

利用 PCR-RFLP 技術鑑別五種吳郭魚

張格銓·張湧泉*·陳榮華·張素容·劉富光

行政院農業委員會水產試驗所淡水繁養殖研究中心

摘 要

本試驗應用聚合酶連鎖反應—限制酶切割片段多型性 (PCR-RFLP) 技術鑑別淡水繁養殖研究中心所保育之尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus niloticus* Linnaeus, 1758)、莫三比克吳郭魚 (*O. mossambicus* Peters, 1852)、歐利亞吳郭魚 (*O. aureus* Steindachner, 1864)、賀諾奴吳郭魚 (*O. urolepis hornorum* Trewavas, 1966) 及斯皮路勒吳郭魚 (*O. spilurus spilurus* Günther, 1894) 等吳郭魚。結果顯示此五種吳郭魚的粒線體 DNA D-loop 片段長度為 958 ~ 968 bp, 核苷酸鹼基組成之 A+T (%) 為 64.3 ~ 65.5; 百分比相同性為 88.5 ~ 96.2; 遺傳距離為 0.038 ~ 0.124。

分析五種吳郭魚之 D-loop 片段, 選擇 *AclI*, *BbsI* 及 *MspI* 內切限制酶對其切割位或切割片段長度有相異之處, 可藉以區別之。另外, 用 Neighbor-joining (NJ) 方法繪出的演化樹顯示其分成三支 (clade), 賀諾奴吳郭魚與莫三比克吳郭魚形成一支, 尼羅吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚形成另一支, 歐利亞吳郭魚則呈獨立狀態。

本項鑑種技術一經確立, 對今後種原庫的保種與育種工作之推展助益良多。

關鍵字: 吳郭魚、粒線體 DNA D-loop 片段、PCR-RFLP、品種判別

前 言

吳郭魚的原產地雖然是在非洲及中東地區, 然而台灣的吳郭魚養殖歷史悠久, 1946 年吳振輝先生及郭啟彰先生從新加坡帶回莫三比克吳郭魚 (*Oreochromis mossambicus* Peters, 1852) 至今 (2009 年) 已逾 60 餘年, 此期間陸續有學者、專家從不同國家帶回其它種類的吳郭魚。水產試驗所研究人員從事品種改良的試驗, 得到成長體型較佳的福壽魚以及高比率的雄性子代。由於所養殖之種類不少, 必須能夠判別品種才能夠正確地進行保種及育種。

傳統上吳郭魚品種的判別方法是對魚體做各種形質的測量、紀錄與比較 (Trewavas, 1983), 不過往往必須成長至一定體型後才能予以區別。在生物化學上, 可以根據同功酶 (allozyme) 結構之

不同, 區分吳郭魚品種 (Pouyaud and Agnès, 1995) 或品系 (Macaranas *et al.*, 1995), 此法是蛋白質層次的分析, 有時候未能顯現遺傳性基因之差異。再者, 核苷酸序列之變化不一定會改變所編碼的多勝肽 (polypeptide), 而且有些多勝肽的變化不會改變蛋白質在電泳膠片上的移動力 (mobility) (Liu and Cordes, 2004), 易產生誤判。Bardakci and Skibinski (1994) 應用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技術鑑別吳郭魚品種, 此技術的優點是分析的 DNA 片段不需要進行核苷酸定序等複雜操作, 相當簡便, 但有試驗結果再現性較低之缺點。

相對於核 DNA (nuclear DNA), 位於細胞質的粒線體 DNA (mitochondrial DNA; mtDNA) 的突變速率比較快而且只是母系遺傳 (maternal inheritance), 導致粒線體 DNA 核苷酸序列歧異度的累積速率比核 DNA 快 (Liu and Cordes, 2004), 即使是因演化而剛分開不久之品種, 其種間核酸置換 (nucleotide substitution) 數量也會快速地累積, 是很好的親緣系統樹分析 (phylogenetic

*通訊作者 / 彰化縣鹿港鎮海埔里 106 號, TEL: (04) 777-2175; FAX: (04) 777-5424; E-mail: yungchuan@mail.fwlk.tfrin.gov.tw

analysis) 材料 (Wilson *et al.*, 1985)。

大部分脊椎動物的粒線體 DNA 長度為 16.3 ~ 17.6 kb (Tzeng, 1992)，由數種基因所組成，其中，「D-loop 控制區」基因的長度約 1 kb，為非編碼 (non-coding) 核苷酸片段，位於 poline tRNA 基因與 phenylalanine tRNA 基因之間，在粒線體 DNA 各種片段中變異性最高 (Moritz *et al.*, 1987)，常用來作為物種內或物種間的遺傳分析材料 (Bernatchez and Danzmann, 1993; Agnès *et al.*, 1997; Romana-Eguia *et al.*, 2004; 吳, 2006; Menezes *et al.*, 2006)。

