



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Next Generation Sequencing for Analyzing DNA of Prey Remains in the Feces of the Brown Dipper (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820) to Investigate its Diet in the Non-breeding Season 【Research report】

應用次世代定序分析褐河鳥 (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820) 糞便殘存DNA 探討其非繁殖季之食性 【研究報告】

Yun-Chung Chiang¹, Ming-Chih Chiu², Shiao-Yu Hong³, Yuan-Hsun Sun⁴, Mei-Hwa Kuo^{1*}
江允中¹、丘明智²、洪孝宇³、孫元勳⁴、郭美華^{1*}

*通訊作者E-mail: mhkuo@dragon.nchu.edu.tw

Received: 2015/12/07 Accepted: 2016/01/04 Available online: 2016/03/01

Abstract

Understanding the relationship between predator and prey in stream ecosystems can be particularly challenging when characterizing these cryptic species in predator diets using only the morphological identification of mixed and degraded prey fragments in predator feces. Here, we developed a methodology for bird diet analysis based on next-generation sequencing. We evaluated whether a molecular, non-invasive technique is useful for identifying prey in fecal samples of the brown dipper (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820). Although the brown dipper is a member of the Passeriformes, they are river birds that can dive into water for foraging. According to previous research, brown dippers feed mainly on aquatic insects, and occasionally on fish, crab and shrimp. This research is focused on the brown dipper's diet in the non-breeding season. The feces samples were collected at five sites covering the Cijiawan Stream region in the Wuling area of Taiwan. We used next generation sequencing to identify the prey in the brown dipper's feces. Based on the NCBI (National Center for Biotechnology Information) and BOLD (Barcode of Life Database) databases, the diversity of dietary items identified spanned 11 genera belonging to 8 families within 6 orders, and 19 genera and 3 species belonging to 15 families within 6 orders, respectively. The dominant taxonomic prey group in the NCBI database was the Ophyra (43% of total sequences), followed by the Rhithrogena (21% of total sequences). The resolution could have reached the genus level. In the BOLD database it was the Tipula (25% of total sequences) followed by the Rhithrogena parva (11% of total sequences). The resolution could have reached the species level. Using different databases, the same sequence was identified for the Ophyra by the NCBI, as for the Tipula by the BOLD. The Ophyra has no record in previous aquatic insect research in the Wuling area. After checking the feces samples, there were no similar fragments found in the samples. This suggested that the results obtained from the BOLD were more reliable. However, nearly half of the sequences could not be identified by BOLD. Our findings indicate that there is an urgent need for a local reference database, in order to obtain results with a higher resolution in future studies.

摘要

本研究主要在瞭解溪流生態系統中捕食者與獵物的關係。傳統上，藉著形態特徵鑑定捕食者糞便中經消化過的獵物片段，以描述捕食者的食性，特別具有挑戰性。我們應用次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 分析鳥類的食性，評估以此非侵入性分子生物技術鑑定糞便樣本中的獵物身份是否可行。褐河鳥 (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820) 雖然身為燕雀目的一員，卻是擁有潛入水中覓食本領的溪流鳥類。過去研究顯示，褐河鳥以水棲昆蟲為主食，偶爾取食魚、蝦、蟹等生物。本研究於褐河鳥非繁殖季 (2014 年7~10 月) 涵蓋七家灣溪流流域之五個地點採樣，進行NGS 分析與NCBI 基因庫資料比對，所得資料顯示獵物項目的多樣性達6 目8 科11屬。其中以家蠅科黑蠅屬 (*Ophyra*) 最優勢 (佔43% 序列量)；其次為扁蜉蝣科Rhithrogena 屬 (佔21% 序列量)，解析度可達屬之階級。另外，以BOLD (Barcode of Life Database) 資料庫比對，獵物項目為6 目15 科19 屬3種；大蚊科大蚊屬 (*Tipula*) 為最優勢 (佔25% 序列量)；其次為扁蜉蝣科的Rhithrogena parva (佔11% 序列量)，解析度最高可達種階級。相同的序列使用不同資料庫進行比對，鑑定出黑蠅屬與大蚊屬不同的結果。黑蠅屬在武陵地區水棲昆蟲調查未曾有記錄，從糞便也未發現碎片，因此我們認為BOLD 資料庫比對的結果較合理，但同時卻有近乎一半的序列無法鑑定，若能建立本地資料庫，將更有助於取食獵物來源的研究發展。

Key words: *Cinclus pallasii*, diet, aquatic insect, Next Generation Sequencing, COI (cytochrome oxidase I)

關鍵詞: 褐河鳥、食性、水棲昆蟲、次世代定序、細胞色素氧化酶I

Full Text: [PDF\(1.05 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

應用次世代定序分析褐河鳥 (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820) 糞便殘存 DNA 探討其非繁殖季之食性

江允中¹、丘明智²、洪孝宇³、孫元勳⁴、郭美華^{1*}

¹ 國立中興大學昆蟲學系 40227 台中市南區國光路 250 號

² 美國加州大學柏克萊分校環境科學政策與管理學系 美國加州柏克萊瑪爾福特大樓 130 號

³ 國立屏東科技大學生物資源研究所 91201 屏東縣內埔鄉學府路 1 號

⁴ 國立屏東科技大學野生動物保育所 91201 屏東縣內埔鄉學府路 1 號

摘要

本研究主要在瞭解溪流生態系統中捕食者與獵物的關係。傳統上，藉著形態特徵鑑定捕食者糞便中經消化過的獵物片段，以描述捕食者的食性，特別具有挑戰性。我們應用次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 分析鳥類的食性，評估以此非侵入性分子生物技術鑑定糞便樣本中的獵物身份是否可行。褐河鳥 (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820) 雖然身為燕雀目的一員，卻是擁有潛入水中覓食本領的溪流鳥類。過去研究顯示，褐河鳥以水棲昆蟲為主食，偶爾取食魚、蝦、蟹等生物。本研究於褐河鳥非繁殖季 (2014 年 7~10 月) 涵蓋七家灣流域之五個地點採樣，進行 NGS 分析與 NCBI 基因庫資料比對，所得資料顯示獵物項目的多樣性達 6 目 8 科 11 屬。其中以家蠅科黑蠅屬 (*Ophyra*) 最優勢 (佔 43% 序列量)；其次為扁蜉蟬科 *Rhithrogena* 屬 (佔 21% 序列量)，解析度可達屬之階級。另外，以 BOLD (Barcode of Life Database) 資料庫比對，獵物項目為 6 目 15 科 19 屬 3 種；大蚊科大蚊屬 (*Tipula*) 為最優勢 (佔 25% 序列量)；其次為扁蜉蟬科的 *Rhithrogena parva* (佔 11% 序列量)，解析度最高可達種階級。相同的序列使用不同資料庫進行比對，鑑定出黑蠅屬與大蚊屬不同的結果。黑蠅屬在武陵地區水棲昆蟲調查未曾有記錄，從糞便也未發現碎片，因此我們認為 BOLD 資料庫比對的結果較合理，但同時卻有近乎一半的序列無法鑑定，若能建立本地資料庫，將更有助於取食獵物來源的研究發展。

