

9708 台灣櫻花鉤吻鮭遺傳結構調查與監測 研究主持人：郭金泉

雪霸國家公園管理處

# 台灣櫻花鉤吻鮭遺傳結構調查與監測

內政部營建署雪霸國家公園管理處

保育研究報告

# 台灣櫻花鉤吻鮭遺傳結構調查與監測

受委託者：台灣國立海洋大學

研究主持人：郭 金泉 (Gwo, Jin-Chywan)

研究人員：徐德華、張軒銘

內政部營建署雪霸國家公園管理處

委託辦理計畫成果報告

中華民國九十八年四月

## 目次

表次	2
圖次	3
摘要	4
第一章 前言	8
第二章 材料與方法	10
第三章 結果	13
第四章 討論	15
第五章 建議事項	66
第六章 主要參考文獻	67
誌謝	70

## 表次

表 1、台灣鮭魚的微衛星引子對及擴增條件·····	71
表 2、櫻鮭家族的 AFLP 分析結果·····	72
表 3、台灣鮭魚的微衛星 DNA 分析結果·····	73
表 4、櫻鮭家族的雄性特有分子標記測試結果·····	74
表 5、七家灣溪野外台灣鮭魚(2005、2008 年)之性別比例·····	75

## 圖次

圖 1、台灣鮭魚採樣地點。·····	76
圖 2、自然死亡的台灣鮭魚樣本照。·····	77
圖 3、毛細管電泳儀的數據結果範例·····	78
圖 4、毛細管電泳儀的數據結果·····	79
圖 5、太平洋鮭屬魚種及櫻鮭家族的雄性特有分子標記序列···	80
圖 6、櫻鮭家族性別鑑定·····	81
圖 7、AFLP 選擇性引子對 E-AAC/M-CAC 得到的指紋圖譜(局部)··	82
圖 8、櫻鮭家族 AFLP 數據的 PCA 分析圖·····	83
圖 9、台灣鮭魚微衛星 DNA 的變性聚丙烯醯胺凝膠電泳圖·····	84

## 摘要

使用擴增片段長度多樣性(Amplified Fragment Length Polymorphism;簡稱 AFLP)和微衛星 DNA(microsatellite DNA)分子標記，調查 2008 年七家灣溪流域野外台灣鮭魚族群的遺傳結構和多樣性，並與 2004 年調查的結果比較。兩個分子標記皆顯示台灣鮭魚族群遺傳結構簡單，極端缺乏遺傳變異，而且族群擁有的多樣性也快速消失。AFLP 和微衛星 DNA 功能互補，但 AFLP 似乎更能在台灣鮭魚的研究項目發揮其多基因座，獲取資訊豐富的優勢。

我們也成功研發出有效辨識台灣鮭魚的微衛星 DNA 標記。分子標記可以輔助傳統以形態分類方法之缺憾和不足，是一套辨識外部型態和內部基因構造都相差無幾櫻鮭家族(cherry salmon complex)四個亞種的有效工具。

雌雄性比(sex ratio)會關鍵性決定小族群的有效族群數目。鮭科魚類除非在繁殖季節才顯現第二性徵，否則不易以外形辨雌雄。台灣鮭魚雄魚又是幼形成熟(neoteny)，即使在繁殖季節亦難分辨雌雄。我們也成功開發出準確、簡單、快速、經濟、非侵入性的雄性性別分子標記(male-specific sex marker)，探討台灣鮭魚野外族群的雌雄性比，與發生性轉換時對族群可能之影響。

他山之石可以攻錯。我們亦編譯數篇復育日本櫻鮭的研究，供保育台灣鮭魚參考。決策者有正確的生物知識和判斷能力，加上有可靠詳實的台灣鮭魚生物學基礎數據，方得以規劃出合理周延保育台灣鮭魚的策略。

關鍵詞： 台灣、台灣陸封鮭魚、櫻鮭、分子標記、性

## 一、 研究緣起

根據 2000 年 4 月 10-13 日，於行政院農委會特有生物研究保育中心舉辦的櫻花鉤吻鮭保育國際研討會之結論，茲將櫻花鉤吻鮭的復育策略(Restoration strategy)的部份工作項目(Tasks)摘要如下：

- 1、冷凍精液保存(Semen cryopreservation)：為保存遺傳特性並預防族群滅絕，現階段應建立冷凍精液保存設備，未來更應發展魚卵或胚體的凍結保存技術。
- 2、養殖方法(Culture methods)：於保育養殖場內維持能完成生活史的櫻花鉤吻鮭人工族群。
- 3、放流與監測(Release and monitoring)：放流魚須進行標誌，俾利監測放流後在自然溪流中之生存率及死亡率，以判定對野生族群之貢獻，避免盲目放流。另亦同時研究放流仔魚最適大小、時間及位置，以提高放流生存率。

然而，以上工作若搭配分子標記，不僅可達到事倍功半之效，亦可評價保育之成果。

## 二、 研究方法及過程

自七家灣溪一號到二號攔砂壩採集 20 尾野外(field)台灣鮭魚樣本。應用 AFLP(擴增片段長度多樣性; Amplified fragment length Polymorphism)，及微衛星 DNA(microsatellite DNA)，分析台灣鮭魚的遺傳結構；並開發簡單、快速、經濟、準確的性別分子標記，探討野外族群的雌雄性比。

## 三、 調查結果

- 1、終於突破台灣鮭魚此瀕危物種因族群數量稀少、棲地萎縮，所造成遺傳變異飄變、遺傳訊息極端不足，難以研究台灣鮭魚遺傳多樣性的困境。
- 2、測試現存族群中 30 個微衛星 DNA 多樣性位點，發現多已固定和僵化，失去多樣性。
- 3、再度確認 AFLP 分子標記可以成功清晰的識別櫻鮭家族四亞種鮭魚。
- 4、AFLP 及微衛星 DNA 標記，可輔助傳統以形態分類方法之缺憾和不足。可以有效防止非法交易及不慎的商業行為，導致外來物種污染台灣鮭魚基因庫或夾帶傳染疾病的可能。
- 5、成功開發出準確、簡單、快速、經濟、非侵入性的性別分子標記，探討台灣鮭魚野外族群的雌雄性比，與若發生性轉換時其可能之影響。

#### 四、主要建議事項

1. 調查現存於高山溪及桃山西溪(第4、第5和第6號防砂壩間及6號防砂壩上游)台灣鮭魚的遺傳結構，完成整個七家灣溪主流和各支流中台灣鮭魚遺傳結構的圖像，為將來環境監測、保育單位擬定管理政策和執行生物保育評估的基礎數據。
2. 大量放流由有限種魚數目交配孵化養殖的同質魚苗，明顯影響台灣鮭魚族群的遺傳結構，扼殺遺傳變異，加速台灣鮭魚基因的同質化。因此人工繁殖使用的種魚應先做分子標記分析，知曉其遺傳背景和性別，再擇遺傳異質性較高的個體配對，繁衍子代放流。
3. 人工繁殖的台灣鮭魚族群在放流前應先以性別分子標記鑑定性別，以避免放流族群性比不均，降低野外存活率及繁殖率。
4. 應長期調查所有河段之台灣鮭魚性比，並比較性成熟種魚性比及未成熟幼魚性比的差異。
5. 應調查野外及人工繁殖個體是否具有表現性性別與基因型性別不同(性轉換)的現象，並究明其原因。
6. 應即刻凍結保存台灣鮭魚精液儲存稍縱即逝的種質資源。
7. 改善台灣鮭魚在七家灣棲息環境之品質、擴大其棲地面積、增加異質棲地數量、和減少台灣鮭魚的移動障礙，盡量維持各個關連族群間的交流，減少獨特的對偶基因之丟失是就地保育、分散風險，降低物種滅絕機率，保護殘存的台灣鮭魚之當務之急。
8. 和擁有自然櫻鮭家族資源的國家(中國、韓國及俄國)，索取交換櫻鮭家族亞種鮭魚樣本，解開台灣鮭魚起源之謎。
9. 加強與日本、美國、加拿大、中國等國家的國際合作。定期舉辦國際研討會，增加研究人員互訪、研習、交流的機會，他山之石可以攻錯。

# ABSTRACT

We examined the genetic diversity of field Formosa landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) samples of this endangered species in Chichiawan Stream using amplified fragment length polymorphisms (AFLP) microsatellite DNA markers for 2008 and compare the results with those of 2004. The population structure obtained from multi-locus AFLP (dominant marker) was overall similar to estimates obtained from single-locus microsatellite DNA (co-dominant marker). AFLP is able to discriminate individuals within the populations whereas microsatellites were not. Formosa landlocked salmon exhibited extreme low genetic diversity and significant decreased of genetic variation. Computer analysis suggested all Formosa landlocked salmon populations belonged to one population genetically.

Traditional morphology-based species identification is impossible for salmon eggs and larvae that without clearly defined morphological features. We successfully generate a genetic marker to aid traditional taxonomy and investigate the integrity of the current taxonomic status among members of cherry salmon complex. Molecular marker, in combination with traditional morphological identification, is a promising tool for identifying four closely related subspecies of cherry salmon complex.

We also developed a reliable, non-invasive PCR method to identify the sex of Formosa landlocked salmon. The *OtY2m* represents a new male-specific marker. It can be used for genotyping in cherry salmon complex. When used in combination with mtDNA 1-rRNA2 control primer should provide a repeatable way to confidently detect the presence of Y chromosome sequences in these species. One of the 44 masu salmon that was genotyped as female according to *OtY2m* was phenotypic male since it had testis rather than ovary. We presume the low frequency (2.27%; one mismatches in 44 fish) of sex-reversed fish in masu salmon may have arisen due to environmental influence rather than DNA recombination.

As a first step in developing intellectual conservation decisions for Formosa landlocked salmon, it is critical to correctly understand the basic biology and collect reliable data of this species before the policy makers can make the thoughtful and brilliant judgments.

Keywords: Taiwan 、 Formosa landlocked salmon 、 cherry salmon 、 molecular marker, sex

# 第一章 前言

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,它是為拓植或於冰河時期為避寒或迷途而到台灣。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,台灣鮭魚再也無法洄游至大海,滯留於台灣河川,逐漸演化為陸封鮭魚。台灣鮭魚是分佈於地球北半球最南端的鮭科魚類(林等, 1987、1988; 郭, 2000a; 鄧, 1959; Gwo et al., 1996、1999)。因其地理位置的獨特性,台灣鮭魚在日本治台時期就被列為天然紀念物刻意保護(林等, 1987、1988; 林和張, 1990; 周等, 2006)。但自20世紀40年代以來,因為人類活動頻繁,破壞棲地、污染環境和過度獵撈捕等因素,使得台灣鮭魚的分佈範圍和數量銳減(林等, 1987、1988; Healey et al., 2001)。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,族群數量急劇起伏變動,數量最少時甚至僅存三百餘尾(曾, 2005)。鑒於台灣鮭魚在保育生物、生物多樣性保護和生物學地理學研究上的重要意義,政府保育單位將其奉為“國寶”魚優先進行保護。近年來,在雪霸國家公園的銳意努力下,逐步改善棲地環境,並進行台灣鮭魚的人工繁殖,歷史棲地復育放流,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(曾, 2005)。此時極易發生遺傳瓶頸效應、導致遺傳飄變和近交衰退,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(林等, 1987、1988; 吳和郭, 2000; 郭和沈, 2006; Gwo et al., 1996、1999)。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,提供管理者擬定有效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,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)、擴增酶切片段長度多樣性(AFLP)、微衛星標記(Microsatellite)和粒線體 DNA(mt DNA)序列分析等技巧(Liu and Cordes, 2004)。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(Bensch et al., 2005)。我們已經成功的利用 AFLP 分子標記標誌所有採獲的野生台灣鮭魚個體,並估算野生族群的遺傳多樣性。根據我們 2006 年調查台灣鮭魚遺傳多樣性的結果(調查樣本為 2005 年所採集),發現七家灣溪第 1 至 3 號壩間的台灣鮭魚族群遺傳多樣性偏低( $H_e = 0.0369$ )(郭和徐, 2006),並且和 2005 年的調查結果(調查樣本為 2004 年所採集)相比,有下降的現象(由 0.08 下降至 0.0369)(郭和徐, 2006)。在族群遺傳結構方面,由過去連續二年(2004

年和 2005 年) 台灣鮭魚樣本皆可分成二大群，暗示七家灣溪 1 至 3 號壩間存在二個主要次族群(clade; 郭和徐, 2006)。而此現象是由於台灣鮭魚原本與生俱來的移動模式所形成的關連族群 (metapopulation)現象，亦或是防砂壩阻隔分割棲地效應的影響，還是過去數次人工魚苗和仔魚放流所造成的歷史痕跡，仍需做更多的後續研究和觀察方可釐清。

雖然 AFLP 分子標記成功的突破研究台灣鮭魚遺傳多樣性及遺傳結構的困境，但是 AFLP 對 DNA 的品質要求高，技術較為繁瑣，無法應用於保存狀況較差的樣本上(例如以福馬林保存的樣本、野外自然死亡腐壞的樣本)，在推廣和普及使用上有困難。為能充分利用野外自然死亡的樣本，和分析調查博物館館藏的歷史樣本的遺傳多樣性，進一步追溯台灣鮭魚遺傳飄變及基因同質化的歷史軌跡，開發微衛星 DNA(Microsatellite DNA)和粒線體 DNA(mt DNA) 定序對 DNA 品質要求較低，操作較簡單的方法有其必要和迫切性。

在保育台灣鮭魚任務中，微衛星 DNA 和 AFLP 都展現其強大的功效與潛力。例如在辨識近緣物種及雜交種的研究中，保育類物種和非保育的近似種一旦發生雜交造成基因滲入時，便會在保育及分類上產生極大的困擾。近年來台灣有業者引進可與台灣鮭魚雜交的日本櫻鮭(*Oncorhynchus masou masou*)進行養殖，若不慎放流至七家灣流域與台灣特有種的台灣鮭魚交配，則後果勘虞。幸好微衛星 DNA 和 AFLP 都具有區分親本和雜交種的鑑識能力。

雌雄性比關鍵性決定小族群的有效族群數目。鮭科魚類除非在繁殖季節才顯現第二性徵，否則平常不易以外形來辨別雌雄。台灣鮭魚雄魚又是幼形成熟(neoteny)，即使在繁殖季節雌雄亦難分辨。由於環境嚴重污染，陸續有鮭科魚類性轉換的報導(Zhang et al., 2001; Nagler et al., 2001)。有必要開發簡單、快速、經濟、準確、非侵入性的性別分子標記，探討台灣鮭魚野外族群的雌雄性比；同時調查是否有性轉換的現象並究明其原因。

本研究的目的為：(1)開發對 DNA 品質要求較低，操作較簡單的微衛星 DNA 技術，(2)繼續以 AFLP 與微衛星 DNA 分子標記，調查棲息於七家灣溪野外台灣鮭魚的遺傳多樣性，(3)開發準確、可靠、簡易、經濟、不傷害性的性別分子標記，探討台灣鮭魚野外族群的雌雄性比。

## 第二章 材料與方法

### 2.1 材料來源

我們於2008年12月自台灣內政部營建署雪霸國家公園管理處武陵工作站，位於台中縣大甲溪河系大甲溪上游的支流七家灣溪，一號壩到二號壩之間長約2公里的河段(圖1)，以手拋網採集20尾外觀健康無法判斷性別的台灣鮭魚。剪取採集活魚脂鰭(大小約1公分)並儲放於95%乙醇中後，立即將之釋放回原採集地點。我們也在觀魚台附近河段拾獲一尾體長約26 cm的台灣鮭魚殘骸(圖2)。魚體可能遭啃食或自然腐化，殘缺不全，但大部分的骨骼仍未支離，整體尚稱完整，少許表皮及鰭條組織附於其上。我們同樣也將此樣本保存於95%乙醇中，帶回實驗室靜待分析。

我們以AFLP和微衛星DNA進行台灣鮭魚遺傳多樣性的分析。為了和2008年採集的台灣鮭魚樣本進行遺傳多樣性的比較，我們使用了6尾櫻鮭(Masu salmon; *Oncorhynchus masou masou*)和8尾石川鮭(Amago salmon; *Oncorhynchus masou ishikawae*)一起進行AFLP分析。8尾石川鮭來自日本國國立水產養殖研究所玉城分所(日本國三重縣)，6尾櫻鮭中的三尾採集自日本國國立北海道大學七飯淡水實驗所(日本國北海道函館)，另三尾由韓國友人提供採集自韓國。微衛星DNA遺傳結構分析的樣本為2008年採集的21尾台灣鮭魚，與2004年於繁殖季節(10~11月)，自一號壩到三號壩之間長約5公里的的河段採集的28尾台灣鮭魚。

開發與鑑定櫻鮭家族雄性特有性別分子標記研究共使用了65尾台灣鮭魚、44尾櫻鮭、7尾石川鮭和3尾琵琶鮭(Biwa salmon; *Oncorhynchus masou subsp.*)樣本。65尾台灣鮭魚樣本中，21尾為2008年所採集到未知性別的野外台灣鮭魚，另外44尾為2005年取自台灣鮭魚生態中心人工繁殖，約3個月大、性腺尚未發達、不知雌雄性別的台灣鮭魚；日本國長野縣松本市信州大學高田實驗室提供44尾櫻鮭樣本；7尾石川鮭和3尾琵琶鮭則都由日本國長野縣水產試驗所提供。解剖上述44尾櫻鮭與7尾石川鮭樣本，觀察生殖巢確認成熟度與性別。

### 2.2 粹取樣本基因組 DNA

用DNA純化試劑組AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific, Inc).粹取基因組DNA，透過1%瓊脂糖凝膠電泳檢測抽取DNA的完整性。選取質量好(分子量大、片段完整)的DNA樣品用於AFLP及微衛星DNA的分析。用NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc)分光光度計測定DNA濃度，再用TE Buffer把所有個體的DNA樣品濃度調整至50ng/μl。

### 2.3 AFLP 指紋圖譜建構及數據分析

根據 Vos 等(1995)開發的 AFLP 方法和步驟，購買並合成試劑。首先以 Tru91 及 EcoR1 分別對基因組 DNA 進行酶切，接著以 T4 DNA 連接酶將酶切後片段接上轉接子(Adapter)。以預擴增引子對將連接後的酶切產物進行預擴增反應。最後再以不同的選擇性引子對進行選擇性擴增反應。選擇性擴增產物的分離，是以 6.5%的變性聚丙烯醯胺凝膠進行電泳，最後以銀染法顯像。待膠風乾後，以 HP ScanJet 5370C 掃描保存。細節請參考我們以往的研究報告(郭和徐，2006)。

經變性聚丙烯醯胺凝膠電泳分離後的擴增片段，依大小分別位於電泳膠片上不同的位置(分子量愈小，移動愈快)。當電泳膠上某一相同水平位置具有擴增片段時，便將此水平位置視為一個基因座(Locus)，等位基因的式形為，有擴增片段(記為 1)或無擴增片段(記為 0)。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:  $P_d = n_i/n$ ，其中:  $n_i$  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 (BSI): 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。
4. 歸類分析 (Assignment): 由 AFLP data analyzer 計算出遺傳距離，輸入 MEGA2.0 軟體中，用 UPGMA 方法進行歸類分析，構建歸類圖 (相關性樹狀圖; relatedness tree)。
5. 遺傳多樣性指數( $H_e$  預期雜合度): 將每個 AFLP 擴增條帶看作一個基因位點，並假設群體處於哈溫(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遺傳多樣性:  $H_e = 1 - \sum P_i^2$ ， $P_i$  為單個位點上的等位對偶基因的頻率。

## 2.4 建構微衛星 DNA 圖譜及判定基因型

取已粹取的基因組 DNA 樣本 1 $\mu$ l (共 5ng)，5×PCR buffer 2 $\mu$ l， $Mg_2$ (25mM) 0.4-0.8 $\mu$ l，微衛星引子(10mM)正反兩股各 0.5 $\mu$ l，dNTP(each 2mM)0.5 $\mu$ l，Taq DNA 聚合酶(Promega)0.05 $\mu$ l、加純水至總體積為 10 $\mu$ l。使用的 30 個微衛星 DNA 引子對見(表 1)。PCR 反應條件: 先 94 $^{\circ}$ C 2min，接著 94 $^{\circ}$ C 30s， $T_m$  $^{\circ}$ C 30s(視引子對不同而調整)，72 $^{\circ}$ C 30s，重覆 35 個循環。將擴增後的微衛星

DNA產物以 6.5%的變性聚丙烯醯胺凝膠電泳與銀染。此外，我們同時搭配HAD-GT12™毛細管電泳儀 (eGene Inc)，進行微衛星DNA產物的確認(圖 3,4)。微衛星基因型的判定方法如下：樣本擴增結果若得到和多數樣本相同的等位對偶基因時，則可直接判定為同型合子(homozygotes)，但若出現不同的等位基因，則需連續擴增二次皆得到清楚的條帶時，方確認為異型合子或同型合子。

## 2.4 開發台灣鮭魚雄性專有性別分子標記

為測試櫻鮭家族的四個亞種是否具有太平洋鮭屬特有的雄性專有分子標記(male-specific marker) *OtY2*，我們根據 Brunelli 和 Thorgaard (2004)的報告，參考登錄於 NCBI (Gene bank)上數個太平洋鮭屬魚種 Dworshak Chinook (AY509558), Yukon Chinook (AY509559), Sockeye salmon (509560), Chum (AY509561) and Coho (AY509562) salmon 的雄性特有分子標記 *OtY2* 的序列(圖 5)。將上述序列使用 ClustalX 進行比對後，自行設計出新的引子對 *OtY2m*，正反向序列分別為 5-TCAATCTGTGACGTCCTCA-3 和 5-GGCTTACCGCTCCCAAGTAT-3。但為了確認使用 *OtY2m* 得到的 PCR 擴增產物和其它太平洋鮭屬魚種的雄性特有分子標記 *OtY2* 是否是同一個片段，我們將從櫻鮭家族四個亞種 DNA 樣本所擴增得到的 *OtY2m* 產物分別進行定序分析 (Applied Biosystems Inc, model 377)。

擴增四種櫻鮭家族成員的DNA樣本，PCR反應體系如下：取基因組DNA樣本 2 $\mu$ l(共 5ng)，5 $\times$ PCR buffer 4 $\mu$ l，Mg<sub>2</sub>(25mM) 1.6 $\mu$ l，引子對 *OtY2m* (10mM)正反兩股各 1 $\mu$ l，dNTP(each 2mM)1 $\mu$ l，Go Taq DNA聚合酶(Promega)0.1 $\mu$ l、加純水至總體積為 20 $\mu$ l。

此外我們也設計出一套以多重PCR方式(Multiplex PCR system)做為性別鑑定的方法，區別雌性個體及擴增失敗的個體。我們自台灣鮭魚粒線體DNA 16S rRNA上設計一組引子對，正反向分別為 5-CCTGTATGAATGGCATCACG-3 and 5-ACATG GGGGCTTAATTTCC-3，與引子對 *OtY2m* 同時進行擴增。PCR反應體系如下：取 5-10ng基因組DNA樣本，5 $\times$ PCR buffer 2 $\mu$ l，Mg<sub>2</sub>(25mM) 0.8 $\mu$ l，引子對 *OtY2m* (10mM)正反兩股各 0.75 $\mu$ l，引子對粒線體DNA 16S rRNA正反兩股各 0.1 $\mu$ l，dNTP(each 2mM)0.75 $\mu$ l，Go Taq DNA聚合酶(Promega)0.05 $\mu$ l、加純水至總體積為 10 $\mu$ l。反應條件：先 94 $^{\circ}$ C 3min，再 94 $^{\circ}$ C 1 min，52 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 1 min，重覆 35 個循環後，再進行一個 72 $^{\circ}$ C 2 min。反應完成後，以 2%瓊脂糖凝膠電泳檢測。

## 第三章 結果

### 3.1 AFLP分析台灣鮭魚遺傳多樣性

使用AFLP選擇性引子對E-AAC/M-CAC，擴增34尾的櫻鮭家族樣本(2008年採集的台灣鮭魚20尾、石川鮭8尾、櫻鮭6尾)的結果，共獲得58個大小介於100-400bp之間之有效的擴增片段(圖7)。石川鮭、櫻鮭和台灣鮭魚分別擁有54、51和44個擴增片段，40個(68.97%)片段為3個櫻鮭家族的樣本所共有，其中33(56.9%)個片段出現於全部個體中(表2)。石川鮭、櫻鮭和台灣鮭魚個體的擴增片段數分別介於45~51(平均47.63)、40~47(平均43.67)和44(平均44)之間(表2)。石川鮭、櫻鮭和台灣鮭魚的多樣性片段(polymorphic bands)及比例分別為12(22.2%)、17(33.3%)和0(沒多樣性)；共有片段(monomorphic bands)分別為42、34和44，展現不同的遺傳多樣性(表2)。石川鮭、櫻鮭和台灣鮭魚群體內的平均相似系數(BSI)分別為0.95、0.92和1；平均遺傳距離(Genetic distance)為0.51、0.083和0；遺傳多樣性指數(He)為0.068、0.111、0(表2)。

使用AFLP選擇性引子對E-AAC/M-CAC的58個擴增片段數據進行PCA(主成分)分析。Pop 1(◆)為石川鮭、Pop 2(◆)為台灣鮭、Pop 3(▲)為櫻鮭。第一主成份(Coord.1)占59.85%、第二主成份(Coord.2)為16.83%，共代表了76.68%的變異(圖8)。第一主成份可明顯將台灣鮭魚自櫻鮭家族中區別出來，第二主成份則可大致區別出石川鮭及櫻鮭。由於台灣鮭魚並無遺傳多樣性，因此20個樣本全類聚成單一個點(圖8)。

### 3.2 微衛星DNA分析台灣鮭魚遺傳結構

我們一共嘗試了30個微衛星引子對(表1)，其中3個(Omy325、Ots4、Ssa14)無法得到PCR產物。而27個成功擴增的微衛星引子對中，僅2個(Omi43TUF和Omi69TUF)有多樣性，其餘25個微衛星位點皆不具多樣性(圖9)。Omi43TUF和Omi69TUF在2004和2008台灣鮭魚的等位基因數(A)為2，觀測遺傳多樣性指數(Ho)分別為0.179和0.15，預期遺傳多樣性指數(He)分別為0.164和0.157(表3)。以 $\chi^2$ 檢驗的結果，Omi43TUF和Omi69TUF均未偏離哈溫定律(HWE)。

### 3.3 櫻鮭家族雄性專有性別分子標記與台灣鮭魚的性比

使用引子對 *OtY2m* 擴增四種櫻鮭家族成員的DNA樣本，均可得到大小約為310bp的單一片段。定序後發現，四種櫻鮭家族成員的擴增產物序列相同，為同一片段。將定序得到的結果與其它太平洋鮭屬魚種的雄性特有分子標記 *OtY2* 序列進行比對(圖5)，櫻鮭家族的 *OtY2m* 與其它太平洋鮭屬魚種的 *OtY2* 序列僅有6到11.8%的差異。

此外我們設計一套以多重PCR方式(Multiplex PCR system)做為性別鑑定的方法，使用此

方法，雄性個體可以得到二條片段，一條為雄性特有分子標記 *OtY2m*，大小約為 310bp，另外一條為粒線體 DNA 16S rRNA 的部分片段，大小約為 250bp。雌性個體僅得到一條片段(為粒線體 DNA 16S rRNA 的部分片段)。若不加入 DNA，或者 DNA 擴增失敗時，便無法得到大小為 250bp 的粒線體 DNA 16S rRNA 部分片段(圖 6)。此自行設計的多重 PCR 方法對櫻鮭家族樣本進行性別鑑定時，若樣本 DNA 濃度過高時，容易在 PCR 過程中產生非特異的片段，影響性別標記的判定。將樣本 DNA 濃度維持在 5~10ng，可得到穩定的結果。

對已知性別的44尾櫻鮭及7尾石川鮭進行性別鑑定。結果顯示44尾櫻鮭中，僅有一尾基因型(genotype)的檢驗結果與表現型(phenotype)之性別不吻合，準確率高達97.72%(錯誤率僅2.27%)。而7尾石川鮭的基因型檢驗結果則皆吻合表現型的性別(表4)。

以性別分子標記鑑定2008年所採集的21尾台灣鮭魚樣本(20尾脂鰭樣本、及1尾死亡的台灣鮭魚皮膚樣本)性別的結果，8尾為雄性，13尾為雌性，性比為0.62(雄/雌)。另外，44尾2005年採集自生態中心人工繁殖的台灣鮭魚個體中，19尾為雄性，25尾為雌性，性比為0.76。2008年的野外族群及2005的人工繁殖族群的性比均未顯著偏離雌雄比1：1 ( $X^2=1.1904$ ；0.8182；df=1； $P>0.05$ )(表5)。

## 第四章、討論

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、治水、遊憩、伐木、過度獵捕等開發行為）、地球暖化氣候變遷，氣溫逐年上升、棲地環境遭到嚴重破壞及污染，防砂壩阻隔零碎化族群和棲地等等原因，野生台灣鮭魚族群數量急劇減少，近親繁殖，族群基因同質化，基因庫萎縮，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，為了保護族群的遺傳資源，研究現存族群的遺傳多樣性自然十分緊迫和重要。本研究利用AFLP分子標記技術測得台灣陸封型鮭魚之多樣性位點出現頻率為0，比櫻鮭家族的養殖石川鮭(22.2%)與日本櫻鮭(33.3%)低(表2；圖7、圖8、圖9)。在27個成功擴增台灣鮭魚的微衛星DNA引子對中，僅2個(Omi43TUF和Omi69TUF)有多樣性(表3)，其餘25個微衛星位點皆不具多樣性(圖4)。在說明台灣鮭魚的遺傳多樣性極度匱乏，極端萎縮，棲息於有些河段的台灣鮭魚族群基因甚至同質，完全沒有遺傳多樣性。而且2008年台灣鮭魚族群個體間的相似系數為1，比2004年(平均相似系數0.946)與2005年(平均相似系數0.977)高；遺傳多樣性指數( $H_e$ )為0，遠低於2004年的0.044與2005年的0.049。這很可能是因為台灣鮭魚族群數目已非常的小型化，有效族群數目偏低，基因同質化嚴重。因此在個體數變動的機率(量變)，與遺傳的時機(質變)兩種原因交替惡性循環下，野外台灣鮭魚族群彷彿陷入了滅絕的漩渦而無法自拔，導致族群遺傳之異質性和基因多樣性不斷喪失，總遺傳變異下降，遺傳多樣性也就直直滑落。

