

雪霸國家公園管理處委託辦理計畫

臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟頰魚體  
內卵黃前質素之測定  
(期末報告)

受委託單位：嘉南藥理大學

計畫主持人：鄭蕙玲

協同主持人：張崑雄

雪霸國家公園管理處委託研究報告

中華民國 104 年 12 月

(本報告內容及建議，純屬研究小組意見，不代表本機關意見)

SP104104

臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟頰魚體  
內卵黃前質素之測定  
(期末報告)

受委託者：嘉南藥理大學

研究主持人：鄭蕙玲

協同主持人：張崑雄

研 究 員：黃大駿

研究助理：蔡政達、張智惟

雪霸國家公園管理處委託研究報告

中華民國 104 年 12 月

(本報告內容及建議，純屬研究小組意見，不代表本機關意見)

## 目次

表次	í í	..III
圖次	í í	.....IV
摘要	í í	..V
第一章 緒論	.....	1
第一節 計畫緣起與背景	.....	1
第二節 計畫目標	.....	2
第二章 臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理	.....	3
第一節 前言	.....	3
第二節 材料與方法	.....	5
第三節 結果	.....	7
第三章 臺灣鏟頷魚體內卵黃前質素之測定	.....	13
第一節 前言	.....	13
第二節 材料與方法	.....	18
第三節 結果	.....	22
第四章 結論與建議	.....	30
第一節 結論	.....	30
第二節 建議	.....	31
參考文獻	.....	32

附錄一 臺灣鏟頰魚基本資料 .....	43
附錄二 採購評審委員會評審會議紀錄公文 .....	45
附錄三 雪霸國家公園管理處學術研究標本採集同意函 .....	46
附錄四 行政院農業委員會申請利用保育類野生動物同意函 .....	46
附錄五 第 1 次期中審查會議紀錄 .....	48
附錄六 第 2 次期中審查會議紀錄 .....	50
附錄七 期中報告審查意見及答覆說明 .....	52
附錄八 期末審查會議公文 .....	57
附錄九 期末報告審查意見及答覆說明 .....	58

## 表次

表 2-1. 櫻鱒族群之地區分布及樣本數 .....	5
表 2-2. 聚合酶連鎖反應之引子序列 .....	5
表 2-3. <i>cytB</i> 基因序列單型、單型歧異度及核苷酸歧異度 .....	7
表 2-4. <i>COI</i> 基因序列單型、單型歧異度及核苷酸歧異度 .....	9
表 2-5. <i>VTG</i> 基因序列單型、單型歧異度及核苷酸歧異度 .....	11
表 2-6. <i>RAG1</i> 基因序列單型、單型歧異度及核苷酸歧異度 .....	11
表 3-1. 各樣點捕獲之臺灣鏟頰魚體長及體重之變化 .....	22
表 3-2. 七家灣溪、有勝溪、高山溪及伊卡丸溪水質分析結果 .....	23
表 3-3. 雪霸國家公園重要記事 .....	27
表 3-4. 水中雌二醇(17 $\beta$ -estradiol)對魚類的影響 .....	29

## 圖次

圖 2-1. 以 cytB 基因序列所架構之 NJ 親緣關係樹狀圖 .....	8
圖 2-2. 以 COI 基因序列所架構之 NJ 親緣關係樹狀圖 .....	9
圖 2-3. 以 VTG 基因序列所架構之 NJ 親緣關係樹狀圖 .....	10
圖 2-4. 以 RAG1 基因序列所架構之 NJ 親緣關係樹狀圖 .....	12
圖 3-1. 臺灣鏟頰魚及水質採集樣點 .....	19
圖 3-2. 七家灣溪(Cijiawan)、有勝溪(YuSheng)、高山溪(Kaoshan)及伊卡丸溪(Ikawam)中，臺灣鏟頰魚公魚及仔魚肝臟中卵黃前質蛋白(vitellogenin)之濃度變化。 .....	24
圖 3-3. 七家灣溪(Cijiawan)、有勝溪(YuSheng)、高山溪(Kaoshan)及伊卡萬溪(Ikawam)中，臺灣鏟頰魚公魚及仔魚肝臟中 monooxygenase(Mon)之活性變化。 .....	25
圖 3-4. 七家灣溪(Cijiawan)、有勝溪(YuSheng)、高山溪(Kaoshan)及伊卡丸溪(Ikawam)中，臺灣鏟頰魚公魚及仔魚肝臟中 glutathione-S-transferase (GST)之活性變化。 .....	25
圖 3-5. 七家灣溪上游(藍線)、七家灣溪中游(黃線)、有勝溪(黃線)、高山溪(紅線)及司界蘭溪下游(黑線)，導電度為 83 年至 104 年之變化。 .....	28

## 摘要

櫻花鉤吻鮭是地處亞熱帶之臺灣唯一的溫帶魚種，推測是在冰河時期來到台灣。由於氣候及環境變遷，櫻花鉤吻鮭遂成為「陸封性鮭魚」，目前僅分布於大甲溪上游雪霸國家公園內的七家灣溪和雪山溪。由於數量稀少且面臨氣候及環境變遷等不利因素，對櫻花鉤吻鮭的生存造成嚴重威脅，保育管理實為重要。本計畫探討臺灣櫻花鉤吻鮭的親緣地理，樣本含括日本北海道及大陸東北的太平洋鮭魚族群。利用多基因進行分子親緣研究，核基因計選取卵黃前質素基因及重組活化蛋白基因，粒線體 DNA 基因則為細胞色素 b 基因及細胞色素 C 氧化酶 I 基因。各基因片段所呈現之遺傳模式並不一致，一般來說，日本族群的遺傳歧異度大於台灣族群（包含野生及人工育種）的遺傳歧異度，親緣關係分析結果顯示台灣族群較為可能衍生自日本族群的親緣地理連結，而中國是親緣較遠的支系。

大梨山地區居民主要以溫帶果樹及高冷蔬菜種植為業，農藥、肥料等化學物質流到溪中，影響當地水質。這些物質進入體內，對生物體產生類似荷爾蒙作用，干擾本身內分泌系統之作用，進而影響生物個體的生長、發育、恆定的維持以及生殖等作用，甚至危及後代的健康。本計畫以臺灣鏟頰魚為材料，比較大甲溪上游國家公園範圍內及中下游國家公園範圍外雄魚體內的類雌性素物質，以探討環境荷爾蒙是否對此區域物種造成影響。經由水質及生理生化值結果顯示，高山溪為四樣點中污染物最少的樣點。針對單氧酶、麩胱甘肽硫基轉移酶及導電度結果顯示，有勝溪及伊卡丸溪目前依然有污染源進入，其中亦包含類雌性素的環境荷爾蒙，需要持續進行長期追蹤。七家灣溪中，臺灣鏟頰魚體內雖然可以測到類雌性素的環境荷爾蒙，經導電度結果顯示水體中污染物濃度已逐年下降。

關鍵詞：櫻花鉤吻鮭、臺灣鏟頰魚、親緣地理、環境荷爾蒙

## Abstract

Taiwan masu salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) is the only temperate cold water fish in Taiwan and presumed they came during glacial epoch. Because of climatic and environmental changes, the salmon no longer migratory became landlocked and only distributed in Cijiawan River and Gaoshan Creek of Tachia River upstream of Shei-Pa National Park Currently. Nevertheless, due to the negative impacts of Typhoons, floods, agriculture development, dams and so on, the survival of wildlife has been seriously threatened. It is important to understand the diversity and phylogeny of Taiwan masu salmon for conservation management. The purpose of this project is to explore the genetic phylogeography of Taiwan salmon by means of sampling both northeast Hokkaido and Pacific salmon populations. The molecular genetic study is based on multigenic technology. Nuclear genes included vitellogenin gene and recombination activating gene 1. Mitochondria DNA included cytochrome b gene and cytochrome c oxidase I gene. The gene fragments and genetic model is inconsistent. In general, the degree of genetic divergence of Japan salmon is larger than that of Taiwan salmon (including wild and artificial breeding). The phylogenetic analysis indicated that Taiwan's ethnic groups would be derived from Japan's ethnic groups, while Taiwan's ethnic groups were less closed with China's ethnic groups in terms of phylogenetic characteristics.

Furthermore, residents in Lishan areas significantly relied on agriculture development and used various pesticides, fertilizers and other chemical substances. These chemicals flow in the river, affecting the local water quality. These substances absorbed into the salmon produced some similar effect of hormones. It inevitably will interference endocrine system itself, thereby affecting the growth, development, and reproduction of organisms, and even endanger the health of next generations. In order to study the impact on water quality caused by environmental hormones, the project compared with the fish from upstream and downstream of Cijiawan River by measuring the vitellogenin of male Taiwan shovel-jaw carp (*Onychostoma barbatulum*). The results of water quality and physiological characteristics revealed that the samples from Kaoshan River were least polluted. In terms of MON, GST and electronic conductivity, the results showed that the water of YuSheng River was surly polluted. In addition, the

pollutants contained xenoestrogen. Further investigation will be necessary. The xenoestrogen were detected insided *O. barbatulus* Cijiawan River, indicating that pollutants in water were gradually reduced in terms of water conductivity.

Keywords: *Oncorhynchus masou formosanus*, *Onychostoma barbatulus*, phylogeography, environmental hormone.

## 第一章 緒論

### 第一節 計畫緣起與背景

櫻花鉤吻鮭是地處亞熱帶之臺灣唯一的溫帶魚種，推測是在十萬至一百萬年前冰河時期由日本海附近往南方游動。在大約 1 萬 5 千年前，冰河期接近尾聲，氣溫升高，由於地殼的劇烈升降，臺灣地形隆起，平緩的河川變為陡峭、短急，櫻花鉤吻鮭無法生存。唯獨大甲溪上游相對上平坦的地形，保存了櫻花鉤吻鮭的生活環境。但中、下游水溫又過高，且中游在部分又形成一個小斷層，阻止了櫻花鉤吻鮭洄游大海的機會，於是櫻花鉤吻鮭遂成為「陸封性鮭魚」，目前僅分布於大甲溪上游雪霸國家公園內的七家灣溪和雪山溪。由於數量稀少且面臨氣候及環境變遷等不利因素，對櫻花鉤吻鮭的生存造成嚴重威脅，保育管理實為重要。瞭解物種之基因多樣性，為物種保育最基本的課題，以往對櫻花鉤吻鮭之研究不少，都忽略大陸東北的鮭魚族群之比較。是以本計畫將探討臺灣櫻花鉤吻鮭的親緣地理，樣本含括日本及大陸東北地區的太平洋陸封鮭魚族群。

另大梨山地區居民主要以溫帶果樹及高冷蔬菜種植為業，而梨山地區為大甲河流域且是德基水庫的主要水源，並供應大台中地區的飲水。在坡地種植果樹及蔬菜於降雨時，農藥、肥料等化學物質勢必會流到溪中，影響當地水質。這些物質進入體內，對生物體產生類似荷爾蒙作用，干擾本身內分泌系統之作用，進而影響生物個體的生長、發育、恆定的維持以及生殖等作用，甚至危及後代的健康。七家灣溪中除臺灣櫻花鉤吻鮭之外，還有臺灣鏟頰魚，族群龐大，以藻類為主食，並捕食水棲昆蟲與有機碎屑，相當適合做為指標魚種。本計畫將以臺灣鏟頰魚為材料，比較大甲溪上游國家公園範圍內及中下游國家公園範圍外雄魚體內的卵黃前質素，以探討環境荷爾蒙是否對此水域造成影響。

## 第二節 計畫目標

本研究預計以一年的時間完成下列工作項目：

- (一) 探討臺灣櫻花鉤吻鮭與太平洋鮭魚的親緣關係。
- (二) 農業活動產生的化學物質對溪流水質的影響。
- (三) 比較國家公園範圍內及外環境荷爾蒙濃度的差異性。

具體工作內容敘述如下：

1. 採集臺灣地區之櫻花鉤吻鮭及臺灣鏟頰魚樣本。
2. 洽談國際合作，以取得大陸黑龍江地區及日本環日本海地區之櫻鱒樣本，完成各地樣本收集。
3. 若無法取得俄羅斯地區樣本，則利用基因庫之序列進行比對。
4. 進行多基因引物開發測試。
5. 進行 DNA 萃取、聚合酶連鎖反應及分子定序。
6. 親緣地理關係親緣重建，並分析臺灣櫻花鉤吻鮭最可能之演化路徑。
7. 選定採樣地點進行水質檢測分析。
8. 檢測樣點之臺灣鏟頰魚體內是否有卵黃前質素 (VTG) 之生成。
9. 利用水中常見之類雌性素-雙酚 A (bisphenol A, BPA) 作為外因性雌性素之試驗用藥，作為比較。
10. 了解環境荷爾蒙是否會對臺灣櫻花鉤吻鮭及飲用水造成不良影響，並提出櫻花鉤吻鮭合理的保育管理策略。

## 第二章 臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理

### 第一節 前言

臺灣之櫻花鉤吻鮭為陸封型魚類，亦為鮭鱒魚類分布之最南界，其近緣種見於中國大陸、日本與蘇聯遠東地區 (Jan et al., 1990)。臺灣櫻花鉤吻鮭之起源，數十年來一直是令人關注的問題，目前已可藉由親緣地理學的技術，釐清臺灣櫻花鉤吻鮭起源之謎團源。

櫻鱒 (Cherry salmon, *Oncorhynchus masou complex*)，為西北太平洋常見之鮭鱒魚類，亦為遠東地區特有之魚類，主要分於環日本海之各河系中，最南分佈於臺灣，最北分佈至鄂霍次克海，最東分佈至堪察加半島 (Kato, 1991)，根據 Kimura (1990)、Watanabe 和 Lin (1985) 的報告，櫻鱒複合種群可分為四個亞種，包括：一、臺灣陸封型之櫻花鉤吻鮭 (*O. masou formosanus* (Jordan and Oshima, 1919))，二、分佈於東亞，包括：日本、韓國、蘇聯與中國大陸之馬蘇大麻哈魚 Masu (*O. masou masou*)，三、分佈於日本非降海型之石川馬蘇大麻哈魚 Amago (*O. masou ishikawae*)，四、分佈於琵琶湖之 Biwa (*O. masou* subsp.)。

櫻鱒的生活史極為複雜，有陸封型、亦有降海型 (Kato, 1991)，而降海型的櫻鱒與其他太平洋鮭魚一樣，會回到原始出生地產卵，只有極少個體會到非出生地產卵，因此，對於櫻鱒族群而言，這樣迴游的特殊性，可以預期在族群結構上會產生分化。對於一個物種的長遠發展，擁有高的遺傳變異是物種適應環境變化的基礎，瞭解一個物種的遺傳結構，便成為保育此物種非常重要的課題。

過去對於櫻鱒的遺傳結構研究極多，例如：同功異構酶 (Okazaki, 1986)、限制 DNA 片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Kijima and Matsunami, 1992; Suzuki et al., 2000; 郭, 2009)、微衛星 DNA (郭, 2009; Yu et al., 2010) 與核酸序列研究 (Numachi et al., 1990; Edpalina et al., 2004; Kitanishi et al., 2007; Yu et al., 2010; 周與張, 2006)，但過去的分分子研究，基本

上都只限於單一亞種或專注於亞種間親緣關係研究，目前已確認臺灣櫻花鉤吻鮭為臺灣原生特有亞種，但對於整個複合種群之多基因親緣地理研究則缺乏(Lin et al., 1990)。現今，以不同方法所重建的櫻鱒複合種群演化關係尚未有定論(Nakabo, 2009；Hsu et al., 2010；Ho and Gwo, 2010)，對於臺灣櫻花鉤吻鮭起源之說法更是莫衷一是，Yu 等人在 2010 年曾經針對日本環日本海與俄羅斯地區，進行過櫻鱒魚類之親緣地理學研究，此研究唯獨缺乏臺灣與中國大陸櫻鱒之樣本，因此本研究重點在於補足此二地區之櫻鱒樣本，並與 Yu 等人的研究比對，確認臺灣櫻花鉤吻鮭之最近緣祖先，釐清櫻花鉤吻鮭為陸源或海源起源之假說。