關鍵詞：褐河鳥、食性、水棲昆蟲、次世代定序、細胞色素氧化酶 I。

*論文聯繫人

Corresponding email: mhkuo@dragon.nchu.edu.tw

褐河鳥非繁殖季之食性 213

前 言

生態系的食物鏈關係及保育管理的先決條件是瞭解生物的食性組成 (Symondson, 2002; Zeale *et al.*, 2011)。捕食者與獵物之間的營養關係涉及了由上而下或由下而上的影響，是能量流的表現 (Chiu *et al.*, 2008; Greenwood and McIntosh, 2008, 2011)，例如在生物防治上增加或減少兩者的數量來控制彼此數量達到防治效果 (Riechert and Bishop, 1990; Letnic and Dworjanyn, 2011)；或在生態上，捕食者受到外來事件影響其行為及繁殖策略等捕食作用 (Chiu *et al.*, 2009; Remeš *et al.*, 2012; Sentis *et al.*, 2012)，其中，彼此間的捕食關係則是自然界中較難觀察的現象之一。

瞭解生物食性有三種方法：直接觀察、侵入性調查及應用分子生物技術。直接觀察較難準確鑑定且耗時，侵入性調查會傷害研究目標，分子生物技術則可利用特定引子經由 PCR 放大生物 DNA 序列，已有許多研究利用並進行生物的食性分析 (Deagle *et al.*, 2005; Zeale *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2015)。

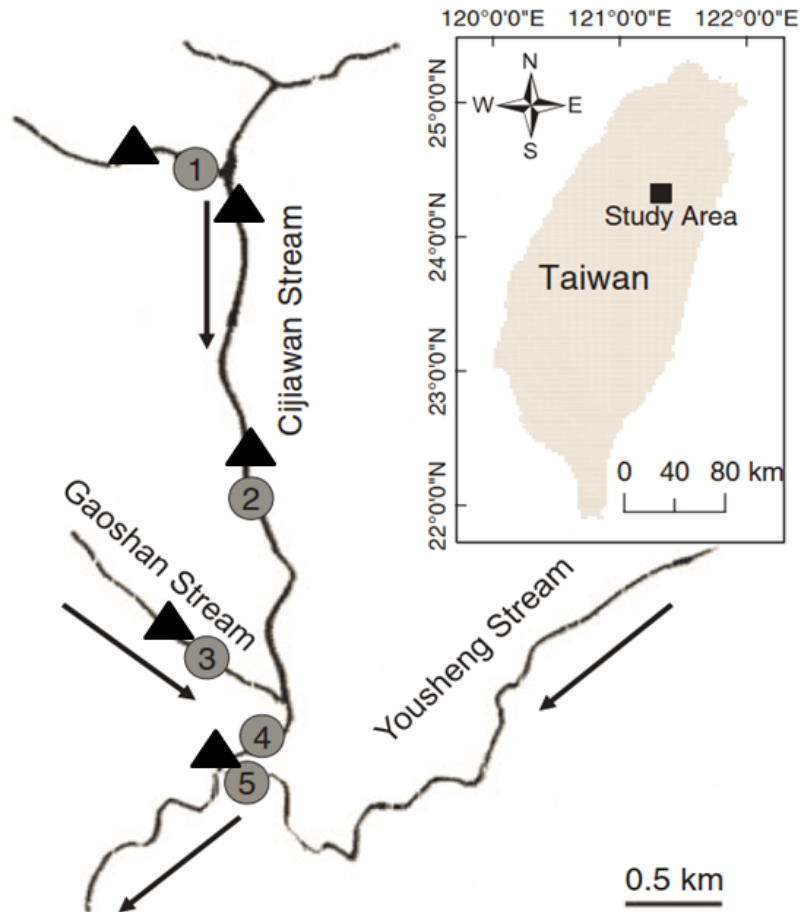
成功辨識不明物種 DNA 序列有兩種情況：第一是序列基因的遺傳差異必須大到可以劃分物種；第二是取得同一物種的參考序列作出準確的序列鑑定 (Hebert *et al.*, 2003; Zeale *et al.*, 2011)。目前發現即使是粒線體 COI 基因序列裡非常小的片段 (100~250 bp) 也可以達到 90~95% 的物種分辨率 (Hajibabaei *et al.*, 2006; Meusnier *et al.*, 2008)，對於分析被高度分解的樣本，如糞便、胃內含物等，有很高的應用價值 (Zeale *et al.*, 2011)。

褐河鳥 (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820) 在武陵地區是容易發現的溪流鳥類，具

有高棲地專一性、容易調查與繁殖季線性領域容易量化等特性，適合作為生態研究的模式物種和環境監測的指標物種 (Sorace *et al.*, 2002; Chen and Wang, 2010)。根據過往研究，2003~2005 年間曾在台中市武陵地區七家灣溪繫放 75 隻褐河鳥 (成鳥 46 隻、幼鳥 29 隻)，觀察到褐河鳥在繁殖季 (12 月上旬到隔年 5 月上旬) (Chen and Wang, 2010; Hong *et al.*, 2011) 會捕捉體型較大的毛翅目昆蟲及魚類餵食幼鳥 (Chiu *et al.*, 2009)，也分析出年存活率 (Chiu *et al.*, 2013)，但這些結果是藉由直接觀察鳥巢取得，親鳥本身於非繁殖季的食性尚未清楚。

由於本研究地區位於東亞季風氣候帶內，每年夏季大多有颱風帶來洪流，導致日平均流量大於 10 立方公尺/秒 (Chiu and Kuo, 2012)，七家灣溪的集水區面積 (72 ha) 大於有勝溪 (31 ha)，前者的最大洪水流量是後者的兩倍以上 (Huang *et al.*, 2012)；而洪水對水棲昆蟲的影響已有文獻記載 (Chiu *et al.*, 2008)，又河鳥以水棲昆蟲為主食，因此收集河鳥糞便樣本外，同時也利用舒伯氏水網採集水棲昆蟲，帶回實驗室鑑定及記錄數量後，調查水棲昆蟲群聚組成，供後續與河鳥糞便樣本中水棲昆蟲組成進行比較與討論。