由於棲地縮小、瀕危鮭科魚類的族群數目銳減、由少數雄魚獨佔交配權更窄化有效族群數目、加上近親繁殖、遺傳飄變等因素，瀕危物種的基因同質化嚴重。一般防砂壩上游鮭魚族群的遺傳變異應該比防砂壩下游鮭魚族群的遺傳變異低。但是2007年發現七號壩以上，防砂壩上游台灣鮭魚族群的遺傳變異佔所有調查台灣鮭魚族群遺傳變異的99%，顯著的比七號壩以下台灣鮭魚族群的遺傳變異高。顯然人為干擾(污染、深潭消失、棲地單純惡化、大量放流由有限種魚數目孵化養殖的同質魚苗等)明顯影響七號壩以下台灣鮭魚族群的遺傳結構，扼殺遺傳變異，加速台灣鮭魚基因的同質化。比較2004年和2008年的遺傳多樣性，台灣鮭魚的基因多樣性持續迅速下降。我們正目睹台灣鮭魚遺傳多樣性消失怠盡的歷史片刻。

Zhang 等(2001)曾以雄性專有成長激素偽基因GH-Y分子標記(male-specific growth hormone pseduogene GH-Y)檢驗的櫻鮭家族性別，並且和以觀察解剖個體確認性別做比對。他們發現GH-Y分子標記的準確率在櫻鮭高達93.1%，琵琶鮭甚至達到96.7%。可惜台灣鮭魚和石川鮭都不具雄性專有成長激素偽基因GH-Y(郭等未發表數據)。以本研究開發的多重PCR雄性專

有性別分子標記系統，對已知性別的44尾櫻鮭及7尾石川鮭進行性別鑑定，成果斐然。檢驗7尾石川鮭的基因型則皆吻合表現型的性別，而44尾櫻鮭中，僅有一尾基因型的檢驗結果與表現型之性別不吻合，準確率高達97.72% (表4)。顯示本研究開發的台灣鮭魚多重PCR雄性專有性別分子標記系統，準確、可靠，可以使用於櫻鮭家族四亞種。本研究和外國的研究都不約而同意識到，目前研發出的雄性專有性別分子標記，都無法100%準確辨識性別，意即會發生若干小誤差 (Zhang et al., 2001; Nagler et al., 2001; Williamson and May 2002)。Zhang 等 (2001)推測誤差的肇因有3種可能：(1)開發的引子不良；(2)檢驗的個體發生性轉換；(3) 檢驗的個體發生DNA重組。本研究將雄性特有分子標記 *OtY2* 序列定序的結果，與 Zhang 等(2001)之研究皆否定(1) 開發的引子不良之可能。而且一般魚類發生自然DNA重組的機率極低，因此咸認檢驗的個體發生性轉換，是誤差肇因的可能性最高(Nagler et al., 2001; Zhang et al., 2001; Metcalf and Gemmell 2006)。美國科學家檢查Columbia河Hanford Reach產卵季節後野生chinook鮭魚的性別，發現產卵後84%野生的chinook雌鮭魚具有XY基因型，而鄰近的對照Dworshak National Fish Hatchery魚隻則正常 (Nagler et al., 2001)。科學家推測此異常現象應和環境因子有密切關係。鮭科魚類一如人類，雌雄異體，同時遵守XY染色體性別決定系統，XX為雌，XY是雄(Penman and Piferrer 2008a,b)。目前陸續發現在鮭科魚類孵化到開口覓食有一段不穩定期 (labile period)，性別易受環境因子影響而改變，形成基因型和表型不吻合的現象(Piferrer and Donaldson 1993; Piferrer et al. 1993)。可能的環境因子包括溫度、類似鮭魚雌雄激素的環境荷爾蒙(EDCs)與汙染物質(Nagler et al., 2001; Zhang et al. 2001; Penman and Piferrer 2008a,b)。

雖然以多重 PCR 雄性專有性別分子標記性別分子標記鑑定 2008 年所採集的 21 尾尚未性成熟的台灣鮭魚，與 44 尾 2005 年採集自生態中心人工繁殖的台灣鮭魚個體的結果，性比均未顯著偏離雌雄比 1:1；但是我們發現有一尾基因型(XX)的櫻鮭雄魚(表 5)。此尾魚的基因型檢測不出雄性專有性別分子標記(*QtY2m*)，表型卻是生產精液具有精巢的成熟雄魚。假如此尾異常的成熟雄魚(XX)和正常雌魚(XX)交配，則所有子代將都是具有 XX 的全雌後裔。如果此現象發生於台灣鮭魚，我們將可預期台灣鮭魚族群的性比將偏向雌性，最後族群雌雄比例懸殊，產生阿里效應 (Allee effect)，終至族群滅絕。我們目前無法知道發生櫻鮭雌魚雄性化現象的原因，但急企需進一步調查，解明原因。

無意識的盲目放流，會有稀釋具有地方特色的地域族群，而造成基因均質化之顧慮。所以放流時不單需要考量放流魚隻的數目，也必須考慮放流魚隻的遺傳差異和品質。如何以人工養殖群體補充衰竭消失中的野生族群，而且對野生族群的衝擊降至最小呢？首先要有繁育群體的有效大小(effective population size; $N_e$ )的觀念。 $N_e$ 和親魚數量的多少是兩個決然不同的觀念。只有當繁育群體的全部個體都同時參與繁殖貢獻基因，而且雌雄親魚的數目相

等時 $N_e$ 才與親魚數量一致。但事實上，親魚群體是由不同年齡的親魚組成的，且同齡親魚的個體體型有大有小，孕卵數有多有少，繁殖有早有遲，有長有短，繁殖力有高有低，因而，親魚群體對生產後代的貢獻並不與其數量成正比。所以，親魚群體在遺傳上 $N_e$ 通常不等於其數量的多少。 $N_e$ 的大小反而受到性比、後代的配子分布及群體數量變動的影響。謹分別說明之。性比 (sex ratio)：繁育群體的有效大小( $N_e$ )以公式  $N_e = (4N_{\text{♀}}N_{\text{♂}} / (N_{\text{♀}} + N_{\text{♂}}))$  推算。式中， $N_{\text{♂}}$ =繁殖雄魚數， $N_{\text{♀}}$ =繁育雌魚數。如果雌雄親魚的性比不等於 1:1，則 $N_e$ 變小，遺傳變異亦變小。性別比例對 $N_e$ 有很大影響。此外，數目較少的性別會強烈左右 $N_e$ 。例如，當 $N_{\text{♂}}=1$ ， $N_{\text{♀}}=\infty$ 時， $N_e = 4$ 。後代群體配子分布(variation in reproductive success)：通常都假定，配子完全隨機地由父母群體留給下一代。事實上，這種情況頗少發生，不同的父母親代個體所留下的後代數目往往差異極大。當一個產卵群體中，某些雌、雄魚繁殖且保存於下一代親魚群體的子代多，而某些雌、雄魚留下的子代較少時，就會影響其子代群體的配子分布，從而導致群體有效大小( $N_e$ )的變小。這可用下面公式說明： $N_e = (4N / (2 + \sigma^2))$ ，式中 $\sigma^2$ 為各家系的子代在新繁殖群體中所佔比例的變方差。在實際現場，情況複雜的混合交配中，特別在人工繁殖時，雌魚有全產、半產及不產等不同情況、受精率也各有高低，每尾雌魚實際留下的後代數量也就大不相同，就更有可能使 $N_e$ 變小。群體數量變動(temporal variability ineffective population size)：當一個繁育群體的個體數目由於某種原因(天災，隔離、移植等)而大減時， $N_e$ 是受以後各代群體大小的調和均值的影響。 $N_e = t / (1/N_1 + 1/N_2 + \dots + 1/N_n)$ 。公式中， $t$ 為世代序數。個體數量最少的世代對 $N_e$ 有決定性的影響。

所以以人工養殖群體補充衰竭瀕危的族群量，而且要使其對野生族群的衝擊降至最低，具體的步驟大致有五個。(1)維持親魚群體的適當大小。在條件許可情況下，族群群體越大越好。當 $N_e$ 在 1000 尾以上時，遺傳飄變的影響幾乎可以忽略。此外、要儘可能保持 1:1 的雌雄比例;(2)定期更換親魚群體。定期地引入天然族群作為親魚，可以減少人為逆向選擇違反天擇的危害，限制遺傳瓶頸、遺傳飄變及近交等的發生，從而保持天然族群的遺傳變異性;(3)在不同地點分別移(易)地保存。以保護族群間的變異。因為在狹小範圍內進行有限的選擇往往會使族群基因同質專一化。而任何族群同質的專一化將降低基因庫的變異，減少族群在生態上和演化上的可能;(4)低溫保存配子和胚體;(5)應用新的育種技術(雄核發育、代理孕母)。由於野外已調查過的台灣鮭魚都顯示遺傳多樣性幾乎同質，將從七家灣孵育的養殖台灣鮭魚放流至已沒台灣鮭魚蹤跡的歷史棲地，讓其順應各個棲地特殊獨一無二的環境(植被、生物相、水質水理等)，由大自然當演化推手，可能是再度萌生台灣鮭魚基因多樣性唯一的對策。

# 鮭科魚類奇妙的遺傳結構

## 1、 地域族群間的遺傳變異

日本雨鱒 (*Salvelinus leucomaenis*; Iwana 岩鱒) 因棲息地的不同，以目視其外觀即可分辨個體之差異 (圖 1)。依日本雨鱒表型的變異，曾經被分成四個獨立的物種 (species)，日本科學家現在將此分類為四個亞種 (subspecies)。雖然四個亞種都通稱為雨鱒，但依外部型態、棲息地域的不同，雨鱒有四種帶有獨自特徵的族群。這種現象不僅出現於雨鱒，很多生物，包括人類，都會因為身處地域的不同，而形成帶有地域特徵形質的地域族群 (local population)。物種表現的地域變異，有的是源自遺傳的差異，有的則來自環境的影響。研究生物的表型 (phenotype) 變異和基因型 (genotype) 變異，與棲息環境的相互關係，是解開地球上為何生命呈現如此繽紛、如此多樣的線索。

爾來隨著分子生物學的快速發展，量化野生或天然生物的遺傳變異，以及地域族群的遺傳分化程度，都不再是難事。日本北海道遊樂布川，以及北海道其他地區的白鮭，都同樣表現誇張的勾鼻第二性徵 (圖 2)，他們一不一樣？假如不一樣，那又是相差多少呢？對於這種問題，科學家僅能以基因層次來回答。假如遺傳分析的結果，發現地域族群之間有遺傳變異 (遺傳分化)，則地域族群的遺傳構造，不僅反映地域族群經歷的演化歷史背景，也告訴我們此地域族群生物的生態特性、地域族群對未來的適應程度、甚至地域族群分化成不同物種的可能性。

遺傳的變異性越高，也可以說遺傳的多樣性也越豐富。保育生物學就是要保護物種的基因多樣性，和物種的遺傳多樣性。族群多樣性一旦下滑，不但族群拓殖新棲地的能力會低落，而且族群對瞬息萬變的環境也會產生適應困難。小族群多伴隨著遺傳多樣性之減少，以及近交弱勢的雙重現象，兩者都會對族群產生負面影響。因此掌握天然族群的遺傳結構，不但可以了解生物的生態特徵及其演化的歷史背景，而且可以提供保育主管單位有效保護野生生物的營運管理方針。

本文首先簡單介紹族群遺傳學的理论模式 (model)，接著以降海洄游型和河川型族群的順序，敘述鮭科魚類遺傳構造的地理空間分布形式 (pattern)。隨後調查降海洄游型和河川型兩種族群類型，族群地理空間分布形式的經時變化，最終以人為干擾對鮭科魚類遺傳構造的影嚮做總結。

## 2、 族群遺傳結構地理空間的變化

### 2.1 族群遺傳學的理论—族群間的分化和移植模式

幾乎所有組成生物族群的個體，在空間都非均勻的分布。一般，個體分散聚集於喜好的棲地 (habitat)，只利用部分空間。科學家稱群聚於共同棲地生活的個體為地域族群 (local population)，地域族群也是科學家進行遺傳基因分析時的最小單位。

影響族群遺傳結構的重要因子有移植遷徙、突變、選拔淘汰。突變與選拔淘汰影響力比移植遷徙小，而且速度緩慢曠日費時，在短期時間的尺度中，往往可以忽視。所以本文聚焦於移植遷徙。假使族群之間頻繁的移植遷徙，在廣泛地理空間範圍，同一種生物的基因會相當均一同質；反之缺乏、甚至彼此斷絕移植遷徙往來的各族群，族群間會明顯呈現不同的遺傳結構。移植遷徙的模式決定族群在各種地理空間的遺傳結構。

首先我們考慮由 $n$ 個相等大小的地域族群組成的島嶼模式 ( $n$ -island model: 圖 3a)。假設聚集於各島嶼的個體數目 (有效族群大小:  $N_e$ ) 相等，而且各族群間的遷徙率 ( $m$ ) 也相同 (逢機遷徙)。

當遷徙和遺傳飄變平衡時，族群的遺傳結構將為  $F_{st} = 1 / (4N_e m + 1)$ ,  $\alpha = \{ (n / (n-1)) \}^2$ 。  $F_{st}$ : 遺傳分化指數。當  $F_{st} = 0$  表族群間沒有遺傳分化；當  $F_{st} = 1$  表各族群之間完全分化。通常野生族群的  $F_{st}$  超過 0.1 時，科學家認為族群已經發生遺傳分化。 $N_e m$  稱為每一代有效遷徙個體數目，當  $N_e m$  超過 1 時 (每一代有一個個體遷徙)，科學家認為族群間完全沒有遺傳分化。移動能力活潑物種的族群，其遺傳結構很符合島嶼模式。當  $n$  很大時， $F_{st} = 1 / (4N_e m + 1)$  近似  $F_{st} = 1 / (4N_e m + 1)$ 。亦即聚集於各島嶼的個體數目增加時，就形成大陸—島嶼模式 (圖 3b)。本質上，島嶼模式和大陸—島嶼模式是相同的。

島嶼模式假設遷徙是逢機性，實際上，很多生物的移動能力有限，一般和與其地理距離最近的生物族群，互動 (移植遷徙) 最頻繁。墊腳石 (踏腳石、飛石) 模式 (Stepping-Stone Model, SSM) 是有考慮距離因素的模式 (Isolation-By-Distance model, IBD; 距離隔離格局) 之一。依照棲地的形狀，墊腳石模式又可分為一次、二次、三次墊腳石模式 (圖 3c,d)。當各族群大小相等時，墊腳石模式一如島嶼模式。當生物族群間的互動僅侷限於鄰近的族群時，墊腳石模式和島嶼模式就很不同，墊腳石模式比島嶼模式容易產生族群間的遺傳分化。

各族群間完全沒有往來稱為滅絕模式 (圖 3e)。例如：因為地殼變動或火山爆發等因素，被地理隔離的生物族群；還有受人類影響，棲地被零碎化之野生生物均屬之。在此情況，隔離的歷史和被隔離的生物族群之有效族群數目，決定各族群的遺傳分化速度，最後各族群終將完全遺傳分化。

滅絕—再生模式 (圖 3f) 考慮的是地域族群滅絕、和滅絕後空出的棲地，因為由別處移植入新族群而再生。由於滅絕—再生模式的理論很複雜，目前尚未有定論。科學家可以從測量野外族群的基因分子標記，推估族群的遺傳分化指數 ( $G_{st}$ 、 $F_{st}$ 、 $Q_{st}$ )，再進行檢驗上述諸移植遷徙的模式 (圖 4)。例如：假使移植遷徙遵從島嶼模式，族群的遺傳分化將和地理的距離無關，預估分布在廣泛範圍之同一種生物的基因會相當同質 (圖 4a)。隔離模式將一如島嶼模式，遺傳分化和地理的距離無關 (圖 4b)。假如遺傳分化和地理的距離有正相關，據推測生物的移動方式將遵從墊腳石模式 (SSM) 或有考慮距離因素的隔離模式 (圖 4c,d)。一次墊腳石模式其斜率較高 (圖 4c)，二次墊腳石模式的斜率較低 (圖 4d)。滅絕—再生模式的理論至今尚未確立直接驗證的方法，咸認此模式造成的遺傳分化和地理的距離之關係，類似隔離模式。

由於在野外追蹤為數眾多個體的移動軌跡相當困難，現在的研究主流是先分析族群的遺傳資料，再反過來推測族群移植遷徙的樣式和其程度。例如田野調查發現族群間個體的移動很頻繁，但是遺傳分析卻發現基因流 (gene flow) 很微量，我們可以合理推測，移動

的個體在移動到達的地點，沒有成功地留下後代子孫，和當地的個體交流彼此的基因。背後的原因可能是每個族群存在著個別的選擇壓力 (individual selection)。例如：同樣是陸封型粉紅鮭 (kokanee；降海洄游型叫襪子目鮭魚：sockeye)，在美國華盛頓州流入湖泊之河川產卵型的粉紅鮭，若是在湖泊產卵，其繁殖成功率較低，競爭不過於湖泊在地生產型的陸封型粉紅鮭。反之，假如測量得知族群間的基因流旺盛，在野外卻罕見個體的移動，可能暗示在最近的過去，族群發生過極度的族群數量 (demography) 波動事件。所以如果能結合族群的遺傳資料和田野調查所得到移動軌跡之數據，應該會導出新穎的發現才是。鮭科魚類到底符合那種模式呢？底下以降海洄游型和河川型族群做解釋。

## 2.2 族群間的分化和移植模式－降海洄游型地域族群的實例

白鮭和樺太鮭是降海洄游型的鮭科魚類，為了成長，往往進行長距離的索餌洄游。來自許多河川的族群，在海洋中聚集成一個單一的族群，集體行動。因此很難將降海洄游型的鮭科魚類定義為地域族群。但是由於鮭科魚類有洄歸母川的特性，我們可以將一條河川或每條河川的支流視為一個地域族群。由於鮭科魚類洄歸率沒有 100%，有些個體往往迷途，游到母川以外的河川，如此構成的遺傳結構，將鮭科魚類整體族群形成一個環環相扣的關聯族群 (metapopulation)。

實際上，究竟降海洄游型鮭科魚類移植的模式如何？假如有些鮭魚個體在海洋洄游時期，混入其他魚群，因此而產生移植事實，科學家將之歸類為大陸－島嶼模式 (圖 5a)。若是在產卵的階段，魚隻接近母川時才迷途移住，則此情境較接近墊腳石模式 (圖 5b)。假若在各河川的族群，頻繁發生滅絕－再生模式，據推測即使鄰近的族群，族群間之遺傳分化應該相當嚴重。

到目前為止的研究報告 (表 1) 多支持移植率在鄰近的河川之間較高，隨著地理距離之遠近，河川越遠，迷途的個體逐漸減少。鮭魚有洄歸母川的本能，越鄰近其出生地的河川，因為河川性質越接近母川，即使迷途誤入母川以外的鄰近河川，鮭魚下一代的存活率應該也較高吧！

那麼如果移植的模式是墊腳石模式，究竟是一次墊腳石模式還是二次墊腳石模式呢？科學家比較歐洲波羅的海 (Baltic Sea) 的大西洋鮭魚和太平洋美國華盛頓州胡德運河 (Hood Canal) 的割喉鱒魚的移動樣式。他們發現歐洲大西洋鮭魚符合一次墊腳石模式，而太平洋的割喉鱒魚的移動模式較吻合二次墊腳石模式 (圖 6)。假使考量兩種鮭魚的洄游途徑和洄歸母川的差異，為何兩者 (大西洋鮭魚和太平洋的割喉鱒魚) 移動模式不同？是相當有趣，令人玩味的。因為歐洲大西洋鮭魚僅在海洋沿岸附近洄游，但是胡德運河的太平洋割喉鱒魚的移動卻擴散至遠洋大海，魚隻自由在入海的江河河口穿梭。由於胡德運河是寬僅 5 公里，非常細長的水系，太平洋割喉鱒魚移植到對岸的河川，反而比移植到河川左右兩方向但距離較遠的河川，既方便又容易。由比較粉紅鮭魚洄歸母川的高準確性及太平洋割喉鱒魚洄歸母川失焦，迷途到對岸繁衍之現象，研究族群遺傳也可用於推測鮭科魚類洄歸母川的機制和生態特徵。

降海洄游型鮭科魚類移植的模式依距離而異。移植的程度如何呢？也就是說要多少地理

尺度，才會發現有遺傳結構不同的族群呢？表 1 彙整降海洄游型鮭科魚類遺傳分化的尺度。日本科學家研究北海道白鮭的同工異構酶，聲稱一旦地理相距超過 600 公里，白鮭的遺傳分化就急速上昇。所以白鮭的遺傳交流可及的範圍是由河口開始算起的 600 公里方圓之內。科學家整理 57 個歐洲大西洋鮭魚地域族群的同工異構酶數據，推測大西洋鮭魚的遺傳分化尺度為 1000~2000 公里以上。棕鱒在各河川之間有依距離而被隔離的現象，河川內則無此現象。因此科學家推測各河川之間的棕鱒族群是遵守墊腳石模式的獨立族群，河川內則是彼此間移植頻繁，遺傳性質均一的棕鱒族群構造。

可見降海洄游型鮭科魚類遺傳分化的程度，依物種的種類、移動能力還有洄歸母川的準度而異。每一代有效遷徙個體數目 ( $N_e m$ ) > 1 則會妨礙族群間的遺傳分化，降海洄游型鮭科魚類大概需 100~1000 公里的河川範圍，每一代有效遷徙個體數目等於 1 才會遺傳分化。然而到目前為止的研究報告多採用由  $F_{st}$ ，再用  $F_{st} = 1 / (4N_e m + 1)$  的公式推測每一代有效遷徙個體數目 ( $N_e m$ )。由於此公式假設各族群數目相等、遷徙和遺傳飄變平衡，和現實的族群現況不符合，移植率的定量推測（每一代有效遷徙個體數目）經常不準，此方面是今後應該努力研究的領域。

## 2.3 族群間的分化和移植模式—河川型地域族群的實例

降海洄游型族群，需遺傳分化的尺度約 100 到 1000 公里。相對的，一條河川的長度最長也約數百公里，因此同一水系的河川型鮭鱒魚族群的遺傳結構，想像上應該是沒有變化。然而事實上，各類魚種的河川型族群在其所棲息的水系內確實存在著遺傳的分化（表 2）。甚至分布於短短數公里的族群，經常呈現強烈的遺傳分化現象。在如此小規模尺度內，竟然有如此多遺傳上相當差異的族群之存在，是很令人驚訝的。雖然常說距離效應，但在多數的場合是不存在的。河川成直線性似乎較吻合一次性墊腳石的模式，然而過去的經驗告訴我們河川型族群更適合隔離模式，或者滅絕—再生的模式。

表 2 列舉族群間的遺傳分化指數 ( $F_{st}$ ) 介於 0.3~0.5，遺傳分化非常強化的族群。這些族群的分化並非源自移植，那究竟為何會如此分化？既然河川內並沒有移植任何魚群，為何會產生這種現象？據推測，瀑布和河川橫斷物把許多河川型族群的棲地分割零碎化是其中的一個原由。事實上過去的許多研究報告，也都舉出這種物理障礙是肇因之一。其次，溫度也會妨礙冷水性鮭科魚類個體的移動範圍，而造成遺傳的分化。這是為何同一物種擁有降海洄遊和河川型族群兩種生活史的鮭科魚類，其河川型族群多分佈於南部（緯度較南），降海洄遊型卻集中於北部（緯度較北），溫度的因素是不可以忽視的原因。

科學家調查河川型鮭科魚類族群，在沒有物理和溫度障礙的河川中，河川各族群之間遺傳的分化程度。他們以棲息於日本北海道空知川上游八個支流的雨鱒為研究對象，進行微衛星 DNA 的調查。實驗設計如下：選擇其中一個位於瀑布上端，移動受限制的族群當控制組。然而實驗組的其他七個支流之間，雨鱒可以自由交流，並不存在影響族群移動的物理和溫度障礙。他們發現七個支流內（除了控制組以外），雨鱒族群的遺傳分化和地理分布，有強烈的正 ( $R^2 = 0.50$ ) 相關的關係（圖 7）。也就是說在沒有河川橫斷物等物理障礙，近似自然狀態的河川，河川型族群是遵守一次墊腳石的模式。假如加上瀑布上端移動受限制

的族群一起統計分析，遺傳分化和地理分布的關係的相關程度就急降為 $R^2 = 0.39$ 。其次，許多河川型族群其族群數目很小，我們也不能否認地域族群可能存在著滅絕再生，而引發遺傳分化之可能性。由於還沒有這方面的研究資料，議論就此打住。

上述的兩個研究顯示即使沒有妨礙族群移動的要因，在僅僅十公里的河川範圍內也發現族群有強烈的遺傳分化現象。一般棲息於河川的鮭科魚類有定棲性之趨勢，這種現象也可能會產生族群的遺傳分化。科學家於 2000 年發現河川型鮭科魚類在其河川棲地也展現一如降海型鮭科魚類，回歸其出生地 (homing) 的行為，這種現象也可能是加速促進族群遺傳分化的原因。

### 3、 族群遺傳結構經時的 (隨著時間) 變化

不論生活史是降海洄游型或河川型的地域族群，鮭科魚類的遺傳組成會隨著地理空間的不同而異。依地理空間形成的遺傳結構是否經時穩定？若否，需要多少時間歲月的錘鍊？

科學家以樺太鮭魚為例，說明樺太鮭魚的遺傳組成會隨著時間的不同而異。樺太鮭魚一個週期的生活史須時兩年，因此奇數年產卵的魚隻和偶數年產卵的魚隻，因為不同年度成熟沒有機會雜交。以族群遺傳的觀點思考，會產生一個有趣的疑問。遺傳上，於今年某河川採獲的樺太鮭魚是與去年同一地點捕獲的樺太鮭魚相似？還是和同一年度在不同河川捕獲的樺太鮭魚遺傳上更相同？

分析 DNA 的數據後發現 DNA 的證據支持後者 (圖 8)。奇數年度的魚隻和偶數年度魚隻，其遺傳相當分歧。不同年度的族群比同年度相距 1 千公里的河川族群，分化程度更高。此事實揭示物種的生態特性決定族群的遺傳構造。此外，不同地理區域偶爾有 1 年成熟的早熟小型個體或 3 年才成熟的晚熟個體，因此，奇數年度和偶數年度有機會交配，然而繁衍的魚隻經常發生生殖能力低落的雜種弱勢現象。此原因一般也歸咎於不同年度遺傳分化的結果。

樺太鮭魚這種奇數年度的魚隻和偶數年度魚隻其遺傳相當分歧的生物相當珍奇。一般鮭科魚類的世代會重複，在如此短時間會產生這般強烈的遺傳結構變化是唯一僅有。下一個有趣的問題是：需要多少時間和歲月的錘鍊，鮭魚的遺傳結構才會產生變化？此問題也是考慮生物演化的重要課題。

科學家們於 1999 年首先將 76 年前採集的大西洋鮭魚隻鱗片以 PCR 擴增 DNA，比較過去 76 年間和現在大西洋鮭魚族群的遺傳結構。研究發現大西洋鮭魚族群的遺傳結構非常穩定 (圖 9)。過去 76 年間，同一河川內大西洋鮭魚族群的遺傳結構幾乎沒有任何變動。同時他們也發現大西洋鮭魚有依地理分布，族群的遺傳結構呈現不同的現象。和樺太鮭魚剛好相反，今年於某河川採獲的大西洋鮭魚是與 76 年前在同一地點捕獲的大西洋鮭魚相似，而和時間無關。在這 76 年間即使孵化放流和撈捕漁業等人為嚴重干擾，大西洋鮭魚居然仍保持 76 年前族群之遺傳結構。其後發表的眾多類似的研究都殊途同歸，得到相似的結果—鮭科魚類的遺傳結構經時穩定 (表 3)。

### 4、 隔離的影響和有效族群的大小

棲息於北海道河川的兩鱒，基本上是行降海洄游型的生活史。一旦河川橫斷結構物（防砂壩或水壩）妨礙它的降海移動，被阻斷在河川橫斷結構物上游的族群，因為被完全陸封於河川，只得於淡水完成其生活史，上游的兩鱒族群就逐漸喪失降海性。日本的科學家調查防砂壩對兩鱒遺傳結構的影響。他們在日本北海道南部的三個河川防砂壩的上下游共計 11 個採樣地點（樣點：以防砂壩為界往上或往下 300 公尺區間）採集兩鱒，進行微衛星 DNA 分析。在樣點內採集到的兩鱒河川族群，在防砂壩完工以前應該是同一個族群，也就是在防砂壩的上下游若發現兩鱒族群有任何遺傳結構的差異，我們可以推論這應該就是隔離造成的影響。

圖 10 表示研究發現防砂壩上游族群和下游族群的對偶基因數目和基因遺傳多樣性（ $H_e$ ）的比例（%）。調查的六個河川的上游兩鱒族群的對偶基因的數目的比例（%）都比下游少，平均值甚至減少約 50%。代表遺傳多樣性的基因遺傳多樣性也有同樣的趨勢。其次同一條河川防砂壩上游兩鱒族群和下游兩鱒族群的遺傳分化指數（ $F_{st}$ ）多超過 0.1，顯示高度遺傳分化。然而在同一條河川的降海洄游型兩鱒族群，科學家卻沒有發現遺傳分化的現象。因此河川橫斷結構物造成棲地的分裂區格化，明顯的促成棲息於其中之族群的零碎化。而且被河川橫斷結構物阻隔的上游棲地越小，河川橫斷結構物的完工日期越早越久遠，棲息於其中之族群的遺傳分化的現象就越顯著（圖 11）。也就是說棲息於其中之族群的遺傳分化程度，還有遺傳多樣性的萎縮程度，和被河川橫斷結構物隔離上游族群的大小，及被隔離時間的長短有顯著的關係。研究分析的兩鱒樣本是河川被河川橫斷結構物阻斷約 30 年後的樣本，一般兩鱒的生活史約 3 年，所以僅僅十個世代，兩鱒族群的遺傳結構居然產生如此巨大的變化。

為甚麼在如此短暫的時間，兩鱒遺傳結構會發生如此巨大的變化呢？為甚麼和大西洋鮭魚會有如此迥然之差異？答案是有效族群的數目（ $N_e$ ）。有效族群越小會產生族群的遺傳飄變，造成族群遺傳多樣性的劇烈滑落和萎縮。降海洄游型的族群，例如大西洋鮭魚，其有效族群數目很龐大，遺傳結構不易產生改變。