分子遺傳標誌依其來源可分為細胞核與胞器二類，不但可以顯現族群內及族群間遺傳的變異程度，更在其譜系中 (lineage) 保存許多演化的訊息，其中尤以粒線體 DNA 為代表性之分子標誌。許多學者認為對於瀕危或稀有物種的保育，演化顯著單位 (Evolutionary Significant Units, ESU) 為適當的保育單位，此概念是指一個族群在粒線體 DNA 或核 DNA 層級上，已經形成獨一的單系群 (Moritz, 1994, 1999)。另一概念則為管理單位 (Management Units, MU)，管理單位的制定是取決於明顯差異的等位基因頻率，而各單位之間的遺傳分化並不是由系統演化所造成的，所反應的是現代的基因隔離與基因流動的停止 (Moritz, 1995)。ESU 與 MU 在保育管理上均有重要的意義，但二者偏重的重點不同，ESU 考慮的是族群的立歷史遺傳結構，單系群的確認和長期保育需要，而 MU 則強調現今族群的遺傳結構，等位基因頻率分布和短期管理需要。因此，了解物種的遺傳多樣性與其地理區域的相關性，以正確地評估族群結構，才能發展合理的保育策略，建構有效管理保育類物種的基礎。

## 第二節 材料與方法

本研究之櫻鱒複合種群個體分別採自台灣、日本北海道及中國東北地區，台灣地區樣本則包含野生個體與人工育種個體，詳細資料如表 2-1。

表 2-1. 櫻鱒族群之地區分布及樣本數

地區	時間	樣本數
台灣 (野生, W1-W4)	104.06	4
(野生, TF01-06)	100.10	6
(人工育種, EF01-07)	104.10	7
日本北海道 (JM01-JM04)	89.09	4
(JH01-JH11)	104.11	11
中國東北 (M01-M02)	104.07	2

樣本取得後以 95% 酒精固定，並保存於 70% 酒精中，加入 DNA Extraction Kit 進行 DNA 萃取。本研究利用多基因進行分子親緣研究，核基因計選取：1. 卵黃前質素 (Vitelfogenin, VTG) 為常用於監測類雌性素的生物指標 (Barucca et al., 2006)，2. 重組活化蛋白 (recombination activating gene 1, RAG1)，粒線體 DNA 基因為：1. 細胞色素 b (cytochrome b) 基因，2. 細胞色素 C 氧化酶 I (COI) 基因，所使用之引子如表 2-2。

表 2-2. 聚合酶連鎖反應之引子序列

基因片段	引子序列
VTG	VITF2F(221-243): 5 $\phi$ AGCGAGTCAATCTGTAACT TTG-3 $\phi$ VITR2R(1111-1132): 5 $\phi$ CTGCCGGCACTCTACACACTTC-3 $\phi$
RAG1	RAG1F1: 5 $\phi$ CTGAGCTGCAGTCAGTACCATAAGATGT-3 $\phi$ RAG1R1: 5 $\phi$ CTGAGTCCTTGTGAGCTTCCATRAAYTT-3 $\phi$
cytB	cytB-F: 5 $\phi$ ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC-3 $\phi$ cytB-R: 5 $\phi$ CCGACTTCCGGATTACAAGACCG-3 $\phi$
COI	COI-F: 5 $\phi$ GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3 $\phi$ COI-R: 5 $\phi$ TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3 $\phi$

利用 PCR 反應進行 DNA 序列增幅。每 100  $\mu$ L PCR 反應中，包括 10 ng 的樣本 DNA、10  $\mu$ L 10 倍反應緩衝液、10  $\mu$ L 之 dNTP(8mM)、10  $\mu$ L 之氯化鎂 (25mM)、10 pmole 之引子與 4U 之 DNA 聚合酵素 (Taq polymerase, Promega, Madison, WI, USA)，以 MJ Thermal Cycler 進行 PCR 反應，反應步驟如下：以 95°C 進行 4 分鐘變性反應，再以 94°C 變性 45 秒、46°C 進行黏合反應 1 分 15 秒，72°C 進行延長反應 1 分 30 秒，此循環反應進行 30 個循環，最後進行十分鐘 72°C 延長反應，以 4°C 保存 PCR 產物，所得產物以 1.0% 膠體於 1xTAE 緩衝液進行電泳，最後以 gel purification kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) 進行純化，所得產物進行序列定序。

DNA 分子序列以 CLUSTAL X 1.81 (Thompson et al., 1997) 進行排序比對 (alignment)，所得結果再進行人工修正以達最大相似性與合理性。將所得序列上傳至 NCBI 基因資料庫中進行比對，以確定該序列為正確片段。以 MEGA 4 計算序列的變化，使用 Kimura 2-parameter distance 法為參數 (Kimura, 1980)，計算鹼基替代率及遺傳距離，並利用聚類分析法 (neighbor-joining, NJ) 進行親緣關係樹重建，再以 Bootstrap 進行 1000 次重排，分析此親緣關係之可信度 (Felsenstein, 1985)。

利用 DnaSP vs. 5.0 (Librado and Rozas, 2009) 套裝軟體進行分析，計算族群內與族群間的遺傳歧異度，以單型多樣性 (haplotype diversity,  $h$ ) (Nei and Tajima, 1983) 和核苷酸歧異度 (nucleotide diversity,  $\pi$ ) (Jukes and Cantor, 1969) 來量化族群的傳變異度。

### 第三節 結果

本研究利用 PCR 增幅粒線體 DNA 完整細胞色素 b (cytochrome *b*) 等 4 個基因，某些個體可能因年代久遠或保存方式不當，暫時無法獲得清晰之序列，個別基因片段之結果敘述如下。

#### 1. *cytB* 基因

我們在櫻鱒 33 個樣本中得到了 11 個單型 (haplotype, H)，基因片段長度為 1112 鹼基對，平均單型歧異度 ( $h$ ) 為 0.790，顯示櫻鱒複合種群依然維持較高的遺傳多樣性，核苷酸歧異度 ( $\theta$ ) 以台灣 2011 年族群 (TF) 為最低 (0.00039)，日本 2000 年族群 (JM) 為最高 (0.00196)，各族群  $\theta$  的平均值為 0.00313 (表 2-3)。以 NJ 法構築的親緣關係樹形圖 (圖 2-1) 顯示某些日本個體形成單獨支系，其他日本個體則和台灣所有個體 (野生和人工育種) 混雜，不過可以看出台灣的樣本有 2 個單型，而中國是親緣較遠的支系，分群不明顯可能是因為 DNA 變異太少所致。

表 2-3. *cytB* 基因序列單型、單型歧異度及核苷酸歧異度

族群	樣本數 (N)	單型 (H)	單型歧異度 ( $h$ )	核苷酸歧異度 ( $\theta$ )
台灣 (野生 W)	4	3	0.750	0.00060
(野生 TF)	6	2	0.533	0.00039
(人工育種 EF)	7	3	0.429	0.00070
日本北海道 (JM)	4	4	1.000	0.00196
(JH)	11	6	0.8731	0.00184
中國東北 (M)	1	1		
全部	33	11	0.790	0.00313

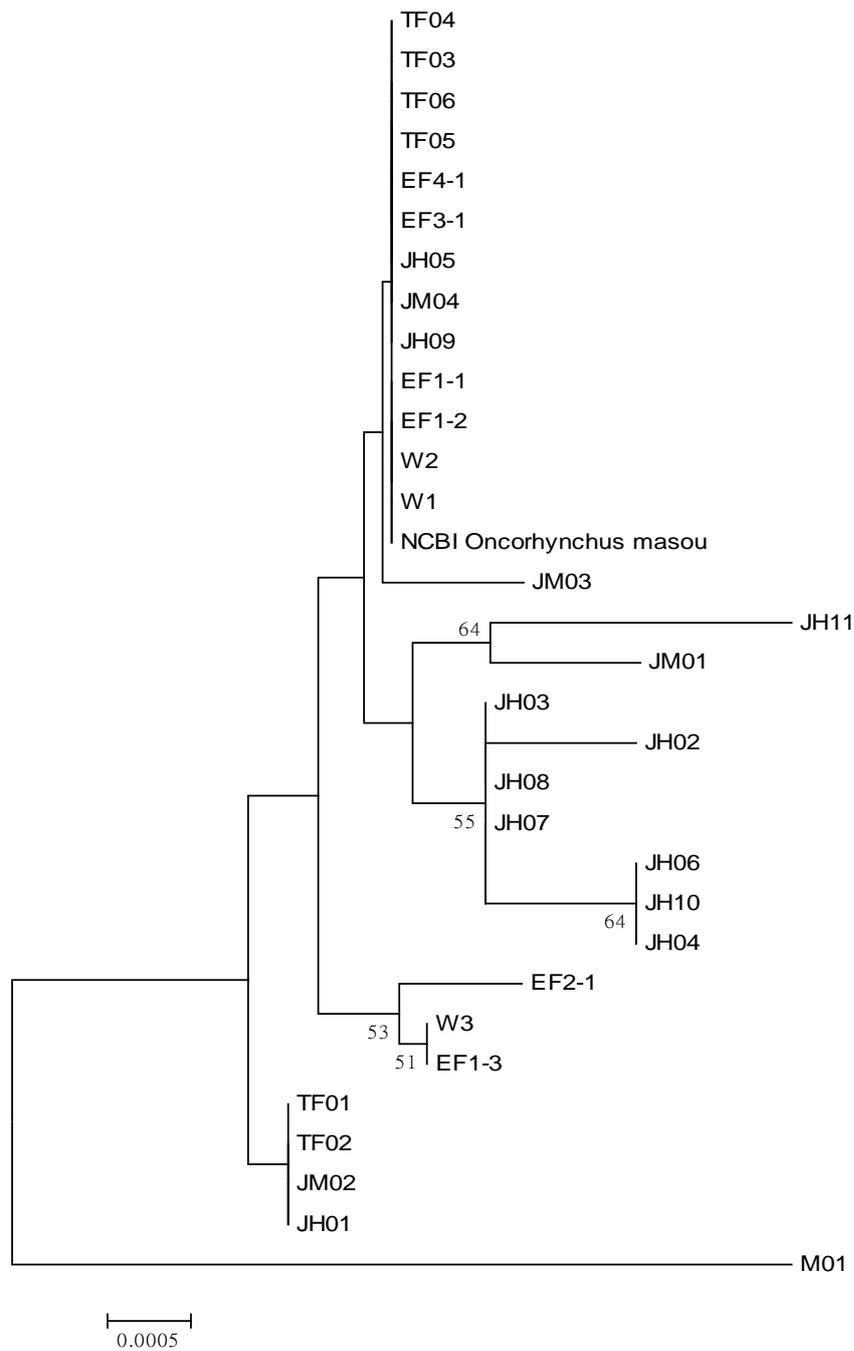


圖 2-1. 以 *cytB* 基因序列所架構之 NJ 親緣關係樹狀圖

## 2. COI 基因

在 COI 基因片段，基因序列長度為 672 鹼基對，櫻鱒 14 個樣本中得到了 9 個單型 (haplotype)，因 JH 和 TF 族群的序列有問題未納入分析，不過可看出

日本與台灣已有差異，台灣樣本可獨自成群，顯現台灣族群自日本衍生的親緣地理連結（圖 2-1）。平均單型多樣性 ( $h$ ) 為 0.949，顯示櫻鱒複合種群此基因片段的遺傳多樣性相當高，核苷酸歧異值 ( $\theta$ ) 以台灣 2011 年族群 (TF) 為最低 ( $0.00039 \pm 0.00039$ )，日本 2000 年族群 (JM) 為最高 ( $0.00196 \pm 0.00134$ )，各族群的平均值為  $0.00313 \pm 0.00123$  (表 2-4)。

表 2-4. COI 基因序列單型、單型歧異度及核苷酸歧異度

族群	樣本數 (N)	單型 (H)	單型歧異度 ( $h$ )	核苷酸歧異度 ( $\theta$ )
台灣 (野生 W)	3	2	0.667	0.01395
(人工育種 EF)	6	4	0.867	0.00716
日本北海道 (JM)	4	3	0.833	0.01912
中國東北 (M)	1	1		
全部	14	9	0.949	0.01967

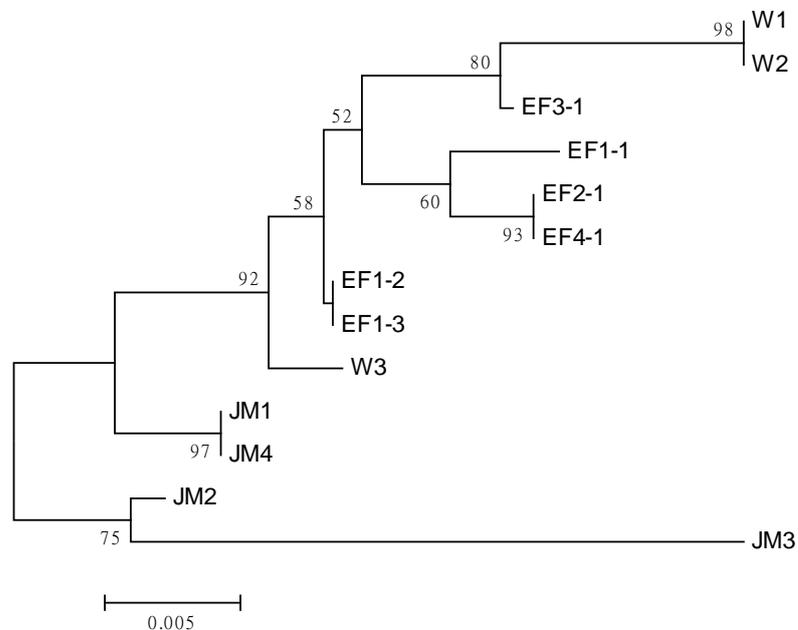


圖 2-2. 以 COI 基因序列所架構之 NJ 親緣關係樹狀圖

### 3. VTG 基因

VTG 之基因序列長度為 870 鹼基對，在 27 個可供分析的樣本中得到了 26 個單型 (haplotype)，換言之幾乎每個個體都是獨立的單型，具有頗高的變異，只有少數台灣個體(EF2-1, EF3-1, EF4-1 和 W1, W3) 與其他個體分隔另成為一支，建構出與其他三個基因片段不一樣的樹型圖 (圖 2-3)，有可能是天擇或是群族分化(genetic bottleneck)的結果。不過因為 DNA 變異量太高，亦有可能是不同基因，雖然 NCBI BLAST 結果亦為卵黃前質素基因無誤，但也有可能同樣是卵黃前質素基因家族另一相似的基因。整體單型多樣性平均值 ( $h$ ) 為 0.962，核苷酸歧異度平均值 ( ) 為 0.04954 (表 2-5)。

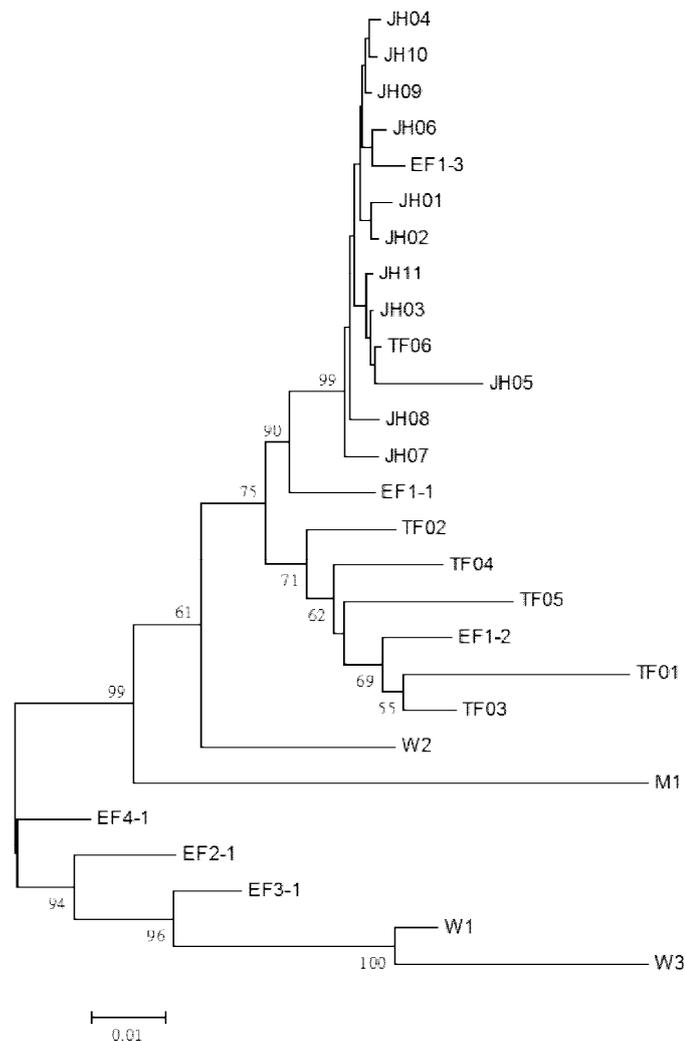


圖 2-3. 以 VTG 基因序列所架構之 NJ 親緣關係樹狀圖

表 2-5. VTG 基因序列單型、單型歧異度及核苷酸歧異度

族群	樣本數 (N)	單型 (H)	單型歧異度 ( $h$ )	核苷酸歧異 度( $\theta$ )
台灣 (野生 W)	3	3	1.000	0.08723
(野生 TF)	6	6	1.000	0.04364
(人工育種 EF)	6	6	1.000	0.05245
日本北海道 (JH)	11	10	0.909	0.01504
中國東北 (M)	1	1		
全部	27	26	0.962	0.04954