本研究應用次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 來分析鳥類的食性並評估非侵入性分子技術鑑定糞便樣本中的獵物身份是否可行。利用分子生物技術，結合基因條碼 (DNA barcoding)，針對褐河鳥糞便內複合食餌碎片之粒線體 COI 基因序列，釐清褐河鳥的食性組成，並分析是否偏好取食特定生活習性、行為或形態特徵之水棲昆蟲，有助於深入瞭解褐河鳥在溪流生態系的地位和功能。



圖一 研究樣站。三角形表示褐河烏糞便採集地點，圓圈為水棲昆蟲採集樣站。

Fig. 1. The study localities. The triangles indicate the sampling sites of the feces of the brown dipper, and the circles indicate the sampling sites for the aquatic insects.

材料與方法

一、研究地區及樣站

研究地區位於台中市和平區的雪霸國家公園台灣櫻花鉤吻鮭 (*Oncorhynchus masou formosanus* (Jordan & Oshima, 1919)) 野生動物保護區，海拔高度約 1700~2000 m，主要溪流是七家灣溪和有勝溪，七家灣溪發源自海拔 3325 m 的桃山，有勝溪發源自海拔

2717 m 的羅葉尾山東側，兩溪在武陵農場的迎賓橋匯流成為大甲溪。七家灣溪的研究範圍自收費站到 6 號攔砂壩，以及高山溪自匯流口到 3 號壩，總長度約 8.5 km。

此研究地區內設五樣站 (圖一)，位置如下：第一測站桃山西溪 (Site 1) (經緯度：E 121.1826, N 24.2352)。第二測站觀魚台 (Site 2) (經緯度：E 121.1838, N 24.2215)。第三測站高山溪 (Site 3) (經緯度：E

121.3075, N 24.3587)。第四測站繁殖場 (Site 4) (經緯度: E 121.1848, N 24.2118)。第五測站有勝溪 (Site 5) (經緯度: E 121.3022, N 24.3489)。

二、褐河烏糞便及水棲昆蟲採樣

褐河烏有固定的線性領域, 在此研究地區有長期繫放研究, 以步行方式沿溪邊尋找收集五樣站附近褐河烏新鮮糞便樣本 (圖一), 涵蓋七家灣溪流流域, 於非繁殖期 (2014 年 7~10 月) 採集, 共 74 個糞便樣本。採得的樣本各別保存於裝有 95% 酒精的 1.5 ml 離心管中, 帶回實驗室置於 -80°C 冰箱以進行後續實驗。

水棲昆蟲採集時間為 2014 年 10 月 19 日, 是以定面積之改良式舒伯氏水網 (網框面積為 30.48 × 30.48 cm, 網目大小為 250 μm) 在水域中採樣, 每一樣站隨機取樣 6 次, 採獲的水棲昆蟲保存在 70~75% 酒精中, 攜回實驗室鑑定種類及記錄數量 (Chiu *et al.*, 2008)。

三、DNA 萃取、增幅及定序

逢機取出不同樣站各 1 個糞便, 共取出 5 糞便樣本同時以 14000 rpm 離心後, 將酒精溶液倒出, 以刮勺將糞便樣本攪鬆, 放入 45 °C 烘箱中直到酒精完全蒸發 (約 2 小時, 每 30 分鐘攪鬆一次)。乾燥後將所有糞便樣本均倒入研鉢中, 以液態氮急速冷凍, 利用研杵將糞便樣本磨成粉末並使其均質化。

DNA 萃取及 PCR 增幅程序依據 Wong *et al.* (2015) 的方法修飾。取 20 mg 均質化樣本萃取 DNA, 使用 DNeasy kit (QIAGEN, protocol modification for insects; Hilden, Germany) 萃取 DNA, 以 GeneAmp® PCR Instrument System 2700 (Applied Biosystems; Waltham, MS, USA) 進行節肢動物微基因條碼 (mini-barcode; COI 基因片

段; 157 bp) 增幅, 其中引子選擇為正向引子: ZBJ-ArtF1c (5'-AGATATTGGAACWT TATATTTTATTTTTGG-3') 及反向引子 ZBJ-ArtR2c (5'-WACTAATCAATTWCCAA ATCCTCC-3') (Zeale *et al.*, 2011)。之後取 PCR 產物進行 TA cloning 選殖基因, 並萃取質體 DNA, 送交核酸定序中心定序確認產物。與 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 資料庫比對確認樣本皆為昆蟲 DNA 後, 將 PCR 產物送交源資國際生物科技股份有限公司 (台中, 台灣), 以 Illumina Miseq 進行 300 bp 雙向 COI 基因片段之高通量次世代定序。

四、序列鑑定

使用 CLC Workbench 6 套裝軟體進行序列整理, 去除引子留下目標序列。利用 NCBI 資料庫 (Sayers *et al.*, 2009) 及 BOLD (Barcode of Life Database) 資料庫比對序列 (Ratnasingham and Hebert, 2007), 各取序列重複數大於 1000 者進行初步序列比對, 比對後選結果較合理之資料, 進一步取序列重複數大於 100 者進行物種鑑定, 並將序列鑑定對應到資料庫中的 COI 片段, 科、屬或種階級。若序列相似度達 99% 以上判定為該物種; 若序列相似度 86.4% 以上分至屬階級; 序列相似度 80% 以上分至科階級; 而序列相似度 77.5% 以上則分到目階級 (Clare *et al.*, 2009; Zeale *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2015)。

五、物種累積曲線

利用 Primer 6 以 rarefaction 方式來計算糞便中獵物序列的累積數, 公式如下

$$ES_n = \sum_{i=1}^S \left[1 - \frac{(N - N_i)! (N - n)!}{(N - N_i - n)! N!} \right]$$

表一 重複數大於 1000 條之次世代定序輸出序列與 NCBI 資料庫比對結果

Table 1. The identification results of NGS output sequences (taking sequences replicated more than 1000 times) compared to the NCBI database