那麼被河川橫斷結構物隔離上游兩鱒族群的有效族群的數目究竟是多少？由於河川橫斷結構物下游兩鱒族群數目非常龐大，假設其經時的遺傳結構穩定，比較河川橫斷結構物上下游兩鱒族群的對偶基因的頻度，科學家可以推估被河川橫斷結構物隔離之上游族群的有效族群數目。利用此法估算日本北海道南部三個河川防砂壩上游，8 個兩鱒族群的平均有效族群數目約是 40 尾。此數目非常小！利用標記放流再捕捉方式，調查推估其中一個有效族群數目為 29。日本科學家估算兩鱒族群的總族群數目（ $census\ N$ ；包括所有未成熟和沒參與繁殖的個體），發現其總族群數約為 370。因此  $N_e/N = 29/370 = 0.08$ ，表示總族群數中對下一代族群基因庫有貢獻魚隻之比例。所以乍見 370 尾偌大族群，實際有傳遞基因至下一代的個體竟然是如此稀少，這是執行族群保育時要特別留意的現象。一般  $N_e/N = 0.10$ ，亦即野外確認具繁衍能力的 10 尾個體之中，只有 1 尾會產生後代，傳遞基因至下一代。有效族群數目決定了族群的遺傳多樣性。

歐美也有若干計算有效族群數目的研究報告，如科學家於 2002 年分析保存了四十年的鋼頭鱒（steelhead trout）鱗片樣本，並推斷棲息於英屬哥倫比亞州河川的鋼頭鮭之有效族群數目。此州每年的孵化場均保存上溯洄游種魚（成熟且參與繁殖的個體）數目的紀錄，所

以科學家可以將此種魚數目和  $N_e$  相比，獲得  $N_e/N$  之比值。據推估由海洋上溯洄游河川的種魚數目平均每 1500 到 2000 尾之中，有效族群大小大約在 262 尾(根據報告的表計算， $N_e$  範圍：92 到 560 尾)，因此  $N_e/N$  比值之平均為 0.15 ( $N_e/N$  範圍：0.06 到 0.29)。這個數字和先前估算的兩鱒有效族群數目相仿，Frankham 於 1995 年比較各種物種的有效族群數目，發現  $N_e/N$  比值界於 0.10 到 0.11 之間。

鋼頭鱒和兩鱒兩者的研究基本上有明顯的不同。過去三十年被河川橫斷結構物隔離於上游的兩鱒族群，其遺傳結構產生急劇的改變 ( $F_{st} = 0.11$ )，而且族群的遺傳多樣性劇烈滑落。反之過去四十年間鋼頭鱒的遺傳結構產很少變動 ( $F_{st} = 0.02$ )，而且族群的遺傳多樣性也沒什改變。族群之間是否有基因交流，是造成兩鱒和鋼頭鱒此差異的主要原因。英屬哥倫比亞州河川的鋼頭鱒可以由鄰近族群提供基因，所以藉以維持鋼頭鱒族群的遺傳多樣性。但是被河川橫斷結構物完全隔離的日本北海道兩鱒，族群之間的基因交流完全終止，造成遺傳多樣性的萎縮。貧乏的遺傳多樣性對被隔離的兩鱒族群造成不可挽救的惡果。所以河川橫斷結構物對被切割零碎化的族群之影響是很深遠，刻骨銘心。

## 5、 保育方針—人為影響和遺傳結構

許多鮭科魚類的成長和繁殖模式，移動遷徙方向都很機動，會因應環境的條件而改變其生活史。假使族群間遺傳基因交流被切割阻隔，被切割的各族群會獨自演化，或許會分化發展而種化。目前雖是被分類為同一物種，未來都有可能分化成諸亞種，甚至形成另一物種。所以說科學家定義物種時，很注意其分布之地域性。

種內分化的模式—物種是經過歲月長時間累積的演化產物。科學家將過去已經高度分化，或者將來會完成高度分化的族群稱為演化顯著單位 (Evolution Significant Unit: ESU)，當成演化的有效單位來處理。演化顯著單位也是科學家最致力於保育的對象。

無意識的盲目放流，會有稀釋具有地方特色的地域族群，而造成基因均質化之顧慮。例如把採集自少數河川族群的受精卵放流至所有的河川，繁衍下一代就是一個典型的例子。科學家比較天然的大西洋鮭魚族群，和孵化場生產的大西洋鮭魚族群之遺傳結構，發現天然大西洋鮭魚族群的遺傳結構，呈依距離而隔離 (IBD: Isolation By Distance; 距離隔離格局) 的現象。然而放流孵化場生產的大西洋鮭魚至廣範圍區域，其放流區域之族群的遺傳結構卻頗均一。放流孵化場生產的大西洋鮭魚，不僅族群的遺傳結構會均質、單純化，孵化場生產的魚隻也會與天然野外的大西洋鮭魚雜交，產生具有生殖力，但適應度較低的種內雜交種。這些雜交種繼續繁衍生產下一代，逐漸增加其族群數目，整體族群的增殖力終將衰減，逐漸步上衰敗路途。所以放流時不單需要考量放流魚隻的數目，也必須考慮放流魚隻的遺傳差異和品質。

遷徙、移植兼具有阻止族群分化，和維持族群繽紛遺傳多樣性的作用。遷徙率的減少，不只影響遺傳基因，同時也大幅度決定地域族群的存續。降海型鮭科魚類每一代即使僅有若干個體移植遷徙，就可大幅度防止族群的滅絕。即使不知如何因瀕危的族群，若能維持和其他族群的聯繫的通路 (生態廊道)，必要時藉著外部個體的移入 (關聯族群)，瀕危族群將可再生。

過量撈捕會降低有效族群的數目，削減族群之遺傳多樣性，引發族群間的遺傳分化。研究調查顯示，遊釣促使加拿大河鱒的湖泊族群之遺傳多樣性，比河川族群更低。由於體型較大，還有較活潑的河鱒個體較易上鉤，剩下殘留在湖泊繁衍的河鱒族群，將以成長緩慢的個體佔大多數，進而一場寧靜革命，結果一舉改變河鱒湖泊族群型之遺傳結構。

各式各樣的人為干擾都會快速改變鮭科魚類原有的遺傳結構。遺傳構造反映出物種或者是族群悠久的演化歷史歲月。遺傳演化不可逆，即使借助人類而恢復生機的鮭魚族群，被復育的鮭魚族群也無法重回原先歷史演化的遺傳構造。所以保育必須兼顧保存族群的遺傳固有性，和維持族群遺傳的多樣性！

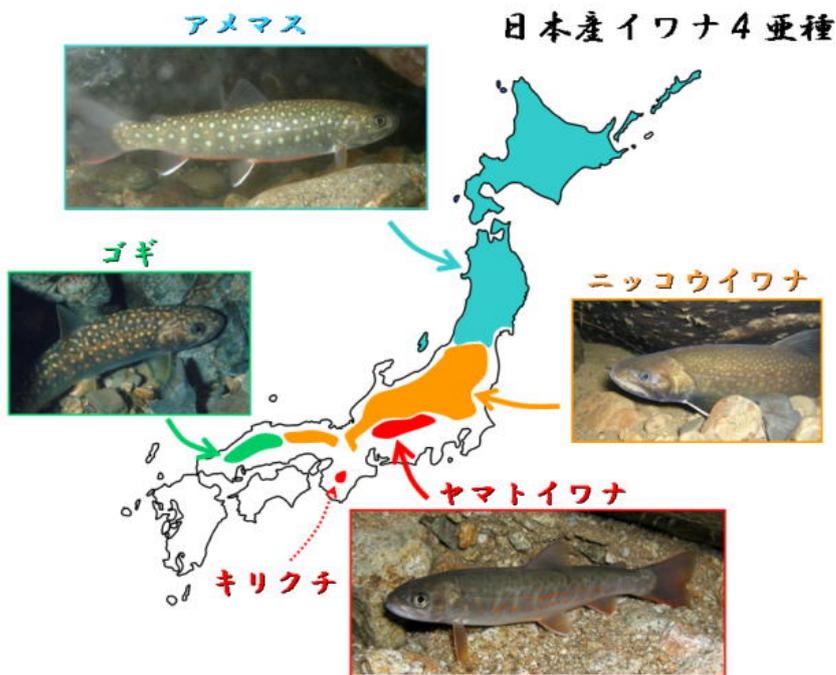


圖 1. 上圖：日本雨鱒主要有四個亞種(アメマス・ニッコウイワナ・ヤマトイワナ・ゴギ)，一般可用體表斑點的顏色區分之。斑點的顏色和大小相當多樣，越往日本列島南部，斑點和外部體色都越紅，其生態上的意義不明。下圖：北海道南部雨鱒 (IWANA) 之生活史。雨鱒同一族群中，有些魚終生滯留淡水河川(殘留型)，另一些魚則銀化降海(降海型)，繁殖期時再溯河回母川產卵。降海型溯河回母川產卵的次數不只一次。

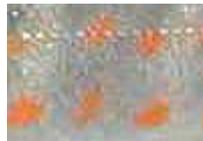
アメマス *Salvelinus leucomaenis*



ニッコウイワナ *Salvelinus pluvius*



ヤマトイワナ *Salvelinus japonicus*



ゴギ *Salvelinus imbricus*

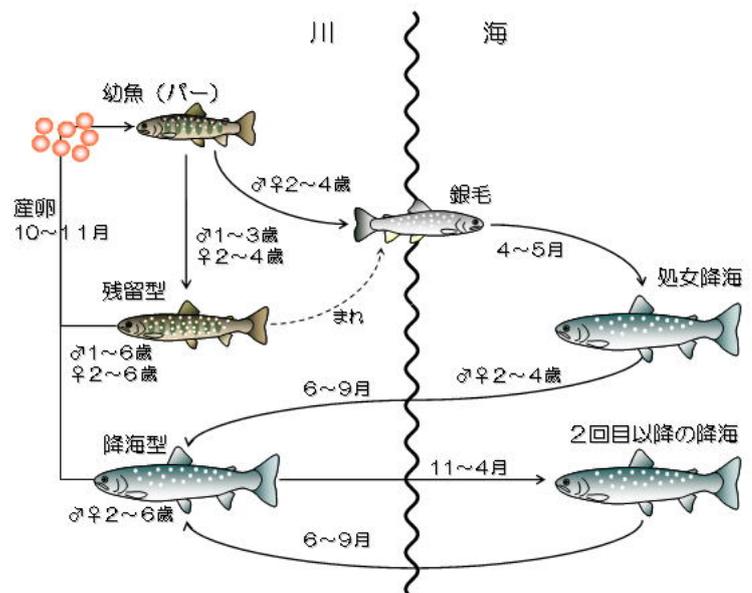


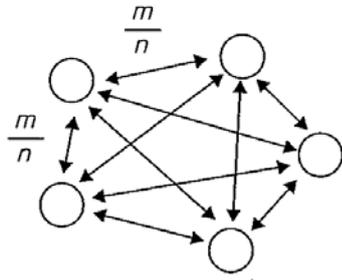


圖 1、雨鱒(AMEMASU 又稱 IWANA，日本漢字寫為岩魚，或白斑紅點鮭。學名 *Salvelinus leucomaenis*)。本相片樣本全長 26 公分，採集自日本北海道函館。雨鱒和鮭魚有同樣的生活史，成長過程必須下海，再溯河回母川產卵。雨鱒性喜冷水，日本的雨鱒是全世界雨鱒分佈中，緯度最低，也即分佈的最南限。因此日本的雨鱒多不降海（太熱），一輩子陸封於冷水性河川之源頭。僅在北海道發現過降海的日本雨鱒。據推測在冰河時期日本的雨鱒應該也是往返於河海之間，進行降海成長，溯河產卵的兩側洄游生活史。但隨著冰河期的消退，氣候暖化，雨鱒遂被陸封於河川上游。被地理隔絕的每個河川中之雨鱒，由於完全封鎖各地域族群彼此間遺傳基因的交流，經過長年累月演化的結果，各自獨立演化出自己的族群特徵。20 世紀中期，隨著人類開發的腳步，各具不同遺傳特徵的雨鱒隔離族群，飽受棲地縮減、人為濫捕過漁、農業觀光活動等的威脅。日本中部以西尤其嚴重。紀伊半島的雨鱒族群已被 IUCN 列為瀕危物種，處境和台灣鮭魚一模一樣。

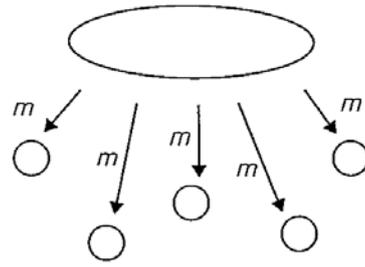


圖 2、日本北海道各河域在繁殖期降海洄游回歸母川的雄鮭魚，都表現誇張的勾鼻第二性徵，他們不一樣嗎？假如不一樣，那又是相差多少呢？對於這種問題，科學家僅能以基因層次來回答。

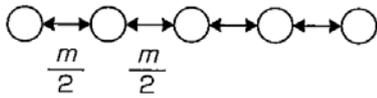
a) 島モデル



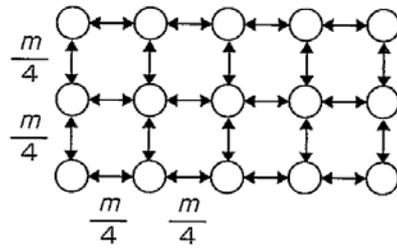
b) 大陸-島モデル



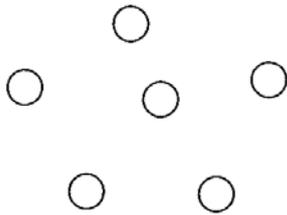
c) 一次元飛び石モデル



d) 二次元飛び石モデル



e) 隔離モデル



f) 絶滅-新生モデル

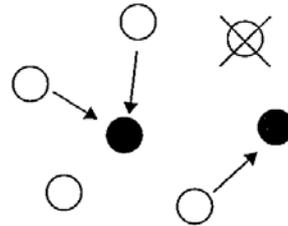


圖 3、族群遺傳學使用的移植模式

- a) 島嶼模式   b) 大陸-島嶼模式   c) 一次墊腳石模式  
 d) 二次墊腳石模式   e) 隔離模式   f) 滅絕-再生模式

m：遷徙移植；各族群間的遷徙率

n：相等大小的地域族群

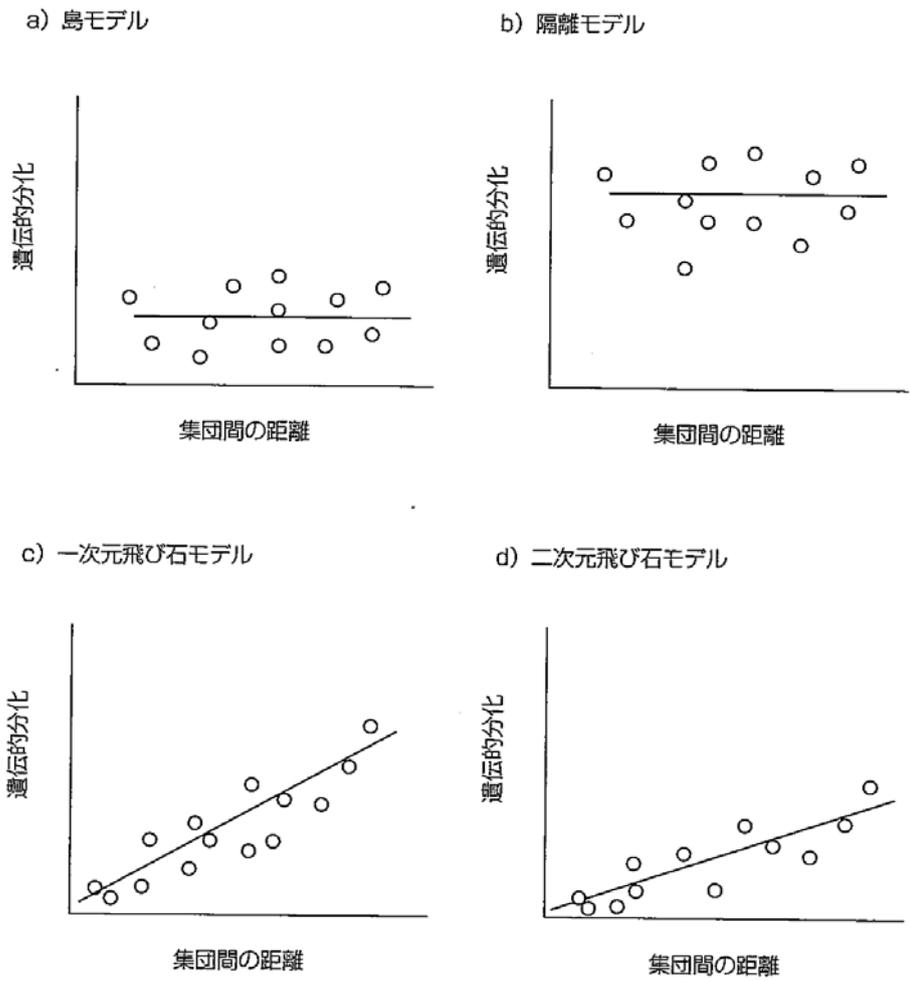


圖 4、族群間的遺傳分化和族群間之相距地理距離的關係

a) 島嶼模式 b) 隔離模式 c) 一次墊腳石模式 d) 二次墊腳石模式  
 縱座標：遺傳分化； 橫坐標：族群間之距離

(a) 島モデル

(b) 飛び石モデル

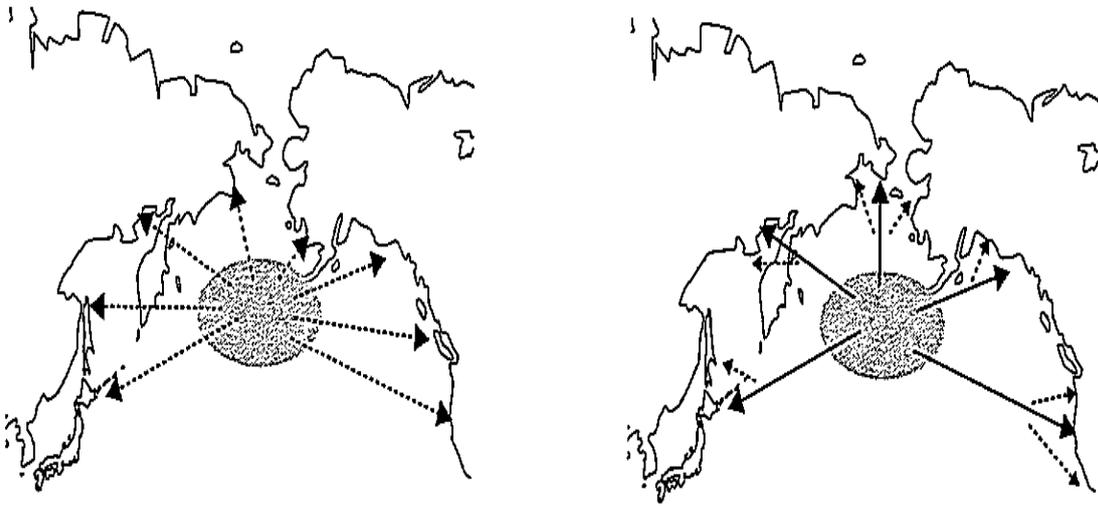


圖 5、白鮭和樺太鮭等降海洄游型鮭科魚類的遠洋洄游族群的移植模式

(a) 鮭魚個體在海洋洄游時期，混入其他魚群（移植），屬於大陸—島嶼模式；(b) 若是在魚隻接近母川時才迷途移住，則此情境較接近墊腳石模式。灰色圓圈代表索餌場，聚集著來自不同河川的個體。點線箭頭（.....>）表示迷途的鮭魚個體。

(a) 一次元飛び石モデル

(b) 二次元飛び石モデル

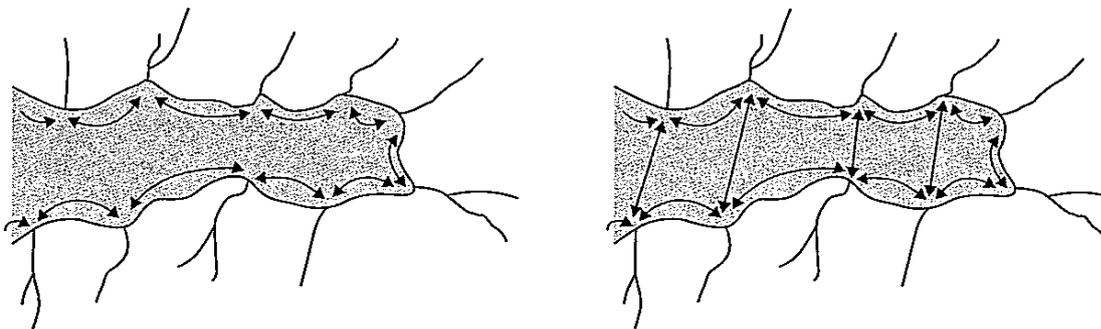


圖 6、鮭魚於河口或海灣進行河川之間的移植

(a) 海洋生活僅限於沿岸的歐洲大西洋鮭魚符合一次墊腳石模式；(b) 洄游至遠洋，而且迷途僅靠距離而應變的鮭魚，其移動樣式較吻合二次墊腳石模式。科學家將調查族群估算的遺傳分化指數 (Fst) 標示在地理空間，藉以驗證族群符合那種移植模式。

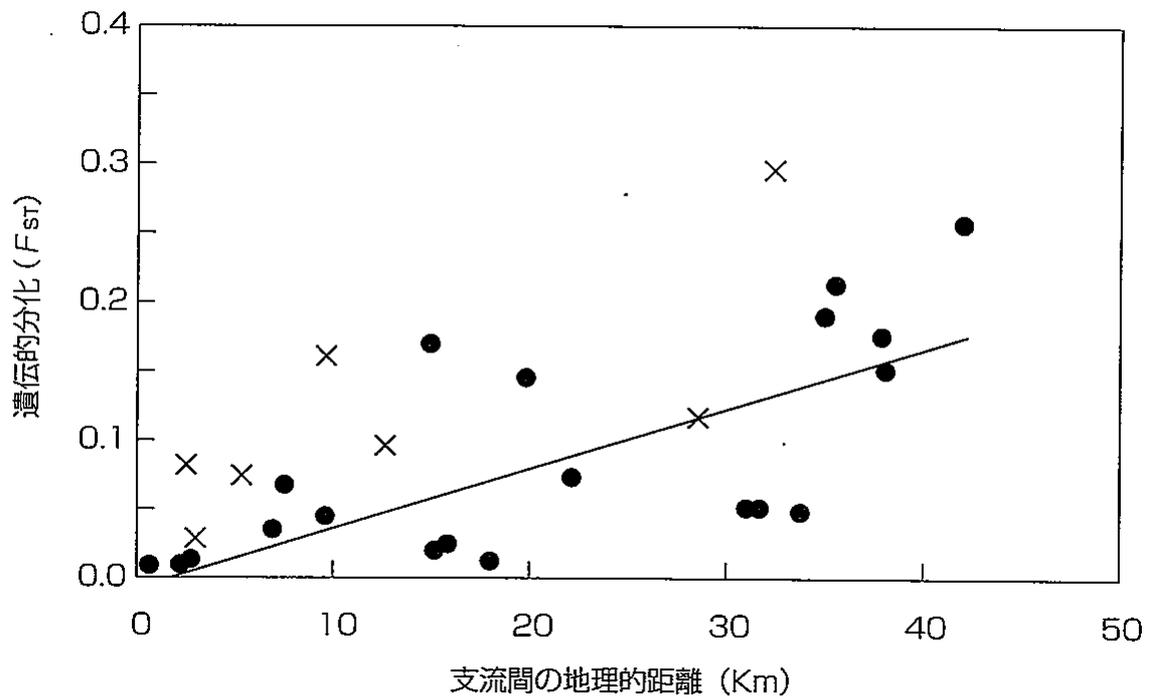


圖 7、棲息於日本北海道空知川上游八個支流的雨鱒，其族群間的遺傳分化和支流間的地理距離的關係。●：沒有河川橫斷物等物理障礙，七個支流內（除了控制組以外），雨鱒族群的遺傳分化和地理分布，有強烈的正（ $R^2 = 0.50$ ）相關。×：加上瀑布上端移動受限制的族群一起統計分析，遺傳分化和地理分布的關係的相關程度就急降為 $R^2 = 0.39$ 。瀑布上端的族群雖然族群很鄰近，但其遺傳卻極端分化。

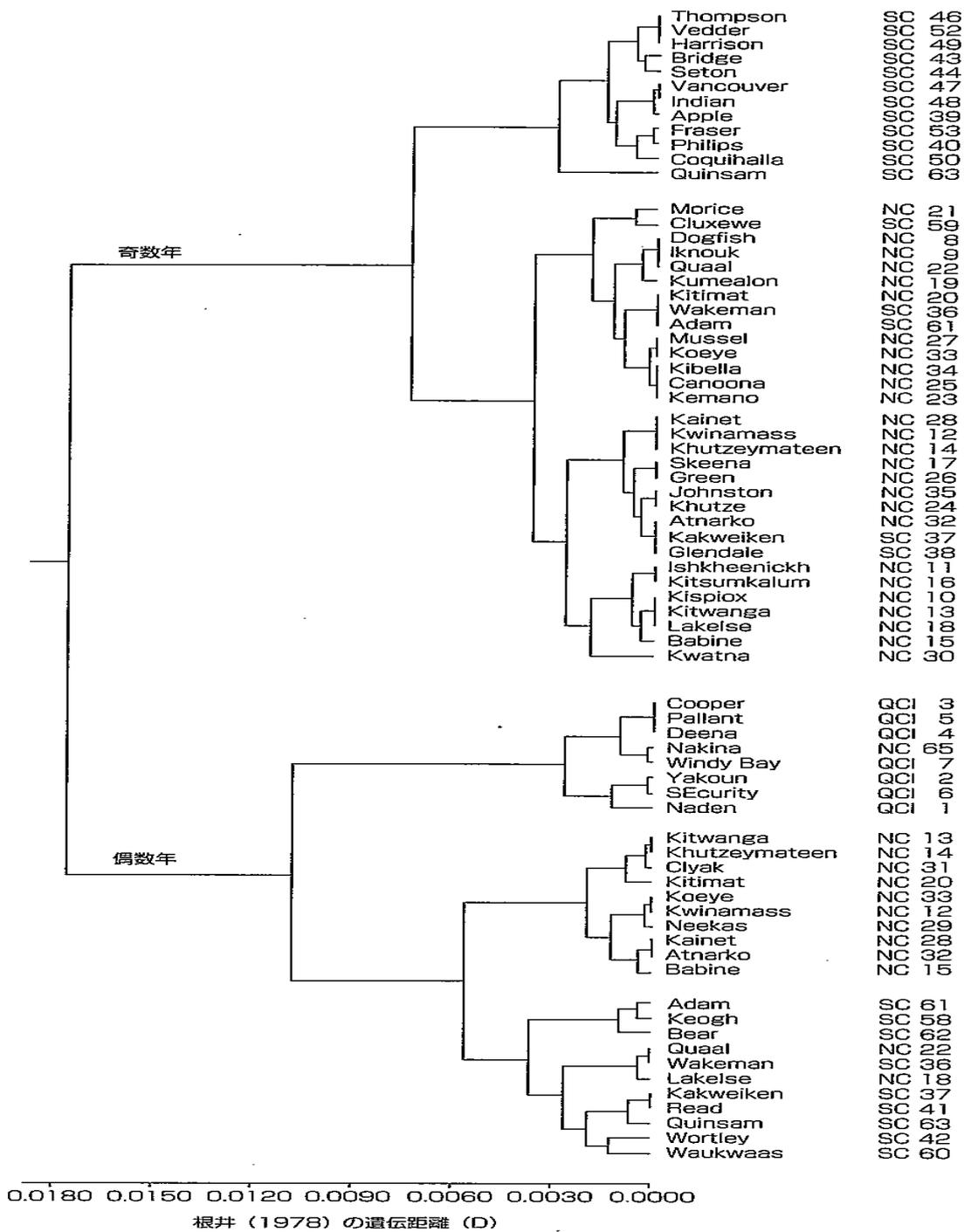


圖 8、根據分析美國西海岸太平洋樺太鮭魚的同工異構酶，所建構的遺傳構造樹狀圖。在同一條河川生活繁衍，奇數年度的魚隻和偶數年度魚隻，其遺傳（根井的遺傳距離：Genetic Distance）明顯分歧，相當珍奇。

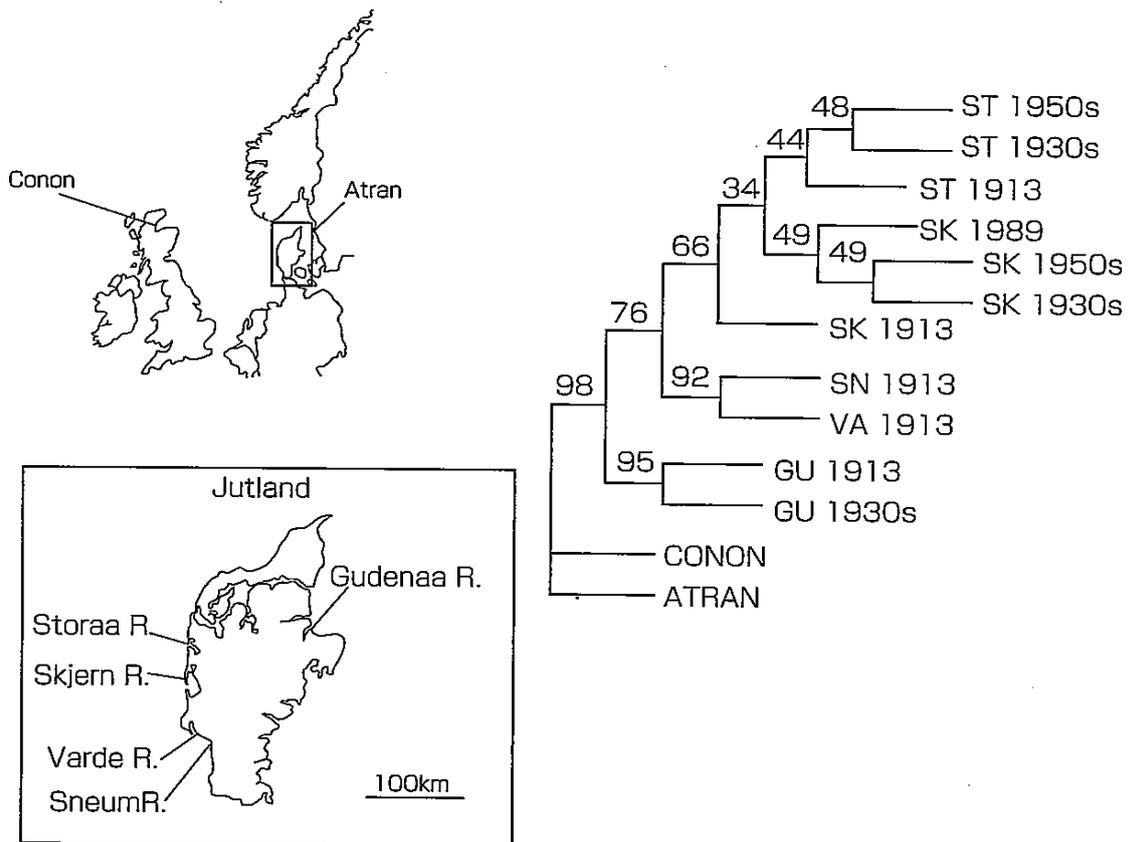


圖 9、大西洋鮭魚遺傳構造的時空（地理）變異

根據分析抽取自鱗片的微衛星 DNA 數據，發現過去 76 年間，同一河川內大西洋鮭魚族群的遺傳結構幾乎沒有任何改動。右圖的年代（1913、1930s、1950s、1989），代表鱗片的採集年代。ST：Storaa（採集地點）。科學家發現即使鱗片的採集年代不同，同一條河川的大西洋鮭魚，遺傳上仍被歸類在一起。鮭科魚類的遺傳結構經時穩定，鮭魚空間（地理）的遺傳構造也維持不變。