## 4. RAG1 基因

RAG1 之基因序列長度為 1486 鹼基對，在 26 個可供分析的樣本中得到了 13 個單型，整體單型多樣性平均值 ( $h$ ) 為 0.840，核苷酸歧異度平均值 ( ) 為 0.00498 (表 2-6)。可能是因為 DNA 變異偏少，以致分群不明顯，不過可以觀察到，日本族群可獨自成群，而台灣則是野生和人工育種混雜，不過人工育種所有個體間並無差異，所以 RAG1 基因歧異度日本族群當然也大於台灣族群野生和人工育種(無變異)，中國樣本亦是呈現親緣較遠的支系 (圖 2-4)。

表 2-6. RAG1 基因序列單型、單型歧異度及核苷酸歧異度

族群	樣本數 (N)	單型 (H)	單型歧異度 ( $h$ )	核苷酸歧異 度( $\theta$ )
台灣 (野生 W)	3	3	1.000	0.00452
(野生 TF)	6	2	0.533	0.00030
(人工育種 EF)	5	1	0.000	0.00000
日本北海道 (JH)	11	8	0.891	0.00185
中國東北 (M)	1	1		
全部	26	13	0.840	0.00498

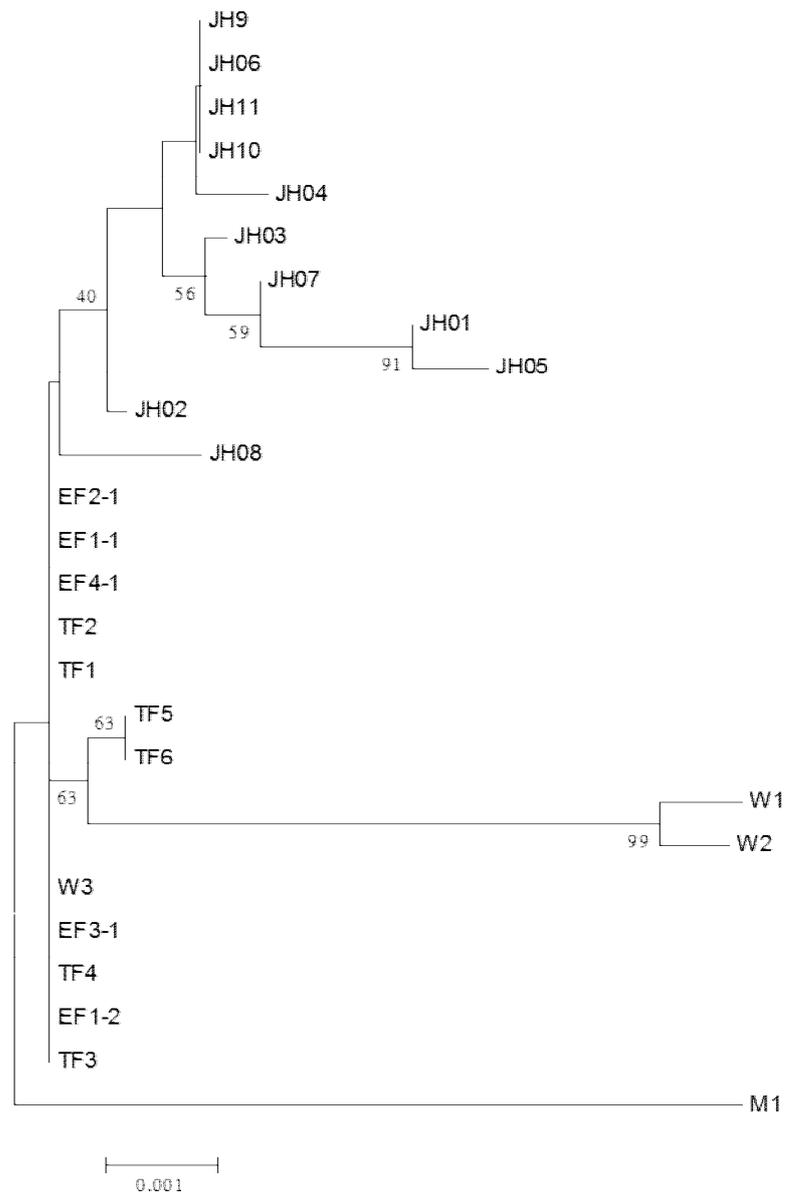


圖 2-4. 以 RAG1 基因序列所架構之 NJ 親緣關係樹狀圖

### 第三章 臺灣鏟頰魚體內卵黃前質素之測定

#### 第一節 前言

臺灣櫻花鉤吻鮭目前分布僅侷限於雪霸國家公園內大甲溪上游武陵地區，此區在日治時期日人曾試植落葉果樹，為全臺最早種植蘋果、水梨、水蜜桃的地區。國民政府來台之後，為安置退伍榮民，並發展對國家外匯有益及平地無法生產的農作物指示下，選擇發展溫帶落葉果樹，並從事蔬菜種植，奠定日後農業發展基礎。武陵地區目前之觀光與農耕活動，增加了許多人為的污染產生，其污染大多是因降雨沖刷所造成之表面逕流，使得污染物快速且大量進入水體，進而影響溪流水體品質（Chang et al., 2010）。

外因性內分泌干擾物（endocrine disrupting chemicals，簡稱：EDCs）又稱為環境荷爾蒙（environmental hormone），係指會干擾負責維持生物體內恆定、生殖、發育或行為的內生荷爾蒙之外來物質，是備受關注的環境污染物之一（Huang et al., 2004; Mendes, 2002）。環境中常見的 DEC 包括殺蟲劑（如 DDT）、工業用化合物（如 PCBs 與烷基酚類）、溴化阻燃劑（如多溴聯苯）、燃燒或化學品製程之副產物（如戴奧辛物質）等種類繁多（Soto and Fernandez, 1997）。當這類污染物質經由不同途徑進入到環境，勢必會對環境生物造成影響。相關的 EDCs 研究主要以雌性激素干擾類群、雄性激素干擾類群及甲狀腺素干擾類群化學物質為主，在不同類別之中又以雌激素干擾類群化學物質對環境生物造成的危害最為嚴重，研究也相對的較多（Sole et al., 2001）。特別是類雌性素對水中的生物影響，更是近年來重視的方向。當此類物質由食物鏈進入到魚體內，經生物累積作用

（bioaccumulation），會破壞生物體內正常荷爾蒙的平衡狀態，並造成個體生殖及發育之異常現象（陳健民，2007）。雙酚 A（bisphenol A, BPA）、壬基苯酚（nonylphenol, NP）為水體中常被討論的類雌性素（xenoestrogen）之環境荷爾蒙。丁與吳（2000）研究指出雙酚 A 及壬基酚會使雄性魚類精子數目降低，導

致雄性個體喪失繁衍能力。除了雙酚 A 及壬基酚外，近 80 種環境荷爾蒙中，農藥就占了將近 40 種 (JEA, 1998)。依目前的研究顯示許多農藥會影響生物體的生殖內分泌系統、胚胎發生及甲狀腺等 (Hayes & Laws, 1990)。農藥對內分泌的影響以 DDT、DDE 等有機氯農藥最為著名。二次大戰前後，美國大量使用 DDT 導致美國的金鷹蛋殼變薄 (Colborn, 1995, 2002)。1980 年美國佛羅里達州 Apopka 湖泊附近化學工廠化學物質外洩，使得農藥 Kelthane (主要成分為 dicofol 及 DDT) 洩漏出去，多年後水體中雖然已無法測出 dicofol 及 DDT 等環境污染物質，但是，在水生食物鏈最高階層的鱷魚，仍然可測相當濃度的 dicofol 及 DDT，也因此造成該地區鱷魚生殖器短小及精液品質下降等生殖的問題，也使得此區鱷魚數量急遽下降 (李美慧, 2006)。另一個受人矚目的有機氯殺蟲劑為 DDE，DDE 是 DDT 主要代謝產物，它主要影響生殖機能發育過程，干擾了生殖荷爾蒙的作用，美國佛羅里達州 Apopka 湖就曾發現因 DDE 所造成非雄非雌的紅耳龜，也因此使得該地紅耳龜數量下降 (Huang et al., 2006)。經研究後發現 DDT、DDE 有類似雌性素 (estradiol) 的功能，嚴重影響魚類、爬蟲類、鳥類及哺乳類生殖週期 (annual reproductive cycle)、生殖系統發育與生殖系統腫瘤的發生，並干擾雄性生殖系統發育或精子品質下降 (Celius and Walther, 1998; Huang et al., 2010)。除有機氯類農藥外，有機磷類農藥及其他非有機類殺蟲劑目前廣範使用於農作物及水產養殖業，但是這類化合物在環境中大量使用，也對生物造成了不少的影響，例如三丁基錫 (Tributyltin: TBT) 等有機錫化合物，其多為船底處理劑，主要防止藻類及附着性生物附着生存，當低濃度 TBT 慢慢的釋出至海洋中，即開始對海洋生物造成毒害，首先發現 TBT 會抑制牡蠣 (*Crassostrea gigas*)、海藻、食用貽貝 (*Mytilus edulis*) 及蝦的生長，接著發現 TBT 會造成沿海軟體動物雌性雄化現象 (Jorgensen, 2010)。Gibbs (1988) 等人更指出 0.5ng/L 的 TBT 會誘導軟體動物產生覆蓋性轉變 (Imposex) 造成雌雄同體，此現象對雌體是一種不可逆的反應，

將造成無法產卵、個體減少，最後造成物種的滅絕。目前世界各國大多禁用有機氯殺蟲劑，但由於有機氯殺蟲劑不易分解，所以經過數十年後，在環境介質中之河川底泥、魚體及貝類仍可檢測出其會影響生物健康的殘存量 (Al-Ahmad et al., 1999; Galindo et al., 1999)。

許多人類疾病都可藉由血液臨床化學檢定方法測知；而研究動物學的學者早已應用此技術在魚病及其他動物疾病的偵測，但最近十年才利用此技術作為污染生物指標的依據。Miller (1983) 曾經建立虹鱚血液的生化物質及酵素的正常範圍做為毒害之判定；Torre (2000) 測定鯉魚 (*Cyprinus Carpio*) 幼苗血液中 ATPase、GOT (glutamate oxalacetate)、GPT (glutamate pyruvate) 及 AchE (acetylcholinesterase) 濃度，用此來評估鯉魚 (*Cyprinus Carpio*) 幼苗對鎘的慢性毒害。其他血液生化值如血液中葡萄糖 (glucose)、乳糖 (lactate)、脂質 (lipid)、脂肪酸 (fatty acid) 及膽固醇 (cholesterol) 濃度改變，也時常做為毒害判定之指標 (楊, 1995; 楊, 2003)；利用 GOT 及 GPT 來觀察甲殼類肝胰臟及脊椎動物肝臟受損的情況 (Galindo et al., 2000)。另一方面，毒物也常直接作用於生物體內的特定酵素或受到生物體內酵素轉換、代謝。

毒性物質對生物影響有時會造成生殖狀態或表現的改變，這種變化亦可用來討論物質對其族群及生態環境的影響。毒性物質造成生物體毒性的影響我們可以分成生理生化、個體表現兩個不同層次來討論。生理生化層次大多利用動物體受毒性物質影響後生理荷爾蒙 (雄性素及雌性素) 及其相關產物 (卵黃前質素) 的改變來探討。卵黃前質素 (vitellogenin, VTG) 是形成卵黃蛋白 (vitellin) 的前驅物，一般而言只有雌魚在繁殖時期體內才會產生。一旦水體環境中含有 1ng/L 的類雌性素，雄性魚體或是未成熟的仔魚就會誘發 VTG 的生成 (Purdom et al., 1994)。因此，VTG 為目前研究水體中是否存在類雌性素物質環境荷爾蒙的重要

生理指標 (Huang and Sedlak, 2001; Lange et al., 2012)。而鮭科 (Salmonid) 與鯉科 (Cyprinid) 的魚類則為常見的實驗指標性生物 (Lange et al., 2012)。

化學物質與生物體接觸並進入生物體內的過程稱之為曝露，其途徑可藉由吸入、食入或皮膚接觸進入生物體，而這些化學物質則會經由不同的生理作用、血液或淋巴系統輸送到不同部位 (Jorgensen, 2010; Klaassen, 2001)。而汙染物會因其本身的特性及生物體組織的功能性不同，使得汙染物分布不均且排除體外的時間不同，如脂溶性高的汙染物容易累積於脂肪含量較高的部位，而水溶性的汙染物較脂溶性汙染物能快速排出體外。生物體排除這些進入到體內的汙染物的方式有兩種，其一為排泄；另一為生物轉化作用，而生物轉化作用是生物體內主要的解毒機制。生物轉化通常藉由體內許多不同的酵素來完成體內的代謝作用，並將有毒物質排除體外，這代謝過程主要可以分為 phase I 與 phase II 兩個階段。其生化指標 phase I 其主要作用的酵素為單氧酶 (monooxygenase) 系統，又稱為細胞色素 P450 (cytochrome P450)，位於甲殼動物的肝胰臟細胞中 (Adams and Greeley, 2000; Dodson et al., 1995)，當有毒物質經由單氧酶系統一連串的氧化、還原與水解的反應後，改變其有毒物質的官能基，增加其親水性，以利排出體外；phase II 方面，麩胱苷肽硫基轉移酶 (glutathione-S-transferases) 為參與進行解毒反應 phase II 中不可或缺的重要反應酵素，可使有毒物質轉變為較不具活性並且使之增加親水性來有利於有毒物質的排除。因此偵測生物體內藥物代謝酵素之活性，可用來判斷此生物體是否遭受汙染，是一種相當靈敏及可靠的生物性指標 (Ezemonye and Tongo, 2010)。

細胞色素 P450 為生物體代謝外來物質或內生性物質的主要酵素群，屬於 phase I 的解毒作用，這些物質包含藥物、環境汙染物、類固醇、維他命等。在人體中，monooxygenase 酵素存在各個器官，如腎、肺、腦、性腺及皮膚等，但大部分酵素主要還是位於肝臟 (Klaassen, 2001)。此外，相關研究也指出

monooxygenase 系統已在內源性或外源性化學物質的生物轉化過程中扮演極為重要的角色 (Dahamna et al., 2004)。一般可誘導細胞色素 P450 產生的物質共分為四大類，第一類代表物為苯巴比妥 (phenobarbital)，誘導細胞色素 P450 中的 2B1/2；第二類代表物為多環芳香烴及其衍生物 3-methylcholanthrene，誘導細胞色素 P450 中的 P4501A1；第三類代表物為乙醇 (ethanol)，誘導細胞色素 P450 中的 P4502E1；第四類代表物為 pregnenolone 16 -carbonitrile，誘導細胞色素 P450 中的 P4503A1 (Kitamura et al., 2008; Marsili et al., 2009)。上述這些物質有些則具有仿雌激素效應的特性，因此隨著這些進入生物體的汙染物質增加時，生物體的細胞相對也會產生更多的酵素加速其解毒作用，並將毒性降到最低，而此增加的現象則稱為誘發作用 (induction)，主要是經由單氧酶系統將有毒物質氧化、還原與水解後，改變其官能基，產生較水溶性化合物以利排出體外。因此在接觸到有毒物質時 phase I 單氧酶 (Mon) 酵素系統活性就會有升高的趨勢 (Liska, 1998)。

phase II 方面，又稱為結合反應，巯胱甘肽硫基轉移酶 (glutathione-S-transferases, GST) 為參與進行解毒反應 phase II 中不可或缺的重要反應酵素。GST 家族是細胞中重要的解毒、抗氧化及抗壓酵素 (Vaglio and Landriscina, 1999)，屬於 Phase-II 的解毒作用。近年來的相關研究提議，由於 GST 存在各種生物體如動物、植物、微生物等體內，且當受到外來物質影響時即會受到誘發，並能對細胞的氧化具有保護的作用，因此可作為監測環境汙染物對生物的影響之指標酵素 (Fausch et al., 1990; Jorgensen, 2010)。而 phase I 的解毒作用中所產生的自由基將會經由 GST 的催化並與解毒中最重要元素巯胱甘肽 (glutathione; GSH) 共軛結合，使其變為親水性的產物並藉由尿液、膽汁或糞便而排出體外 (Clapper and Szarka, 1998)。GSH 為解毒作用中重要的元素，可合成如巯胱甘胺酸過氧化酶 (glutathione peroxidase) 這類具有抗氧化的解毒性酵素。