Order	Family	Genus	Species	Percentage of sequence (%)	Similarity (%)
Coleoptera	Staphylinidae	<i>Zyras</i>	<i>haworthi</i>	0.34	86
Diptera	Hybotidae	<i>Chersodromia</i>	<i>amaura</i>	0.08	90
Diptera	Hybotidae	<i>Elaphropeza</i>	<i>chekjawa</i>	0.51	89
Diptera	Muscidae	<i>Ophyra</i>	<i>leucostoma</i>	43.19	93~95
Ephemeroptera	Baetidae	<i>Baetis</i>	<i>fuscatus</i>	0.13	87
Ephemeroptera	Baetidae	<i>Procloeon</i>	sp.	0.06	91
Ephemeroptera	Heptageniidae	<i>Notonurus</i>	<i>josettae</i>	0.03	87
Ephemeroptera	Heptageniidae	<i>Rhithrogena</i>	<i>japonica</i>	20.50	88~89
Lepidoptera	Anthelidae	<i>Anthela</i>	<i>stygiata</i>	6.45	91
Plecoptera	Capniidae	<i>Capniidae</i>	sp.	2.10	86~87
Trichoptera	Hydropsychoidea	<i>Ceratopsyche</i>	<i>bronta</i>	1.48	92
Unidentified				25.15	

其中，S 代表總物種數量，N 代表總個體數量，n 代表總個體數量中觀察到第 n 個體數 (Clarke and Warwick, 2001)。再利用 Sigma plot 11.0 軟體繪出稀有性曲線圖，以探討糞便樣本中所鑑定出的獵物項目是否達到飽和。

結 果

一、褐河烏糞便中之獵物組成

本研究共使用了 5 個糞便樣本，能成功使用分子生物技術進行褐河烏獵物 DNA 的萃取及 PCR 增幅目標片段，並能鑑定出褐河烏親鳥在非繁殖季之獵物身分項目 (表一及表二)。

本研究經由次世代定序已定序出 382 萬多條 DNA 片段，共可區分出 16 萬多種核苷酸組成不同的序列。表一顯示取序列重複數大於 1000 次的 87 種序列 (佔所有序列量 75%) 與 NCBI 資料庫比對結果，可鑑定 6 目 8 科 11 屬，其中家蠅科黑蠅屬 (*Ophyra*) 最多 (佔 43% 序列量)；其次為扁蜉蟬科 *Rhithrogena*

屬 (佔 21% 序列量)，未鑑定者佔 25% 序列量，解析度可達屬階級。另外取序列重複數大於 100 次的 2070 種序列 (佔所有序列量 89%) 與 BOLD 資料庫比對，鑑定出 6 目 15 科 19 屬 3 種，大蚊科大蚊屬 (*Tipula*) 為最多 (佔 25% 序列量)；其次為扁蜉蟬科的 *Rhithrogena parva* (佔 11% 序列量)，未鑑定者約佔 25% 序列量，無法鑑定者佔 42%，解析度最高可達種階級 (表二)。

褐河烏糞便中食性項目的多樣性以稀有性曲線評估 NCBI 和 BOLD 資料庫比對序列工作的完整性，由圖二結果可看出 NCBI 資料庫比對結果曲線漸趨平緩，代表鑑定出的物種數達飽和，但 BOLD 資料庫比對結果，卻顯示鑑定出的物種數未達飽和。

褐河烏親鳥在非繁殖季之獵物身分，將目級組成繪成圓餅圖 (圖三)。圖三 A 為 NCBI 資料庫比對出 6 個目級結果，雙翅目為最優勢獵物 (58.49%)、其次為蜉蟬目 (27.67%)、鱗翅目 (8.62%)、禿翅目 (2.80%)、毛翅目

表二 重複數大於 100 條之次世代定序輸出序列與 BOLD 資料庫比對之結果
 Table 2. The identification results of NGS output sequences (taking sequences replicated more than 100 times) compared to the BOLD database

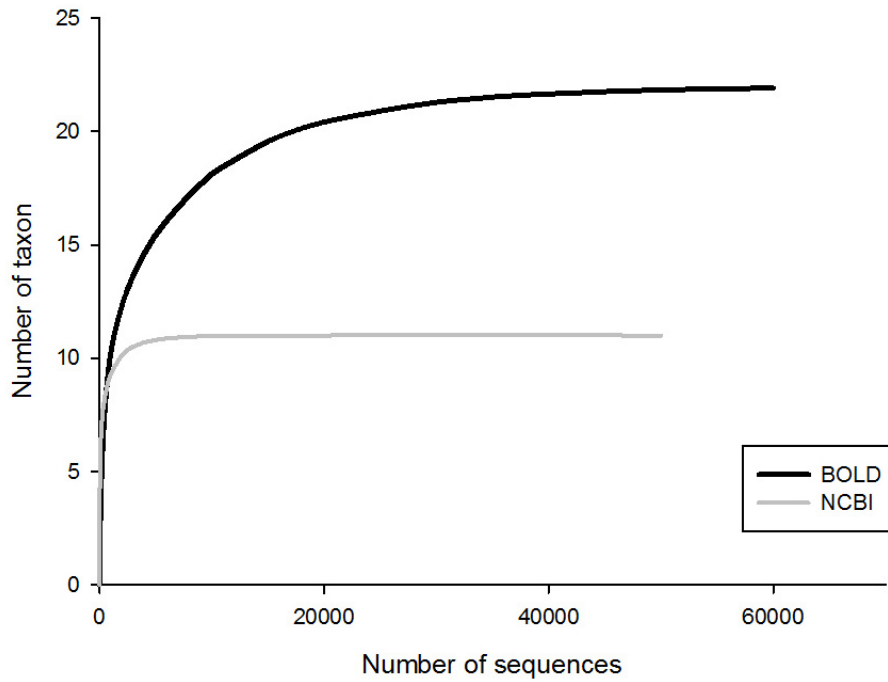
Order	Family	Genus	Species	Percentage of sequence (%)	Similarity (%)
Coleoptera	Curculionidae	<i>Mylocerus</i>	sp.	0.028	90~91.67
Coleoptera	Dytiscidae	<i>Laccophilus</i>	<i>biguttatus</i>	1.637	90~91.67
Diptera	Ceratopogonidae		sp.	0.014	92.86
Diptera	Chironomidae		sp.	0.008	91.03
Diptera	Chironomidae	<i>Tokunagaia</i>	<i>tonollii</i>	0.172	90.36~91.67
Diptera	Chironomidae	<i>Gymnometriocnemus</i>	sp.	4.469	90~92.13
Diptera	Chironomidae	<i>Paraphaenocladus</i>	sp.	0.003	93.26
Diptera	Dolichopodidae	<i>Dolichopus</i>	sp.	0.004	91.36
Diptera	Drosophilidae	<i>Drosophila</i>	sp.	0.003	96.43
Diptera	Mycetophilidae	<i>Mycetophila</i>	sp.	0.049	91.95~94.25
Diptera	Syrphidae	<i>Xylota</i>	<i>ouelleti</i>	0.006	91.03
Diptera	Tipulidae	<i>Tipula</i>	sp.	24.960	94.87~100
Ephemeroptera	Baetidae	<i>Acentrella</i>	<i>lata</i>	0.043	98.69~100
Ephemeroptera	Baetidae	<i>Baetis</i>	sp.	0.005	95.51
Ephemeroptera	Baetidae	<i>Plauditus</i>	<i>dubius</i>	0.004	88.89
Ephemeroptera	Heptageniidae	<i>Rhithrogena</i>	<i>ampla</i>	1.160	96.73~100
Ephemeroptera	Heptageniidae	<i>Rhithrogena</i>	<i>parva</i>	10.983	96.08~100
Lepidoptera	Erebidae	<i>Isogona</i>	<i>natatrix</i>	0.003	90.37
Lepidoptera	Geometridae	<i>Alcis</i>	sp.	2.080	89.66~93.1
Lepidoptera	Geometridae	<i>Operophtera</i>	<i>bruceata</i>	0.012	90.48~91.27
Plecoptera	Leuctridae	<i>Paraleuctra</i>	<i>vershina</i>	0.008	91.11~92.22
Trichoptera	Hydropsychidae	<i>Hydropsyche</i>	<i>alhedra</i>	0.827	92.06~94.44
Trichoptera	Hydropsychidae	<i>Hydropsyche</i>	<i>slossonae</i>	0.015	93.65
Unknown				42.079	
Unidentified				11.321	

