

利用粒線體 DNA D-loop 之 PCR-RFLP 分析鑑別吳郭魚 雜交子代之母系遺傳研究

張格銓* · 張湧泉 · 陳榮華 · 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 PCR-RFLP 技術鑑定水產試驗所淡水中心種原庫保存與坊間養殖的雜交單雄性魚粒線體 DNA D-loop 之差異，旨在瞭解雜交吳郭魚之母系遺傳 (maternal heredity)，與其子代雄性比高低的相關性。

電泳結果顯示，經過不同限制酶之切割反應，可判定淡水中心種原庫保存之雜交魚苗粒線體遺傳皆屬一致性的單一尼羅型 (Nile tilapia type)，而坊間的雜交魚則可分為尼羅型、歐利亞型 (Blue tilapia type) 與莫三比克型 (Mozambique tilapia type) 等三型。由上述結果配合外觀型態來判斷，坊間歐利亞型雜交幼魚，其母本係歐利亞吳郭魚 (*Oreochromis aureus*)，而非尼羅吳郭魚。同樣的，莫三比克型之母本也非尼羅吳郭魚。由此推測，母本混雜非尼羅吳郭魚之結果可能係今日坊間魚苗雄性比例下降的原因。因此，若要得到穩定且高比例雄性之雜交吳郭魚苗，要做好保種管理，以避免使用不純的種魚。

關鍵字：單雄性雜交吳郭魚、粒線體 DNA、母系遺傳

前 言

吳郭魚養殖有早熟及多產二大缺失，大大影響養殖收益，也間接增加養殖成本 (李, 1979; 劉與劉, 1982)。單性養殖為解決該問題的辦法，1975 年成功以雄性歐利亞吳郭魚 (*Oreochromis aureus*) 與雌性尼羅吳郭魚 (*O. niloticus*) 雜交育成高比例單性魚苗，稱為雜交單雄性吳郭魚苗 (余, 1978)，從此單雄性養殖便成為吳郭魚養殖的發展重心。

由於吳郭魚在天然環境下很容易雜交繁殖，雜交子代也能代代相傳，因此純種之取得越來越困難。但產業上，常用雜交方式來取得單雄性種苗，目前坊間業者是以人工方式挑選種魚，此方法僅以外觀與經驗作為判斷依據，如此選出的種魚，其純度不得不讓人產生疑慮。所以，業者乃反應坊間雜交單雄性苗之雄性比率有逐年下降之

趨勢，而無法達到真正單雄性養殖之目的。在淡水中心種原庫之吳郭魚雜交試驗中，發現以 N₁ 品系 (1966 年源自日本) 或 N₂ 品系 (2002 年源自泰國) 之尼羅雌性魚與歐利亞雄性魚雜交，可以得到 100% 雄性子代 (陳等, 2008)。種原庫保存的種魚是經過育種選拔並妥善管理以避免種間相互雜交的可能，因之使得雜交子代雄性比率較高且較穩定。

2009 年台灣發生八八水災，造成坊間養殖的池魚或保有的種苗大量流失。所幸淡水中心多年來對引種、保種及育種的努力，加上種原庫吳郭魚對種原之嚴密保存，並依管理規範詳實紀錄追蹤吳郭魚種系，才能確保台灣吳郭魚種原。近年來，開發了 PCR-RFLP 鑑別五個純種吳郭魚，此方法除可鑑別種原庫純種吳郭魚外，並進一步嘗試應用於追蹤雜交品系之母系遺傳 (maternal heredity)。本試驗蒐集坊間雜交單雄性幼魚，利用 PCR-RFLP 技術 (張等, 2009) 判斷其母系遺傳之型式，未來可進一步探討雌性種魚非尼羅吳郭魚比例與雜交子代雄性比之關係。

*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: glenn@mail.fwtk.tfrin.gov.tw

材料與方法

一、試驗魚種

在 98 年間採集嘉義地區業者放養之雜交單雄性幼魚 25 尾 (魚苗為同一池同一時間放養)，對照組為 97 年淡水中心種原庫繁殖之雜交單雄性幼魚 32 尾。採樣時分別剪取各組單雄性雜交幼魚之少許尾鰭組織，並逐一拍照存檔。

