



逢機多態性引子區別臺灣及越南養殖牡蠣之可行性探討

王姿文、黃奕瑄、游蕻、曾福生
水產試驗所水產養殖組

前言

牡蠣 (*Crassostrea* sp.) 為臺灣三大養殖貝類之一，養殖區域北起新竹香山，南至屏東，主要產區在嘉義縣、雲林縣、彰化縣、臺南縣市及屏東縣，而澎湖、金門及馬祖等離島也均可看到牡蠣養殖 (蕭等, 2012)。近年，臺灣牡蠣養殖面臨到氣候變遷及人力老化等問題，使產量大幅下降，根據漁業署的漁業統計年報顯示，牡蠣總產量從 2017 年的 2 萬 3 千公噸跌到 2021 年的 1 萬 8 千公噸，5 年間減少 40 億新臺幣產值。根據海關進出口統計資料發現，進口貨名一活、生鮮或冷藏牡蠣，至 2017 年起，從東南亞進口的國家僅有越南，而進口重量從 2017 年 4 公噸到 2021 年的 1,660 公噸。

農產品的產地溯源分析技術，主要是辨別不同地區來源農產品的專一性指標，農產品產地溯源研究技術包含：有機成分指紋、紅外光譜指紋、同位素指紋及礦物元素指紋等。目前，臺灣茶葉改良場建立了茶葉產地鑑別技術，除了多重元素檢驗分析外，還發展 DNA 分子標記鑑定技術，其可作為辨別茶樹種苗的品種鑑定、成品茶的品種鑑定、茶樹繁殖用母樹及種苗純度之分析、茶樹種原的遺傳歧異度與親緣關係分析、茶樹品種

的起源地探索與親緣鑑定及茶樹分子遺傳圖譜的建構 (胡等, 2011)。

因牡蠣基因組資料庫有限，且國外相關牡蠣養殖產地，樣本取得困難。本試驗使用逢機擴增多型性去氧核糖核酸 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 引子，作為建構不同來源牡蠣 DNA 指紋的工具。RAPD 方法，主要優點包括適用於基因組資料不全、有限數量 DNA 可用的問題及成本低 (Hadrys Balick et al., 1992)。

本試驗使用 RAPD 引子比對臺灣澎湖地區講美與菜園及越南下龍灣 (Halong bay)、榮市 (Vinh City)、峴港 (Da Nang) 及芽莊 (Nha Trang) 養殖牡蠣的 DNA 指紋，並利用分析軟體計算遺傳相似度，結果顯示該方法可判別不同親緣牡蠣。

材料與方法

一、牡蠣樣本

牡蠣樣本分別由本所漁業組、加工組提供與魚病檢測所剩之樣本，共兩批。2021 年 11 月，由漁業組提供，臺灣澎湖帶殼牡蠣，來源標示講美 (MJ)，菜園 (TU)，樣本數各 10 顆。2022 年 8 月，由加工組提供，越南牡蠣，來源標示下龍灣 (SL)，樣本數為 11 顆；

榮市 (ZS)，樣本數為 8 顆；岷港 (SG)，樣本數為 12 顆；芽莊 (YJ)，樣本數為 12 顆。皆為脫殼冰藏的牡蠣。來源地如圖 1。

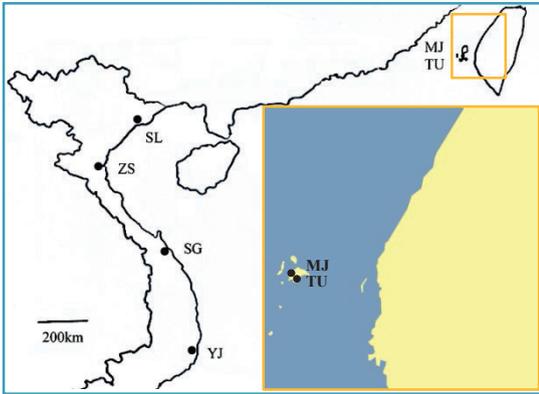


圖 1 養殖牡蠣來源之地理位置圖

澎湖講美 (MJ) 和菜園 (TU)，越南的下龍灣 (SL)、榮市 (ZS)、岷港 (SG) 及芽莊 (YJ)