(1.97%)及鞘翅目 (0.45%)；圖三 B 為 BOLD 資料庫比對結果，雙翅目仍為最優勢獵物 (63.85%)、其次為蜉蝣目 (26.23%)、鱗翅目 (4.51%)、鞘翅目 (3.59%)、毛翅目 (1.81%) 及 襉翅目 (0.02%)，由此可發現褐河烏於非繁殖季以取食雙翅目及蜉蝣目為主，佔食性組成之 86~90%。

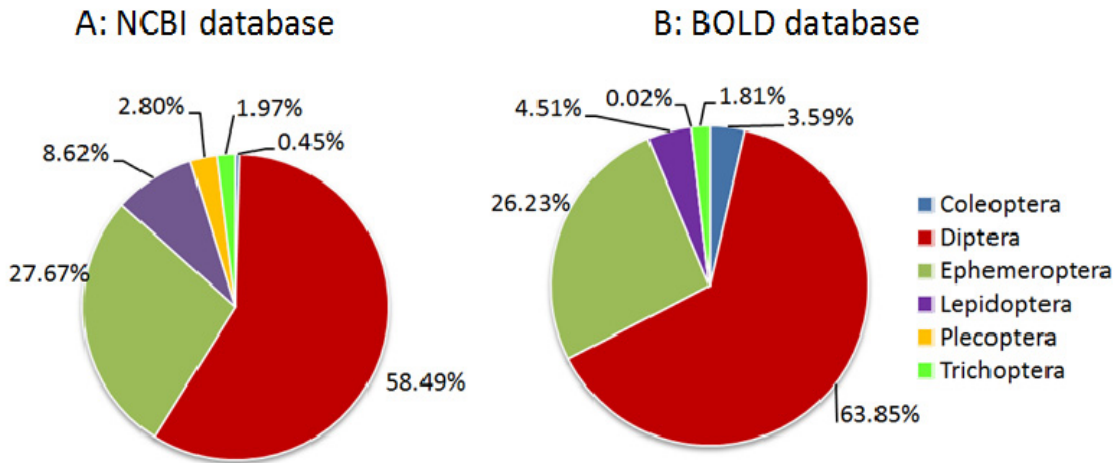
二、水棲昆蟲群聚組成

2014 年 10 月七家灣河流域 5 個採集樣

站，共計調查水棲昆蟲已知有 5 目 29 科 34 屬 41 分類群 (Taxa)，分屬鞘翅目 5 分類群、雙翅目 17 分類群、蜉蝣目 7 分類群、襉翅目 4 分類群、毛翅目 11 分類群；其中蜉蝣目四節蜉蝣科 *Baetis* spp. 為優勢物種，佔 38.06%；其次為扁蜉蝣 *Rhithrogena ampla*，佔 16.51% (表三)。圖四顯示水棲昆蟲目級組成以蜉蝣目為主 (59.98%)，其次為雙翅目 (27.84%)，兩者共佔群聚組成之 88%；毛翅目 (6.20%)、襉翅目 (3.10%) 及鞘



圖二 以稀有性曲線分析褐河烏糞便中屬階級食性項目的多樣性，以評估 NCBI 和 BOLD 資料庫序列比對工作的完整性。
 Fig. 2. Based on the NCBI and BOLD databases, we employed rarefaction curves to evaluate the completeness of the sequencing effort in the genus level in the brown dipper's feces for describing the sequence diversity in dietary items.

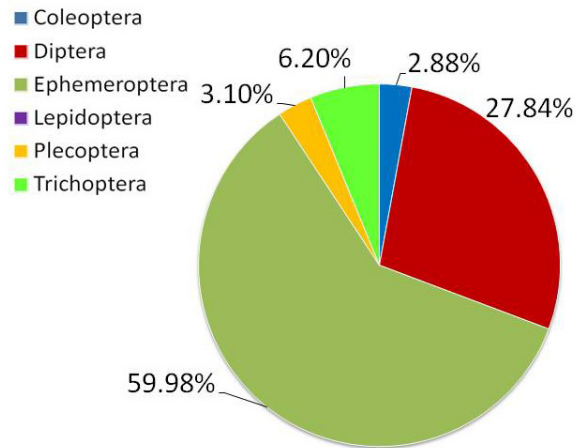


圖三 次世代定序的水棲昆蟲目級組成。A：與 NCBI 資料庫比對序列結果。B：與 BOLD 資料庫比對序列結果。
 Fig. 3. Aquatic insect composition from the NGS output sequences in insect orders. A: The identification results from the NCBI database. B: The identification results from the BOLD database.

