

# 分子標誌輔助養殖水產 動物育種之應用

撰文/曾福生

## 前言

台灣的水產養殖業發展至今，養殖種類的更迭是市場及養殖從業人員在需求、材料、方法相互創新促進的結果，而養殖種類從野生環境捕撈的種源馴養和建造水池人為繁育養殖的總合結果，造就現在台灣的水產養殖產業。從鰻魚、草蝦、虱目魚、淡水長臂大蝦、九孔、白蝦、石斑、吳郭魚及龍膽石斑等蓬勃發展，至今產業分工細緻，有種魚培育、各階段的育苗及養成，並帶動其他周邊相關產業的發展，為增加台灣外匯的重要產業。

但在水產養殖產業中，各類養殖物種在技術蓬勃發展、各方面人員素質提昇及資金的持續投入下，卻維持不到 10 年的光景，無法永續，日趨萎縮。無可諱言，台灣的水產養殖業發展一直偏重在尋找高價、新的養殖種類，因此，都在發展各式種類的繁養殖技術，種類繁多，所以台灣可以人工繁殖上百種以上的淡、海水種類的魚介貝類，可養殖的種類可謂是多樣性，多種選拔在過去因市場是對內，台灣的消費心態喜好以生、猛、奇的現撈海鮮，這些都以量制價、物以稀為貴，但這只是野生種的收集馴養成種魚與繁殖，從整體產業技術觀點而言，技術層次不高，所有的考量以產量為主，沒有質的思考，在整個養殖過程中，有種魚培育、各階段的育苗及養成，雖有產業分工，卻沒有全程品管的概念，對往後的養殖風險改善無所助益。以當前

台灣所面臨的問題，就是每當大量繁養殖技術的突破，產量大增，外銷前景大好時，國內的養殖即出現問題，環境惡化疾病叢生，影響後續的經營，雖經診斷，找出病因，卻是束手無策，這些情形在九孔、草蝦、石斑魚等都曾發生過，如此的投資心血，無法持續，令人扼腕，也道出了養殖產業的不穩定性。

固然環境惡化疾病蔓延，是國內養殖的重要問題，但養殖物種的品質是整個養殖週期的關鍵，影響至巨，而養殖物種的品質受制於種魚群種源，因此，種魚群的來源及培育至為重要。眾所周知，所有一開始的親魚皆從野生環境收集馴養而來的，繁殖出子代，再培育成種魚，往後的種苗生產都靠這一群後裔長大後再選拔回來繁殖下一代，並沒有選種育種觀念，更沒有配種管理制度，代代如此，近親繁殖，難免會有某些有害的隱性基因的累積、顯現，影響到生長及對環境的耐受性，逐漸造成退化及生殖隔離的問題。如此嚴重影響到養殖產業，在所難免。最明顯的例子，就是 92 年台灣的九孔養殖產業中，種苗培育階段，在附苗板上，附着苗初期的落苗問題。業者在整個九孔繁養殖流程中，習慣從自行養成的成員，捕撈準備出售的貝中再挑選部分生殖巢飽滿的成員，作為繁殖下一代的種貝，如此，周而復始，連續多代的同場內的養殖九孔交配，再加上，代代繁殖時雌雄比皆低於 20:1 的雄性瓶頸效應及近交，導致九孔的生殖隔離的現象發生

及近交退化的問題，這些問題已造成台灣九孔產業的傷害，台灣的這類問題並不只有發生在九孔，幾乎所有的可完全養殖的物種都有相同的問題，有的已發生，有的尚在醞釀中，但無論如何，往者已矣，必須記取教訓，以作為正在發生或即將發生的借鏡，必竟演化是無法從來的，要解決這樣問題並非短期可期。