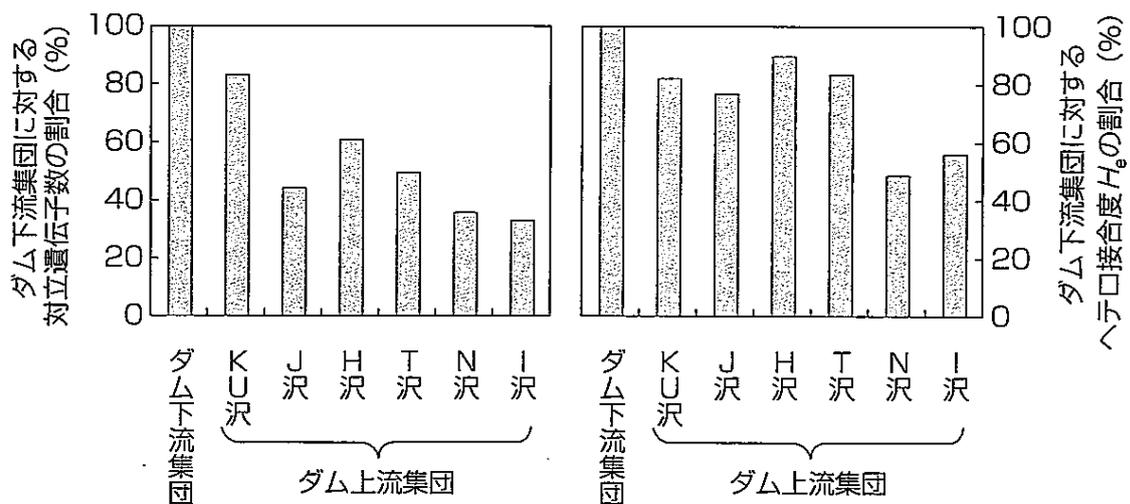


圖 10、比較棲息於日本北海道南部的河川防砂壩（ダム）上下游雨鱒族群，遺傳結構的差異（對偶基因數目和基因遺傳多樣性（ $H_e$ ）的比例）。隔離，造成防砂壩上游雨鱒族群遺傳的遺傳多樣性萎縮，基因同質化。

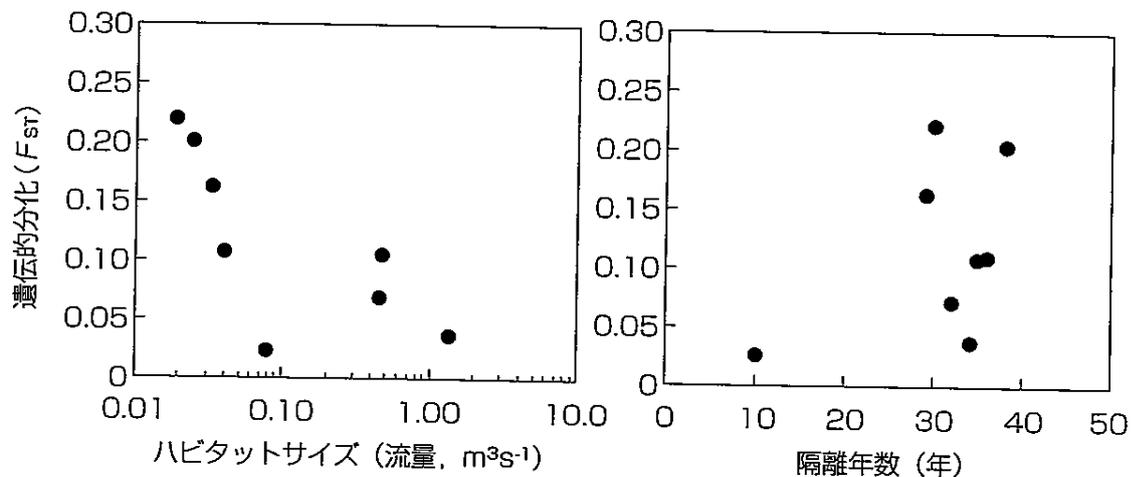


圖 11、棲息於日本北海道南部三個水系河川的雨鱒族群，被河川橫斷結構物阻隔的上游棲地（ハビタット）越小，河川橫斷結構物的完工日期越早越久遠，棲息於其中之族群，和河川橫斷結構物下游族群的遺傳分化就越顯著。也就是說棲息於河川橫斷結構物上游族群的滅絕機率，隨著被河川橫斷結構物隔離上游族群的小大，及被隔離時間的長短有上升的關係。被隔離的族群越小，被隔離的時間越長，族群滅絕的機率越高。

表 1. 降海型サケ科魚類の遺伝的構造

種名	空間スケール <sup>a</sup>	遺伝子マーカー	$F_{ST}$ (範囲)	距離の効果	引用文献
タイセイヨウサケ	~8,170km	アイソザイム	0.15	O <sup>b</sup>	Elo (1993)
タイセイヨウサケ	~2,000km	ミトコンドリアDNA	0.00~0.54	X	Nielsen <i>et al.</i> (1996)
タイセイヨウサケ	~1,000km	マイクロサテライト	0.03~0.15	O	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
タイセイヨウサケ	~1,400km	マイクロサテライト	0.06	O	McConnell <i>et al.</i> (1997)
タイセイヨウサケ	~50km	アロザイム	0.15	O <sup>c</sup>	Koljonen <i>et al.</i> (1999)
タイセイヨウサケ	水系内	マイクロサテライト	0.03 (0.01~0.09)	X	Garant <i>et al.</i> (2000)
タイセイヨウサケ	~50km	アロザイム	0.02	-	Verspoor <i>et al.</i> (1991)
ブラウントラウト	~50km	アイソザイム	0.22	O <sup>b</sup>	Moran <i>et al.</i> (1995)
ブラウントラウト	~700km	ミトコンドリアDNA	0.17	O <sup>b</sup>	Hansen & Mensberg (1998)
ブラウントラウト	~800km	アロザイム	0.27	O <sup>b</sup>	Bouza <i>et al.</i> (1999)
ブラウントラウト	~3,000km	アロザイム	0.13	O	Faundez <i>et al.</i> (1997)
カワマス	~600km (水系内)	マイクロサテライト	0.20	O	Castric <i>et al.</i> (2001)
同上	~600km (水系間)	マイクロサテライト	0.04	X	同上
カワマス	~5,000km	マイクロサテライト	0.05-0.15	O <sup>d</sup>	Castric & Bernatchez (2003)
北極イワナ	~1000km	マイクロサテライト	0.06	-	Bernatchez <i>et al.</i> (1998)
カットスロート	~400km	マイクロサテライト	0.12	X	Wenburg <i>et al.</i> (1998)
カットスロート	~100km	マイクロサテライト	0.03	O	Wenburg & Bentzen (2001)
カラフトマス	~2,500km	アロザイム	0.01-0.05	O <sup>f</sup>	Hawkins <i>et al.</i> (2002)
カラフトマス	~5,000km	マイクロサテライト	0.02(-0.01-0.11)	O	Olsen <i>et al.</i> (1998)
シロザケ	~3,000km	アロザイム	0.04(0.01-0.15)	O	Kijima & Fujio (1982)
シロザケ	北海道内	アロザイム	-0.02~0.12	-	Winans <i>et al.</i> (1994)
ギンザケ	~800km	マイクロサテライト	0.01(0.00-0.02)	X	Sato <i>et al.</i> (2001)
マスノスケ	~800km	マイクロサテライト	0.01(0.00-0.02)	O	Utter <i>et al.</i> (1993)
マスノスケ	~800km	マイクロサテライト	0.01(0.00-0.02)	O	Kinnison <i>et al.</i> (2002)

a: 地図から推定, b: 100-1,000km以上であり, c: 孵化場産ではなし, d: 分布の北限と南限ではなし, e: 移殖個体群, f: 偶数年の方が顕著

表 1、降海洄游型サケ科魚類の遺伝的構造

同工異構種 (アイソザイム)、微衛星 DNA (マイクロサテライト)、粒線体 DNA (ミトコンドリア DNA) a: 以地図推測空間距離; b: 距離在 1 百至 1 千公里以上; c: 非孵化場生産; d: 非分布之南限或北限; e: 移殖族群; f: 偶数年族群很顯著差異。

表2. 河川型サケ科魚類の遺伝的構造

種名	空間スケール	遺伝子マーカー	$F_{st}$ (範囲)	距離の効果	引用文献
ブラウントラウト	~300km	アロザイム	0.13	x	Ryman (1983)
ブラウントラウト		アロザイム		x	Crozier & Ferguson (1986)
ブラウントラウト	いろいろ	アロザイム		x	Ferguson (1989)
ブラウントラウト	~328km	アロザイム	0.20	x	Estoup <i>et al.</i> (1998)
同上	同上	マイクロサテライト	0.26	○	同上
ブラウントラウト	~10km	マイクロサテライト	0.00-0.06	○	Carlsson & Nilsson (2000)
タイセイヨウサケ <sup>a</sup>	~40km	マイクロサテライト, mtDNA	0.04-0.32	-	Tessier <i>et al.</i> (1997)
カワマス	~42km	マイクロサテライト	0.37	x	Angers & Bernatchez (1998)
カワマス	~20km(水系内)	マイクロサテライト	0.09-0.20	-	Hebert <i>et al.</i> (2000)
同上	~20km(水系間)	マイクロサテライト	-0.06-0.02	-	同上
ブルチャ <sup>a</sup>	~400km	マイクロサテライト	0.39	○ <sup>c</sup>	Costello <i>et al.</i> (2003)
ブルチャ <sup>a</sup>	~50km	マイクロサテライト	0.06	x	Spruell <i>et al.</i> (1999)
北極イワナ <sup>a</sup>	水系内	マイクロサテライト	0.08	x	Bernatchez <i>et al.</i> (2002)
同上	水系間	マイクロサテライト	0.04	x	同上
北極イワナ <sup>a</sup>	水系内	マイクロサテライト	0.24	-	Brunner <i>et al.</i> (1998)
同上	水系間	マイクロサテライト	0.18	-	同上
イワナ <sup>b</sup>	~20km	マイクロサテライト	0.11 (0.02-0.22)	x	Yamamoto <i>et al.</i> (未発表)
オシロコマ	~35km	マイクロサテライト	0.06	○	Koizumi <i>et al.</i> (未発表)

a: 陸封型あるいは降湖型, b: 水系内ダム上下集団間, c: 河川により異なる

表2、河川型鮭科魚類的遺傳構造

同工異構酶 (アインザイム)、微衛星 DNA (マイクロサテライト)、粒線体 DNA (mtDNA)

a: 陸封型或降湖型; b: 同一水系分布于河川横断物上下の族群之間; c: 不同河川

表3. サケ科魚類における遺伝的構造の時間的・空間的変異

種名	個体群タイプ	解析集団数	遺伝子マーカー	時間スケール	空間スケール(km)	時間的変化	空間的変異	引用文献
タイセイヨウサケ	降海型	3~7	マイクロサテライト	76年(4回)	10 <sup>1</sup> ~10 <sup>2</sup>	安定	分化	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
タイセイヨウサケ	降海型	3~5	マイクロサテライト	78年(4回)	10 <sup>1</sup> ~10 <sup>2</sup>	安定	分化	Hansen <i>et al.</i> (2002)
スチールヘッド	降海型	3	アロザイム	40年(3回)	10 <sup>1</sup> ~10 <sup>2</sup>	分化	分化	Heath <i>et al.</i> (2002)
タイセイヨウサケ	降湖型	4	マイクロサテライト	24年(2回)	10 <sup>1</sup> ~10 <sup>2</sup>	安定	分化	Tessier & Bernatchez (1999)
ブラウントラウト	降海型	4	アロザイム	15年(毎年)	> 10 <sup>3</sup>	分化	分化	Jorde & Ryman (1996)
同上	同上	1	ミトコンドリアDNA	14年(毎年)	—	分化	—	Laikre <i>et al.</i> (1998)
ブラウントラウト	—	3	アロザイム	10年(5回)	—	安定	—	Ferguson (1989)
ブラウントラウト	降海型	2	ミトコンドリアDNA	5年(2回)	—	分化	—	Hansen & Loeschcke (1996)
同上	同上	同上	アロザイム	同上	—	安定	—	同上
ブラウントラウト	河川型	5	マイクロサテライト	3年	< 5km	安定	分化	Carlsson <i>et al.</i> (1999)
ブルチャ-	降湖型	5	マイクロサテライト	3年	10 <sup>0</sup> ~10 <sup>1</sup>	安定	分化	Spruell <i>et al.</i> (1999)
タイセイヨウサケ	降海型	7	マイクロサテライト	2年	10 <sup>0</sup> ~10 <sup>1</sup>	弱い分化	分化	Garant <i>et al.</i> (2000)
ブラウントラウト	河川型	2~11	マイクロサテライト	2年	10 <sup>0</sup> ~10 <sup>1</sup>	弱い分化	分化	Estoup <i>et al.</i> (1998)
同上	同上	同上	アロザイム	同上	同上	安定	分化	同上
ブラウントラウト	河川型	7	マイクロサテライト	2年	< 10km	安定	分化	Carlsson & Nilsson (2000)

表3、鮭科魚類遺傳結構の時空変異

型式(タイプ); 尺度(スケール); 標記(マーカー); 同工異構酶(アインザイム)、微衛星DNA(マイクロサテライト)、粒線体DNA(ミトコンドリアDNA)

## 日本人工放流櫻鮭的最新趨勢

櫻鮭 (*Oncorhynchus masou*) 在日本是從北海道到本州中部被日本人廣泛使用的漁業資源。其主要的產地是日本北部的青森縣與北海道，而單單北海道漁獲產量就占日本全國一半以上。櫻鮭在北海道的產量，依序為日本海最多，接著是太平洋的西部、鄂霍次克海、太平洋的東部、最後是根室海峽。近年來櫻鮭漁獲產量在日本海的比例逐漸減少、而太平洋西部有增加的趨勢 (圖 1)。以全國產量分析，在 1981 以後櫻鮭的漁獲量逐漸減產的現象非常明顯。北海道在 1970 年代前半，捕獲 150~200 萬尾，達到巔峰，以後則驟降至 100 萬尾 (圖 1)。

為了恢復有逐漸減少趨勢的櫻鮭資源，日本政府採取下面兩種政策。一為保護野生魚櫻鮭棲息的河川環境，另一政策則為放流孵化場生產的人工櫻鮭魚苗。幸虧不曾像其他鮭科魚類那樣積極進行人工增殖事業和人工放流，日本今天才依然有許多的櫻鮭的野生種存在。不過，日本的河川環境因為防洪、治水、治山、砍伐森林與農業灌溉等的過度開發，已處於非常嚴重破壞的狀態，櫻鮭的棲地和其生息環境更是嚴苛岌岌可危。由於復原河川環境、需要有社會的共識，且河川復原工程需要龐大的經費與時間，曠日費時。隨著河川環境的惡化，櫻鮭的數量有減少的趨勢，光憑龜速的修復河川環境，緩不濟急，實難以增加野生魚的數量。因此，與其他鮭科魚類的情形一樣，在日本也進行櫻鮭的人工放流，也即放流孵化場生產的人工魚苗至野外。放流的孵化場養殖魚苗依來源可分成兩個系統。一為「溯上系」櫻鮭系統：人工授精卵在孵化場飼育至仔稚魚或幼魚期後，才放流至自然河川，再採捕溯上種魚之精卵進行人工授精的系統。在 1960 年代以前，此種「溯上系」稚魚都以無給餌的方式放流到河川。自從導入給餌飼養的方式之後，日本放流已轉變成放流給餌後的稚魚。另一為「池產系」櫻鮭系統：此系統是從魚卵到種魚的完全養殖方式，鮭魚完全在人為養殖環境生長繁衍。

由於「溯上系」櫻鮭系統在蓄養溯上種魚期間，經常發生魚隻罹患魚病等問題，造成魚隻之活存率過低，導致放流事業停滯。為了確保有穩定的卵源，「池產系」櫻鮭系統乃孕運而生。在 1960 年代初期，日本模仿美國大量生產虹鱒卵的技術，開始在陸上淡水池以人為環境完全養殖櫻鮭。從 1970 年代起開始生產「池產系」的卵，到了 1980 年以後，「池產系」的稚魚放流規模漸擴大 (圖 2)。此外，放流族群中也逐漸增加春季生產稚魚之比例。在 2001 年春季，包含日本本州，全日本「溯上系」與「池產系」之孵化場共放流 1746 萬尾櫻鮭。其中春季稚魚為 1232 萬尾占 70%、秋季幼魚 242 萬尾 (14%)、春季的銀化魚苗 (smolt：櫻鮭降海型幼魚) 272 萬尾 (16%)。

日本近年來為了調查放流魚隻對櫻鮭漁獲量的貢獻程度，在北海道各地進行將放流魚隻標識後放流再捕獲，為期八年的研究。結果發現，在北海道西岸 25~37 個地方的魚市場販售的櫻鮭，標識魚佔漁獲量的 2.5~5.7%。不過由於每年放流約一千萬尾的櫻鮭中，只標識約三、四成的銀化魚，其餘的稚魚和秋季幼魚都沒有標誌，所以此值 (2.5~5.7%) 可說是低估。由此可見，至少在北海道的櫻鮭資源方面，孵化場魚之養殖魚具有維持底線的作用。

本文從保育生態學的觀點討論孵化場養殖魚和野生魚的差異。從追溯櫻鮭的生活史來檢討孵化場生產的人工飼育魚的特異性，和近年來已明白的問題點。

## 孵化場養殖魚(孵化場生產魚)的行為特性

棲息於自然河川的野生鮭科魚類，遵守「倖存到成熟，留下更多的子孫」物競天擇的原則，經年累月，在此演化過程中，下一代繼承盡快成長與倖存的能力，演化成適合棲息環境的行為特性。但檢視孵化場的環境，不論水溫、給餌和生息密度等都與自然河川的環境迥異，因此孵化場生產的人工魚苗，其提高成長及倖存之行為特性應會與野生魚迥異。在此以櫻鮭為中心列舉出研究實例，追溯其生活史來介紹各時期孵化場養殖魚之行為特性。此外也試探其原因。

### 1-1. 稚魚期分散行為的差異

每年秋季（10，11月）櫻鮭種魚在河床床底石礫產卵，受精卵在冬季孵化破殼後，躲在石礫下的仔魚以自己攜帶的卵黃維持生存。卵黃吸收殆盡時（在北海道為4~5月左右），稚魚始從石礫下現身，開始在河川覓食採餌。此時之稚魚稱為「浮上」(swim up)。浮上的稚魚個體立刻分散到河川上下游，各自尋找合適的棲所，形成地盤後在其勢力範圍內成長。亦即，對稚魚而言，浮上是尋找新的棲息環境之旅。此時也是櫻鮭一生中最脆弱和最危險的時期。浮上後的稚魚因游泳能力尚弱，是掠食者最佳的餌食，因此被捕食的個體為數不少。此外，稚魚也有種間競爭的壓力，個體因爭奪棲地而死亡。此種情形對稚魚而言，「何時浮上、浮上後去哪裡」就具有重要意義。依據近年的研究，「池產系」下一代養殖魚的稚魚之分散樣式與「溯上系」孵化場養殖魚，甚至野生魚都顯然不同。

為了比較野生魚稚魚之間與孵化場養殖魚稚魚之間的分散樣式，日本研究人員使用森「池產系」孵化場養殖魚的個體，及溯上游經北海道南西部之尻別川的野生個體進行實驗。森「池產系」的個體是1965年以來，在北海道立水產孵化場森支場經數代飼育培育出的品系。在長45m、寬1.8m的流水路(raceway)之上、下方兩端各設置能計算已溯上或降下個體數的活門(trap)。為了容易定位稚魚位置，將流水路隔成九個隔間，隔間之間以小裂縫(slit)相隔，所以稚魚能自由在隔間之間移動。然後在流水路中央部（由上數來第五個隔間）砂礫中，放置野生魚及「池產系」孵化場養殖魚的發眼卵各1500粒，從稚魚開始浮上那天起，每天於日出及日落檢查紀錄經過活門的個體，調查稚魚的分散方式（圖3）。實驗進行一個月後發現野生魚稚魚與孵化場養殖魚稚魚間的分散方式有極大差異。約68%的野生魚之稚魚往流水路下方的方向移動，而孵化場稚魚只約32%。反之，有24%的野生魚之稚魚往流水路上方移動，孵化場稚魚則為55%。因此森「池產系」的稚魚有往流水路上方（55%）或佇留（13%）在被放流地的強烈傾向。

為何野生和「池產系」孵化場的稚魚分散行為會出現如此的差異呢？現階段的推測是：在人工飼養的流水路型池中，孵化場養殖魚往流水路上游方向移動可以提高存活率，可說是最適當的行為。因為在人工飼育環境（流水路型池中），往飼育池流水路的下游側移動，不但不能獲得更多的食物，也無法找到新的棲息環境。佇留在浮上的場所或往流水路上游側移動的個體，不只能獲得更多的食物(餌或飼料)，而且能確保獲得較新鮮的水質等，更合適的環境條件。經過長期間被飼養在流水路池中及數代人工交配後之魚隻，或許在人為

無意識下選拔出具備上述行為特性的魚品系。

此外，從本實驗中可知兩者間分散的時間帶迥異。野生稚魚有夜行性的傾向，但孵化場養殖魚反而可以看見許多在白天行動的個體。其他的鮭科魚類稚魚也多是在夜間採取分散行為。因為在白天行動比夜間更容易被掠食者發現，但在人為飼育的環境下成長的孵化場稚魚卻不知有掠食者，或許因此孵化場稚魚沒有演化出在夜間行動之行為特性。這只是推測而已，釐清孵化場養殖魚傾向日行性的過程是今後有趣的課題。

## 1-2. 幼魚期的攻擊性與迴避掠食者行為的差異

許多鮭科魚類從產卵場所浮上分散後，佔地形成地盤，短從一年，長至數年生息於河川。因魚種或同一物種內的不同族群，對河川的依賴程度自然不同。棲息於日本北海道的櫻鮭，幾乎都在河川內生活至少一年左右。歐美國家研究者針對在河川生活期的幼魚之(1)攻擊性與(2)迴避掠食者的兩種行為特性，進行過許多鮭科魚類的野生魚與孵化場養殖魚之比較研究(表1)。

在天然河川分散後，環繞著固定的場所或地盤，稚魚相互間展開激烈的攻擊。爭鬥的結果，佔優勢的個體(優位)就能優先獲得最合適的棲所，最合適的棲所也就是能源效率最佳的場所。所以幼魚期攻擊性的強弱決定未來的勢力範圍亦即棲息場所，也強烈影響個體將來的成長。而迴避捕食者是對掠食者懷有警戒心的表徵。迴避掠食者能力較弱的個體，往往容易被掠食者發現捕食，存活的機率就較低。由此可知，攻擊性與迴避掠食者的行為是與個體成長及存活有顯著相關的行為特質。櫻鮭的野生魚與孵化場養殖魚之間的這兩個行為特性顯然迥異。

如前所述，日本研究人員選擇森「池產系」的孵化場養殖魚及游經北海道中西部積丹半島之積丹川野生魚族群為研究實驗的對象。過去此流域之孵化場養殖魚幾乎沒有被放流到野外，因此日本積丹川尚能夠獲得野生的櫻鮭。採集棲息該河川的野生魚之稚魚，使其習慣與孵化場養殖魚同樣的人為環境後，調查野生魚與孵化場養殖魚之攻擊性與迴避掠食者的行為。首先調查兩者的攻擊性，各自挑選一尾體型幾乎毫雷同的野生魚與孵化場養殖魚，放入水槽20小時，使其習慣水槽的環境後，觀察2個個體間的攻擊行為、採餌行為及迴避掠食者的行為。

一般，每尾櫻鮭個體都會形成自己地盤，研究人員一眼即可判斷哪尾是勝者(優位)哪尾是敗者(劣位)。勝者的攻擊性激烈時，甚至咬斷敗者的尾鰭，敗者侷限於一隅也無法在水槽的自由游泳，甚至也有敗者個體因處於過度緊張狀態，導致體色變黑。但只憑肉眼來判斷優劣未免有失客觀性。因此，研究者觀察勝者的攻擊頻率及勝者盤據定位的場所五分鐘後，才據此資料判斷哪尾魚是勝者。此外，在這段期間也給餌，記錄兩者的採餌次數。反覆觀察約30次行動後，才決定兩者攻擊性的差異。

結果，櫻鮭孵化場養殖魚是勝者，對野生魚處於優位的情況是59%，居劣位(敗者)佔41%，但尚沒到達統計上的顯著差異。其他的鮭屬魚類方面，也有報告指出孵化場養殖魚之攻擊性大於野生魚，而且兩者的採餌行動也有相當大的差異。從本實驗可以看出櫻鮭孵化場養殖魚的採餌活性高於野生魚。

接著比較兩者迴避掠食者的行為。研究人員準備長 50cm、寬 40cm、深 15cm 的水槽，水槽底部鋪滿砂石，利用水管 (a) 不斷注入 10°C 的河水(圖 4)。此外，在實驗魚迎向水流容易定位的水槽最後部位設置隱蔽場所 (cover)。準備 12 個同樣大小的實驗水槽，各放入一尾魚，經過 20 小時，等牠們適應水槽後再開始進行實驗。

經過 20 小時後，幾乎所有的實驗魚都定位於設置在水槽最後部位的隱蔽場所。等確認後，由給餌管 (b)，在水槽上方以一定的時間間隔給餌。最初個體對餌的反應不同，但逐漸地每個個體都記得能取餌的場所 (採餌場所)。然後，將水溶液 (混合櫻鮭碎肉與飼養櫻鮭掠食者(Japanese huchen)的飼育水) 由特定給餌用的導管 (c) 連接水管 (a) 混合河水注入水槽(圖 4)，讓實驗魚嗅此味道。這是虛擬與自己同種的個體遭到掠食者咬食的情境。結果實驗魚出現有別於以往的行為和舉動，開始對虛擬的掠食者懷有戒心，牠們都乖乖躲在隱蔽場所。1 分鐘後，以既定的時間間隔，研究人員再度繼續正常給餌，觀查並紀錄實驗魚再度開始採餌行動的時間。亦即，對掠食者警戒心較低的個體，雖然明知有掠食者的味道，仍然立刻就對餌有反應。警戒心較強的個體，即使給餌，也不屑一顧。實驗的結果顯示，孵化場養殖魚比野生魚對掠食者的警戒心較低，一嗅到掠食者的氣味仍立刻採餌的個體很多。此情形與第一個實驗結果 —「孵化場養殖魚採餌活性高於野生魚」有關連。此外，野生魚在接受掠食者的氣味前，與孵化場養殖魚一樣，一開始就對餌有反應。但在嗅到有掠食者的氣味後，對餌食完全無反應。更令人驚訝的是，即使持續給餌，經過 20 分鐘後，約有 50% 野生魚實驗個體根本就一直躲在隱蔽場所不出來。

由以上兩個實驗可見，與野生魚相較之下，孵化場養殖魚的特徵為採餌活性高、以及對掠食者的迴避行為反應遲鈍。因為孵化場養殖魚的飼育環境，不是在某特定定點佈餌，而是整個養殖水槽都撒餌以期提高稚魚之攝食率。爾來大西洋鮭的研究也發現，在無法預測能獲得餌食的環境下，攻擊性高的個體未必能獲得較多的餌，結果出現攻擊性高與個體成長無關的現象。因為攻擊行動所消耗之能源，超過從餌食所獲得的能源、甚至不利於成長。孵化場養殖魚雖然攻擊性較野生魚強，能形成地盤，但由於給餌範圍大，因此未必有助於其之成長。相對地，由於孵化場養殖魚飼育在沒有掠食者的環境，對掠食者根本沒有警戒心，頻繁採餌的個體成長較快，逐漸演化出上述採餌活性高以及對掠食者反應遲鈍的行為特性。

一如前述，在歐美比較鮭科魚類孵化場養殖魚和野生魚的幼魚期行為特性之研究汗牛充棟，但是這些研究並沒有得到一致性的結論。在某個研究的結論是“孵化場養殖魚的攻擊性高於野生魚，成長狀況較佳”；但在另一研究中卻出現完全相反的結果(表 1)。為何會出現如此天壤之別的結論呢？當然，應該也要考慮研究結論因魚種和實驗條件不同等之情形。不過，主要還是因為孵化場養殖魚飼育環境不同而導致的結果吧。養殖池子的大小、水溫、水流流量、個體放養密度或給餌量等都是不容忽略的因素。這些養殖環境的差異強烈影響「池產系」孵化場養殖魚的行為特性。另一個主因是飼育期間的長短。養殖馴化時間也因孵化場而異。如果魚隻在孵化場被飼育很長的世代，就容易發現更適合該場所之飼育環境的行為，也容易形成與野生魚不同的行為特性。事實上，依據報告，將孵化場養殖魚飼育長大成稚魚後，放流到自然河川，等成長及成熟後再捕獲，經過人工受精來進行世代交替的「溯上系」族群 (或者可以說成是相當於孵化場養殖魚與野生魚中間型的族群)，

不具一如孵化場養殖魚那樣有顯著的行為特性差異。亦即，同為「孵化場魚」養殖魚，「池產系」和「溯上系」不只棲息環境，連被飼育的期間也不同，不會顯現相同的行為特性。此情形亦適用於野生魚。因各河川水溫、水質、植被、沿岸林、棲息密度等野生魚的生活環境就不同，因此各河川的野生魚族群具備特有的行為特性。因此，將同樣的孵化場養殖魚放流到數條不同的河川，如果野生魚的族群來源不同，就不會有相同的結果。