表三 2014年10月七家灣溪水棲昆蟲組成

Table 3. Composition of aquatic insects during October 2014 in the Cijiawan Stream

Order	Family	Subfamily	Genus	Species	Percentage of number (%)
Coleoptera	Dytiscidae		<i>Deronectes</i>	sp.	0.01
Coleoptera	Elmidae		<i>Zaitzevia</i>	sp. A	2.06
Coleoptera	Elmidae		<i>Zaitzevia</i>	sp. B	0.13
Coleoptera	Hydrophilidae		<i>Paracymus</i>	sp.	0.01
Coleoptera	Scirtidae		<i>Cyphon</i>	spp.	0.41
Diptera	Blephariceridae		<i>Agathon</i>	spp.	0.07
Diptera	Blephariceridae		<i>Bibiocephala</i>	spp.	0.07
Diptera	Ceratopogonidae		<i>Bezzia</i>	sp.	0.08
Diptera	Chironomidae	Orthocladeinae		spp.	3.20
Diptera	Chironomidae	Tanypodinae		spp.	0.66
Diptera	Chironomidae			sp. C	6.26
Diptera	Chironomidae			spp.	9.59
Diptera	Empididae		<i>Chelifera</i>	sp.	0.01
Diptera	Empididae		<i>Clinocera</i>	sp.	0.01
Diptera	Empididae		<i>Hemerodromia</i>		0.02
Diptera	Limoniidae		<i>Antocha</i>	sp.	0.84
Diptera	Noctuidae		<i>Eriocera</i>	sp. A	0.41
Diptera	Noctuidae		<i>Eriocera</i>	sp. B	0.80
Diptera	Pediciidae		<i>Dicranota</i>	sp.	0.03
Diptera	Sciaridae				0.01
Diptera	Simuliidae		<i>Simulium</i>	sp.	5.77
Diptera	Thaumaleidae				0.02
Ephemeroidea	Acerentomidae		<i>Acerella</i>	<i>montana</i>	0.46
Ephemeroidea	Baetidae		<i>Acentrella</i>	<i>lata</i>	3.91
Ephemeroidea	Baetidae		<i>Baetiella</i>	<i>bispinosa</i>	0.87
Ephemeroidea	Baetidae		<i>Baetis</i>	spp.	38.06
Ephemeroidea	Ephemerellidae		<i>Cincticostella</i>	<i>fusca</i>	0.16
Ephemeroidea	Ephemeridae		<i>Ephemerella</i>	<i>sauteri</i>	1.01
Ephemeroidea	Heptageniidae		<i>Epeorus</i>	<i>erratus</i>	0.08
Ephemeroidea	Heptageniidae		<i>Rhithrogena</i>	<i>ampla</i>	16.51
Plecoptera	Nemouridae		<i>Amphinemura</i>	sp.	0.85
Plecoptera	Nemouridae		<i>Protonemura</i>	spp.	0.34
Plecoptera	Perlidae		<i>Neoperla</i>	spp.	1.44
Plecoptera	Styloperlidae		<i>Cerconychia</i>	sp.	0.05
Trichoptera	Glossosomatidae		<i>Glossosoma</i>	sp.	0.82
Trichoptera	Hydrobiosidae		<i>Apsilochorema</i>	sp.	0.11
Trichoptera	Hydropsychidae		<i>Arctopsyche</i>	sp.	0.03
Trichoptera	Hydropsychidae		<i>Hydropsyche</i>	spp.	2.96
Trichoptera	Hydroptilidae		<i>Hydroptila</i>	sp.	0.01
Trichoptera	Lepidostomatidae		<i>Goerodes</i>	sp.	0.10
Trichoptera	Rhyacophilidae		<i>Himalopsyche</i>	sp.	0.10
Trichoptera	Rhyacophilidae		<i>Rhyacophila</i>	<i>nigrdcephala</i>	1.22
Trichoptera	Rhyacophilidae		<i>Rhyacophila</i>	spp.	0.31
Trichoptera	Stenopsychidae		<i>Stenopsyche</i>	sp.	0.06
Trichoptera	Uenoidae		<i>Uenoa</i>	<i>taiwanesis</i>	0.05



圖四 2014年10月七家灣溪水棲昆蟲目級相對組成，顏色及數字代表昆蟲各目及其比例。

Fig. 4. Aquatic insect composition of order level during October 2014 in the Cijawan Stream. Insect orders and their percentage are shown.

翅目 (2.88%)。

討 論

近年來發展的分子糞便學提供了一個了解捕食者與獵物之間關係的機會，分析鳥類糞便中獵物碎片存留的 DNA 鑑定至屬或種的階級，從缺乏至蓬勃發展 (Zaidi *et al.*, 1999; Symondson, 2002; Deagle *et al.*, 2005; Casper *et al.*, 2007; Clare *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2015)，且捕食者食性組成以分子生物技術鑑定結果為形態鑑定的 1.4 至 5.8 倍 (Casper *et al.*, 2007)。昆蟲獵物經過消化後的碎片，其 DNA 仍然能夠從捕食者糞便樣本中被萃取出，Wong *et al.* (2015) 鑑定武陵地區溪鳥鉛色水鶉 (*Phoenicurus fuliginosus affinis*) 糞便中獵物碎片，結合基因條碼 (DNA barcoding)，再將其序列資料比對參考資料庫，判別出所屬分類群，並利用選殖的方式估算出相對組成數量，可進一步探討溪鳥對

不同生態系資源來源的需求及取食偏好。

從先前研究的例子看來似乎鑑定捕食者糞便中的獵物已經不困難，且還能夠進一步的將捕食者的獵物量化，分子糞便學鑑定捕食者的獵物身份可達到種階級，有助於未來需要更高解析度的研究發展 (Deagle *et al.*, 2005; Deagle and Tollit, 2007; Wong *et al.*, 2015)。本研究利用次世代定序，獲得褐河鳥糞便中複合食餌碎片 COI 基因序列資料，再將此基因條碼與參考資料庫比對，鑑定糞便樣本中的獵物身份是可行的。序列鑑定結果發現，褐河鳥食性項目以雙翅目及蜉蝣目為主 (共 86~90%)，與同時空的水棲昆蟲群聚組成相近 (88%)，證明了可利用鳥類糞便樣本分析水棲昆蟲群聚的潛力，大大提高食性研究利用上的效率與價值。

Chiu *et al.* (2009) 曾經利用巢位觀察的方式，記錄褐河鳥親鳥攜回育雛的獵物種類，發現偏好餵食體型較大的毛翅目昆蟲及小魚，較不喜歡蜉蝣目、襉翅目和雙翅目。褐河