當有外來物質進入到生物體時，GSH 則會大量的消耗並進行解毒作用 (Clapper and Szarka, 1998)。因此生物體的細胞存亡與否則與 GSH 的動態平衡息息相關 (Radwan et al., 1992)。因此，類雌激素接觸到生物體後，在生物體排除有毒物質時，就可看到 phase II 酵素系統活性上升的情況。

## 第二節 材料與方法

臺灣鏟頰魚，目前正式學名為臺灣白甲魚 (*Onychostoma barbatulus*) 在分類地位上屬於硬骨魚綱 (Osteichthyes)、鯉形目 (Cypriniformes)、鯉科 (Cobitidae)、鮠亞科 (Barbinae)、白甲魚屬 (*Onychostoma*) 魚類。臺灣鏟頰魚，1908 年由 Pellegrin 所命名，俗名為苦花、鮠魚、苦俛、齊頭俛。本種分佈於中國大陸與台灣，中國大陸主要分佈於長江以南至珠江以北各水系，台灣則屬於泛島性分佈，台灣西部以高屏溪以北各水系，東部則以太麻里溪以北各水系均有分佈 (沈, 1993; Tzeng, 1986; 樂, 2000)，喜歡棲息在低水溫 (攝氏 20 度以下) 的中下水層地區，在七家灣溪有大的族群分布。

為瞭解人為活動是否產生類雌性素之環境荷爾蒙類汙染物質，本研究於雪霸國家公園範圍內之七家灣溪 (觀魚台上游處，N24 22.825 E121 18.577)、高山溪 (高山溪下游處，N24 21.470 E121 18.557)、有勝溪 (有勝溪下游處，N24 20.841 E121 18.620) 及保護區外之伊卡丸溪 (N24 19.423 E121 17.000) 進行臺灣鏟頰魚採集 (圖 3-1)。將採集獲得之魚體解剖取其肝臟進行進行 monooxygenase (Mon)、glutathione-S-transferase (GST) 及卵黃前質素 (VTG) 之測定。另一方面，為瞭解水體遭受環境荷爾蒙的汙染程度，本研究亦於實驗室內進行臺灣鏟頰魚不同濃度雌激素的曝露試驗，並由此曝露試驗結果比較野外採集臺灣鏟頰魚受類雌性素之環境荷爾蒙類汙染物質影響之狀態。除此之外，為記錄當時水體狀態同時採集水樣進行水體中溶氧量 (DO)、酸鹼值 (pH)、生化需氧量 (BOD)、

總懸浮固體 (TSS)、葉綠素 a、濁度 (Trubility)、氨態氮 ( $\text{NH}_4^+$ )、亞硝酸態氮 ( $\text{NO}_2^-$ )、硝酸態氮 ( $\text{NO}_3^-$ ) 及正磷酸鹽 ( $\text{PO}_4^+$ ) 分析。

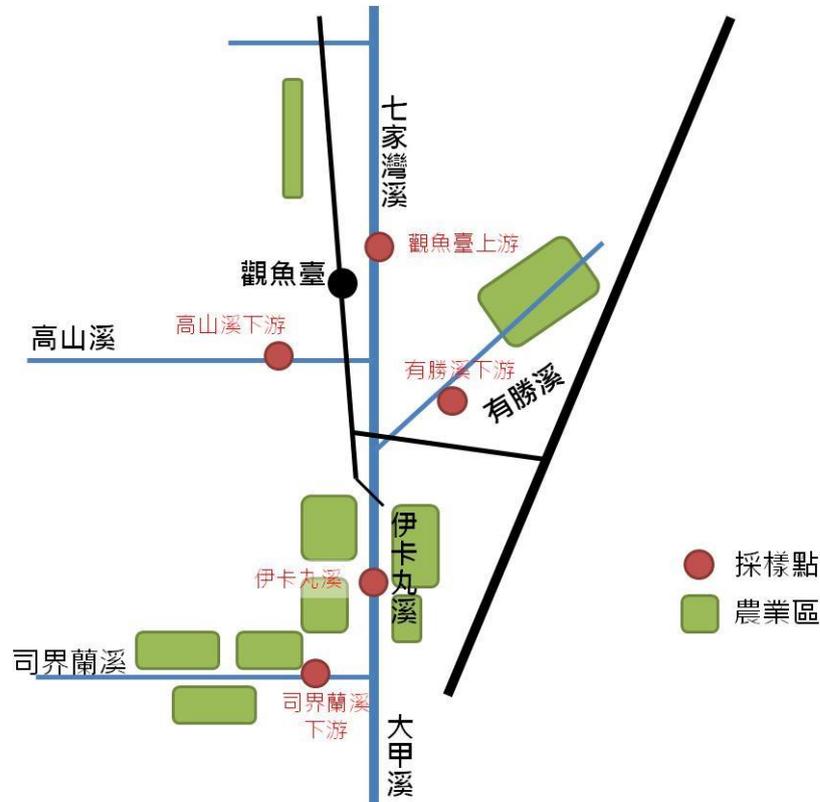


圖 3-1. 臺灣鏟頰魚及水質採集樣點

### 一、臺灣鏟頰魚體內 monooxygenase (Mon)、glutathione-S-transferase (GST) 及卵黃前質素 (VTG) 之測定

1. 試驗前處理：實驗之容器均依環檢所（行政院環境保護署環境檢驗所，2013）『水樣急毒性檢測方法中之玻璃器血清洗法』清洗。臺灣鏟頰魚記錄體長、重量等形質後，解剖魚體取出肝臟，加入 0.5ml Teis-HCl buffer (Sigma, USA) 及 5 l EDTA (Sigma, USA) 於 4°C 下均質。均質液於 4°C，10,000 rpm 下離心 10 分鐘。離心後上清液保存於 -20°C 等待後續卵黃前質素 (VTG) 濃度及 monooxygenase (Mon)、glutathione-S-transferase (GST) 活性分析 (Gagne et al., 2001; Gange and Blaise, 2000)。

2. 卵黃前質素 (VTG): 為瞭解臺灣鏟頰魚是否接觸類雌性素之污染物質, VTG 分析僅進行雄性及未成熟個體 VTG 之分析。萃取液中 VTG 主要利用 Alkali-labile phosphates (ALP) 分析法進行分析 (Gagne and Blaise, 2004)。分析步驟如下: 取血淋巴液 500ul 加入 t-Butyl Methyl Ether 500 l 在室溫下等待 30 分鐘後於 4°C 10,000rpm 下離心 10 分鐘。離心後取出上清液 325ul, 加入 100ul 2M NaOH, 加熱 37°C 60 分鐘, 加熱完成後取出下清液進行分析。為確實計算血淋巴液中 VTG 含量 ALP 所得數值需再進行總蛋白含量分析以校正。總蛋白測定以 SIGMA 出品的蛋白質測試劑 (Cat NO.610-A) 測定。VTG 濃度 (ug/mg) = ALP (ug/ml) 濃度 / 總蛋白濃度 (mg/ml)。

3. Mon (monooxygenase) 活性分析: 2 l 組織液加入 80 l 0.625 M potassium phosphate buffer, 再加入 200 l 反應藥劑 (以 1:3 的比例混和 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine 與 0.25 M sodium acetate buffer pH5.0), 最後加入 25ul 3% Hydrogen Peroxide, 在室溫下反應 30 分鐘後以波長 650nm 下測定每分鐘吸光值之變化 (Brogdon and Barber, 1987, 1990; Brogdon et al., 1997)。

4. GST (glutathione-S-transferase) 活性分析: 10 l 組織液加入 200 l 10Mm glutathione 與 63 Mm chlorodinitrobenzene 20:1 混合而成之藥劑, 在室溫下等待 10 分鐘後波長 340nm 下測定每分鐘吸光值之變化 (Brogdon and Barber, 1987, 1990; Brogdon et al., 1997)。

5. 統計方法: monooxygenase、glutathione-S-transferase 及 Vitellogenin 等之分析經重量校正後以 one-way ANOVA 進行各區域間的比較, 分析後有顯著差異者 ( $p < 0.05$ ) 再以 Duncan 比較各組間的差異。

## 二、臺灣鏟頰魚不同濃度雌激素的曝露試驗

本實驗是利用曝露試驗建立 VTG 與雌性激素的劑量反應關係。將雄性或未成熟之臺灣鏟頰魚自野外取回後，放入直徑 100 公分、高 120 公分、體積約 200 公升的 FRP 材質圓桶內馴養，馴養期間溶氧維持在 5 mg/L 以上，水溫與曝露試驗溫度一致，為  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照時間維持在每天 12 小時（光照：黑暗 = 12hr：12hr），以水循環過濾裝置維護水質，每天餵食市售飼料。馴養 14 天後選擇體形相似的個體進行靜置曝露試驗，試驗期間採用 48 小時間隔換水方式，以控制試驗過程試藥濃度。

試驗分成處理組 1 組（10ng 17 -estradiol/L 組），對照組 1 組（Control 組），共 2 組。所有實驗均於溫度  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照週期 12 小時（光照：黑暗 = 12hr：12hr）的恆溫室中進行。試驗過程中，臺灣鏟頰魚曝露於 0（Control 組）及 10ng/L 的雌二醇（17 -estradiol）中，經 10 天後進行魚體肝臟之 monooxygenase（Mon）、glutathione-S-transferase（GST）及卵黃前質素（VTG）之測定。其中對照組中只添加 acetone。

## 三、水質調查

水質檢測依據環境檢驗所之水質檢測方法總則（環檢所，2005）及河川、湖泊及水庫水質採樣通則（環檢所，2004）進行，將樣區水樣採回後做進一步的水質檢測分析，其檢測項目包含溫度（Temperature）、溶氧量（DO, dissolved oxygen）、酸鹼度（pH）、濁度（行政院環境保護署環境檢驗所，2005b）、總懸浮固體（TSS, total suspended solids）（行政院環境保護署環境檢驗所，2006b）、生化需氧量（BOD；Biochemical Oxygen Demand）（行政院環境保護署環境檢驗所，2011）、葉綠素 a（Cha, chlorophyll a）（行政院環境保護署環境檢驗所，2006a）等水質重要指標。

此外為有效了解水質與人為擾動的關係，亦針對水中氨氮 ( $\text{NH}_4^+$ ) (行政院環境保護署環境檢驗所, 2005a) 及正磷酸鹽 ( $\text{PO}_4^+$ ) (行政院環境保護署環境檢驗所, 2010) 進行分析，各項檢測採樣與檢驗方式將依實際狀況進行調整。

### 第三節 結果

本次調查於 2015 年 6 月 4 日至 5 日及 2015 年 9 月 20 日至 21 日於有勝溪、七家灣溪、高山溪及伊卡丸溪應用長沉籠及電器捕抓法進行臺灣鏟頰魚捕捉。兩次調查共捕獲 53 隻臺灣鏟頰魚，其中以有勝溪捕獲最多 (27 隻)。捕獲臺灣鏟頰魚公母比為 25:28，體長平均為  $95.4 \pm 33.5 \text{mm}$ ，體重平均為  $23.1 \pm 21.5 \text{g}$  (表 3-1)。捕獲臺灣鏟頰魚體長及體重值中均以七家灣溪最高，次之高山溪，有勝溪及伊卡丸溪最小 (one-way ANOVA, Duncan,  $p < 0.05$ )，其中各樣點中公母體長及體重並無顯著差異。

表 3-1. 各樣點捕獲之臺灣鏟頰魚體長及體重之變化

	體長			體重		
	Female (N)	Male (N)	總合 (N)	Female (N)	Male (N)	總合 (N)
七家灣溪	$143.7 \pm 12.2$ (6)	$125.9 \pm 12.6$ (6)	$134.8 \pm 15.1$ (12)	$61.94 \pm 14.9$ (6)	$36.37 \pm 10.9$ (6)	$49.15 \pm 18.2$ (12)
有勝溪	$83.3 \pm 35.2$ (17)	$67.6 \pm 14.7$ (10)	$77.5 \pm 29.9$ (27)	$16.2 \pm 18.8$ (17)	$6.8 \pm 5.9$ (10)	$12.7 \pm 15.8$ (27)
高山溪	$129.9 \pm 11.9$ (3)	$89.7 \pm 14.9$ (3)	$109.8 \pm 25.1$ (6)	$43.2 \pm 13.1$ (3)	$17.3 \pm 12.9$ (3)	$30.3 \pm 18.3$ (6)
伊卡丸溪	$86.86 \pm 2.6$ (2)	$86 \pm 4.8$ (6)	$86.2 \pm 4.1$ (8)	$13.2 \pm 1.7$ (2)	$13.1 \pm 2.5$ (6)	$13.1 \pm 2.2$ (8)
總合	$101.5 \pm 38.5$ (28)	$88.7 \pm 25.9$ (25)	$95.4 \pm 33.5$ (53)	$28.7 \pm 25.4$ (28)	$16.7 \pm 13.9$ (25)	$23.1 \pm 21.5$ (53)

N: 為捕獲樣品數

分析該次調查期間水質狀況，七家灣溪、有勝溪、高山溪及伊卡丸溪各項水質參數經 RPI (River Pollution Index) 計算後均屬於未受污染之河川，但是有勝溪及伊卡丸溪葉綠素 a 及 BOD 偏高，該情況可能與樣點水中含磷酸鹽、硝酸鹽

偏高有關(表 3-2)。此外，導電度的部分有勝溪及伊卡丸溪分別為 369 及 343 S/cm，兩處樣點均較七家灣溪及高山溪均有明顯的偏高情況。總結四處樣點水體變化顯示，有勝溪及伊卡丸溪水質參數中，葉綠素 a、BOD、磷酸鹽、硝酸鹽等與農業相關的水質參數均較另外兩樣點有偏高的情況，造成該情況的原因，是否與農業活動有關值得進一步注意。

表 3-2. 七家灣溪、有勝溪、高山溪及伊卡丸溪水質分析結果

水質因子	站名	七家灣溪	有勝溪	高山溪	伊卡丸溪
調查日期		2015/6/4	2015/6/4	2015/6/4	2015/10/3
水溫(°C)		18.5	24.5	19.4	15.6
DO (mg/L)		11.11	7.60	8.52	7.68
pH		7.98	8.32	7.98	7.92
導電度( S/cm)		183	369	185	343
BOD (mg/L)		0.64	0.95	0.10	1.12
TSS (mg/L)		ND	ND	5.0	2.3
葉綠素 a(mg/m <sup>3</sup> )		0.02	0.24	0.05	0.31
Trubidity (NTU)		12.30	24.23	14.34	31.43
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N(mg/L)		0.06	0.12	0.085	0.18
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)		0.004	0.005	0.004	0.005
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)		0.11	2.30	0.11	2.60
PO <sub>4</sub> (mg/L)		0.18	0.13	0.09	0.21
懸浮物		ND <1 mg/L			