今後需調查物理要因及生物要因不同對魚的行為特性有何影響？以及飼育多久會影響行為特性？我們必須更加明確掌握孵化場養殖魚的特性。此外，為了正確預測對孵化場養殖魚的影響，我們也必須藉由調查每條河川野生族群各自的行為特性，然後進行適當的保護管理措施。

### 1-3.降海時期的行為差異

櫻鮭幼魚的降海時期會因河川而異。日本北海道南部大致是在5月左右。日本研究人員將森「池產系」的孵化場養殖魚放流到流過北海道南西部積丹半島的古宇川，與原有的野生魚，比較降海時間的差異。調查方法為在5月下旬以前，為了區別和辨識孵化場飼育的「池產系」和天然的野生魚，將在孵化場飼育的每尾「池產系」都剪掉部份的鰭、進行外部標誌以資和野生魚區別，再放流到同河川。隔年的5~6月左右，於河口部以手拋網捕獲已銀化的魚隻，調查降海魚隻之中野生魚及孵化場養殖魚所佔的比例。結果發現野生魚從5月上旬開始降海，在同個月份之中旬到達顛峰（圖5）。

相對地，雖然孵化場養殖魚也從5月下旬開始降海，但尖峰期卻在6月下旬，約比野生魚整整慢1個月。經過交叉比對研究後發現，放流至其他河川的森「池產系」孵化場養殖魚亦於6月左右開始銀化。我們並不清楚為何孵化場養殖魚之銀化和降海時間都較野生魚慢。但是包含當幌川在內的所有北海道東部河川，孵化場養殖魚的降海時間都在6月左右，此現象似乎和遺傳有關。支持此想法的資料是一份日本的研究報告——尻別川「溯上系」的孵化場養殖魚與古宇川原有的野生魚一樣，原本都在5月到達降海的尖峰期，但「溯上系」和森「池產系」（降海的尖峰期慢1個月）孵化場養殖魚間經過人工交配所生產的雜交魚，其降海的尖峰期卻落在兩者的中間。影響鮭科魚類降海行為與日照時間之長短及水溫等條件息息相關，該研究結果暗示降海行為也深受遺傳因子的影響。有些研究者建議尚需考慮長年繼代飼育的影響（無意識間與降海時期較慢的個體交配等）。今後需監測調查同一河川的「池產系」孵化場養殖魚及野生魚經過數世代後的降海時期是否有差異，應該就可釐清繼代飼育對降海時期的影響。

### 1.4 成熟期繁殖行為的差異

目前尚無研究報導櫻鮭成熟期時，孵化場養殖魚與野生魚兩者之間，行為是否有差異。歐美則有使用其他種鮭科魚類，得知在成熟期時的孵化場養殖魚與野生魚，其繁殖行為也有差異。茲舉棲息於北美西部河川的銀鮭為例。

研究人員在河川內作圍欄，放入在河內成熟的銀鮭野生魚與「池產系」的孵化場銀鮭，

比較兩者繁殖行為及繁殖成功率。不管是哪一種鮭科魚類的魚種，一般都可看到鮭科魚類許多共同的繁殖行為。例如多尾雄魚會圍繞著成熟的雌魚，如眾星拱月，但彼此互相激烈地攻擊，其中最強的一尾雄魚會驅逐其他雄魚，單獨與雌魚配對產卵。研究人員發現，野生魚與孵化場養殖魚的繁殖行為迥異，野生魚的雄魚比孵化場的雄魚攻擊性較強，而且繁殖次數較多。此外，在競爭方面，孵化場養殖魚處於劣勢，繁殖期間受外傷的頻率較高。由於鮭科魚類的人工受精技術早已確立，是藉由人手來進行的。因此，孵化場養殖的雄魚，不必環繞雌魚，彼此激烈競爭即能繁衍後代。在被飼育的環境下，對孵化場的雄魚而言，上述野生魚須在繁殖場發動爭奪成熟雌魚的攻擊行為，及此經驗是與其繁殖能否成功息息相關，此外，野生魚的雄魚必須在發動攻擊行為後，成功驅逐對手，方能有機會與雌魚配對能留下子孫，都是夏蟲語冰無任何關聯。野生魚與孵化場養殖魚繁殖背景的差異，演化出兩者之雄魚環繞雌魚時的攻擊性如此迥異吧。

那麼，孵化場養殖魚與野生魚的雌魚是否在繁殖期時兩者間有行為上的差異呢？一般而言，鮭科魚類的雌魚，在河川內尋找適當產卵的場所，然後開始以尾鰭挖掘河床。當挖掘到適合產卵的深度時，方與雄魚配對後排卵。有時雌魚間會相互爭奪產卵場所，但不似雄魚間之競爭般頻繁。實驗的結果發現，兩者在繁殖之前的行動幾無差異。不過，孵化場養殖魚比野生魚重覆築更多的產卵床且排放較多的卵，故卵的損失很大。此雌魚產卵場的選擇及產卵的行為特質可能與因為使用人工交配後，省略和雄魚互動後衍生出的行為差異和弊端吧。

再則，科學家估計孵化場的雄魚繁殖的成功率（存活的後代仔魚數）是野生雄魚的62%，雌魚的繁殖成功率則為82%。亦即，就繁殖行為及繁殖成功的觀點而言，孵化場養殖魚居於劣勢。大西洋鮭「池產系」的孵化場養殖魚及野生魚間亦出現同樣的趨勢。

## 1-5. 透過生活史觀察孵化場養殖魚對野生族群的影響

研究者使用棲息於北大西洋區域的大西洋鮭為實驗對象，將22尾「池產系」的種魚與17尾源自野生之種魚放到實驗河川，調查下一代仔魚存活於族群內的比例之研究。由於孵化場養殖魚有特異的基因座，藉由分子標記調查此特異基因，即可得知那尾魚是來自孵化場、野生魚，或是孵化場養殖魚與野生魚雜交所生的子代。研究人員在生活史各時期採集個體，調查其遺傳基因比例。發現耐人尋味的結果：調查已成長且成熟的仔魚後發現，實驗魚之中，16%的種魚具有孵化場養殖魚的遺傳基因。

如前所述，孵化場養殖魚在天然繁殖場繁殖成功機率較低，在鮭魚生活史初期，以行為特性的差異，應就可斷言源自孵化場養殖魚之子代能存活到成熟的個體應很少。不過，我們不能就因此樂觀的認為孵化場養殖魚之影響有限。因為上述實驗是假設孵化場養殖魚與野生魚約為1:1所進行之實驗的結果。此外，該研究是僅研究經過一世代的結果。如果放流更多的孵化場養殖魚到野外、或放流後經過更多世代後，應就會發現有比本研究結果更多，源自孵化場養殖魚的遺傳基因更廣泛分布在族群內。如前1-3.降海時期的行為差異一節所述，鮭魚採取降海行動的行為是否深受遺傳因素影響和支配，如果考慮對自然環境適應度較低的孵化場養殖魚遺傳基因，藉由交配而遍及整個族群時，其對野生魚整體，對

自然環境的適應度實有極大且深遠的影響。

## 目前日本對櫻鮭鮭魚人工放流的認識和態度

孵化場飼育生產的魚，不只改變天然櫻鮭原有的質與量；透過雜交，也可能對野生櫻鮭族群的遺傳構造產生影響。而且在人為環境以人工飼育，也有傳播病原菌或產生濫捕野生魚的後遺症。鮭科魚類是在海洋成長，為了產卵而溯河的洄游魚類，其對海域與陸域物質之循環扮演極重要的角色。在溯上河流途中如遭捕獲，將阻斷河海物質之循環，對生態系造成深遠的影響。因此，本節從保護櫻鮭的固有性與多樣性之觀點，介紹日本現在所進行的對策和思維，同時思考將來對人工放流應有的認識和態度。

櫻鮭一般沿著陸地之海岸邊洄游，但各地域族群間的遺傳變異或遺傳多樣性的歧異度，遠大於洄游範圍遠至太平洋東岸美國加拿大之白鮭和樺太鱒。櫻鮭連在同一條河川之內、甚至是同一條河川支流間的各個族群之遺傳結構也不同。這些在每條河川擁有各自不同之遺傳的獨立特異性，暗示櫻鮭有強烈洄歸母川的回歸特性。櫻鮭以支流和河川為單位，適應各種環境而演化。然而日本以往的人工增殖事業，基於物理與經濟上的理由，要同時一起保持「溯上系」及「池產系」等許多地域族群是很困難的事，因此多利用有限的河川族群來應付廣泛的增殖需求。因此孵化場養殖魚與原有的在地魚雜交，會導致各個在地野生族群有消失的風險。我們又從上述的報告可知，孵化場產的櫻鮭在行為上與野生魚完全迥異。雖然沒有報告指出兩者之差異與適應度（活存率與繁殖成功率）的低下有關，為排除此可能性，有必要以禁漏原則（預警原則）先做作出安全的防火牆，防範於未然。

因此，自從 1980 年代後半開始，日本政府規定北海道日本海側的河川（例如：下苗太路川、厚田川、積丹川、須築川、利別川），是不放流孵化場養殖魚的河川。而且這些河川全被指定為保護水面，全年禁止在河川採捕水產動物，也嚴格限制在河川內興建土木工程，可說為野生魚備好較適合棲息的環境。鄂霍次克及太平洋地區也有保護水面河川及資源保護的水面河川（部分期間禁漁：禁止採捕櫻鮭幼魚），因此部分河川有中止放流孵化場養殖魚的傾向。

近年來，有關「溯上系」的孵化場養殖魚，以 3 河川（斜里川、尻別川、標津川）為保育系群之河川，進行繁殖及遺傳性質的監測調查。此外，也開始進行監測「池產系」的孵化場養殖魚，探討其對野生自然族群在遺傳（質及量的性質）、行為（分散行動及降海時期）及增殖（與適應度有關的溯上率及回歸率）的影響。

野生族群的減少會使遺傳多樣性萎縮。為了防止此潛在的風險，保障野生族群能快活的生活的環境比什麼都來得重要。日本科學家建議，為了提高和兼顧日本產鮭科魚類地域族群的固有性與多樣性，並維持和增大野生族群遺傳之多樣性，依目的來區分及管理河川是很重要的。因此提議將河川分成 4 種：

- (1) 維持野生資源的野生族群
- (2) 藉由孵化放流來維持地域族群的遺傳特性
- (3) 以漁獲為目的，藉由孵化放流來維持漁業資源
- (4) 著眼於關懷環境、培養情操、生態知識的觀察、維護漁業資源等多功能目的

如此依人類利用目的的不同來區分及管理河川，在現實上相當有效。不過，光是如此努力並不能復活鮭魚的野生族群。因為鮭魚資源減少的原因並不只是因為過度漁獲所致，棲地環境的惡質化亦難辭其咎。人類為了興建水庫等河川橫斷物，將河川柔腸寸斷，河川蜿蜒多樣的淺灘及深淵等基本構造，也因河川直線化與人工護岸之施工而慘遭破壞。而且水庫等河川橫斷物也切斷供應鮭魚產卵必須的砂石，加上酪農飼育牛羊等牲畜，生產為數可觀的糞尿。農業旱田地帶流入的細粒土砂、肥料農藥，一併惡化下游河川的水質與底質。所以光是著力在漁業上作限制，對野生族群的增加效果有限，甚至無濟於事。因此，為保護或復活野生魚族群，不只是水產業，環繞鮭魚與鮭魚生活史息息相關的農業、林業、和河川土木等河川及利用流域有關的所有行業、領域和利益攸關者，腦海裡都需要有保護環境的想法。這樣，鮭屬魚類遺傳上的多樣性及與管理孵化場養殖魚的關係，就可直接轉換成河川生態系與人類的關係。保育生物超越生物學的框架，衍伸上攀提高層級，化為立法（含社會制度與法律等社會科學上問題）才能落實魚類的資源保護。

表 1. サケ科魚類における孵化場魚の行動特性

生活期	魚種	孵化場魚の行動特性 (野生魚と比較した場合)	参考文献
稚魚期	サクラマス	昼間に上流方向への移動分散を行う。	Nagata <i>et al.</i> (1994)
幼魚期	サクラマス	採餌頻度が高い。攻撃性に差はなく、捕食者への警戒心が弱い。	Yamamoto & Reinhardt (2003)
	ギンザケ	攻撃性が高い。	Swain & Riddell (1990); Rhodes & Quinn (1998)
	ニジマス	捕食者への警戒心が弱い。	Johnsson & Abrahams (1991); Berejikian (1995)
	ブラウントラウト	攻撃性が低い。 採餌頻度が低く、移動性が高い。	Berejikian <i>et al.</i> (2001) Bachman (1984)
	大西洋サケ	攻撃性に差はなく、捕食者への警戒心が弱い。	Johnsson <i>et al.</i> (1996)
スモルト期	大西洋サケ	攻撃性が高く、捕食者への警戒心が弱い。	Einum & Fleming (1997)
	カッツロートラウト	攻撃性が高い。採餌頻度に差はない。	Mesa (1991)
スモルト期	サクラマス	降下時期が異なる。 (ただし、孵化場の影響だけでなく、系統の違いも含まれている) スモルト化が完了してから、降下行動を起こす。	小林ら (1988) 小山・永田 (1995)
	成熟期	ギンザケ	雄は攻撃性が弱く、雌は卵の産み残しが多いため、繁殖成功が低い。
成熟期	マスノスケ	雄は繁殖グループへの参加が低い。雌は卵の産み残しが多い。	Berejikian <i>et al.</i> (2001)
	大西洋サケ	雄は攻撃性が弱く、雌は卵の産み残しが多いため、繁殖成功が低い。	Fleming <i>et al.</i> (1996)

表 1、鮭科魚類孵化場生産魚隻在生活史各時期（稚魚、幼魚、銀化期、成熟期）の行為特性。由於魚種和實驗條件的不同，這些研究並沒有得到一致性的結論。



Figure 9.9. Different forms of masu salmon.

櫻鮭在不同生活史時的體型與外表模樣

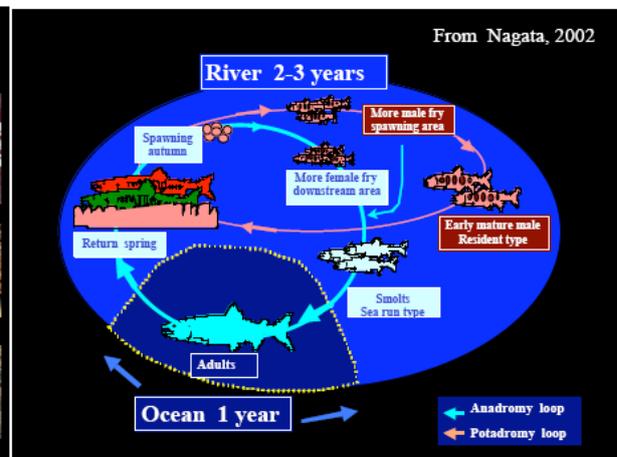


Figure 9.10. Life cycle of masu salmon.

櫻鮭的生活史

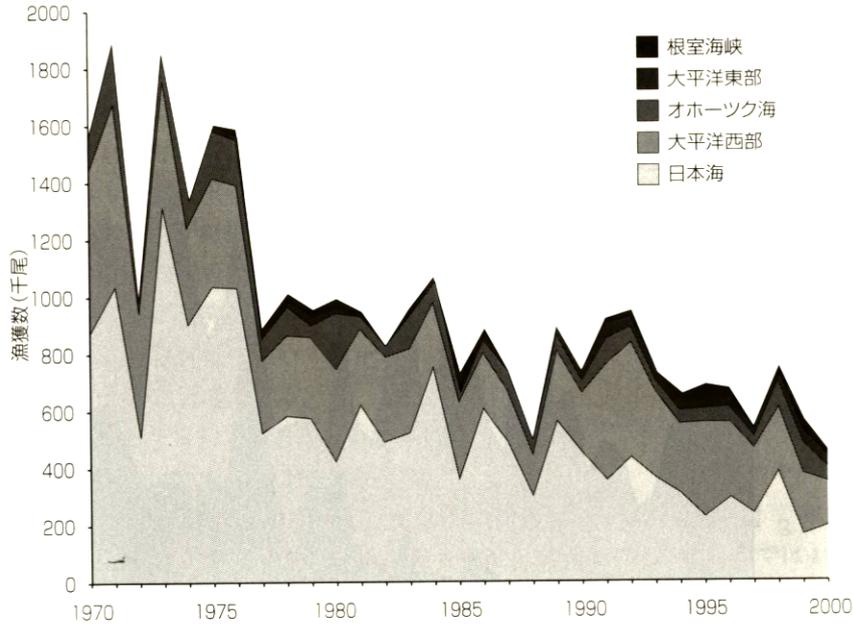


図1. サクラマス沿岸漁獲尾数  
1970～80年の尾数は各海区の1981年以降の平均体重を用いて漁獲重量から推定した(北海道立水産孵化場調べ)。

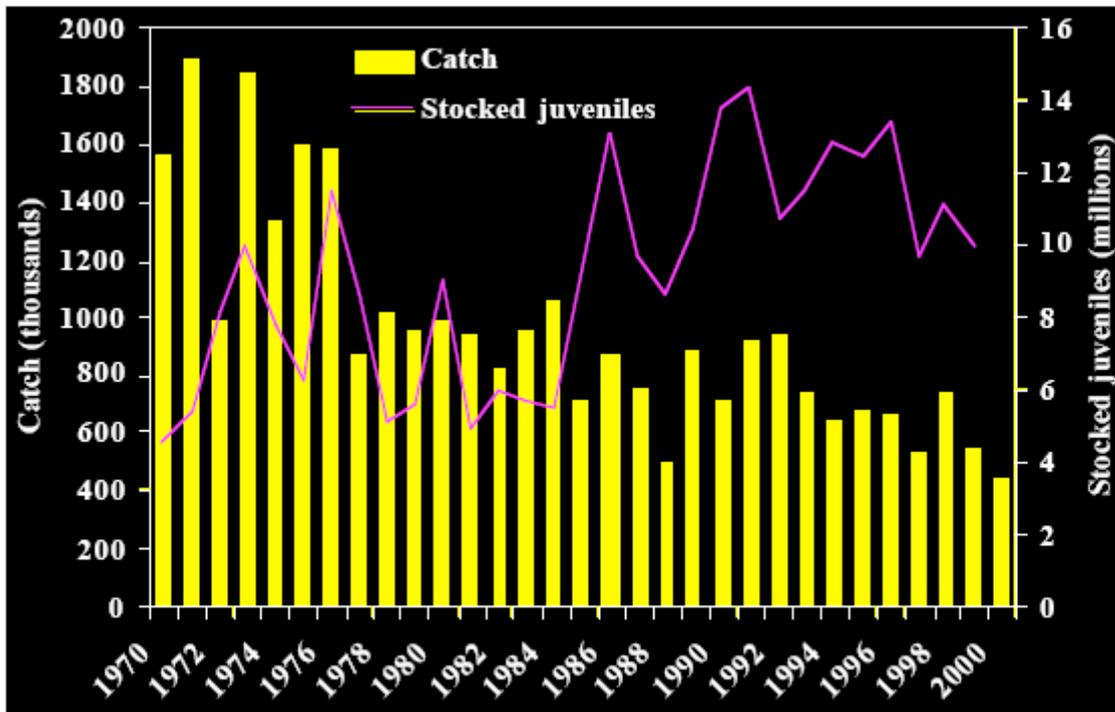


Figure 9.11. Historical catch and stocked juveniles in Hokkaido masu salmon.

圖1、日本1970到2000年沿岸櫻鮭漁獲尾數。1970~80年的尾數是利用各海區1981年以後之平均體重，由漁獲重量來推斷(北海道立水產孵化場調查)。在日本北海道櫻鮭的漁獲量，依序為日本海最多，接著是太平洋的西部、鄂霍次克海、太平洋的東部、最後是根室海峽。近年來日本海漁獲的比例減少、而太平洋西部有增大的趨勢。北海道在1970年代前半漁獲150~200萬尾，達到最高產量，1980年代以後逐漸減產，非常明顯下滑至100萬尾。

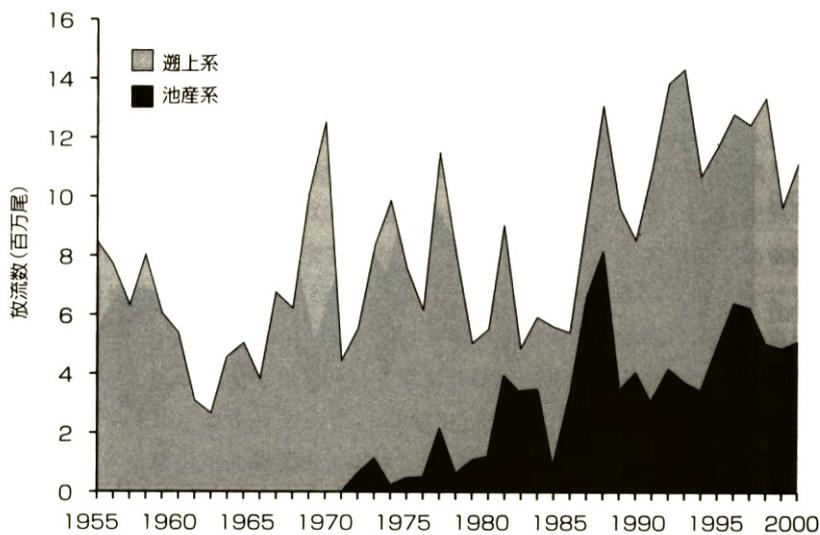


圖2. 北海道産サクラマスの放流数(採卵年)(さけ・ます資源管理センターおよび北海道立水産孵化場調べ)

圖2、北海道産櫻鮭的放流數(採卵年)(依據日本鮭、鱒資源管理中心及北海道立水產孵化場的調查報告)。放流的孵化場養殖魚苗依來源可分成兩個系統。一為「溯上系」櫻鮭系統：人工授精卵在孵化場飼育至仔稚魚，幼魚期後才放流至河川，再採溯上種魚之精卵進行人工授精的系統。1960年代以前，此種「溯上系」稚魚都以無給餌的方式放流到河川。自從導入給餌飼養的方式之後，已轉變成放流給餌後的稚魚。另一為「池産系」的系統：此系統是從魚卵到種魚的完全養殖方式，鮭魚完全在人為養殖環境生長繁衍。「池産系」從1970年代起發軔，1980年以後「池産系」的稚魚放流規模漸漸擴展。

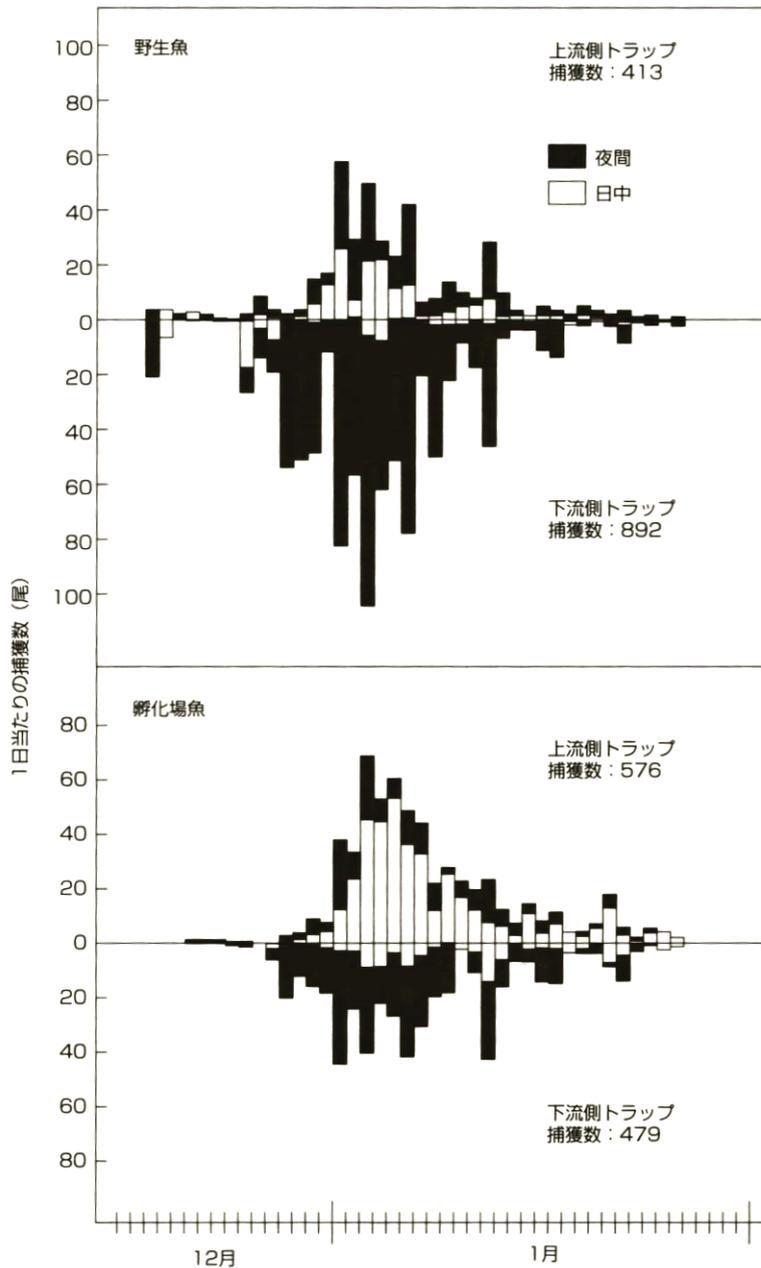


図 3. 野生魚と孵化場魚の浮上後の移動における日変化 (Nagata et al., 1994 を改変)

圖 3、為了比較野生魚稚魚之間與孵化場養殖魚稚魚之間的分散樣式，將野生魚及「池產系」孵化場魚的發眼卵各 1500 粒放置在流水式 (raceway) 水路中央部砂礫中孵化。從稚魚開始浮上那天起，每天於日出及日落檢查紀錄經過活門的個體，調查稚魚的分散分布。

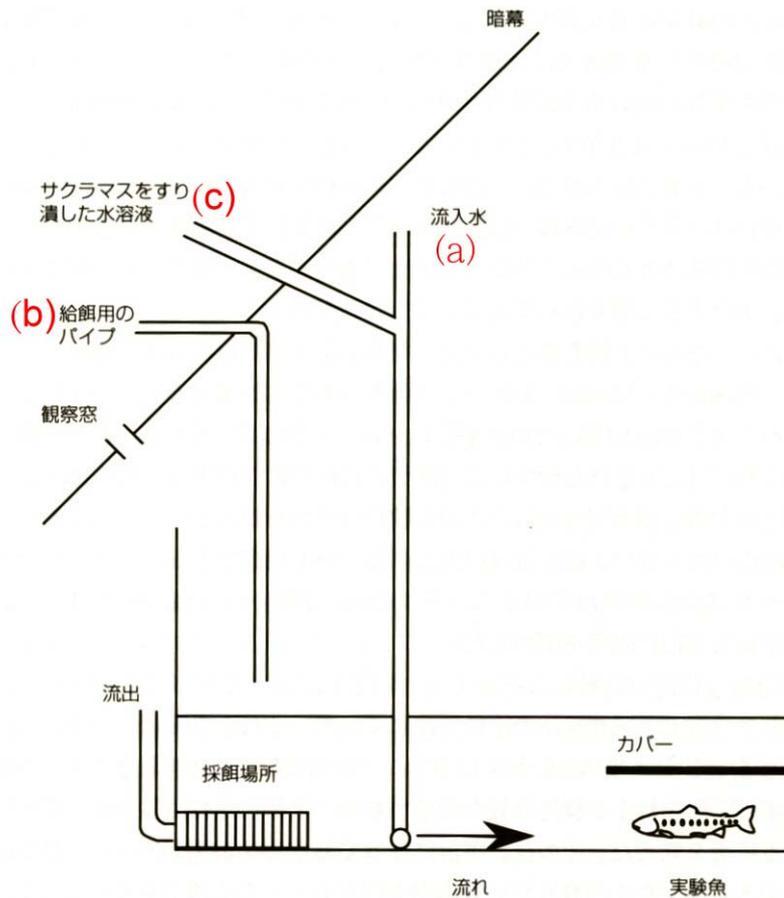


図4. 捕食者回避行動を調べるために用いた水槽 (Yamamoto & Reinhardt, 2003を改変)

圖4、調查迴避掠食者行為所使用的實驗水槽（改繪自 Yamamoto & Reinhardt 2003）。實驗水槽長 50cm、寬 40cm、深 15cm；水槽底部鋪滿砂石，利用水管 (a) 不斷注入 10°C 的天然河水。在實驗魚迎向水流容易定位的水槽最後部位，設置隱蔽場所 (cover)。同樣大小的實驗水槽共 12 個，各放入一尾魚，經過 20 小時，等牠們適應水槽環境後再開始進行實驗。由給餌管 (b)，在水槽上方以一定的時間間隔給餌。將水溶液（混合櫻鮭碎肉與飼養掠食者的飼育水）由特定給餌用的導管 (c) 連接水管 (a) 混合河水注入水槽，觀察實驗魚對此味道（虛擬掠食者捕食同伴）之反應。

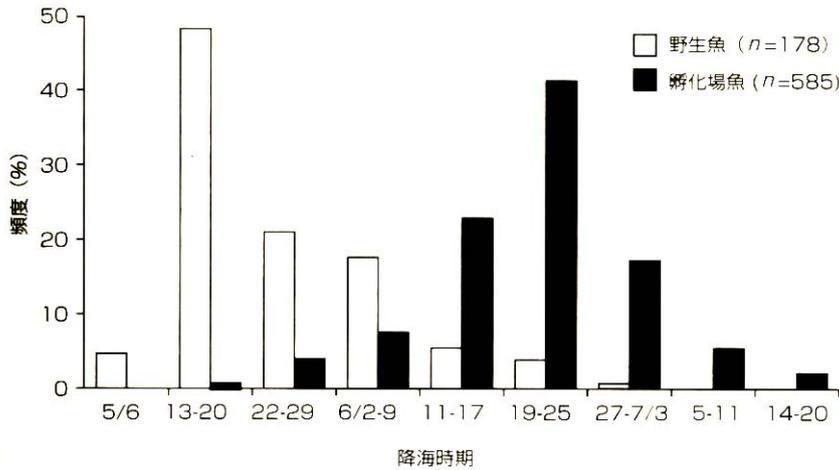


圖5. 北海道西南部を流れる古手川における野生魚と孵化場魚の降海時期 (小林ら, 1988を改変)

