

海洋環境保護及永續發展專題研究計畫成果報告

(第二年期末報告)

應用環境 DNA 及元條碼技術調查海洋敏感物種的利用現況

執行期間： 113 年 01 月 01 日至 114 年 12 月 31 日

執行機構及系所：國立台灣海洋大學水產養殖系

計畫主持人：徐德華副教授

協同主持人：李宏泰助理教授

研究人員：葉羽真助理、侯瑋瑋助理、顏彰霆碩士生

中 華 民 國 114 年 11 月 6 日

目錄

中文摘要	01
英文摘要	01
前言	02
研究目的	07
研究方法	07
結果與討論	10
參考文獻	21

中文摘要

近年來，保育意識逐漸抬頭，有愈來愈多受到生存危機的海洋生物被列入保育，其中較知名的包括海龜及鯊魚等。然而，少數漁民在不認識保育生物或無意識的混獲下，仍有可能危害到這些珍貴物種的生存。因此，如何以最少的人力物力進行長期監測，並有效偵測出這些保育物種是否在漁獲中，是未來保育管理上的一個重要課題。環境 DNA (eDNA) 是在環境中持續存在的遺傳物質，來自於棲地中的各種生物。目前有許多研究已應用環境 DNA 在海洋生物的調查上，特別是棲地廣大，不易被觀察到的物種。通過 PCR 擴增和 DNA 定序技術，我們可以在不捕捉樣本下，將特定物種鑑別出來。甚至在不具有特定目標時，也可以透過通用引子對，以 DNA 條碼 (DNA barcoding)，結合次世代定序技術，實現多物種的環境 DNA 定性檢測 (eDNA metabarcoding)。本研究使用最新的環境 DNA 及元條形碼檢測技術，並實地於大溪、南方澳、深澳、和平島、東港、蚵仔寮、花蓮、富岡、竹圍、南寮、梧棲、馬公及鎖港等 13 個漁港，及鯊魚凍與魚漿製品進行採樣，一共 348 個樣本，並且偵測到 1912 個物種，其中包含瀕危物種。此計畫將有助於釐清漁業活動中是否有無意識混獲或有意識的非法捕捉的情況。

關鍵詞：漁業、瀕危、保育、分子標記、DNA 條碼

英文摘要

In recent years, conservation concerns have gradually risen, more critically endangered marine life including sea turtles and sharks were listed on the IUCN red list. However, some fishermen may still harm the endangered marine life without knowing the endangered species, or with unconscious fishing activities. Therefore, how to keep long-term monitoring and to detect the endangered species from fishery catches effectively and economically, is an essential issue in future conservation management. Environmental DNA (eDNA) is organic materials that remain in the environment and comes from various organisms in the habitat. Survey of marine organisms by using environmental DNA is popular, especially when species that are vastly inhabited and difficult to observe. Through the development of PCR and DNA sequencing techniques, we can identify target species without capturing specimens. Moreover, non-specific, multi-species identification also possible to achieved by DNA barcoding and next-generation sequencing techniques. We used environmental DNA and metabarcoding technology for four-year investigations and found 1912 species and several endangered marine life- from fishing ports (DaXi, NanFangAo, ShenAo, HePing Island, DongGang, KeZaiLiao, HuaLien, FuGang, ZhuWei, NanLiao, WuQi, MaGong, SuoGang), and seafood (fish jelly and Surimi). This project will help to clarify whether there is unintentional or conscious illegal capture.

Key words : fishery, endangered, conservation, molecular marker, DNA barcoding

前言

一、海洋生物的保育

由於全球氣候變遷、環境遭受破壞及漁業過度捕撈等多重因素影響，海洋生態系及生物多樣性正面臨嚴重的危機。除了有些物種已數量稀少而瀕臨滅絕外，亦有愈來愈多的經濟性魚種的漁獲量大幅下降，海洋資源永續利用同樣面臨挑戰與威脅（Molles, 2005）。近年來，保育意識逐漸抬頭，有愈來愈多受到生存危機的海洋生物而被列入保育。以台灣為例，國人較為熟知的綠蠐龜（*Chelonia mydas*）、白海豚（*Sousa spp.*）及龍王鯛（*Cheilinus undulates*）等物種均已名列行政院農委會現行公告的保育類野生動物名錄中。此外，漁業署已配合國際公約（CITES）將多種分佈於三大洋的鯊魚及魷類物種列為部份或完全禁捕物種，包括鯨鯊（*Rhincodon typus*）、污斑白眼鯊（*Carcharhinus longimanus*）、平滑白眼鯊（*Carcharhinus falciformis*）、淺海狐鯊（*Alopias pelagicus*）、狐鯊（*Alopias valpinus*）、深海狐鯊（*Alopias superciliosus*）、八鰭丫髻鯊（*Sphyrna mokarran*）、丁字雙髻鯊（*Eusphyra blochii*）、紅肉丫髻鯊（*Sphyrna lewini*）、丫髻鯊（*Sphyrna zygaena*）、灰鯖鯊（*Isurus oxyrinchus*）、蝠魷屬（*Mobula spp.*）及鬼蝠魷屬物種（*Manta spp.*）等。同時，亦有愈來愈多海洋生物已陸續名列保育類野生動物，倘若相關宣導資訊未能即時落實或在非預期情況下意外混獲，仍有可能危害到這些物種的生存。因此，如何在有限的人力及資源下，建立有效的調查機制來長期監測這些保育物種是否被捕獲，亦是現階段保育工作中的重要課題。

二、環境 DNA

環境 DNA（environmental DNA, eDNA），係指由土壤、水體或甚至空氣等各種不同環境中持續存在的遺傳物質。這些遺傳物質經由毛髮、皮屑、黏液或排泄物等不同途徑，散落在行經的環境當中。因此，若能透過採集土壤或水體等環境樣本，並成功提取環境樣本中 DNA，便可進一步利用基因定序技術來偵測是否有生物個體存在的蹤跡（圖 1）。目前有許多研究已應用環境 DNA 在海洋生物的調查上，特別是棲地廣大，不易被觀察到的物種。通過 PCR 擴增和 DNA 定序技術，我們可以在不捕捉樣本下，將特定物種鑑別出來。甚至在不具有特定目標時，也可以透過通用引子對，以 DNA 條碼（DNA barcoding），結合次世代定序技術，實現多物種的 eDNA 定性檢測（eDNA metabarcoding）。由於漁獲最終目的是提供市場消費、而漁獲又必定經由漁港進出。因此在漁獲、漁船及器具的清洗時，這些組織將匯集入漁港中（圖 2）。因此，我們很容易透過環境 DNA 的方式，檢測出特定的保育類生物是否存在，進一步提供相關管理上的幫助。

