

RAPD 指紋標記在台灣本土塘虱魚 品種鑑別應用

黃家富、黃德威、劉富光

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

根據聯合國【生物多樣性公約】對生物多樣性的定義：「意指地球上陸生、海洋及其它水生生態系中生物的變異性，它包括基因多樣性、物種多樣性與生態多樣性。」整個生態系統包含生物與非生物系統間、生物與生物間交互作用，以及生物個體的生理反應等，相當複雜；而生物多樣性之保護與永續利用是維持全球經濟穩定與發展的重要因素。

台灣地處亞熱帶，島內多山，河川流短而急促，但仍擁有七十餘種原生淡水魚，以及百餘種洄游及河口型魚類，使台灣成為全世界單位面積裡淡水魚種類最多的區域之一(邵廣昭，1992)。然而幾十年以來，現代科技如：工業、電子產業等的發展，人類社會物質文明到達另一高峰，導致生態環境相對惡化，自然資源與能源的過度消耗。另外，由於一味著重經濟的發展，忽略了維護種原的認知與共識，再加上人為的濫捕與利益掛帥的心態驅使下，沒有計畫的引進外來種，致使本土性魚種有日趨滅絕之虞。水產試驗所所有鑑於本土性魚種生物多樣性研究之重要性及為籌設水產種原庫之需，乃積極的建構 DNA 指紋分子標記技術平台，期能瞭解本土原生種魚種的品系，進而達到選種、育種及

保種的目標。

俗語說：「龍生龍、鳳生鳳，老鼠生的兒子會打洞」，此一俚語說明了物種親源間的關係，更闡明基因 (DNA) 的重要使命。DNA 是生物傳遞遺傳訊息的物質，它存在於生物的每一細胞中，以密碼形式儲存遺傳訊息資料，直接反應生物個體或種群間基因組中 DNA 片段間的差異，產生與生俱來的 DNA 身份證號碼，常被作為生物族群遺傳、親緣鑑定、遺傳標記等研究之用，這種 DNA 身份證號碼即是 DNA 指紋分子標記。常用的 DNA 指紋分子標記技術有：(1)粒線體 DNA 序列分析；(2)隨機擴增片段多形性 (RAPD)；(3)擴增片段長度多形性 (AFLP)；(4)重複序列標記-微衛星 DNA (Microsatellite DNA)；(5)表達序列標幟 (EST) 等。本所淡水繁養殖中心係利用 RAPD 核苷酸標記技術評估台灣本土原生種塘虱魚的遺傳變異情形。

RAPD 技術是在 1990 年，由 Williams 與 Welsh 等專家所領導的兩個科學研究小組幾乎同時發表的一種 DNA 多形性的檢測技術。此技術實際上是聚合酶連鎖反應 (PCR) 技術的延伸，其原理係在無需取得相關的檢測 DNA 序列情況下，利用不同的隨機排列的 10 個鹼基 (bp) 寡核苷酸單鏈為“引子”(Primer)，以研究生物的基因組 DNA 為模板 (Template) 進行 PCR 擴增反應，然後依反應

產物 (DNA 片段) 的多形性來進行遺傳分析。RAPD 的分析關鍵在於所使用引子的序列不同, 每一個特定的引子在模板 DNA 上都有其特定的結合位置。假若在引子的結合位置中發生了序列的缺失、插入、突變或重組等情形, 則導致引子的結合發生改變, 所擴增的片段也不同, 因此可檢測出目標基因在此區域的多形性。RAPD 分析方法最大的優點在於操作簡便、分析量大, 只需少量的樣品 DNA、經 PCR 反應可複製特定的 DNA 產物, 不必使用放射性同位素, 可以直接進行膠體電泳觀察結果 (鄭可大等, 1994), 所以 RAPD 自 1990 年建構以來, 已經廣泛的被應用於細菌、動、植物族群遺傳變異、遺傳育種、生物系統分類與進化等諸多研究。

本研究以 RAPD 技術分析台灣本土性塘虱魚 (*Clarias fuscus*)、非洲塘虱魚 (*C. mossambicus*) 及泰國塘虱魚 (*C. batracus*) 等的遺傳變異。以 John B. H. 設計之 RAPD primer oligonucleotide set No. 101-300 共 200 組為引子進行試驗, 篩選得 16 組引子產生可重複的 DNA 圖譜 (圖 1), 依據該 DNA 片段代表基因座共享的方法分析遺傳變異性, 顯示單個引子產生 RAPD 標記數平均在 7.18—9.62 個表現 DNA 片段染色帶; 其擴增 DNA 片段分子大小介於 300—2,000 鹼基對之間。隨機擴增多形性核苷酸圖譜顯示, 三種不同種塘虱魚, 甚至於不同水域捕獲的台灣本土性塘虱魚, 皆顯示不同層次的多形性。來自頭前溪和高屏溪的台灣本土性塘虱魚的遺傳多形性分別為 58.44% 及 40.85%, 人工育種之台灣本土性塘虱魚遺傳多形性則為 58.12%。三個不同來源之本土性塘虱魚 (新竹頭前溪、高雄高屏溪及私人種苗培育場) 的遺傳異質性 (Heterozygosity) 估計分別為 0.467、0.311 及 0.445, 此意謂著生存於自然水域中

