

# 建立雜交龍虎斑之分子鑑定技術

宋嘉軒、何欣玗 / 水產試驗所技術服務組

石斑魚屬於鱸形目 (Perciformes)、石斑魚科 (Epinephelidae)，是臺灣重要的養殖海水魚種，廣泛分布於熱帶至溫帶海域，魚種體色鮮艷多變，且具有雌雄同體及先雌後雄的性轉變等現象。

1980 年代起，不同石斑魚種的繁養殖及育苗技術已陸續建立，包含：瑪拉巴石斑 (*Epinephelus malabaricus*)、點帶石斑 (*E. coioides*)、棕點石斑 (*E. fuscoguttatus*)、鞍帶石斑 (*E. lanceolatus*)、藍身大石斑 (*E. tukula*)、豹鱸 (*Plectropomus leopardus*)、雲紋石斑魚 (*E. moara*) 以及龍虎斑 (*E. fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*)。在臺灣主要的養殖石斑魚生產區集中在屏東縣及高雄市，依據漁業統計年報，2020 – 2023 年主要養殖石斑魚種為龍虎斑，其次為鞍帶石斑及點帶石斑，且不論是在產值或產量，龍虎斑都呈現逐年上升的趨勢（圖 1、2）。依據 2025 年 7 月全國養殖魚種放養量累計，龍虎斑的放養面積為 715.26 公頃，佔整體石斑魚產業面積的 70.76%，鞍帶石斑放養面積為 255.78 公頃，佔比為 25.31%。

龍虎斑的培育方式是由公的鞍帶石斑（俗名龍膽）及母的棕點石斑（俗名老虎斑）在人工環境下雜交產生的  $F_1$  子代，由於父母的俗名分別為龍膽及老虎斑，因此得名龍虎斑。2006 年由馬來西亞沙巴大學首次培育成功，龍虎斑的育成率高、成長快，保有龍膽皮厚有彈性且富含

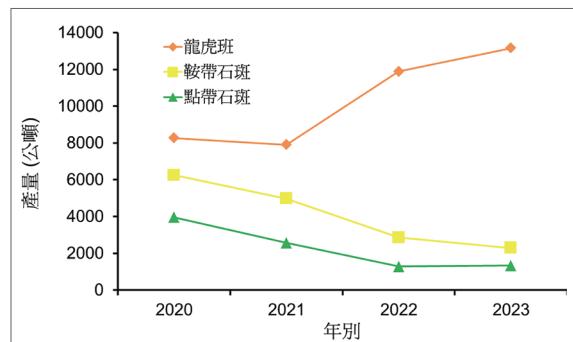


圖 1 2020-2023 年臺灣養殖石斑產量

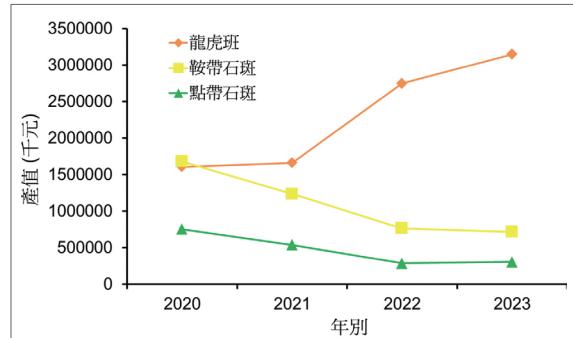


圖 2 2020-2023 年臺灣養殖石斑產值

膠質特性及老虎斑魚肉細緻的口感、對疾病抵抗性強的優勢，受到養殖業者及消費者的青睞，是目前臺灣、中國及東南亞地區養殖石斑魚的主要魚種之一。

區分養殖石斑魚的種類，可經由石斑魚的體型、體色、斑紋、鰭條數、鱗片等外部形態特徵來進行鑑定，不過當加工過的漁產品形態特徵不易判定時，就必須使用分子生物相關的技術，例如：PCR、real-time PCR、蛋白質電泳或質譜儀分析等。

