

單性吳郭魚苗品質之鑑別



前言

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。產業上，常用雜交方式（♀尼羅吳郭魚 × ♂歐利亞吳郭魚）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，然而依此選出的種魚純度，不得不讓人產生疑慮。所以，屢屢接獲養殖業者反應坊間雜交單雄性苗之雄性比率有逐年下降之趨勢，無法達到真正單雄性養殖之目的，影響產量與收益。

本中心多年來致力於吳郭魚引種、保種及育種的努力，並於前幾年興建完成種原庫，對水產種原予以嚴密保存。近年來，研發了 PCR-RFLP 生物技術以鑑別各種吳郭魚。此技術除用來鑑別種原庫之純種吳郭魚外，並可進一步嘗試應用於追蹤雜交品系之母系遺傳 (maternal heredity)。有鑑於此，本試驗蒐集坊間雜交單雄性魚苗，利用 PCR-RFLP 技術 (張等, 2009) 判斷其母系遺傳之型式，且利用微衛星 DNA 等輔助方法，來探討雌性種魚為非尼羅吳郭魚之比例與雜交子代混雜的程度，以供繁養殖業者參考。

張格銓、劉富光

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

材料與方法

一、試驗魚種

採集 2009 年間嘉義地區業者養殖之雜交單雄性魚苗 25 尾 (坊間-1 組)、2010 年間台南地區業者養殖的雜交單雄性魚苗 50 尾 (坊間-2 組)。各剪取二組魚苗之少許尾鰭或肌肉組織。

二、試驗方法

(一) 基因組 DNA 萃取

將樣本組織萃取細胞基因組 DNA 後，以核酸分析儀測定濃度後保存於-20°C 冰箱備用。

(二) 粒線體 DNA D-loop 片段之 PCR

以 PCR 方法擴增粒線體 D-loop 序列，將 PCR 產物進行定序。將核酸序列對照已發表之 PCR-RFLP 生物技術應用之相關報告 (張等, 2009)，可得知該些樣本之母系遺傳為尼羅魚型、歐利亞型或莫三比克型。

(三) 利用微衛星 DNA 輔助分析

1. 基因組 DNA 萃取

除了萃取前述 2 組、75 尾試驗魚中，經粒線體 DNA D-loop 判定其母系遺傳為「非尼羅魚型」個體 (計 10 尾) 之基因組 DNA 外，也萃取種原庫所保存尼羅魚、歐利亞與

莫三比克等之基因組 DNA (各 23 尾；計 69 尾)，以便進行魚苗混雜之分析。

2. 微衛星 DNA 實驗

選取微衛星 DNA 基因座 (Locus) UNH 155 (張等，2010) 之引子分別與各個基因組 DNA 進行 PCR 反應。反應結束後，取 10 μL 進行 DNA 洋菜電泳，檢驗 DNA 產物是否存在。將在電泳膠片上有反應之微衛星 DNA 產物，進一步實施基因型分析 (genotyping)。

結果與討論

一、粒線體 D-loop 分析

利用粒線體 DNA D-loop 序列，並參考張等 (2009) 之五種吳郭魚 D-loop 序列資料，可提供判斷母系遺傳型的方法。表 1 係本試驗之 D-loop 定序結果，坊間-1 組之雜交單雄性魚苗 25 尾樣品中分成三種型式，其中 21 尾為尼羅型 (84%)，3 尾為歐利亞型 (12%) 及 1 尾為莫三比克型 (4%)。坊間-2 組之 50 尾魚苗樣品中，44 尾為尼羅型 (88%)，6 尾為莫三比克型 (12%)。

試驗中出現了兩種非尼羅型的遺傳，分別為歐利亞型與莫三比克型，在正常情況下，按理不應出現非尼羅型的魚苗。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，若來自歐利亞吳郭魚、莫三比克吳郭魚等中小型魚種之遺傳，可能會影響魚體的成長。坊間-1 組的樣本有幾尾魚苗的粒線體 DNA D-loop 為歐利亞型，可推測該魚苗之母本應為歐利亞吳郭魚，且繁殖業者可能挑選錯誤的種魚，使該種魚與雄性的歐利亞吳郭魚繁殖，故魚苗為

歐利亞吳郭魚。又坊間-1、坊間-2 兩組樣本中，都發現混雜了一些莫三比克型魚苗，顯示其母本可能曾與莫三比克吳郭魚雜交。綜合上述之結果，坊間雜交單雄性的魚苗除了尼羅型之母系遺傳外，另混雜了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之母系遺傳。

