

吳郭魚分子標記輔助育種與性別分子標記發展現況

王俐文、陳建彰、張凱傑、陳榮華、楊順德

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

吳郭魚是重要的養殖魚種，2019年產值將近新臺幣29億元（漁業統計年報，2019），主要養殖種類為尼羅吳郭魚（*Oreochromis nilotica*）（圖1）、紅色吳郭魚（圖2）及雜交吳郭魚（*O. nilotica* × *O. aureus*）；其中，尼羅吳郭魚係由本所鄧火土前所長及國立臺灣海洋大學游祥平教授於1966年自日本引進，在臺灣有長期的養殖歷史。

現今的吳郭魚養殖為促使效率與品質的一致，成長、抗逆境、單性養殖等性狀的綜合表現成為育種時須考量的因素。傳統育種方法是依據吳郭魚的外表型（Phenotype, P），最常見的為選拔育種（selective breeding），即挑選成長快的個體進行培育；而雜交育種則是以歐利亞吳郭魚（*O. aurea*）（圖3）及尼羅吳郭魚交配產生單性魚苗，具有較強的抗病力；另有大型跨國育種計畫改良出的吉富吳郭魚（Genetic Improvement of Farmed Tilapia, GIFT），該研究團隊鑑於各地吳郭魚經長期養殖與近親交配後，造成基因窄化，乃積極蒐集各國養殖與野生種原，先建立混和基本族群，經6代的選種後，建立高成長的吉富品系（NAGA Worldfish, 2004）。



圖1 尼羅吳郭魚



圖2 紅色吳郭魚



圖3 歐利亞吳郭魚

除了上述挑選外表型的傳統育種方法，近年來由於定序技術的進步，物種的認識進入基因層次，育種的方向也導向針對基因型 (Genotype, G) 進行操作篩選，如分子標記輔助育種 (marker-assisted selection, MAS) 就是結合基因型與外表型的選育 (P + G) 方式，所利用的分子標記 (molecular marker) 包含蛋白質、DNA 及 RNA 等，可以針對不同研究需求決定使用的類型。DNA 分子標記在生物不同發育時期、任何器官組織皆可檢測，且可遺傳到下一代，因此育種上多使用 DNA 標記為主，其技術是在生物基因體 (genome) 中，以特殊的 DNA 序列作為記號，類似地圖中的地標，讓我們在幾億核苷酸序列中能夠標示位置，藉以定位目標基因。由於多數高經濟物種的基因未全部解碼，當需要篩選某一性狀作為育種目標時，無法直接指出目標基因序列或位置，需藉由統計分析 DNA 標記和目標性狀有高連鎖相關，以 DNA 標記代替基因作為育種工具，當 DNA 標記與目標基因的距離越近，越能精準篩選出目標基因型。當以 DNA 標記選育出目標性狀的親代後，也可利用相同 DNA 標記在子代中提早篩選有遺傳到目標性狀基因型的個體，以利延續種源。

經濟生物的分子輔助育種流程如圖 4，包括：(1)開發大量的分子標記；(2)建構高密度遺傳圖譜 (或稱 linkage map, LG)；(3)應用連鎖分析定位目標性狀 (黃等，2020)。

DNA 分子標記的開發

可以作為標記的 DNA 序列包含粒線體



圖 4 分子輔助育種步驟

DNA (mitochondrial DNA)、限制酶切位 (restriction enzyme recognition sequence)、簡單重複序列 (simple sequences repeats, SSRs)、微衛星序列 (microsatellite sequence, MS) 及單一核苷酸多態性 (simple nucleotide polymorphism, SNP) 等，理想的 DNA 分子標記具有以下條件：(1)數量極多，均勻分布於整體基因組中；(2)在種內及種間具有很高的多型性 (polymorphism)，自然中存在許多對偶變異；(3)親代遺傳至子代具有高保留性；(4)採樣時盡可能避免傷害生物；(5)能夠以簡單且不昂貴的方式檢測 (郭，2006)。以下介紹兩種近年最常被應用的分子標記：

一、微衛星序列 (microsatellite sequence, MS)

真核生物基因體存在大量且連續重複的片段，片段重複次數具有多型性及個體差異，5—100 次以上不等，於真核生物中連續重複的序列被稱為衛星 DNA (satellites DNA)，依照重複序列單位的長短，可將其分為重複序列單位長度大於 100 bp 的衛星 DNA、介於 10—100 bp 之間的迷你微衛星 DNA (minisatellites DNA) 與小於 10 bp 的微衛星 DNA (microsatellites DNA)，或稱簡單重複序列 (SSRs)，約每隔 10—550 Kb 就存在一個微衛星，例如斑馬魚平均 1.25 Kb 就具有一個 (Bin Li et al., 2004)。微衛星分子標記