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 技術在操作上需要約 2 ~ 10 µg 之 DNA，如果是分析整體的粒線體 DNA，必須摘取試驗魚的肝臟或生殖腺等組織萃取多量的粒線體 DNA (蔡等, 1997)，試驗魚也會因而致死。而 PCR-RFLP 技術則是先應用 PCR 技術大量增幅目標 DNA 片段後，才進行 RFLP 分析，樣品 DNA 的原始需求量較少，僅若干毫微克 (ng)，在採樣及操作上簡便許多，只要少量活魚之鱗部組織或血液組織即可，已被研究人員廣泛使用在遺傳變異分析，例如：美洲紅點鮭 (*Salvelinus fontinalis* Mitchell, 1814) (Bernatchez and Danzmann, 1993)、尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus niloticus* Linnaeus, 1758) (Agnès *et al.*, 1997)、虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) (Sajedi *et al.*, 2003)、尼羅吳郭魚及紅色吳郭魚雜交種 (*Oreochromis* sp.) (Romana-Eguia *et al.*, 2004)、鯉魚 (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) (Lehoczky *et al.*, 2005) 及正鰱 (*Katsuwonus pelamis* Linnaeus, 1758) (Menezes *et al.*, 2006)；也被使用在品種鑑別，例如：六種旗魚 (Innes *et al.*, 1998)、三種鰻魚 (張等, 1999)、23 種食用魚類 (Wolf *et al.*, 2000) 及 2 種紫菜 (Niwa and Aruga, 2006)。另外，吳 (2006) 分析、比較中國大陸幾種主要引進吳郭魚的粒線體 DNA D-loop 片段等之基因序列，繪出親緣關係並鑑別不同的品種，不過並未進一步地實施 RFLP。

本試驗擬針對本中心所保育的尼羅吳郭魚、莫三比克吳郭魚、歐利亞吳郭魚 (*O. aureus* Steindachner, 1864)、賀諾奴吳郭魚 (*O. urolepis hornorum* Trewavas, 1966) 及斯皮路勒吳郭魚 (*O. spilurus spilurus* Günther, 1894) 等，瞭解不同品種

的 D-loop 片段之序列型態與多型性 (polymorphism) 分布情形，期能設計出生物技術判別之方法，以便輔助吳郭魚之保種及育種工作。

材料與方法

一、試驗魚種

採樣自本中心保種之尼羅吳郭魚、莫三比克吳郭魚、歐利亞吳郭魚、賀諾奴吳郭魚及斯皮路勒吳郭魚。

二、試驗方法

(一) Genomic DNA 之萃取

分別剪取各組試驗魚 (每組 32 尾) 之少許臀鰭組織，使用 MasterPure DNA Purification Kit (EPICENTRE) 萃取 genomic DNA 後，以 GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences) 核酸分析儀測定濃度後保存於 -20°C 冰箱備用。

(二) mtDNA D-loop 片段之 PCR 試驗

選定一對引子 LN20: 5'-ACCACTAGCACCCAAAGCTA-3' (Forward) 及 HN20: 5'-GTGTTATGCTTTAGTTAAGC-3' (Reverse) (Agnès *et al.*, 1997; Bernatchez and Danzmann, 1993; Romana-Eguia *et al.*, 2004; 張等, 2008)；LN20 及 HN20 分別為 proline tRNA 基因與 phenylalanine tRNA 基因之一部分 (Bernatchez and Danzmann, 1993)，位於 D-loop 片段兩端。將此對引子與 genomic DNA 進行 PCR 反應，以增幅 mtDNA D-loop 長度約 1 kb 之片段。反應試液包括：genomic DNA (25 ng/µl) 1 µl，10 mM dNTP 1 µl，10 µM LN20 1 µl，10 µM HN20 1 µl，Reaction Buffer (10X) 5 µl，SuperTaq (5U/µl) 0.2 µl 及無菌水 40.8 µl，總體積 50 µl。PCR 反應機型為 MyCycler thermal cycler (Bio-Rad)。增幅反應條件為：變性 (denaturation) 94 °C，2 分，接著進行 30 個循環的變性 (denaturation) 94 °C，1 分，黏合 (annealing) 55 °C，1 分及延長 (extension) 72 °C，1 分，最後再於 72 °C 延長 7 分後，降至 4 °C 終止反應。

