

出國報告（出國類別：研究）

中國大陸南方喙鯨型態與分子分類研究

服務機關：國立自然科學博物館

姓名職稱：姚秋如 助理研究員

派赴國家：中國大陸

出國期間：102/12/25-10/12/30

報告日期：103/01/24

摘要

此次訪問行程由報告人前往大陸大連市遼寧省海洋水產科學研究院，檢視兩具中喙鯨屬骨骼標本，並由各標本不同骨骼部位鑽取骨粉以萃取其內所含古 DNA (ancient DNA)，經由 PCR 實驗增幅放大粒線體 DNA 之 COI 與細胞色素 B 基因片段，定序 DNA 序列後，綜合型態與 DNA 資料，鑑定各中喙鯨標本種類。經資料分析後，本研究結果如下：原由福建省某標本廠提供之兩件中喙鯨全骨骼標本，起初由中國大陸鯨豚專家王丕烈教授檢視其型態，發現無法藉由骨骼型態鑑定種類，因此由報告人與王教授合作，藉由分別萃取兩件標本之顱骨、下顎骨、及牙齒之古 DNA 後，經定序獲得 DNA 序列，分別鑑定各段骨骼之種類，結果顯示，兩隻中喙鯨之下顎骨應為互相錯置，經交換下顎骨後，無論是藉由 DNA 序列、或是由鼻骨、額骨、頂骨、及下顎骨型態綜合鑑定後，確認其中一隻是柏氏中喙鯨，另一隻是銀杏齒中喙鯨，而後者是首度在中國大陸沿岸擱淺紀錄。此外原放置於柏氏中喙鯨下顎骨之牙齒，經 DNA 鑑定種類後發現，與抹香鯨相似度為 99%。上述研究資料說明，可能是標本處理人員不熟悉中喙鯨種類，在製作過程中錯置下顎骨至另一個體所致。而疑似抹香鯨之牙齒放置於喙鯨下顎骨亦應為現場處理人員專業素養不佳所致。兩件骨骼標本由於處理人員的專業不足將部分骨骼元件誤置，以致後續的型態鑑定困難，顯示自然史標本的製作與典藏人員，實需相關生物知識及經驗。本研究藉由鯨豚骨骼中的古 DNA 進行分子鑑定技術解決分類疑慮，亦可應用於形態鑑定不易或是標本資料不明的典藏骨骼標本。

目次

內容	頁碼
封面	i
摘要	ii
(一)、目的	1
(二)、過程	2
(三)、研究結果	3
(四)、心得與建議事項	3
(五)、圖片	5

(一)、目的

1.、前言

喙鯨的分類難題

喙鯨科 (Ziphiidae) 是齒鯨亞目中，外型獨特且行為隱秘的一群生物，牠們喜歡居住在大洋深海區，多單獨行動或僅數隻成群，習性害羞隱密，因此無論是在海上調查或是擱淺紀錄中，都是屬於稀有類群。牠們的體長介於 4 – 10 公尺，最重要的特徵是牙齒數量稀少，依不同種類，個體僅具 2 至數顆形狀各殊的牙齒，且位於下顎。此外，僅成熟雄性具有大而明顯的牙齒露出牙齦 (圖 1)，雌性與幼體的牙齒深藏在齒槽中，肉眼無法察覺。這樣的牙齒數量與構造，顯然不利於喙鯨咬食獵物，而經由喙鯨的胃含物分析及分布海域推測，牠們的主要食物是頭足類；再由其吻部形狀、牙齒形態與頭頸、舌與胸骨之肌肉結構推測，喙鯨是以吸食方式攝取獵物 (suction feeding)。其牙齒的兩性雙型 (sexual dimorphism) 現象顯然跟攝食較無關，而可能與繁殖、雄性競爭有關。

喙鯨科中的中喙鯨屬 (genus Mesoplodon) 是所有鯨豚類中，種類數目最多的屬，廣佈於各大洋區的深海水域。牠們體長介於 4 – 6 公尺，身型修長，有突出的吻部，而屬內各種間的外型特徵非常相似，最重要辨識種類的外型特徵是成熟雄鯨的外露獠牙，各種類的形狀、尺寸及位於下顎骨的部位各具特色；而雌性與未成年雄性的牙齒深藏在齒槽中並不顯露於外，因此在分類上更增添難度。此外，雖可經由骨骼中的 DNA 分析鑑定種類，然而因骨骼標本的製作過程及典藏方法均不利於 DNA 分子的保存，使得其內所含之 DNA 降解斷裂，而被歸類為古 DNA (ancient DNA)。

古 DNA 特性及應用

古 DNA 泛指由老舊生物標本中萃取之 DNA，這些 DNA 可能萃取自動物的牙齒、骨骼、鳥獸毛皮、自然風化木乃伊、魚鱗或各類古舊的植物標本等。這些生物標本的來源大多來自於博物館和考古遺址，保存年代從數十年、數百年甚至十萬年。對於生物及演化課題有興趣的人，古 DNA 無疑是非常珍貴的材料，藉此人們可針對分類議題，如對模式標本或已滅絕物種 (如猛瑪象、穴熊或尼安德塔人等) 進行 DNA 萃取，以從事演化或是族群遺傳研究。此外，應用於現生稀有物種的保育生物研究上，也可針對其老舊自然史典藏品進行採樣研究，不僅可減少對現生珍稀物種採樣騷擾，也可比對牠們在人類急遽開發前後之族群遺傳多樣性差異。