PCR 是最常使用的分子鑑定技術，一般在魚類的種類鑑定上，會先選用粒線體基因



(如 COI、ND2、16S rDNA 等) 作為鑑定的目標基因，在不同的種之間都有良好的鑑別效果。然而，龍虎斑是老虎斑的雜交後代，龍虎斑的粒線體源自於老虎斑，兩者在粒線體基因序列上具有極高的相似性，所以單只使用粒線體基因則無法進行龍虎斑或雜交石斑的鑑定，必須搭配核基因 (nuclear gene) 的結果共同比對分析。龍虎斑的染色體一半來自老虎斑一半來自龍膽 (圖 3)，在基因序列上必然會有所不同，在對偶基因 (allele) 上會出現異型合子 (heterozygous) 的現象，比對這些有差異的核酸序列就可作為龍虎斑和其父系及母系的判定依據。

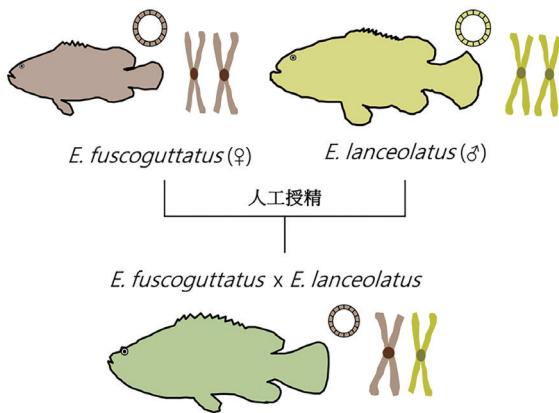


圖 3 龍虎斑粒線體與染色體來源示意圖。環狀代表粒線體，X 字母狀代表染色體

目前已有不同的雜交石斑核酸鑑定技術陸續發表，可分為主要兩個階段：(1) 確認粒線體基因的母系來源，(2) 比對分析核基因的父系來源，搭配兩個部分的結果即可鑑別為純系或雜交石斑。筆者首先利用現有發表的技術進行龍虎斑的核酸鑑定，在粒線體的分析上，使用 Ward 等 (1994) 所發表的 COI 基因引子對，進行老虎斑、龍膽及龍虎斑的 PCR 分析，PCR 產物片段大

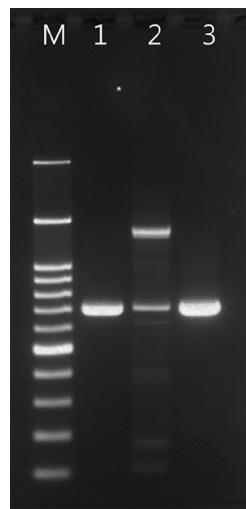


圖 4 COI 基因 PCR 產物

電泳分析

Lane 1 = 老虎斑

Lane 2 = 龍膽

Lane 3 = 龍虎斑

Lane M : 100 bp DNA ladder

小預計約為 700 bp，經瓊質膠電泳分析顯示，老虎斑及龍虎斑的 gel pattern 相同 (圖 4)。將 PCR 產物進行核酸定序，使用 Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 進行比對，三者的鑑定結果分別為老虎斑、龍膽及老虎斑。

在核基因的分析選用 Qu 等 (2018) 發表的 RYR3 (ryanodine receptor type 3) 基因引子對，目標片段預計約為 900 bp，經過電泳檢視 PCR 產物的 gel pattern 無法區分出不同魚種 (圖 5)，將目標片段進行核酸定序、螢光圖譜及資料庫比對，在龍虎斑的序列中發現異型核苷酸出現的位置 (圖 6)，藉由異型核苷酸的出現來判定其為雜交斑，其序列分別與老虎斑及龍膽相同。綜合 COI 和 RYR3 基因的分析結果，在粒線體基因屬於老虎斑，在核基因中含有老虎斑及龍膽的序列，就可判斷分析石斑魚屬於龍虎斑。

然而，在現有的鑑定方法中，PCR 產物的 gel pattern 無法作為判斷，必須進行核酸定序才能知道結果，在核基因的部分，還需要檢視

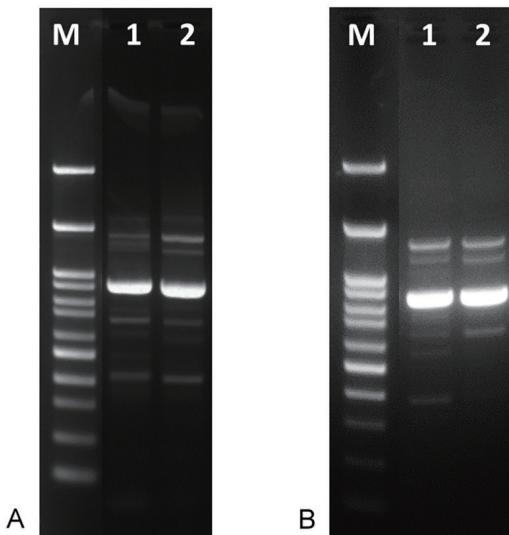


圖 5 RYR3 基因 PCR 產物電泳分析

A : Lane 1 = 老虎斑、Lane 2 = 龍虎斑；B : Lane 1 = 龍 膽、Lane 2 = 龍 虎 斑；Lane M : 100 bp DNA ladder