Table 1 Base composition of nucleotide sequences on the mtDNA D-loop from five tilapia species (primers not included)

Tilapia	Length	Base composition (%)				A+T(%)	GenBank Accession. No.
		T	C	A	G		
<i>O. aureus</i>	968	32.9	21.3	32.1	13.7	65.0	EU430994
<i>O. u. hornorum</i>	961	33.4	20.4	31.6	14.6	65.0	EU308500
<i>O. mossambicus</i>	958	33.0	21.2	31.3	14.5	64.3	EU430997
<i>O. n. niloticus</i>	961	33.6	20.5	31.9	13.9	65.5	EU430996
<i>O. s. spilurus</i>	962	34.1	20.6	31.2	14.1	65.3	EU431000

(三) D-loop 片段選殖

將試驗吳郭魚 (每種各取一尾) 以 T₄ 連接酶 (ligase) 將 D-loop PCR 產物與 pGEM-T easy vector 進行連接反應, 此產物再進行轉型作用 (transformation) 至 XL1-blue 菌株, 在含有 50 µg/ml Ampicillin LB agar 培養皿 (內含 IPTG 及 X-Gal) 進行重組 DNA 菌株的篩選, 將選擇之菌株委託源資國際生物科技定序, 以瞭解插入片段是否正確。

(四) 洋菜膠體電泳 (agarose gel electrophoresis) 與核苷酸序列分析

製備 1.5 % 洋菜膠體置於內含 0.5 × TAE buffer 之迷你電泳槽 (Bioer GE-100), 將 PCR 產物以微量吸管抽至洋菜膠體孔內, 電壓 100 V。電泳結束後將膠體以 Ethidium bromide 染色, 接著用影像處理系統 PHOTO-PRINT (VILBER LOVRMAT) 進行分析及儲存為影像檔案。

定序後之 D-loop 片段, 用 SeqBuilder 軟體 (DNASTAR Lasergene 7.1) 分析各種限制酶之切割位及數量 (或未切割), 從中比較、篩選出幾個對試驗魚品種有不同切割片段, 可藉以判別品種之限制酶, 例如 *AcuI*、*BbsI* 及 *MspI* 等, 向廠商 (New England Biolabs) 購買, 依照其產品使用說明對各種吳郭魚 (每種 32 尾) 所試驗之 PCR 產物做實際切割後, 如前述方式做電泳分析。

定序後之 D-loop 片段, 以 MegAlign 軟體 (DNASTAR Lasergene 7.1) 分析比對後的 D-loop 核苷酸序列, 比較彼此間的百分比相同性 (percent identity)。另外, 使用 MEGA 4 套裝軟體 (Tamura *et al.*, 2007) 分析比對後的核苷酸序列之鹼基組

成 (base composition)、鹼基轉換 (base transition) 及鹼基顛換 (base transversion); 以 kimura 2-parameter 模式計算遺傳距離 (genetic distance), 並依照 Neighbor-joining (NJ) 方法 (bootstrap 重複抽樣 1,000 次檢測), 繪出演化樹 (phylogenetic tree), 以同為慈鯛科之灰體藍首魚 (*Tropheus duboisi* Marlier, 1959) D-loop 片段 (NCBI accession No. AP006015) 作為外群 (outgroup)。

結 果

各種吳郭魚增幅的粒線體 DNA D-loop 片段, 經過核苷酸定序及序列比對後之長度為 958 ~ 968 bp (不含引子序列), 鹼基組成之 A+T (%) 在 64.3 ~ 65.5 之間, 已將各個序列登錄於 NCBI (美國國家生物技術資訊中心) 的 GenBank (Table 1) 資料庫。比較各種吳郭魚彼此間鹼基之轉換及顛換情形, 結果顯示都是轉換多於顛換, 轉換/顛換之比值為 1.5 (歐利亞吳郭魚與莫三比克吳郭魚) ~ 4.1 (尼羅吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚) (Table 2)。序列之百分比相同性方面, 為 88.5 (歐利亞吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚) ~ 96.2 (尼羅吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚); 遺傳距離為 0.038 (尼羅吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚) ~ 0.124 (歐利亞吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚) (Table 3)。

