

應用生物技術判別原種及雜交種魚類

張湧泉、劉富光

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

魚類在天然或人為的棲息環境中，偶爾會產生雜交現象，有些是自行雜交，有些則是人為配種雜交。就魚類養殖而言，通常是為了提高飼育魚的成長率、體型或活存率等因素而嘗試生產雜交魚。為了維護養殖魚類的遺傳資源及保持種魚純度，原種及雜交種必須分開飼養與管理，以避免因基因滲入而產生混淆。

傳統上，判別原種及雜交種的基本方法為從魚體外觀做形態形質 (morphometrics) (如體長、體高、眼徑等) 及計數形質 (meristics) (如鰭條數及鱗片數等) 的測量、分析與比較。不過用這些方法得到的形質資料難免會有模糊地帶而產生爭議。近年來，隨著 PCR (polymerase chain reaction; 聚合酶連鎖反應) 原理及操作儀器的發明，衍生出幾項生物技術，可以將特定的 DNA 片段大量的增幅，並利用其作為遺傳標記 (genetic marker)，進而使原種及雜交種的鑑別更為精確及客觀。以下，簡單敘述其中幾種方法。

隨機增幅多型性去氧核糖核酸 (RAPD, random amplified polymorphic DNA)

PCR 增幅反應的條件只需要一個隨機引

子 (random primer)，也不必先將欲增幅的目標 DNA 定序以設計一對引子，相當簡便。不過，正因為所使用的是隨機性的引子，可能有時候用了幾個引子就可以顯示出 1 個或數個足以辨別原種及雜交種的特異性電泳帶，有時候則用了上百個仍無法成功。例如 Elo 等人 (1997) 應用 RAPD 技術判別褐鱒 (*Salmo trutta*)、大西洋鮭 (*S. salar*) 及其雜交種；Yamazaki 等人 (2005) 亦應用此技術分辨櫻花鉤吻鮭 (*Oncorhynchus masou masou*)、五月櫻花鉤吻鮭 (*O. m. ishikawae*) 及其雜交種。

聚合酶連鎖反應—限制酶切割片段多型性 (PCR-RFLP, polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism)

先對欲增幅的核 DNA (nuclear DNA) 片段設計出操作 PCR 反應所需要的一對引子，接著將所得到的反應產物定序後，選定限制酶 (restriction enzyme) 嘗試切割。對同一種限制酶而言，不同序列的 DNA 片段可能無法切割或者有不同的切割位或切割片段，電泳片上呈現出來的多型性即可以用來辨別原種或雜交種。另外，由於粒線體 DNA 是母系遺傳，如果已知道是那兩種魚的雜交種但不知其親代之性別，可以對雜交種及親

代之粒線體 DNA 特定片段實施 PCR-RFLP，其中，與雜交種所呈現的多型性相同者即為母系。例如 Rubidge 等人 (2001) 應用 PCR-RFLP 技術判別西坡割喉鱒 (*Oncorhynchus clarki lewisi*)、虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*)、第一代雜交種及其與西坡割喉鱒或虹鱒回交之子代等，另外，分析出雜交種的母系為西坡割喉鱒，父系為虹鱒；Bostrom 等人 (2002) 也應用此技術判別金黃九棘鱸 (*Cephalopholis fulva*)、斑副花鮨 (*Paranthias furcifer*) 及其雜交種，並分析出雜交種的母系為金黃九棘鱸，父系為斑副花鮨。

增幅切割片段多型性 (AFLP, amplified fragment length polymorphism)

本技術是 RAPD 及 RFLP 的綜合體，欲增幅的目標 DNA 不需要定序。先用兩種限制酶 (一般是用 *EcoRI* 及 *MseI*) 一起將基因體 (genomic) DNA 切割為成千上萬個片段後，加入轉接子 (adaptor) 與切割的片段結合，接著先後經過前增幅 (preamplification) 及選擇性增幅 (selective amplification) 反應，使片段數降低到約 100 個左右，電泳分析在原種及雜交種之間會顯示出多型性的差異，可藉以區分之。例如 Congiu 等人 (2001) 應用 AFLP 技術判別納氏鱒 (*Acipenser naccarii*)、美國白鱒 (*A. transmontanus*) 及其雜交種；Young (2001) 等人應用此技術判別虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss irideus*)、沿岸割喉鱒 (*O. clarki clarki*)、第一代雜交種及其與虹鱒或沿岸割喉鱒回交之子代等；Liu 等人

(1998) 應用此技術判別河魴 (*Ictalurus punctatus*)、藍魴 (*I. furcatus*)、第一代雜交種、第二代雜交種及第一代雜交種與河魴或藍魴回交之子代等；Albert 等人 (2006) 應用此技術判別美洲鰻 (*Anguilla rostrata*)、歐洲鰻 (*A. anguilla*)、第一代雜交種、第二代雜交種及第一代雜交種與美洲鰻或歐洲鰻回交之子代等。

微衛星 DNA (Microsatellite DNA)

微衛星 DNA 是具有核苷酸重複排列現象的 DNA 片段，重複序列通常包含 2-4 個核苷酸，例如 ACTACTACTACTACTACT 其重複次數在族群或個體間時或有所差異，造成所增幅 DNA 片段的長度有所不同，可藉各長度的分布情形分辨原種及雜交種。原則上需先將欲增幅的目標 DNA 定序以設計一對引子。例如 Mia 等人 (2005) 應用微衛星 DNA 技術判別白鱧 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、黑鱧 (*Aristichthys nobilis*) 及其雜交種。

事實上，針對某魚種操作 PCR-RFLP 或微衛星 DNA 時，所需要的一對引子往往在文獻上已經有發表，甚至有可用於一般魚種的通用引子 (universal primer) 供選用，不需要自己設計，節省了費用與時間。另外，操作 PCR-RFLP 時，對已經定序的各個 PCR 產物，可以應用生物技術套裝軟體進行分析，了解到各種限制酶對該 DNA 片段的切割情形，進而比較出可以使用何種限制酶判別原種及雜交種，不需要將限制酶逐一與 PCR 產物直接反應，節省了大量時間。