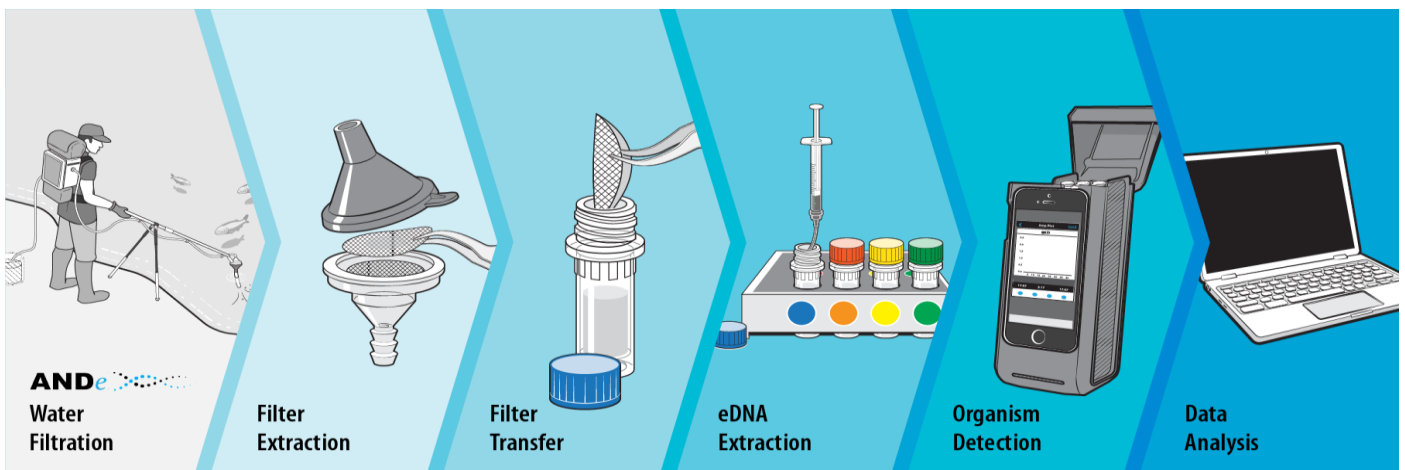


圖 1、環境 DNA 研究示意圖（引用自 www.smith-root.com）。

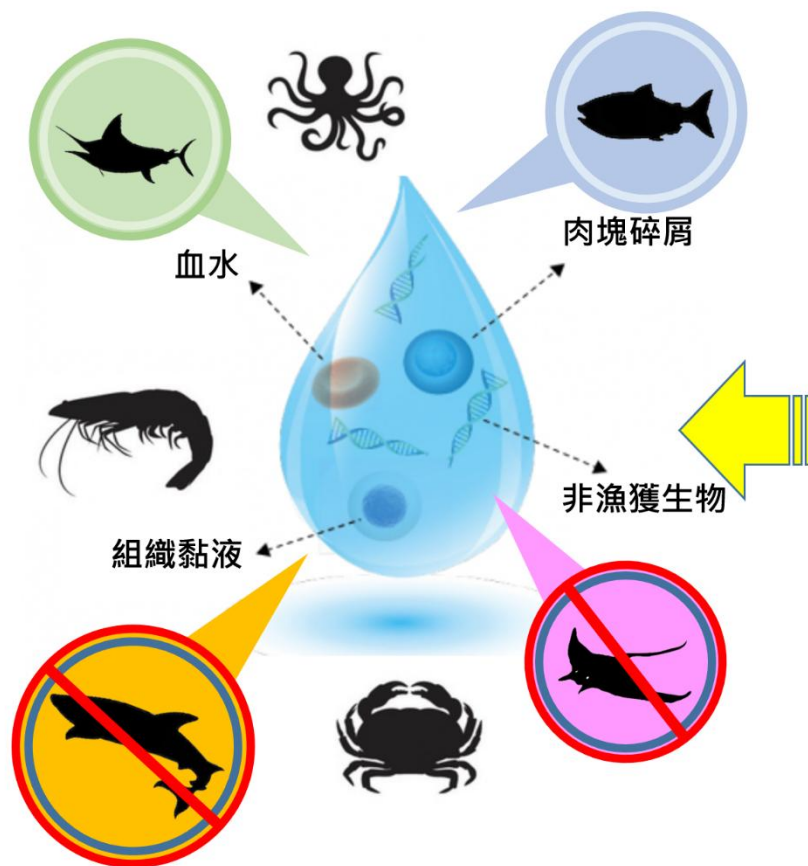


圖 2、漁港是所有漁獲的集中地，港口內的水樣富含海洋生物的組織，因此利用環境 DNA 的檢測技術，將可有效率的確認漁獲中是否有我們感興趣的保育或重要的海洋生物。

三、環境 DNA 採集及萃取方法開發

本計畫前期已在海洋大學養殖系溫室的 FRP 飼育桶進行測試。結果不論是石斑或吳郭魚、直接採集沉積物或自粗過濾（濾袋）、磁珠使用量等，都可以得到足量的 DNA (14-46ng/ul)。另外在潮境工作站對珊瑚礁生態水槽及養殖魚水槽進行粗過濾及沉積物的採樣，同樣可取得足量的 DNA (5-14ng/ul)。由於在野外環境，可能無法採取到沉積物，而粗過濾也有可能無法取得足量的環境 DNA，因此需進一步使用孔隙更小的過濾器來過濾水體（圖 3）。

因此，在前期計畫中，我們開發 eDNA-collector 系統，此方法已順利取得中華民國專利，「專利號 I728559：循環式環境中微生物或生物分子收集系統及其方法」（圖 3）。為一種環境中微生物或生物分子收集方法包含：利用一可循環流體本體配置數個磁珠，以形成一磁珠循環式收集本體；將該可循環流體本體及其磁珠置於一環境中以循環流動方式收集數個微生物或生物分子樣本，以形成數個微生物或生物分子吸附磁珠；將數個該微生物或生物分子吸附磁珠自該可循環流體本體卸下或取出；及自數個該微生物或生物分子吸附磁珠進行後續取出數個該微生物或生物分子樣本。實際應用時，我們首先在實驗室中製備由磁棒結合磁珠的 eDNA-collector，並保存於離心管中，裡面放置保存液來保持 eDNA-collector 結合 DNA 的能力。在現場使用採水器取得水樣，並且將 eDNA-collector 放入容器水體中 3-5 分鐘，即可由 eDNA-collector 結合 eDNA。隨後，將 eDNA-collector 放回保存液中，可使環境 DNA 保持與 eDNA-collector 結合的狀態。攜回至實驗室後，將磁棒取出，並卸除磁珠。再使用實驗室常規的磁座進行裂解、洗淨及將 eDNA 溶出。由於在野外環境，eDNA 可能是以組織碎屑的方式存在，因此我們除了使用專利方法外，另外將抽取的水樣，再以 MilliporeSigma™ 的 SVHV010RS Sterivex-HV Durapore PVDF 0.45um 膠囊過濾器進行過濾法採樣，可以兼顧各種形式 eDNA，盡量取得更完整的數據（圖 3）。

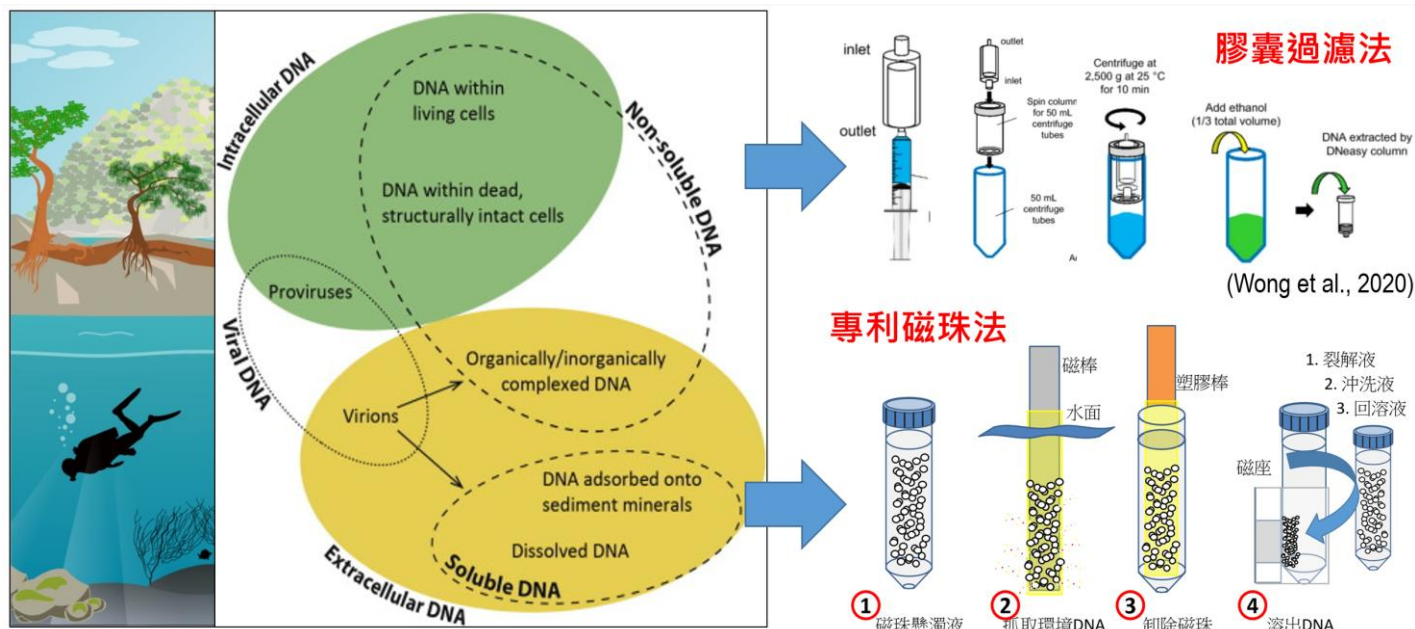


圖 3、本計畫使用的環境 DNA 採樣方法。溶解之 eDNA 主要使用自行開發之 eDNA-collector 系統。而生物組織碎屑則以膠囊過濾法進行。

四、環境 DNA 檢測實例－以和平島漁市為例

在過去研究中，我們在和平島漁市進行環境 DNA 實測（圖 4）。由於和平島漁市的魚獲眾多，且有許多海鮮餐廳及海鮮加工品店，因此魚獲物難以全面紀錄。我們首先於卸貨區及市場小賣區進行拍照記錄，並且觀察是否有較敏感的魚種。雖然我們從攤位上觀察到裸胸鯙物種、熱帶魚雀鯛及常見的經濟性食用魚等，但種類數目並不多。我們進一步使用 19 種通用引子對擴增 4 個 eDNA 樣本中物種的線粒體 DNA（12S、COI、ND5）片段，並通過 NovaSeq 6000 測序進行測序，並鑑定了 153 種魚類。在這些魚類中，包含 22 種軟骨魚類、14 種鰻形目和 15 種石斑科魚類。據我們所知，這項工作是第一項證明使用 eDNA 元條形碼方法進行大規模海鮮鑑定的可行性的研究。



圖 4、和平島漁市的調查結果及期刊發表。

五、環境 DNA 與海鮮製品之物種資料庫

在全年的調查偵測後，我們將來自於大溪、南方澳、深澳、和平島、東港、蚵仔寮、花蓮、富岡、竹圍、南寮、梧棲、馬公、鎖港漁港，及鯊魚凍、魚漿製品等數據進行總物種分析。一共鑑定出了條鰭魚綱 1731 個魚種（37 個目），盲鰻綱 4 種、及軟骨魚綱 239 個魚種（11 個目）及鯨豚類物種 9 種（圖 5）。而軟骨魚綱 239 個魚種中，則包括了 41 個科（圖 6）。目前台灣魚類資料庫中，總共有條鰭魚綱 2923 個魚種（33 個目），盲鰻綱 13 種、及軟骨魚綱 185 個魚種（14 個目）。顯示本計畫已獲得了近 59.2% 的魚種，若扣除淡水魚種，則比例將更高。而軟骨魚綱物種則甚至超過了台灣有記錄的物種數目。

Actinopterygii 條鰭魚綱	1731	18 Gonorynchiformes 鼠鱗目	2	36 Tetraodontiformes 鮎形目	87
1 Albuliformes 狐鱔目	4	19 Icosteiformes 鰐魚目	1	37 Zeiformes 的鯛目	8
2 Alepocephaliformes 黑頭魚目	1	20 Lampriformes 月魚目	9	Chondrichthyes 軟骨魚綱	239
3 Anguilliformes 鰻形目	93	21 Lophiiformes 鮫鱈目	19	38 Carcharhiniformes 真鯊目	80
4 Argentiniformes 水珍魚目	16	22 Mugiliformes 鱚形目	28	39 Chimaeriformes 銀鮫目	6
5 Ateleopodiformes 軟腕魚目	2	23 Myctophiformes 燈籠魚目	63	40 Echinorhiniformes 棘鯊目	1
6 Atheriniformes 銀漢魚目	5	24 Ophidiiformes 鰐魚目	11	41 Hexanchiformes 六鰓鯊目	4
7 Aulopiformes 仙女魚目	41	25 Osmeriformes 胡瓜魚目	3	42 Lamniformes 鯖鯊目	12
8 Beloniformes 鶴鱖目	38	26 Perciformes 鱸形目	917	43 Myliobatiformes 鱈目	56
9 Beryciformes 金眼鯛目	32	27 Pleuronectiformes 鰾形目	57	44 Orectolobiformes 鬚鯊目	3
10 Centrarchiformes 日鱸目	2	28 Polymixiiformes 銀眼鯛目	3	45 Rajiformes 鰐目	32
11 Cichliformes 慈鯛目	2	29 Salmoniformes 鮭形目	10	46 Squaliformes 角鯊目	35
12 Clupeiformes 鯵形目	44	30 Scombriformes 鯖形目	4	47 Squatiniformes 扁鯊目	5
13 Cypriniformes 鯉形目	11	31 Scorpaeniformes 鮨形目	101	48 Torpediniformes 電鯊目	5
14 Cyprinodontiformes 鱗形目	1	32 Siluriformes 鯰形目	13	Myxini 盲鰻綱	4
15 Elopiformes 海鱸目	5	33 Stephanoberyciformes 奇金眼鯛目	1	49 Myxiniformes 盲鰻目	4
16 Gadiformes 鱈形目	47	34 Stomiiformes 巨口魚目	41	Mammalia 哺乳綱	7
17 Gasterosteiformes 刺魚目	7	35 Synbranchiformes 合鰓魚目	2	50 Cetacea 鯨目	9

