的遺傳符合孟德爾定律，因此在數據分析中可將 1 個擴增片段視為一個基因，1 個個體的擴增片段組合即為該個體的基因型(盧聖棟 1993)。每對引子檢出的多樣位點數從 3 到 25 不等，平均 11.3 個，多樣位點比例在 4.4%~39.0%之間，以 E-AGC/M-CTG 檢出的位點數最多，多樣性也最高(表 3)。28 個個體表現為 25 種基因型，其中 2 號與 3 號、5 號與 20 號、18 號與 22 號樣品的擴增圖譜完全相同。引子 E-AGC/M-CTG 擴增出的 AFLP 指紋圖譜如(圖 3)。

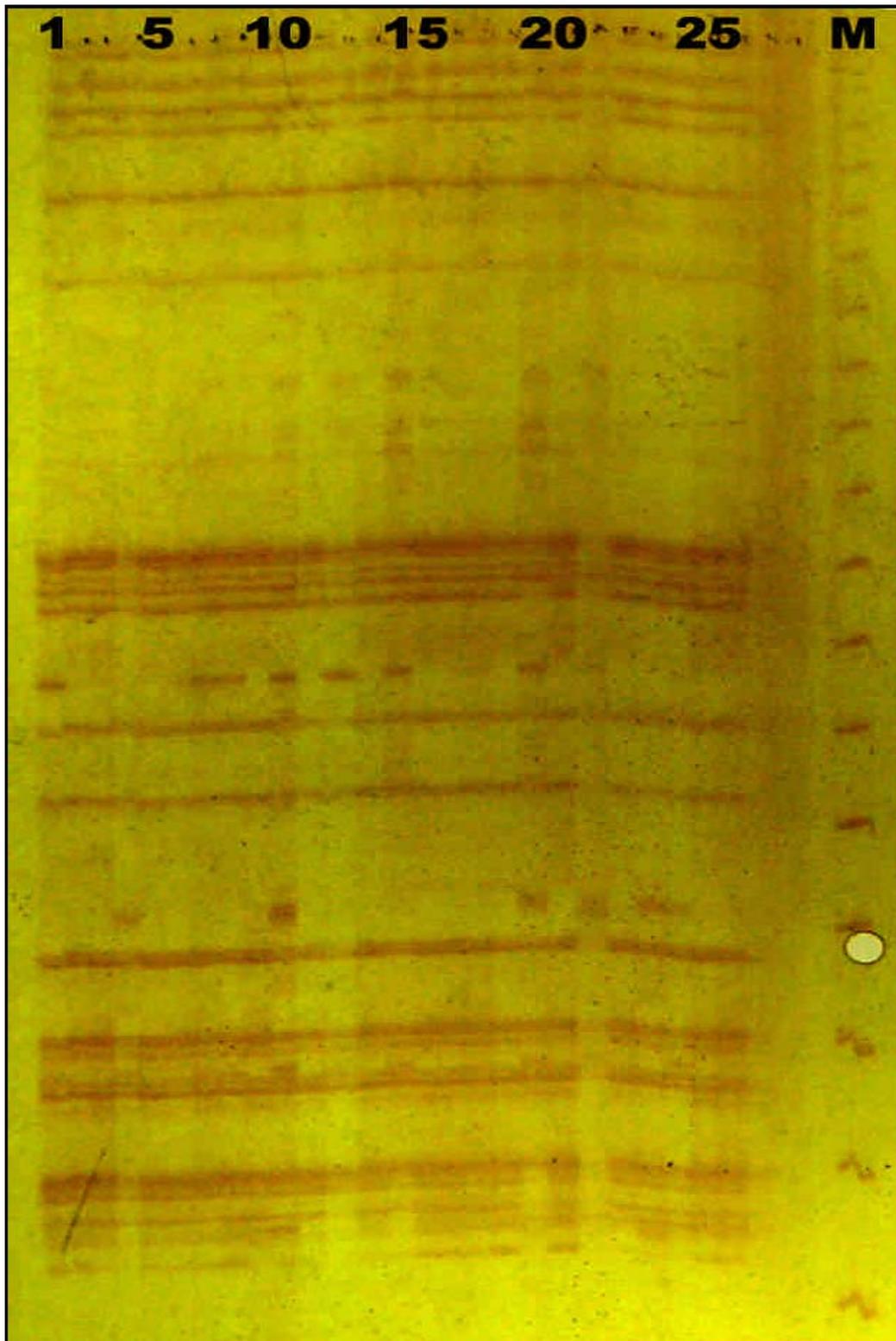


圖3、台灣鮭魚AFLP指紋圖。用E-ACG/M-CTG 引物擴增獲得，數字代表台灣鮭魚樣品編號，M為10bp DNA分子量標記物。

4.3 相似系數及遺傳距離

透過 6 對選擇性引子進行擴增的結果：個體間的遺傳相似系數為 0.8941~1，平均 0.9633。個體間的遺傳距離範圍為：0~0.1117,平均遺傳距離為 0.0374；個體之間的遺傳相似度很高。

4.4 歸類分析

根據個體間的遺傳距離分別用NJ法和UPGMA法對28個個體進行歸類分析，建構了歸類樹（圖4、圖5），兩種方法所獲圖譜的拓撲學架構相似，28個個體分為兩大支（群；clade），其中4、10、19、21和23號為一支，其餘23個個體為1支，如圖4和圖5所示。兩支個體擴增條帶數目也不一致，前者每個個體檢出條帶為264~276條，平均269.4條，個體之間的相似系數平均為0.9647，遺傳距離平均為0.0359；後者每個個體檢出條帶為227~248條，平均230條，個體之間的相似系數平均為0.9863，遺傳距離平均為0.0138。