二、核酸萃取與定量

取 0.3 g 的組織至微量離心管後，加入 475 μ l 的裂解緩衝液及 25 μ l 的蛋白酶 K。混合均勻後，放入烘箱中，每 30 分鐘搖晃一次至組織完全溶解。將溶解物加入 500 μ l 的苯酚-氯仿混合物 (1:1)，均勻混合後，於 4°C 以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新的微量離心管，且以 1:6 比例加入無水酒精，混合後放置 -80°C。沉澱 12 小時後，於 4°C 以 13,000 rpm 離心 30 分鐘，倒除上清液。加入 200 μ l 的 70% 酒精，於 4°C 以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，倒除上清液，陰乾沉澱物。沉澱物以 40°C TE 緩衝液回溶，完成萃取。

樣本核酸經定量分光光度計檢測吸光值 (OD 260/OD 280) 檢測核酸濃度後，定量樣本核酸濃度至 100 ng/ μ l。

三、聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

本實驗使用 6 條 RAPD 引子。序列參閱

曾等 (2008) 所使用的六對引子 (p3、5、7、8、9、12)，對 MJ、TU、SL、ZS、SG 及 YJ 等 6 個來源的牡蠣樣本進行擴增。

每個樣本取 2 μ l 定量 DNA，加入 12.5 μ l 的 2X PCR Mix、2 μ l 引子 (10 mM) 及 8.5 μ l 的 PCR water，混合均勻後上機進行反應。

反應條件為 94°C 預先變性 15 分鐘；接著進行輪迴反應，反應依序為 94°C，45 秒；42°C，45 秒及 72°C，30 秒，共進行 30 次；最後 72°C，10 分鐘。擴增產物於 4°C 備用。

擴增產物以 1.5% 瓊脂糖凝膠 (agarose gel)，於電壓 100 伏特下進行電泳分析，經溴化乙錠 (EtBr) 染色後於 UV 燈下顯影，再由影像分析系統觀察和拍照。

四、資料分析

人工分析判讀照片檔，將擴增條帶轉換為 0 和 1 數據，同分子量位置出現擴增條帶記為 1，未出現者記為 0，再將 (0、1) 數組輸入 Excel 中，再以 PAST v.4.03 統計分析軟體進行分析，計算各來源之遺傳相似度。

結果與討論

從澎湖講美 (MJ) 和菜園 (TU)，越南下龍灣 (SL)、榮市 (ZS)、岷港 (SG) 及芽莊 (YJ) 等共 63 個牡蠣樣本，在 6 對引子 (p3、5、7、8、9、12) 擴增的 DNA 指紋 (圖 2)，澎湖 MJ 和 TU DNA 指紋明顯不同於越南 SL、ZS、SG 及 YJ；p3、5、7、8、9、12 擴增來自澎湖 MJ 和 TU 個體的基因數均不少於 3 個。而來自越南個體在 p3、9、12 引子展現出缺失現象且基因數明顯少於澎湖；p5、7、8 引子雖有但 DNA 指紋不同。