圖 5、漁港與海鮮製品調查偵測到之物種。

1 Alopiidae 狐鯊科	3	14 Hexanchidae 六鰓鯊科	3	27 Rhinobatidae 琵琶鱔科	3
2 Carcharhinidae 真鯊科	41	15 Lamnidae 鼠鯊科	5	28 Rhinochimaeridae 長吻銀鮫科	3
3 Centrophoridae 刺鯊科	8	16 Myliobatidae 鱈科	13	29 Rhynchobatidae 龍紋鱔科	4
4 Cetorhinidae 象鯊科	1	17 Narcinidae 雙鰭電鱔科	1	30 Scyliorhinidae 貓鯊科	16
5 Chimaeridae 銀鮫科	3	18 Odontaspidae 砂錐齒鯊科	2	31 Somniosidae 睡鯊科	2
6 Chlamydoselachidae 皺鰓鯊科	1	19 Orectolobidae 鬚鯊科	1	32 Sphyrnidae 雙髻鯊科	4
7 Dalatiidae 鎧鯊科	2	20 Platyrhinidae 黃點鮪科	2	33 Squalidae 角鯊科	13
8 Dasyatidae 魟科	36	21 Plesiobatidae 深水尾魟科	1	34 Squatinidae 扁鯊科	5
9 Echinorhinidae 笠鱗鯊科	1	22 Pseudocarchariidae 擬錐齒鯊科	1	35 Torpedinidae 電鱔科	4
10 Etmopteridae 烏鯊科	10	23 Pseudotriakidae 擬皺唇鯊科	1	36 Triakidae 皺唇鯊科	14
11 Gymnuridae 燕魟科	1	24 Rajidae 鰐科	1	37 Urolophidae 扁魟科	3
12 Hemigaleidae 半沙條鯊科	3	25 Rhincodontidae 鯨鯊科	24	總數	239
13 Hemiscylliidae 長尾鬚鯊科	1	26 Rhinidae 鰐頭鱔科	1		

圖 6、漁港與海鮮製品調查偵測到之軟骨魚物種。

六、漁港及海鮮製品之物種組成比較

在比較各漁港與海鮮製品後，我們可以發現，大溪的物種數最多，而且獨有的物種數也最多（圖 7）。單獨看軟骨魚時，也同樣得到大溪軟骨魚數目多的結果（圖 8）。由於大溪的魚獲大多來自於底棲及深海的魚種，例如鱸科、及鰻科物種等。而物種數目多的真鯊目物種中，各魚港及海鮮製品的物種數目差異不大，甚至在海鮮製品中的物種數目還多於漁港，這顯示真鯊目物種是海鮮製品中的重要原料來源。與此相比，魷、鱈、鰻等物種，則幾乎沒有被使用於魚漿製品中（圖 8）。目前的數據顯示，有豐富的軟骨魚被捕獲並且在海鮮製品上被利用，因此，收集完整基礎資料及完善更多採樣地點，應可進一步推測出敏感性物種的被利用狀況（圖 8）。

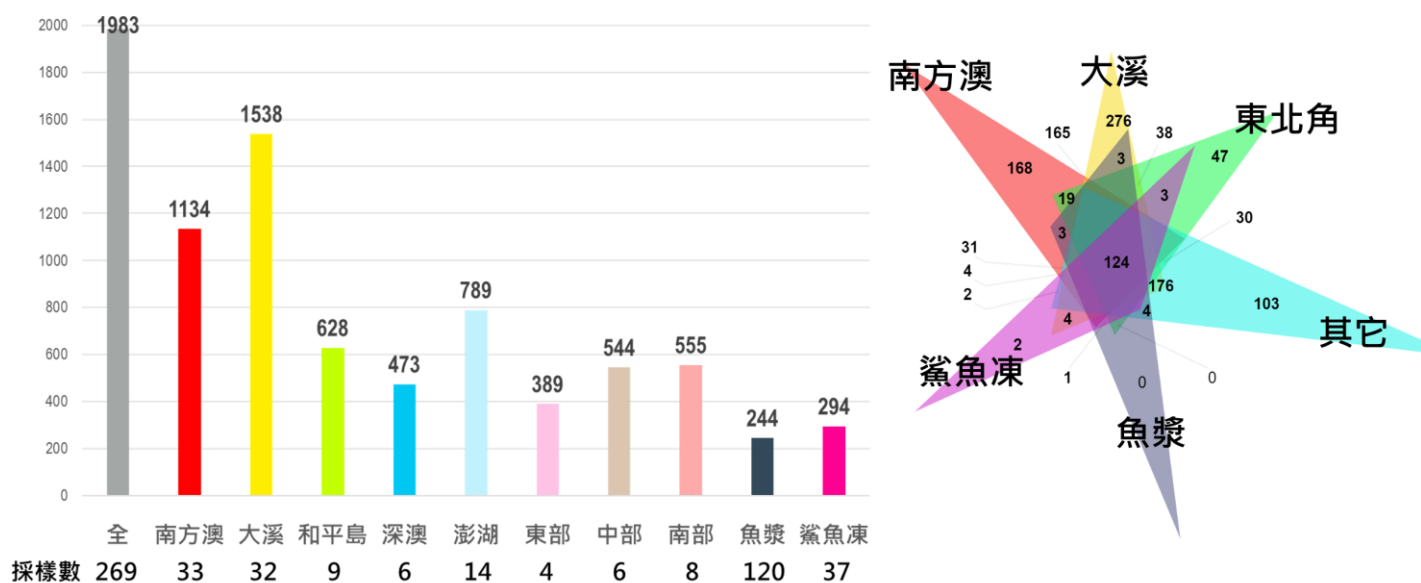


圖 7、各漁港與海鮮製品調查偵測到之物種數目及文氏圖。

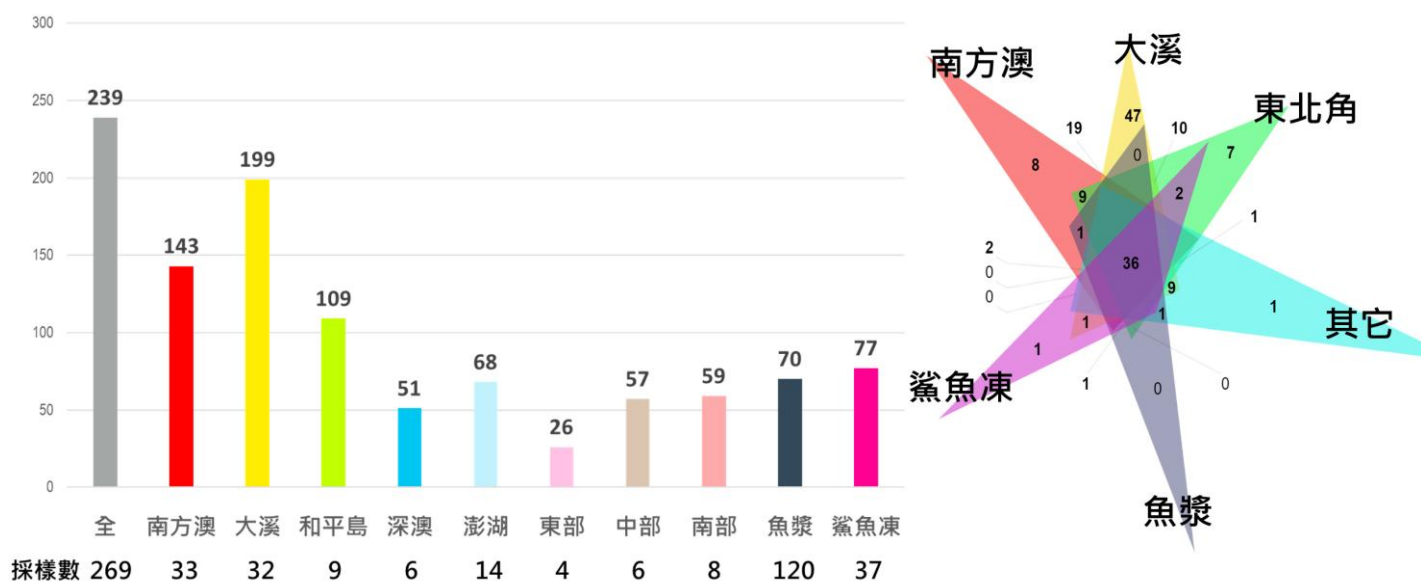


圖 8、各漁港與海鮮製品調查偵測到之軟骨魚綱物種數目及文氏圖。

研究目的

本研究目的，主要是應用環境 DNA 與元條碼（DNA metabarcoding）技術來調查敏感海洋生物，透過高效的環境 DNA 檢測技術的建立，釐清漁業活動及海鮮製品中的無意識混獲及利用現況。因此，初期（第一年）工作重點，將持續收集漁港及海鮮製品，並完善相關資料庫及檢測技術，包括：優化採集環境 DNA 的方法、開發偵測目標物種所需之分子探針、進行基因序列分析之最佳化條件、驗證偵測結果可靠性、建立標準作業流。後期（第二年）工作重點，則將在台灣各地漁港或海鮮製品實施大規模環境樣本採集，檢測出特定的保育類生物是否存在。