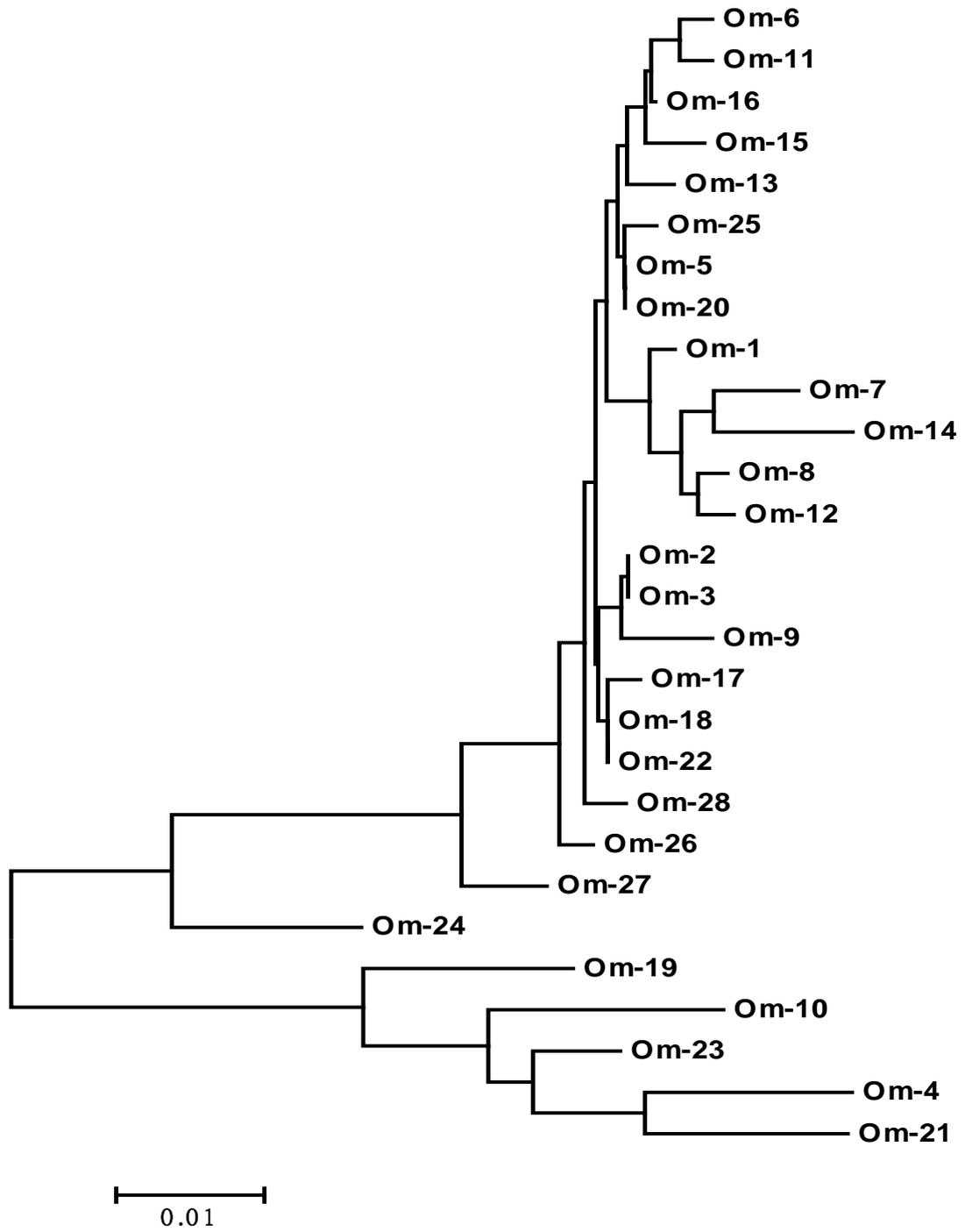


圖 4、台灣鮭魚 NJ 聚類樹。Om：台灣鮭魚，數字代表樣品編號。比例尺表示遺傳距離。

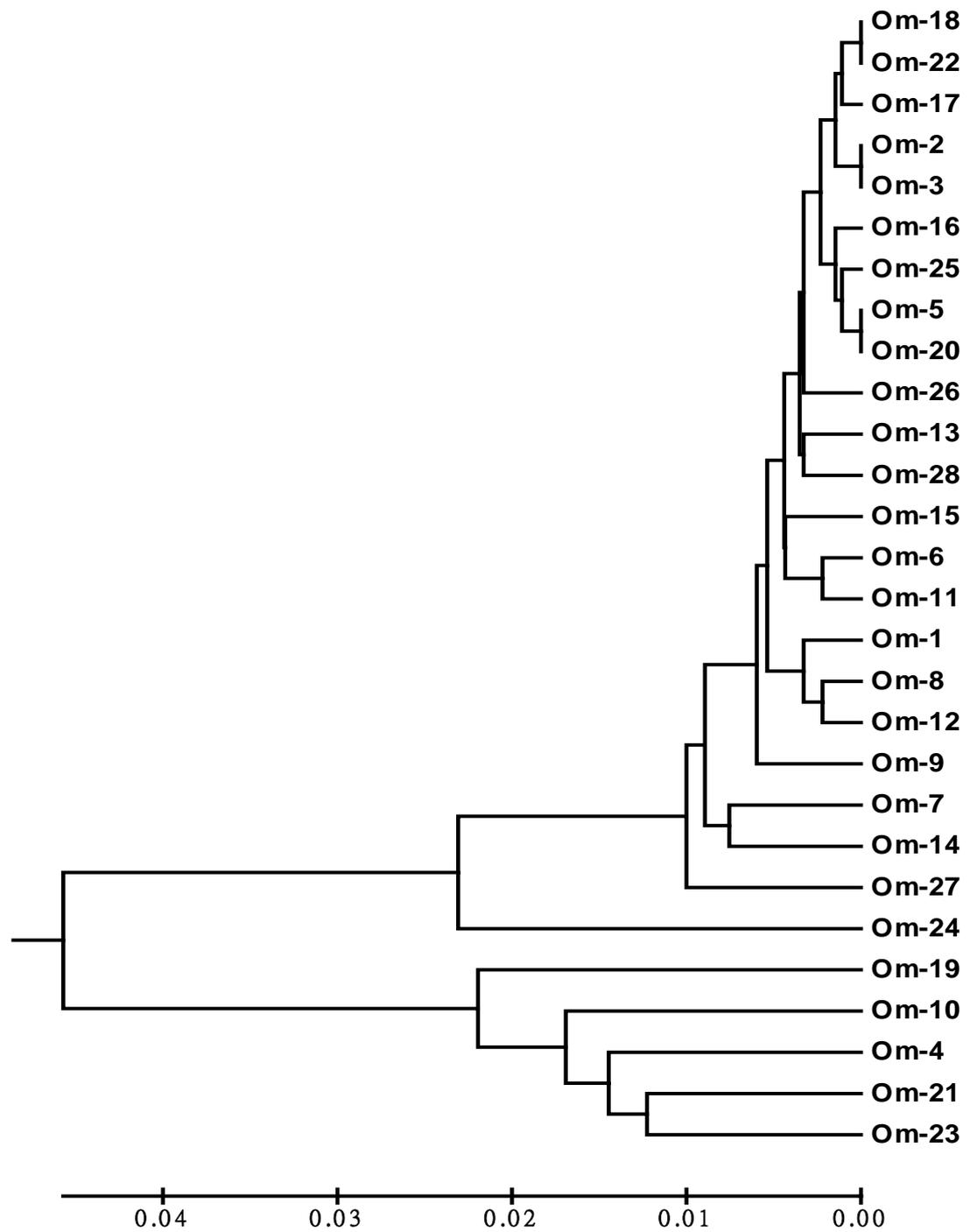


圖 5、台灣鮭魚 UPGMA 聚類樹。Om：台灣鮭魚，數字代表樣品編號。比例尺表示遺傳距離。

第五章 討論

5.1 台灣陸封型鮭魚的遺傳多樣性現狀及原因探討

台灣陸封型鮭魚屬冰河時期孑遺的活化石，是台灣家喻戶曉的保育明星物種。由於人類活動（農業、旅遊）還有氣溫逐年上升，棲地環境遭到破壞，防砂壩阻隔等等原因，台灣鮭魚族群數量急劇減少，族群年齡架構老化，其遺傳資源遭到嚴重破壞。遺傳多樣性是一個物種長期存在和發展的基礎，因此為了更好地保護族群的遺傳資源，研究其現存族群的遺傳多樣性變得十分緊迫和重要。本試驗利用AFLP技術測得台灣陸封型鮭魚之多樣性位點出現頻率為22.7%，海水大黃魚(*Pseudosciaena crocea*)野生族群和養殖族群的AFLP多樣性位點出現頻率分別為76.6%、69.2%~70.6%(王等 2002);真鯛(*Pagrus major*)(王等 2000)為58.4%~64.0%;牙鮭(*Paralichthys olivaceus*)野生族群為46.2%，養殖族群群體為40.1 % (張等 2004);紫紅笛鯛(*Lutjanus argentimaculatus*)(張等 2003)養殖族群為41.89 %~55.14%，野生族群為57.14 %，都遠高過台灣鮭魚，這些數據都說明台灣鮭魚的遺傳多樣性很低。而且台灣鮭魚族群個體間的相似系數平均為0.9633，個體間的遺傳距離平均為0.0374；和去年所測得的數據（平均相似系數 0.946，平均遺傳距離 0.055）都偏低。最可能的原因是由於自然和人為因素的影響使台灣鮭魚的數量急劇下降，然後產生遺傳瓶頸，伴隨著近親繁殖、基因頻率的漂變的惡性循環，導致遺傳異質性和基因多樣性不斷喪失，總遺傳變異下降，遺傳多樣性也就大大降低了。

以AFLP分析台灣鮭魚族群同時也發現一些族群個體的條帶數（264~276），明顯多於其它個體(227~248)，而這些個體在歸類分析時，明顯分為一支(clade)。若把條帶數較多的個體和其他的個體區分成兩個小群體，經過數據處理後，兩個小群體內部個體之間的平均遺傳距離分別為0.03589和0.01385，而二群體之間的遺傳距離0.09138，遠遠大於全部個體間的平均遺傳距離0.0374。這表示台灣鮭魚族群的遺傳變異主要來自於這二個群體間，而非來自於整個族群

內部。檢視兩年的結果，均顯示台灣鮭魚有二個主要的群體(圖6)。我們推測目前台灣鮭魚應該有兩個關連族群 (metapopulation)，並且靠著彼此互相的聯繫交流來維持現存台灣鮭魚族群主要的遺傳多樣性。

