



日本鮑魚類的分子遺傳育種技術

徐崇仁

水產試驗所水產養殖組

分子遺傳育種技術係利用分子標識協助傳統育種技術，以防止近親交配導致品種劣化，並追蹤重要形質如成長、抗病等的遺傳特性，以引導不同族群間雜交的進行。由於所育成的品種並非基因改造種，故在國際間日益受到重視。本所目前在進行國家水產生物種原庫的籌建工作，有關分子遺傳育種的技術發展應是未來營運成敗的關鍵之一。另一方面，台灣九孔養殖面臨困境，種苗生產的失敗疑與近親交配有關。為此，本所在「九十二年度國際農業科技合作計畫-8.技術指導」計畫項下，特別邀請日本國立養殖研究所分子遺傳育種專家原素之博士 (Dr. Motoyuki Hara) 訪台介紹日本分子遺傳育種的技術發展。本文特摘述其重點，相信 Dr. Hara 的演講及與國內相關研究人員的技術交流，必然有助於國內分子遺傳育種的技術發展及九孔養殖面臨困境的解決。

日本鮑魚的遺傳類緣關係研究

日本鮑魚類 (*Haliotis* spp.) 作為漁業對象種類有六種：*H. discus hannai* (蜆

夷鮑)、*H. discus discus* (黑鮑)、*H. madaca* (マダカ)、*H. gigantea* (メガイ)、*H. diversicolor aquatilis* (トコブシ)、*H. diversicolor diversicolor* (フクトコブシ、九孔)。其中前 4 種為殼長 10 cm 以上的大型種。棲息海域方面蜆夷鮑分布於寒流域，而其他 5 種分布於暖流域。以往這些鮑魚類以貝殼型態為分類的依據，與其他貝類一樣不易找出明確的分類形質。特別是大型的 4 種有各種不同的分類結果。1970 年代後半，日本導入 allozyme 分析方法，先用於魚類，1985 年用於鮑魚類研究。1992 年 Hara 等以 12 種酵素之 15 個 allozyme 基因座為標識分析日本鮑魚類的遺傳關係，求得 5 種鮑魚類顯著不同基因頻度數及遺傳距離。*H. discus hannai* 個體間，有 0—3 基因座其基因頻度有顯著差異。*H. discus hannai* 與 *H. discus discus* 間有 4 座、*H. discus hannai* 與 *H. madaca* 間也有 4 座，而以上 3 種與 *H. gigantea* 間則有 5—7 座。以上 4 種與 *H. diversicolor aquatilis* 在 15 座中有 14 座有顯著差異。而未顯示共通帶 (共通的等位基因) 的分歧基因座有 7 座。



為比較各種鮑魚的遺傳類緣關係，以顯示遺傳分化程度的遺傳距離 (Nei) 作成分支圖如圖 1。一般動物分類群之遺傳距離，經廣泛調查結果，將種間之 Nei 定為 1.0 階層，亞種間為 0.1 階層，地方種間為 0.01 階層。Oniwa 等總結海產貝類的報告，種間為 0.792 ± 0.089 ，屬間為 1.731 ± 0.117 。Hara 等的報告如圖 1，トコブシ與其他 4 種差異大，為別屬階層（註：故 *H. diversicolor aquatilis* 改為 *Sulculus aquatilis*），*H. gigantea* 與其他 3 種為亞種，而 *H. discus hannai*、*H. madaca* 及 *H. discus discus* 為地方品種。

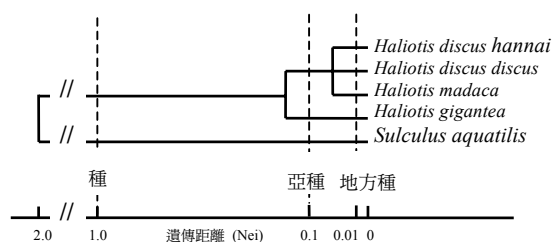


圖 1 由遺傳距離求得 5 種鮑魚的遺傳類緣關係

如以 Microsatellite DNA (MS) 分析法調查鮑魚的遺傳類緣關係，因為 MS 屬非蛋白質編碼領域，故不使用「基因座」、「等位基因」的名詞，而分別以「MS marker 座」、「allele」取代。表 1 顯示 5 種鮑魚各族群中 11 個 MS marker 座之 PCR 增幅結果，*H. discus discus*、*H. madaca* 及 *H. discus hannai* 三種在所有 MS marker 座均可見多數 allele 之增幅，但 *Sulculus aquatilis* 完全不見增幅。*H. gigantea* 則有三個 MS marker 座不見增幅。可能原因為各種類 MS 領域之 primer 序列具明顯的種特異性，異種間無法通用。