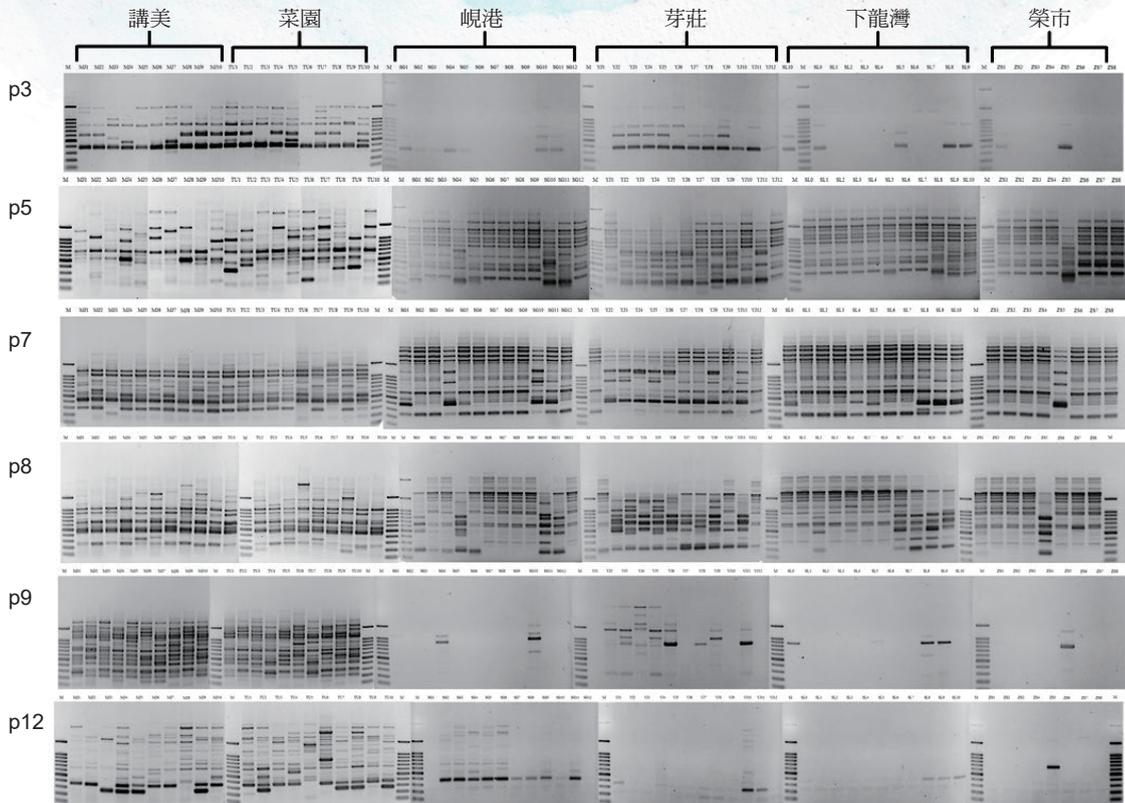


圖 2 p3、5、7、8、9、12 引子擴增澎湖講美 (MJ1-10)、菜園 (TU1-10)、越南下龍灣 (SL1-11)、榮市 (ZS1-8)、峴港 (SG1-12)、芽莊 (YJ1-12) 之瓊脂糖凝膠圖

比較兩地擴增的 DNA 指紋總體基因數澎湖多於越南，基因數相對較多卻無法區分講美和菜園；越南在 p3、9、12 有基因缺失的問題，其餘的 p5、7、8 基因數多，DNA 指紋樣態不多，可能有近交或是選育的操作。以 p5 為例，共檢測 63 個樣本，澎湖 MJ 和 TU 樣本 20 個，基因數少，DNA 指紋較多樣；越南 SG 的 2、3、5、6、7、8、9、12，YJ 的 1、10、12，SL 的 1、2、3、4、5、6、7，ZS 的 1、2、3、4、6、7、8 等，共 25 個樣本，來自越南不同地點卻有相似的 DNA 指紋，YJ 的 DNA 指紋樣態較為複雜，SL 和 ZS 只有兩型。其他兩個 p7 及 p8 引子間，DNA 指紋不同，但引子內 DNA 指紋樣

態變異少，個體間沒有相同的 DNA 指紋，這些是因養殖時牡蠣來源不一，還是收成後包裝混雜其中，暫無法釐清還須確認。

以非加權組平均法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 分析 DNA 指紋相似度 (圖 3)，紅色箭頭處相似度約 0.21 可分兩群：一群澎湖 MJ 和 TU，藍色箭頭處相似度約 0.49；另一群為越南 SL、ZS、SG 及 YJ。澎湖 MJ 和 TU 無法區別，變異最小；綠色箭頭處相似度約 0.36 可將越南分北方群 (SL、ZS) 和南方群 (SG、YJ)，其中南方群變異最大。綜合檢測數據，顯示利用分子標記 RAPD 方法，可以區分澎湖和越南牡蠣，快速鑑別親緣性及遺傳歧異度。

臺灣養殖方式附苗後移至養殖區以插筴式、垂下式、平掛式和浮棚式固定自然養殖，除浮棚式外，皆依日周潮汐變化。牡蠣苗的生產一年當中有兩季，依季節可分春苗及秋苗，以人工處理的附苗介質（牡蠣殼）掛在海域自然附苗，除非有人為移動，否則終其一生牡蠣都待在原地長大繁殖。臺灣牡蠣苗