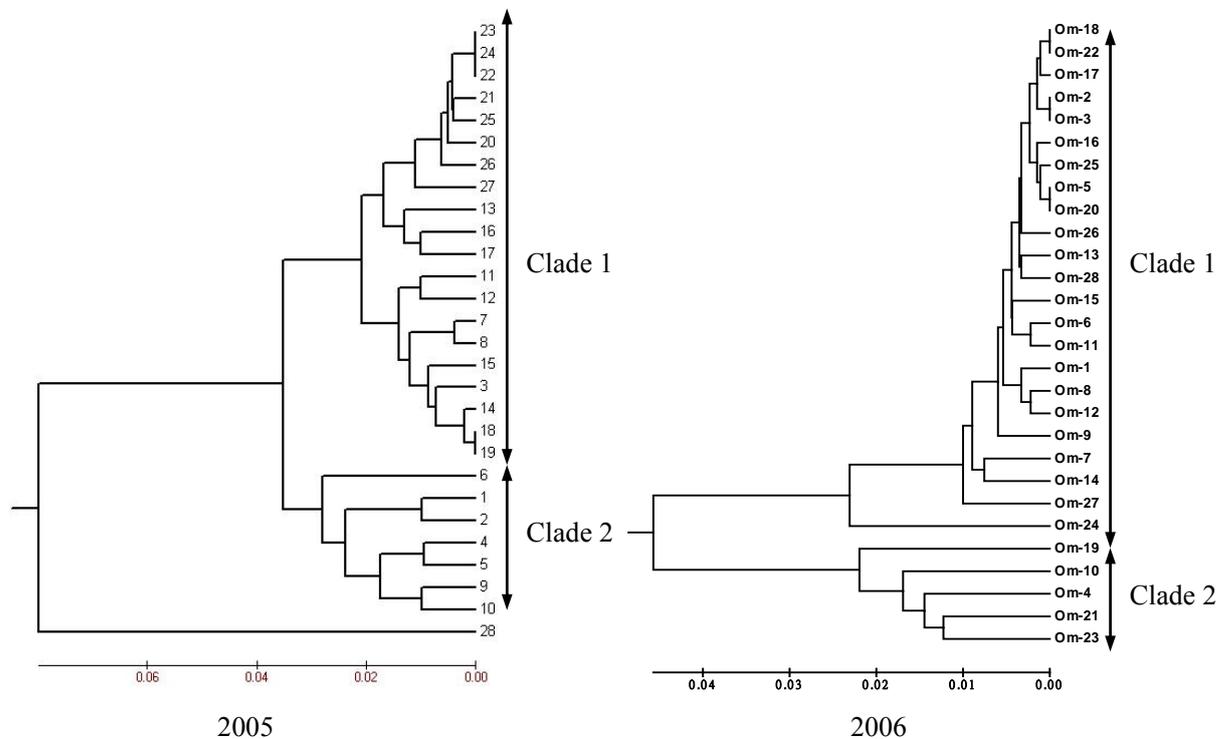


圖6、2005及2006年台灣鮭魚族群的UPGMA類聚圖

5.2 台灣陸封型鮭魚遺傳多樣性保護對策分析

要適當的保護稀少物種，明瞭稀有物種的族群遺傳結構是不可或缺的。聯合國生物多樣性 (biodiversity) 之定義，包括基因 (gene)、物種 (species)、生態系 (ecosystem) 及地景 (landscape) 的多樣性。為了維持生態系的構造和機能之正常運作，保護生態系其構成要素的基因和物種是具體的對策。因此必須重視產生物種多樣性的演化背景。一般系統分類學僅以單系統群為研究對象，但保育生物學的基因的固有性是指演化歷史過程的產物，包括單系統群，側系統群及多系統群。因此學者建議從族群遺傳的眼光保護物種的對象應以實

質的管理單位 (Management Unit; EU) 著手。在自然群體中，一個族群內的遺傳多樣性通常與該族群的有效族群數量 (effective population size) 呈正比 (Tajima 1989)。而一般情況下海水魚的遺傳多樣性最高，溯河性洄游性魚類 (Anadromous fish) 次之，淡水魚最低 (DeWoody and Avise 2000)。淡水魚通常棲息於固定的水域中 (湖泊或溪流)，其生存環境通常範圍較小，且經常發生劇烈的變動 (乾旱、洪水、人為活動)，因此有效族群數量低，且不容易與外界交流，所以遺傳多樣性相對較低。

根據日本環境省新版的紅皮書 (Red list) 之記載，總共有76個物種和亞種需要保護。這個數目是日本列島原生淡水魚總數 (318) 的約1/4弱。日本淡水魚物種急劇減少的主要原因有，建築開發、在河川設置橫斷物、農業活動、工業廢水、下水道污水之排入、農藥及肥料之使用及引進來物種等等，總之都是人為因素。淡水魚依其生活史可分為 (1) 周緣性淡水魚 (原本是海水魚只是短暫進入淡水水域)、(2) 淡海兩側洄游型 (來回於淡水和海水之間) 和 (3) 純淡水型 (終生棲息於淡水)。隨著淡水之滿水或乾涸，地理造成之侵食及堆積作用，因此河川與湖沼組成的淡水水域，其空間極富多樣性。棲息於此種環境之淡水魚也因而演化出各式各樣的生活史及族群構造。尤其純淡水魚極易受地理隔離，同一物種經常在不同的環境下求生存。更由於淡水 (河川湖沼) 是人類最鄰近的環境，自古極易受人類活動，如治水、利水之目的變更河川水路，岸邊水泥化，掩埋新生地的影響。因此物種內不同族群間明顯有分化現象，例如鯉科魚類 (motsogo) 族群內之多樣性極小，淡海兩側洄游之香魚其族群內的多樣性即較高。比起海水，淡水的環境變動更遠大於海水水域 (後藤 等1994)。

在稀有物種基因多樣性的保護和保存上，是十分困難的。因為稀有物種一般具有在有限的棲地，族群數目極少的特徵。小族群因為個體數量少，即使在不受到人為的影響之下，仍有可能因機率產生的基因漂變，使得對生存有利的基因喪失，導致整體適應力下降；或是因為近親交配，使得許多異質化的

基因受到固定，喪失了遺傳多樣性。因此族群的小型化造成滅絕風險提高的原因，大致可分成個體數變動的機率性（量變），與遺傳的逢機性（genetic stochasticity）造成基因劣質化（質變）兩種原因。在兩種原因交替作用之下，族群數目更趨減少，彷彿陷入了滅絕的漩渦而無法自拔(圖7)（鷺谷 等2005）。

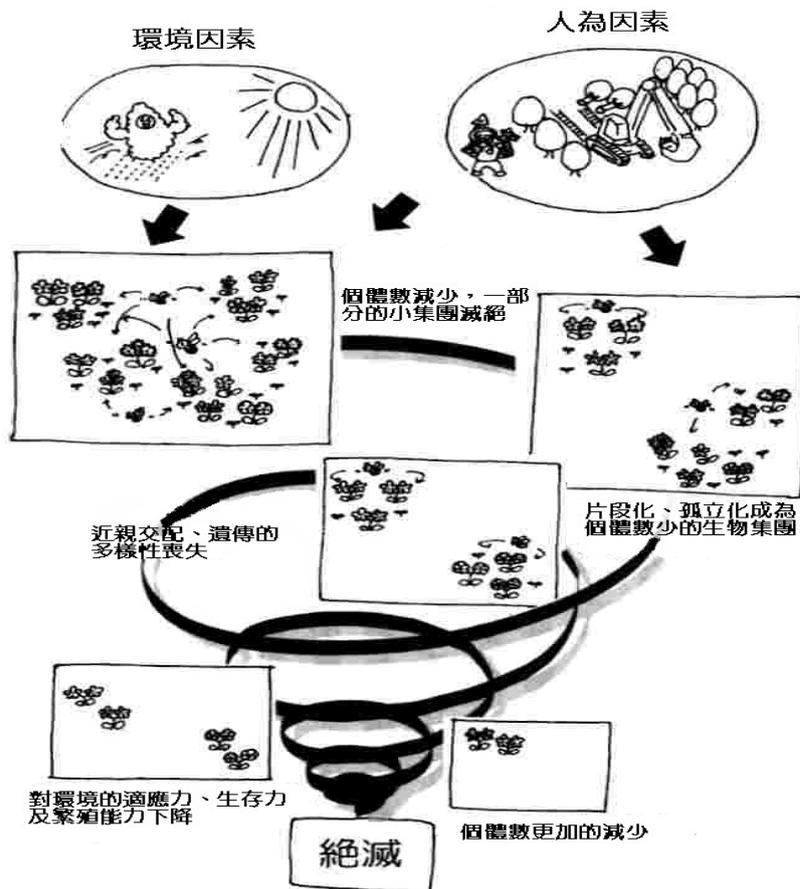


圖7、小型化族群的滅絕概念圖（引用自鷺谷等 2005）

因此，若無法有效增加棲地的範圍和多樣性，在環境負載力的限制下，並無法有效提升族群的數目。然而，在日本的ネコギギ (*Pseudobagrus ichikawai*，一種鮭科魚類) 的研究報告中提到，ネコギギ其主要棲所為各個大巨石頭縫隙所形成，以微衛星DNA分析主要七個棲息地的個體，發現族群分佈呈區塊狀，且僅數十公尺的分離族群之間即有明顯的基因結構差異，全流域呈不同的族群