除 *Sulculus aquatilis* 以外，其他 4 種鮑魚以 11 個 MS marker 座之 allele 頻度為基，求其遺傳距離 D_{sw} ，再以 NJ 法調查其類緣關係。結果如圖 2 所示，*H. discus discus*、*H. discus hannai* 及 *H. madaca* 間有非常近的遺傳關係，與上述 allozyme 分析結果頗為一致。

表 1 5 種鮑魚各族群中 11 個 MS marker 座之 PCR 增幅結果

MS marker 座	重複序列	allele 數	<i>H. d. h.</i>	<i>H. d. d.</i>	<i>H. m.</i>	<i>H. g.</i>	<i>S. a.</i>
<i>Hdd 13</i>	(CA) ₁₂	19	○	○	○	○	×
<i>Hdd 63</i>	(CA) ₁₆	10	○	○	○	○	×
<i>Hdd 137</i>	(CA) ₇	3	○	○	○	○	×
<i>Hdd 201</i>	(CA) ₂₁	15	○	○	○	×	×
<i>Hdd 397</i>	(CA) ₆	3	○	○	○	○	×
<i>Hdd 413</i>	(CT) ₉	2	○	○	○	○	×
<i>Hdd 527</i>	(CTCA) ₉	3	○	○	○	×	×
<i>Hdd 535</i>	(CT) ₁₃	12	○	○	○	×	×
<i>Hdd 553</i>	(CTCA) ₆	7	○	○	○	○	×
<i>Hdd 562</i>	(TTG) ₃	15	○	○	○	○	×
<i>Hdd 584</i>	(ACTC) ₁₇	10	○	○	○	○	×

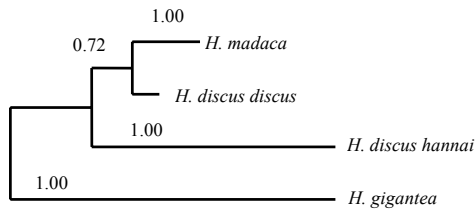


圖 2 4 種鮑魚以 11 個 MS marker 座之 allele 頻度為基，求其遺傳距離 D_{sw} ，再以 NJ 法求得之類緣關係分支圖

蝦夷鮑與黑鮑的關係

H. discus hannai (蝦夷鮑) 與 *H. discus discus* (黑鮑) 為日本主要栽培漁業對象種，故不僅在分類學上，產業上亦受重視。Fusio 等在日本海側三處、太平洋側五處；Hara 等在日本海側二處、太平洋側五處；Kishima 等在日本海側六處採集樣本，以 allozyme 分析，再進行採集海域間遺傳組成之基因頻度差檢定結果，採集海域間均至少有一基因座其 allele 頻度有顯著差，亦即兩種在各海域均形成某種程度的獨立繁殖族群。

調查採集海域間遺傳組成與地理距離的關係結果，基因頻度有連續性。由基因頻度求得其關係可見顯著正相關，意味著地理距離越近，遺傳交流的機率越高。然而，調查各採集海域 *H. discus hannai* 與 *H. discus discus* 各 MS marker 座 allele 出現頻度，繪製遺傳類緣關係樹枝圖 (圖 3) 後，可見此兩種鮑魚可以地理遠近明顯區分。亦即由 MS marker 座之 allele 出現頻度分析，可大幅提高兩近似種鮑魚的識別率，這對水產種苗放流影響的評估有相當大的應用價值。