生命條碼研究與分類

生命條碼(Barcode of Life)為利用一小段 DNA 序列作條碼來鑑別物種的一種構想。此構想源於 2002 年，由加拿大 Guelph 大學的 Paul Hebert 率先倡議，隨後又在相關學術會議中獲得許多國際學者贊成加入，並於 2004 年 5 月由 Sloan 基金會贊助在 Washington D.C. 舉辦的會議中即開始規劃成立“ Consortium for the Barcode of Life (CBOL)” 的國際組織，希整合全球從事系統分類、演化及資訊的科學家來共同合作，能將全球所有物種的生命條碼予以建置完成。分類學是從事生物學各領域研究最基礎的工作，也是博物館自然史研究及典藏的基石。但傳統形態分類法有時會遇到分類難題無法解決，生命條碼的概念與方法恰可與型態分類互補長短，架構成較為完整的分類法體系。

本研究即是萃取骨骼標本中的古 DNA 及後續實驗分析，依照生命條碼研究法則進行物種鑑定。我們利用 PCR 技術增幅放大兩具喙鯨標本不同骨骼的粒線體 DNA(COI 及細胞色素 B 基因片段)，並定序後，再與其他已知種類的鯨豚同源 DNA 序列比較，期望鑑定兩具型態特異無法藉由外型判斷物種的喙鯨標本。

2、工作目標

中國大陸沿海多為大陸棚地形，屬淺海水域，雖與喙鯨科常出現的深水域不同，但是仍有少數喙鯨擱淺事件。大連市遼寧省海洋水產科學研究院的王丕烈教授為大陸資深鯨豚研究員，近年來專注於喙鯨標本的分類研究，他在中國南方區域各自然史典藏單位檢視喙鯨科骨骼標本，發現兩具有分類疑慮的中喙鯨骨骼標本，因此商借此兩具標本至遼寧海洋水產科學研究院進行研究，報告人應邀前往學術交流，檢視測量兩件喙鯨骨骼標本，並進行其骨骼內的古 DNA 萃取及初步分子實驗。

(二)、過程

- 1、日期 民國 102 年 12 月 25-30 日
- 2、地點 大連市遼寧海洋水產科學研究院
- 3、標本檢視、取骨粉與萃取古 DNA 實驗
 - (1) 拍攝標本照，測量喙鯨頭骨型態之通用測量型值。
 - (2) 以電鑽取骨粉，包含兩具標本之耳骨、顱骨、下顎骨及牙齒共 5 件骨骼元件，每件骨骼各兩個重複樣本。
 - (3) 萃取骨粉之古 DNA 並進行 PCR，增幅放大其中的粒線體 DNACOI 及細胞色素

B 基因片段。

4. 參訪單位之主要工作人員

遼寧水產科學研究院

王丕烈 研究員

馬志強 高級工程師

鹿志創 助理研究員

(三)、研究結果

將 PCR 產物攜回本館後，再次進行巢狀 PCR(Nested PCR)實驗，經確定產物後進行定序，由各骨骼樣本 DNA 序列比對後發現，喙鯨標本 1 號頭顱(圖 2 上)與喙鯨標本 2 號頭顱(圖 3 上)分別鑑定為柏氏中喙鯨及銀杏齒中喙鯨，然而喙鯨標本 1 號下顎骨(圖 2 下)與喙鯨標本 2 號下顎骨(圖 3 下)則分別鑑定為銀杏齒中喙鯨和柏氏中喙鯨，顯示此兩件標本的下顎骨彼此錯置。此外，位於 1 號下顎骨的兩件牙齒 DNA 則與抹香鯨 DNA 的相似度 99%，顯示此二牙齒與 1 號下顎骨非屬同一物種。

基於 DNA 鑑定結果，將兩件標本之下顎骨交換，並且將 1 號標本牙齒撤除後，綜合頭部之鼻骨、頂骨與額骨以及下顎骨型態，1 號標本基於骨骼型態被鑑定為柏氏中喙鯨，而 2 號標本被鑑定為銀杏齒中喙鯨。能是標本處理人員不熟悉中喙鯨種類，在製作過程中錯置下顎骨至另一個體所致。而疑似抹香鯨之牙齒放置於喙鯨下顎骨亦應為現場處理人員專業素養不足所致。