能夠簡單的被檢測，利用微衛星兩端的保守序列作為 PCR 引子序列，以 PCR 產物的片段大小，就能夠分辨不同的基因型，再者微衛星為共顯性標記 (co-dominant marker)，可區分顯性性狀下，同型合子與異型合子。早期開發微衛星序列的價格昂貴，但在次世代定序 (NGS) 技術的進步下，能夠一次開發大量的微衛星序列，成為分子育種技術的重要工具。

二、單一核苷酸多態性 (simple nucleotide polymorphism, SNP)

SNP 為另一個因次世代定序技術進步而蓬勃發展的 DNA 分子標記，其是指同一個物種下，不同個體，單一核苷酸的置換，且頻率必須超過 1% 才能稱做單一核苷酸多態性，其餘頻率不高的視為單一核苷酸突變。單一核苷酸的置換分為兩種，分別是轉換 (transition) 及倒轉 (transversion)。轉換是一種嘧啶鹼基被另一嘧啶鹼基所取代，或一種嘌呤鹼基被另一嘌呤鹼基取代 (例如 A→T, C→G 的同類置換)。倒轉是不同類鹼基之互換 (例如 A→G, C→T 的異類置換)。SNP 作為分子標記，密度較微衛星高上許多，平均每 1,000 個鹼基就有 4–5 個 SNP，使基因定位更精準、解析度更高。SNP 也是共顯性分子標記，且可以進行大量自動化的基因型鑑定，例如 DNA 微列陣 (microarray) (Yoshida, 2019)。

遺傳圖譜的建構

遺傳圖譜是我們在定位基因時按圖索驥的地圖，所表示的是基因與分子標記的相對

位置，利用孟德爾的遺傳分離率所繪製，當兩個標記獨立、位在不同的染色體上，它們的分離機率是 1/2；若兩個標記是連鎖的，分離率會小於 1/2，可能位在相同的染色體上，視為同一個連鎖群 (linkage group)，分離率越小則兩的標記的相對距離越近。吳郭魚的連鎖圖譜最早由 Kocher 等人在 1998 年所開發，由 62 個微衛星與 112 個 AFLP 所組成，全長共 704 cM，有 30 個連鎖群。第二代吳郭魚雜交連鎖圖譜在 2005 年由 Lee 提出，以歐利亞與尼羅吳郭魚種間雜交之 F2 子代建構，全長 1,311 cM，24 個連鎖群，有 525 個微衛星及 21 基因標記，平均每個標記距離 2.4 cM。

另外在 2013 年，Feng 等人用已知的微衛星序列及表現序列標籤 (expressed sequence tag-derived markers)，建立莫三比克 (圖 5) 與紅色吳郭魚的微衛星連鎖圖譜，而兩種吳郭魚共有的標記跨越 22 個連鎖群，共 1,067.6 cM，其中標記間平均距離 3.3 cM；Feng 也比較了雌雄吳郭魚的連鎖圖譜，發現在部分連鎖群，雌雄之間具有顯著不同的重組率。吳郭魚的 SNP 連鎖圖譜也因應技術進步而被建構，2018 年挪威學者 Rajesh Joshi 等人開發吳郭魚生物晶片並同時提出了高密度的 SNP 圖譜，有 40,186 個 SNP 標記分布在 22 個連鎖群上，雄性與雌性之間有三分之一的連鎖群具有不同的重組率，雌性的連鎖群約為雄性連鎖群長度的 1.2 倍 (雄：1,359.6 cM；雌：1,632.9 cM)，而此作者認為性別決定區域為在 LG23, 40.53 cM 位置處，鄰近抗穆勒氏基因 (*anti-Müllerian hormone, amh*) (Joshi et al., 2018)。



圖 5 莫三比克吳郭魚

分子標記應用於數量性狀

數量性狀 (qualitative trait) 是指一些能夠測量、在一定範圍內變化，具有個體差異的表型。通常是由多基因及環境共同加成作用影響，可以產生連續的表型分布，如身高、體重及抗病力等，數量性狀的多基因中，分有主效基因 (major monogene) 與微效基因，微效基因對於性狀影響較小，而有少數可能具有重要的調控作用的關鍵基因為主效基因；數量性狀基因座 (qualitative trait loci, QTL) 是基因組中的特定區域，影響特定的數量性狀變異，且可被遺傳。分子標記與可測量性狀之間的統計關聯能夠定位數量性狀基因座在基因組的位置 (Nature.com)。QTL 相關技術已有成功商業利用案例，Benchmark 公司宣布發現鏈球菌抗性的 QTL，並以此 QTL 挑選 2020 春季上市吳郭魚苗之親魚，生產有鏈球菌抗性的商業吳郭魚苗，是第一