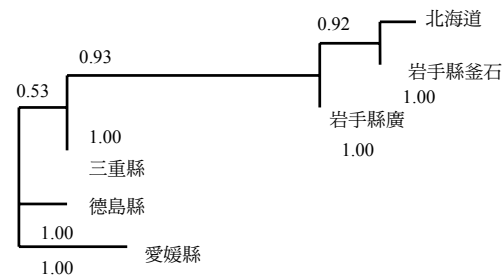


圖 3 *H. discus hannai* 與 *H. discus discus* 遺傳類緣關係樹枝圖

人工種苗的遺傳特徵

人工種苗於繁殖及初期成長過程之環境條件與天然環境相當不同，故可想見與天然族群具有不同的遺傳特徵。表 2 顯示變異性高的 5 個 MS marker 座的比較結果。從主要 allele 出現頻度範圍，可見人工種苗的 allele 頻度有較大的變異幅度，與天然族群具有的 allele 出現頻度不同，且人工種苗的 allele 出現頻度其變異係數亦較大。如果以 allele 數較多的 Hd 13 marker 座比較天然族群及同海域產種貝所繁殖的人工種苗各 allele 之出現頻度 (圖 4)，顯見人工種苗喪失了許多出現頻度較低的 allele。

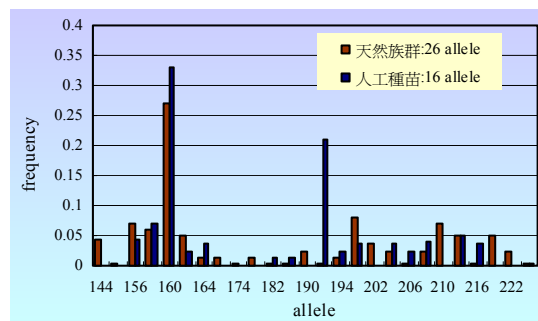


圖 4 天然族群及同海域產種貝所繁殖的人工種苗 Hd 13 marker 座各 allele 出現頻度之比較



表 2 變異性高的 5 個 MS marker 座 allele 出現頻度範圍及變異係數的比較

MS marker 座	天然族群 (5)*	人工種苗 (5)*
Hd 13-158	0.059-0.175 (49.9%)**	0.067-0.542 (109.0%)
160	0.203-0.325 (20.4%)	0.108-0.417 (39.1%)
Hd 457-181	0.500-0.672 (12.7%)	0.155-0.409 (42.1%)
185	0.026-0.171 (55.0%)	0.144-0.448 (50.4%)
Hd 535-176	0.067-0.200 (37.6%)	0.107-0.339 (48.5%)
192	0.049-0.117 (34.7%)	0.005-0.242 (71.7%)
Hd 562-169	0.368-0.483 (10.4%)	0.349-0.496 (12.4%)
173	0.142-0.207 (14.5%)	0.058-0.377 (67.3%)
Hd 584-119	0.150-0.256 (25.0%)	0.021-0.271 (76.6%)
127	0.092-0.167 (20.9%)	0-0.158 (87.0%)

*：族群數，每一族群分析 60 個體

**：變異係數

親子判別

Hara 等以 *H. discus hannai* 五個雌貝及八個雄貝交配作出的種苗飼養 8 個月，所得 20 萬個種苗隨機取出 228 個，進行對照種貝與種苗 MS allele 型之親子判別。親子判別係由種貝之 MS allele 型中找出種苗之 MS allele 型 (圖 5)。例

如種貝之 Hd 13 座中只有♀ 1 有一個 MS allele 為 184 bp allele，如果種苗中亦具有這一獨特 allele 時，可知其為♀ 1 之子。獨特 allele 越多，親子判別越容易而且確實。MS 分析法因變異性高，多型座多，容易找到獨特 allele。如 allele 有複數的種貝擁有時，則以組合方式判別。