二、試驗方法

(一) 基因組 DNA 萃取

將樣本組織分別使用 MasterPure DNA Purification Kit (EPICENTRE) 萃取細胞全 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) 粒線體 D-loop PCR 擴增

選定一對引子 LN20: 5'-ACCACTAGCACCCAAAGCTA-3' (Forward) 及 HN20: 5'-GTGTTATGCTTTAGTTAAGC-3' (Reverse) 進行 PCR 擴增 (張等, 2009)。反應試液包括: 1 μl 基因組 DNA (25 ng/ μl)，1 μl 10 mM dNTP，1 μl LN20 (10 μM)，1 μl HN20 (10 μM)，5 μl Reaction Buffer (10X)，0.2 μl SuperTaq (5U/ μl) 及 40.8 μl 無菌水，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。

(三) 限制酶切割反應:

將 PCR 產物分別優先以限制酶 *Bbs*I 進行 37°C 切割 1 小時後，進行約 30 分鐘的水平電泳，若有發生切割反應則可判別母系為尼羅型之遺傳型式 (張等, 2009)。若限制酶 *Bbs*I 無法切割樣本 PCR 產物，更進一步的以相同條件進行限制酶 *Acl*I 及 *Msp*I 切割，以片段數量之不同來判斷粒線體遺傳 (張等, 2009)。

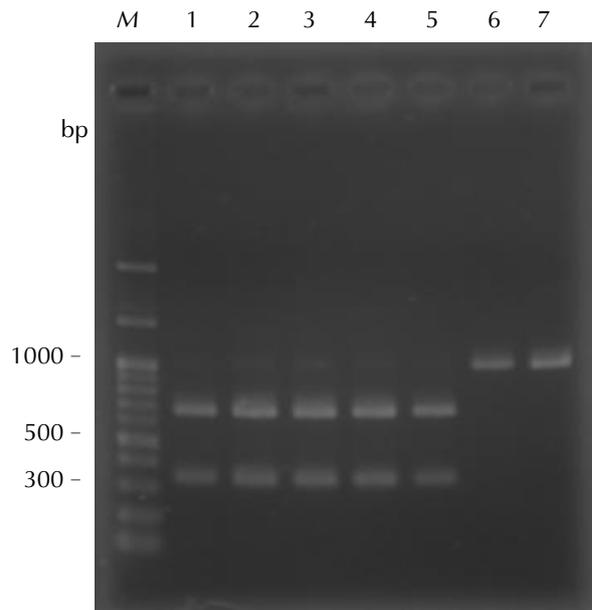


Fig. 1 PCR-RFLP analysis with *Bbs*I for mtDNA D-loop polymorphism. 1: *O. niloticus*; 2~4: all-male hybrid tilapia from FARC; 5: all-male hybrid tilapia (Nile tilapia type) from the private fish farm; 6, 7: all-male hybrid tilapia (Not Nile tilapia type) from a private fish farm; M: 100bp DNA ladder.

結果與討論

坊間雜交單雄性幼魚樣本平均全長 12.53 ± 1.03 cm，淡水中心種原庫雜交單雄性幼魚樣本平均全長 5.83 ± 0.61 cm。因為試樣魚體型小，不易由外觀判斷其親代種原，但可從尾鰭線條層次約略判別坊間單雄性雜交魚大多遺傳自尼羅吳郭魚。考量兩組試驗魚採樣之時間與體型大小不同，所以本試驗並未進行細部之型質測量比較，僅進行遺傳訊息之研究。

利用粒線體 D-loop 序列，並參考張等 (2009) 之遺傳判定方式，可提供判斷母系遺傳的方法。在本試驗所使用的限制酶中，若限制酶 *Bbs*I 可成功的對吳郭魚 D-loop 區切割為 2 個片段，由電泳圖片可判定該魚的母系遺傳為尼羅吳郭魚，當 *Bbs*I 無法對樣本 PCR 產物進行切割時，就表示有可能帶有其他種類吳郭魚之母系遺傳，需要進一步用其他的限制酶來切割，以確定其母系遺傳之品種。因此，母體遺傳為尼羅吳郭魚以外的品種，其樣本之 PCR 產物另外以 *Acl*I 及 *Msp*I 限制酶做切割實驗。