二、微衛星分析

以 UNH 155 基因座之引子與尼羅吳郭魚、歐利亞吳郭魚和莫三比克吳郭魚進行擴增，可分別得到不同位置之等位基因 (Allele) (表 2)，其中尼羅吳郭魚之等位基因為 110、112 及 116，莫三比克吳郭魚之等位基因為 142 與 144，歐利亞吳郭魚之等位基因為 174 和 186，三種吳郭魚之等位基因彼此間相距皆超過 20 個鹼基對且沒有相互交錯，可以明顯的區別，以作為標準品來追溯雜交魚苗之種原。將粒線體 D-loop 為非尼羅型的魚苗進行微衛星分析，可進一步瞭解魚苗混雜情況 (表 3)，這些魚苗分別判定為歐利亞吳郭魚、反雜交種 ($\text{♀歐利亞種} \times \text{♂尼羅種}$) 與三種混雜種：(1)混有尼羅吳郭魚及莫三比克吳郭魚的遺傳；(2)混有歐利亞吳郭魚及莫三比克吳郭魚的遺傳；(3)混有三種吳郭魚的遺傳 (尼羅吳郭魚、歐利亞吳郭魚及莫三比克吳郭魚)。

粒線體 DNA D-loop 試驗中非尼羅吳郭魚遺傳型的樣本綜合微衛星 DNA 基因座 UNH 155 等位基因的分布，可協助判斷混雜魚苗的遺傳來源。微衛星的結果不但可以輔助粒線體 DNA D-loop 的鑑種判定，更可深入了解魚苗雜交的程度，為坊間魚苗品質的優劣把脈。

三、混雜的魚苗品質

據上述研究結果，2 組坊間魚苗的混雜比例都超過 10%，本試驗只是針對粒線體 D-loop 與 1 個微衛星基因座進行混雜判定，實際上混雜的魚苗比例可能更高些。造成這個現象的原因應是種原管理的疏漏，間接造成了魚苗品質的降低。現今的種苗業者大都以人工的方式挑選種魚，有些種魚雖具有良好的外型與體態，但其 DNA 也許混雜了其他吳郭魚種的基因（如莫三比克吳郭魚），卻因無法以肉眼區別，容易挑選到不純的種魚來進行繁殖，長此以往，魚苗的混雜情況便

會越來越嚴重。

結語

混雜其他魚種遺傳的單性吳郭魚苗，會導致魚苗雄性比例降低，在養殖過程中會有多產現象與成長較緩慢等問題。魚苗成長緩慢的原因與種原有關，有賴繁殖業者來把關。筆者建議繁殖業者將魚苗雄性比例下降的種魚淘汰，另將保存的尼羅吳郭魚與歐利亞吳郭魚重新進行選擇育種，必要時可導入生物技術輔助，以確保種原的品質無虞。

表 1 各組雜交魚苗之粒線體 DNA D-loop 型

組 別	D-loop 型數量與所佔百分比			總 數
	尼羅型	歐利亞型	莫三比克型	
坊間-1	21 (84%)	3 (12%)	1 (4%)	25
坊間-2	44 (88%)	0	6 (12%)	50

表 2 三種純吳郭魚微衛星 DNA 基因座 UNH 155 之等位基因

品 種	等 位 基 因 型						
尼羅吳郭魚	110	112	116	-	-	-	-
歐利亞吳郭魚	-	-	-	-	-	174	186
莫三比克吳郭魚	-	-	-	142	144	-	-

表 3 以粒線體 DNA D-loop 鑑定為非尼羅型魚苗的混雜情況

組 別	樣本編號	D-loop 型式	UNH 155 對偶型	綜 合 推 論
坊間-1	No. 02	歐利亞型	174, 186	歐利亞吳郭魚
	No. 05	歐利亞型	174, 186	歐利亞吳郭魚
	No. 18	歐利亞型	104, 174	反雜交(歐利亞、尼羅魚)
	No. 20	莫三比克型	110, 142	混雜種(尼羅魚、莫三比克)
坊間-2	No. 02	莫三比克型	142, 176	混雜種(歐利亞、莫三比克)
	No. 32	莫三比克型	116, 170	混雜種(尼羅魚、歐利亞、莫三比克)
	No. 33	莫三比克型	112, 186	混雜種(尼羅魚、歐利亞、莫三比克)
	No. 35	莫三比克型	104, 170	混雜種(尼羅魚、歐利亞、莫三比克)
	No. 36	莫三比克型	104, 170	混雜種(尼羅魚、歐利亞、莫三比克)
	No. 42	莫三比克型	110, 116	混雜種(尼羅魚、莫三比克)