

應用分子標誌輔助選拔育種問題的探討

曾福生、林金榮

水產試驗所水產養殖組

前言

養殖魚種的育種過程中有二大重要工作，首先是確定想育種的養殖魚是否存在有用的遺傳性狀，其次為採用有效的方法把目標性狀基因轉移到品種中。利用易於鑑定的遺傳標誌來輔助選拔是提昇選拔效率和降低盲目育種常用的手段。傳統的育種過程，基本上還是應用形態學標誌，這類標誌數目有限，往往受到環境的影響，不利於直接選拔。

近一、二十年來迅速發展的 DNA 分子標誌係利用隨機擴增片段多形性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, 縮寫為 RAPD) 及重複序列為基礎的分子標誌如微衛星 DNA (Microsatellite) 等，為育種改良提供有效、快速的檢驗技術，也就是所謂的“分子標誌輔助選拔”(marker-assisted selection, 縮寫為 MAS)。把分子標誌技術應用於選拔育種過程，藉由分析與目標性狀關聯基因標誌的基因型來進行選拔育種，從而提昇選育效率。其原理是利用目標區域中，目標性狀基因與分子標誌連鎖或表現共分離關係的分子標誌，選拔出具期望性狀的個體，達到提昇選育效率的目的。

分子標誌輔助選拔的特點

一、能夠早期選拔

一個個體有很多重要性狀，有些在幼苗時期即可表現出來，有些則只見於成熟個體。所以若要在幼苗期選拔成熟期的性狀，傳統方法須待幼苗成熟後再從中選拔，在飼育初期的數月或數年中均不能對其進行選擇，對於生活史較長的魚種，如石斑魚類，類似的情形就成為育種改良過程中的眾多限制因素之一。而利用分子標誌就可以在受精卵或孵化後的仔稚魚階段進行檢測，可大量地節省培育種魚過程中所浪費的人力、物力和財力。以石斑種魚為例，台灣的每一種魚場至少必須維持數千尾以上的種魚，而每尾的年齡至少在 5 齡以上，所占的養殖面積及其花費的成本相當驚人，若不幸又遭逢風災，導致種魚流失，損失經常都超過上百億台幣。若能使用分子標誌，無論是幼苗或種魚，採用精兵政策，從選拔育種或淘汰遺傳型重複的角度來看，至少可淘汰一半以上的種魚，選留下來的優質種魚，數量縮減可建構堅固的養殖設施以減少風災的威脅。

二、解決目標性狀表現型鑑定的困難

有的性狀如抗病、抗寄生蟲及抗逆性等，不僅鑑定費時、費力，而且這些性狀受環境的影響很大，基因型與環境間存在交互作用，直接鑑定往往不太準確。如抗病性的

選拔就有此情況，採用野外自然發病法需要一定的環境條件，且需要特別的野外的實驗設計；採用人工接種寄生蟲法需要先培育寄生蟲，但難度相當高，甚至有的寄生蟲至今仍無法培育。另外，對偶基因的外在表現不明顯，如隱性對偶基因，尤其對多基因遺傳的數量性狀來說，環境變異會使不同基因型表現出部分或全部相同的外表型，這些現象使得基因型的鑑定更加困難。有些外表型如抗菌或抗寄生蟲性、耐乾旱性或耐鹽性，只有在難於界定或控制的特定條件下才能表現出來。在育種過程的初期，材料相當少，不可能重複鑑定，或者要冒一定風險，分子標誌技術可解決部分基因型鑑定的困難。

三、同時進行更廣泛和強度更大的選拔

生活史在早期，特別是對幼苗階段，可以把更多的群體納入目標的對象之中，並利用分子標誌同時對幾個目標性狀進行選拔。

四、非犧牲或破壞性性狀評估和選拔

利用分子標誌檢測所需樣本可採取少許的組織，如鱗片、魚鰭等，可避免犧牲個體，讓其繼續活存至成熟，以便育種工作者同時對進行其他性狀的選拔。因此在選拔過程中能夠重複測知，增加選拔的準確度，選留具優良性狀的個體，淘汰較差的個體，如此將可縮小蓄養空間、大量降低飼料及管理成本。