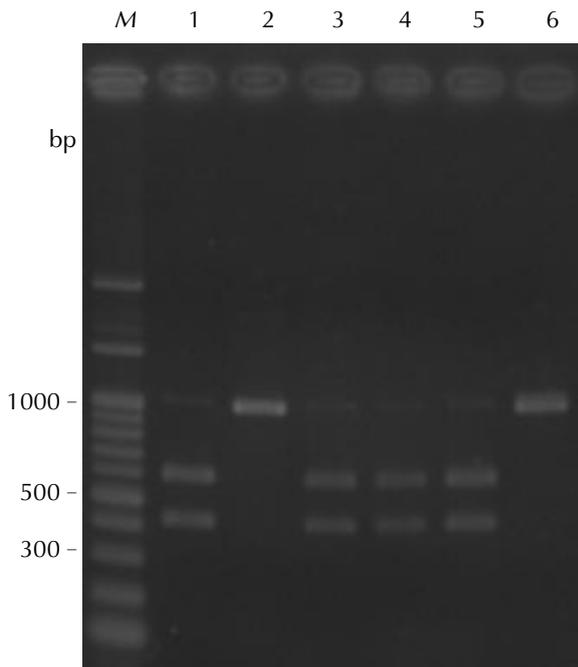


Fig. 2 PCR-RFLP analysis with *AcuI* for mtDNA D-loop polymorphism. 1: *O. aureus*; 2: *O. mossambicus*; 3-6: all-male hybrid tilapia (Not Nile tilapia type) from a private fish farm; M: 100bp DNA ladder.

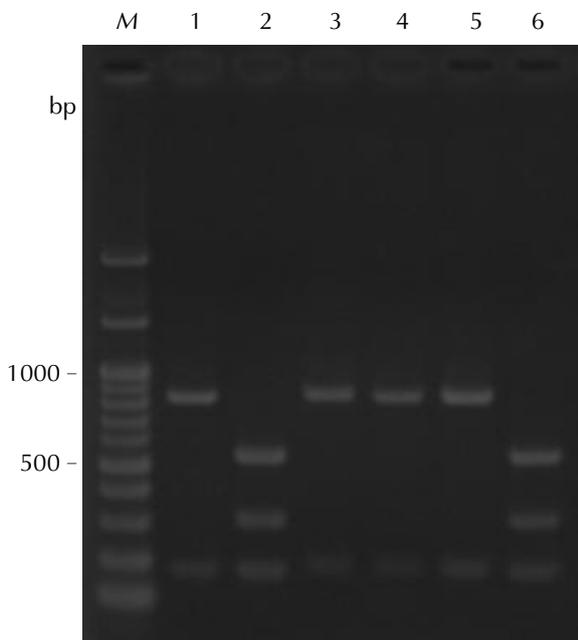


Fig. 3 PCR-RFLP analysis with *MspI* for mtDNA D-loop polymorphism. 1: *O. aureus*; 2: *O. mossambicus*; 3-6: all-male hybrid tilapia (Not Nile tilapia type) from a private fish farm; M: 100bp DNA ladder.

由 Fig. 1 可看出，以 *BbsI* 限制酶切割時，樣本 1 是純尼羅吳郭魚與樣本 2~4 淡水中心種原庫的雜交全雄性子代，都能成功的被切割為 2 個片段，而樣本 5~7 都來自於坊間的雜交全雄性子代，其中樣品 5，可切割成 2 段，而樣本 6、7 則無法被切割。在 *AcuI* 切割試驗的結果顯示，樣品 1 歐利亞吳郭魚，可被切割為 2 片段，樣品 2，莫三比克吳郭魚無法被切割，而樣本 3~6 均來自坊間的全雄性雜交子代，其中樣本 3~5，均被切割為 2 片段，而樣品 6 則無法切割 (Fig. 2)。

另外，在 *MspI* 的切割試驗結果則為，樣品 1 為歐利亞吳郭魚可被切割成 2 片段，樣品 2 為莫三比克吳郭魚可被切割為 3 片段，樣本 3~6 均來自坊間全雄性雜交子代，其中樣品 3~5，可被切割成 2 片段，樣本 6，則被切割為 3 段 (Fig. 3)。由 Table 1 可知，種原庫雜交單雄性幼魚 32 尾樣品皆為尼羅魚 (Nile tilapia type) 之粒線體型式。坊間雜交單雄性幼魚 25 尾樣品中可分成三種型式，除了 21 尾尼羅型以外，有 3 尾為歐利亞型 (Blue tilapia type) 及 1 尾莫三比克型 (Mozambique tilapia type)。