研究方法

本期計畫工作主要是建立環境 DNA 檢測技術平台，包括建立採集環境 DNA 最適條件與方法、開發偵測目標物種所需之分子探針、進行基因序列分析之最佳化條件、驗證偵測結果可靠性、建立標準作業流程等。另外在台灣兩個重要漁港，南方澳及大溪漁港每月進行採樣，建立完整的漁獲物資料，並分析其中是否具有重要或瀕危的的保育類生物，作為未來進行長期監測所需的比對資料。以上茲分述如下：

一、採集環境 DNA 最適條件與方法

採集之環境樣本主要為水體，採集之水體可適情況選擇直接採集法或過濾採集法。直接採集法，係指水體不經過濾直接萃取 DNA。過濾採集法，是將水體經由過濾而將 DNA 收集在濾膜上，隨後再萃取 DNA。由於濾膜的規格，隨材質（聚碳酸酯、硝酸纖維膜、玻璃纖維膜、尼龍膜）與孔徑而（0.22-1.5 μm ）有所不同，收集效果亦有所不同，經測試後選擇效果較佳的濾膜使用。此外，採集之水體現場立即過濾外，亦可保存後再進行過濾，但保存的溫度及時間亦需經由測試避免 DNA 因保存不當而導致降解。萃取 DNA 的部份，主要是利用市售的 DNA extraction kit，並將 DNA 溶液保存於 4 °C 再進行後續實驗。

二、開發擴增目標物種所需之通用引子對

初步將採用粒線體 DNA（Mitochondrial DNA, mtDNA）上之片段作為擴增目標物種所需之通用引子對。將參考美國國家生物技術資訊中心（National Center for Biotechnology Information, NCBI）線上資料庫所提供不同物種之粒線體 DNA 序列資訊設計通用引子對。另外主要使用 Miya（2015）所開發針對 12S 的 Mifish-E 及 Mifish-U，做為主要的通用引子對。將萃取完成的 DNA 樣本以及分子探針進行聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction, PCR）將特定基因片段進行大量擴增。PCR 反應條件依序為：第一階段、94°C，5 分鐘；第二階段、94°C，1 分鐘黏合溫度（ T_a ）視引子而異，1 分鐘、70°C，2 分鐘，共 30 個循環；第三階段：72°C，5 分鐘。最終產物透過凝膠電泳並進行 DNA 定序，確認及鑑別有無目標物種。

三、次世代平台使用

在前期研究中，我們使用了 Oxford Nanopore Technologies 所開發的第三代定序裝置 MinION 及 Illumina NOVAseq 平台。儘管 MinION 系統的特色在於方便攜帶，且可於個人實驗室中進行高通量的 DNA 定序，但我們目前使用 Illumina NOVAseq 平台為主要基礎數據建立使用。主要原因為 Illumina NOVAseq 平台數據量最大、價格經濟，在建立數據時，具有完整全面的優勢。而 Nanopore MinION 則較適合做為離實驗室較遠，無法當日來回，或需要快速獲得數據使用（圖 9）。

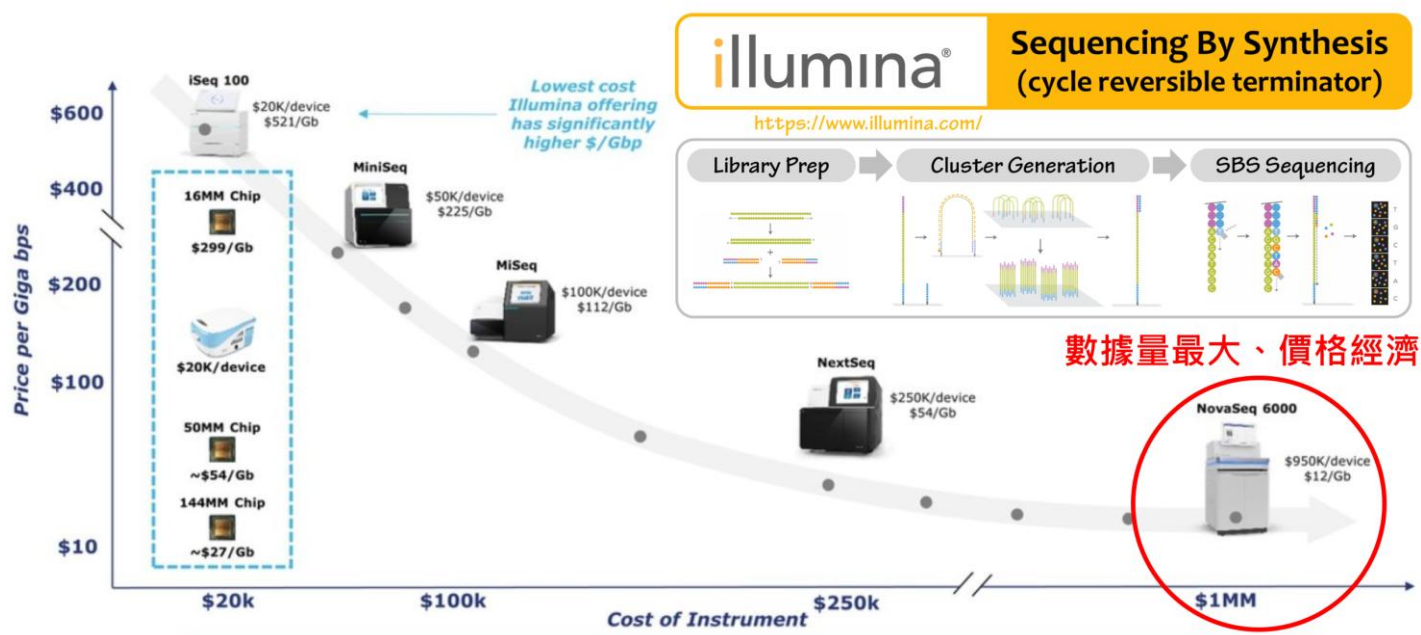


圖 9、本計畫用於基礎數據所採用的 Illumina 平台比較。

五、標準作業流程

為進行大規模採集並進行比較，將依過去執行相關計畫的經驗設計作業流程，接著對研究人員進行統一的教育訓練，以減少大規模樣本採集的人為偏差影響。

六、長期環境樣本採集

研究人員將於南方澳及大溪漁港進行樣本採集預計每個月採集一次，共 24 個樣本。另外全台其它漁港則以每季或每半年採集一次。海鮮製品以魚漿製品、鯊魚凍、魚露、魚油、魚粉等為主，視初步獲得敏感物種的情況進行更仔細全面的採樣。

七、數據分析

將獲得的 DNA 數據進行分類整理，並且與美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 線上資料庫進行物種比對。隨後整理列表，將其中的重要物種及瀕危的保育類物種進行分析。

八、可能遭遇之困難及解決途徑

(1) 環境 DNA 技術及分析：本研究主持人長期進行分子標記的研究，且於前期計畫順利開發環境 DNA 技術，相信可順利解決後續分析問題。(2) 敏感物種的 DNA 檢測技術開發：由於研究的目的是希望偵測出敏感海洋生物，但不能保證在漁港及漁獲中會有目標物種。因此本計畫將搭配貢寮水生中心及海科館潮境工作站蓄養的活體敏感海洋生物進行測試，解決方法的開發及驗證問題。(3) 長期環境樣本的採集：由於大規模環境樣本的採集耗時耗力，因此我們仍聚焦於東北角地區的南方澳及大溪漁港，全台各地漁港則以每季至每半年進行調查，若發現需深入研究之區域則再調整。

預期效益

1. 完成南方澳及大溪漁港的長期採集調查（每月1次，共24次）。
2. 完成南方澳及大溪漁港的敏感海洋生物分析。
3. 完成全台漁港的長期採集調查（至少4個漁港、每半年1次，共8次）
4. 完成海鮮製品的採集調查（至少3種品項，共20個樣本）
5. 於計畫執行結束1年內，在國內外刊物發表1篇。

研究預定進度

一、預定進度

第一年												
研究項目	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
樣本採集												
數據分析												
第二年												
研究項目	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
樣本採集												
數據分析												

二、預定查核點

查核點 編號	預定完成時間 (年/月)	查核點概況說明
1	113 年 12 月	漁港及海鮮製品調查結果（漁港至少 32 筆、海鮮製品至少 20 個樣本）
2	114 年 12 月	漁港及海鮮製品調查結果（漁港至少 32 筆、海鮮製品至少 20 個樣本）

捌、經費配置表

第一年

經費項目		數量	單價	金額	說明
人事費	兼任獎助生	12	10,000	120,000	每人每月編列 10,000 元整。
業務費	研究耗材項目	52	15000	780,000	漁港共 32 筆、海鮮製品 20 筆
行政管理費(12%)		--	--	108,000	計畫總金額*0.12
總和				1,008,000	

第二年

經費項目		數量	單價	金額	說明
人事費	兼任獎助生	12	10,000	120,000	每人每月編列 10,000 元整。
業務費	研究耗材項目	52	15000	780,000	漁港共 32 筆、海鮮製品 20 筆
行政管理費(12%)		--	--	108,000	計畫總金額*0.12
總和				1,008,000	

結果與討論

一、總物種清單

在全年的 eDNA 調查偵測後，我們匯總了來自大溪 (DX)、南方澳 (NF)、其它漁港 (F；包含深澳、和平島、東港、蚵仔寮、花蓮、富岡、竹圍、南寮、梧棲、馬公、鎖港) 以及海鮮製品 (S；包含鯊魚凍、魚漿製品) 的所有數據，進行了總體物種分析。

總體物種鑑定結果

為了進一步提升物種鑑定的準確性，本次分析我們捨棄了過去使用的 97% 相似度，改用更為嚴謹的 99% 相似度來進行 OUT (Operational Taxonomic Unit) 類聚。在前期報告中 (使用 97%)，我們一共得到了 2124 個物種；而在本期使用 99% 相似度重整後，仍鑑定出了 1912 個物種。雖然物種總數因閾值提高而略微下降，但這份名錄的可靠性顯著提升。根據鑑定結果 (圖 7)，這 1912 個物種涵蓋了多個綱：條鰭魚綱 (Actinopterygii)：佔絕大多數，共 1677 個物種 (分屬 36 個目)。軟骨魚綱 (Chondrichthyes)：共 224 個物種 (分屬 11 個目)。盲鰻綱 (Myxini)：共 3 個物種。哺乳綱 (Mammalia)：也偵測到 8 種鯨豚類物種。