分析各種吳郭魚之 D-loop 片段, 發現可以利用三種內切限制酶對其切割位、片段數目或長度之不同, 予以區別之。其中, *AcuI* 可以鑑別歐利亞吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚, 其雖然均切割成二個片段, 不過切割位及長度不一樣, 又可将此二種吳郭魚分別與無切割位之賀諾奴吳郭魚、莫三比克吳郭魚及尼羅吳郭魚區別 (Fig. 1); *BbsI* 對尼

Table 2 Number of transition or transversion, and transition/transversion ratio of nucleotide sequences on the mtDNA D-loop from five tilapia species

Tilapia	<i>O. aureus</i>	<i>O. u. hornorum</i>	<i>O. mossambicus</i>	<i>O. n. niloticus</i>	<i>O. s. spilurus</i>
<i>O. aureus</i>		68, 39	59, 40	64, 40	72, 38
<i>O. u. hornorum</i>	1.7		45, 18	61, 26	59, 25
<i>O. mossambicus</i>	1.5	2.5		54, 26	54, 23
<i>O. n. niloticus</i>	1.6	2.3	2.1		29, 7
<i>O. s. spilurus</i>	1.9	2.4	2.3	4.1	

Above diagonal: transition, transversion; below diagonal: transition/transversion ratio

Table 3 Percent identity and genetic distance of nucleotide sequence on the mtDNA D-loop from five tilapia species

Tilapia	<i>O. aureus</i>	<i>O. u. hornorum</i>	<i>O. mossambicus</i>	<i>O. n. niloticus</i>	<i>O. s. spilurus</i>
<i>O. aureus</i>		88.8	89.6	89.2	88.5
<i>O. u. hornorum</i>	0.120		93.4	90.9	91.2
<i>O. mossambicus</i>	0.111	0.070		91.6	92.0
<i>O. n. niloticus</i>	0.119	0.097	0.089		96.2
<i>O. s. spilurus</i>	0.124	0.093	0.085	0.038	

Above diagonal: transition, transversion; below diagonal: transition/transversion ratio

Table 4 Number of fragment produced by restriction enzyme digestions of amplified mtDNA D-loop region from five tilapia species

Enzymes	<i>O. aureus</i>	<i>O. u. hornorum</i>	<i>O. mossambicus</i>	<i>O. n. niloticus</i>	<i>O. s. spilurus</i>
<i>Acul</i>	2 (429)	1	1	1	2 (741)
<i>BbsI</i>	1	1	1	2 (674)	1
<i>MspI</i>	2 (835)	2 (830)	3 (531, 827)	3 (534, 830)	3 (533, 831)

Cutting sites (in base pairs) are shown in parenthesis.
Fragment size smaller than 80 bp is not shown.

Table 5 Number of fragment produced by restriction enzyme digestions of amplified mtDNA D-loop region from five tilapia species

Enzymes	<i>O. aureus</i>	<i>O. u. hornorum</i>	<i>O. mossambicus</i>	<i>O. n. niloticus</i>	<i>O. s. spilurus</i>
<i>Acul</i>	428, 580	1001	998	1001	262, 740
<i>BbsI</i>	1008	1001	998	328, 673	1002
<i>MspI</i>	174, 834	172, 829	172, 296, 530	172, 296, 533	172, 298, 486

Fragment size smaller than 80 bp is not shown.

羅吳郭魚有一個切割位，可以單獨地與沒有切割位的莫三比克吳郭魚、歐利亞吳郭魚、賀諾奴吳郭魚及斯皮路勒吳郭魚一起區別 (Fig. 2)；*MspI* 對歐利亞吳郭魚與賀諾奴吳郭魚均有一個切割位，對莫三比克吳郭魚、尼羅吳郭魚及斯皮路勒吳郭魚則均有二個切割位 (Fig. 3)。各種吳郭魚所採樣之 32 尾試驗魚，其電泳圖表現均分別有其一致性。即使僅比較此三種限制酶切割片段數量之

型式，亦能快速地鑑別此五種吳郭魚 (Table 4)，也可以進一步地了解其切割 (或未切割) 片段大小 (Table 5)。

使用 Neighbor-joining (NJ) 方法繪出的演化樹顯示試驗之吳郭魚中，賀諾奴吳郭魚與莫三比克吳郭魚形成一支 (clade)，尼羅吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚形成另一支，歐利亞吳郭魚則呈獨立狀態 (Fig. 4)。