結構(圖8)。稀有物種由數個生息於局部地域的族群(local population)組成關連族群,籍著各族群間或多或少的遺傳交流,維持此物種的基因多樣性。若是彼此間完全斷絕交流則稱為地域族群(regional population)。遺傳交流越少的物種,其滅絕的機率就越大。

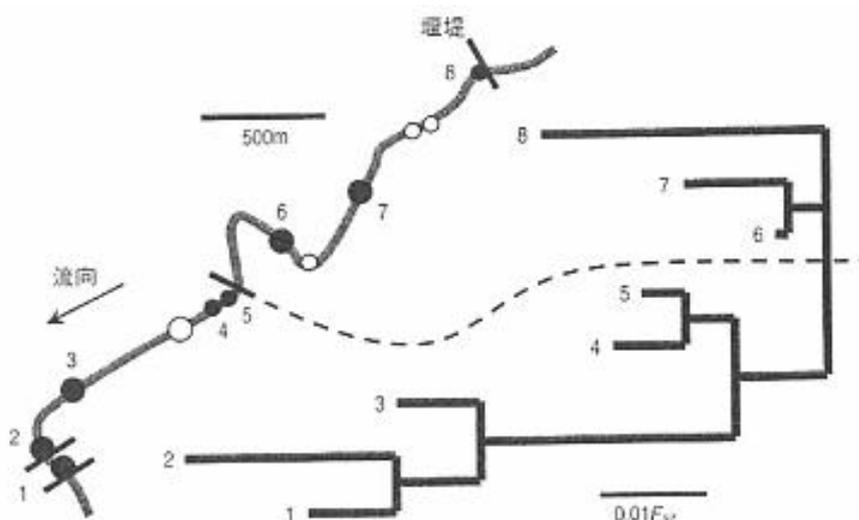


圖8、以微衛星DNA法調查ネコギギ在河川中呈現的遺傳結構圖。數字代表不同的8個族群。

日本科學家在日本國九州的葉木川高山上游,一段被瀑布和攔砂壩所隔離出的2.5公里河段對陸封河川型(fluvial form)櫻鮭進行了三年的活動行為調查。他們發現河川型的陸封櫻鮭具有定居的傾向,大部分的個體(78%)都生活在固定的深潭中,平常移動距離有限(75~100公尺)。即使到了繁殖季節,移動的個體比例也沒有顯著的提升,然而雄魚在繁殖季節的行動遠比雌魚活潑,推測和雄魚積極尋求配偶有關(Sakata et al. 2005)。而去年雪霸台日研究團隊針對6尾台灣鮭魚種魚在繁殖季節的行動調查結果發現,大部分的台灣鮭魚個體僅在500公尺內來回移動(中尾 2006; 牧口 等2006)。因此我們推測台灣鮭魚在七家灣河流棲息地的各個主要深潭中,形成關連族群的可能性非常高。在台灣鮭魚的保育策略上,找出各個關連族群,並持續的監測其遺傳結構,設法維持關連族群間的通路暢通,並避免棲地零碎化是維持基因多樣性的重點。因為即使某

個局部族群滅絕，移入別處的局部族群，仍有機會恢復物種的基因多樣性。因此保持多個局部族群間的多重通路 (network)，是分散危險，降低物種滅絕機率，保持物種安定的另一法則。目前台灣陸封型鮭魚的生存區域僅限於七家灣溪五~七公里的範圍內，由歷年調查的族群數量的紀錄發現族群數量最多時也不超過四千尾(曾 2005)。因此該地區的生物生產力有限，因為有承載量的極限，也同時限制了可以人工放流的魚群數量。異地保育是保護和恢復珍稀和瀕危物種的有效措施。事實上，隨著保育工作的進展，對台灣陸封型鮭魚進行異地遷移是大勢所趨。而有效族群的大小與一個族群的遺傳多樣性之程度有密切的關係。因此確定族群在特定條件下其有效族群的大小，對防止近親繁殖和保持族群的遺傳多樣性有一定意義。在掌握台灣鮭魚遺傳架構特徵後，應該嘗試放流一部分人工繁殖的台灣陸封型鮭魚魚苗到與七家灣溪生態環境條件相似，而且在歷史紀錄中曾經有台灣陸封型鮭魚出現的溪流，並追蹤調查其遺傳組成的經時變化，確定該區域的最適放流量；同時也讓大自然決定台灣陸封型鮭魚的演化，而非人為決定它未來的演化走向。

在人為飼養台灣陸封型鮭魚族群的遺傳管理上，透過建立譜系 (pedigree)，可以達到減緩和避免近交衰退的速度。但較低的對偶基因頻度即使在沒有發生近交的情況下仍可能出現遺傳漂變；因此，必須把注意力放在稀有對偶基因遺傳型個體的發現和妥善保存上。在選擇親魚時為低頻對偶基因攜帶者提供更多的繁殖機會，使這些對偶基因在群體中的分佈頻率提升，從而降低這些基因的丟失機率，最大限度地保持台灣陸封型鮭魚的遺傳多樣性。從本實驗結果可以看出，條帶的多樣性22.7%僅為少量個體所擁有，這意味著這些等位基因在族群中的分佈頻率很低。如果在保育過程中不特別注意，保護帶有這種等位基因的個體，就會很快導致某些低頻等位對偶基因的丟失，進而使族群的遺傳多樣性進一步降低。當一個等位基因在台灣鮭魚族群群體中的分佈頻率過低時，在隨機抽取的樣品中仍可能丟失該基因，因此，在放流實施過程中，除了要考慮生態學原理和管理成本外，還必須同時考慮保持族群多樣性的遺傳學原理。

綜合以上結論，要有效保護台灣鮭魚，除了透過放流等手段提升其族群豐度外，應盡量維持各個關連族群間的交流，減少等位對偶基因的丟失，並持續監測各關連族群的遺傳結構，維護其棲地的多樣性。繼續追蹤台灣鮭魚的河川日常行動，尤其找出颱風和山洪肆虐時台灣鮭魚的避難所，以及台灣鮭魚尋找產卵場的棲地條件，應該也是為保護台灣鮭魚的重要手段。

5.3 鮭魚生活史具多樣性

鮭科魚類中許多鮭魚的族群生活史(後藤 1994; 木曾 1995; 前田 2004)，兼有迴游型(降海)及河川殘留型兩型共存，展現生活史的多樣性(圖 9)。同一物種甚至還有陸封型族群，例如紅鮭(*Oncorhynchus keta*)的生活史就有降海迴游、河川殘留型及陸封湖泊型(kokanee)。原則上雄魚既迴游也殘留，但雌魚僅迴游不殘留在河川。我們先定義幾個在鮭魚的族群生活史中常用的名詞以便往後的討論。溯河型(catadromous)(fighter)：在到達某個發育階段後開始降海，在海洋生活若干時日，為了繁殖生產再度迴游回歸到母川。鮮豔的婚姻體色、鼻端鉤吻、駝背、具強烈攻擊性等，二次性徵發達。河川殘留型(river resident form; sneaker) 或河川早熟化型(mature parr)：不降海在河川中成熟的個體。比降海型早熟(1至3年)，一般呈幼體成熟現象，沒有二次性徵。許多迴游型的鮭鱒魚類，雄魚有降海及河川殘留型兩種，河川殘留型雄魚不降海在河川中成熟。雌魚則很少會殘留在河川。一般精巢的 GSI(生殖巢指數)是溯河型的 1.5 倍。陸封型(land-locked form)：由於物理、生理等障礙造成魚隻無法上溯，和下面的河川型很難區分。河川型(fluvial form)：和有否物理障礙無關，不降海棲息在河川的個體或族群。Jack：降海的雄魚當中，部分僅在海洋短暫停留即迴游回河川。此種雄魚早熟、體型小，沒有二次性徵。一般體型比比河川殘留型雄魚大，精巢的 GSI 比溯河型的大。而且似乎有遺傳性，Jack 的子代又成為下一代的 Jack。