### 水產育種的現況及重要性

全球多數國家的水產漁獲主要來源，仍然以海洋捕撈為主，但位在北歐的挪威的水產漁獲，單就鮭魚的養殖漁獲，就高於海洋捕撈。為維持鮭魚養殖產業發展的基礎與該產業的榮景，該國政府從這個產業的根本切入，積極的投入海水養殖鮭魚的育種研究，尤其是大西鮭魚的遺傳育種研究，更是成為家喻戶曉成功的例子，該項成功的研究及有系統的企業化推廣，促使該項產業成為該國的三大產業之一。養殖的大西洋鮭魚種是運用大規模家系選拔，長期的有系統進行遺傳育種改良，不僅避免了在養殖過程中會產生的經濟性狀衰退現象，反而因不斷地遺傳改良而增進經濟性狀，在經過 5-6 個世代的選拔改良，其主要的經濟性狀已高過野生種大西洋鮭魚，養殖時程從改良前的 4 年減少至 2 年以內，大幅的降低約一半養殖成本，並將整套的技術輸出到南美洲的智利。同時這套技術也在其他國家使用，分別應用在鯉魚、吳郭魚及白蝦，如著名的 GIFT 及 genoma 兩種品系吳郭魚。然而在台灣吳郭魚也有莫桑比克和尼羅雜交而來 F1 雜交魚俗稱福壽魚、紅色尼羅魚及雌尼羅和雄奧利亞雜交而來全雄苗皆在產業上應用，但缺乏有系統的管理，無法像挪威的大西鮭魚遺傳育種一樣，免除在養殖過程中經濟性狀衰退現象，相當可惜。

### 有系統的建立育種材料，提高育種材料的基因庫經濟性狀品質，創造育種的啟始(目的基因性狀及可用的素材)

傳統育種過程中基本上還是應用形態學標誌，

這類標誌往往受不同的成長變態階段的外部形態及所處環境的變異而影響辨別，同時形態學標誌數量有限，不利於直接選拔，所以在建立的過程中需有詳細的數代遺傳性的歷史數據資料，以及有系統的收錄，以便後人能根據這些資料評估作為選拔的判斷。在台灣，對水產經濟性物種而言，要有這樣的歷史性狀紀錄資料似乎不可能，因此要從建立育種材料開始，但要如何開始呢？應包括二個重要的工作項目，即確定育種的目標，和所選拔的素材中是否存在著育種目標中有利的遺傳變異；首先「育種平台的建立」是採用有效的選拔配種方法把目標性狀基因藉由遺傳轉移到所要的品種中；其次「標誌技術平台的建立」利用遺傳標記鑑定作為輔助，將目標性狀關聯基因分子標誌的基因型選拔出來，以提高選拔效率和降低形態學標誌選拔育種的盲點。

### 育種平台的建立

擁有經鑑定過的育種材料對育種者非常重要，而我們如何將試驗研究材料轉變成為品種，這是需要從計畫一開始就必須規劃的，之後逐年努力完成。眾所周知的，育種時程相當長，往往規劃者與執行者的所著重觀點不同。規劃者往往只重視縮短育種時程，凡事以快為主；執行者重視的是建立模式育種材料，必竟遺傳育種改良，不同於其他的研究，是否有逐代改良，改良的程度如何、以及評估的標準，都必須先行建立，否則難以具體表示。這方面觀念在水產養殖是相當欠缺的，水產養殖物種的育種材料建立還有另一重要的工程，即在建立育種材料並紀錄水產性狀，同時也將分子標誌的篩選及選殖一併納入，以該育種材料作為分子標誌選殖的對象，對往後的選拔優良水產性狀基因型時將可提供非常有用的材料及工具的育種平台，將試驗研究材料轉變成為品種。

利用所建立的品種採用有效的選拔配種方式把帶有的目標基因性狀品種，藉由遺傳過程轉移到所



待改良的品種中。其中輪迴雜交，是最有效且簡便的方法，以具有較多優良性狀但欠缺某個別性狀的待改良品種，作為輪迴親本（通常是指引進種），以具有輪迴親本所欠缺的優良性狀的品種，作為非輪迴親本，輪迴親本和非輪迴親本，兩者的雜交後裔再與輪迴親本連續數代的有系統回交和選拔，在回交過程完成後最好再進行 1-2 個世代的自交，以便固定這一對純合基因，形成具有輪迴親本一系列的優良性狀而少數欠缺的性狀受到改良的新品種。回交育種方法，是針對某個別不良性狀改良的較佳選育方法，可對帶有個別不良性狀的品種進行改良，所以分子標誌輔助選拔應用於回交育種可以提高選拔效率，加快育種進程。