圖 5、流過北海道西南部的古手川中之野生魚 (□) 及孵化場生產的養殖魚 (■)，其降海尖峰期錯開將近一個月 (改繪自小林等 1988)。

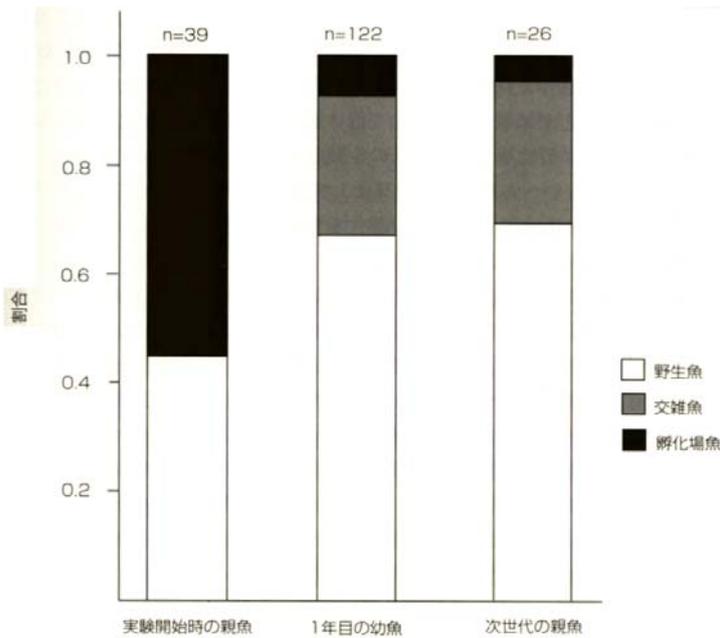


圖6. ノルウェーのImsa川にて大西洋サケを用いて行った実験により明らかになった野生魚・孵化場魚および交雑魚の割合の変化 (Fleming et al. 2000を改変)  
22尾の放流魚と17尾の天然魚を実験河川内に放して実験を開始し、その子が親魚になるまで追跡調査をした結果である。

圖 6、在挪威的Imsa 河川利用大西洋鮭進行實驗，得知下一代在Imsa 河川中，野生魚 (□)、孵化場養殖魚 (■) 及雜交魚所佔比例的變化 (改繪自 Fleming 等 2000)。實驗開始時研究人員將 22 尾孵化場養殖放流魚與 17 尾天然魚放入實驗河川，並追蹤調查下一代仔魚變成親魚 (種魚) 的比例。

## 內分泌干擾化學物質影響櫻鮭的溯河與性行為

已知「內分泌干擾化學物質」(Endocrine Disrupting Chemicals, 簡稱 EDCs) 藉由干擾生物的內分泌機制, 影響各種生物的生理現象。在魚類, 有些 EDCs 會對雄魚作用, 使雄魚生產合成雌魚特異的卵黃蛋白質之前驅物—卵黃前質 (vitellogenin), 與形成卵膜材料之卵膜構成蛋白前驅物質, 然後誘導雄魚雌性化, 這些內分泌干擾化學物質就叫做類似雌性激素內分泌干擾物質 (簡稱: 類似雌性激素 EDCs)。由於性激素會作用中樞神經, 影響行為, 所以 EDCs 不只影響生物的生理現象, 也影響生物受性激素控制的行為, 進而出現干擾作用。例如老鼠在胎兒期與授乳期如暴露在酚甲烷 A (Bisphenol-A, 簡稱 BPA), 會影響到中樞神經系統的發育, 且可能會影響老鼠的行為、認知、學習與記憶等。此外亦有報告指出, 某些化學物質會污染環境進而引發各種生物之異常的行為。

重要水產資源—鮭科魚類之洄游與產卵行為, 顯然受到性激素的控制。鮭與鱒在河川產卵, 稚魚在淡水成長, 然後體色銀化變態, 變成有適應海水能力後降海, 過著河海洄游生活 (圖 1)。不過, 部分滯留在河川的櫻鮭 (*Oncorhynchus masou*) 其雄魚在稚魚期會早熟, 出現早熟的雄魚, 體色沒有銀化, 終生生活在淡水區域。科學家投與雄激素 (androgen) 可以誘導與抑制稚魚之銀化與降河行為。例如大西洋鮭魚 (*Salmo salar*) 的銀化稚魚暴露在壬基苯酚 (nonylphenol, 簡稱 NP) 等物質時, 會阻礙其降河行為與對海水的適應能力。此外, 洄游在海洋的鮭鱒魚類開始成熟後, 為了繁殖與產卵會回到自己出生的河川產生回歸母川的行為 (圖 1)。投與性激素可促進鮭魚回溯母川的溯河行為。由於鮭科魚類的洄游與產卵行為受到性激素的控制, 所以 EDCs 影響洄游與產卵行為之可能性很高。

日本研究者認為EDCs干擾了魚類的繁殖機能, 即使沒有妨礙到魚類的生理機能, 但如妨礙到魚類的中樞神經之發育, 進而波及魚類的生殖行為, 魚類就無法進行健全完整的繁殖行為。為了釐清類似雌激素EDCs的影響, 本文以一連串的行為觀察實驗來證明 17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, 簡稱 E<sub>2</sub>)、壬基苯酚(NP)、烷基酚(alkylphenol) 類與酚甲烷A(BPA)等均會影響魚類的繁殖行為, 且解明其等的作用機制及臨界濃度, 顯示類似雌性激素EDCs確實會阻斷或妨礙雄魚的性行為。

### 類似雌性激素 EDCs 對鮭科魚類洄游行為的影響

鮭科魚類每到產卵期就會從海洋或湖泊回歸母川, 為了上溯河川上游的產卵場, 顯示出強烈的溯河衝動。投與睪固酮(Testosterone, 簡稱T) 和 11-酮基睪固酮(11-ketotestosterone, 簡稱11-KT)的雄激素及E<sub>2</sub>的雌激素均可以促進此行為。一旦這些行為受到類似雌性激素的影響, 例如當溯河河川被污染時, 就會妨礙到鮭科魚類的健全繁殖行為。因此, 日本研究者進行一系列研究(1)首先將已成熟的鮭科魚類去勢 (以手術除去生殖腺) 然後投與E<sub>2</sub>, 觀察雌激素對其溯上河川行為的效果。(2)投與Fadrozole(第二代aromatase inhibitor : 芳香化酶阻斷(抑制)劑, 簡稱AI) 抑制或阻斷促進T代謝 (芳香化) 到E<sub>2</sub>的酶, 觀察對鮭科魚類溯上河川行為的影響, (3)觀察投與NP或BPA時, 對魚類性行為的影響, (4)考察類似雌性激素EDCs對鮭魚溯河行為的影響。

## 雌激素參與櫻鮭的河川溯上行為

為了調查雌激素對鮭科魚類的河川溯上行為之影響，日本科學家以氯乙烯製的管子製作人工水路，連接上下兩個混凝土池（圖 2），比較去勢手術及投與雌激素E<sub>2</sub>的早熟雄櫻鮭之溯上率。魚齡約 6 個月的櫻鮭會出現精巢發達的早熟雄鮭，表現出與一般成熟個體同樣的河川溯上行為及性行為，由於早熟雄鮭體型小，容易處理，實驗所需使用的化學物質之劑量也較少，可說是最適合作為實驗材料的模式物種。日本科學家同時也準備了兩組對照組。第一組對照組(去勢群)：亦即將精巢已非常發達的早熟雄鮭(當年 8 月，魚齡約 11 個月)麻醉後剖腹，以鑷子摘除精巢、再縫合後的去勢群；以及只進行剖腹再縫合的第二組對照組(偽手術群)。同時在兩組對照組魚隻腹腔，分別埋植內含醫療用矽管的膠囊。膠囊內填充長效徐放式(慢慢釋放激素，使血液中長期保持一定的激素濃度)溶入芝麻油的 500μg 之雌激素E<sub>2</sub>、或者只封入芝麻油。同時切除脂鰭與腹鰭以資標識和區別兩組對照組魚隻。兩組對照組魚隻在流水式水槽飼育 1 個月後，從同年 9 月開始，將兩組對照組全部的實驗魚隻移到人工水路的下面池，比較兩組對照組溯上至上面池的個體及其溯上率。

結果，35%施行偽手術的早熟雄鮭出現溯上人工河川的行為。去勢群僅 10%溯上，兩組對照組的溯上率有顯著差異（圖 3）。如果將雌激素E<sub>2</sub>投與偽手術群的早熟雄鮭，則能顯著的提升溯上率到 70%；如果將雌激素E<sub>2</sub>埋植於(投與)去勢的雄鮭群時，被抑制的溯上率只上升到 40%（圖 3）。由此可知，精巢分泌的性激素誘發櫻鮭的溯上行為（比較圖 3 偽手術群與去勢群）。投與雌激素E<sub>2</sub> 也可以促進雄鮭魚的溯上行為，但由於雄魚的精巢和去勢的雄鮭不會也不可能分泌雌激素E<sub>2</sub>，因此可能雄魚精巢分泌雌激素E<sub>2</sub>的前驅物質—雄激素T，在腦部被aromatase(芳香化酶)芳香化，代謝成雌激素E<sub>2</sub>，因而促使雄魚展開溯上行為。

## 芳香化酶阻斷劑與鮭魚之溯河行為

為了確認雌激素E<sub>2</sub>如何參與影響鮭魚的溯河行為，日本科學家投與早熟雄櫻鮭 500μg 抑制產生雌激素E<sub>2</sub>的芳香化酶阻斷劑Fadrozole，然後調查早熟雄櫻鮭溯河行為的頻率。此外，為了調查類似雌性激素EDCs對溯河行為的影響，日本科學家也比較投與濃度 1mg 的NP及濃度 1mg 的BPA 觀察早熟雄魚的溯河頻率。與前面實驗一樣，使用醫療用矽管膠囊，於當年 8 月將化學物質埋植入魚腹腔內（對照群的早熟雄魚則只投與溶媒芝麻油），飼育 1 個月後，當年 9 月開始比較早熟雄櫻鮭在人工水路的溯上(溯河)率。

以放射免疫分析法（Radioimmunoassay，簡稱RIA）來測量及監控投與成熟的雌、雄櫻鮭Fadrozole(芳香化酶阻斷劑)後，其血液中雌激素E<sub>2</sub>濃度的變化。結果顯示雌魚投與群的血清中雌激素E<sub>2</sub>濃度有顯著地降低（圖 4）。Fadrozole透過對芳香化酶的阻斷，能有效地對雌性櫻鮭產生作用，降低血清中雌激素E<sub>2</sub>濃度（圖 4）。不過，不管是否投與Fadrozole，由於雄魚的血液中幾乎沒有分泌雌激素E<sub>2</sub>，因為血清中雌激素E<sub>2</sub>的濃度一直維持於低濃度。

相對於對照組早熟雄魚 40%的溯上率（圖 5(A)），埋植Fadrozole於實驗組的早熟雄魚其溯上率顯著地下降至 25%（圖 5(A)）。此時，血中雌激素E<sub>2</sub>濃度雖是相當低（圖 5(A)之b的正下方），但出現溯上行為的個體顯著(圖 5(A)之b的正下方黑長條圖bc)的比未出現的個體(圖

5(A)之b的正下方斜線長條圖 a)多。此情形強烈暗示雌激素E<sub>2</sub>會促進櫻鮭的溯河行為。綜合前述實驗的結果，推論雄魚精巢分泌的雄激素T藉由腦部的aromatase(芳香化酶)代謝成雌激素E<sub>2</sub>，直接對中樞神經系統發生作用，進而誘發和促進雄魚之溯河行為(圖4)。有報告亦指出，投與Fadrozole阻斷了雄銀鮭 (*Oncorhynchus kisutch*) 腦部的aromatase(芳香化酶)的活性，因而抑制雌激素E<sub>2</sub>的生產。另一方面，投與Fadrozole給早熟雄魚，發現實驗組血清中雌激素的濃度(圖5(A)之b的正下方)與對照組同樣低(圖5(A)對照組a的正下方)，並沒有顯著差異。所以我們可以確認：精巢不存在aromatase(芳香化酶)，因為投與早熟雄魚Fadrozole，並不影響早熟雄魚血清中雌激素E<sub>2</sub>的濃度。

投與NP與BPA也不影響早熟雄魚的溯上率(圖5(A))。與對照組相較之下投與NP與BPA的實驗組血液中雌激素E<sub>2</sub>濃度，有顯著地下降(圖5(B)之BPA與NP)，顯然這兩種類似雌性激素EDCs可能具有抑制雌激素E<sub>2</sub>分泌的作用。不過，在這次的實驗中，投與的NP與BPA劑量，雖然顯著降低血液中雌激素E<sub>2</sub>的濃度，但是並沒有顯著改變溯上率。本實驗中，NP與BPA雖沒有影響溯上行為，但因其雌激素活性較低，干擾作用的影響也低。為了評估類似雌性激素EDCs對魚類河川溯上行為的影響，有需要改變NP與BPA的投與量及投與期間，更深入解析詳細探討。

### 類似雌激素 EDCs 對鮭科魚類雄魚性行為的影響

溯河到達產卵場的鮭鱒魚，為了產卵而進行一連串定型的制式性行為(圖6)。配對後的雄魚挨近雌魚身旁(attending)，表現出催促身體微震的雌魚產卵的行為(quivering)。同時，佔據產卵床的周圍形成地盤，驅逐其他想進入其地盤的雄魚。雌魚選擇適當流速的場所以便後代稚魚交換氧氣和成長的砂石河底，自發地使用尾鰭，進行挖掘產卵床的築巢行為(digging)。產卵床一完成，雌雄魚同時產卵與排精，完成受精過程。產完卵後，雌魚再度用尾鰭將砂石覆蓋產卵巢的受精卵，表現將砂石埋回產卵床的行為(covering)。魚類之產卵行為受性激素控制，因此受EDCs影響的可能性很高。

本研究調查雌激素EDCs的影響，尤其是對雄魚性行為的影響。一如與對溯河行為影響的實驗一樣，使用櫻鮭的早熟雄魚及觀察投與雌性激素EDCs時雌魚性行為的實驗水槽(圖7)。實驗水槽底部鋪上砂石，利用幫浦環流作出流水式的水槽，實驗水槽放置配對的1尾2歲成熟雌魚及1尾0歲的早熟雄魚。雌魚會自發性地挖掘產卵床，雄魚雖是早熟雄魚，但是對雌魚也表現出伴隨及催促產卵的行為，因此我們可以計測量化鮭魚產卵行為時，雄魚性行為的強度、次數與頻率。

### 控制櫻鮭雄魚性行為的激素

為了調查性激素對櫻鮭雄魚性行為的影響，與溯河行為的實驗一樣，在當年8月將早熟雄魚去勢，使用醫療用矽管膠囊，投與睪固酮(T)、11-酮基睪酮(11-KT)、17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>)和17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -二羥-4-孕烯-3-酮(17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one，簡稱DHP：是由卵巢濾泡細胞產生的主要孕激素)各種性激素各500 $\mu$ g(只有T投與1000 $\mu$ g)，連續埋植處理42天。同年10

月讓這些實驗雄魚與成熟雌魚在觀察實驗水槽內配對，錄影並紀錄其伴隨（attending指雄魚特異貼近的行為）及促進產卵的行為（quivering），每隔 30 分鐘比較兩行為的出現頻率（伴隨是指雄魚貼近雌魚時間的百分比，促進產卵的行為則以次數表示）。實驗結果顯示，雄魚之伴隨與促進產卵的性行為因去勢而大幅減少（圖 8；去勢）。但投與 1000 $\mu$ g 的雄激素 T 可以顯著增進雄魚伴隨雌魚之性行為（圖 8；去勢+T）；如投與 500 $\mu$ g 的 11-KT 則去勢早熟雄魚會恢復伴隨與促進產卵的兩種性行為（圖 8；去勢+11-KT）。雌激素(E<sub>2</sub>) 及配子成熟激素(DHP)沒有出現顯著增進，去勢早熟雄魚恢復伴隨與促進產卵的兩種性行為的效果（圖 8；去勢+ E<sub>2</sub>；去勢+DHP）。11-KT 比 T 顯現較高的成效，11-KT 由 T 轉化而來，是活化型的雄激素也是魚類主要的雄激素，本實驗結果強烈暗示雄魚精巢分泌的 11-KT(活化型雄激素)才會促進雄魚展示獨特的性行為。

### 類似雌性激素 EDCs 對早熟雄櫻鮭性行為的影響

雖然 E<sub>2</sub> 對早熟雄魚的性行為沒有影響，但 NP 與 BPA 卻有抑制雄魚繁殖時性行為的傾向（圖 9）。不過，NP 與 BPA 抑制效果不明確，劑量效果也不太清楚。由此即使短期間投與成熟的雄魚類似雌性激素 EDCs，對其性行為應也不會有很大的影響。

因此，從剛雄魚開始成熟的初期之 7 月開始，以 5、50、500 $\mu$ g 低濃度 NP 及 BPA 長期 (3 個月) 投與早熟雄魚。同年 10 月起與前述實驗一樣，比較早熟雄魚對成熟雌魚之性行為頻率。結果，NP 與 BPA 有更明確抑制雄性行為的趨勢（圖 10）。當 BPA 投與 50 $\mu$ g 以上的劑量，即可顯著地抑制雄魚伴隨與促進雌魚產卵的兩種性行為，雄魚幾乎完全對雌魚沒性趣，失去對成熟雌魚的性衝動。NP 對雄性行為的抑制效果遠比 BPA 差，50 $\mu$ g 劑量比 500 $\mu$ g 劑量更有強烈抑制的現象。此研究結果顯示 NP 在某特定的濃度範圍對雄魚的性行為有抑制效果。雖然環境水源受污染時，我們無法直接評估類似雌性激素 EDCs 對鮭魚的影響。但仍可以推論出低濃度的 EDCs 與長期暴露在低濃度的 EDCs 下對雄魚性行為的影響。櫻鮭種魚在春天由海洋回歸母川，滯留在河川內生活數個月後，到了秋天才成熟產卵。在河川生活之際長期暴露於 NP 等類似雌性激素 EDCs 中時，當然會抑制雄魚的性行為，進而可能影響其繁殖。

### 結語

櫻鮭產卵時，雄魚的性行為顯然受長期投與低濃度的類似雌性激素 EDCs(NP 及 BPA) 的影響，而受到抑制。產卵繁殖時期投與雄激素(T 與 11-KT) 可以促進櫻鮭雄魚的特異的性行為，有直接促進效果，投與雌激素 E<sub>2</sub> 反而不見效果。由於腦部才有雄激素受體，所以 11-KT 直接作用於腦中樞神經系、促進雄魚特異性行為的可能性很高。投與 NP 及 BPA 抑制了雄魚的性行為，故類似雌性激素 EDCs 作用於魚類的腦中樞神經系統，降低雄魚的性衝動。由於 NP 出現低劑量卻有低用量效果的現象，故雄魚長期暴露在低劑量下，也會抑制由雄激素所誘導的雄性性行為。

有研究報告指出，老鼠在胎兒期，副腎皮質激素促進中樞神經系發育，衍生作出雄型

或雌型的腦，在胎兒期如暴露在低劑量的 EDCs 中，會影響到雄老鼠的行為。我們對魚腦雌雄性的問題尚不明，本研究發現對成熟的雄魚投與類似雌性激素 EDCs 之效果不彰，但對剛開始進入成熟期的雄魚投與低劑量就顯現很大的效果，故魚類隨著成熟的進行，因為精巢分泌雄激素的作用，而形成雄型的腦，EDCs 則很可能抑制此過程。

另一方面，因雌激素的作用而促進鮭魚為了產卵的河川溯上行為。與雌雄無關，科學家投與雄激素T或雌激素E<sub>2</sub> 都促進了櫻鱒的溯上行為，生殖腺(精巢與卵巢)分泌的雄激素T在腦部藉由aromatase(芳香化酶)的代謝作用而轉變成雌激素E<sub>2</sub>，進而刺激行為中樞。成熟期的鮭科魚類，不只是雄魚，即使雌魚也從卵巢大量分泌雄激素T，作為雌激素E<sub>2</sub>前驅物質。由於血中雄激素T之濃度很高，科學家據以推論存在腦部的aromatase(芳香化酶)活性，及雌激素受體，與魚類的回歸母川或溯河行為有密切的關聯。芳香化酶廣泛存在於在魚類的腦部，它可以催化某些雄激素轉化為雌激素。芳香化酶阻斷劑可能是比性激素更直接誘導魚類的性分化，參與魚類性別分化的調控。

本研究報告，NP或BPA不影響早熟雄魚之溯河行為(圖 5)，但卻導致血中雌激素E<sub>2</sub>濃度的下降，如果一如性行為實驗那樣，低劑量且長期投與時，可能會發現有影響，故有必要進一步更詳細研究。

NP 及 BPA 的有抑制雄魚性行為的作用。此情形顯示類似雌性激素 EDCs 所造成環境水源的污染，雖屬低濃度，但會抑制 鮭科魚類的產卵行為，進而可能對鮭科魚類的繁殖造成影響。不過，光靠這次實驗，很難正確掌握出現影響的環境臨界濃度，故今後有必要進行更詳細的試驗。此外，關於類似雌性激素 EDCs 對魚類繁殖行為影響的作用機制，由於目前對控制行為的內分泌機制的基礎知識匱乏，故此領域亦有必要更深入研究，一探性激素促進中樞神經系發育與控制性行為的機制。

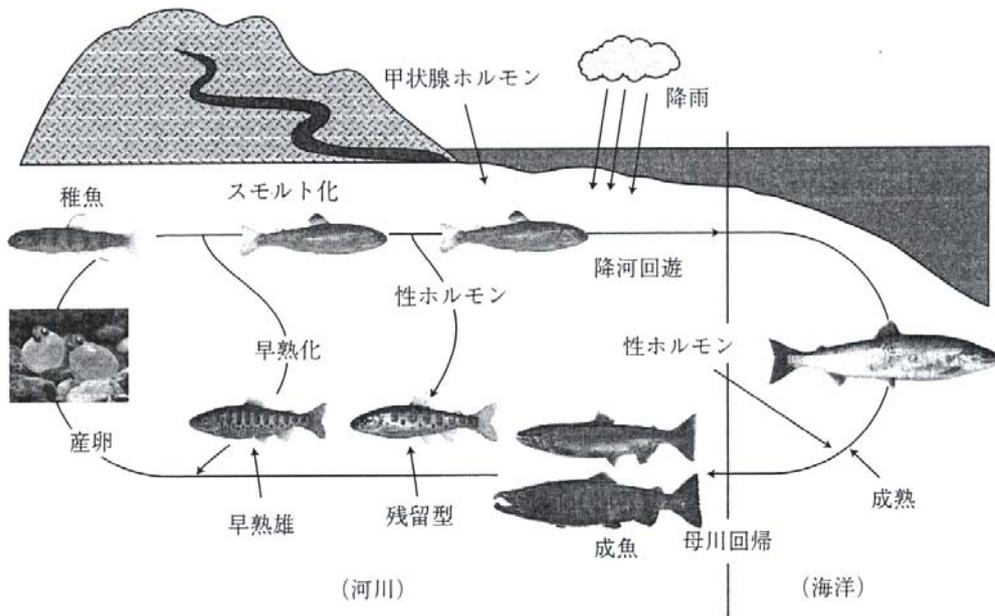


図9-1 サクラマス我的生活史と回遊行動に対する性ホルモンの関与

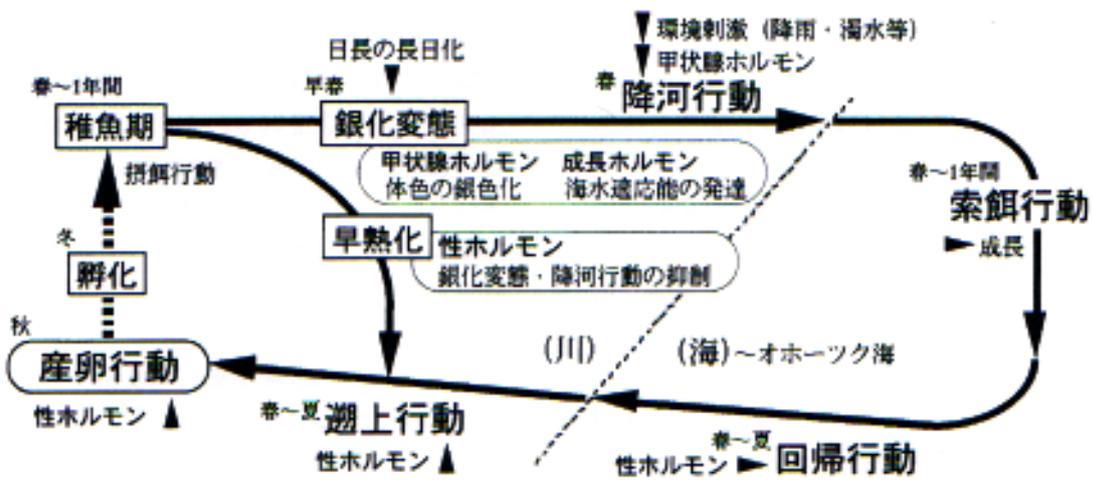


図1 サクラマスの回遊行動の概略

圖 1、櫻鮭的生活史及性激素如何影響櫻鮭的洄游行為。

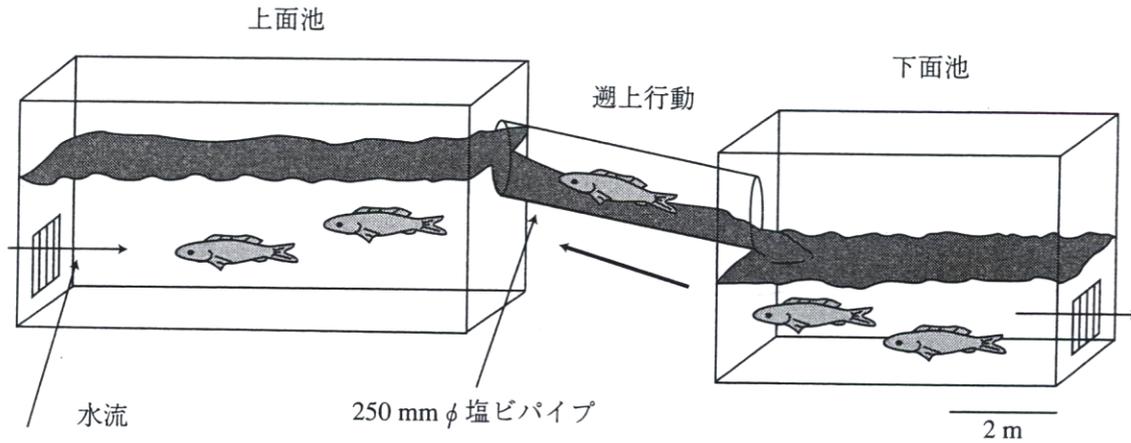


図9・2 河川遡上行動観察用人工水路

圖 2、為了調查雌激素對鮭科魚類的河川溯河行為之影響，日本科學家以氯乙烯製的管子製作人工水路，連接兩個混凝土池(上面池與下面池)，比較去勢手術及投與雌激素 E2 給早熟雄櫻鮭是否改變早熟雄櫻鮭之溯上率（由下面池經人工水路上溯至上面池）。

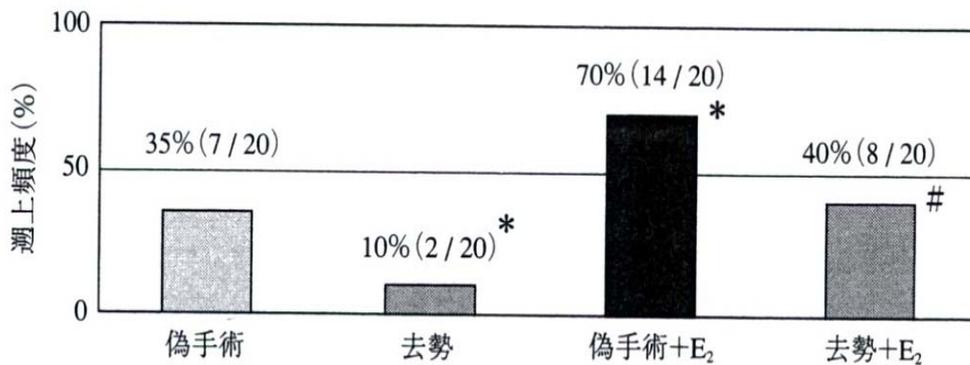


図9・3 サクラマス早熟雄に偽手術，去勢，およびそれぞれにE<sub>2</sub>投与を施した実験群の遡上頻度  
\*および#は，それぞれ偽手術群および去勢群に対する有意差を示す ( $p < 0.05$ )。

圖 3 比較櫻鮭早熟雄魚施行偽手術、去勢及投與E<sub>2</sub>後魚隻之溯上(溯河)頻率。  
\*與#分別針對偽手術群及去勢群，顯示彼此間有統計上的顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

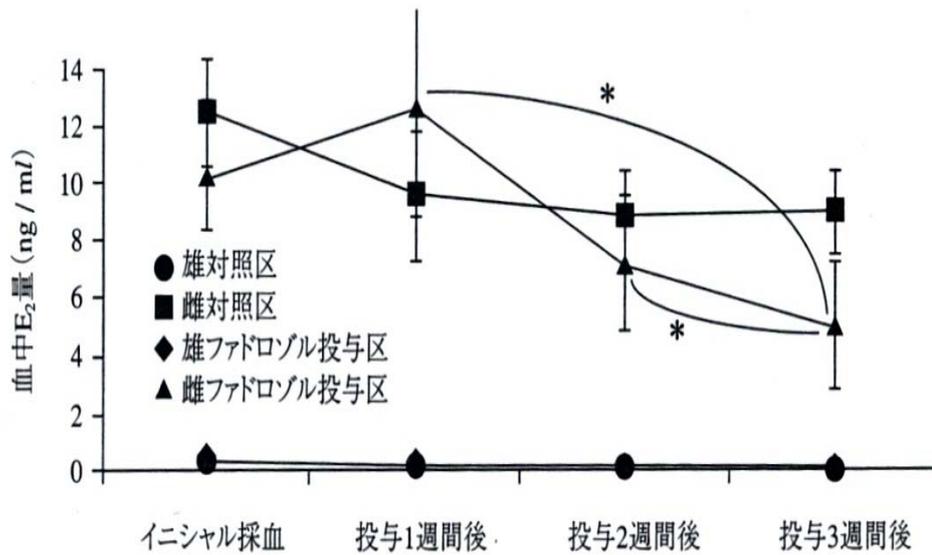


図9.4 サクラマス成熟魚のエストラジール-17 $\beta$ 血中濃度に与えるファドロゾール投与の影響  
 データは平均値 $\pm$ 標準誤差. \*は線で結んだ両者の間に有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示す.