主要由雲林縣天然海域繁殖和附苗，採收後依需求，人為運送異地養殖，運送他地養成，遺傳變異源自雲林海域，後續之遺傳變異主要是受養成地區環境天擇的結果，越南和臺灣的澎湖縣養成地區環境截然不同，所以利用 RAPD 方法針對這些沒有相關遺傳資料來源牡蠣樣本探討區別的可行性提供參考。

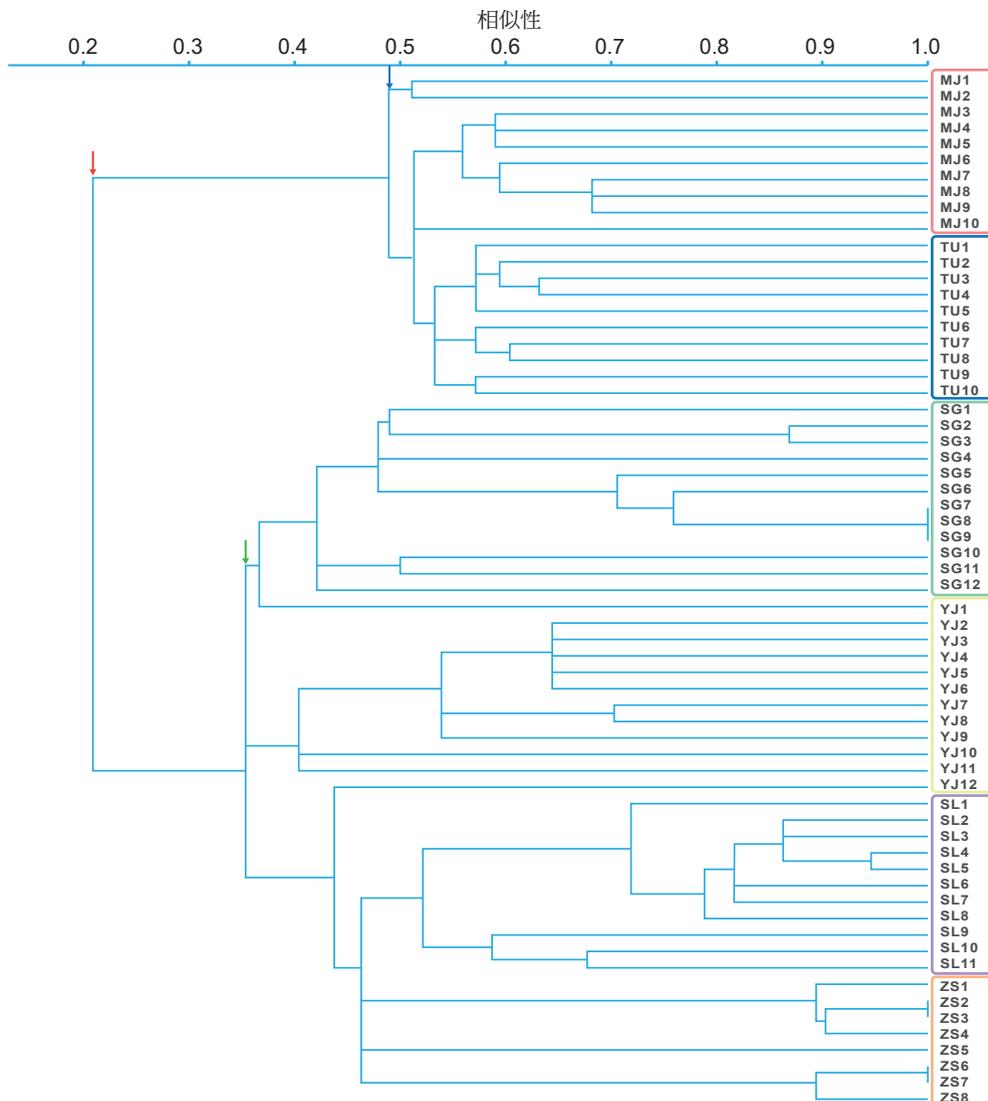


圖3 澎湖和越南不同採樣點之親緣關係 UPGMA 分析

澎湖講美 (MJ1-10, 紅色框)、菜園 (TU1-10, 藍色框), 越南下龍灣 (SL1-11, 紫色框)、榮市 (ZS1-8, 橘色框)、峴港 (SG1-12, 綠色框)、芽莊 (YJ1-12, 黃色框)