以粒線體遺傳型之出現比例，估算坊間雜交單雄性魚 25 尾中混雜了 4 尾 (約 16%) 非尼羅吳郭魚的遺傳。坊間試樣魚平均體重為 35.53 ± 9.87 g，而其中 3 尾為歐利亞型幼魚之平均體重為 27.4 g，顯然成長較差。在正常情況下，按理不會出現此型，我們懷疑這些歐利亞型幼魚是繁殖時誤選雌性歐利亞種魚所致。經過更進一步與尼羅型比較外觀型態，發現歐利亞型幼魚之尾鰭 (Fig. 4b) 均無明顯尼羅吳郭魚特徵的線條層次 (Fig. 4a)。根據上述資料，可推測歐利亞型幼魚之母本可能是歐利亞吳郭魚。

理論上這些雜交單雄性魚苗之粒線體遺傳應來自成長較快的尼羅吳郭魚，若來自莫三比克種或其他小型種，可能會影響魚的成長。在坊間養殖的雜交單雄性幼魚中，發現一尾為莫三比克型，且其尾鰭線條似有尼羅吳郭魚之特徵 (Fig. 4c)，我們認為其母本可能曾與莫三比克吳郭魚 (*O. mossambicus*) 雜交。綜合以上結果，坊間的雜交單雄性幼魚除了尼羅型之母系遺傳外，另混雜有歐利亞型與莫三比克型。理想的雜交單雄性魚苗，其粒線體應僅具有單一的尼羅型母系遺傳。

Table 1 Identification of the mtDNA D-loop type by cleavage with restriction enzymes

Group	No. of segment			mtDNA D-loop type	No. of fish
	<i>Bbsl</i>	<i>Acul</i>	<i>Mspl</i>		
All-male hybrid tilapia from FARC, FRI	2	-	-	Nile tilapia	32
	1	2	2	Blue tilapia	3
All-male hybrid tilapia from a private fish farm	1	1	3	Mozambique tilapia	1
	2	-	-	Nile tilapia	21

* - : No test

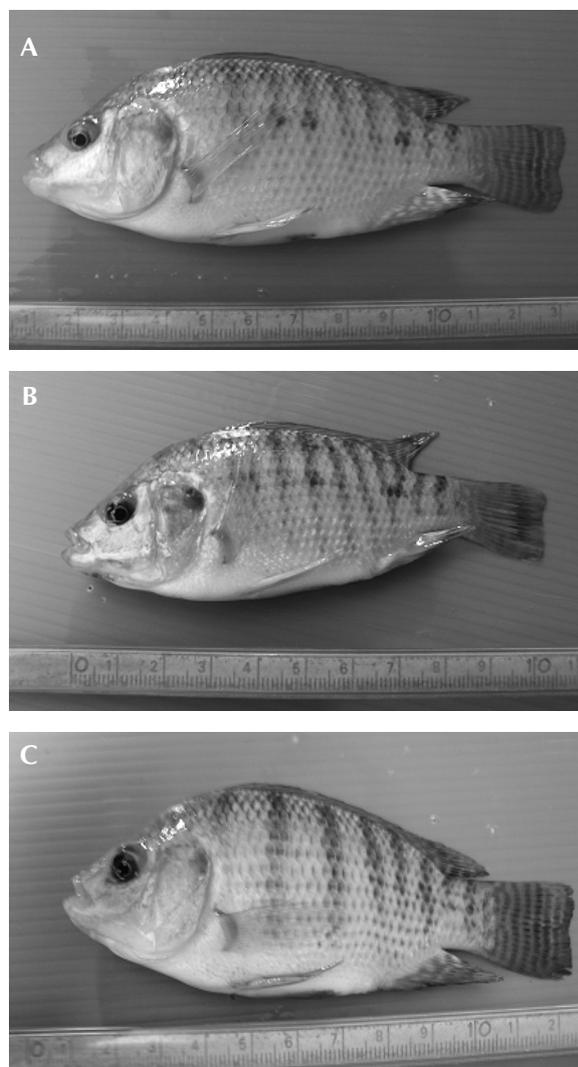


Fig. 4 The appearance of all-male hybrid tilapia with different mtDNA D-loop segment. A: Nile tilapia type; B: Blue tilapia type; C: Mozambique tilapia type