卵黃前質素 (VTG) 為具有卵形成的雌性動物特有蛋白質，然而當雄性或幼生生物接觸至類雌性素污染物後亦會有 VTG 的誘發，為生物體接觸到類雌性素污染物的生物指標 (Chiu et al., 2014; Matozzo et al., 2008)。分析野外捕獲之臺灣鏟頰魚肝臟內公魚及仔魚肝臟中 VTG 顯示，伊卡丸溪中的臺灣鏟頰魚肝臟內 VTG 濃度最高 (2.12±0.66 g/g)，其次為有勝溪 (0.78±0.25 g/g) 及七家灣溪 (0.59±0.81 g/g) 所捕獲之樣本，高山溪中臺灣鏟頰魚肝臟內 VTG 濃度最低 (圖

3-2)。經結果顯示，伊卡丸溪中臺灣鏟頰魚肝臟 VTG 濃度較高，因此該區域存在類雌性素污染物質的濃度明顯高於其他樣點。

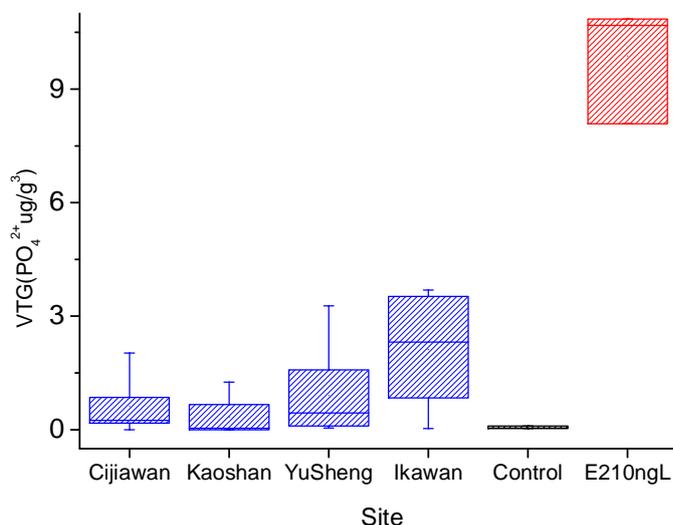


圖 3-2. 七家灣溪(Cijiawan)、有勝溪(YuSheng)、高山溪(Kaoshan)及伊卡丸溪(Ikawam)中，臺灣鏟頰魚公魚及仔魚肝臟中卵黃前質蛋白(vitellogenin)之濃度變化。控制組(Control)及雌性激素(E210ngL)為實驗室試驗進行 0 及 10ng/L 的雌性激素(17 $\beta$ -estradiol)經 10 天曝露分析之結果。盒鬚圖表示上下盒表示族群 25%及 75%之四分位數，中位數為平均值，上下為最小值及最大值。

Monooxygenase (Mon) 及 glutathione-S-transferase (GST) 為環境生物接觸到有機污染物及無機污染物的生理指標(Chiu et al., 2014; Ezemonye and Tongo, 2010; Venturino et al., 2003)。分析公魚及仔魚體內肝臟中 Mon 及 GST 均顯示有勝溪公魚及仔魚肝臟 Mon ( $4.16 \pm 1.08 \Delta A_{650}/30\text{min/g}$ ) 及 GST ( $1.58 \pm 1.13 \Delta A_{340}/20\text{min/g}$ ) 活性均呈現較高的狀況，伊卡丸溪 Mon ( $3.63 \pm 1.13 \Delta A_{650}/30\text{min/g}$ ) 及 GST ( $1.24 \pm 0.73 \Delta A_{340}/20\text{min/g}$ ) 活性次之，高山溪及七家灣溪則較為偏低，因此初步推測伊卡丸溪及有勝溪較七家灣溪及高山溪有較高的污染源(圖 3-3, 圖 3-4)。經臺灣鏟頰魚肝臟生理生化酵素 Mon 及 GST 活性分析顯示，有勝溪的污染狀態為四個樣點中最為明顯，其次為伊卡丸溪，高山溪及七家灣溪則為偏低的情況。

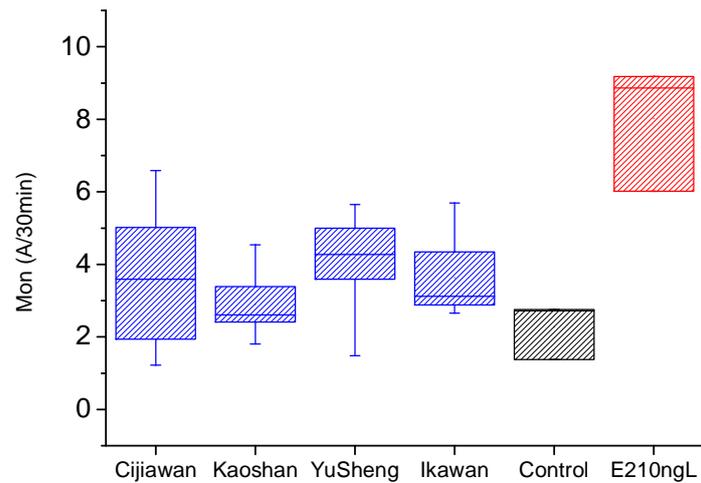


圖 3-3. 七家灣溪(Cijiawan)、有勝溪(YuSheng)、高山溪(Kaoshan)及伊卡萬溪(Ikawam)中，臺灣鏟頰魚公魚及仔魚肝臟中 monooxygenase(Mon)之活性變化。控制組(Control)及雌性激素(E210ngL)為實驗室試驗進行 0 及 10ng/L 的雌性激素 (17 $\beta$ -estradiol) 經 10 天曝露分析之結果。

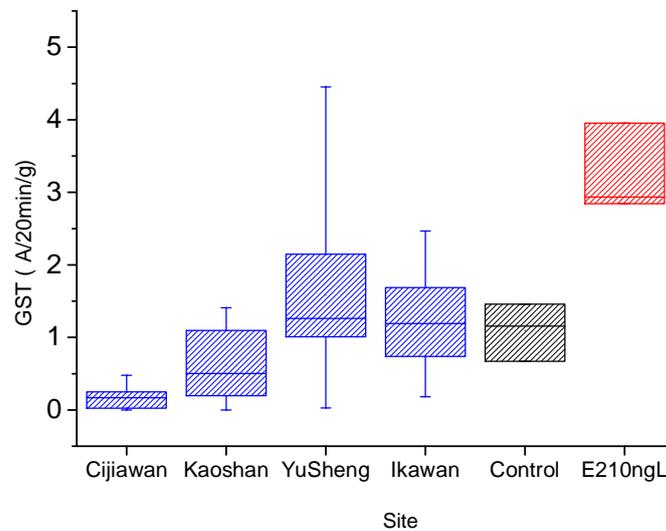


圖 3-4. 七家灣溪(Cijiawan)、有勝溪(YuSheng)、高山溪(Kaoshan)及伊卡九溪(Ikawam)中，臺灣鏟頰魚公魚及仔魚肝臟中 glutathione-S-transferase (GST)之活性變化。控制組(Control)及雌性激素(E210ngL)為實驗室試驗進行 0 及 10ng/L 的雌性激素 (17 $\beta$ -estradiol) 經 10 天曝露分析之結果。

分析實驗室內臺灣鏟頰魚曝露雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E2) 10 天後，肝臟 VTG 濃度。經分析結果顯示，濃度為 0 (Control) 及 10ng/L 之處理組 VTG 誘發濃度分別為  $0.06 \pm 0.02$  g/g 及  $9.87 \pm 0.89$  g/g。結果顯示，有勝溪與伊卡九溪中可

能有較高的類雌性素污染物質。目前 103 種環境荷爾蒙中，農業藥用藥中已經許多藥物被訂定為環境荷爾蒙的化學物質，如：DDT、靈丹 (lindane)、巴拉松 (parathion)、地特靈 (dieldrin)、飛佈達 (heptachlor)、加保利 (carbaryl)、得滅克 (aldicarb) 等 (陳, 2004)。其中，除蟲菊酯類 (邴等, 2009)、殺菌劑 (張等, 2013)、2,4 DDT (丁等, 2012) 及芬普尼 (fipronil) (Ohia *et al.*, 2004) 等農藥已被證明具有類雌性素影響之環境荷爾蒙。雪霸國家公園自民國 81 年成立後，於民國 86 年開使逐步將武陵路以東農業使用地區逐年收回造林，使得七家灣溪中游段所受到的農業衝擊也逐年減少 (表 3-3)。七家灣溪的農業衝擊逐年減少，但是在有勝溪及伊卡丸溪一帶，目前依然有農業活動在此進行。本計劃研究結果指出，沒有農業活動的高山溪及鮮少農業的七家灣溪中，水中的雌性素當量濃度均低於現今有農業活動的伊卡丸溪及有勝溪。其中特別是伊卡丸溪又特別明顯。

與歷年資料比較發現，導電度為民國 83 年記錄至今，較明顯變化的水質項目之一 (圖 3-5)。導電度代表水傳導電流能力，導電度與水中離子總濃度、移動性、價數、相對濃度及水溫等有關。通常導電度愈高，表示水中電解質含量較多。因此，水之導電度也常被用來評估水體是否遭受污染的指標，通常數值越高代表水質受污染程度物越高，通常蒸餾水導電度介於 0.5 至 3 S/cm，一般河川通常介於 50 至 1500 S/cm，其中 150 至 500 S/cm 為適合魚類生存的範圍。本研究調查七家灣溪上游、七家灣溪中游、有勝溪、高山溪及司界蘭溪下游五樣點之導電度均低於 500 S/cm 為適合魚類生存的範圍，顯示該樣點的水體狀態均適合魚類在此生存。五個樣點中又以高山溪、七家灣溪上游及七家灣溪中游水質狀況較佳，特別值得注意的是有勝溪及七家灣溪中游水中污染物有逐年遞減的情況，司界蘭溪下游污染物則有漸漸上升的趨勢。數據顯示，民國 86 年開始逐步將武陵路以東農業使用地區逐年收回後 (表 3-3)，七家灣溪中游段的水質污染已漸漸的減少。

特別的是有勝溪污染狀態也有漸減的情形，造成這種情況是否與有勝溪一帶逐年減少農業活動有關，值得進一步的追蹤。

表 3-3. 雪霸國家公園重要記事

時間	重要記事
民國 49 年代末期	林務局基於水土保持的目的，在德基水庫集水區內的大甲溪上游建構了許多高度達 4 公尺以上的攔沙壩。
民國 52 年 5 月 10 日	建制成立武陵榮民農場
民國 52 年～56 年	「開墾時期」，試種夏季高冷蔬菜，溫帶果樹
民國 56 年～70 年	「農業時期」，規劃完成了北谷蔬菜地，擴大農業生產面積
民國 58 年 11 月 1 日	更名「武陵農場」，以栽培溫帶果樹及種植高冷地蔬果為主
民國 70 年～87 年	「農業休閒轉型時期」，民國 75 年農場完成第一期轉型規劃，以推動觀光遊憩事業
民國 81 年 7 月 1 日	雪霸國家公園成立
民國 83 年	更成立臺灣櫻花鉤吻鮭保護區
民國 86 年	將武陵路以東農業使用地區逐年收回造林
民國 88 年至今	「轉型觀光發展時期」，推動第二期轉型計畫，使農場正式進入以觀光為主之轉型階段。
民國 88 至 90 年間	拆除了武陵地區高山溪的 4 座攔沙壩
民國 93 年 11 月	武陵遊客中心開放
民國 100 年 05 月	著手拆除七家灣溪一號攔砂壩
民國 102 年 07 月	蘇力颱風帶來洪水事件，臺灣櫻花鉤吻鮭族群數量僅剩 1,245 尾

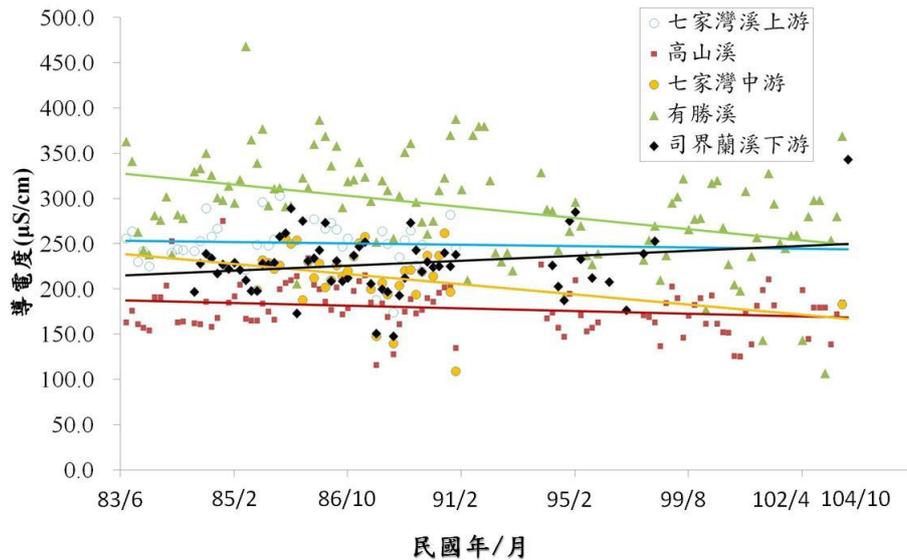


圖 3-5. 七家灣溪上游(藍線,  $P=0.77$ )、七家灣溪中游(黃線,  $P=0.067$ )、有勝溪(黃線,  $P<0.01$ )、高山溪(紅線,  $P=0.023$ )及司界蘭溪下游(黑線,  $P=0.073$ ), 導電度為 83 年至 104 年之變化。(水質資料來源: 雪霸國家公園)

根據研究顯示, 水中雌二醇 (17 -estradiol, E2) 在 5ng/L 時會造成雄性鯽魚 (*Carassius auratus*) 及鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 開始誘發 VTG, 水中 E2 到 16~20ng/L 後開始會影響青鱒及食蚊魚生殖行為異常及子代孵化數降低, E2 濃度至 30~40ng/L 後, 孔雀花鱒 (*Poecilia reticulata*) 及雜色鱒 (*Cyprinodon variegatus*) 開始會出現性腺萎縮及子代雌雄比改變的狀態(表 3-4)。本年度調查的結果顯示, 七家灣溪、有勝溪、高山溪及伊卡九溪臺灣鏟頰魚肝臟中 VTG 測定範圍為 0.001~3.689 g/g, 遠低於臺灣鏟頰魚曝露 10ng 17 -estradiol/L 在 10 天後所得之濃度 ( $9.87\pm 0.89$  g/g)。依據實驗室的結果推測, 七家灣溪、有勝溪、高山溪及伊卡九溪水中水體雌性素當量 (estradiol equivalent concentration, EEQ) 目前推測應低於 10ng/L, 對於該處生活的狀況應該不致於有太大的影響。

表 3-4. 水中雌二醇(17 $\beta$ -estradiol)對魚類的影響

種類	EC50 (ng/L)	Endpoint	Reference
<i>Poecilia reticulata</i> (孔雀魚)	30	GSI	(Nimrod and Benson, 1998)
<i>Oncorhynchus KETA</i> (鮭科, 大麻哈魚)	500	Sex differentiation	(Nakamura, 1984)
<i>Carassius carassius</i> (黑鯽)	30	Vtg induction	(Zhang et al., 2008b)
<i>Carassius auratus</i> (鯽魚)	5	Vtg induction	(Zhang et al., 2008a)
<i>Cyprinus carpio</i> (鯉魚)	100	Quality of milt	(Gimeno et al., 1998)
<i>Cyprinus carpio</i> (鯉魚)	5.45	Vtg in male	(Gimeno et al., 1998)
<i>Gobiocypris rarus</i> (鮡魚)	5	Vtg induction	(Liao et al., 2009)
<i>Gambusia holbrooki</i> (霍氏食蚊魚)	20	Sexual activity	(Doyle and Lim, 2002a)
<i>Oryzias javanicus</i> (爪哇青鱗)	16	Reproduction	(Imai et al., 2005)
<i>Oryzias latipes</i> (青鱗)	2.86	Vtg induction	(Doyle and Lim, 2002b)
<i>Cyprinodon variegatus</i> (雜色鱗)	40	Reproductive rate	(Cripe et al., 2009)