(四)、心得與建議事項

1. 兩件骨骼標本由於處理人員的專業不足將部分骨骼元件誤置，以致後續的鑑定困難，顯示自然史標本的製作與典藏，實需生物知識及經驗。本研究藉由鯨豚骨骼中的古 DNA 進行分子鑑定技術解決疑慮，此技術亦可應用於標示不清的典藏骨骼標本。根據報告人過往拜訪不同自然史標本館的鯨豚典藏經驗，亦曾發現類似上述現象，尤以素人典藏或標本館委託製作之標示較常出現此狀況。自然史標本具有研究、教育及展示之用，標本的正確性有賴專業之研究、製作人員與典藏管理制度，而現場處理的第一線工作人員的

處理流程、標本標示及製作技術是標本成品正確性與完整性的關鍵。本研究突顯標本處理人員的專業與經驗的重要性，而培養分類與標本製作人才正是自然史博物館的重要使命之一。

2. 本研究應用古 DNA 及生命條碼原理進行標本物種鑑定工作。應用古 DNA 前，需要先了解其特性及限制。古 DNA 因為損壞嚴重，因此比一般 DNA 更難以取得及進行後續分析(如 PCR、定序及相關分生實驗)。古 DNA 損壞問題有三大面向：第一是易汙染、第二是古 DNA 斷裂，能增幅的長度縮短、第三是古 DNA 損壞、導致判讀序列時，發現假性突變等。標本的保存方法與歷經時間決定了古 DNA 的質與量，而其中保存方法是更為重要的因子，若保存環境具穩定的溫度、低溫(如永凍層)、乾燥(如沙漠)，DNA 的品質就會好很多。抽古 DNA 方法異於慣常萃取方法，且後續 PCR 或其他實驗方式亦有講究，由於古 DNA 易汙染的特性，每次實驗需有合宜的控制組(negative and positive controls)以瞭解實驗的過程是否有外來 DNA 汙染。針對古 DNA 的三大難題，萃取古 DNA 時必須克服外在 DNA 汙染、減少古 DNA 再次損壞與斷裂、儘量去除 PCR 或後續實驗之抑制物，萃取過程將會有"增加 DNA 釋放(DNA release)"與"減低 DNA 損壞(DNA degradation)"的兩難(trade-off)。在本研究過程中，我們參考各文獻的古 DNA 萃取方法，採用 Rohland 等人(2007)所發表的骨骼與牙齒古 DNA 萃取法，並根據前述古 DNA 實驗原則，同時進行控制組實驗以確保實驗數術正確。除本研究之外，我們亦以相同技術與實驗分析，針對本館、國立海洋生物博物館、國立台灣博物館、澎湖水族館等單位的不完整骨骼標本或是日治時期遺留而標本資料佚失的骨骼標本進行古 DNA 實驗以鑑定物種，亦有超過 20 件成功鑑定的成果。

古 DNA 雖有較多實驗技術的困難，但經過適當的萃取過程可取得珍貴自然史標本的遺傳訊息，經過後續分子實驗與資料分析，能幫助我們解決分類疑慮進而取得正確的生物資料，使自然史典藏品達到研究、教育及展示的功能。

(五)、 圖片

1. 雄性與雌性銀杏齒中喙鯨下顎骨及牙齒。雄性標本呈現典型成熟雄性喙鯨的特點：巨大的牙齒及高度突顯的下顎骨。



2. 1 號標本喙鯨頭顱骨(上圖)，鼻骨、額骨及頂骨特徵與柏氏中喙鯨或史氏中喙鯨特徵較相似。1 號下顎骨(下圖)型態與齒型卻與上述兩種中喙鯨特徵相異，導致形態鑑定困難。



3. 2 號標本喙鯨頭顱骨(上圖)，鼻骨、額骨及頂骨特徵與銀杏齒中喙鯨特徵較相似，但 2 號下顎骨(下圖)型態與齒型組合，則與任何已知喙鯨種類特徵相異，導致形態鑑定困難。



4. 此次出差工作地點：遼寧水產科學研究院，新研究大樓於 2013 年 4 月開始啟用。研究大樓除實驗室外，亦有鯨豚骨骼標本典藏室。

本圖左邊建築物即為遼寧水產科學研究院新研究大樓。



王丕烈教授(前)正檢視露脊鼠海豚標本，由馬志強先生(後左)與鹿志創先生(後右)協助排放標本。



露脊鼠海豚是黃渤海水域常見鯨豚物種，也是遼寧海洋水產科學研究院蒐藏最多的物種之一。



5. 萃取骨骼及牙齒中的古 DNA 程序須注意外源 DNA 污染，下圖為鑽取骨粉需注意的要點。

將鋁箔紙放入高溫下滅菌，
並使用UV光照射避免有其他DNA污染



電鑽機身用酒精或漂白水擦拭，鑽頭用火殺菌，使用UV光照射
避免其他DNA污染



取出骨骼樣本，表面以95%酒精
及漂白水擦拭，置於鋁箔紙上



以電鑽鑽取樣本



樣本表面可能會附著其他DNA，
因此捨去表層粉末，只取用內部骨粉



樣本表面可能會附著其他DNA，
因此捨去表層粉末，只取用內部骨粉



收集骨粉樣本



將樣本倒入經高溫滅菌及UV光照
射後的小試管內



骨粉樣本採樣完畢