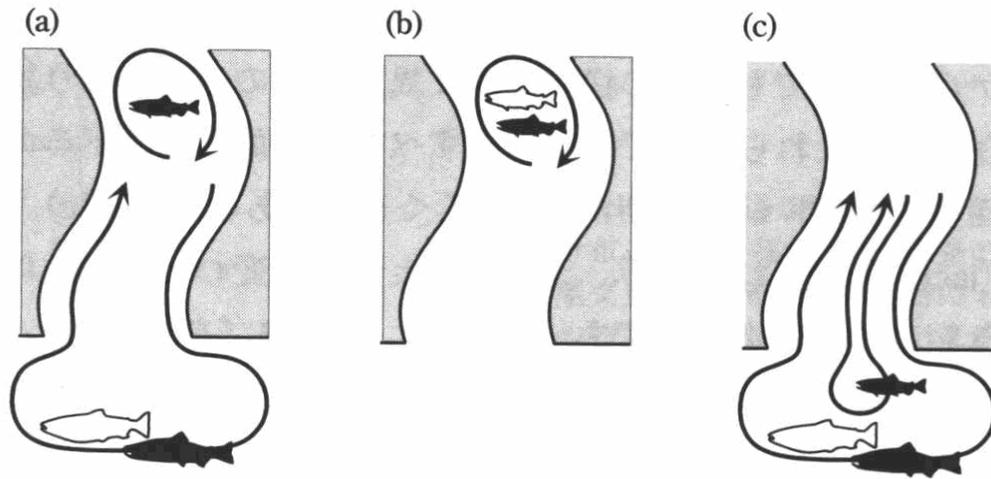


圖 9、鮭科魚類展現多樣性的生活史。

- (a) 迴游型族群 I—所有雌魚和部分雄魚(迴游型雄)降海或降湖，殘留在河川的部分雄魚(河川殘留型雄)比降海或降湖的雌魚和迴游型雄魚早熟。
- (b) 河川型族群—所有雌雄魚皆留在河川成長成熟，生活史不迴游。
- (c) 迴游型族群 II—所有雌雄魚皆降海，部分雄魚(Jack)及早溯河並提早性成熟。白色代表雌魚，黑色代表雄魚。

所有鮭魚的迴游行動基本呈降海、索餌、回歸母川、溯河、產卵模式週而復始(圖 10)。櫻鮭於秋季溯河於河川上游產卵，受精卵於當年冬天孵化。孵化的稚魚體側有橢圓雲狀黑斑紋(parr mark)，類似河底小石頭具偽裝保護擬態功能，體高較高、定居型、領域性強、獨居具攻擊性、滯留在河川 1 年半後才於春天降海迴游。隨著春天日照時間增長，溶雪、河流流量及濁度的增加等環境因子的變化，促使體內產生一系列荷爾蒙(甲狀腺、成長荷爾蒙)連鎖效應，刺激稚魚體色開始銀化(smolt)，在鱗片累積銀白色保護色之色素，轉換能源之代謝，體高變低、成群、攻擊性弱、為下海適應海洋生活做準備。

鮭魚由於卵粒的大小和孵化時間的長短而影響未來孵上河面稚魚的成長速度。一般大卵粒的鮭魚卵會孵出大魚苗，而且較早脫卵殼而出的個體將來會占據攝餌較優的地盤，有助於此魚將來的競爭力。河川殘留型或河川早熟雄魚因

為性荷爾蒙分泌旺盛的作用，抑制河川早熟雄魚體色銀化及降海的行為，而且有強烈的領域地盤性，搶先佔據產卵場附近餌料豐富的索餌場，並具排他行為。競爭失利的未成熟同儕只好飲恨降海，等到迴游產卵時才有機會再回歸母川。從海洋回歸母川的大型雄鮭魚（fighter）由於在海洋攝食比河川更多更豐盛的食物，成長反而逆轉比河川殘留早熟雄魚（sneaker）更魁偉，享有優先與雌魚交配的交配權。

鮭科魚類的祖先原本是棲息於淡水行河川生活的純淡水魚，隨著歲月的演變鮭魚慢慢拓展其生活範圍至海洋，演化發展出河海迴游的生活史。鮭科魚類為了享用海洋豐盛的食物，由河川降海進行索餌迴游，為了將由海洋獲取的能源傳遞到下一代，再千里迢迢由海洋回歸母川進行產卵迴游。亦即降海迴游是成長過程的一部份，而溯河迴游則是繁殖過程的一個環節。所有鮭魚的迴游行為和性荷爾蒙及成長荷爾蒙的互動息息相關。而性荷爾蒙分泌的多寡似乎決定了鮭魚是殘留於河川，還是開始銀化降海進行河海迴游。（後藤 1994；前田 2004）。

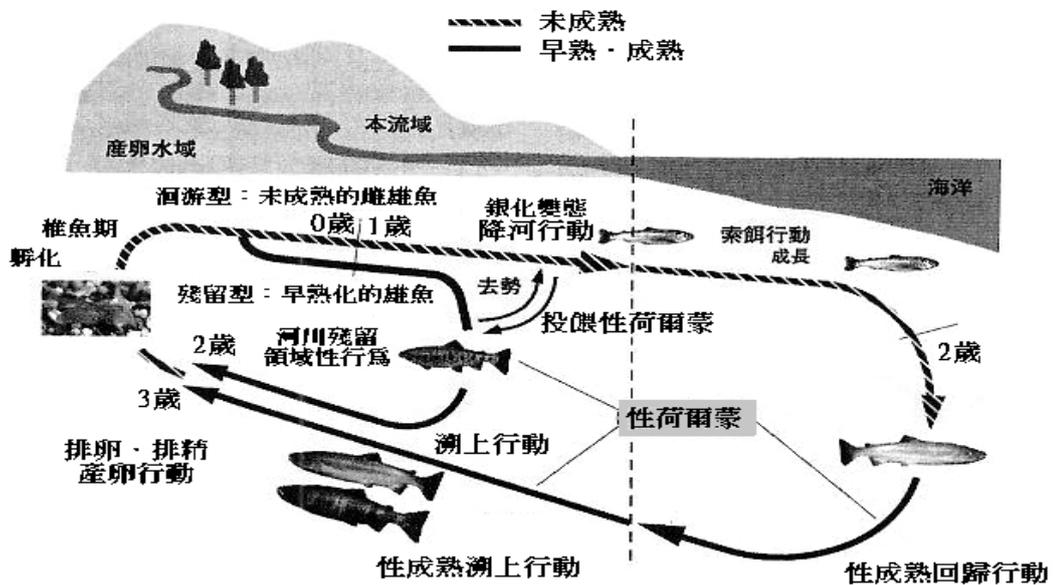


圖10、櫻鮭生活史。櫻鮭迴游行動基本呈降海、索餌、回歸母川、溯河、產卵模式週而復始。

5.4 陸封使洄游物種喪失洄游性終至完成物種的種化

許多鮭科的魚類，同時擁有終生在河川度過的陸封型、及在河海之間洄游的降海型，兩種不同類型的生活史。早期由於陸封型和降海型鮭魚外表型態有極大的差異，曾經誤認牠們是屬於不同物種。現在科學家已經知道遺傳因素決定鮭魚到底會變成陸封型還是降海型。在被阻隔的河川中鮭魚會逐漸喪失降海的本能。事實上，6,000~7,000年前被瀑布阻隔棲息於瀑布上游的棕鱒，已完全失去降海的形質。科學家觀察棲息於北海道，在和海有相連的河川及防砂壩上游和海切割的河川中之紅點鮭，並比較其生活史。在和海有相連的河川一般都可以同時看見降海型和陸封型鮭魚。而在防砂壩上游的河川中只能看見陸封型鮭魚。比較銀化個體、亦即降海個體的頻度，發現從防砂壩上游降海的個體數目甚少，只有和海有相連的河川的10分之一。亦即，在防砂壩上游降海型個體既無法溯返、也不太降海（在防砂壩上游，少數銀化的個體都是雌魚，頗耐人尋味）。此外，在防砂壩上游，稚魚的密度甚至低於通常的5分之一，一般都認為產卵數較陸封型鮭魚多的降海型無法參與繁殖是原因所在。在海中長大的降海型，由於產卵數多，通常都負起鮭魚再生產的相當分量（前田 2004）。