## 第四章 結論與建議

### 第一節 結論

1. 各基因片段所呈現之遺傳模式並不一致，一般來說，日本族群的遺傳歧異度大於台灣族群（包含野生及人工育種）的遺傳歧異度，中國地區則因樣本數較少，無法進行其他相關分析。
2. 兩個粒線體的基因片段，cytB 基因可能是因為 DNA 變異太少，以致分群不明顯。在 COI 基因片段，日本族群與台灣族群已有差異，台灣樣本可獨自成群。
3. 兩個細胞核片段的結果也不完全一致，卵黃前質素(VTG) 基因具有頗高的變異，可能是因為天擇或是基因漂變的結果，不過因為 DNA 變異量太高，亦有可能是卵黃前質素基因家族中的不同基因。RAG1 基因亦因是 DNA 變異偏少，以致分群不明顯。
4. 以 NJ 法所架構之 Unroot 親緣關係樹分析結果顯示台灣族群較為可能衍生自日本族群的親緣地理連結，而中國是親緣較遠的支系。
5. 經由水質及生理生化值結果顯示，高山溪為四樣點中污染物最少的樣點。
6. 針對 MON、GST 及導電度結果顯示，有勝溪及伊卡丸溪目前依然有污染源進入，其中亦包含類雌性素的環境荷爾蒙，需要持續進行長期追蹤。
7. 七家灣溪中，臺灣鏟頰魚雖然可以測到類雌性素的環境荷爾蒙，經導電度結果顯示水體中污染物濃度已逐年下降，但是仍然需要持續進行長期追蹤。

## 第二節 建議

1. 104年6月在七家灣溪所採集個體有3個基因片段呈現有遺傳差異，顯示在臺灣地區的野生族群中仍有少數遺傳變異，而人工育種的個體之遺傳歧異度則較低，建議可視當年族群量之大小，選擇較多的野生個體作為人工育種之親本，以增加放流個體之遺傳變異。
2. 在 Salmon DB 網站 (<http://salmondb.cmm.uchile.cl/>)，已有虹鱒(rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*)的公開 EST 資料庫可從中得到相當多筆的鮭魚相關基因，建議可做櫻花鉤吻鮭多基因的研究，因為從少數基因的獲得的訊息常有偏差，尤其是有相當生理功能的基因（如 VTG），如能以隨機方式選取較多的中性基因（20個或更多），或許可以獲得較為清楚的櫻花鉤吻鮭親緣結構，以利物種未來長期之保育管理。
3. 應持續長期監測水中雌性素污染物質。高山溪為四樣點中污染物最少的樣點，有勝溪及伊卡丸溪於今年調查已發現低濃度的類雌性素，為有效掌握櫻花鉤吻鮭及國家公園內水體狀態之變化，並於可能產生污染時即時控制，應持續進行長期追蹤水中雌性素污染物質。
4. 應持建立符合七家灣溪長期監測水中雌性素污染物質之標準方式。雌性素污染物質種類繁多，較難一一針對化學品進行逐一檢測，因此測定水體雌性素當量（estradiol equivalent concentration, EEQ）成為近年來水中類雌性素污染物質長期監測的重要方向。然而，水體雌性素當量（estradiol equivalent concentration, EEQ）檢測法種多樣，為進行長期追蹤水中雌性素污染物質，國家公園應選定一種長期監測水中雌性素污染物質之標準方式。

## 參考文獻

- Adams, S.M., Greeley, M.S. (2000) Ecotoxicological Indicators of Water Quality: Using Multi-response Indicators to Assess the Health of Aquatic Ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution* 123, 103-115.
- Al-Ahmad, A., F. D. Daschner, and K. Kummerer. 1999. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 158.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Barucca, M., A. Canapa, E. Olmo and F. Regoli. 2006. Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. *Environmental Research* 101, 68673
- Brogdon, W. G., Barber, A. M. 1987. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single- mosquito homogenates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 29, 252-259.
- Brogdon, W. G., Barber, A. M. 1990. Microplate assay of glutathione s-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 96, 339-342.
- Brogdon, W. G., McAllister, J. C., Vulule, J. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mpaquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase fro insectide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association* 13, 233-237.
- Celius, T., and B. T. Walther. 1998. Differential sensitivity of zonagenesis and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) to DDT pesticides. *Journal of Experimental Zoology*, 281 ( 4 ) , 346-353. Retrieved from <Go to ISI>://000074561500009
- Chiu, Y. W., Wu, J. P., Hsieh, T. C., Liang, S. H., Chen, C. M., Huang, D. J. 2014. Alterations of biochemical indicators in hepatopancreas of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*, from paddy fields in Taiwan. *Journal of Environmental Biology* 35, 667-673.
- Chang, C. L., Kuan, W. H., and P. S. Lui. 2010. Modeling

- watershed responses to typhoon events ó A case study of WuLin catchment in Taiwan. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 ( 4A ) , 658-663.
- Chen, S. Y., Y. H. Su, S. F. Wu, T. Sha and Y. P. Zhang. 2005. Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37, 804-814.
- Clapper, M. L., and C. E. Szarka. 1998. Glutathione S-transferases ô biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112 ( 0 ) , 377-388.
- Colborn, T. 1995. Environmental estrogens - health implications for humans and wildlife. *Environmental health perspectives* 103, 135-136.
- Colborn, T. 2002. Impact of endocrine disruptors on brain development and behavior - Preface. *Environmental Health Perspectives Supplements* 110, 335-335.
- Cripe, G., Hemmer, B., Goodman, L., Fournie, J., Raimondo, S., Vennari, J., Danner, R., Smith, K., Manfredonia, B., Kulaw, D., Hemmer, M. 2009. Multigenerational exposure of the estuarine sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) to 17 beta-estradiol. i. organism-level effects over three generations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2397-2408.
- Dahamna, S., Sekfali, N., Walker, C.H. 2004. Biochemical indicators of hepatotoxic effects of pesticides. . *Commun Agric Appl Biol Sci* 69, 821-828.
- Dodson, S. I., T. Hanazato, and P. R. Gorski. 1995. Behavioral-Responses of *Daphnia-Pulex* Exposed to Carbaryl and *Chaoborus* Kairomone. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 ( 1 ) , 43-50.
- Doyle, C., Lim, R. 2002a. The effect of 17 -estradiol on the gonopodial development and sexual activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2719-2724.
- Doyle, C., Lim, R. 2002b. Sexual behavior and impregnation success of adult male mosquitofish following exposure to 17 [beta]-estradiol. *Ecotoxicology and environmental safety* 61, 392-397.
- Edpalina, R. R., M. Yoon, S. Urawa, S. Kusuda, A. Urano and S. Abe. 2004. Genetic

- variation in wild and hatchery populations of Masu salmon (*Oncorhynchus masou*) inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. *Fish Genet Breed Sci* 34: 37644.
- Ezemonye, L., Tongo, I. 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere* 81, 214-217.
- Fausch, K. D., J. Lyons, J. R. Karr, and P. L. Angermeier. 1990. Fish communities as indicators of environmental degradation. *American Society Symposium*, 8, 123-144.
- Gagne, F., and C. Blaise. 1998. Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent in situ hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicology*. 44: 83-91.
- Gange, F., and C. Blaise. 2000. Organic alkali-labile phosphates in biological materials: a generic assay to detect vitellogenin in biological tissues. *Environmental Toxicology*. 15: 243-247.
- Gagne, F., and C. Blaise. 2004. Shell protein characteristics and vitellogenin-like proteins in brine shrimp *Artemia franciscana* exposed to municipal effluent and 20-hydroxyecdysone, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 138: 515-522.
- Gagne, F., C. Blaise, M. Salazar, S. Salazar, P. D. and Hansen. 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Ellipticomplanata*, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 128: 213-225.
- Galindo, R. J. G., V. U. Fossato, C. V. Lizarraga, and F. Dolci. 1999. Pesticides in water, sediments, and shrimp from a coastal lagoon off the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 837-841.
- Gibbs, P. E., P. L. Pascoe, and G. R. Burt. 1988. Sex change in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the*

- Marine Biological Association of the United Kingdom, 68, 715-731.
- Gimeno, S., Komen, H., Jobling, S., Sumpter, J., Bowmer, T. 1998. Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquatic Toxicology* 43, 93-109.
- Hansen, P.D., H. Dizel, B. Hock, A. Marx, J. Sherry, M. McMaster, and C. Blaise. 1998. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in analytical chemistry*. 17: 448-451.
- Hsu, T. H., Wang, Z. Y., Takata, K., Onozato, H., Hara, T. and Gwo, J. C. 2010. Use of microsatellite DNA and amplified fragment length polymorphism for Cherry salmon (*Oncorhynchus masou*) complex identification, *Aquaculture Research*, 41, pp e316-e325.
- Huang, C.H., and D. L. Sedlak. 2001. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 ( 1 ) , 133-139.
- Huang, D. J., H. C. Chen, J. P. Wu, and S.Y. Wang. 2006. Reproduction obstacles for the female green neon shrimp ( *Neocaridina denticulata* ) after exposure to chlordane and lindane. *Chemosphere*, 64, 11-16.
- Huang, D. J., Y. W. Chiu, C. M. Chen, K. H. Huang, and S. Y. Wang. 2010. Prevalence of malformed frogs in Kaoping and Tungkang River basins of southern Taiwan. *Journal of Environmental Biology*, 31, 335-341.
- Imai, S., Koyama, J., Fujii, K. 2005. Effects of 17 beta-estradiol on the reproduction of Java-medaka (*Oryzias javanicus*), a new test fish species. *Marine Pollution Bulletin* 51, 708-714.
- Jan, R. Q., L. C. Jaung, Y. S. Lin and K. H. Chang. 1990. A morphometric and meristic study of the landlocked salmon in Taiwan, in comparison with other members of the genus *Oncorhynchus* ( Salmonidae ). *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica* 29 ( 3, Supplement ) :41-59.
- JEA. 1998. Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors: Japan

Environment Agency.

- Jordan, D. S. and M. Ohima. 1919. Salmon formosanus, a new trout from the mountain streams of Formosa. *Proceedings of the National Academy of Science Philadelphia* 71, 122-124.
- Jorgensen, S. E. 2010. *Ecotoxicology*. CA: Elsevier.
- Kato, F. 1991. Morphological and ecological notes on large sized specimens of the amago, *Oncorhynchus ishikawai* and the yamame, *O. masou*. *Suisanzoshoku*, 39 (3) , 279-288.
- Kimura, S. 1990. On the type specimens of *Salmo macrostoma*, *Oncorhynchus ishikawae* and *O. rhodurud*. *Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica*, 29, pp 1616.
- Kijima, A. and D. Matsunami. 1992. Haplotypic differences and variability of mitochondrial DNA among cultured stocks of the masu salmon complex. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 143161436.
- Kitamura, S., K. Sugihara, S. Sanoh, N. Fujimoto, and S. Ohta. 2008. Metabolic Activation of Proestrogens in the Environment by Cytochrome P450 System. *Journal of Health Science*, 54 (4) , 343-355.
- Klaassen, C. D. 2001. *Casarett and Doull's Toxicology (6 ed.)*. New York: McGraw-Hill.
- Lange, A., Y. Katsu, S. Miyagawa, Y. Ogino, H. Urushitani, T. Kobayashi, and T. Iguchi. 2012. Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquatic Toxicology*, 109, 250-258.
- Liska, D.J. 1998. The detoxification enzyme systems. *Altern. Med. Rev.* 3: 187-198.
- Lee, H.B., and T. E. Peart. 1998. Residues and trace elements - determination of 17 $\beta$ -estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 81 (6) :1209-1216.
- Lin, Y. S., S. S. Tsao and K. H. Chang. 1990. Population and distribution of the

- Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) in Chichiawan stream. Bull. Inst. Zool. Academia Sinica 29(3, Supplement):73-85.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.
- Marsili, L., S. Casini, G. Mori, S. Ancora, N. Bianchi, A. D'Agostino, and M. C. Fossi. 2009. The Italian wall lizard (*Podarcis sicula*) as a bioindicator of oil field activity. Science of the Total Environment, 407 (11), 3597-3604.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C. 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. Environment International. 34: 531-545.
- Mendes, J.J.A. 2002. The endocrine disrupters: a major medical challenge. Food and Chemical Toxicology 40, 781-788.
- Miller, W.R., Hendricks, A.C., Cairns, J. 1983. Normal ranges for diagnostically important hematological and blood chemistry characteristics of rainbow trout (*Salmon gairdneri*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 40, 420-425.
- Moritz, C. 1994. Defining Evolutionarily Significant Units for conservation. Trends in Ecology and Evolution 9, 373-375.
- Moritz, C. 1999. Conservation units and translocations: Strategies for conserving evolutionary processes. Hereditas 130, 217-228.
- Nakabo, T. 2009. Zoogeography of Taiwanese Fishes, Korean Journal of Ichthyology, 21, pp 311-321.
- Nakamura, M. 1984. Effects of estradiol-17 [beta] on gonadal sex differentiation in two species of salmonids, the masu salmon, *Oncorhynchus masou*, and the chum salmon, *O. keta*. Aquaculture Research 43, 83-90.
- Nimrod, A., Benson, W. 1998. Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. Aquatic Toxicology 44, 141-156.
- Numachi, K., T. Kobayashi, K. H. Chang and Y. S. Lin. 1990. Genetic identification

- and differentiation of the formosan landlocked salmon, *Oncorhynchus masou formosanus*, by restriction analysis of mitochondrial DNA. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica* 29 (3, Supplement) :61-72.
- Okazaki, T., 1986. Genetic variation and population structure in masu salmon *Oncorhynchus masou* of Japan. *Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries* 52, 136561376.
- Purdom, C.E., P. A. Hardiman, V. J. Bye, N. C. Eno, C. R. Tyler, and J. P. Sumpter. 1994. Estrogenic effects of the effluent from sewage treatment works. *Journal of chemical ecology*. 8: 275-285.
- Radwan, M. A., H. B. Elwakil, and K. A. Osman. 1992. Toxicity and Biochemical-Impact of Certain Oxime Carbamate Pesticides against Terrestrial Snail, *Theba-Pisana* (Muller) . *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 27 (6) , 759-773.
- Sole, M., Porte, C., Barcelo, D. (2001) Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *Trac-trends in Analytical Chemistry* 20, 518-525.
- Soto, A.M., Fernandez, M.F. 1997. Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environmental Health Perspectives Supplements* 105, 647-654.
- Suzuki, K., T. Kobayashi, T. Matsuishi and K. Numachi. 2000. Genetic variability of masu salmon in Hokkaido, by restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Nippon Suisan Gakkaishi* 66, 6396646 (in Japanese with English abstract)
- Torres, F.R., Salibian, A., Ferrari, L. 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus Carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution* 109, 277-282.
- Vaglio, A., and C. Landriscina, 1999. Changes in Liver Enzyme Activity in the Teleost *Sparus aurata* Response to Cadmium Intoxication. *Ecotoxicology and environmental safety*, 43 (1) , 111-116.

