

分子標記篩選技術於水產養殖之應用

撰文/張格銓·張湧泉·劉富光

前言

水產生物是人類重要的食物來源之一，隨著全球人口快速的成長，其對糧食的需求量亦不斷地提昇。然而，近年來天然水產生物資源的利用已達到飽和的地步，因此，養殖水產生物的開發便顯得益形重要。與畜產業相比，水產養殖生物普遍是以群體型式生活在相同水域，環境因子對其往往具有群體性的影響，加上不易在現場進行觀察，使得生物技術在水產養殖方面的研究起步較晚，之後又發現水產養殖生物之多樣性較為複雜，難以將畜產的研究模式直接拿來套用，導致其生物技術的發展速度更為緩慢。

不過，水產養殖生物的保育及永續經營是產業能否穩定發展的重要因素，必須利用分子標記 (molecular markers) 技術，建立各種可以探討水產養殖生物遺傳學的方法，藉以鑑別品種、品系或家系，並分辨純種或雜交種，同時評估族群的遺傳變異或近親交配程度，甚至分析出與成長或疾病抵抗力等形質有關之基因，以輔助養殖的選種、保種及育種工作，並有效控管養殖生物之重要經濟性狀，俾進一步地強化產業的競爭力。

分子標記

生物分類學的早期研究，係利用外表的形態、形質、生態行為或解剖資料等進行分析。自 1960 年代起，在遺傳學、生物化學、細胞學及分子生物

學等知識之蓬勃發展下，逐漸釐清出遺傳學的基本要素為蛋白質、去氧核糖核酸 (DNA) 及核糖核酸 (RNA) 等，其中，DNA 是體遺傳學上最原始的訊息，較容易保存與進行試驗，多年來的相關研究也陸續地開花結果。一般所謂的「分子標記」係指 DNA 的核苷酸片段，物種間 DNA 的核苷酸組成各有不同，在相同的 DNA 核苷酸片段上，親緣關係之遠近亦會造成核苷酸組成或功能有不同程度的差異性，可以利用此多型性 (polymorphism) 現象，實施各種分析。

近年來，用來鑑定及分析各種分子標記的技術如雨後春筍般的快速發展，相關之軟體及硬體日新月異，其精確度和效率具有非常明顯的進步，已被充分應用在水產養殖上的學術研究及現場需求，文獻上也有許多相關的研究報告，足資參考與利用。

常見的分子標記技術有粒線體 DNA (mitochondrial DNA)、聚合酶連鎖反應—限制酶切割片段多型性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、隨機增幅多型性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、增幅片段多型性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、微衛星 DNA (microsatellite DNA) 及單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 等，其詳細的原理在此不再贅述，不過多半與 DNA 特定片

段的序列或與簡單序列的重複次數有關，每種分子標記技術各有其優點、缺點與適用的目的與對象。

其中，粒線體 DNA 因為是母系遺傳，可以用來追蹤來自於母體的遺傳基因及追溯雜交種原；PCR-RFLP 技術可用來鑑別不同的品種，也可鑑別原種與雜交種；RAPD 與 AFLP 技術對於欲增幅的目標 DNA 皆不需要定序，在應用上比較簡便，可在種原或品系鑑定上發揮功用，亦可用在遺傳多樣性之分析；微衛星 DNA 是具有核苷酸重複排列現象的 DNA 片段，重複序列通常包含 2~4 個核苷酸，例如 ACTACTACTACTACTACT (ACT 連續出現 6 次)，其重複次數在族群或個體間時或有所差異，造成所增幅之 DNA 片段長度有所不同，可藉此特性廣泛的應用於品種鑑定、遺傳變異及多樣性分析等，相較於 RAPD 或 AFLP 等技術，微衛星 DNA 具有更高的解析力，不過在操作上需較長時程與較多的人力，也受限於無法追蹤重複序列以外的變異；SNP 通常為雙等位 (biallelic) 基因，因點突變 (point mutations) 於同一核苷酸位置上出現不同的鹼基所形成的多型性現象，可應用在連鎖圖譜 (linkage mapping) 的研究。另外，SNP 出現的頻率高，分佈情形也比微衛星 DNA 更廣泛，是頗被看好的分子標記。

