

利用水體中環境DNA檢測魚種的新技術

劉恩良、吳瑞賢、何源興摘譯

水產試驗所東部海洋生物研究中心

水域中的環境 DNA (environmental DNA, eDNA) 係指水體中所發現的遺傳物質。最近研究人員以即時定量 PCR (realtime qPCR) 方法，提升了判定的靈敏度與專一性。Takahara 等使用即時定量 PCR，再根據水族缸與試驗池中所測得 eDNA 濃度與生物量正相關的比例，推估出自然潟湖中鯉魚的生物量。為了擴充偵測魚種分類的範圍，Minamoto 等針對粒線體 *cyt b* 基因中的 285 bp 短片段設計一組退化性引子，經 PCR 反應以及選殖 PCR 產物定序之後，成功的發現在水族缸中 1–5 種以及河流中 2–4 種的魚類。Thomsen 等開發了針對 2 屬與 4 種魚類的專一性 PCR 引子，可以放大 *cyt b* 基因中的 32–51 bp 片段，再使用次世代定序 (NGS) 方法偵測出 15 種魚類。最近，Kelly 等為了評估蒙特利灣水族館 (Monterey Bay Aquarium) 大型水族展示槽內的魚類群相，設計了一段引子可以放大粒線體 12S rRNA 基因中 106 bp 片段，再以 NGS 方式加以定序，發現於水槽內 8 種硬骨魚中的 7 種，但是放大出來 PCR 產物序列的變異僅能解析到科或屬的等級，而且無法偵測出其他板鰓類魚類，例如鯊及魮。2015 年 Miya 等公開發表一組可通用的 PCR 引子 (稱為 MiFish-U/E)，作為 eDNA metabarcoding 的工具。引子的設計是根據 880 種魚類 (其中有 160 種板鰓類的部分粒線體 DNA) 粒線體基

因體 DNA 序列並列比對而成的，這組引子主要是對應在 12 rRNA 基因中具高度變異的片段 (163–185 bp)，此片段序列除少數相關的同種變異外，足以區別魚類的科、屬，乃至於種的階層。研究人員從沖繩 Churaumi 水族館中的 4 個水槽採得 eDNA。結果從 180 種海水魚中，可鑑別出 168 種 (約佔 93.3%)，其中包含 59 科 123 屬。這些魚類不僅具有分類學上的差異，更分布在不同生態環境中，諸如海洋表層、底棲、近岸與深海。他們也以同樣技術分析了水族館附近珊瑚礁周圍的天然海水，發現了 93 種魚類，其中 64 種未在水族館內的水槽發現。因此，此組引子成功地檢測出 70 科 152 屬共 232 種魚類。作者從兩個資料庫 (MitoFish 與 MiFish) 組合建立序列參考來源，其中 MitoFish database 有 1,324 筆 (平均 16.5 kb) 序列，而 MiFish database 有 2,953 筆序列；總計含括 457 科 1,829 屬約 4,230 種魚類。雖然目前粒線體基因體序列持續發表，可以改善資料庫相容性的問題。然而未來更具經濟效益，更快速的 DNA 定序技術，可針對粒線體基因體 DNA 或甚至細胞核內基因體，提供有別於傳統 DNA 條碼更廣泛的應用。

本文獲作者同意摘譯自：

Miya M. et al. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, 2: 150088.