烏的主食是水棲昆蟲，七家灣溪的水棲昆蟲波動主要是受到流量的影響，若當年夏季有洪水，冬季的水棲昆蟲量就相對較低 (Chiu *et al.*, 2008; Chiu and Kuo, 2012)，對冬季繁殖的褐河烏有影響，但對夏秋颱風較多的非繁殖季時期所知有限。本研究發現褐河烏於非繁殖季卻以取食雙翅目及蜉蝣目為主，暗示褐河烏繁殖季與非繁殖季時主要捕食的獵物目標不同。Chiu and Kuo (2012) 認為洪水會造成水棲昆蟲數量減少和組成改變，由 *k* 型策略物種優勢轉變成 *r* 型策略物種優勢 (Chiu and Kuo, 2012)，水棲昆蟲數量和組成的轉變對河烏食性和繁殖的影響有待進一步分析。

同屬的歐洲白喉河烏 (*Cinclus cinclus*)，Taylor and O'Halloran (2001) 年以形態鑑定河烏糞便中的獵物組成之研究，發現溪流流量正常時河烏以毛翅目幼蟲為主食，而氾濫或洪水時期則以蜉蝣目及雙翅目為主，並且包含一些陸生蟲，例如鞘翅目等。氾濫洪水時期對應到本次 10 月台灣武陵地區七家灣溪，屬於此時期，褐河烏非繁殖季食性以蜉蝣目及雙翅目為主，與 Taylor and O'Halloran (2001) 之結果雷同。此外，本研究序列鑑定結果中出現鱗翅目、鞘翅目之陸生類群 (表一及表二)，可能如文獻所說，氾濫期因食物豐度低，褐河烏會在岸邊取食或取食掉落水中的昆蟲，因此出現非水棲昆蟲的結果。

利用兩個資料庫比對後顯示獵物組成均以雙翅目為主，蜉蝣目次之，而水棲昆蟲群聚組成則是以蜉蝣目為主，雙翅目次之，顯示褐河烏的覓食行為不是逢機取食。褐河烏通常以潛水的方式捕捉大型的獵物，而較小型的獵物則利用涉水啄食 (Eguchi, 1990)。扁蜉蝣科為七家灣溪廣泛分布的昆蟲，較容易取食捕捉；大蚊科幼蟲通常具有呼吸孔，需要靠近水面，對於褐河烏而言，可能大蚊科幼蟲為較容易取

食的目標，因此糞便中食性項目的多樣性以大蚊科大蚊屬幼蟲為最優勢獵物。再者，若想要捕食毛翅目幼蟲，褐河烏需要潛水，但潛水捕食大型獵物會花費較多能量。此次結果我們發現褐河烏在非繁殖季不僅以蜉蝣目為主食，也會取食較多的雙翅目，而非繁殖季節的毛翅目。

從物種累積曲線可發現資料庫的重要性，NCBI 資料庫比對出 11 屬分類群曲線已達飽和，然而 BOLD 資料庫比對出 19 屬分類群曲線，卻未達飽和 (圖二)，顯示此次序列分析結果無法完全代表褐河烏的食性組成；且同一條序列使用不同資料庫比對鑑定出來的物種卻不同，這個現象在序列重複次數最多的雙翅目最明顯，例如 NCBI 比對鑑定為家蠅科黑蠅屬，而 BOLD 則為大蚊科大蚊屬。我們在武陵地區進行長期的水棲昆蟲相調查與監測，目前未有發現家蠅科黑蠅屬的紀錄，且挑取同月份之褐河烏糞便內昆蟲碎片於顯微鏡下觀察，並未發現相似碎片；再者，雖然黑蠅屬的序列比對相似度達 95%，但與大蚊屬的序列比對相似度最高達 100%，可能是因 NCBI 資料庫無該大蚊屬之序列資料造成的結果。綜合上述，我們認為與 BOLD 之比對結果較合理，但仍然有超過一半的序列種類無法得知其分類地位 (表二)。因此，若要確實反映褐河烏的食性，應須建立本地水棲昆蟲 DNA 資料庫來進行比對。

致 謝

本研究承蒙科技部計畫編號 MOST 103-2313-B-020-004 及雪霸國家公園管理處委託計畫「武陵地區生態系長期監測與研究」的部分經費補助。感謝陳佳郁、邱俊禛及蔡正隆提供分子生物技術上和序列鑑定的協助，並感謝

汪采葳和曾建閔協助收集褐河烏糞便樣本供研究使用。

引用文獻

- Casper RM, Jarman SN, Deagle BE, Gales NJ, Hindell MA.** 2007. Detecting prey from DNA in predator scats: A comparison with morphological analysis, using *Arctocephalus* seals fed a known diet. *J Exp Marine Bio Ecol* 347: 144-154.
- Clare EL, Fraser EE, Braid HE, Fenton MB, Hebert PDN.** 2009. Species on the menu of a generalist predator, the eastern red bat (*Lasiurus borealis*): Using a molecular approach to detect arthropod prey. *Mol Ecol* 18: 2532-2542.
- Clarke KR, Warwick RM.** 2001. Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edition. PRIMER-E Ltd, Plymouth. 172 pp.
- Chen CC, Wang Y.** 2010. Relationships between stream habitat and breeding territory length of the Brown Dipper (*Cinclus pallasii*) in Taiwan. *J Ornithol* 151: 87-93.
- Chiu MC, Kuo MH.** 2012. Application of r/K selection to macroinvertebrate responses to extreme floods. *Ecol Entomol* 37: 145-154.
- Chiu MC, Kuo MH, Hong SY, Sun YH.** 2013. Impact of extreme flooding on the annual survival of a riparian predator, the Brown Dipper *Cinclus pallasii*. *Ibis* 155: 377-383.
- Chiu MC, Kuo MH, Sun YH, Hong SY, Kuo HC.** 2008. Effects of flooding on avian top-predators and their invertebrate prey in a monsoonal Taiwan stream. *Freshwater Biol* 53: 1335-1344.
- Chiu MC, Kuo MH, Tzeng CS, Yang CH, Chen CC, and Sun YH.** 2009. Prey selection by breeding Brown Dippers *Cinclus pallasii* in a Taiwanese mountain stream. *Zool Stud* 48: 761-768.
- Deagle BE, Tollit DJ.** 2007. Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces: Potential to estimate diet composition? *Conserv Genet* 8: 743-747.
- Deagle BE, Tollit DJ, Jarman SN, Hindell MA, Trites AW, Gales NJ.** 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: Analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Mol Ecol* 14: 1831-1842.
- Eguchi K.** 1990. The choice of foraging methods of the Brown Dipper, *Cinclus pallasii* (Aves: Cinclidae). *J Ethol* 8: 121-127.
- Greenwood MJ, McIntosh AR.** 2008. Flooding impacts on responses of a riparian consumer to cross-ecosystem subsidies. *Ecology* 89: 1489-1496.
- Greenwood MJ, McIntosh AR.** 2011. Cross-ecosystem disturbance influences on the life history and population size structure of a riparian predator.