表現序列標籤 (expressed sequence tag, EST) 技術是將特定細胞之訊息核糖核酸 (message RNA)，以隨機引子或是含有 oligo(dT) 的引子進行反轉錄，經特定限制酶切割後大量進行選殖工作，更進一步建立互補 DNA (cDNA) 資料庫。這些基因之含量多寡能直接影響到選殖之插入片段比率，若進行連鎖圖譜等之比較研究，可能會發現某些基因對水產養殖生物的生長、生殖或疾病反應等有相關性。建立 EST 系統為相當龐大的工程，目前對水產養殖生物的研究多半尚在資料庫的建構階段。

另外，DNA 微矩陣 (microarray) 是近年來快速發展的分子標記技術，將在生物晶片 (biochip) 上排列成微矩陣的 DNA 探針與所試驗的 DNA 反應，以

分析是否有特異性的病原菌或快速成長基因等之存在。

標記輔助選育 (marker-assisted selection, MAS)

水產養殖動物大部分的經濟性狀形質係受到多重基因的控制，其變異是連續性的，也就是以數量形質 (quantitative traits) 的方式遺傳，如果對於體重、水溫耐受性、體色、產卵時間或疾病的抵抗力等重要的數量形質，能夠應用微衛星 DNA 等技術分別定位出各種相關的數量形質基因座 (quantitative traits loci, QTL)，進而探究 QTL 彼此之間的相互作用，也就可以執行「標記輔助選育」，達到更科學化的育種境界。

傳統的選擇育種過程中，研究人員必須繁殖並鑑定各種不同的雜交組合子代，以重複試驗及多世代之測試來進行選育，若能施行「標記輔助選育」，可縮短育種時程或有效提昇產品價值。目前「標記輔助選育」技術已被應用在鮭魚、歐洲鱸、河魨、日本比目魚及大西洋比目魚等之選育，在短時間內篩選出具有特定性狀之個體。

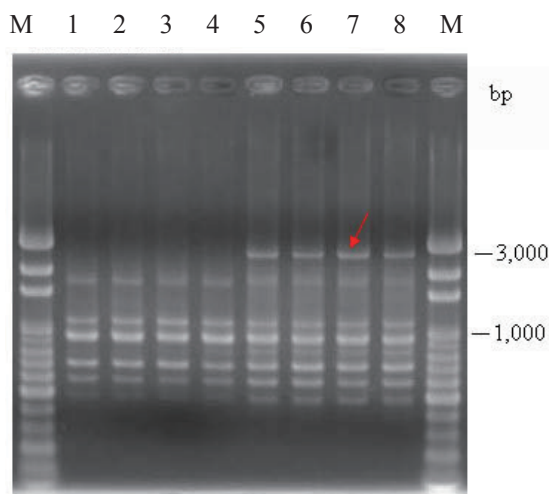
分子標記技術的幾個應用實例

吳郭魚是世界性魚種，養殖及天然野生產量很多，市場也很龐大，是聯合國糧農組織 (FAO) 大力推廣的養殖魚種之一，可望成為人類重要且廉價的糧食及蛋白質來源。過去，台灣多年來致力於吳郭魚雜交育種試驗，主要透過種內或種間雜交，以外表的形態與形質為基礎，加上試驗人員之經驗，研判其遺傳特性，進而選拔優良品種供業者養殖。水產試驗所的「國家水產生物種原庫—淡水繁養殖研究中心支庫」於 95 年初完工啟用，已著手進行重要淡水魚類的保種工作，尤其針對吳郭魚除保種外，更積極地進行選種及育種的工作。

吳郭魚在台灣養殖已經有超過 60 年的歷史，由於屬於外來品種，而且當初引進的數量並不多，加上選種繁殖會產生瓶頸效應 (bottleneck effect)，

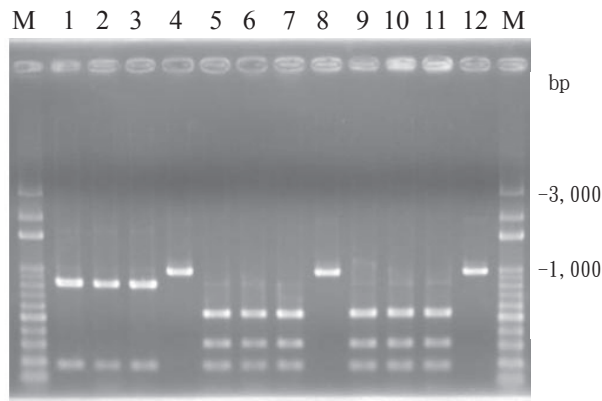
因此容易造成近親衰退 (inbreeding depression) 現象，這是台灣及各國引種養殖均會面臨的事情。水產試驗所之研究人員針對所保育的台灣紅色吳郭魚利用 RAPD (圖一) 及 PCR-RFLP (圖二) 技術鑑別品系，並將這些結果應用於選種及育種之工作，避免品系之混淆，維持其穩定性。期望能進一步地在經濟性狀如成長快速或對特定疾病的抗病力等，能定出相關的分子標記，以協助吳郭魚的養殖育種工作。