本試驗應用鑑別台灣種原庫吳郭魚之 PCR-RFLP 技術 (張等, 2009), D-loop 序列長度約 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)。我們應用該片段進行單性雜交吳郭魚之研究, 比較且區隔不同型之 D-loop, 結果可有效的判定單雄性雜交吳郭魚的母本來源。

對本試驗來說, 研究單雄性雜交吳郭魚粒線體型式僅能找到部分的母本來源, 仍然缺少父系遺傳資料。就嚴格的角度來判別父系或母系的種魚純度, 不僅需經過多次個別的雜交試驗, 還得配合良好的育種管理才能客觀的判斷。然而, 要穩定雜交單雄性吳郭魚之生產力, 現階段最好的辦法就是避免使用不純的種魚進行繁殖。淡水中心種原庫已將重要的吳郭魚魚種分別保存, 更以科學的方法進行鑑種與管理, 由此次試驗淡水中心種原庫雜交單雄性幼魚 32 尾, 粒線體 D-loop 遺傳全部係單一尼羅型, 而坊間的 25 尾同樣的供試魚中則有 16% (4 尾) 混雜了歐利亞及莫三比克型, 便可證明保種與選種的重要性。未來的趨勢將會應用分子標記等生物技術來輔佐種魚品系之建立, 發展可追蹤種原來源與純度的技術, 如此才是解決種魚純度問題之捷徑以及奠定選育種技術的基礎。

謝 辭

本試驗得以順利完成，承本中心同仁丁惠茹女士在生物技術操作上之鼎力協助，特此表示謝意。

參考文獻

- 李健全 (1979) 吳郭魚單性養殖之理論與實際. 中國水產, 322: 11-13.
- 余廷基 (1978) 吳郭魚單性養殖. 農牧旬刊, 41(9): 95-97.
- 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.
- 陳榮華, 張湧泉, 張格銓, 劉富光 (2008) 吳郭魚雜交與自交系的成長比較 - 快速成長品系之研發. 水產研究, 16(2): 41-47.
- 張格銓, 張湧泉, 陳榮華, 張素容, 劉富光 (2009) 利用 PCR-RFLP 技術鑑別五種吳郭魚. 水產研究, 17(2): 77-85.
- 劉富光, 劉嘉剛 (1982) 不同孵育方式對吳郭魚繁殖潛力的影響. 臺灣省水產試驗所試驗報告, 34: 187-195.
- 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.
- Bardacki F. and D. O. F. Skibinski (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73: 117-123.
- 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 Brown, W. M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269-292.
- 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.

Maternal Inheritance Identification of Hybrid Tilapia Progeny by PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA D-loop

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

Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to check the differences of D-loop segment of mitochondrial DNA in the all-male hybrid tilapia progeny, sampled from the aquatic genetic resource bank at the Freshwater Aquaculture Research Center (FARC) and a private fish farm, respectively, in order to elucidate the relationship between the mitochondrial DNA's maternal heredity and the male ratio of hybrid tilapia progeny.

After the digestion of mitochondrial D-loop PCR fragment by different restriction enzymes, the electrophoretic analysis showed that the maternal inheritance of D-loop in the hybrid progeny, sampled from the aquatic genetic resource bank at the FARC, were all identified as 'Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) type', while those sampled from the private fish farm were identified as three categories of 'Nile tilapia type', 'Blue tilapia (*O. aureus*) type' and 'Mozambique tilapia (*O. mossambicus*) type'.

From the above mentioned results and appearance of the hybrid offspring, it was concluded that mother of 'Blue tilapia type' hybrid progeny was Blue tilapia, not Nile tilapia. Similarly, mother of 'Mozambique tilapia type' was not Nile tilapia. The impurity of maternal broodstock might be the possible reason of the decreasing male ratio of hybrid tilapia progeny in the private fish farm in recent years. In this aspect, it's important for tilapia aquaculture to increase stable and high ratio of all male hybrid tilapia progeny by management and maintenance of the purity of broodstock.

Key words: all-male hybrid tilapia, mitochondrial DNA, maternal heredity

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