在新品種的選育工作中，選拔是其中最重要的過程。所謂的選拔就是在一個育種群體中選拔符合育種要求的基因型。傳統的個體選拔是針對符合育種目標的水產性狀所進行的直接選拔，即選拔的是個體的表現型而不是基因型。一般而言，這種方法對品質性狀的選拔是有效的，但缺點是選拔的時程長、成本高、對顯性基因控制的性狀，很難選拔到純合基因型的個體。對於數量性狀的選拔，由於存在單基因多效性、多基因單效性、調控基因以及修飾基因等的作用，所以個體的表現型與基因型之間存有很大的差異，得經過田間試驗以表型性狀進行個體選拔，所以準確性較差；另一種選拔方法則是透過形態標誌的方式，即選拔與育種目標性狀基因連鎖的另一水產性狀，從而對符合育種要求的水產性狀進行間接選拔。由於許多形態標記本身常常是一種有害的性狀或與其他有害性狀相連鎖，而且形態標誌的數量少，所以這種間接的選拔方法應用並不廣泛。有研究利用同工異構酶標誌應用於個體選拔，認為同工異構酶分析手段簡單，可以應用於大群體的遺傳分析。但由於同工異構酶是基因轉譯後的產物，受到個體不同生長環境或發育階段的影響，以及帶有一定的組織特異性、標誌數量有限等缺點，所以利用同工異構酶標誌也不能滿足個體選

拔的要求。隨著現代分子生物學的發展，分子標誌輔助選拔技術就是其中重要的一項技術，不僅彌補了育種中傳統的選拔技術準確率低的缺點，而且縮短了育種進程，廣泛的使用在育種改良。

### 分子標誌輔助選拔在育種上的應用

品質性狀及數量性狀為品種選育目的中的兩大主題，分子標誌基因座則是以連鎖在品質性狀及數量性狀基因座的兩側區域，因而分子標誌輔助選拔在育種應用如下：

#### （一）帶有目標性狀基因的親魚選拔

分子標誌輔助選拔，利用與目標性狀基因連鎖的分子標誌，直接對是否帶有目標性狀基因的個體進行選拔，大幅度的縮短育種時程。分子標誌輔助選拔，因個體的基因與生俱來，從受精開始至老死，一生不變，不受個體生長發育受環境影響、各變態階段因形態差異而影響，以及在選育開始的前幾個世代，形態標誌尚未明顯時，都可進行篩選；當目標性狀基因為隱性基因時，利用呈現共顯性遺傳的分子標誌可直接對其進行選拔，無需進行測交或自交的檢驗；如果目標性狀無法在當代進行選拔時，亦可利用分子標誌直接檢測當代確定目標性狀基因是否存在，無需進行後裔的性狀檢測。

#### （二）選拔以輪迴親本基因組為遺傳背景個體

回交育種選拔方法中，非輪迴親本在為輪迴親本導入優良性狀基因的同時也可能攜帶與之基因連鎖的有害基因，這種夾帶有害基因的現象稱為基因連鎖負累現象 (gene linkage drag)。常常使得經過改良而獲得的新品種與最初的育種目標不一致。因而，在回交育種選拔方法不僅要考慮優良性狀的導入，還必須考慮保持其整個基因組的遺傳背景基本不變。藉由分子標誌輔助選拔技術，可依據物種高密度的分子標誌連鎖圖，對各選拔個體進行整個體基因組的組成分析，進而可以選出帶有多個目標性