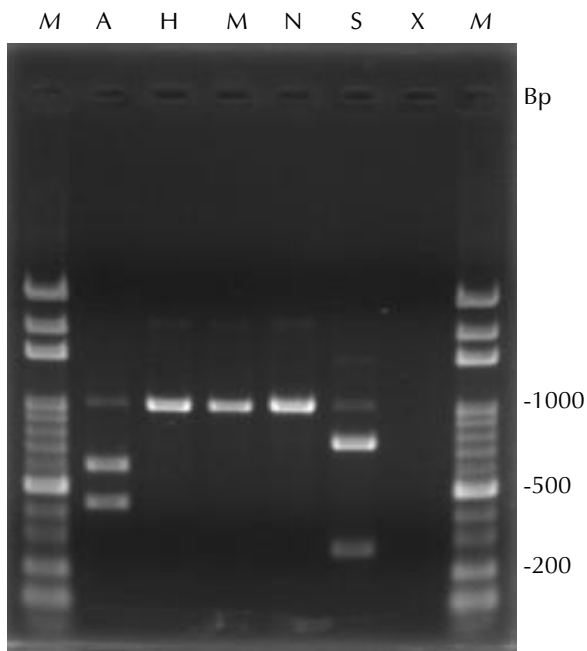


Fig. 1 Cleavage, with *AcuI*, of the amplified mtDNA D-loop segment from five tilapia species. A: *O. aureus*; H: *O. u. hororum*; M: *O. mossambicus*; N: *O. n. niloticus*; S: *O. s. spilurus*; X: negative control; M: 100bp DNA ladder marker.

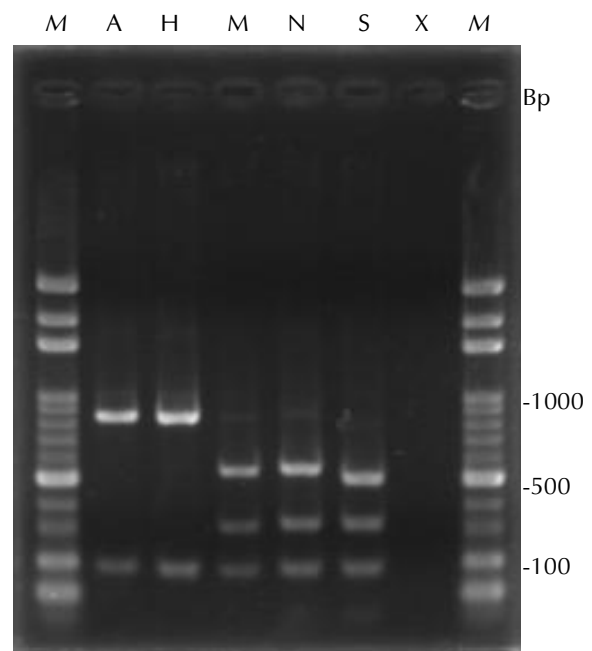


Fig. 3 Cleavage, with *MspI*, of the amplified mtDNA D-loop segment from five tilapia species. A: *O. aureus*; H: *O. u. hororum*; M: *O. mossambicus*; N: *O. n. niloticus*; S: *O. s. spilurus*; X: negative control; M: 100bp DNA ladder marker.

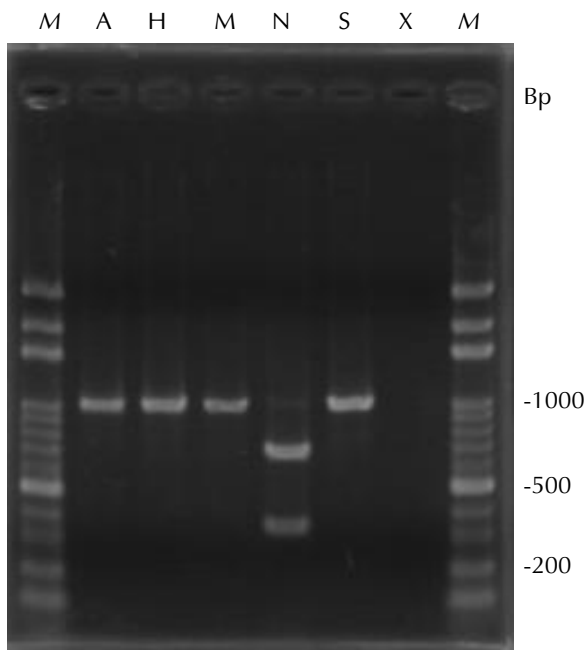


Fig. 2 Cleavage, with *BbsI*, of the amplified mtDNA D-loop segment from five tilapia species. A: *O. aureus*; H: *O. u. hororum*; M: *O. mossambicus*; N: *O. n. niloticus*; S: *O. s. spilurus*; X: negative control; M: 100bp DNA ladder marker.