物種名錄的交叉比對與數據驗證

為了驗證這 1912 個物種在台灣海域出現的合理性，我們將此 eDNA 名錄與「臺灣物種名錄資料庫」(TaiBIF) 進行了關鍵的交叉比對。根據 (2025 年 10 月) 的資料，該資料庫共收錄有 3567 個魚種 (圖 8)。比對後發現，在我們偵測到的 1912 個物種中，有 647 個物種並未存在於目前的臺灣物種名錄中。我們針對這 647 個「名錄外物種」進行了進一步的詳細分析 (圖 8)：合理的未收錄物種 (260 個)：經查證台灣魚類資料庫，這 260 個學名均為有效學名。這些物種雖然尚未被收錄於臺灣物種名錄，但大多僅是尚未登錄。另外有些 eDNA 的出現，可能代表著台灣海域的新發現種、尚未被正式登錄的原生物種、或是已在本地建立族群的外來種。需進一步確認的物種 (387 個)：剩餘的 387 個物種，其已知的地理分佈點與台灣明顯不符，需要深入探討其 eDNA 的來源。我們將這 387 個物種依據其生物地理學特性，歸納為三種可能的來源 (圖 9)：漁業 (遠洋) 帶入 (161 種，佔 41.60%)：這 161 個物種主要分佈於大西洋、北太平洋冷水域、印度洋或南半球。這些物種雖非台灣原生物種，但卻是台灣遠洋漁船 (如延繩釣、拖網) 在國外經濟海域的常見捕撈目標。其 eDNA 出現在漁獲集散的漁港中，被認為是合理的生物訊號殘留。水產養殖逸出 (27 種，佔 6.98%)：此類群包含了已知在台灣有養殖紀錄 (如非洲 LMB) 或作為大量觀賞魚貿易的非本土物種 (如觀賞用雀鯊)。牠們的 eDNA 訊號，推測可能來自漁港周邊養殖場的廢水逸出，或是不當放流事件。完全不合理 (數據錯誤/污染) (199 種，佔 51.42%)：此類群佔了近一半，包含了高度地方性特有種 (如特定島嶼、澳洲特有種)，以及難以用任何漁業貿易解釋的極地/美洲/非洲小型淡水魚。這些物種的 eDNA 訊號出現在台灣漁港的可能性極低。我們高度懷疑，這些結果是來自於 NCBI 公共數據庫的序列比對錯誤 (參考序列標記錯誤)，或是實驗室到數據分析過程中的樣本污染。根據上述的數據清洗流程，在 1912 個總物種中，我們標記了 199 個物種為「高度不合理」的數據 (圖 9)，其佔總數據的 10.4% (199/1912)。雖然目前我們對這些數據進行標示並暫時保留，但在進行後續的生物多樣性分析時，應將其排除。因此，扣除這 199 個錯誤/污染數據後，我們獲得了 1713 個「高可靠物種」(1912-199 = 1713)。這份名錄為後續分析台灣漁港的生物多樣性、漁業資源利用，以及外來物種入侵監測，提供了更為堅實可靠的基礎。

1	Acipenseriformes 鱘形目	1	15	Elopiformes 海鱸目	5	29	Scorpaeniformes 鮋形目	92	1	Carcharhiniformes 真鯊目	77
2	Actinopteri 鱗形目	1	16	Gadiformes 鱈形目	50	30	Siluriformes 鯰形目	11	2	Chimaeriformes 銀鮫目	8
3	Albuliformes 狐鱔目	5	17	Gasterosteiformes 刺魚目	8	31	Stephanoberyciformes 奇金眼鯢	1	3	Echinorhiniformes 棘鯊目	1
4	Alepocephaliformes 黑頭魚目	1	18	Gonorynchiformes 鼠鱗目	2	32	Stomiiformes 巨口魚目	38	4	Hexanchiformes 六鰓鯊目	4
5	Anguilliformes 鰻形目	93	19	Lampriformes 月魚目	8	33	Synbranchiformes 合鰓魚目	1	5	Lamniformes 鯖鯊目	12
6	Argentiniiformes 水珍魚目	12	20	Lophiiformes 鮫鱈目	20	34	Tetraodontiformes 魷形目	75	6	Myliobatiformes 鱘目	51
7	Ateleopodiformes 軟腕魚目	2	21	Mugiliformes 鱚形目	21	35	Trachichthyiformes 燧鯛目	1	7	Orectolobiformes 鬚鯊目	3
8	Atheriniformes 銀漢魚目	6	22	Myctophiformes 燈籠魚目	58	36	Zeiformes 的鯛目	8	8	Rajiformes 鰐目	26
9	Aulopiformes 仙女魚目	42	23	Ophidiiformes 鼬魚目	9		Actinopterygii 條鰭魚綱	1677	9	Squaliformes 角鯊目	33
10	Beloniformes 鶴鱺目	36	24	Osmeriformes 胡瓜魚目	3				10	Squatinaformes 扁鯊目	5
11	Beryciformes 金眼鯛目	28	25	Perciformes 鱈形目	899	1	Myxiniformes 盲鰻目	3	11	Torpediniformes 電鰻目	4
12	Clupeiformes 鯵形目	50	26	Pleuronectiformes 鰈形目	64		Myxini 盲鰻綱	3		Chondrichthyes 軟骨魚綱	224
13	Cypriniformes 鯉形目	11	27	Polymixiiformes 銀眼鯛目	3	1	Cetacea 鯨目	8			
14	Cyprinodontiformes 鱒形目	2	28	Salmoniformes 鮭形目	10		Mammalia 哺乳綱	8			
										總物種數	1912

圖 7、截至本期漁港調查偵測到之物種。



目前(2025/10月)收錄有3567個學名

eDNA資料1912個進行比對

其中發現647個學名不存在於資料庫

260個學名合理 (資料庫尚未收錄)

387個學名需確認 (分佈地點不符合)

遠洋漁業、水產養殖可能進入

資料庫錯誤或序列污染

圖 8、與台灣物種名錄進行比對的結果。

分類	數量	比例	定義與判斷依據
漁業 (遠洋)	161	41.60%	主要分佈於大西洋、北太平洋冷水域、南半球的魚種，這些物種是台灣遠洋漁船的常見捕撈目標，其 eDNA 在漁港是合理的。
水產養殖	27	6.98%	已知在台灣有養殖或大量觀賞魚貿易紀錄的非本土物種（如非洲慈鯛、觀賞用雀鯛），其 eDNA 可能來自漁港周邊的養殖場或廢水逸出。
完全不合理 (數據錯誤/污染)	199	51.42%	高度地方性特有種（如特定島嶼、澳洲特有種）、難以用漁業貿易解釋的極地/美洲/非洲小型淡水魚。eDNA 出現極可能是 NCBI 序列比對錯誤或數據污染。

➡ 目前有約有10.4% (199/1912)數據需確認，目前先進行標示保留。

圖 9、查證魚種清單及結果。

二、漁港及海鮮製品之物種組成比較

在比較各類別之物種組成（大溪漁港 DX、南方澳漁港 NF、其它漁港 F 與海鮮製品 S），我們從物種分佈的文氏圖（圖 10）中可以發現，大溪漁港不僅物種總數最多，其獨有的物種數（204 種）也顯著高於南方澳（165 種）和其它漁港（155 種）。若單獨觀察軟骨魚總綱的物種數（圖 10 柱狀圖的藍色柱；圖 11 表格），也得到一致的結果：大溪的軟骨魚物種數（194 種）在所有採樣點中位居第一。

這種高度的物種獨特性，可能與採樣地的漁法差異有關。PCoA 分析圖（圖 12）顯示，大溪的樣本（紅點）明顯自成一群，並與「底拖網」漁法有強烈關聯。這一點也印證在物種統計表（圖 11）中：大溪在主要來自底棲的鰩目（Myliobatiformes, 42 種）及鰻目（Rajiformes, 24 種）上，物種數均為最高。與此相對，南方澳的樣本（綠點）則主要與「延繩釣」漁法相關。在分析特定物種的利用情況時，我們發現：真鯊目（Carcharhiniformes）：作為物種數最多的目，真鯊目在各漁港間的物種數差異不大（介於 59 至 66 種之間），同時在海鮮製品中也檢測到 55 種（圖 11）。這顯示真鯊目物種是海鮮製品中穩定且重要的原料來源之一。鰩目與鰻目（Myliobatiformes and Rajiformes）：與真鯊目形成鮮明對比，這些主要由底拖網捕獲的底棲軟骨魚，在海鮮製品中的物種數則顯著偏低（分別僅 7 種與 5 種）（圖 11）。這可能暗示，相較於鯊魚，魷、鰩、鰻等物種較少被加工成魚漿等製品，或是其 DNA 在加工過程中更易降解而難以檢出。PCoA 分析（圖 12）也顯示，「海鮮製品」（黃點）的物種組成自成一群，其組成特性混合了來自各漁港的來源，這證實了其作為加工混合物的屬性。

總結來說，目前的數據顯示有豐富的軟骨魚物種在台灣東北部漁港被捕獲，且許多物種（特別是真鯊目）正被海鮮製品廣泛利用。因此，未來應持續收集更完整的基礎資料，並擴大採樣地點（例如增加零售市場的採樣），這將有助於進一步追蹤與推測特定敏感性物種的實際被利用狀況。