序列螢光圖譜進行異型核苷酸的分析，或利用基因選殖 (gene cloning) 的方式，將老虎斑和龍膽的序列分離出來，需要花費更多的時間及費用。因此，本研究針對老虎斑及龍虎斑在粒線體及核基因中具有差異之區域進行分析，開發便利並準確的龍虎斑核酸鑑定技術。

整個技術開發主軸同樣是兩個階段，第一階段：確認粒線體屬於老虎斑，第二階段：在核基因中找出屬於龍膽的序列，合併兩階段的結果就可快速的進行龍虎斑的鑑定。在確認粒線體的階段，本研究設計具老虎斑粒線體專一性引子，目標片段大小約 320 bp，PCR 結果顯示，只有在老虎斑及龍虎斑的 DNA 樣品中有 PCR 產物，在龍膽的 DNA 樣品中沒有信號 (圖 7A)。將 PCR 產物進行核酸定序，使用 Nucleotide BLAST 進行比對 PCR 產物屬於老虎斑。

在第二階段，篩選出在老虎斑及龍膽核基因中具有長度差異的區域，PCR 結果顯示，在老虎斑及龍膽的 DNA 樣品中，目標片段產物

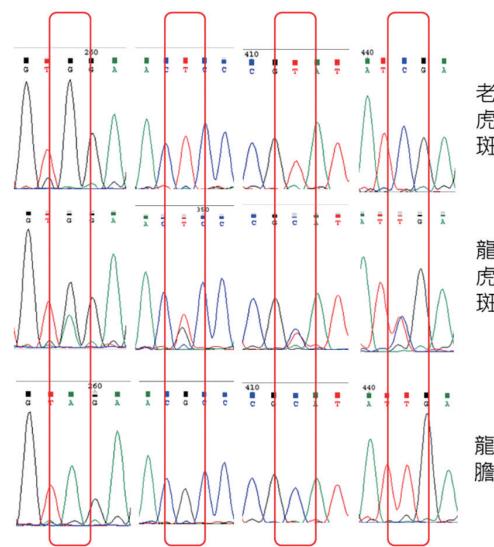
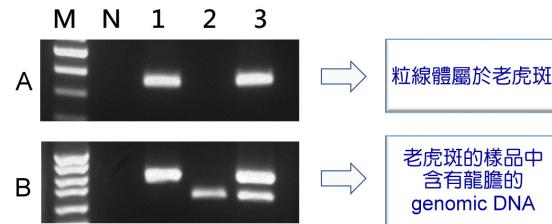


圖 6 三種石斑魚 RYR3 基因 DNA 序列螢光圖譜比對 (紅色框線代表異型核苷酸位點)

圖 7 PCR 產物 gel pattern 與鑑定結果示意圖  
A: 粒線體引子 PCR 產物；B: 核基因引子 PCR 產物；Lane 1 = 老虎斑、lane 2 = 龍膽、lane 3 = 龍虎斑；Lane M : 100 bp DNA ladder；Lane N : negative control

分別為 800 bp 和 650 bp，在龍虎斑的 DNA 樣品中，其 gel pattern 顯示出同時有 800 bp 和 650 bp 兩種產物的存在 (圖 7B)，進一步將兩種 PCR 產物進行核酸定序，使用 Nucleotide BLAST 進行比對，結果顯示 800 bp 的片段屬於老虎斑，650 bp 的片段屬於龍膽。因此合併兩個階段的結果，當檢測樣品的粒線體屬於老虎斑，在核基因中同時又含有老虎斑及龍膽的 DNA 序列，即代表分析的樣品屬於雜交的龍虎斑，並且目前本研究新開發的檢測技術，可提前依據 PCR 產物的 gel pattern 進行龍虎斑的鑑定。