圖 4、將 Fadrozole(ファドロゾル；芳香化酵素阻斷劑)投與(埋植於)櫻鮭雌雄兩性成熟魚，觀察實驗魚血清中 Estradiol-17 $\beta$  濃度的經時改變。數據以平均値 $\pm$ 標準誤差表示。\* 表示以線連接的兩個實驗之間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

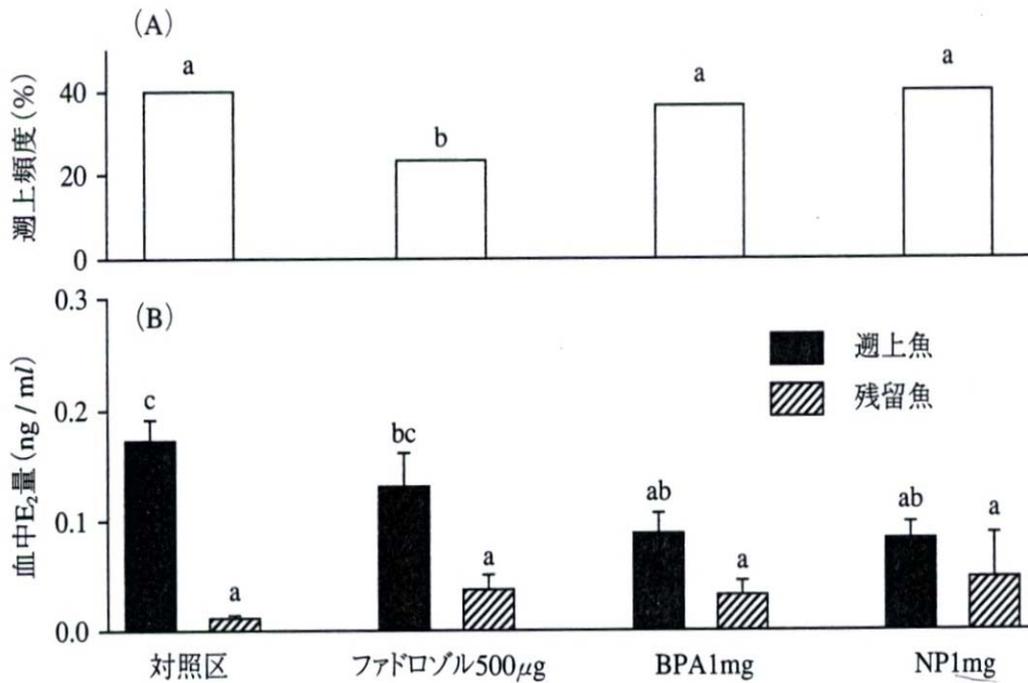


図9-5 サクラマス早熟雄の遡上頻度 (A) と血中エストラジオール-17 $\beta$ 濃度に対するファドロゾール、ビスフェノール-A (BPA) およびノニルフェノール (NP) 投与の効果  
 ホルモン濃度は平均値と標準誤差で表示. 同じアルファベットが附されていないグラフの間には有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示す.

圖 5、埋植 Fadrozole(ファドロゾル)、酚甲烷 (Bisphenol-A : BPA) 及壬基苯酚 (Nonylphenol : NP), 觀察對櫻鮭早熟雄魚的溯上頻率 (A; 上圖) 與血液中 Estradiol-17 $\beta$  濃度(B; 下圖)的影響。以平均值及標準誤差來表示激素濃度。沒有附上相同字母 (a,b,c,) 的柱狀圖表示不同的處理造成彼此間呈現統計上的顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

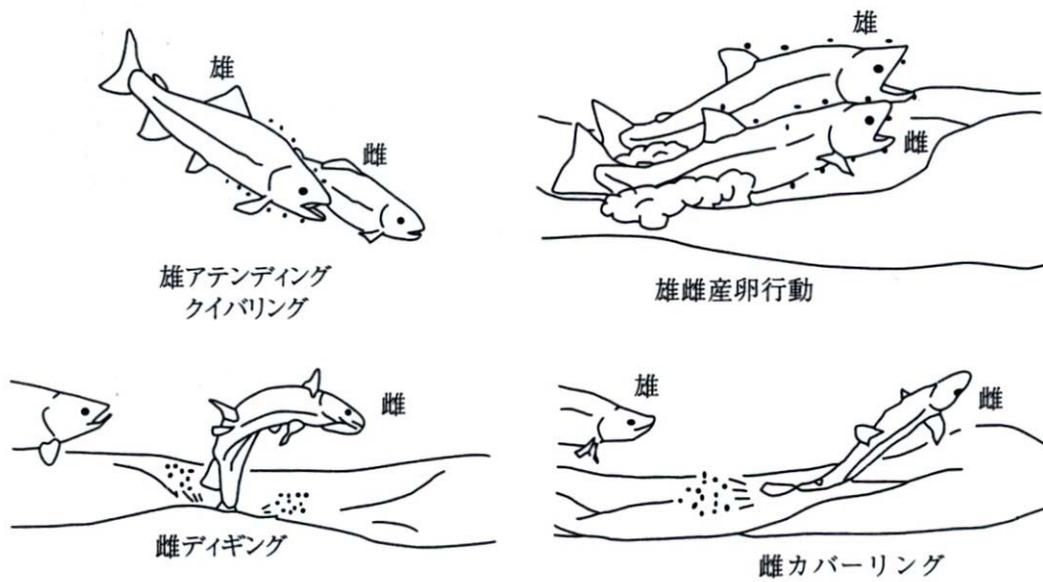


図9・6 サケ科魚類の性行動

圖 6 鮭科魚類的性行為

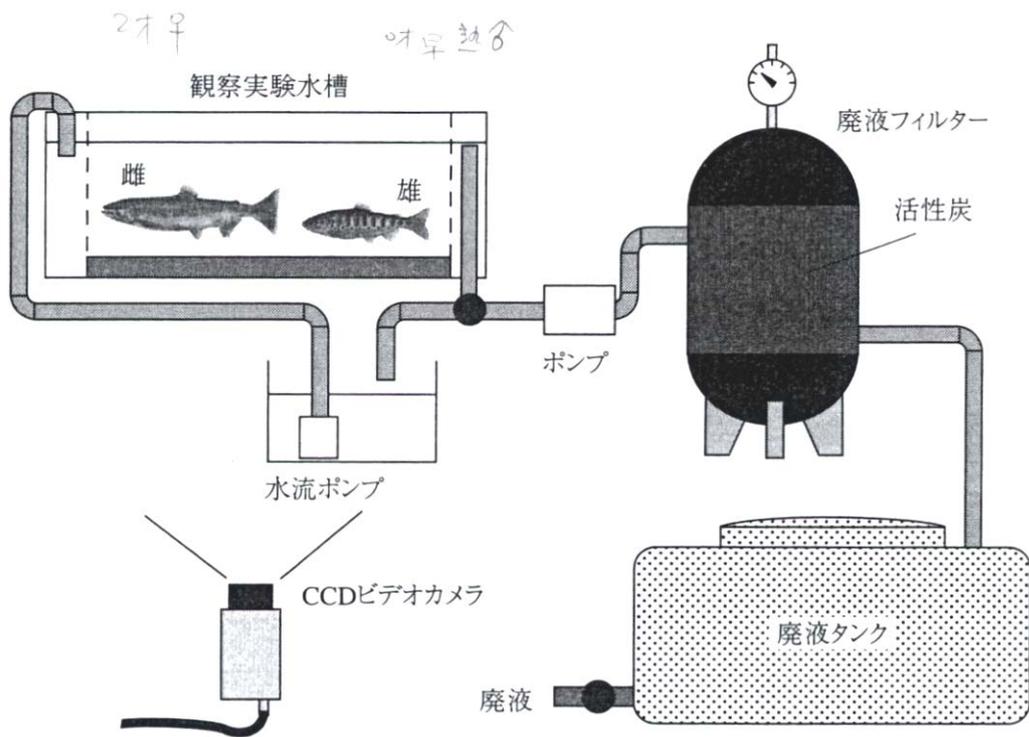


図9・7 サクラマス の性行動観察用実験水槽

圖 7 觀察櫻鮭性行為所設計的實驗水槽

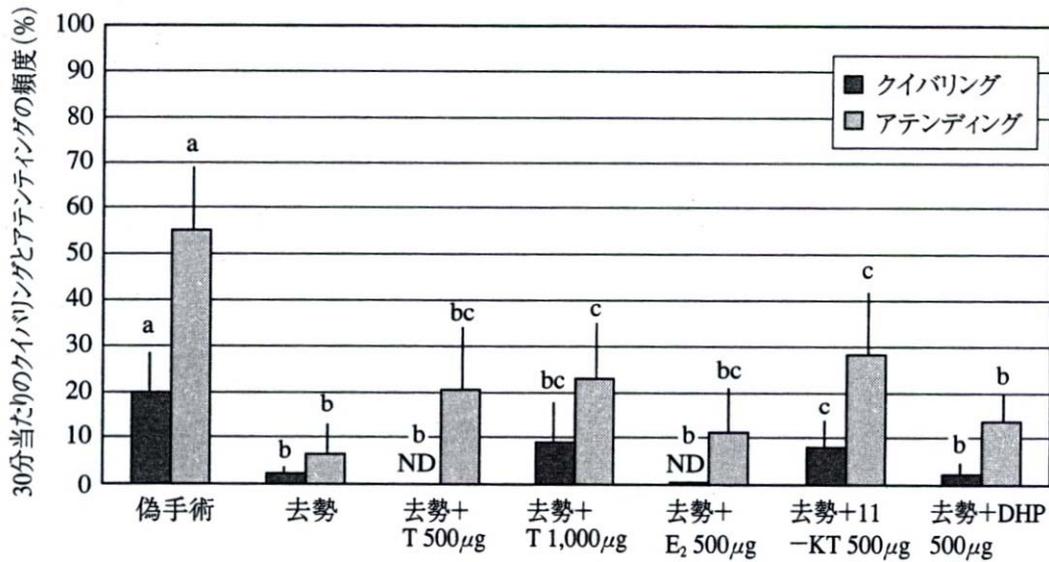


図9・8 サクラマス早熟雄の成熟雌に対する性行動(クイバリング, アテンディング)頻度に及ぼす去勢とテストステロン(T), エストラジオール-17 $\beta$ (E<sub>2</sub>), 11-ケトテストステロン(11-KT), 17 $\alpha$  20 $\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネ-3-オン(DHP)投与の影響  
データは平均値と標準誤差で表示. 同じアルファベットが付されていないグラフの間には有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示す.

圖 8 櫻鮭早熟雄魚對成熟雌魚性行為(灰色:雄魚貼近雌魚;黑色:雄魚催促雌魚產卵)之頻率, 受去勢及投與睪固酮(T: Testosterone)、17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>)、11-KT、17 $\alpha$ 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one(DHP)之影響。數據以平均值及標準誤差來表示, 沒有相同字母(a,b,c,)的柱狀圖表示不同的處理造成彼此間有顯著差異(P<0.05)。

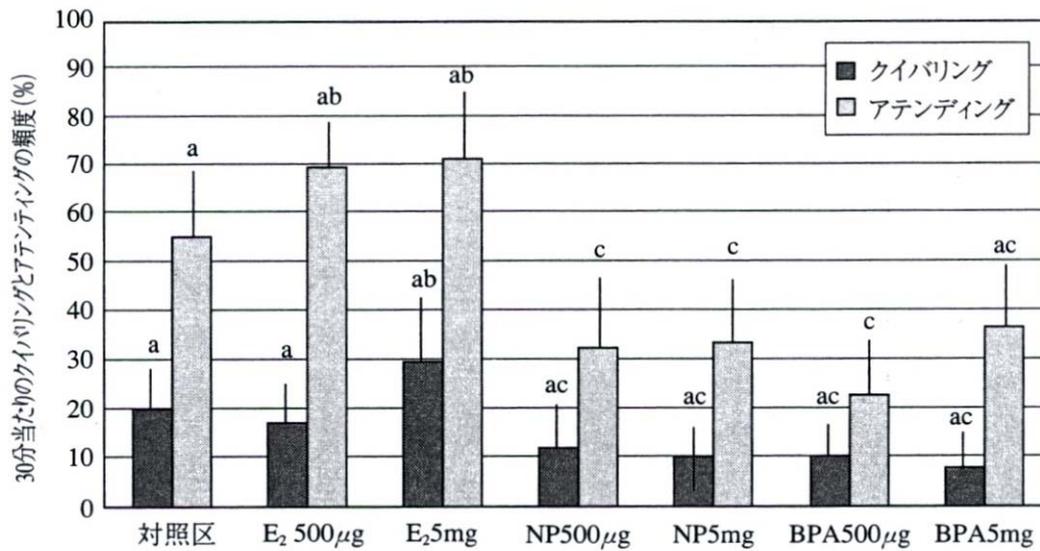


図9・9 サクラマス早熟雄の成熟雌に対する性行動（クイバリング，アテンディング）頻度に及ぼす $17\beta$ -エストラジオール（E<sub>2</sub>），ノニルフェノール（NP）およびビスフェノール-A（BPA）の影響  
データは平均値と標準誤差で表示．同じアルファベットが付されていないグラフの間には有意差（ $p < 0.05$ ）があることを示す．

圖 9、將不同劑量的  $17\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>)、Nonylphenol (NP) 及 Bisphenol-A (BPA) 埋植於櫻鮭早熟雄魚，研究埋植處理後的櫻鮭早熟雄魚對成熟雌魚之性行為（灰色：雄魚貼近雌魚；黑色：雄魚催促雌魚產卵）。數據以平均值及標準誤差來表示，沒有附上相同字母 (a,b,c,) 的柱狀圖表示彼此有顯著差異 (P<0.05)。

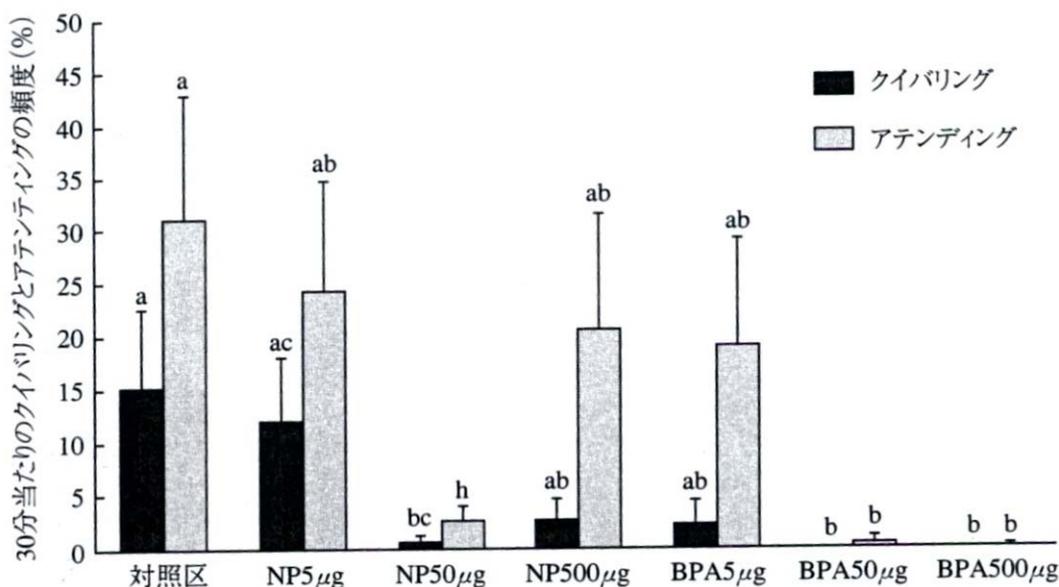


図9・10 サクラマス早熟雄の成熟雌に対する性行動（クイバリング，アテンディング）頻度に及ぼすノニルフェノール（NP）およびビスフェノール-A（BPA）の低用量長期投与の影響  
 データは平均値と標準誤差で表示，同じアルファベットが附されていないグラフの間には有意差（ $p < 0.05$ ）があることを示す。

圖 10、櫻鮭早熟雄魚長期埋植低劑量 Nonylphenol (NP) 及 Bisphenol-A (BPA) 處理，研究處理後的櫻鮭早熟雄魚對成熟雌魚之性行為（灰色：雄魚貼近雌魚；黑色：雄魚催促雌魚產卵）頻率的影響。數據以平均值及標準誤差來表示，沒有附上相同字母 (a,b,c,) 的柱狀圖表示彼此間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

## 結語—如何保育河川的水生生物尤其是鮭魚

防砂壩即使完全沒有改變生態環境條件，單只限制魚類的移動也會對生態造成深遠的影響。不管森林資源如何豐富，即使妥善保護殘存的原生自然環境，只要其流域有一座魚類無法溯上的小水壩、亦即魚類到海洋的生物廊道是否暢通，將大大地左右魚類的命運。事實上，科學家作田野調查時發現許多外觀上有豐富的森林包圍的河川，乍見之下看似狀態極佳的溪流，卻不見原本應該棲息在那裡的魚類蹤影。再則，河川被切割最可怕的影响就是所謂遺傳的劣化和族群滅絕的後果，不是緊接在水壩興建完工之後，而是在數十年後才浮出檯面。

鮭鱒魚類有特別強烈之地域固有性，生活在相同的河川，卻有所謂河川陸封型及降海型兩種生活史的變異。歐洲的棕鱒甚至還曾被分類成 50 種物種。美國瀕危物種的保護法（Endangered Species Act），對地域族群也準用物種原則，在法律上以演化顯著性單位（evolutionarily significant unit：簡稱 ESU）之族群作為最小保育單位，立法保護，執行保育政策。當生物物種的存在發生異狀時，如果我們感同身受，將之視為對人類來說也是逐漸失去住得舒適的環境指標時，那麼所謂為了保護環境而保護自然，則不僅是保育物種，也應該保護牠們的生活。思考如何保育鮭鱒魚類時，應該要考慮鮭魚的地域固有性及生活史的多樣性。因為悠久歷史造成地域固有的生態系是不可逆，無可替代的。

## 第五章、建議事項

1. 調查現存於高山溪及桃山西溪(第4、第 5和第 6號防砂壩間及6號防砂壩上游) 台灣鮭魚的遺傳結構，完成整個七家灣溪主流和各支流中台灣鮭魚遺傳結構的圖像，為將來環境監測、保育單位擬定管理政策和執行生物保育評估的基礎數據。
2. 大量放流由有限種魚數目交配孵化養殖的同質魚苗，明顯影響台灣鮭魚族群的遺傳結構，扼殺遺傳變異，加速台灣鮭魚基因的同質化。因此人工繁殖使用的種魚應先做分子標記分析，知曉其遺傳背景，再擇遺傳異質性較高的個體配對，繁衍子代放流。
3. 人工繁殖的台灣鮭魚族群在放流前應先以性別分子標記鑑定性別，以避免放流族群性比不均，降低野外存活率及繁殖率。
4. 應長期調查所有河段之台灣鮭魚性比，並比較性成熟種魚性比及未成熟幼魚性比的差異。
5. 應調查野外及人工繁殖個體是否具有表現性性別與基因型性別不同(性轉換)的現象，並究明其原因。
6. 應即刻凍結保存台灣鮭魚精液儲存稍縱即逝的種質資源。
7. 改善台灣鮭魚在七家灣棲息環境之品質、擴大其棲地面積、增加異質棲地數量、和減少台灣鮭魚的移動障礙，盡量維持各個關連族群間的交流，減少獨特的對偶基因之丟失是就地保育、分散風險，降低物種滅絕機率，保護殘存的台灣鮭魚之當務之急。
8. 和擁有自然櫻鮭家族資源的國家(中國、韓國及俄國)，索取交換櫻鮭家族亞種鮭魚樣本，解開台灣鮭魚起源之謎。
9. 加強與日本、美國、加拿大、中國等國家的國際合作。定期舉辦國際研討會，增加研究人員互訪、研習、交流的機會，他山之石可以攻錯。

## 第六章、主要參考文獻

- 王昱仁(1997)，台灣鈎吻鮭與日本鈎吻鮭遺傳多樣性之研究，碩士論文，國立清華大學，新竹、台灣，國立清華大學。
- 林曜松、楊平世、梁世雄、曹先紹、莊鈴川(1987)，櫻花鈎吻鮭生態之研究(一) 魚群分布與環境因子關係之初步研究，台北、台灣：行政院農業委員會。
- 林曜松、曹先紹、張崑雄、楊平世(1988)，櫻花鈎吻鮭生態之研究(二) 族群分布與環境因子關係之研究，台北、台灣：行政院農業委員會。
- 林曜松、張崑雄(1990)，臺灣七家灣溪櫻花鈎吻鮭族群生態與保育，台北、台灣：行政院農業委員會。
- 郭金泉(2000a)，台灣陸封型鮭魚 (*Oncorhynchus masou formosanus*) 真骨魚類、鮭目、鮭科親子親緣與凍結保存之應用：資源保育之芻議。櫻花鈎吻鮭保育研究研討會論文集。頁47-77。南投、台灣：農委會特有生物中心。
- 吳炯農、郭金泉(2000)，有效繁育群體大小與遺傳飄變，養魚世界，2000 (8)，頁22-25。
- 郭金泉、蔡俊興(2005)，開發台灣櫻花鈎吻鮭分子標記及原始生殖細胞移植之技術，苗栗、台灣：內政部營建署雪霸國家公園管理處。
- 郭金泉、徐德華(2006)，開發台灣鮭魚的分子標記，苗栗、台灣：內政部營建署雪霸國家公園管理處。
- 郭金泉、沈曼雯(2006)，河川橫斷物造成族群小型化的風險，台灣水產，642，頁46-58。
- 周以正(2006)，台灣鮭與太平洋鮭屬魚種間之粒線體 DNA、生長荷爾蒙基因的分子演化研究，苗栗、台灣：內政部營建署雪霸國家公園管理處。
- 周以正、鍾郁涵、張學偉、蔡奇立、郭金泉(2006)，論台灣鮭魚身世之謎和正名。自然保育季刊，56，頁51-58。
- 曾晴賢(2005)，武陵地區長期生態監測暨生態模式建立：櫻花鈎吻鮭族群監測與動態分析，苗栗、台灣：內政部營建署雪霸國家公園管理處。
- 鄧火土(1959)，台灣高地產陸封鮭魚的形態與生態，基隆、台灣：臺灣省水產試驗所。
- 生田和正，棟方有宗，北村章二 2006。「環境ホルモン—水産生物に対する影響実態と作用機構」。p143-155。恒星社厚生閣。東京、日本。
- 棟方 有宗 2002. 性ホルモンがサクラマス の回遊行動を制御する。日本比較内分泌学会ニュース. 104:24-30.
- 棟方有宗・会田勝美. 2002. サケ科魚類の回遊行動における性ホルモンの役割. 生物の科学 遺伝 57:83-88.
- Bensch, S., Akesson, M.(2005), Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals?, Molecular Ecology, 14, pp 2899-2914.
- Chang, H.-W., Yang, J.-L., Huang, H.-Y., Gwo, J.-C., Su, Y.-F., Wen, C.-H., Chou, Y.-C. 2009. A novel growth hormone 1 gene-derived probe for *Oncorhynchus masou formosanus* distinguished from the *Oncorhynchus* subspecies. Molecular & Cellular Probes 23:103-106.
- 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, pp 35-43.
- Frankham, R., Ralls, K.(1998), Conservation biology: inbreeding leads to extinction, Nature , 392, pp 441-442.

- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A.(2002), Introduction to Conservation Genetics, Cambridge, UK : Cambridge University Press.
- Giannasi N., Thorpe, R.S., Malhotra A.(2001), The use of amplified fragment length polymorphism in determining species trees at fine taxonomic levels: analysis of a medically important snake, *Trimeresurus albolabris*, *Molecular Ecology*, 10, pp 419-426.
- Griffiths, R., Orr, K.(1999), The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers, *Molecular Ecology*, 8, pp 671-674.
- Gwo, J.-C., Lin, X.-W., Gwo, H.-H., Wu, H.-C. and Lin, P.-W.(1996), The ultrastructure of Formosan landlocked salmon, *Oncorhynchus masou formosanus*, spermatozoon (Teleostei; Salmoniformes; Salmonidae), *Journal of Submicroscopic Cytology & Pathology*, 28, pp 33-40.
- Gwo, J.-C., Ohia, H., Okuzawa, K., Wu, H.-C.(1999), Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology*, 51, pp 569-582.
- Gwo, J.-C., Wang, Z.-Y., Hsu, T.-H. and Lin, C. 2008. The genetic structure of the Formosa landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) in Taiwan. *Journal of National Park* 18(1) : 1-10.
- Gwo, J.-C., Hsu, T.-H., Lin, K.-H. and Chou, Y.-C. 2008. SCI. Genetic relationship among four subspecies of cherry salmon (*Oncorhynchus masou*) inferred using AFLP. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48:776-781.
- Gwo, J.-C. 2008. The verification of early Japanese literatures on Formosa landlocked salmon ◦ *Journal of the National Taiwan Museum* 61(3):55-84.
- Healey, M., Kline, P. and Tsai, C.-F.(2001), Saving the endangered Formosa landlocked salmon, *Fisheries*, 26, pp 6-14.
- Hosoya, K., Chang, K.H., and Numachi, K.I.(1992), Character examination of the basibranchial teeth of the Formosan salmon, *Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica*, 31, pp 213-220.
- Hsu, T.-H. and Gwo, J.-C. 2007. The genetic diversity of Formosa landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Journal of the National Taiwan Museum* 60(4) : 39-58.
- Kassam, D., Seki, S., Rusuwa, B., Ambali, A.J.D., Yamaoka, K.(2005), Genetic diversity within the genus *Cynotilapia* and its phylogenetic position among Lake Malawi's mbuna cichlids, *African Journal of Biotechnology*, 4(10), pp 1195-1202.
- Liu, Z.J. and Cordes, J.F.(2004), DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics, *Aquaculture*, 238, pp 1-37.
- Munakata A, Amano M, Ikuta K, Kitamura S, & Aida K. 2001. The effects of testosterone on upstream migratory behavior in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Gen Comp Endocrinol.* 122(3):329-40.
- Munakata A., Amano M., Ikuta K., Kitamura S. & Aida K. 2002. Effects of environmental disrupters on reproductive behavior of masu salmon. *Environmental Science.* 9, 84.
- Nakamura, M., Nagoya, H. & Hirai, T. 2002. Nonylphenol induces complete feminization of the gonadogenetically controlled all-male amago salmon. *Fisheries Science* 68:1387-1389.
- Nagler JJ, J Bouma, GH Thorgaard, and DD Dauble. 2001. High Incidence of a Male-Specific Genetic Marker in Phenotypic Female Chinook Salmon from the Columbia River. *Environmental Health Perspectives* 109:67-69.
- Ogden, R., and Thorpe, R.S.(2002), The usefulness of amplified fragment length polymorphism marjers for

- taxon discrimination across graduated fine evolutionary levels in Caribbean *Anolis* lizards, *Molecular Ecology*, 11, pp 437-445.
- Nei, M.(1973), Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, pp 3321-3323.
- Nei, M., Li, W.H.(1979), Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, pp 5269-5273.
- Numachi, K.I., Kobayashi, K., Chang, K.H., Lin, Y.S.(1990), Genetic identification and differentiation of the Formosan landlocked salmon, *Oncorhynchus masou formosanus*, by restriction analysis of mitochondrial DNA, *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica*, 29(3), pp 61-72.
- Page, R.D.M.(1996), TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Computer Applications in the Biosciences*, 12, pp 357-358.
- Penman D. and F. Piferrer 2008a. Fish Gonadogenesis. Part I. Genetic and Environmental Mechanisms of Sex. Determination *Rev. Fish Sci.*, 16 (S1): 14-32.
- Penman D. and F. Piferrer 2008b. Fish Gonadogenesis. Part II. Molecular Biology and Genomics of Sex Differentiation. *Rev. Fish Sci.*, 16 (S1): 33-53.
- Piferrer F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197, 229-281.
- Piferrer, F., I.J. Baker, and E.M. Donaldson, 1993. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 91:59-65.
- Sullivan J.P., Lavoue S., Arnegard M.E., Hopkins C.D.(2004), AFLPs resolve phylogeny and reveal mitochondrial introgression within a species flock of African electric fish (Mormyroidea : Teleostei), *Evolution*, 58, pp 825-841.
- 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 Research*, 23, pp 4407-4414.
- Wang Z.Y., Tsoi K.H., Chu K.H.(2004), Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, pp 399-407.
- Watanabe, M., and Lin, Y.(1985), Revision of the salmonid fish in Taiwan. *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan*, 40(10), pp 75-85.
- Watanabe, T., Yamasaki, K., Seki, S., Taniguchi, N.(2004), Detection of ayu sex-linked DNA markers using homologous clones, *Fisheries Science*, 70, pp 47-52.
- Yamamoto, S., Maekawa, K., Tamate, T., Koizumi, I., Hasegawa, K., Jubota, H. (2006). Genetic evaluation of translocation in artificially isolated population of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*). *Fisheries Research* 78:352-358.
- 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, pp 157.
- Young, W.P., Ostberg, C.O., Keim, P., Thorgaard, G.H.(2001), Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*), *Molecular Ecology*, 10, pp 921-930.
- Yue, G.H., Ong, D., Wong, C.C., Lim, L.C., Orban, L.(2003), A strain-specific and a sex-associated STS marker for Asian arowana (*Scleropages formosus*, *Osteoglossidae*), *Aquaculture Research*, 34, pp 951-957.