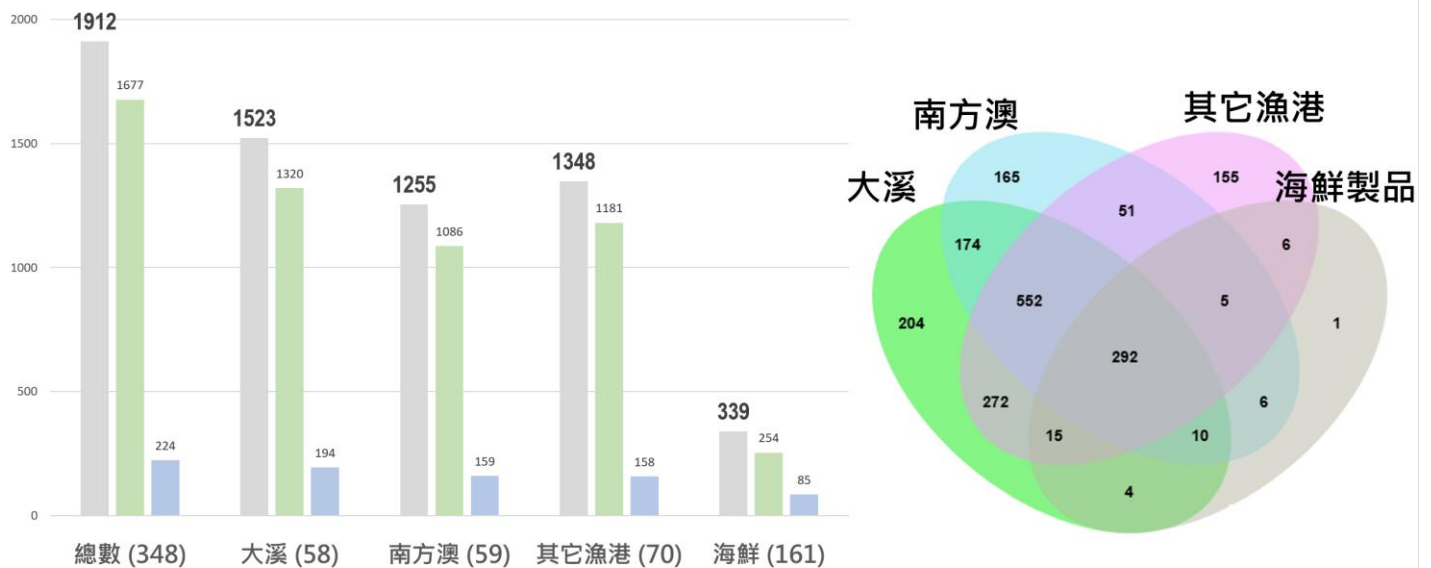
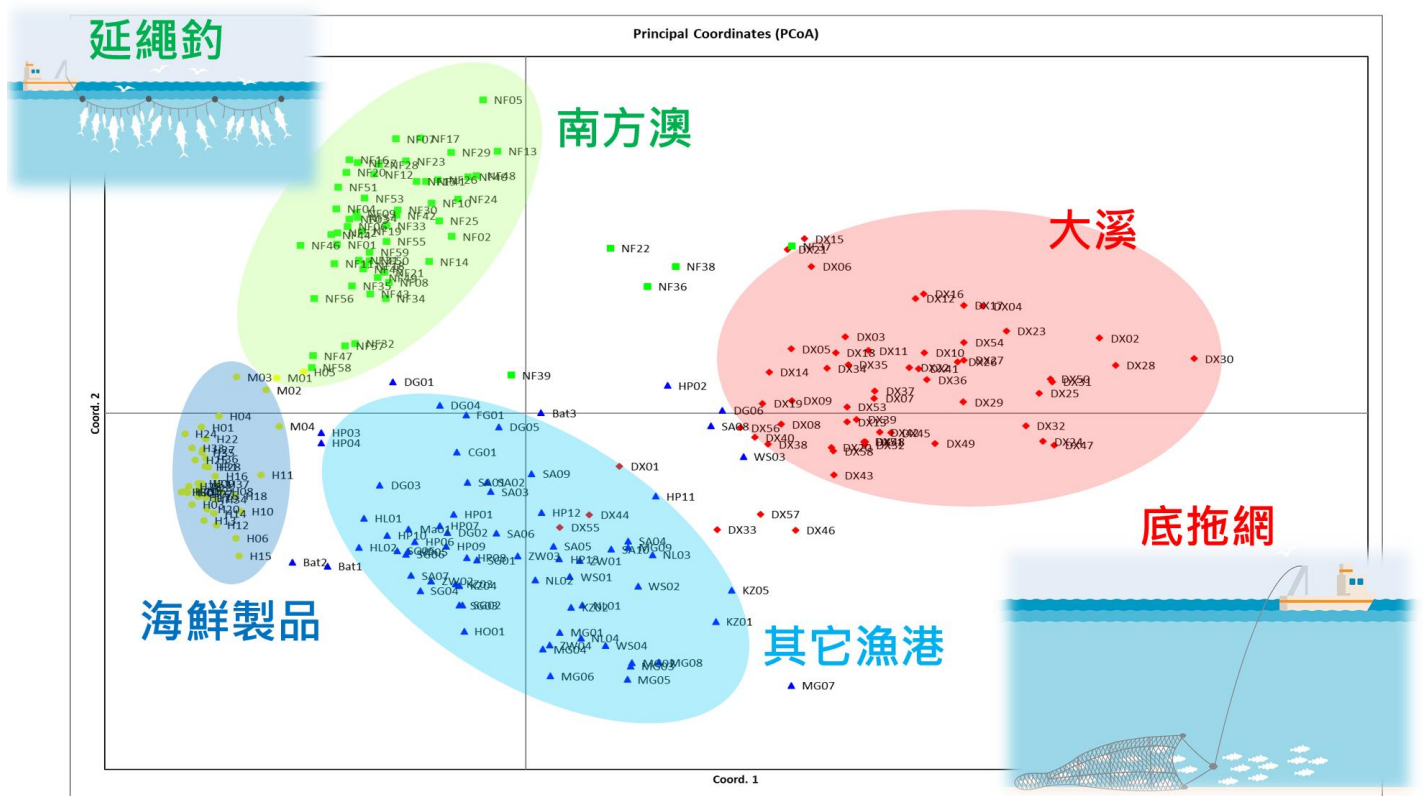


圖 10、各類別調查偵測到之物種數目及文氏圖。

項目	總數	大溪	南方澳	其它漁港	海鮮
Carcharhiniformes 真鯊目	77	66	63	59	55
Chimaeriformes 銀鮫目	8	8	6	5	1
Echinorhiniformes 棘鯊目	1	1	0	0	0
Hexanchiformes 六鰓鯊目	4	4	2	1	0
Lamniformes 鯖鯊目	12	11	12	9	10
Myliobatiformes 鰐目	51	42	36	43	7
Orectolobiformes 鬚鯊目	3	2	2	2	0
Rajiformes 鰐目	26	24	15	19	5
Squaliformes 角鯊目	33	27	20	19	5
Squatiniformes 扁鯊目	5	5	2	1	2
Torpediniformes 電鰐目	4	4	1	0	0
Chondrichthyes 軟骨魚綱	224	194	159	158	85
Cetacea 鯨目	8	6	8	6	0



三、敏感物種的 eDNA 篩查

在軟骨魚類中，路氏雙髻鯊（*Sphyrna lewini*）的 eDNA 訊號最為突出，其總體相對豐度高達 3.3%。數據分析揭示了幾個關鍵點：高度的港口特異性：此物種的訊號在南方澳（7.036%）呈現極端高峰，遠高於大溪（0.383%）或其它漁港（1.208%），這強烈暗示南方澳是此物種被捕獲、卸貨或加工的主要地

點之一（圖 13）。加工製品的直接證據：更重要的是，「海鮮」樣本中的訊號也高達 4.608%。這與長鰭真鯊（*Carcharhinus longimanus*）的情況相似，後者在「海鮮」中的訊號（0.146%）也是所有來源中最高的。這兩項證據共同且有力地表明，這些被 IUCN 列為「極危」等級的鯊魚物種，正被當作原料，廣泛使用於我們採樣的魚漿、鯊魚凍等海鮮加工製品中。此外，清單中還穩定偵測到其他多種 CR 物種，如錐齒鯊（*Carcharias taurus*）、多種龍紋鱈（如吉他龍紋鱈、薛氏琵琶鱈）以及扁鯊（*Squatina squatina*）等，牠們的 DNA 訊號也主要分佈在「其它漁港」和「海鮮」樣本中（圖 13）。

本研究的另一個重大發現是，eDNA 同時偵測到了多種同屬 CR 等級的鯨豚類（哺乳綱），包括真海豚（*Delphinus delphis*）、短肢领航鯨（*Globicephala macrorhynchus*）和瑞氏海豚（*Grampus griseus*）等。對於鯨豚類，其 eDNA 訊號主要來自港口水體（南方澳、其它漁港）（圖 13）。這雖然不一定代表牠們被「利用」，但至少也是這些極危物種在漁業活動頻繁的港口周邊水域的證據。總而言之，eDNA 作為一個非侵入性的監測工具，能有效揭露受威脅物種的實際利用情況與環境分佈，為未來的漁業管理與保育政策提供了關鍵的科學依據。