狀而且遺傳背景良好的理想個體。研究指出，理論上在傳統的育種方法中，要達到 99 % 以上的輪迴親本比率則需要經過 7 個世代。

### (三) 有效選拔目標性狀基因附近發生重組交換的個體

在回交育種選拔方法，基因連鎖負累現象是影響回交育種的一個主要限制因素。傳統的解決方法，一般都是以擴大選拔族群或增加回交次數來解決。研究指出，既使回交 20 個世代後，仍然發現相當大的與目標性狀基因連鎖的提供者的體染色體片段。經由分子標誌輔助選拔可以快速降低基因連鎖負累部分。因此，分子標誌輔助選拔可以對目標性狀基因附近發生了重組的個體進行確定。

## 標誌技術平台的建立

近一、二十年來迅速發展起來的 DNA 分子標誌技術，為育種改良發展出全新有效的檢驗技術，這就是所謂的“分子標記輔助選拔”(marker-assisted selection, 縮寫為 MAS)。把分子標誌技術應用於育種過程之中，藉由分析與目標性狀關聯基因標誌的基因型來進行育種，從而提高育種效率的目的。

### (一) DNA 分子標誌技術

遺傳標誌 (genetic markers) 是分類學、育種學和物種進化研究的主要技術指標之一，是基因型 (genotype) 特殊的易於識別的表現形式。目前應用遺傳標誌主要有四種類型：形態標誌 (morphological markers) 即生物個體的形態特徵，如魚的體色、體長、體高等；細胞學標誌 (cytological markers)，主要是指染色體核型，包括染色體數目、大小、著絲點的位置和帶型；生化標誌 (biochemical markers)，包括蛋白質標誌和同工異構酶標誌等；DNA 分子標誌 (DNA markers)，是在 DNA 分子層次上經由標準操作程序來反應生物個體間或種群間具有差異 DNA 分子片段。

近一、二十年來，由於分子生物學技術的

發展，分子選殖及 DNA 重組技術的成熟，特別是 PCR 技術和新電泳技術的出現，DNA 分子遺傳標誌技術快速發展成熟，而且新的分子遺傳標誌技術不斷發展出來，廣泛應用於體基因組的研究。目前分子遺傳標誌技術已有下列幾種：(1) 線粒體 DNA (mitochondria DNA, mtDNA) 分子標誌；(2) 以傳統核酸探針雜交為基礎的分子標誌，如限制酶切片段多形性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、螢光原位雜合技術 (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) 和單股構形多形性 (Single Strand Conformation Polymorphism-RFLP, SSCP-RFLP)；(3) 單核苷酸多形性 (single nucleotide Polymorphism, SNP)；(4) 以 PCR 為基礎的分子標誌技術，如隨機擴增片段多形性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、DNA 擴增產物指紋分析 (DNA Amplification Fingerprinting, DAF)、擴增片段長度多形性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)、單股構形多形性 PCR (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP -PCR)；(5) 以重複序列為基礎的分子標誌，如微隨體 DNA (Microsatellite)；(6) 以 mRNA 為基礎的分子標誌，如反轉錄 PCR (Reverse Transcription PCR, RT - PCR) 和差異顯示反轉錄 PCR (Differential Display Reverse Transcription, DDRT- PCR)。但常用的有下列幾種：線粒體 DNA 分子標誌、單核苷酸多形性、RAPD 隨機擴增片段多形性、STS 微隨體 DNA、重複序列為基礎的分子標誌和 AFLP 擴增片段長度多形性等。

### (二) 分子標誌輔助選拔技術的原理及特點

分子標誌輔助選拔 (Marker Assisted Selection, MAS) 是將分子標誌應用於遺傳育種改良過程中進行選拔的一種輔助手段。其基本原理是利用與目標性狀基因連鎖或表現共分離關係的分子標誌，對個體進行選拔目標區域中與目標性狀基因連鎖的分