- Venturino, A., Rosenbaum, E., De Castro, A.C., Anguiano, O.L., Gauna, L., De Schroeder, T.F., De D'Angelo, A.M.P. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*. 8: 167-186.
- Watanabe, M. and Y. Lin. 1985. Revision of the salmonid fish in Taiwan. *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan*, 40, pp 75-85.
- Yu, J. N., N. Azuma, M. Yoon, V. Brykov, S. Urawa, M. Nagata, D. H. Jin and S. Abe. 2010. Population genetic structure and phylogeography of masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Zoological science*, 27 (5), 375-385.
- Zhang, H., Kong, F., Wang, S., Yu, Y., Zhang, M., Chen, M., Tan, X. 2008a. Prediction and assessment of the combination effects to a mixture of estrogenic chemicals on freshwater fish (in Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae* 28, 1178-1175.
- Zhang, H., Kong, F., Wang, S., Yu, Y., Zhang, M., Chen, M., Tan, X., Qian, S. 2008b. Mixture effects to vitellogenin induction by four environmental estrogens in freshwater fish (in Chinese). *Environ Sci Pollut Res Int* 29, 2005-2011.
- 丁望賢、吳建誼。2000。環境荷爾蒙 $\alpha$ -壬基苯酚與雙酚A在臺灣水環境中之分析與流布調查。環境檢驗通訊雜誌。33: 12-21。于淑芬、林永發。2003。武陵地區水質調查及環境監測。內政部營建署雪霸國家公園管理處自行研究報告。
- 王敏昭、張簡水紋。2003。七家灣溪沿岸土地各利用型態對溪流生態影響之研究。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2005a。水中氨氮檢測方法—靛酚比色法 (NIEA W448.51B)。臺北市。行政院環境保護署。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2005b。水中濁度檢測方法—濁度計法 (NIEA W219.52C)。臺北市。行政院環境保護署。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006a。水中葉綠素a檢測方法—丙酮萃取法／分光光度計分析法 (NIEA E507.02B)。臺北市。行政院環境保護署。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006b。水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法

- 103°C~105°C 乾燥 (NIEA W210.57A)。臺北市。行政院環境保護署。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2010。水中磷檢測方法—分光光度計／維生素丙法 (NIEA W427.53B)。臺北市。行政院環境保護署。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2011。水中生化需氧量檢測方法(NIEA W510.55B)。臺北市。行政院環境保護署。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2013。生物急毒性檢測方法 羅漢魚靜水式法 (NIEA B902.13B)。臺北市。行政院環境保護署。
- 周以正、張文政。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。內政部營建署雪霸國家公園管理處。
- 李美慧。2006。生態監測概論。台北。明文書局。
- 林永發、陳裕良、于淑芬。2002。高山溪拆霸後環境監測及武陵地區水質調查。雪霸國家公園管理處委託研究報告。
- 官文惠。2005。武陵地區長期生態監測暨生態模式建立-水質參數研究。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告。
- 林幸助、吳聲海、官文惠、邵廣昭、施習德、孫元勳、郭美華、彭宗仁、曾晴賢、楊正澤、葉文斌、葉昭憲、蔡尚惠。2006。武陵地區長期生態監測暨生態模式建立。內政部營建署雪霸國家公園管理處保育研究報告。
- 林幸助、吳聲海、官文惠、邵廣昭、孫元勳、高樹基、郭美華、彭宗仁、曾晴賢、楊正澤、葉文斌、葉昭憲、蔡尚惠。2007。武陵地區長期生態監測暨生態模式建立。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託計畫。
- 官文惠、郭美華、葉昭憲。2009。台灣櫻花鉤吻鮭歷史棲地-南湖溪環境生態監測及評估計畫。太魯閣國家公園管理處與雪霸國家公園管理處委託研究計畫。
- 林幸助、吳聲海、官文惠、邵廣昭、施習德、孫元勳、郭美華、彭宗仁、曾晴賢、楊正澤、葉文斌、葉昭憲、蔡尚惠。2006。武陵地區長期生態監測暨生態模式建立。內政部營建署雪霸國家公園管理處保育研究報告。
- 林幸助、邵廣昭、郭美華、曾晴賢、葉昭憲。2009。98年度武陵地區長期生態研究。雪霸國家公園管理處委託研究報告。

林幸助、吳聲海、官文惠、邵廣昭、郭美華、曾晴賢、葉昭憲。2010。武陵地區生態系長期監測與研究。雪霸國家公園管理處委託研究報告。

官文惠、郭美華、葉昭憲。2010。台灣櫻花鉤吻鮭歷史棲地-有勝溪及羅葉尾溪環境生態監測及評估期末報告。雪霸國家公園管理處委託研究報告。

林幸助、王筱雯、吳聲海、官文惠、邵廣昭、孫元勳、郭美華、曾晴賢、楊正澤、葉昭憲、蔡尚惠。2011。武陵地區溪流生態系長期監測暨整合研究。雪霸國家公園管理處委託研究報告。

林幸助、王筱雯、林鶯熹、吳聲海、官文惠、邵廣昭、孫元勳、郭美華、曾晴賢、楊正澤、葉昭憲、蔡尚惠。2012。武陵地區溪流生態系復育監測與研究。雪霸國家公園管理處委託研究報告。

林幸助。2013。武陵地區溪流生態系及七家灣溪一號防砂壩壩體改善後研究。雪霸國家公園管理處委託研究報告。

陳弘成。1994。溪流水源水質監測系統之規劃與調查(武陵地區)。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託計畫。

陳弘成。1995。武陵地區溪流水源水質監測系統之規劃與調查。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託計畫。

陳弘成、楊喜男。1995。武陵地區-溪流之水源水質監測系統之規劃與調查。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託計畫。

陳弘成、楊喜男。1996。溪流之水質調查與生物監測之研究(武陵附近地區)。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告。

陳弘成。1998。武陵地區-溪流之水源水質監測系統之規劃與調查。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告。

陳弘成。1999。武陵地區溪流水源水質監測系統之規劃與調查。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告。

陳健民。2007。環境毒物學。台北。新文京。

郭金泉。2009。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。

曾晴賢、郭美華、官文惠。2014。七家灣溪及高山溪鮭魚族群及棲地監測。雪霸

國家公園管理處委託辦理計畫。

環檢所（行政院環境檢驗所）。1998。水樣急毒性檢測方法-米蝦淨水式法。臺北市。行政院環境保護署。

# 附錄

## 本年度計劃捕獲臺灣鏟頷魚基本資料

取樣日	樣點	F/M	體長(mm)	體重(g)	註
20015/6/5	七家灣溪	Male	131.32	41.396	
20015/6/5	七家灣溪	Female	153.74	72.19	
20015/6/5	有勝溪	Male	49.75	2.088	*
20015/6/5	有勝溪	Female	54.69	2.562	
20015/6/5	有勝溪	Male	76.63	7.608	
20015/6/5	有勝溪	Female	52.78	2.283	
20015/6/5	有勝溪	Male	64.55	4.67	
20015/6/5	有勝溪	Male	58.36	3.281	
20015/6/5	有勝溪	Male	65.81	4.858	
20015/6/5	有勝溪	Male	60.65	3.73	
20015/6/5	有勝溪	Male	56.16	2.975	*
20015/6/5	有勝溪	Female	71.04	5.937	
20015/6/5	有勝溪	Female	65.23	4.786	
20015/6/5	有勝溪	Male	59.62	3.482	*
20015/6/5	有勝溪	Female	54.45	2.773	
20015/6/5	有勝溪	Female	47.39	1.684	
20015/6/5	有勝溪	Female	51.16	2.01	
20015/6/5	有勝溪	Female	46.94	1.548	
20015/6/5	有勝溪	Female	49.56	1.983	
2015/9/22	七家灣溪	Male	146.20	46.00	
2015/9/22	七家灣溪	Male	124.70	40.00	
2015/9/22	七家灣溪	Male	112.66	32.80	
2015/9/22	七家灣溪	Female	132.44	44.00	
2015/9/22	七家灣溪	Female	152.22	61.76	
2015/9/22	七家灣溪	Male	128.14	42.00	
2015/9/22	七家灣溪	Male	112.66	16.00	
2015/9/22	七家灣溪	Female	155.66	84.00	

取樣日	樣點	F/M	體長(mm)	體重(g)	註
2015/9/22	七家灣溪	Female	141.90	61.60	
2015/9/22	七家灣溪	Female	126.42	48.08	
2015/9/22	伊卡丸溪	Male	91.16	12.00	
2015/9/22	伊卡丸溪	Male	81.70	14.40	*
2015/9/22	伊卡丸溪	Male	82.56	14.40	*
2015/9/22	伊卡丸溪	Female	86.86	14.40	
2015/9/22	伊卡丸溪	Male	89.44	12.80	
2015/9/22	伊卡丸溪	Male	90.30	16.00	
2015/9/22	伊卡丸溪	Female	86.86	12.00	
2015/9/22	伊卡丸溪	Male	80.84	8.80	
2015/9/22	有勝溪	Female	141.90	60.08	
2015/9/22	有勝溪	Female	120.40	32.00	
2015/9/22	有勝溪	Male	90.30	15.20	*
2015/9/22	有勝溪	Female	129.00	39.20	
2015/9/22	有勝溪	Female	128.14	40.80	
2015/9/22	有勝溪	Female	130.72	40.00	
2015/9/22	有勝溪	Female	111.80	20.00	
2015/9/22	有勝溪	Female	79.98	9.60	
2015/9/22	有勝溪	Male	93.74	20.00	
2015/9/22	有勝溪	Female	80.84	8.00	
2015/9/22	高山溪	Male	106.64	32.00	
2015/9/22	高山溪	Female	143.62	57.60	
2015/9/22	高山溪	Female	122.98	32.00	
2015/9/22	高山溪	Female	122.98	40.00	
2015/9/22	高山溪	Male	78.26	8.00	
2015/9/22	高山溪	Male	84.28	12.00	

\*為進行實驗室曝露之魚隻

檔 號：

保存年限：

### 雪霸國家公園管理處 函

機關地址：36443苗栗縣大湖鄉富興村水尾坪100號  
聯絡人：鍾雲喜  
聯絡電話：037-996100#702  
電子郵件：yunhsi@spnp.gov.tw  
傳真：037-996706

環境資源管理系

受文者：嘉南藥理大學

發文日期：中華民國104年2月09日  
發文字號：營雪保字第1041000238號  
速別：普通件  
密等及解密條件或保密期限：普通  
附件：如主旨

主旨：檢送本處104年2月6日辦理「104年度臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟頷魚體內卵黃前質素之測定」案採購評審委員會評審會議紀錄乙份，請查照。

正本：鍾銘山委員、鄭瑞昌委員、劉金龍委員、于淑芬委員、廖林彥委員  
副本：嘉南藥理大學、本處行政室、保育研究課

# 處長 陳貞蓉



檔 號：

保存年限：

## 雪霸國家公園管理處 函

機關地址：36443苗栗縣大湖鄉富興村水尾坪100號  
聯絡人：胡景程  
聯絡電話：037-996100#702  
電子郵件：hu@spnp.gov.tw  
傳真：037-996706

環  
境  
管  
理  
系

受文者：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學

發文日期：中華民國104年6月05日

發文字號：營雪保字第1040001689號

速別：普通件

密等及解密條件或保密期限：普通

附件：正本附件：採集許可書、人員名冊、核發要點、點位資料填寫範例各1份；

副本附件：採集許可書、人員名冊

主旨：有關貴校鄭蕙玲副教授等6人為執行本處委辦之「臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟頰魚體內卵黃前質素之測定」研究計畫案，申請本處學術研究標本採集證6份，復如說明，請查照。

說明：

- 一、依據行政院農業委員會104年6月4日農授林務字第1041700654號函、臺中市政府104年6月1日府授農海行字第1040120131號函、內政部104年5月8日內授營園字第1040807950號函辦理並兼復貴校104年4月23日嘉環管字第1040003020號函。
- 二、本處同意貴校鄭蕙玲副教授等6人自104年6月4日起至104年12月31日止進入本處園區執行旨揭採集計畫。
- 三、每次調查採集時請攜帶本公文(含採集許可書及採集人員名冊)及身分證明文件備查。並請採集與調查人員先至本處武陵管理站登記並領取研究背心，俾便進行必要之配合聯繫。



正本

檔 號：  
保存年限：

行政院農業委員會 函

71710  
臺南市仁德區二仁路1段60號

地址：10014臺北市中正區南海路37號  
承辦人：謝書綺  
電話：(02)2351-5441分機662  
電子信箱：m6030@forest.gov.tw

受文者：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學

環境資源管理系

發文日期：中華民國104年6月4日  
發文字號：農授林務字第1041700654號  
速別：普通件  
密等及解密條件或保密期限：普通  
附件：如說明(計5頁)

主旨：本會同意貴校鄭蕙玲教授等6人，申請利用保育類野生動物-櫻花鉤吻鮭30尾，供學術研究一案，復如說明，請查照。

說明：

- 一、依據雪霸國家公園管理處104年5月11日營雪保字第1040001422號函、臺中市政府104年6月1日府授農海行字第1040120131號函與申請人104年5月28日以電子郵件檢送修正後附件一及附件二資料等辦理。
- 二、同意自即日起至104年12月31日止於臺中市大甲溪上游之七家灣溪採取櫻花鉤吻鮭之背鰭之鰭膜後原地釋放，並檢取產卵後自然死亡個體肌肉，進行基因序列分析，其調查方法詳如「同意利用保育類野生動物事項」、「執行人員名冊」與同意進入保護區域公文各1份。
- 三、本案倘涉原住民族利益，請踐行原住民族基本法第21條之規定。
- 四、請依下列事項辦理：
  - (一)本申請案係依據該法第18條第1項第2款及其施行細則第21條之規定許可，如行為涉及其他法條或法規時(例如：涉及動物福利請依動物保護法規定)，請申請人依相關規定辦理。
  - (二)申請利用期間如涉及瀕臨絕種及珍貴稀有野生動物因病或不明原因死亡時，應依該法第38條規定辦理。
  - (三)請於進行研究時，攜帶本同意函(或相關核准函)影本及身分證明文件，並於研究利用時同時通知當地縣(市)政府，俾以視業務狀況派員瞭解及查驗執行利用情形。
  - (四)為建檔保存臺灣野生動物遺傳物質之需，如有採集遺傳物



檔 號：  
保存年限：

### 雪霸國家公園管理處 函

機關地址：36443苗栗縣大湖鄉富興村水尾坪100號  
聯絡人：胡景程  
聯絡電話：037-996100#702  
電子郵件：hu@spnp.gov.tw  
傳真：037-996706

環境資源管理系

受文者：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學

發文日期：中華民國104年8月06日  
發文字號：營雪保字第1041001180號  
速別：普通件  
密等及解密條件或保密期限：普通  
附件：如主旨

主旨：檢送本處委託貴校辦理「104年臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟頰魚體內卵黃前質素之測定」第1次期中審查會議紀錄1份，請查照。

說明：

- 一、旨揭計畫案已於104年7月30日辦理第1次期中審查。
- 二、請貴校依委員建議與會議結論修訂期中報告，並於8月29日前將修正後之期中報告書函送本處審查。

正本：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學、國立清華大學生命科學系曾晴賢教授

副本：本處各課、室、站（電子布告欄）、保育研究課（含附件）

# 處長 陸貞蓉

嘉南藥理大學 總收文



A1040006466

**「104 年臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟頰魚體內卵黃前質素之測定」 第 1 次期中審查會議紀錄**

壹、會議時間：104 年 7 月 30 日（星期四）下午 2 時 0 分

貳、會議地點：雪霸國家公園管理處第 1 會議室

參、主席：陳處長貞蓉 記錄：胡景程

肆、出(列)席單位及人員：詳如簽到簿

伍、討論事項

一、曾委員晴賢：

- (一) 報告格式仍應依照管理處之要求修正。
- (二) 執行本研究以前，應對於相關同質性或主題之研究先做深入了解，過去有甚多研究文獻，建議以過往之研究基礎做背景，勿從零開始做研究。
- (三) 採集樣點的位置請定位並標示清楚，並註明時間與數量，研究樣點除實驗點之外，亦應有對照組。高山溪和七家灣溪之臺灣鏟頰魚族群是否為獨立的族群，宜更審慎解讀。
- (四) 文中採集的 7 隻鮭魚，是養殖個體還是野外個體？且 7 隻樣本似不足以做親緣地理的分析，此外，國外的樣本是否足夠？
- (五) 申請利用臺灣櫻花鉤吻鮭的保育類動物公文請一併附上，野外或養殖的都請附上。
- (六) 請註明自然溪流中的環境荷爾蒙的 base-line，若實驗組與對照組水體環境荷爾蒙都在 base-line 以下，如何進一步解釋，相關實驗設計請審慎。
- (七) 期末時要完成本計畫之 10 點工作項目，期中未見有初步成果，應再加油。

受託單位回應：

檔 號：

保存年限：

### 雪霸國家公園管理處 函

機關地址：36443苗栗縣大湖鄉富興村水尾坪100號  
聯絡人：胡景程  
聯絡電話：037-996100#702  
電子郵件：hu@spnp.gov.tw  
傳真：037-996706

環  
境  
生  
態  
系

受文者：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學

發文日期：中華民國104年9月23日  
發文字號：營雪保字第1041001453號  
速別：普通件  
密等及解密條件或保密期限：普通  
附件：如主旨

主旨：檢送本處委託貴校辦理「104年臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟頰魚體內卵黃前質素之測定」第2次期中審查會議紀錄1份，請查照。

說明：

- 一、旨揭計畫案已於104年9月15日完成第2次期中審查。
- 二、請貴校依委員建議與提問修正後將回覆對照表函覆本處，並將第2期款領據函送本處，俾憑辦理撥款事宜。