總數	大溪	南方澳	其它漁港	海鮮	學名	中文名	IUCN
0.0455	0.001	0.034	0.001	0.146	<i>Carcharhinus longimanus</i>	長鰭真鯊	CR
0.003	0.001	0.003	0.001	0.007	<i>Carcharhinus porosus</i>	小尾真鯊	CR
0.00025	0.001	0	0	0	<i>Myliobatis aquila</i>	隼鱈	CR
0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	<i>Carcharias taurus</i>	錐齒鯊	CR
0.0005	0.001	0	0.001	0	<i>Dipturus intermedius</i>	中間長吻鰻	CR
0.00675	0.001	0.001	0.024	0.001	<i>Rhinobatos schlegelii</i>	薛氏琵琶鱈	CR
0.0075	0.004	0.001	0.01	0.015	<i>Rhynchobatus djiddensis</i>	吉打龍紋鱈	CR
0.00075	0	0.001	0.001	0.001	<i>Rhynchobatus australiae</i>	南方龍紋鱈	CR
0.0005	0.001	0.001	0	0	<i>Rhynchobatus laevis</i>	光滑龍紋鱈	CR
0.0005	0.001	0	0.001	0	<i>Cephaloscyllium albipinnum</i>	白鰭頭鯊	CR
3.30875	0.383	7.036	1.208	4.608	<i>Sphyrna lewini</i>	路易氏雙髻鯊	CR
0.0005	0	0	0.001	0.001	<i>Sphyrna mokarran</i>	無溝雙髻鯊	CR
0.0005	0.001	0.001	0	0	<i>Squatina legnota</i>	色邊扁鯊	CR
0.0005	0.001	0	0	0.001	<i>Squatina squatina</i>	扁鯊	CR
0.0005	0	0.001	0.001	0	<i>Galeorhinus galeus</i>	翅鯊	CR
0.00075	0.001	0.001	0.001	0	<i>Delphinus delphis</i>	真海豚	CR
0.0005	0	0.001	0.001	0	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	短肢领航鯨	CR
0.00075	0.001	0.001	0.001	0	<i>Grampus griseus</i>	瑞氏海豚	CR
0.00075	0.001	0.001	0.001	0	<i>Lagenodelphis hosei</i>	弗氏海豚	CR
0.0005	0.001	0.001	0	0	<i>Stenella attenuata</i>	熱帶斑海豚	CR
0.00075	0.001	0.001	0.001	0	<i>Stenella longirostris</i>	長吻飛旋海豚	CR
0.00075	0.001	0.001	0.001	0	<i>Steno bredanensis</i>	糙齒海豚	CR
0.00025	0	0.001	0	0	<i>Kogia breviceps</i>	小抹香鯨	CR

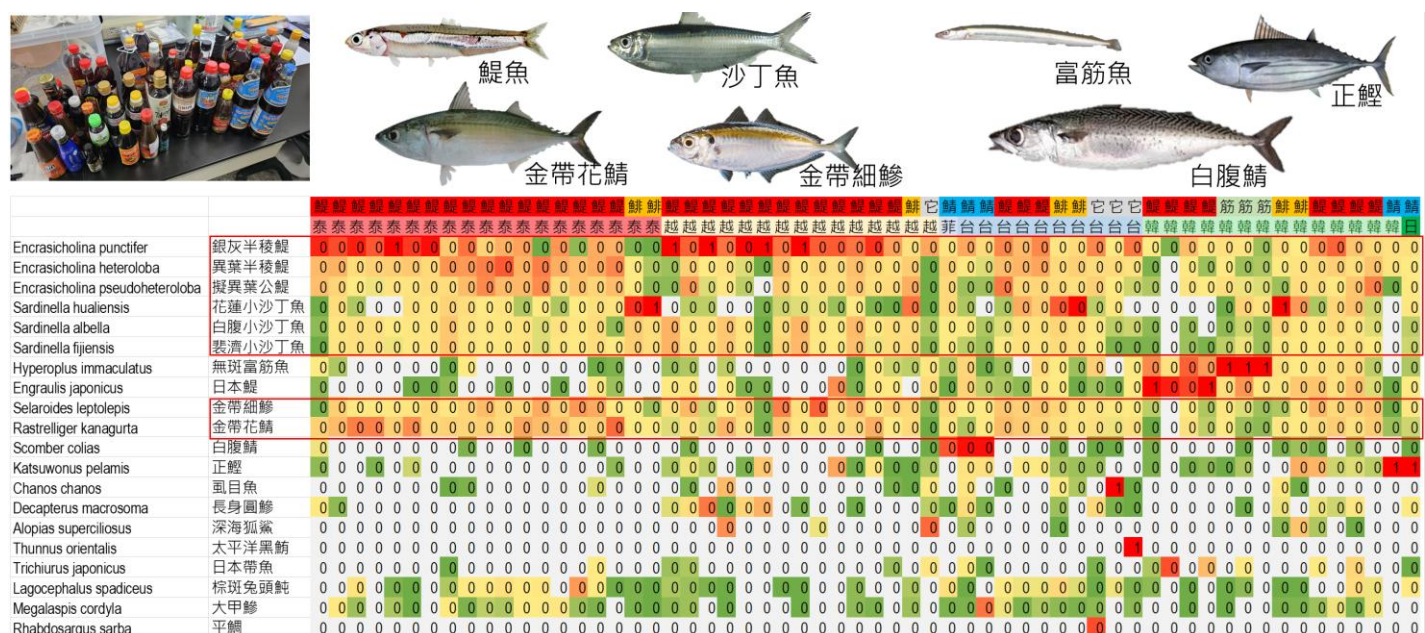
圖 13、各類別數據中的敏感物種。

四、應用元條碼技術鑑別魚露製品

魚露，又稱魚醬或魚醬油，是閩菜、潮州菜及東南亞料理中不可或缺的調味料。它以小型魚蝦為原料，經醃漬、發酵和熬煉製成，呈琥珀色，味道鹹中帶鮮。傳統上，越南和泰國是魚露的主要生產國，但台灣、韓國與日本亦有生產具地方特色的魚醬油。

研究方法與核心發現

本期我們蒐集了來自泰國、越南、菲律賓、台灣、韓國及日本的 60 份市售魚露及魚醬油產品（如圖 14 左上角所示），並透過 eDNA 元條碼（Metabarcoding）技術分析其魚種組成，旨在深入了解產品的真實原料來源，並揭示標籤之外可能被忽略的成分。研究結果（圖 14）非常清晰地顯示了兩種截然不



五、應用環境 DNA 技術於野外生態調查

本期計畫應用 eDNA 來調查淡水水域的魚種。在基隆及新北市選擇了 11 個淡水池塘進行調查（圖 15-17）。這幾個池塘的特點是離住宅區近，是在地居民容易抵達進行休閒活動的半野外環境。每個地點至少進行 2 次 eDNA 調查（部分進行 3 次），11 個地點一共發現了 28 個魚種，其中 16 種為外來物種（草魚、藍寶石魚、青魚、大口黑鱸、吉利吳郭魚、吳郭魚、火口魚、紅寶石魚、線鱧、翼甲鯰、虹鱒、孔雀魚、大肚魚、玻璃魚、鰱魚、鰻魚等。），12 種為在地物種（極樂吻蝦虎、高體鰟鮒、臺灣石鮒、大眼華鰮、鰲條、花鰻鱺、黃鰪、鯽魚、鯉魚、扁圓吻鮠、臺灣鬚鰻、紅鰱鮒等）（圖 18-19）。