討 論

在 DNA 序列的演化上，鹼基的轉換率與顛換率是不一樣的，通常是轉換率高於顛換率 (Strandberg and Salter, 2004)，本試驗的吳郭魚彼此間粒線體 DNA D-loop 片段的轉換/顛換之比值為 1.5 ~ 4.1，也顯示相同的結果。一般而言，D-loop 片段的鹼基組成是 A+T-rich (Wolstenholme, 1992)，即 A+T (%) 多於 C+G (%)，本試驗各種吳郭魚的 A+T (%) 在 65.0 左右，此與吳 (2006) 對吳郭魚遺傳分析的結果類似。

在種別鑑定方面，五種吳郭魚粒線體 D-loop 序列在 DNASTAR Lasergene 軟體之分析下，能顯示出完整的限制酶切割位置、片段多寡及長度，在經過人工比較後，我們選擇區別性高且容易購得的三種限制酶作為研究工具，應用 PCR-RFLP 方法可將試驗之吳郭魚區分。首先用內切限制酶 *BbsI* 切割 PCR 產物，如果電泳圖呈現二個片段，即顯示為尼羅吳郭魚，可輕易地與其它四種吳郭魚區別。倘若用 *BbsI* 無法切割，則使用 *AcuI* 切割，如果電泳圖呈現二個片段，可以根據切割位及長度之不同判斷為歐利亞吳郭魚或斯皮路勒吳郭

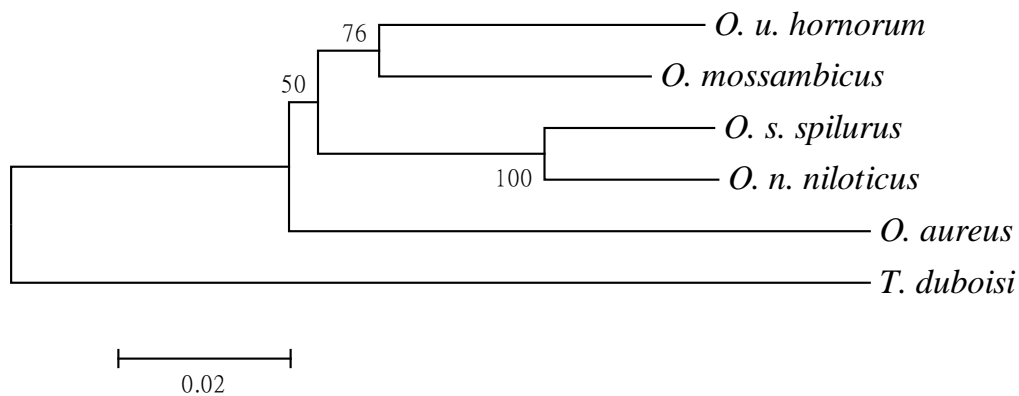


Fig. 4 Neighbor-joining(NJ) tree of the five tilapia species based on mtDNA D-loop sequences. *Tropheus duboisi* serves as the outgroup.

魚。假使用 *BbsI* 及 *AcuI* 均無法切割，則可用 *MspI* 切割，若切割成二個片段就是賀諾奴吳郭魚，若切割成三個片段就是莫三比克吳郭魚。PCR 產物實際做切割及電泳分析後，顯示電泳結果與軟體分析之限制酶切割數量與位置相同，僅在 *AcuI* 之結果中發現歐利亞吳郭魚及斯皮路勒吳郭魚的 PCR 產物均有少數並未切割 (Fig. 1)，原因為此限制酶切割所必須另行添加的 SAM (S-adenosylmethionine) 試液，在反應條件下並不穩定，造成沒有完全切割之現象，不過並未影響到判讀，畢竟其它三種完全未切割吳郭魚 PCR 產物之電泳片亮度要高出許多。另外，電泳片上的切割片段在 80bp 以下常因亮度不足，會造成觀察困難 (Wolf *et al.*, 2000)，所以判讀時通常會忽略小片段 DNA；本試驗結果僅在 *MspI* 對斯皮路勒吳郭魚的 PCR 產物出現長度小於 80 bp 的切割片段 (Table 5)。