基因型比對

Hd 13 基因座

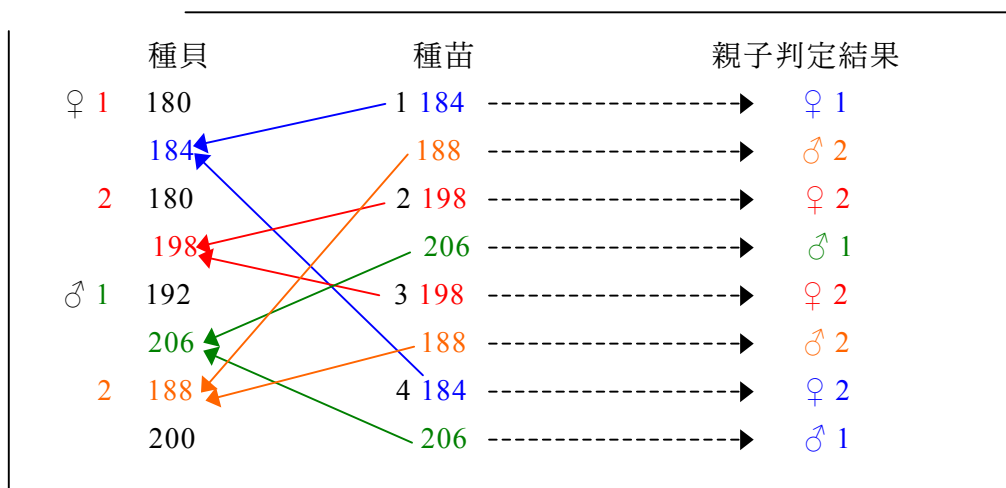


圖 5 對照蝦夷鮑種貝與種苗 MS allele 型之親子判別



本例中以 5 個 MS 座、13 個種貝找得 7 個獨特 allele，結果在 228 個種苗中可判別 96% 的親子關係。同時，雌種貝 5 個中有 3 個，雄種貝 8 個中有 6 個的種苗可以檢測到與種苗間的親子關係，雌雄各有 2 個其種苗佔 90% 以上（圖 6）。原因可能為成熟度良好的種貝，其產卵誘發後不一定 100% 放精、放卵，或由於產卵量及反應時間的差異。

結論

日本鮑魚類遺傳育種學的研究是以天然族群之遺傳構造解析及人工種苗遺傳特性之監控為主。微衛星 DNA 分析

法因遺傳變異性及分析再現性佳，可應用於許多方面，包括親子判別、類緣關係及 QTL 解析。雖然，微衛星 DNA 領域具有種特異性，分析領域之微衛星 DNA PRIMER 尚未開發之種類其開發過程須煩瑣的操作及相當的經費，但因應用性高，吾人應全力開發各種微衛星 DNA 標識。尤其九孔較鮑魚成熟期短，如果再佐以親子判別、類緣關係及 QTL 解析等分子遺傳育種技術，對其品種改良的研究應大有助益。同時，分子遺傳育種技術對人工種苗繁殖場的種貝養成管理、栽培漁業方面則對人工種苗放流與再生產關係及遺傳多樣性影響的評估也應有顯著的助益。

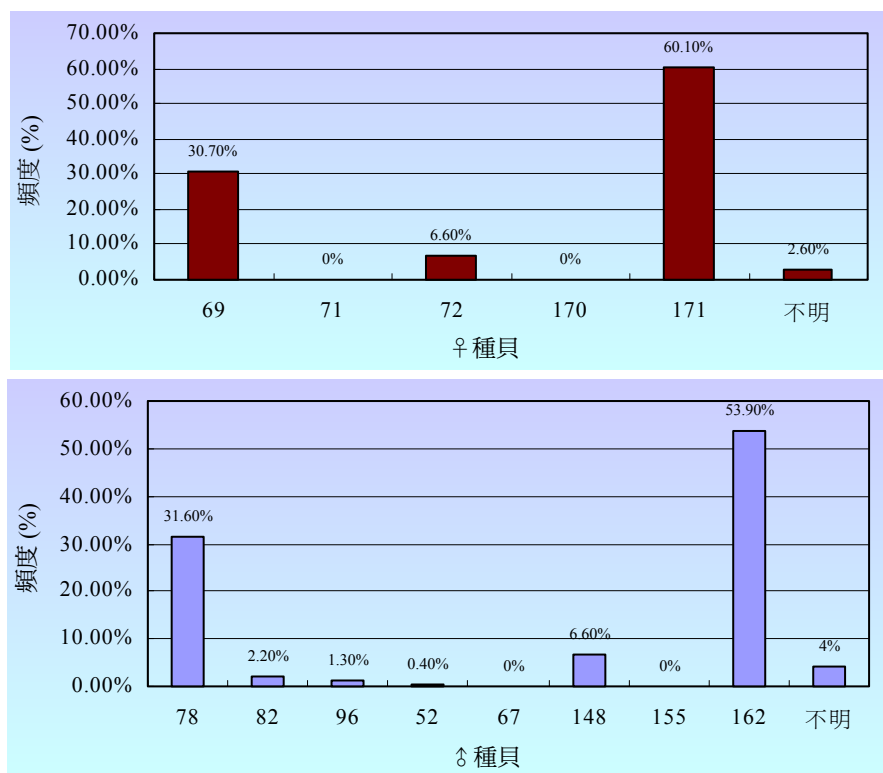


圖 6 以獨特 allele 判別不同雌雄種貝別之種苗比率