圖 15、以環境 DNA 在 11 處淡水池塘進行調查。

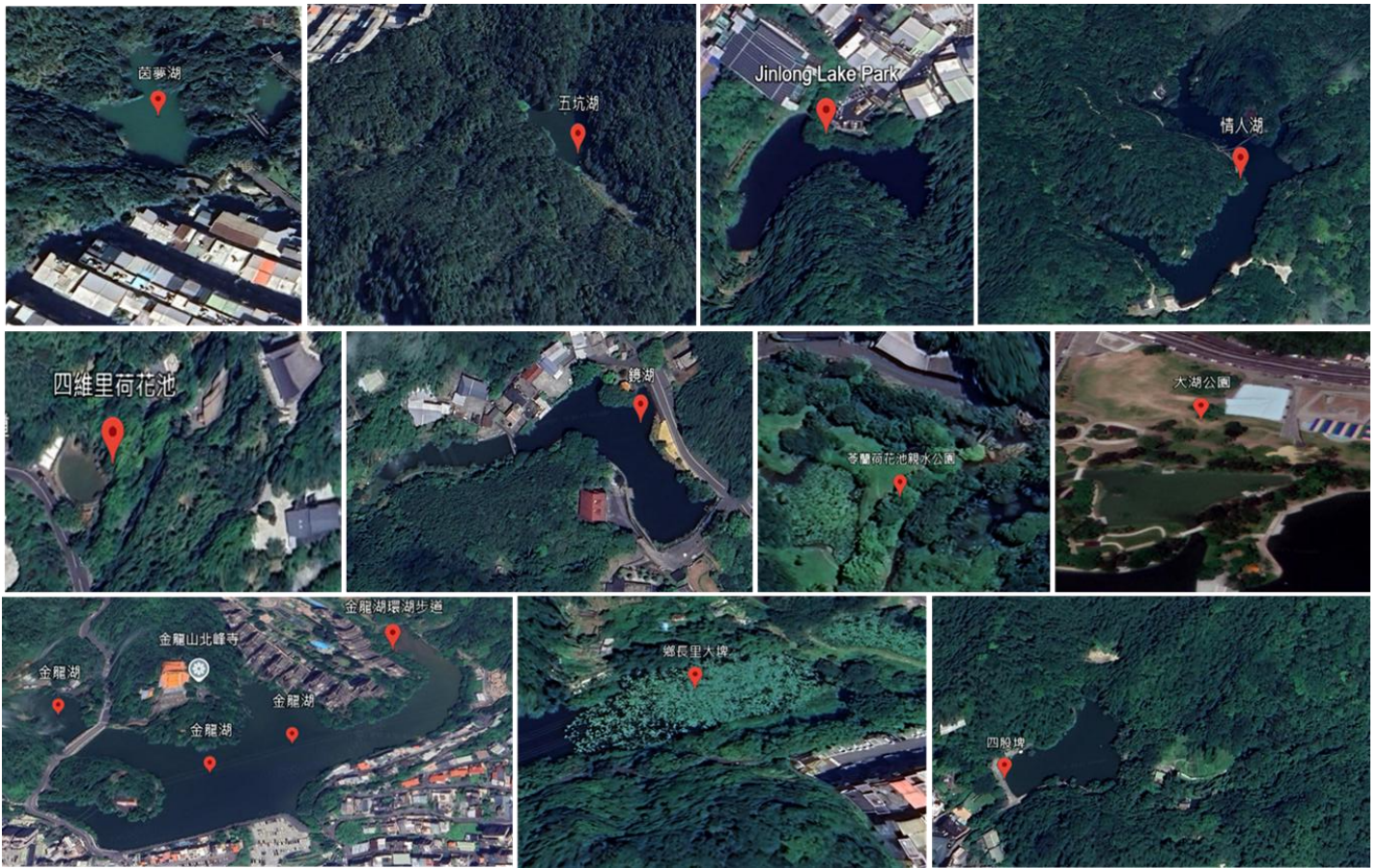


圖 16、以環境 DNA 在 11 處淡水池塘進行調查。

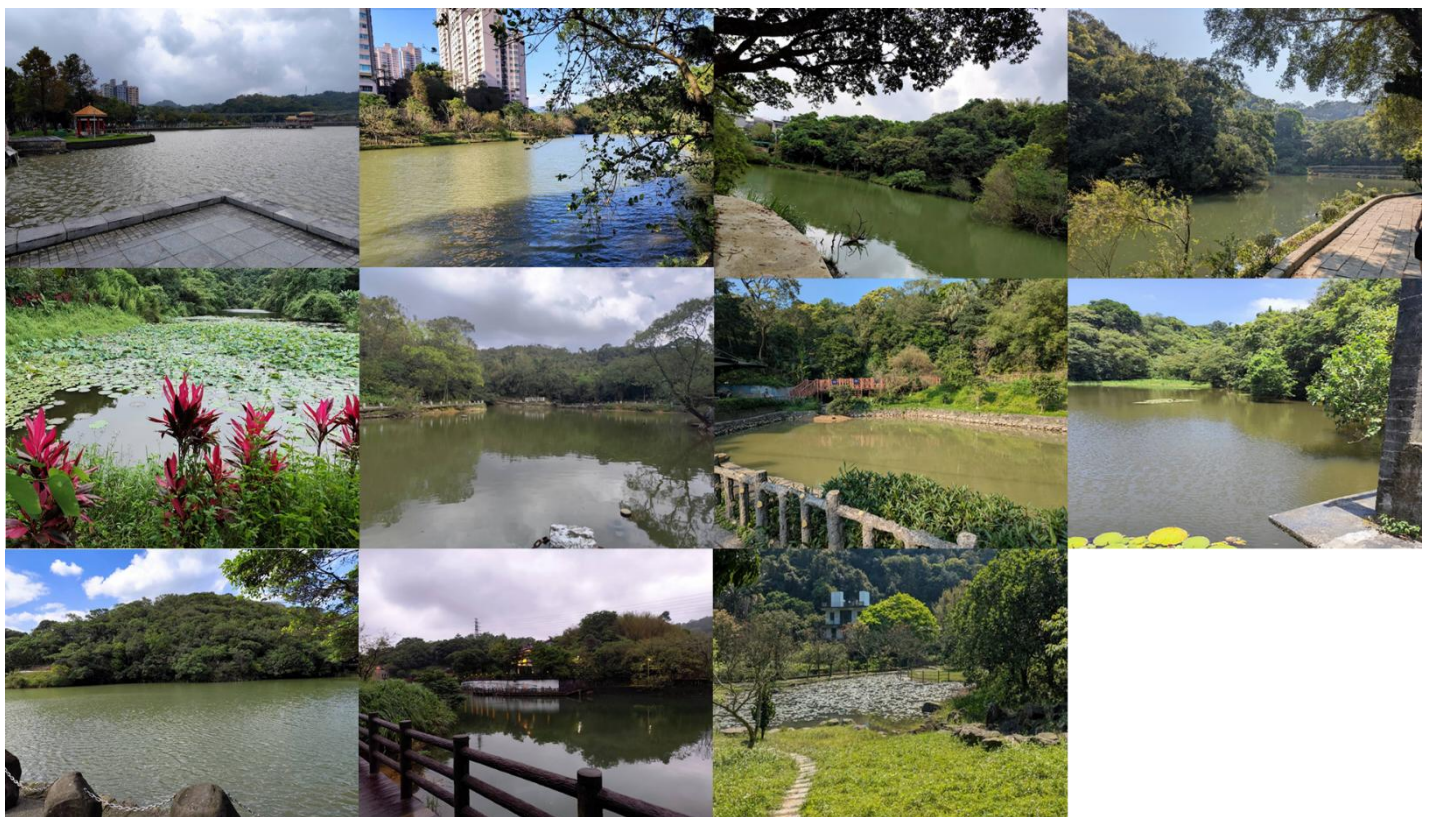


圖 17、以環境 DNA 在 11 處淡水池塘進行調查。

物種	大湖	金龍湖	鄉長里	四股	情人湖	芩蘭	鏡湖	茵夢湖	五坑湖	金園	四維里
花鰻鱺											
臺灣鬚鱨											
鯽魚											
紅鰭鮒											
鯉魚											
扁圓吻鮠											
餐											
黃鰱											
極樂吻鰕虎											
高體鰟鮍											
大眼華鰮											
臺灣石鮒											
線鱧											
吉利慈鯛											
草魚											
大肚魚											
藍寶石											
鰱魚											
鰻魚											
大口黑鱸											
青魚											
虹鱖											
吳郭魚											
蛙副雙邊魚											
孔雀魚											
火口魚											
翼甲鯰											
紅寶石											

圖 18、以環境 DNA 在淡水池塘進行調查獲得的魚種清單。



圖 19、以環境 DNA 在淡水池塘進行調查獲得的魚種清單圖。

六、本期計畫檢討與建議

與前期計畫相比，本計畫成功地延續了前期已建立的採樣點，並完成了全年度的數據收集。截至目前，我們已累積了 348 筆來自各漁港及海鮮製品的 eDNA 資料，並從中鑑定出至少 1912 種魚種。這份貫穿全年的數據清單，使我們能做出幾項關鍵結論：

證實敏感物種的普遍存在：累計的數據證實，台灣漁港的漁獲中確實混有大量的敏感性物種，包括我們偵測到的 8 種鯨豚類。研究顯示，無論是不同的地理區域（大溪、南方澳、其它漁港）、不同的漁法（延繩釣、底拖網），或是加工後的「海鮮製品」，均能穩定偵測到敏感性物種的 eDNA 訊號。

鎖定關鍵監測產品：在軟骨魚的追蹤上，我們發現鯊魚凍及魚漿製品是極佳的監測樣本。透過分析這些終端產品，我們能有效釐清實際被加工利用的軟骨魚種類，特別是那些受威脅（IUCN 極危）的鯊魚物種。

揭示淡水環境的生態危機：本期我們特別新增了野外淡水池塘的調查，結果令人憂心。eDNA 數據明確顯示，台灣的淡水池塘已遭受外來物種的嚴重影響。在所有的調查地點中，均發現了外來入侵物

種的存在，這意味著本土原生淡水物種的生存正受到嚴重威脅。

未來工作展望由於基礎數據的建立需要長時間的積累，且不同漁港的魚獲物種組成各異，本計畫所建立的數據庫將是未來漁業管理及保育政策的關鍵基本資料。

基於本期的成果，我們規劃了下一期的研究方向：

持續建立全台漁港基礎數據：我們將繼續進行漁港的常態性採樣，以擴充這個全台漁港的 eDNA 基礎數據庫，並計畫以此成果申請國科會的後續計畫，以確保監測的長期性。

研發特定物種的快速鑑定技術：除了廣泛的群落分析，下一期我們將投入研發針對特定敏感物種（如路氏雙髻鯊、大洋狐鮫等）的快速偵測及鑑定方法（例如 qPCR 或 LAMP），以便進行更即時、更精準的現場執法或查核。

深入加工品供應鏈分析：我們將持續進行魚類加工品（特別是魚漿與鯊魚凍）的深入分析，不僅是為了鑑定物種，更希望能藉此建立「環境友善魚類製品」的概念，為消費者提供可追溯且符合保育標準的產品選擇。

數據整理與發表：本計畫所獲得的龐大 eDNA 數據清單將被陸續整理，我們已開始準備將相關研究成果撰寫成學術論文，進行發表。

參考文獻

- Bakker J, Wangensteen OS, Chapman DD, et al. (2017) Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact. *Scientific Reports* 7.
- Bonanomi S, Pellissier L, Therkildsen NO, et al. (2015) Archived DNA reveals fisheries and climate induced collapse of a major fishery. *Scientific Reports* 5.
- Boussarie G, Bakker J, Wangensteen OS, et al. (2018) Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks. *Science Advances* 4.
- Choy CPP, Wainwright BJ (2022) What Is in your shark fin soup? probably an endangered shark species and a bit of mercury. *Animals*, 12, 7.
- D'Alessandro S, Mariani S (2021) Sifting environmental DNA metabarcoding data sets for rapid reconstruction of marine food webs. *Fish and Fisheries*, 22, 822–833.
- Hunter ME, Ferrante JA, Meigs-Friend G, Ulmer A (2019) Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques. *Scientific Reports*, 9, 5259.
- Lee HT, Liao CH, Hsu TH (2021) Environmental DNA (eDNA) metabarcoding in the fish market and nearby seafood restaurants in Taiwan reveals the underestimation of fish species diversity in seafood. *Biology* 10, 1132.
- Liu SYV, Chan CLC, Lin O, et al. (2013) DNA barcoding of shark meats identify species composition and CITES-listed species from the markets in Taiwan. *PLOS ONE* 8, e79373.
- Jerde CL, Wilson EA, Dressler TL (2019) Measuring global fish species richness with eDNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 19, 19-22.
- Knudsen SW, Ebert RB, Hesselsoe M, et al. (2019) Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 510, 31-45.
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, et al. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2, 150088.
- Pikitch EK (2018) A tool for finding rare marine species. *Science* 360, 1180-1182.
- Piredda R, Mottola A, Cipriano G, et al. (2022) Next Generation Sequencing (NGS) approach applied to species identification in mixed processed seafood products. *Food Control*, 133, 108590.
- Ritter CD, Dal Pont G, Stica PV, et al. (2022) Wanted not, wasted not: Searching for non-target taxa in environmental DNA metabarcoding by-catch. *Environmental Advances*, 7, 100169.
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Bach SS, et al. (2017) Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution* 1.
- Stoeckle MY, Soboleva L, Charlop-Powers Z (2017) Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS One* 12.
- Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, et al. (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports* 7.
- Zaiko A, Pochon X, Garcia-Vazquez E, Olenin S, Wood SA (2018) Advantages and limitations of environmental DNA/RNA tools for marine biosecurity: management and surveillance of non-indigenous species. *Frontiers in Marine Science* 5.
- Zhang GK, Chain FJJ, Abbott CL, Cristescu ME (2018) Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evolutionary Applications* 11, 1901-1914.