- Austral Ecol 36: 593-604.
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN.** 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes* 6: 959-964.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR.** 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B* 270: 313-321.
- Hong SY, Chen HL, Kao CC, Zeng JW, Sun YH.** 2011. Breeding biology of Brown Dipper (*Cinclus pallasii*) in Chichiawan Stream. *J Nat Park* 21: 30-36. (in Chinese with English abstract)
- Huang JC, Lee TY, Kao SJ, Hsu SC, Lin HJ, Peng TR.** 2012. Land use effect and hydrological control on nitrate yield in subtropical mountainous watersheds. *Hydrol Earth Syst Sci* 16: 699-714.
- Letnic M, Dworjanyn SA.** 2011. Does a top predator reduce the predatory impact of an invasive mesopredator on an endangered rodent? *Ecography* 34: 827-835.
- Meusnier I, Singer GAC, Landry J-F, Hickey DA, Hebert PDN, Hajibabaei M.** 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics* 9, e214.
- Ratnasingham S, Hebert PDN.** 2007. BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7: 355-364.
- Remeš V, Matysioková B, Cockburn A.** 2012. Nest predation in New Zealand songbirds: Exotic predators, introduced prey and long-term changes in predation risk. *Biol Conserv* 148: 54-60.
- Riechert SE, Bishop L.** 1990. Prey control by an assemblage of generalist predators: Spiders in garden test systems. *Ecology* 71: 1441-1450.
- Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Feolo M, Geer LY, Helmberg W, Kapustin Y, Landsman D, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Miller V, Mizrahi I, Ostell J, Pruitt KD, Schuler GD, Sequeira E, Sherry ST, Shumway M, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E, Ye J.** 2009. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 37: D5-15.
- Sentis A, Lucas É, Vickery W.** 2012. Prey abundance, intraguild predators, ants and the optimal egg-laying strategy of a furtive predator. *J Insect Behav* 25: 529-542.
- Sorace A, Formichetti P, Boano A, Andreani P, Gramegna C, Mancini L.** 2002. The presence of a river bird, the dipper, in relation to water quality and biotic indices in central Italy. *Environ Pollut* 118: 89-96.
- Symondson WOC.** 2002. Molecular identification of prey in predator diets.

- Mol Ecol 11: 627-641.
- Taylor AJ, O'Halloran J.** 2001. Diet of Dippers *Cinclus cinclus* during an early winter spate and the possible implications for Dipper populations subjected to climate change. *Bird Study* 48: 173-179.
- Wong CK, Chiu MC, Sun YH, Hong SY, Kuo MH.** 2015. Using molecular scatology to identify aquatic and terrestrial prey in the diet of a riparian predator, the Plumbeous Water Redstart *Phoenicurus fuliginosa*. *Bird Study* 62: 368-376.
- Zaidi RH, Jaal Z, Hawkes NJ, Hemingway J, Symondson WOC.** 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Mol Ecol* 8: 2081-2087.
- Zeale MRK, Butlin RK, Barker GLA, Lees DC, Jones G.** 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Mol Ecol Resour* 11: 236-244.

收件日期：2015年12月7日

接受日期：2016年1月4日

Next Generation Sequencing for Analyzing DNA of Prey Remains in the Feces of the Brown Dipper (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820) to Investigate its Diet in the Non-breeding Season

Yun-Chung Chiang¹, Ming-Chih Chiu², Shiao-Yu Hong³, Yuan-Hsun Sun⁴, Mei-Hwa Kuo^{1*}

¹ Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

² Department of Environmental Science, Policy, and Management, University of California, Berkeley

³ Institute of Bioresources, National Pingtung University of Science & Technology, Pingtung, Taiwan

⁴ Institute of Wildlife Conservation, National Pingtung University of Science & Technology, Pingtung, Taiwan

ABSTRACT

Understanding the relationship between predator and prey in stream ecosystems can be particularly challenging when characterizing these cryptic species in predator diets using only the morphological identification of mixed and degraded prey fragments in predator feces. Here, we developed a methodology for bird diet analysis based on next-generation sequencing. We evaluated whether a molecular, non-invasive technique is useful for identifying prey in fecal samples of the brown dipper (*Cinclus pallasii* Temminck, 1820). Although the brown dipper is a member of the Passeriformes, they are river birds that can dive into water for foraging. According to previous research, brown dippers feed mainly on aquatic insects, and occasionally on fish, crab and shrimp. This research is focused on the brown dipper's diet in the non-breeding season. The feces samples were collected at five sites covering the Cijiawan Stream region in the Wuling area of Taiwan. We used next generation sequencing to identify the prey in the brown dipper's feces. Based on the NCBI (National Center for Biotechnology Information) and BOLD (Barcode of Life Database) databases, the diversity of dietary items identified spanned 11 genera belonging to 8 families within 6 orders, and 19 genera and 3 species belonging to 15 families within 6 orders, respectively. The dominant taxonomic prey group in the NCBI database was the *Ophyra* (43% of total sequences), followed by the *Rhithrogena* (21% of total sequences). The resolution could have reached the genus level. In the BOLD database it was the *Tipula* (25% of total sequences) followed by the *Rhithrogena parva* (11% of total sequences). The resolution could have reached the species level. Using different databases, the same sequence was identified for the *Ophyra* by the NCBI, as for the *Tipula* by the BOLD. The *Ophyra* has no record in previous aquatic insect research in the Wuling area. After checking the feces samples, there were no similar fragments found in the samples. This suggested that the results obtained from the BOLD were more reliable. However, nearly half of the sequences could not be identified by BOLD. Our findings indicate that there is an urgent need for a local reference database, in order to obtain results with a higher resolution in future studies.

Key words: *Cinclus pallasii*, diet, aquatic insect, Next Generation Sequencing. COI (cytochrome oxidase I)