五、提高回交育種效率

把一個期望對偶基因從一個品系轉移到另外一個品系中的傳統方法需經 5—10 代的回交育種。在每次回交世代中，育種工作者不僅要選拔被轉移的對偶基因的表型，還要選拔輪回親本的其他性狀的表型。然而，經過若干世代的回交之後，除目標性狀對偶基

因外，還有與之連鎖的相當長的染色體片斷也從目標對偶基因供體中轉移到回交後代。如利用傳統的回交配種方法將一個野生種的優良基因轉移到養殖品種中，回交 20 代以上還有可能帶有 100 個以上的其他非期望基因。如果是數量性狀位點 (Quantitative Trait Loci, QTL) 的轉移，因為上位效應和連鎖累贅的作用，問題則更為複雜，實施更形困難。利用分子標誌可以選拔，可以儘可能排除那些含有重組染色體 (打破了連鎖累贅) 的個體，減少不需要的染色體片斷，因而提高育種效率。另外，對隱性性狀可以進行不間斷的回交 (傳統回交是隔代回交)，從而提高基因的回交轉移速度。

影響分子標誌輔助選拔的因素

一、分子標誌與目標性狀的基因座或 QTL 之間的距離

MAS 的選拔效率取決於基因座間的距離，愈小者 QTL 對偶基因效應的準確程度愈高，尤其在每個 QTL 只有一個連鎖的分子標誌時。惟如果有兩個或以上的分子標誌時，這個效應會遞減。Gimelfarb & Lande (1994, 1995) 發現一條染色體上存在有最適量的分子標誌密度，如果分子標誌數量超過最適密度，則 MAS 的選拔效率相對會降低。但是，也有研究認為連鎖程度雖會降低效率，但影響不大 (van Berloo Ralph & Stam, 1998)。

二、分子標誌的使用數量

Tanksley (1983) 建議若主效基因 (major monogene) 的頭尾兩側都有分子標誌，同時使用時可提高選拔效率。Landry et al. (1987)

指出，農作物中的萬苳有兩個限制性內切酶的酶切分子標誌 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)，各別位於抗霜黴病基因的頭尾兩側，但不包括在該基因內，而是有相當的距離，約有 10% 的基因連鎖，若以其中之一的 RFLP 分子標誌選拔，其選拔的效果為 90%，若同時使用則選拔效果可提高至 99%。在選拔指數中應使用多少個分子標誌，一般認為有一個最佳數目，且與目標性狀的遺傳率 (heritability) 有關 (Gimelfarb & Lande, 1994a, 1995; Moreau et al., 1998)；一般而言，目標性狀的遺傳率愈高，使用的分子標誌就會愈少。Gimelfarb & Lande (1994a) 發現，使用 6 個分子標誌時，MAS 效率高於使用 3 個者，但使用 12 個以上時，MAS 的效率在低世代時反而降低，在高世代時增幅很小，這顯示分子標誌的使用並不是多多益善。

三、族群的大小

Lande & Thompson (1990) 指出，在群體無限大，分子標誌無限多的假設上，族群中一些遺傳率低的性狀，使用 MAS 選拔，比使用傳統者效率高，但仍需進行大量個體研究加以確認。但樣本大小確實對累加性遺傳變方有一定的影響，在個體數少的群體中，MAS 選拔沒有太大效果。其他一些根據電腦類比的結果對 MAS 選拔效率的研究顯示，群體大小是影響 MAS 的關鍵因素 (Gimelfarb & Lande, 1994a, b, 1995; Hospital et al., 1997)。Moreau et al. (1998) 發現，MAS 選拔的相對效率隨群體增大而提高，但在群體小於 200 時，MAS 仍然有效。因此，在個體數少的群體中使用分子標誌時，須考慮選

拔的目標性狀的遺傳率高低，而一般以 0.25 以下最佳。

四、目標性狀的遺傳率

根據研究顯示，性狀的遺傳率是影響 MAS 選拔的關鍵因素之一。一般來說，遺傳率越高，則 MAS 效率降低 (Hospital et al., 1997; van Berloo Ralph & Stam, 1998; Xie & Xu, 1998)。Moreau et al. (1998) 認為在群體大小有限的情況下，對低遺傳率的性狀，MAS 選拔效率相對較高，但也有一定範圍，並不是所有低遺傳率的性狀都會有效果。有些在 0.1—0.2 低遺傳率時，MAS 選拔具有較高的效率，有些則以 0.3—0.4 之間的效果較佳 (Hospital et al., 1997; Moreau et al., 1998)。此外，假如群體個體數量很多 (例如大於 500，但不是無限大)，最適遺傳率反而會趨近於零。在實際利用分子標誌輔助選拔改良普通菜豆的耐乾旱性狀時顯示，MAS 選拔的效率與性狀的遺傳率呈反比關係 (Schneider et al., 1997)。