台灣地窄人稠，水產動物之養殖方法多半屬於集約式，一旦罹病容易造成大量死亡現象，重創養殖產業。最好是能夠「預防勝於治療」或者在短時間內鑑定出病原菌而對症下藥。有鑑於此，水產試驗所的研究人員即投入一系列相關分子標記之研發工作，開發出生物晶片能夠在養殖現場，簡便而快速地對養殖動物檢測是否感染常見的水產病原菌，其對特定病原菌的檢測具有極高的專一性，可做為快速診斷養殖動物健康與否之方法。另外，亦有研究人員應用分子標記的篩選技術，針對幼苗期、成長期及生殖期等階段的白蝦，定期檢測是否有被幾



1~4: C03r; 5-8: C07r; M: 100 bp DNA分子量標記
註：箭頭指示特异性電泳帶。
資料來源：張等人，2008。

圖一 應用RAPD 技術鑑別台灣紅色吳郭魚品系 (OPA07隨機引子)



1~4: C03r; 5~8: C07r; 9~12: A07r; 4, 8, 12: 未切割對照組; M: 100bp DNA分子量標記
資料來源：張等人，2008。

圖二 應用PCR-RFLP 技術鑑別台灣紅色吳郭魚品系 (增幅之粒線體DNA D-loop 片段以限制酶MspI切割)

種常見病毒如 WSSV、TSV、IHHNV 或 YHV/GAV 等感染，以篩選出無特定病原 (specific pathogen free, SPF) 的蝦體，安全地養殖於無特定病原的養蝦池中，顯著提高池蝦的活存率。

結論

科學家應用基因轉殖技術，成功將實驗魚的肌肉量倍增，看似有突破的發展性，可惜技術層面尚未穩定，無法滿足產業面的需求。此外，外來基因可能會有安全上之問題，專家亦無法對基因改造產品 (GMO) 的安全性驟下定論，即使在農業上已經有多項 GMO 產品上市，消費者仍對 GMO 動物產品存有疑慮。多數的先進國家均不接受 GMO 動物產品。因此，在水產養殖上仍然以培育天然的品種為主流，再配合分子標記育種，期望能達到永續經營的目標。

分子標記技術除了被應用在水產養殖生物產業外，在生物多樣性的應用研究也非常廣泛。台灣在生物技術領域方面已培育出許多優秀的人才，如果能將適當的分子標記技術，應用於適合的物種與目的，勢將產生正面的經濟效益。近年來，微衛星

DNA、SNP 及 EST 等資料庫已大幅的增加，因此，建立特定性狀之控制技術將會越來越容易且快速，如果用來輔助選種、保種及育種工作，在水產養殖上勢必可以更有效的保存種原並改良品種，提高養殖生物的品質與生產量，進而提升國際競爭能力，以確保產業的永續經營與利用。 AgBIO

張格銓	水產試驗所淡水繁養殖研究中心	約聘研究助理
張湧泉	水產試驗所淡水繁養殖研究中心	助理研究員
劉富光	水產試驗所淡水繁養殖研究中心	研究員兼主任

參考文獻

1. 張湧泉、陳榮華、張格銓、劉富光 (2008) RAPD及PCR-RFLP生物技術應用在台灣紅色吳郭魚之選擇育種研究。水產研究，16(1):29-37。
2. 張錦宜、林金榮 (2007) 台灣常見水產病原菌檢測晶片之開發。水試專訊，18:1-4。
3. 鄭金華 (2007) 無特定病原(SPF)白蝦繁養殖模式之開發與產業應用。農業生技產業季刊，10:48-59。
4. Liu, Z. J. and Cordes, J. F. (2004) *DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics*. Aquaculture 238:1-37.