個成功將吳郭魚 QTL 應用於商業的案例。不論是用分子標記定位整個數量性狀基因座，或是數量性狀的主效基因，都是分子標記能夠協助數量性狀育種的方式，但都需要配合表型的選拔。

吳郭魚的性別及性別分子標記

一般雄魚體型較雌魚大，生長速度約為雌魚的兩倍，但吳郭魚早熟多產的特性，雌雄混養時會產生子代，造成密度過高、生長停滯、魚體大小不一以及飼料浪費等問題，因此單雄性魚苗為養殖業者一直以來追求的目標，故吳郭魚的育種研究集中於提高雄性率及探討性別決定機制。

生物有各式各樣的性別決定方式，遺傳決定、環境影響或者依不同成長階段改變性別等，大自然的性別機制千奇百怪，雖然魚類具有性別遺傳因子，但硬骨魚只有少數具

有核型不同 (karyotypically distinct) 的性染色體 (Andrey, 2006)。吳郭魚沒有核型不同的性染色體，但我們常以性別系統來討論吳郭魚的性別，X、Y 代表是雌、雄性別基因，而非性染色體。性別基因位在體染色體中，可以依照性別基因是「雄性同配型」或「雌性同配型」，簡稱為 ZW 系統或 XY 系統 (雄性同配型：ZZ 為雄、WZ 為雌；雌性同配型：XX 為雌、XY 為雄)，如歐利亞吳郭魚的性別系統為雄性同配型的 ZW 系統，尼羅及莫三比克吳郭魚為雌性同配型的 XY 系統。

再者，性別基因中不同基因型也會影響吳郭魚性別，在現場操作中已經有發現全為 XY 的尼羅吳郭魚，依舊有 10–20% 為雌性。因此究竟哪一個基因的哪一種基因型才是雄性決定的關鍵，是近年吳郭魚性別相關研究主要想釐清的目標。

第一個關於尼羅吳郭魚性別標記研究是 2003 年，Lee 等人將 10 個微衛星標記與吳郭魚表型性別作連鎖分析，找出性別決定區域鄰近的微衛星標記。而後有學者研究出能夠簡單以 PCR 方法分辨尼羅吳郭魚性別決定區域，適用中國沿岸非吉富品系的尼羅吳郭魚品系 (Sun et al., 2014)。2006 年學者將性別相關基因 *sox8*、*cyp19*、*amh*、*wnt4* 等，與尼羅吳郭魚的性別標記位置比較，發現 *amh*

和 *dmrta2* 與性別標記位在相同的連鎖群。而後有更多進一步的研究，認為尼羅吳郭魚的性別決定關鍵就位在抗穆勒氏基因 (Joshi et al., 2018; Li et al., 2015; Minghui et al., 2015)。

尼羅之外，其他吳郭魚種也有性別相關的微衛星 (表 1)。莫三比克的性別決定位置被認為在 LG1，而紅色吳郭魚的則位在 LG22 (Feng et al., 2013)。本所先前針對歐利亞吳郭魚的性別分子標記研究發現，LG3 上的四個微衛星基因座標誌 (GM201、UNH104、GM271、GM354) 應可發展成性別遺傳標誌，或可提早鑑定受精卵或魚苗的性別 (張，2014)。

結語

吳郭魚性別相對複雜且常受環境影響，即使全為 XY 的子代依然有部分比例的雌性出現，早期環境溫度會使部分尼羅吳郭魚發生性別轉換。因此加入分子標記育種輔助選育，期望能找出性別決定基因型。分子標記輔助育種不但結合基因型與外表型的篩選方式，在日後的育種研究，提供數量性狀實際的育種策略，且對捉摸不定的吳郭魚性別決定，提供子代測試外的選育依據，是目前可達到省時省力並且精確等優點的便捷工具。

表 1 四種吳郭魚的性別微衛星分子標記

Linkage group	尼 羅	歐 利 亞	莫三比克	紅 色
	LG23	LG3	LG1	LG22
Marker	UNH898 (Minghui et al., 2015; Li et al., 2015; Joshi et al., 2018)	GM201 UNH104 GM271 GM354 (張, 2014)	OMO086 OMO287 (Feng et al., 2013)	GM047 OMO049 (Feng et al., 2013)