科學家也發現一旦興建防砂壩，降海型鮭魚就無法產卵，造成降海型鮭魚稚魚的密度下降，因此在河中充分成長，結果就不想降海。總結上述的結果可以得到下面的概念圖（圖 11）。(1)降海型的鮭魚無法洄歸河川時，生息密度必然銳減→(2)生息密度變低時，幼魚的成長情形變好→(3) 幼魚的成長情形變好時，陸封型的鮭魚會增加→(4) 只有陸封型產卵時，生息密度就會變低。亦即，我們可以認為，如果降海型是在能夠返回河川的環境（生息環境高密度），則下一代就會想變成降海型。反之，降海型是在無法返回河川的環境（低密度），則下一代就會打算變成陸封型。牠們可能採取這種巧妙、臨機應變的戰略。此外，如果站在魚類的立場來看，也可以認為這是一種如果能充分得到餌食和生活空間就留下來，如果不能得到就降海之有條件的戰略（conditional

strategy)。所謂降海就是無法在河川中殘留性成熟的個體所採取消極的決定(後藤等 1994)。

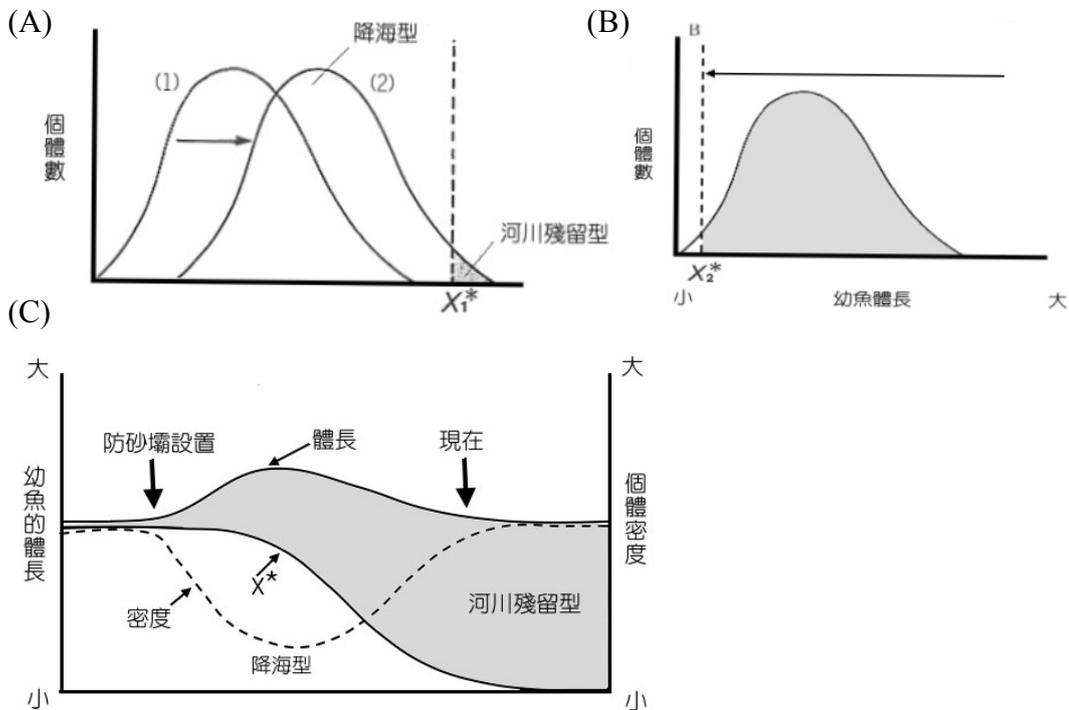


圖 11、防砂壩的設置與和物種陸封的經時模式

(A) 短期幼魚決定過程的現象 (B) 長期阻隔後天擇作用促成臨界體長的變化。溯河洄游型生活史的兩鱒原來幼魚體長和殘留在河川的臨界體長是 X_1^* (圖 A-(1))。隨著防砂壩完工之後，防砂壩上游的魚數目急劇下降。由於魚密度激減，每尾幼魚的成長速度在短期間急速增加，許多幼魚體長超越 X_1^* (河川殘留體長)而性成熟(圖 A-(2))。但防砂壩阻隔時間越久，防砂壩上游沒有降海型鮭魚的加入，上游鮭魚只好進行河川殘留生活史，故在河川中比較容易成熟的雌個體之基因，在小集團中急速散佈。陸封之 X 防砂壩上游被阻隔的族群，基奠基者中雌魚數目極少。(C) 防砂壩的設置和物種陸封的經時模式。防砂壩完工後，陸封鮭魚的族群密度、幼魚體長及臨界體長 X^* 的經時變化預測圖。族群密度激減之後 X^* 急速變小。

事實上，族群被水庫切割會造成陸封型鮭魚突然增加的現象，例子不勝枚舉。例如，從 1935 年開始人類增強對棲息於堪察加半島（在蘇俄西伯利亞的東北部）紅鮭的海洋撈捕壓力，洄歸河川的鮭魚數量立即銳減。同時期紅鮭在 Darunee 湖產卵場的產卵量也伴隨著銳減。如此一來，幼鮭魚的成長反而變好，結果不降海的陸封型紅鮭短期間增加了。有報告說北海道的櫻鮭和紅鮭在棲息密度低的那年或環境條件好的那年，殘留在河川的個體會增加。我們可以這麼說，在鮭科魚類的生活史戰略中，即使沒有改變遺傳形質，也具備相當不錯的臨機應變能力（歸山 2002；前田 2004）。

台灣鮭魚或許也經歷相同的演化過程，亦即由台灣北方之日本、韓國或中國的櫻鮭家族南下，迷途或擴展領域而進入大甲溪終被陸封。原本奠基族群有效族群數目就極少，族群的基因多樣性不多，再加上防砂壩的切割，零碎化棲地，使的台灣鮭魚之遺傳多樣性更加稀少。伐林使棲地裸露於陽光直射之下水溫上升、人為污染（果蔬茶園農藥肥料除草劑之噴灑）、過漁、氣候變遷等因素，台灣鮭魚滅種之劫數難逃。拯救台灣鮭魚的行動實在刻不容緩！！

5.5 AFLP分子標記在保育台灣鮭魚的應用

由於使用 AFLP 技術時不必事先知道所欲分析物種的遺傳資訊，因此此技術在分析各種物種的親緣關係上很有潛力。本實驗室使用 AFLP 技術分析台灣鮭魚和其同為櫻鮭家族的山女(yamame)和石川鮭(amago)的親緣關係，初步的結果和粒線體 DNA 的分析結果相似(圖 12、13)。但需要特別指出，分析 AFLP 法所擴增的片段，一般是假設來自於同一基因座的對偶基因（allele of the same locus）而且同源（homologus）。但是由於以 AFLP 檢出之片段的序列較短（約 50-700bp），當受檢對象之間差異較大時（如不同物種）可能會出現較多的非對偶片段（nonallelic fragement）。因為同樣大小的片段可能來自不同的基因座，但卻被當成不同物種間的不同基因座，而導致低估物種間遺傳距離等錯誤的結

論。因此用 AFLP 技術進行親緣關係分析研究時有必要採用多對選擇性引子、也即需增加觀測位點，並對結果進行綜合分析，才可以保證所獲結果的正確性 (Wang et al., 2004)。