瀏覽 NCBI 網站的 GenBank 資料庫，搜尋已登錄的吳郭魚 D-loop 序列 (長度大於 500 bp)，用 SeqBuilder 軟體進行分析並與本試驗結果比較，發現有相同的切割結果。以莫三比克吳郭魚為例，GenBank 資料庫之 AY597335、EU430998、EU430999 及 EU697117 等 D-loop 序列，皆顯示 *AcuI* 和 *BbsI* 沒有切割位，*MspI* 有二個切割位，而且切割位在序列上之相對位置，也與本試驗結果類似；另外，分析尼羅吳郭魚 (AY913855) 及歐利亞吳郭魚 (EU697116) 之 D-loop 序列，也出現類似於本試驗結果之情況。就所分析之切割位而言，似未受到族群間遺傳變異之影響，不過尚需

多做一些不同族群樣本之分析與比較。

欲應用生物技術鑑別本中心所保育純種吳郭魚之前，先查閱相關文獻，發現大部分用 D-loop 片段作種內族群間之遺傳分析，不過吳 (2006) 的試驗結果顯示粒線體 DNA 16S rRNA、Cyt b 及 D-loop 等不同片段之核苷酸序列均因品種間有多型性之存在，皆可用來作吳郭魚之品種鑑定，而且增幅 D-loop 片段所使用之引子與前述被用來種內族群間之遺傳分析是同一對 (LN20 及 HN20)。

就吳郭魚而言，文獻顯示 D-loop 片段可分析種內族群之變異及種間之鑑別，為了便於比較及大致了解本中心吳郭魚之遺傳變異情形，乃採用此片段作試驗與分析。在台灣，吳郭魚雖然是常見的淡水魚，卻是外來種，而且引進數量並不多。試驗結果顯示所採樣本中心之吳郭魚可能是因為當初引進數量少而且經過多年來選種及保種之結果，在 D-loop 片段並未見族群或個體間之變異。

所收集到之文獻並未有以粒線體 DNA COI 片段鑑別吳郭魚之報告。對一般動物而言，粒線體 DNA 有種間變異性高及種內變異性低之特性，不同片段只是有程度上之區別而已。以 COI 為例，目前在 Barcode of life data systems (BOLD) 所登錄的莫三比克吳郭魚 COI 片段就有幾種不同的核苷酸序列，也是有種內變異性存在。

本試驗只是單純地針對本中心所保育之純種吳郭魚做試驗，欲建立用生物技術判定吳郭魚品種之平台及相關資料，必要時也可以協助魚苗之種別判定。吳郭魚容易進行種間雜交，一般養殖魚為雜交種，並不適用此法鑑別。

尼羅吳郭魚與斯皮路勒吳郭魚 D-loop 片段之百分比相同性最高，遺傳距離最低，在演化樹上自成一支，演化關係最近；賀諾奴吳郭魚與莫三比克吳郭魚之百分比相同性最高，遺傳距離最低，在演化樹上另成一支；歐利亞吳郭魚與其它四種吳郭魚之百分比相同性均低於 90，遺傳距離較大，呈現獨立分支。吳 (2006) 的試驗結果同樣顯示莫三比克吳郭魚與賀諾奴吳郭魚之遺傳距離最低，而歐利亞吳郭魚也是因親緣關係較遠，自成一支。

本試驗利用 PCR-RFLP 技術，能在短時間內透過 PCR 及限制酶切割反應，鑑別試驗物種，此方法一經確立後可省去定序的時間與操作，相當簡便。此外，切割片段之判定具有高度的專一性，也是很好的研究粒線體之遺傳工具，未來可輔助於雜交種母系之判定，對種原庫吳郭魚的保種與育種的研究工作助益良多。