的台灣本土塘虱魚之數量可能處於族群衰減 (population decline) 狀態。

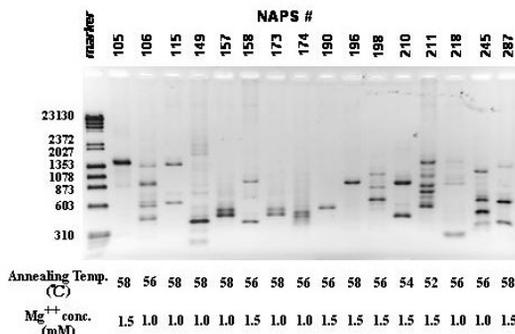


圖 1 16 組 RAPD 引子在最適條件下對台灣本土性塘虱魚的隨機擴增 DNA 片段

分析台灣本土性塘虱魚、非洲塘虱魚及泰國塘虱魚間的遺傳相似係數 (F), 台灣本土性塘虱魚對非洲塘虱魚及泰國塘虱魚之 F 值分別為 0.6646 及 0.5879; 分析三個不同來源之台灣本土性塘虱魚的種內遺傳相似係數則分別為 0.9296 (頭前溪 vs 高屏溪)、0.8163 (頭前溪 vs 人工種苗) 及 0.7659 (高屏溪 vs 人工種苗) (表 1)。依據遺傳相似性係數估算, 頭前溪與高屏溪的塘虱魚具 93% 相似度, 但與非洲塘虱魚及泰國塘虱魚比較則分別僅具 66% 和 59% 相似度, 此點顯示台灣本土性塘虱魚的基因庫尚未因棲息地破壞或雜交種競爭而嚴重受到擾亂。

此外以編號 # 211、# 245、# 287 之引子對非洲塘虱魚染色體 DNA 進行 PCR 反應, 分別將核苷酸圖譜中之特定 DNA 片段回收作為探針。以此探針對不同來源之塘虱魚進行雜合 (hybridization) 試驗, 結果證明了作為探針的 DNA 片段確實僅存在於非洲塘虱魚染色體 DNA 中 (圖 2)。也利用此特定探針對頭前溪、高屏溪、苗栗明德水庫、人工種苗、非洲塘虱魚與台灣本土性塘虱魚雜交子

表 1 以隨機擴增片段多形性方法分析台灣塘虱魚、非洲塘虱魚及泰國塘虱魚間之遺傳相似係數

品 種	台灣塘虱魚			非洲塘虱魚	泰國塘虱魚
	頭前溪	高屏溪	人工培育苗		
台灣塘虱魚					
頭前溪	1.0000	0.9296	0.8163	0.6887	0.5844
高屏溪		1.0000	0.76593	0.6565	0.5598
人工培育苗			1.0000	0.6487	0.6195
平均值				0.6646	0.5879
非洲塘虱魚				1.0000	0.6090
泰國塘虱魚					1.0000

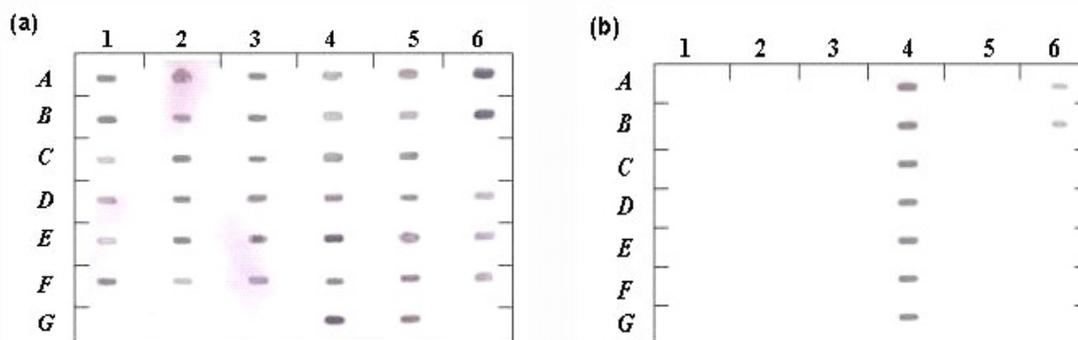


圖 2 (a)以 RAPD 引子# 211 製作之共通探針(universal probe)對塘虱魚種內、種間之 DNA 雜合分析；(b)以 RAPD 引子# 211 製作之特定探針(unique probe)對塘虱魚種內、種間之 DNA 雜合分析。A1-F6：採自新竹頭前溪台灣本土性塘虱魚；A2-F6：6 尾採自高屏溪台灣本土性塘虱魚；A3-F3：6 尾採自彰化縣私人養殖場台灣本土性塘虱魚種苗；A4-G7：7 尾非洲塘虱魚；A5-G7：7 尾泰國塘虱魚，採自進口之魚種；A6-B6：2 尾採自苗栗明德水庫；6D-6F：3 尾福馬林浸泡標本。點漬 1 μ g genomic DNA 於尼龍膜上。

代及福馬林標本等塘虱魚樣品進行雜合試驗，結果只有苗栗明德水庫水域之塘虱魚樣品與人工雜交子代可與探針呈現反應，證明了 RAPD 遺傳標記會遺傳到雜交子代的理論，同時建立塘虱魚的 RAPD 遺傳標記。

結語

本所為因應水產種原庫之建立，積極建

立 DNA 指紋分子標記技術平台，廣泛應用於 (1)物種鑑定：如台灣特有種或稀有魚類－台灣副細鯽、何氏棘鯪、菊池氏細鯽、圓吻鯽、台灣青鱗魚等及經濟性魚種－真泥鰍、鯪魚、台灣鯽魚等之 DNA 指紋分子標記研究；(2)族群遺傳結構分析；(3)育種選種；(4)重要性狀如成長快、抗病力強、適應環境能力強等遺傳標記之建立，監控種原並加速達成遺傳選種育種之目的；(5)確立品種智慧財產權。