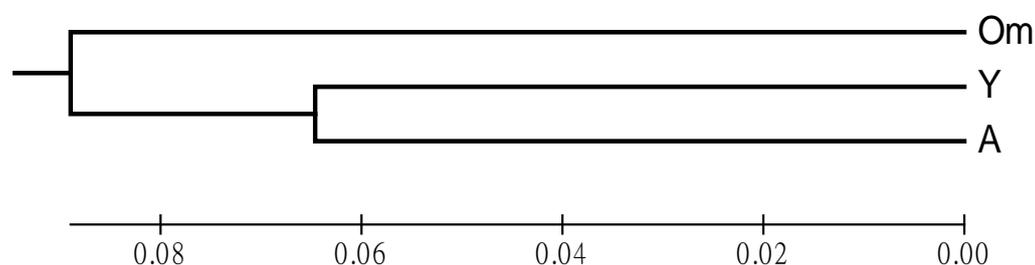


圖 12、台灣鮭魚(Om)、山女(Y)、石川鮭(A)的 UPGMA 類聚樹圖。

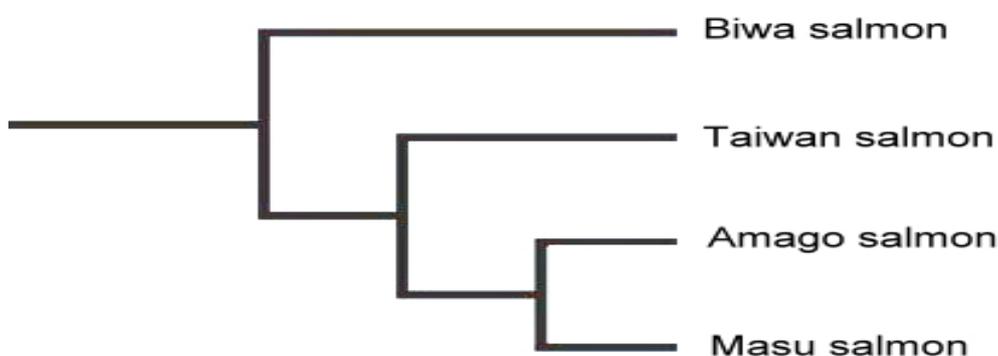


圖 13、以粒線體 DNA 所分析的櫻鮭家族親緣關係圖 (Chung et al. 2006)

在開發和特定性狀相關的分子標記上，AFLP 具有一次可以檢出大量帶條的特點，並且均勻分散於整個基因組。在虹鱒已被應用於開發具有抗 IHNV 的數量基因(QTLs)定位(Rodriguez et al. 2004)，及性別差異條帶(Felipa et al. 2005)上。而台灣鮭魚為陸封型鮭魚，具有幼體成熟的現象，成熟的個體並無櫻花色，且雄魚也無鉤吻現象。因此目前分辨台灣鮭魚性別的方法只有在生殖季節時，擠壓成熟個體的腹部，以被擠出的少量精卵來識別。況且有些雄魚精液稀少甚或可能雌性化？甚難分辨。若台灣鮭魚尚未成熟，或是在非生殖季節時，則無法辨別，進而無法確認公母比例，使得有效族群的推算十分困難。因此除了調查遺傳多樣性以外，應嘗試使用 AFLP 技術開發台灣鮭魚的性別差異條帶。

在建立長期的族群遺傳結構 AFLP 指紋圖譜時，傳統的銀染技術在非同次電泳的結果判別上，有一定的困難。因此無法直接比對每年新採樣的樣本，並且有個體數目上的限制。而本實驗室已建立良好的 AFLP 技術，並且嘗試開發 LICOR 4300 螢光掃描儀的使用。此方式除了具有能比對不同次電泳結果的特點外，在操作上省去了傳統銀染步驟較煩索的缺點。而目前已獲得初步的成果(圖 14)。

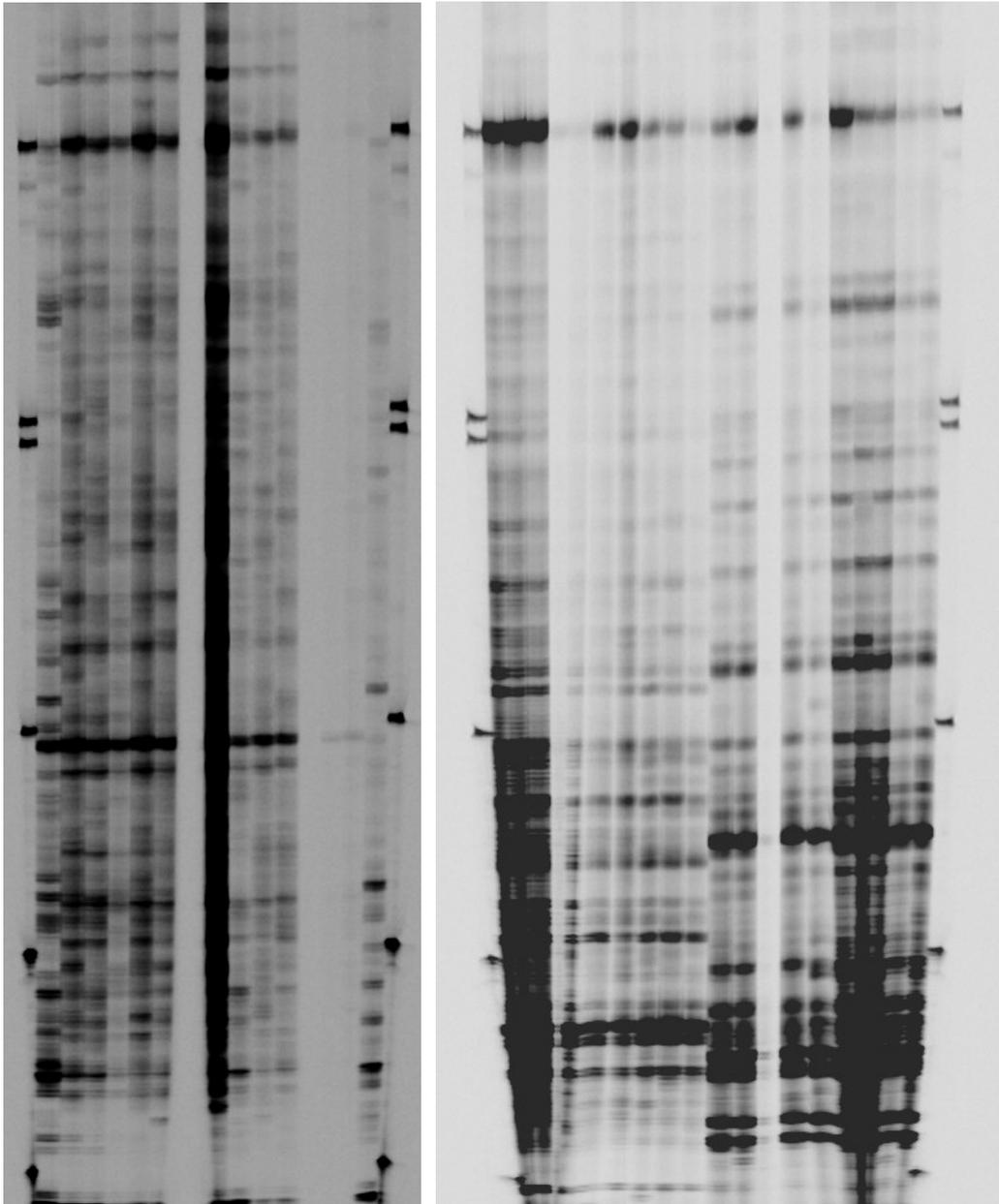


圖 14、Licor 4300 掃描儀所讀出的 AFLP 指紋圖譜。

謝言

感謝中國集美大學王志勇教授及實驗室研究生的技術指導、數據分析和討論。更感謝雪霸國家公園管理處的經費協助，尤其廖林彥（雪霸鮭魚王子）的提供樣品，處長、課長、技士等的鼓勵。感謝中研院植物所陳榮芳老師、助理李惠君小姐；植物所208核酸分析實驗室的方攻貞小姐、鄭明玲小姐在儀器和實驗上的協助。高雄醫學大學張學偉老師、實驗室學生鍾意涵和中華醫事技術學院周以正老師在分生實驗上的指導。在此一併感謝。