應用分子標誌輔助選拔的條件

一、檢測的自動化程度

分子標誌種類很多，如 RFLP 係以限制性內切酶酶切而獲得的標誌。RFLP 檢測步驟多，週期較長，成本較高，自動化程度不易提高。擴增片段長度多形性 (Amplification Fragment Length Polymorphism, AFLP) 改良了 RFLP，可檢測到更高的多形性，但還是比不上聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，其檢測步驟少、簡單、快速、省時、再現性高、成本低，檢測過程 (包括

體基因組 DNA 的純化、分子標誌的檢測、資料分析等)可自動化,檢測數量大幅增加。RAPD、簡單重複序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 等分子標誌即以 PCR 為主。而以此為基礎所發展的序列標識位 (Sequence Tagged Sites, STS)、序列特徵擴增區 (sequence characterized amplified region, SCAR)、酶切擴增多形性 (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, CAPS) 分子標誌等也有很大的發展潛力,一樣可以應用於輔助選拔。

二、把目標性狀的基因座定位於染色體圖譜上

又稱之為“基因標識”,即建立目標基因與分子標誌的連鎖關係。這裡的目標基因包括控制簡單遺傳性狀和控制數量性狀的基因 (QTL)。分子標誌輔助選拔的可靠程度,取決於目標性狀基因座位置和分子標誌基因座位置之間的基因重組頻率。因此,二者之間的遺傳距離越小越好。與目標性狀基因座緊密連鎖的單一分子標誌可用於輔助選拔。如果在目標性狀基因座的頭尾兩端都能找到與之連鎖的分子標誌,會進一步提高選拔的準確度。由於在染色體上任兩個基因座的距離在 15—20 cM (centiMorgan, 1 cM 大約是百萬鹼基對,表示基因重組機率為百分之一) 以內,很難發生基因重組,即在這段距離內的兩個基因不容易互換。因此,一般認為,如果目標性狀基因座的兩側距離在 15—20 cM 以下,就是選拔育種的關鍵分子標誌。

三、儘可能構築飽和的染色體分子標誌圖譜

分子標誌雖然分布在染色體內,但只是一群不具功能的基因資料,雖然彼此間的關

係不清楚,卻各有其位置 (基因座),因此可藉由其在染色體內的位置,真正的將分子標誌的基因座定位於這個染色體圖譜上,並可在比較不同種的染色體組成時,作為對照或比評估的基礎。首先需要利用分子標誌在 F_2 族群上基因座彼此間的關係及相對位置以線性形式排列起來的連鎖圖譜,然後把這些連鎖圖譜與特定的染色體或連鎖群相聯繫,將分子標誌的基因座定位在染色體上。但後一步工作對育種來說不是必須的。建立飽和的分子圖譜是對目的基因進行精密定位的前提。目前,對大多數重要的農作物如水稻、玉米、小麥、大麥、番茄、馬鈴薯等均已建立相當飽和的圖譜,畜產則在豬和牛有較詳細的資料。但在水產方面,僅有斑馬魚、河豚、吳郭魚、草蝦及鮑魚。

結語

從 1980 年以來,分子標誌研究與應用快速發展,這些新的選拔技術有效提昇畜產及農作物的育種效率。由已開發及開發中國家所組成的經濟合作暨發展組織 (OECD) 預測,未來 5 年,分子標誌輔助選拔育種技術會廣泛的應用在開發商業化養殖品種上,且此一趨勢會持續至西元 2030 年,顯示如何利用分子標誌作為育種改良的手段已廣受全世界重視。儘管分子標誌的優點多,但水產養殖的種類繁多、特性各異,況且不同的分子標誌各有其優缺點及適用範圍。畜產及農作物發展過程中的諸多經驗,可供尚在起步階段的水產養殖產業作為參考與借鏡,以降低研究投資的風險。