## 誌 謝

感謝雪霸國家公園管理處的經費協助，林青前處長、保育課前課長張美瓊的鼓勵及支持。也感謝日本信州大學高田啟介教授、榮譽教授小野里坦教授、日本近畿大學 太田博巳教授、日本北海道大學荒井克俊、山羽悅郎教授提供樣本和建言，海洋大學頂尖中心李孟洲先生在儀器和實驗上的協助，在此一併感謝。

表 1、台灣鮭魚的微衛星引子對及擴增條件。本研究使用的 30 個微衛星位點的名稱(Locus)、引子對序列(Primer sequence)、重覆形式(Repeat motif)、對偶基因數 Allele number)、鎂離子濃度(Mg<sup>2+</sup>)和黏合溫度(Annealing temperature; Tm)等。30 個微衛星 DNA 位點中，僅 Omi43TUF 和 Omi69TUF 有多樣性；Omy325、Ots4、Ssa14 無 PCR 產物；其餘位點則無多樣性。

Locus	Primer sequence	Repeat motif	Allele number	Mg <sup>2+</sup> (mM)	Tm (°C)	Reference
Ots520	F: AGAGTGCAAGGCGAGTATTC R: CTTGACAGCAGGTAACCATG	(GA)n	1	2.0	50	Noguchi et al. 2003
Oma01	F: GTGTGGATGGCGATTGGTGT R: TCCCCTGAGATCATTGTAAA	(CA)n(CT)n	1	2.0	62	Noguchi et al. 2003
Oma02	F: AATGCCTGTTGGGAAAAGAGA R: TAGGGGTTTGTAAATGTAGAA	(CA)n	1	1.0	56	Noguchi et al. 2003
Oma3ke	F: TTTCTCCTTTAGCCCAATG R: CAGAGTAGACAGGGGATG	(CT)n	1	1.0	56	Noguchi et al. 2003
Oma4my	F: CTGCGCATGTGTAGCCTATG R: TCTTTAGAGGGGTCATTAC	(TA)n	1	1.0	56	Noguchi et al. 2003
Omy207	F: ACCCTAGTCATTCACTCAGG R: GATCACTGTGATAGACATCG	(GT)n	1	1.0	64	O'Connell et al. 1997
Omy325	F: TGTGAGACTGTCAGATTTTGC R: CGGAGTCCGTATCCTTCCC	(GT)n	—	2.0	50	O'Connell et al. 1997
Oneu11	F: GTTTGGATGACTCAGATGGGACT R: TCTATCTTTCCTGTCAACTTCCA	(CA)n	1	1.0	56	Scribner et al. 1996
Ots1	F: GGAAAGAGCAGATGTTGTT R: TGAAGCAGCAGATAAAGCA	(TG)nNn(TG)nNn(TG)n nNn(TG)nNn(TG)n	1	1.0	48	Banks et al. 1999
Ots3	F: CACACTCTTTCAGGAG R: AGAATCACAATGGAAG	(TC)n	1	2.0	48	Banks et al. 1999
Ots4	F: GACCCAGAGGACAGCACA R: GGAGGACACATTTTCAGCAG	(GA)nNn(GA)nNn(GA) n	—	1.0	56	Banks et al. 1999
Ssa14	F: CCTTTTGACAGATTTAGGATTTTC R: CAAACCAACATACCTAAAGCC	(TC)nN(CT)nN(AC)n(T C)nN(CA)n	—	1.0	52	McConnell et al. 1995
Ssa171	F: TTATTATCCAAAGGGTCAAAA R: GAGGTGCTGGGGTTACTAT	(TGTA)n(TG)n	1	1.0	50	O'Reilly et al. 1995
Ssa197	F: GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG R: TGGCAGGGATTTGACATAAC	(GT)5C(TG)4TC(TG)3 A(GTGA)15	1	1.0	56	O'Reilly et al. 1996
Ssa293	F: TGGTTATTGTTTCCAGAG R: ATCAGATACACAGAGACGG	(GT)n	1	1.0	56	O'Connell et al. 1997
Omi17TUF	F: GCCTAAGCATAACAAGAAGGC R: TGGTTGACATCGAGTGGAAC	(CA)n	1	1.0	60	AB105828
Omi30TUF	F: AGAAGACGAAGTGGATGCTG R: GTCACCGTTTCTTTACCTGC	(CA)n	1	1.0	64	AB105830
Omi34TUF	F: ATTTGCTTCCGTCATCCAG R: GGATGATGAAACAACCGCTC	(CA)n	1	1.0	60	AB105831
Omi43TUF	F: CCAACTGTCCCTAGAGAA R: GCGTGTTTGTAGAAGCTC	(CA)n	2	1.0	52	AB105832
Omi50TUF	F: CTTAGAACCAACAACCGTGGG R: GCAGTGTCTTTGTGGCAAGA	(CA)n	1	1.0	60	AB105834
Omi57TUF	F: GATCAGCCCATGTGTGAC R: CGGGGTGAGTATGCTTGAAT	(CA)n	1	1.0	60	AB105835
Omi65TUF	F: CCACTAGGGAGCCACTGT R: CTGACAGCTCCATACTAGTGCG	(CA)n	1	2.0	60	AB105837
Omi69TUF	F: CAGACCAACTGTCCTAGAGAA R: AGCGTGTGTTGTAGAAGCTCTCC	(CA)n	2	1.0	64	AB213229
Omi70TUF	F: TTCCTATGACCCGTTCTCTGC R: CATCGCTTTCCTGATGCC	(CA)n	1	2.0	62	AB105840
Omi77TUF	F: GTCAACACTGAGAGCTGACA R: GTTCTGAGTAGCTGGCAGC	(CA)n	1	1.0	64	AB105841
Omi87TUF	F: CCAACTCCCGTATCCTCAGA R: TGCCTTTCAGAAAGGTGGC	(CA)n	1	2.0	58	AB213231
Omi102TUF	F: TTAACATAACGCACACAGAGGC R: TCACAAGACAGAGACACGTG	(CA)n	1	2.0	62	AB105844
Omi109TUF	F: AGAGGTAGTCTGGGAGATGGC R: CTTATTGACCAACACGCGA	(CA)n	1	2.0	58	AB105845
Omi112TUF	F: TTCCAGCAGTTTCGGGAG R: GATGGCTGCTGACACAGTA	(CA)n	1	2.0	60	AB105847
Omi179TUF	F: TTATCCTAGTGCCGGTCTG R: ATGAGCTTTTCAGTGGCTT	(CA)n	1	2.0	58	AB105856

表2、櫻鮭家族的AFLP分析結果。AFLP選擇性引子對E-AAC/M-CAC，擴增34尾櫻鮭家族樣本(2008年採集的台灣鮭魚20尾、石川鮭8尾、櫻鮭6尾)的分析結果

	石川鮭	櫻鮭	台灣鮭
樣本數	8	6	20
個體擴增片段數	45~51	40~47	44
(平均)	47.63	43.67	44
多樣性片段 (polymorphic bands)	12	17	0
(百分比%)	22.2	33.3	0
共有片段 (monomorphic bands)	42	34	44
總擴增片段 (total bands)	54	51	44
平均相似系數(BSI)	0.95	0.92	1
平均遺傳距離(Genetic distance)	0.051	0.083	0
遺傳多樣性指數(He)	0.068	0.111	0

表 3、台灣鮭魚的微衛星 DNA 分析結果。2004 與 2008 台灣鮭魚的 2 個多樣性微衛星位點的對偶基因數(A)、觀測遺傳多樣性(Ho)、預期遺傳多樣性(He)、及哈溫定律(HWE)的 $\chi^2$  檢驗

Locus		2004台灣鮭魚	2008台灣鮭魚
Omi43TUF	樣本數(N)	28	20
	對偶基因數(A)	2	2
	觀測遺傳多樣性(Ho)	0.179	0.15
	預期遺傳多樣性(He)	0.164	0.157
	哈溫定律(HWE)*	0.2667	0.1307
Omi69TUF	樣本數(N)	28	20
	對偶基因數(A)	2	2
	觀測遺傳多樣性(Ho)	0.179	0.15
	預期遺傳多樣性(He)	0.164	0.157
	哈溫定律(HWE)*	0.2667	0.1307

\* $\chi^2$  test檢驗發現此2個微衛星位點的遺傳多樣性符合哈溫定律。 $\chi^2=0.2667$  ;  $df=1$  ;  $P>0.05$

表 4、櫻鮭家族的雄性特有分子標記測試結果。正常雄性個體應具有雄性特有分子標記 *OtY2m*，而雌性個體則無。

Phenotype(表現型)	櫻鮭		石川鮭	
	雄	雌	雄	雌
Genotype 有 <i>OtY2m</i>	19	0	6	0
Genotype 無 <i>OtY2m</i>	1	24	0	1

表5、七家灣溪野外台灣鮭魚(2005、2008年)之性別比例。

時期	採集地點	樣本數	性比	(雄/雌)
2008	1~2 號壩間	21	0.62	(8/13)
2005	生態中心	44	0.76	(19/25)

二年採集分析魚隻的性比均未顯著偏離1：1 ( $X^2=1.1904$ ； $0.8182$ ； $df=1$ ； $P>0.05$ )

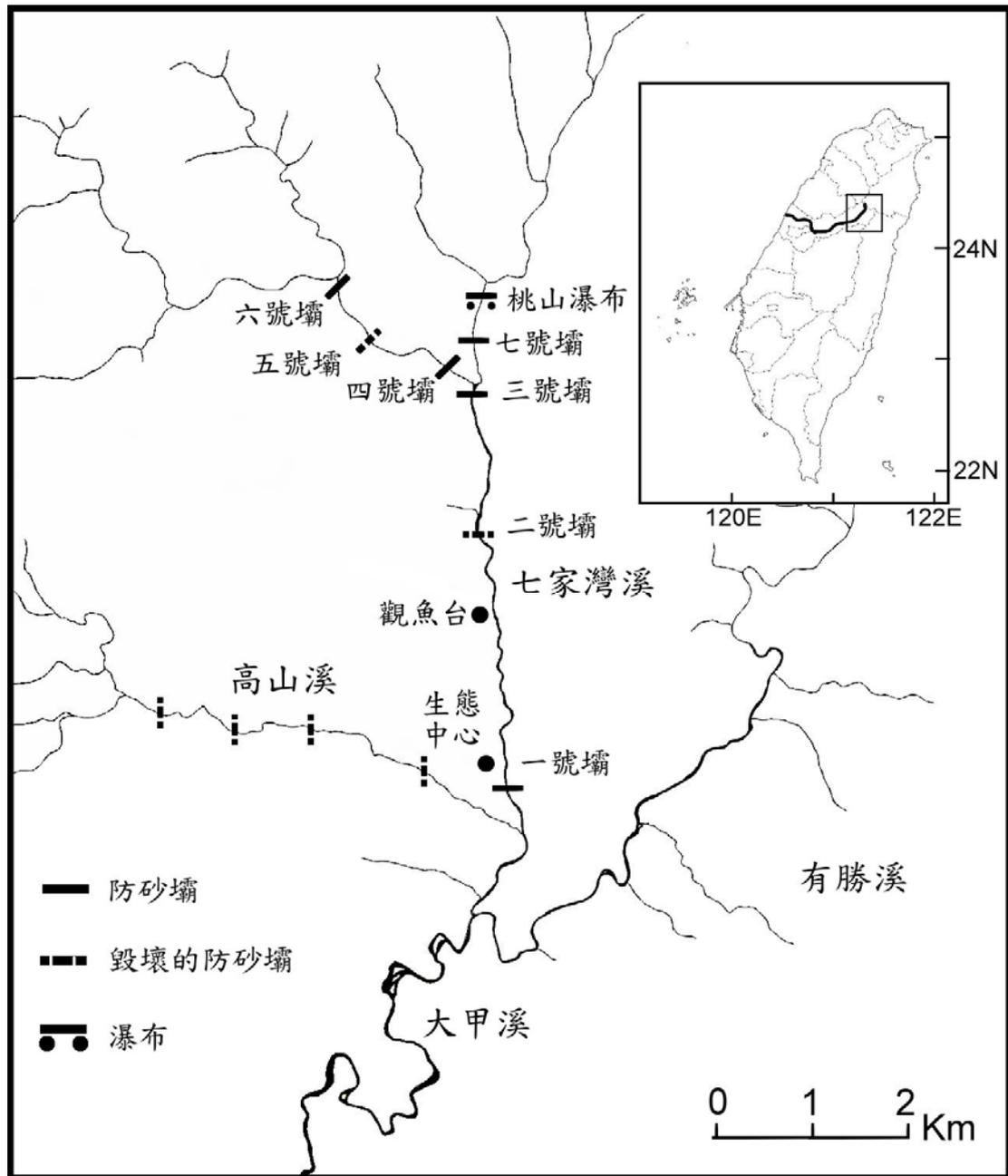


圖 1、台灣鮭魚採樣地點位於台灣台中縣大甲溪上游的七家灣溪。



圖 2、自然死亡的台灣鮭魚樣本照。2008 年採集野生台灣鮭魚樣本時，自觀魚台附近河段拾獲的死亡台灣鮭魚樣本。全長約 26cm。

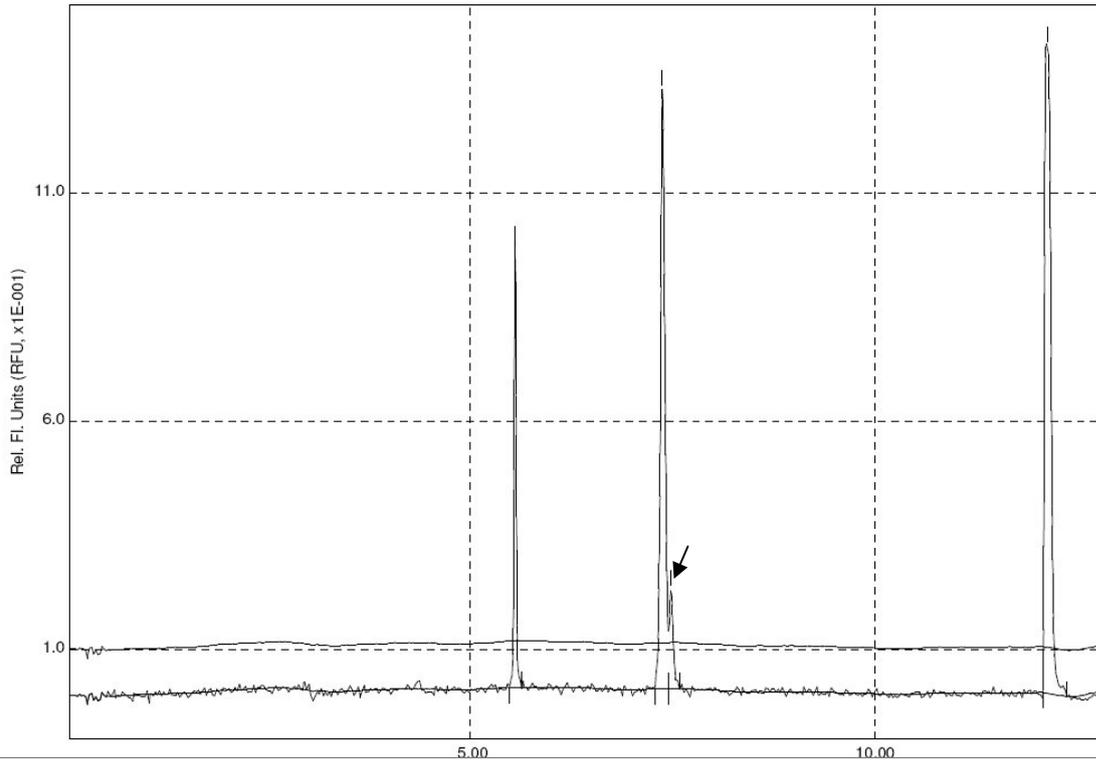


圖 3、毛細管電泳儀的數據結果範例。精準的波形圖有利於辨別偽陽性 (黑色箭頭處) 的 PCR 產物。

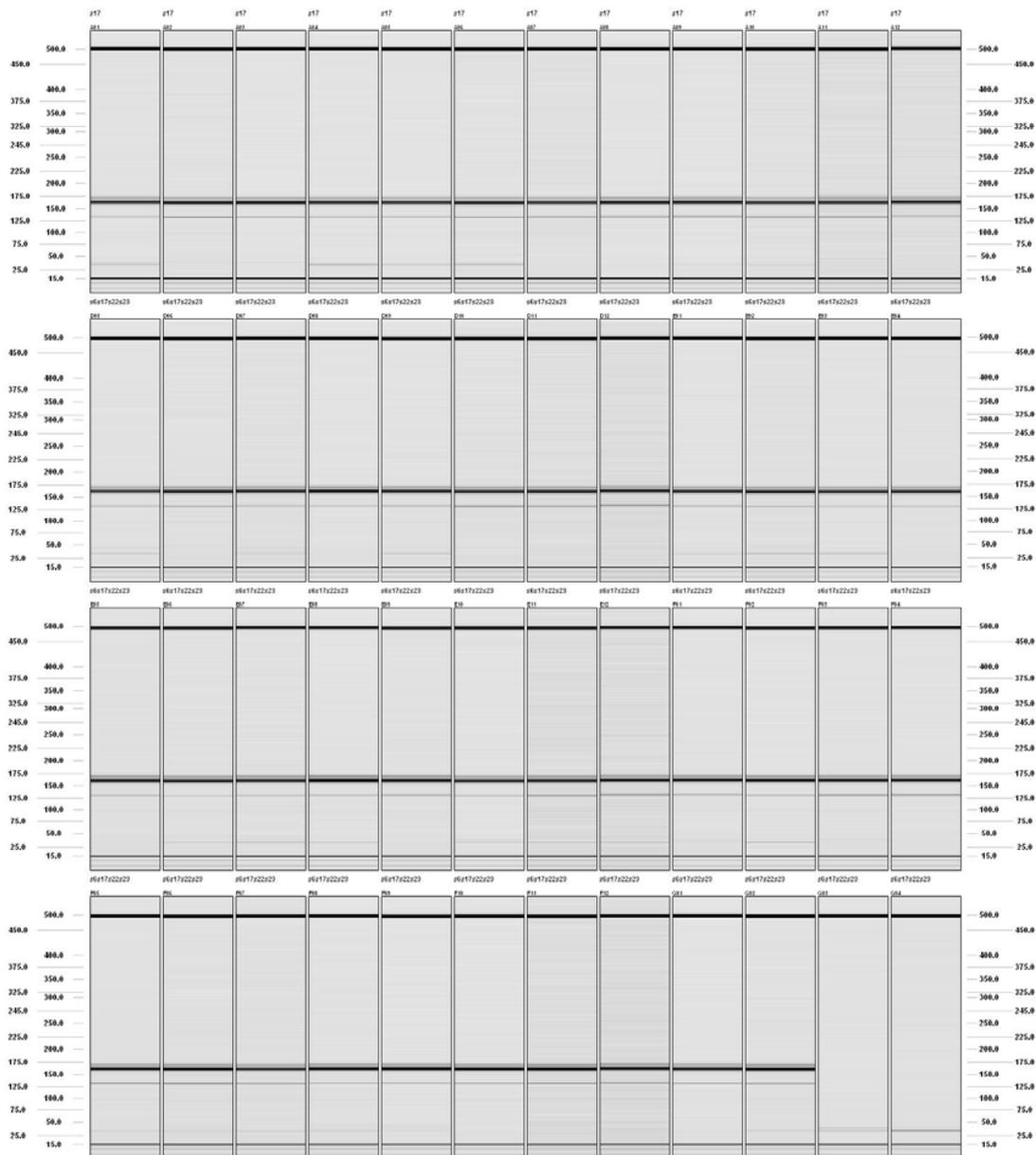


圖 4、毛細管電泳儀的數據結果。利用毛細管電泳儀可批次處理大量的樣本。圖為微衛星位點 Omi30TUF 擴增產物的電泳結果，僅有一個等位基因，所有個體皆為同型合子 (homozygotes)。





圖 6、櫻鮭家族性別鑑定。以雄性特有分子標記 *OtY2m* 為主，並搭配粒線體 DNA 16S Rna 部分片段為輔的櫻鮭家族性別鑑定法。雄性個體(M)可以得到二條片段，一條為雄性特有分子標記 *OtY2m*，大小約為 310bp，另外一條為粒線體 DNA 16S rRNA 部分片段，大小約為 250bp。雌性個體(F)僅得到一條片段，為粒線體 DNA 16S rRNA 的部分片段。若不加入 DNA (C)，或者擴增失敗時，便無法得到大小為 250bp 的粒線體 DNA 16S rRNA 部分片段。

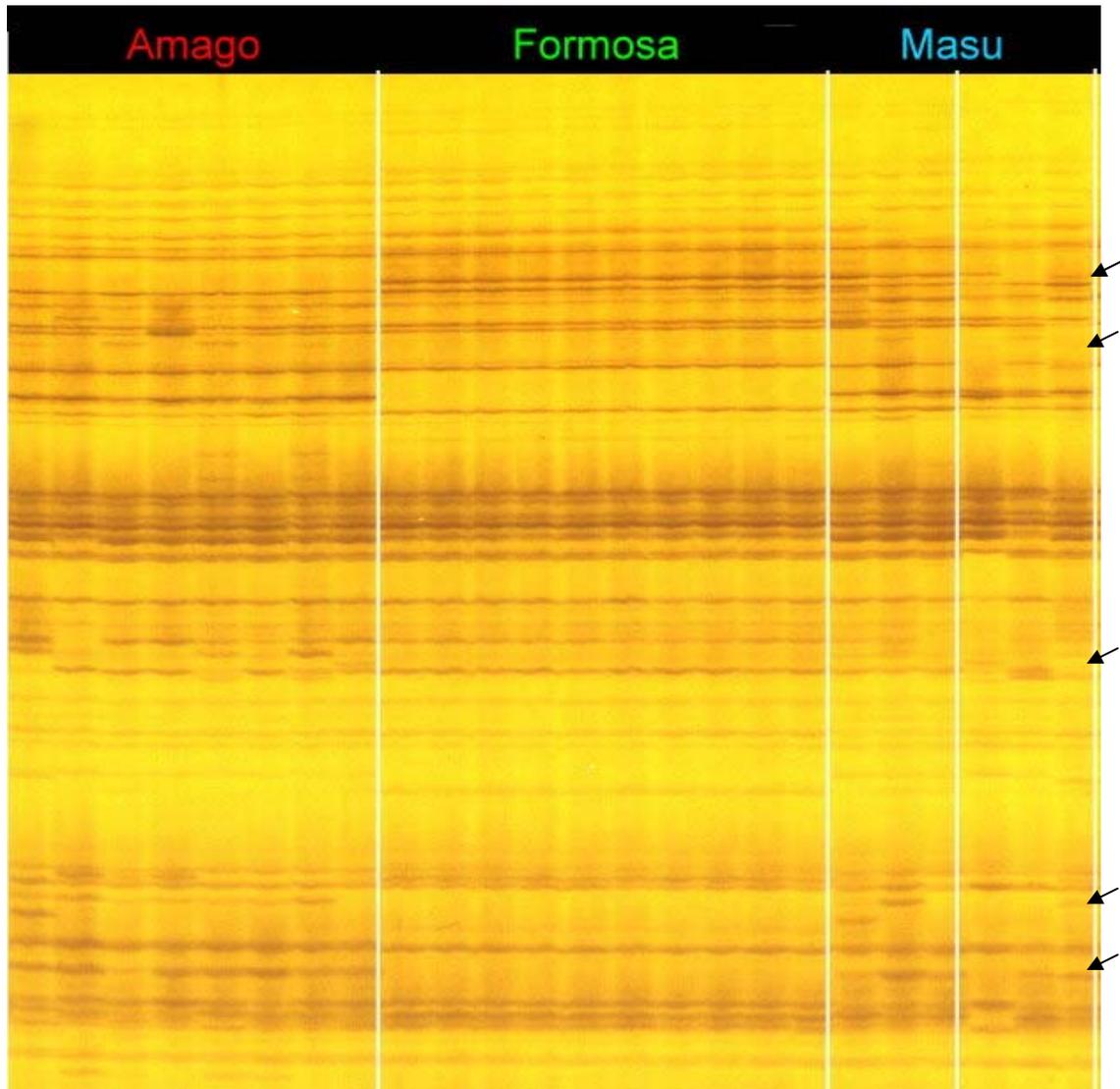


圖 7、AFLP 選擇性引子對 E-AAC/M-CAC 得到的指紋圖譜(局部)。石川鮭與櫻鮭在多個位點上具備多樣性(箭頭)，而台灣鮭則無多樣性。

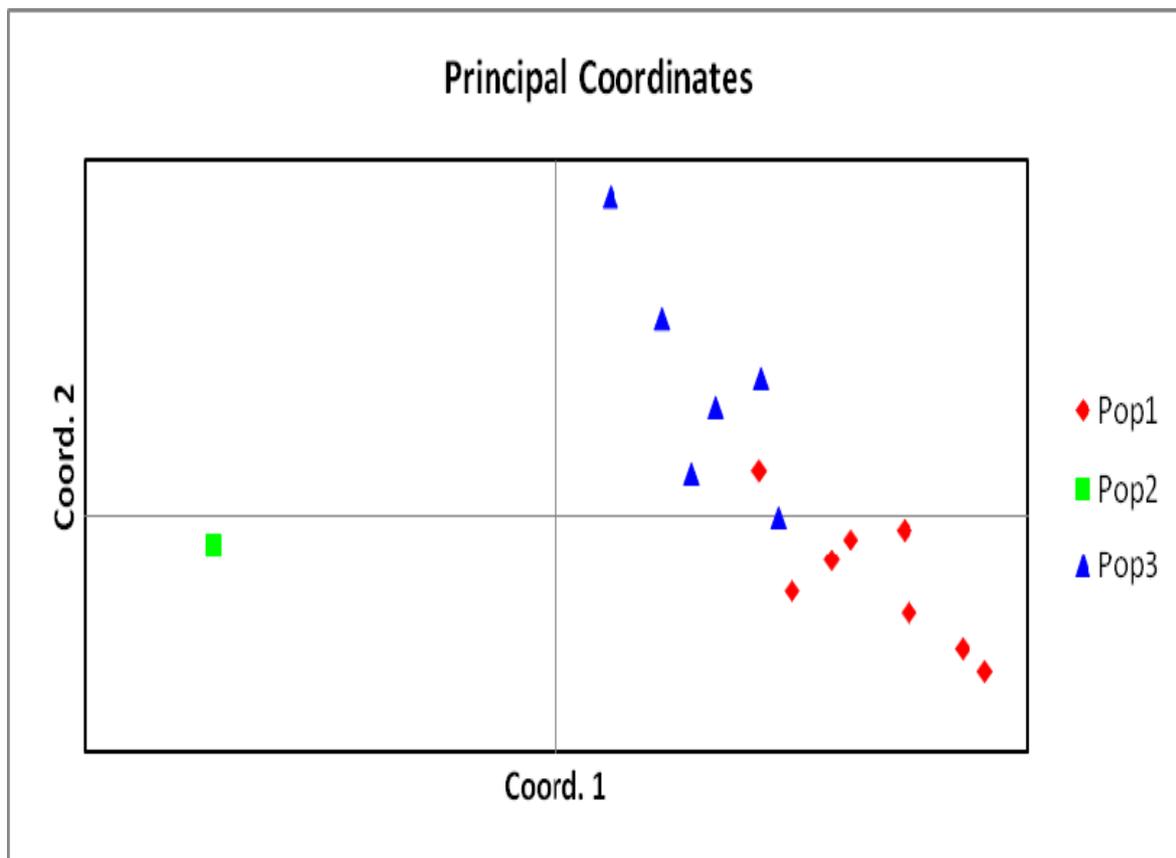


圖 8、櫻鮭家族 AFLP 數據的 PCA 分析圖。使用 AFLP 選擇性引子對 E-AAC/M-CAC 的 58 個擴增片段數據進行 PCA 分析的結果。Pop1(◆)為石川鮭、Pop2(■)為台灣鮭、Pop3(▲)為櫻鮭。第一主成份(Coord.1)為 59.85%、第二主成份(Coord.2)為 16.83%，共代表了 76.68% 的變異。第一主成份可明顯將台灣鮭魚自櫻鮭家族中區別出來，第二主成份則可大致區別出石川鮭及櫻鮭。由於台灣鮭魚並無多樣性，因此 20 個樣本全類聚成單一個點。

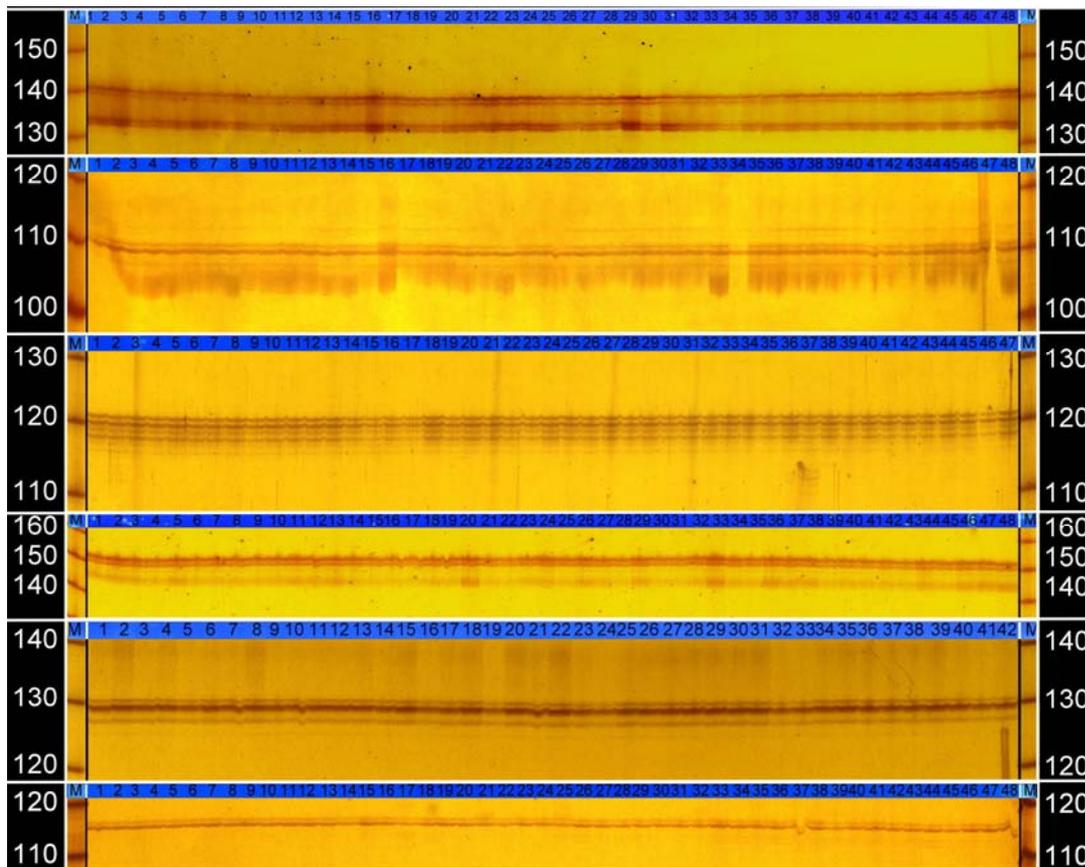


圖 9、台灣鮭魚微衛星 DNA 的變性聚丙烯醯胺凝膠電泳圖。以 6.5% 的變性聚丙烯醯胺凝膠電泳後，銀染所得到的微衛星 DNA 電泳圖。6 個微衛星位點均只有一個對偶基因，不具有多樣性。由上到下依序為微衛星位點 Oma02、Oma3ke、Oma4my、Oneu11、Ssa197、Ssa293。