參考文獻

中文部分

- 王志勇、王藝磊、林利民、洪惠馨、張雅芝、邱淑貞、岡本信明 2000. 利用 AFLP 指紋技術研究中國沿海真鯛群體的遺傳變異和趨異。水產學報，25(4):288-293。
- 王志勇、王藝磊、林利民 2002. 福建官井洋大黃魚 AFLP 指紋多態性的研究。中國水產科學，9(3):198-202。
- 王藝磊、戴軍、姚揚烈，張子平 2004 利用 AFLP 技術篩選鋸緣青蟹性別差異 DNA 片段。中國水產科學，11(4):286-290。
- 牧口祐也、新居久也、中尾勝哉、廖林彥、林永發、郭金泉、上田宏 2006. 以遙測技術追蹤台灣陸封鮭魚(*Oncorhynchus masou formosanus*)於產卵期在七家灣溪的行動—初步研究。台灣、水產養殖年會摘要。基隆、台灣。
- 郭金泉、沈曼雯 2006. 鮭魚返鄉之謎(上)。科技報導 294:12-14 版。
- 郭金泉、沈曼雯 2006. 鮭魚返鄉之謎(下)。科技報導 295:10-11 版。
- 郭金泉、周以正 2006. 台灣鮭魚的中文學名。科技報導 295:12 版。
- 郭金泉 2006. 以保育孵化場策略保育瀕危鮭魚族群。台灣水產 639:58-63。
- 曾晴賢 2005 武陵地區長期生態監測暨生態模式建立：櫻花鉤吻鮭族群監測與動態分析。內政部營建署雪霸國家公園管理處。21 頁。
- 張全啟、徐曉斐、齊浩、王興蓮、包振民 2004 牙鮭野生群體與養殖群體的遺傳多樣性分析。中國海洋大學學報，34(5):816-820。
- 張俊彬、黃良民 2003 紫紅笛鯛遺傳多樣性的 AFLP 分析。熱帶海洋學報，5(23):50-55。

英文部分

- Chung, Y.H., Chang, H.W., Gwo, J.C., Lin, Y.F., Liao, L.Y., Chiang, R.H., Chang, W.C., Chou, Y.C., 2006. Genetic relationship among the subspecies of *Oncorhynchus masou* determined by growth hormone genes. Poster #162 in Fourteenth Symposium on Recent Advances in Cellular and Molecular Biology, Taiwan. Jan 18-20, 2006。
- DeWoody, J.A. and Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater, and anadromous fishes compared with other animals. J. Fish Biol. 56, 461-473.
- Felipa, A., Young, W.P., Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 2005. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 247, 35-43.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence. Alignment Briefings in Bioinformatics. 5, 150-163.
- Liu, Z., Nichols, A., Li, P., Dunham, R.A., 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*) and their F1,

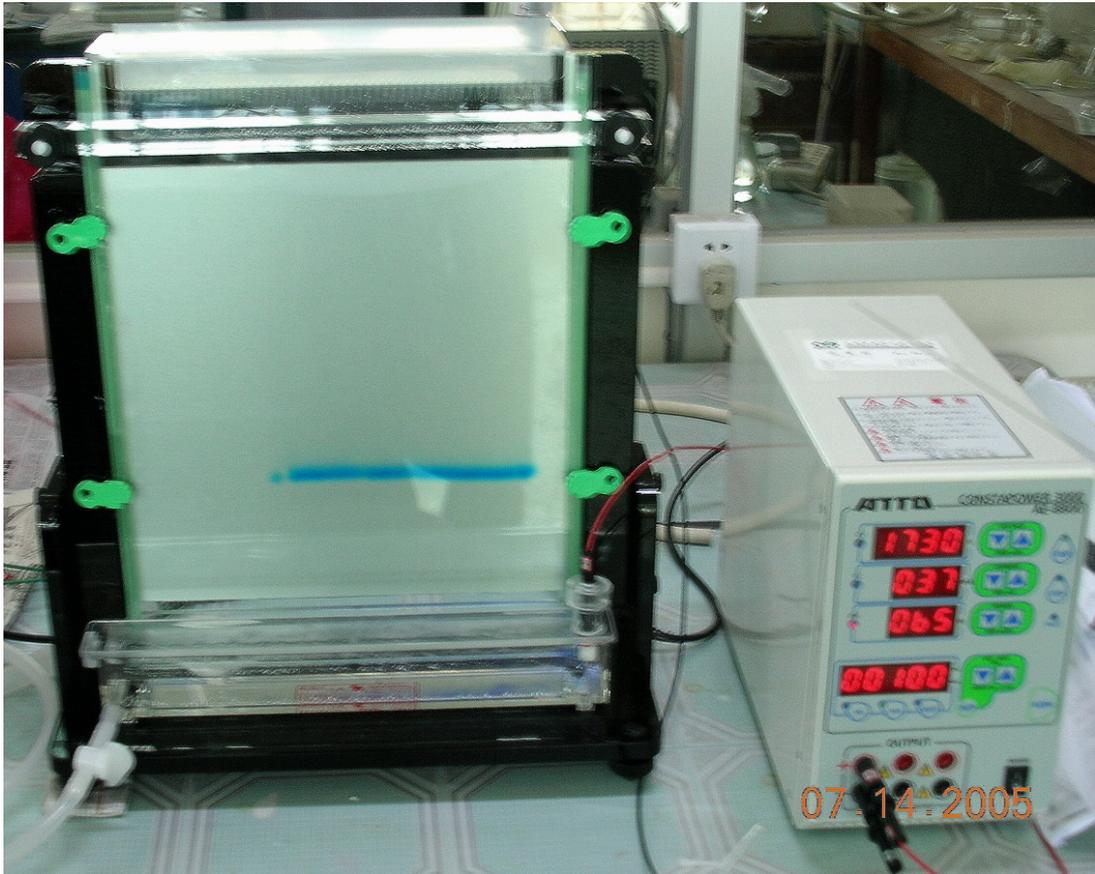
-
- F2 and backcross hybrids. *Molecular and General Genetics*. 258,260-268.
- Lynch, M. 1990. The Similarity Index and DNA Fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 7(5), 478-484.
- Merril, C.R., Switzer, R.C., Margaret, L.V.K., 1979. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(9), 4335-4339.
- Nei, M., Li, W.H., Proc. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Natl. Acad.* 76(10), 5269-5273.
- Pe´reza, F., Erazoa, C., Zhinulaa, M., Volckaertb, P., Caldero´na, J., 2004. A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. *Aquaculture*. 242, 105-118.
- Rodriguez, M.F., LaPatrac, S., Williams, S., Famula, T., May, B., 2004. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. *Aquaculture*. 241, 93-115.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2000. *Molecular cloning—a laboratory manual*, third edition.
- Sakata, K., Kondou, A., Takeshita, N., Nakazono, A., Kimura, S., 2005. Movement of the fluvial form of masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*, in a mountain stream in Kyushu, Japan. *Fisheries science*. 71, 333-341.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.
- Wang, Z.Y., Kwok, H.T., Chu, K.H., 2004. Applications of AFLP technology in the genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32, 399-407.
- Yeh, F.C., Boyle, T.J.B., 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*. 129, 157.

日文部分

- 後藤 晃、塚本 勝巳、前田 光司 1994。川と海を回遊する淡水魚—生活史と進化。東海大學出版社。東京、日本。275頁。
- 木曾 克裕 1995。本州北部太平洋の河川を母川とするサクラマス の生活史の研究。中央水研研報 (7): 1-118。
- 前田 光司 2004。サケ。マスの生態と進化。文一総合出版。東京、日本。335頁。
- 鷺谷いづみ、武田 和彦、西田 睦 2005。生態系へのまなざし。東京大學出版社。東京、日本。312頁。
- 中尾 勝哉 2006。台灣サクラマスの河川内游泳行動調査に参加して。育てる漁業 NO. 393:3-5。

歸山 雅秀 2002。最新のサケ學。成山 堂。東京、日本。127頁。

附錄一



ATTO公司的AE-6145 型的電泳儀

附錄二

1、AFLP 矩陣數據

橫座標：台灣陸封型鮭魚個體數目 縱座標：檢出條帶數

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
46	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