子標誌以及體基因組篩選，從而減少 gene linkage drag，選拔出期望的個體，達到提高育種效率的目的。分子標誌輔助選拔與表型性狀和同工異構酶標誌進行個體選拔相比，分子標誌輔助選拔具有以下特點：(1) 可直接比較 DNA 的核苷酸鹼基序列差異，不受基因表達的影響，再現性強；(2) 標誌位點多，遍佈於整個體染色組；(3) 許多標誌是共顯性標誌，不受雜交方式的影響，不受個體的生長發育階段及環境條件的影響，縮短育種時程；(4) 標誌形式多樣性，正是傳統的標誌所不具備的優點。

### (三) 分子標誌輔助選拔的方法

分子標誌輔助選拔的應用於育種必備的條件：

(1) 與目標性狀基因（控制品質性狀或數量性狀）基因連鎖的分子標誌，標誌基因座與目標性狀基因座之間的距離決定了分子標誌輔助選拔的準確率，距離越小表示標誌基因座與目標性狀基因座基因連鎖愈明顯，所以距離越小準確率越高，所以，目標性狀基因的精確定位以及兩側各有一個與其基因連鎖的分子標誌基因座，同時目標性狀基因座與分子標誌基因座之間的距離小於 5 cM；(2) 檢測方法自動化，由於分子標誌輔助選拔研究的對象是大規模的育種群體，因而要求檢測過程簡單、成本低、再現性高及自動化程度高，最好以 PCR 檢測技術為主。所以，RAPD 標誌、AFLP 標誌、SCAR 標誌及 STS 等標誌，都是以 PCR 擴增方式為基礎的檢測方法，其中以 SCAR 標誌的發展不僅改進 PCR 的穩定性，更易於進行自動化和大規模的篩選，更加適用於分子標誌輔助選拔。

### (四) 分子標誌輔助選拔之應用

將多個有利性狀基因經由配種的選育方法遺傳轉移組合到一個品種之中，這些基因可以控制相同的性狀也可以控制不同的性狀，多個有利性狀基因遺傳轉移組合突破了回交育種改良個別性狀的限制，使品種在多個性狀上同時得到改良，產生更有實用價值的育種材料。多個有利性狀基因遺傳轉移

組合常應用在抗病性育種選育，育種專家將多個控制垂直抗病性的基因轉移組合在同一品種中，可以提高個體抗病的持久性。在傳統的抗病性檢測中，通過接種鑑定不僅程序複雜，而且常常影響個體的生長發育，而且一些抗病性基因很難找到對照品種鑑定。採用與抗病性狀基因連鎖的分子標誌或相應基因的專一性引子進行分子標誌輔助選拔，可加速抗病源篩選和抗病性狀基因的鑑定，提高育種選拔效率，縮短育種週期。特別是在多個抗病性狀基因的轉移組合選育和轉移數個抗病性狀基因方面具有很大的應用前景。

### 結論

分子標誌輔助選拔技術，是現代生物技術在遺傳改良領域中應用的一個重要技術。在挪威的大西洋鮭魚的育種成功例子激勵下，整套技術同時輸出至其他國家使用，分別應用在鯉魚、吳郭魚和白蝦的育種研究，有效率的縮短傳統的育種時程，驗證了分子標誌輔助選拔育種現場的應用是沒問題的。儘管我國在分子標誌輔助選拔方面的研究剛開始，但在水產養殖方面則有相當的發展，尤其是可繁殖的水產物種有上百種，選擇數種適當的對象，全力投入應會相當的進展，為什麼只選擇數種，因為選拔育種必須連續數代的繁殖、養殖及選拔，都不是一、兩年內可完成的，是耗時，耗費人力，資金投注大的綜合技術研究，雖然我們有上百種的繁養殖對象，卻無法兼顧，財力物力也不允許，因此，只能選擇數種，具經濟性與發展性，確實需要審慎請專人評估，一經決定投入後就無法回頭，因為分子標誌輔助選拔育種是量身打造的技術平台，跨物種使用是有其困難性。

AgBIO

曾福生 行政院農業委員會水產試驗所 水產養殖組  
副研究員