正本：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學、國立清華大學生命科學系曾晴賢教授

副本：本處各課、室、站（電子布告欄）、保育研究課（含附件）

# 處長 胡景程

嘉南藥理大學 總收文



A1040008240

**「104 年臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鉅頭魚體內卵黃前質素之測定」 第 2 次期中審查會議紀錄**

壹、會議時間：104 年 9 月 15 日（星期二）下午 2 時 0 分

貳、會議地點：雪霸國家公園管理處第 1 會議室

參、主席：陳處長貞蓉

記錄：胡景程

肆、出(列)席單位及人員：詳如簽到簿

伍、討論事項

一、曾委員晴賢：

- (一) 文獻格式請依照規定編排，且參考文獻不用單獨列一章節，參考文獻數量應該還是有努力空間，可以再增加，部分物種學名應再確認正確性。
- (二) 申請利用臺灣櫻花鉤吻鮭的保育類動物公文請一併附上，野外或養殖的都請附上。
- (三) 目前所採集的樣本數部分，野外個體 4 尾，養殖個體 7 尾，與預計目標的 30 尾尚有差距，還請多加努力。
- (四) 期中報告除了初步成果呈現之外，也可將下半年度的工作重點列出，若是有工作執行上的困難，也應提出來一起討論。
- (五) 採集鮭魚身體樣本部分，建議以脂鰭或臀鰭為主，取代背鰭鰭膜，比較不會影響鮭魚的行動能力。
- (六) 有關鮭魚的食物來源組成部分，可參考林幸助老師在武陵地區長期生態監測的研究報告，因為鮭魚的食物不是只有水生昆蟲，來自空中的昆蟲也占食物組成不少比例。

受託單位回應：

- (一) 感謝曾老師的建議，文獻格式、參考文獻與物種學名將依規定修正與增加，保育類野生動物的利用公文與相關資料將會在

「臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟頰魚體內卵黃前質素之測定」 第 2 次期中審查會議紀錄

壹、會議時間：104 年 9 月 15 日（星期二）下午 2 時 0 分

貳、會議地點：雪霸國家公園管理處第 1 會議室

參、主席：陳處長貞蓉

記錄：胡景程

肆、出(列)席單位及人員：詳如簽到簿

伍、討論事項

委員	委員提問	嘉南藥理大學回覆
曾晴賢 委員	<p>(一) 文獻格式請依照規定編排，且參考文獻不用單獨列一章節，參考文獻數量應該還是有努力空間，可以再增加，部分物種學名應再確認正確性。</p> <p>(二) 申請利用臺灣櫻花鉤吻鮭的保育類動物公文請一併附上，野外或養殖的都請附上。</p> <p>(三) 目前所採集的樣本數部分，野外個體 4 尾，養殖個體 7 尾，與預計目標的 30 尾尚有差距，</p>	<p>(一) 感謝委員指正，遵照辦理。</p> <p>(二) 感謝委員指正。相關文件將檢附於期末報告中。</p> <p>(三) 遵照委員建議，已加速研究樣本之採樣。</p>

	<p>還請多加努力。</p> <p>(四) 期中報告除了初步成果呈現之外，也可將下半年度的工作重點列出，若是有工作執行上的困難，也應提出來一起討論。</p> <p>(五) 採集鮭魚身體樣本部分，建議以脂鰭或臀鰭為主，取代背鰭鰭膜，比較不會影響鮭魚的行動能力。</p> <p>(六) 有關鮭魚的食物來源組成部分，可參考林幸助老師在武陵地區長期生態監測的研究報告，因為鮭魚的食物不是只有水生昆蟲，來自空中的昆蟲也占食物組成不少比例。</p>	<p>(四) 已遵照委員建議修正。</p> <p>(五) 遵照委員建議辦理。</p> <p>(六) 感謝委員指正。已將相關文獻納入參考資料中。</p>
<p>本處人員</p>	<p>(一) 是否有其他地區溪流臺灣鏟頰魚體內卵黃前質素的背景值?與其他溪流的比對如何?還請研究團隊將養殖的臺灣鏟頰</p>	<p>(一) 謝謝委員建議。本團隊已針對臺灣鏟頰魚體進行標準類雌性素曝露，並收集相關結果。該部</p>

	<p>魚卵黃前質素背景值(標準值)提出，或是到底要多少劑量的卵黃前質素才會對臺灣鏟頷魚產生雌化的影響?</p> <p>(二) 本研究探討園區外的有勝溪與園區內受保護的七家灣溪內之苦花的卵黃前質素是否有差異，此成果可作為本處未來擴大園區重要的論述依據，請研究團隊在此部分上多加努力。</p> <p>(三) 臺灣鏟頷魚與鮭魚的食性不同，臺灣鏟頷魚為植食性，鮭魚為肉食性，環境賀爾蒙在體內的累積量是否有所不同?</p> <p>(四) 研究團隊不採集司界蘭溪的臺灣鏟頷魚樣本，那是否可以到其它已確定受環境賀爾蒙影響的溪流採集樣本並與之比較?</p> <p>(五) 方法論部分也請研究團隊再加強，如：養殖的</p>	<p>分資料應該可以讓管理處瞭解環境荷爾蒙相關資訊。</p> <p>(二) 謝謝建議。該部分論述將於期末中增加。</p> <p>(三) 環境賀爾蒙在體內的累積量的確會與食性而有所差異。但是，在鮭魚無法進行採樣的情況下，目前團隊選擇臺灣鏟頷魚為指標。</p> <p>(四) 本團隊已針對臺灣鏟頷魚體進行標準類雌性素曝露，並收集相關資料，應可以比較其影響程度與狀態。</p> <p>(五) 謝謝建議。將於方法論部分加強該部分描述。</p>
--	--	---

	<p>臺灣鏟頷魚的條件或飼料成分，或是接受不同濃度雌激素曝露試驗的臺灣鏟頷魚到底為野外採集個體還是養殖個體。</p> <p>(六) 第五章所提之初步建議事項，應為初步研究成果非建議事項，請研究團隊在期末報告時留意並提出適當之建議事項。</p> <p>(七) 請研究團隊確實掌握時效，以利研究工作能在契約期程內完成，若需要展延，請研究團隊與承辦業務課室討論如何提供行政協助。</p> <p>(八) 適合鮭魚存活的水溫範圍已經知道是多少(12~17度)，這個研究案也是希望研究團隊能找出鮭魚能忍受的環境賀爾蒙範圍為何?是否能找出標準值?希望研究團隊能為我們訂出這樣的標</p>	<p>(六) 感謝委員指正。 本團隊將於期末報告提出適當之建議事項。</p> <p>(七) 遵照委員指示辦理，已加速各項工作之進行。</p> <p>(八) 感謝委員建議。 本計畫僅探討臺灣鏟頷魚體內卵黃前質素之測定，有關臺灣鏟頷魚體或鮭魚可忍受之環境賀爾蒙範圍，可為未來研究的方向。</p> <p>(九) 感謝委員指正。 期末報告會將歷次審查會議委員提問與回覆之對照表納</p>
--	--	---

	<p>準質讓我們參考。</p> <p>(九) 請將歷次審查會議委員提問與回覆之對照表納入期末報告。</p>	<p>入。</p>
--	---	-----------

## 陸、結論

- 一、 本次審查會議原則通過，請受託單位依各與會人員之建議修正，並將修正意見列表函覆本處，請受託單位依合約規定辦理第 2 期款請款。
- 二、 若研究期程需要展延，請受託單位提書面資料說明具體理由，由本處依行政程序辦理簽核。

柒、散會：下午 15 時 40 分

期末審查會議公文

檔 號：

保存年限：

雪霸國家公園管理處 函

機關地址：36443苗栗縣大湖鄉富興村水尾坪100號

聯絡人：潘振彰

聯絡電話：037-996100#701

電子郵件：lyonia@spnp.gov.tw

傳真：037-996706

受文者：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學

發文日期：中華民國104年12月25日

發文字號：營雪保字第1041002044號

速別：普通件

密等及解密條件或保密期限：普通

附件：如主旨

主旨：檢送本處委託貴校辦理「104年臺灣櫻花鉤吻鮭之親緣地理與臺灣鏟領魚體內卵黃前質素之測定」期末審查會議紀錄1份，請查照。

說明：

- 一、旨揭計畫案已於104年12月22日辦理期末審查。
- 二、請貴校依委員建議與會議結論修訂期末報告，於12月29日前將修正後之期末報告書函送本處審查並依據契約規定辦理撥付款項等事宜。

正本：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學、臺北市立動物園曹先紹博士、特有生物研究保育中心楊正雄助理研究員

副本：本處各課、室、站(電子布告欄)、保育研究課(含附件)

處長 潘 貞 蓉



「臺灣櫻花鉤鮭之親緣地理與臺灣鏟頰魚體內卵黃前質素之測定」

期末報告審查意見及答覆說明

討論事項

委員	委員提問	嘉南藥理大學回覆
曹先紹 委員	(一) 請補充說明分子標記的選擇為何？為何非以中性演化基因為主？是否其選汰影響會干擾分析結果？	(一) 感謝委員指正，生物的DNA序列會以一定速度累積隨機突變，若欲推算出兩種生物是在多久以前自共同祖先分出來的，當以中性演化基因為主。然而，基因組中有些改變較快的區域，是受到了正向天擇的記號，那些突變有利於生物的生存和繁衍，因此更有可能傳給後代，可作為異域種化的依據。

	<p>(二) 由於大陸櫻鮭樣數偏低，分析結果宜謹慎解讀。</p> <p>(三) 重建親緣關係樹，宜在探討對象外，選擇親緣關係較遠的物種為外群(outgroup)，加入一起比較(建議可取其他鮭鱒魚類樣本)。</p> <p>(四) 重建親緣關係樹時，或可嘗試減或剔除人工育種樣本，讓整體樹型更加清楚。</p> <p>(五) 英文摘要中，Vitellogenin 誤植為 Vitelfogenin。</p>	<p>(二) 感謝委員指正，已遵照委員建議加以修正。</p> <p>(三) 感謝委員指正，因所選取的 VTG 及 RAG1 基因片段尚無其他鮭鱒魚類可比對作為外群，因此本研究中之親緣關係樹皆採用 unroot 方式建構。</p> <p>(四) 感謝委員建議，基因樹樹形複雜是代表這些基因可能有各自對應的原因(演化力量)，將人工復育的樣本加入，可更清楚復育的成效。</p> <p>(五) 感謝委員指正，已修正。</p>
--	--	--

<p>楊正雄 委員</p>	<p>(一) 在遺傳分析上,有標本數不足的問題(通常會取10左右),且分析 plot 不足(除 NJ 樹外,建議也要進行 ML, MP 樹比較),又無使用外群(outgroup)應使用最近緣種但非同種,才能有更高更好的解析度,若有不足標本及分析的地方,則建議報告最後結論/摘要應保守撰寫,儘量不要放大結論。</p> <p>(二) 中國的標本取得不易,雖然只有進行分析1尾且不易下結論,但目前已有新的定序技術(NGS 次世代定序)可在很少的樣本下,進行更完整的研究分析,但花費甚高,若有機會或願對此種源問題有興趣,可採合作或是另做計畫進行。</p> <p>(三) 不同基因片段有不同的解析度,適用於種間/</p>	<p>(一) 感謝委員指正,各族群樣本數不均勻是本研究難以克服的缺失,以現有的資料分析,ML 與 NJ 之樹型結果幾乎完全一模一樣,已遵照委員建議修正報告之結論。</p> <p>(二) 感謝委員建議。</p>
-------------------	---	--

	<p>種內而有不同的目的，因此的選擇片段時應留意其研究目的來選擇，一般都會以中性基因為主，少有選擇 coding gene 的狀況，因此本研究選擇 VTG, RAG1 的用意為何？</p> <p>(四) 臺灣白甲魚或臺灣鏟領魚，在中文/英文學名的對照上，建議應該一致，若以 <i>Onychostoma</i> 為名，就應以白甲魚稱呼，鏟領魚可做對照說明。</p> <p>(五) 以檢測各項酵素濃度目的來說，藻食性的臺灣白甲魚是否合適，是否可</p>	<p>(三) 感謝委員指正，生物的 DNA 序列會以一定速度累積隨機突變，若欲推算出兩種生物是在多久以前自共同祖先分出來的，當以中性演化基因為主。然而，基因組中有些改變較快的區域，是受到了正向天擇的記號，那些突變有利於生物的生存和繁衍，因此更有可能傳給後代，可作為異域種化的依據。</p> <p>(四) 已遵照委員建議修正。</p> <p>(五) 謝謝委員，若單以</p>
--	---	--

	<p>能採用肉食性、生態位階較高的種類進行。若有怕損傷臺灣櫻花鉤吻鮭問題，建議可在人工繁殖作業時取用部份個體為之。另若考量累積性問題，取樣個體大小是否太小？</p> <p>(六) 水體本身做為環境背景值，是否有可能進行實際檢測？</p> <p>(七) 圖 3-5，請附上趨勢線的 R2 數值對照。</p>	<p>瞭解水中雌性素當量濃度時，藻食性魚類較不受複雜食物鏈干擾，得以容易瞭解水中雌性素當量濃度。在搜集資料後，各區域均有鏟頷魚出現，且數量也較為足夠。因此，選定鏟頷魚為本次試驗生物。</p> <p>(六) 感謝委員建議，本次水質資料為本團隊直接於現場進行測定之資料。</p> <p>(七) 感謝委員指正，已將迴歸線設定時以 <math>p &lt; 0.1</math> 為有效迴歸線，本次分析結果除七家灣溪上游 <math>P &gt; 0.1</math> 外其於 P 值均小於 0.1，該部分結果已列入圖後進行參考。</p>
--	--	---

<p>本處 人員</p>	<p>(一) 國內其它學者曾有進行鮭魚演化的論述，請問本計畫之結果與哪位專家學者較為接近？</p> <p>(二) 臺灣鏟領魚的 sample size 可否列出，另報告前言中有提及 1ng/L 的類雌性素即會誘發 VTG 的生成，然而本研究不同濃度雌激素曝露試驗為何訂定 0 及 10ng/L 的濃度？</p> <p>(三) 圖 3-5 導電度資料的引用請註明清楚。</p>	<p>(一) 本研究結果顯示台灣櫻花鉤吻鮭仍難以完全單獨成一分支，但就其特殊之地理位置，應可視為太平洋鮭鱒複合種群其中之一亞種。</p> <p>(二) 感謝委員提醒，已於後方附件列出鏟領魚的 sample size 之相關資料。至於雌激素曝露試驗訂定 0 及 10ng/L 的濃度主要為搜及文獻後判斷武陵地區雌激素濃度應低於 10ng/l，因此其定為比較之最高值。</p> <p>(三) 感謝委員指正，已將資料加入參考文獻中。</p>

	<p>(四) 附錄請附上歷次完整之公文、會議紀錄及回應說明。</p> <p>(五) 過去本處於七家灣溪流流域曾進行武陵地區長期生態監測與調查，亦有豐碩之成果，建請予以參考比較。</p> <p>(六) 圖 3-5 中，七家灣溪上游與七家灣溪中游的導電度資料，91 年之後就沒有資料，司界蘭溪下游 99 年以後也沒有(104 年僅有一筆)，則本圖導電度的 83 年至 104 年趨勢圖是否有疑義。</p> <p>(七) 表 3-2 中，此水質分析</p>	<p>(四) 感謝委員指正。已將相關資料置於附錄。</p> <p>(五) 謝謝建議。將於方法論部分加強該部分描述。</p> <p>(六) 謝謝委員，為離清導電度資料之可信度，在分析迴歸線之有效度時，已將迴歸線設定時以 <math>p &lt; 0.1</math> (迴歸分析) 為有效迴歸線，本次分析結果除七家灣溪上游 <math>P &gt; 0.1</math> 外其於 <math>P</math> 值均小於 0.1，該部分結果已列入圖後進行參考。</p> <p>(七) 謝謝提醒，該部分資料的確為不同天</p>
--	---	--

	<p>結果僅有一筆一天採樣資料，且伊卡萬溪採樣日期也與其他 3 條溪流不同，拿來比較似有不妥。</p> <p>(八) 本案成果是否能呈現本處於櫻花鉤吻鮭保育工作上之成效或能給予具體可行之建議。</p>	<p>所採集，拿來比較可信度的確也較為不妥。該部分將於爾後調查進行修正。</p> <p>(八) 本研究結果顯示貴處於櫻花鉤吻鮭保育已頗具成果，未來配合棲地之經營與復育，效益應更為顯著。</p>
--	--	--