參考文獻

- 吳豐 (2006) 我國羅非魚主要引進種的遺傳分析及分子標記研究. 中山大學 (中國) 研究所碩士論文, 30 pp.
- 張湧泉, 簡茂盛, 賴仲義, 劉正義 (1999) 應用隨機增幅多型性去氧核糖核酸(RAPD) 及聚合酶連鎖反應—限制酶切割片段多型性 (PCR-RFLP) 方法, 鑑別日本鰻 *Anguilla japonica*、美洲鰻 *A. rostrata* 與歐洲鰻 *A. anguilla*. 水產研究, 7(1&2): 11-24.
- 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.
- 蔡添財, 陳榮華, 余廷基, 廖一久 (1997) 以粒線體去氧核糖核酸之限制酶切割圖譜鑑別台灣養殖之吳郭魚. 水產研究, 5(1): 1-10.
- Agnèse, J. F., B. Adépo-Gourène, E. K. Abban and Y. Fermon (1997) Genetic differentiation among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). Heredity, 79: 88-96.
- Bardakci, F. and D. O. F. Skibinski (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity, 73: 117-123.
- Bernatchez, L. and R. G. Danzmann (1993) Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). Mol. Biol. Evol., 10: 1002-1014.
- Innes B. H., P. M. Grewe and R. D. Ward (1998) PCR-based genetic identification of marlin and other billfish. Mar. Freshwater Res., 49: 383-388.
- Lehoczky, I., Z. Jeney, I. Magyary, C. Hancz and K. Kohlmann (2005) Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains kept at the live gene bank at Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary. Aquaculture, 247: 45-49.
- Liu, Z. J. and J. F. Cordes (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238: 1-37.
- Macaranas, J. M., L. Q. Agustin, M. C. A. Ablan, M. J. R. Pante, A. A. Eknath and R. S. V. Pullin (1995) Genetic improvement of farmed tilapias: biochemical characterization of strain differences in Nile tilapia. Aquacult. Int., 3: 43-54.
- Menezes, M. R., M. Ikeda and N. Taniguchi (2006) Genetic variation in skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* (L.) using PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. J. Fish. Biol., 68 (supplement A): 156-161.
- Moritz, C., T. E. Dowling and W. M. Brown (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst., 18: 269-292.
- Niwa, K. and Y. Aruga (2006) Identification of currently cultivated *Porphyra* species by PCR-RFLP analysis. Fisheries Sci., 72: 143-148.
- Pouyaud, L. and J. F. Agnèse (1995) Phylogenetic relationships between 21 species of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. J. Fish. Biol., 47: 26-38.
- Romana-Eguia, M. R. R., M. Ikeda, Z. U. Basiao and N. Taniguchi (2004) Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. Aquaculture, 236: 131-150.
- Sajedi, R. H., S. Aminzadeh, H. Naderi-manesh, M. Sadeghizadeh, H. Abdolhay and M. Naderi-manesh (2003) Genetic variation within and among rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, hatchery populations from Iran assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. Food Chem. Toxicol., 68: 870-873.
- Strandberg, A., K. Kristina and L. A. Salter (2004) A comparison of methods for estimating the transition: transversion ratio from DNA sequences. Mol. Phyl. Evol., 32: 495-503.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

- (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.*, 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Trewavas, E. (1983) Tilappine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. *Br. Mus. (Nat. Hist.)*, London.
- Tzeng, C. S., C. F. Hui, S. C. Shen and P. C. Huang (1992) The complete nucleotide sequence of the *Crossostoma lacustre* mitochondrial genome: conservation and variations among vertebrates. *Nucl. Acids Res.*, 20: 4853-4858.
- Wilson A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, U. B. Gyllensten, K. M. H. Bychowski, R. G. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage, and M. Stoneking (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.*, 26: 375-400.
- Wolf, C., B. Martin, H. Philipp and Jürg (2000) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Food Sci. Technol. LWT*, 33: 144-150.
- Wolstenholme, D. R. (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, 141: 173-216.

Application of PCR-RFLP Technique on the Identification of Five Tilapia Species

Ke-Chuan Chang , Yuon-Chuan Chang^{*}, Rong-Hwa Chen, Su-Jung Chang
and Fu-Guang Liu

Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus* Linnaeus, 1758), Mozambique tilapia (*O. mossambicus* Peters, 1852), Blue tilapia (*O. aureus* Steindachner, 1864), Wami tilapia (*O. urolepis hornorum* Trewavas, 1966) and Sabaki tilapia (*O. spilurus spilurus* Günther, 1894), all stocked at Freshwater Aquaculture Research Center, were identified by using of PCR-RFLP technique. For these 5 species of tilapia, D-loop region were at the range of 958 ~ 968 base-pairs (bp) in length, A+T (%) of the base composition were at the range of 64.3 ~ 65.5 ; percent identity were between 88.5 and 96.2 ; and genetic distance were between 0.038 and 0.124 .

Digestion of the D-loop region, by using *AcuI*, *BbsI* or *MspI* restriction enzymes, resulted in several different restriction patterns that could be used to discriminate the five tilapia species. Phylogenetic tree constructed by neighbor-joining (NJ) method showed that Wami tilapia and Mozambique tilapia were in the same clade, Nile tilapia and Sabaki tilapia were in another clade, and Blue tilapia was alone.

The established identification technique is with much help to the conservation and breeding work at the germplasm bank.

Key words: tilapia, mitochondrial DNA D-loop, PCR-RFLP, discrimination of species

*Correspondence: Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute, 106 Hai-Pu, Lukang 50562, Taiwan. TEL: (04) 777-2175; FAX: (04) 777-5424; E-mail: yungchuan@mail.fwlrk.tfrin.gov.tw