

RAPD 及 PCR-RFLP 生物技術應用在台灣紅色吳郭魚之選擇育種研究

張湧泉* · 陳榮華 · 張格銓 · 劉富光

行政院農業委員會水產試驗所淡水繁養殖研究中心

摘 要

本試驗乃應用隨機增幅多型性去氧核糖核酸 (RAPD) 及聚合酶連鎖反應—限制酶切割片段多型性 (PCR-RFLP) 生物技術鑑別本中心研育之台灣紅色吳郭魚 (*Oreochromis* sp.) A07r、C03r 及 C07r 品系，並分析各品系之遺傳變異情形，以做為輔助選擇育種的工具。另外，實施 A07r 自交、C03r 自交，及雌 C03r 與雄 C07r 雜交之育種試驗，以進一步純化品系。

結果顯示在 RAPD 方面，OPA 07 隨機引子可以鑑別 C03r 與 C07r 品系；OPA 15 隨機引子則可以鑑別 A07r 與 C07r 品系。在 PCR-RFLP 方面，mtDNA D-loop 片段之切割位及切割片段，可以將 C03r 與其它二品系 (A07r、C07r) 區別；而且 A07r、C03r 及 C07r 品系內之單套體變異 (haplotype diversity) 均為 0，顯示出其遺傳變異情形均相當低。

育種試驗結果顯示各品系子代在魚苗期都為白色，成長約五個月後，A07r 與 C03r 品系自交之純紅子代與黑點子代之平均體長與體重均無顯著差異 ($p > 0.05$)。C03r 品系 (雌) 與 C07r 品系 (雄) 雜交之純紅子代與黑點子代之平均體長與體重亦無顯著差異 ($p > 0.05$)；但白色 (包括純白及具黑點) 子代則不論是平均體長或體重都顯著地低於前二類子代 ($p < 0.05$)。由於各試驗組內之純紅子代與黑點子代之成長均無顯著差異，且黑點子代之黑點數量少，故推測可能是由於兩種子代之遺傳基因差異不大所致。

關鍵字：台灣紅色吳郭魚、輔助選擇育種、RAPD、PCR-RFLP、遺傳變異

前 言

原生種吳郭魚之體色為黑色，“紅色”吳郭魚泛指體色為紅色、桃紅色、橘紅色、褐色、黃色、金色及白色等之突變吳郭魚 (Wohlfarth *et al.*, 1990; Mather *et al.*, 2001)。紅色吳郭魚最早發現於台灣 (Popma and Masser, 1999)；埃及、以色列、菲律賓、泰國及美國等地也有不同之品系 (Avtalion and Reich, 1989; Popma and Masser, 1999; Hilsdorf *et al.*, 2002)。其中，有些是單一種突變品系，例如：Red-Stirling *Oreochromis niloticus* (Angela *et al.*, 2005) 或 Florida Red *O. mossambicus*

(Hilsdorf, *et al.*, 2002)；有些則是突變種與其它原生種吳郭魚雜交之品系，例如：台灣紅色吳郭魚 (*Oreochromis* sp.) (郭, 1979; 郭與蔡, 1984, 1990)。

在台灣，紅色吳郭魚最早是 1968 年出現於民間養殖池之莫三鼻克吳郭魚 (*O. mossambicus*) 突變種，由於其體型較小，水產試驗所鹿港分所 (本中心之前身) 研究人員將其與體型較大之尼羅吳郭魚 (*O. niloticus*) 原生種進行雜交育種，其子代體表為紅色 (但有黑斑分佈) 之魚苗只佔 30% 以下，其它為黑色魚苗 (郭, 1979)。紅色吳郭魚體色的遺傳機制並不明確，而且初期之色澤並不穩定，會出現紅色、桃紅色、橘紅色、褐色、黃色、金色及白色等不同子代，夾帶面積大小不等之黑斑，經過數年之選擇育種 (selective breeding)，於 1977 年，體表為紅色之魚苗數量不但比率提升為 80%，且其色彩也比較清新亮麗，同時黑斑顯著減

*通訊作者 / 彰化縣鹿港鎮海埔里 106 號, TEL: (04) 777-2175; FAX: (04) 777-5424; E-mail: yungchuan@mail.fwtk.tfrin.gov.tw

少；至 1986 年，黑斑多半集中在腹部，而且已有一些純紅色魚苗出現 (蔡, 2004)。多年來，由莫三鼻克與尼羅魚雜交而來的紅色吳郭魚除了被選種、繁殖外，也分別與賀諾奴、歐利亞 (郭與蔡, 1984) 及尼羅 (郭與蔡, 1990) 等吳郭魚進行雜交之育種改良試驗。目前，各品系之子代純紅色吳郭魚比例不一，有些個體完全為純紅色；有些個體在魚苗期為純紅色，成長後出現少數黑點；有些個體從小就有黑點，另外，有時候會參雜一些純白或白色帶黑點之個體。

隨機增幅多型性去氧核糖核酸 (random amplified polymorphic DNA; RAPD) 生物技術係以隨機方式增幅基因體 DNA (genomic DNA) 片段。因不同品種之 DNA 序列有所差異，所增幅之 DNA 片段也常會產生多型性 (polymorphism)，在適當條件下，就會出現可用來區別品種之特異性遺傳標記，此技術已被應用在種別鑑定，如鰻魚 (張等, 1999) 及吳郭魚 (Bardakci and Skibinski, 1994) 等。

聚合酶連鎖反應－限制酶切割片段多型性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP) 技術是將增幅之特定 DNA 片段用限制酶 (restriction enzyme) 切割，相同限制酶對不同品種 DNA 片段之切割位或切割片段也許會不一樣，造成多型性現象。此技術原則上必須事先了解特定 DNA 之序列以便設計所需要的一對引子，不過文獻上常有已設計好的引子甚至通用引子 (universal primer) 足資選用。粒線體 DNA (mitochondrial DNA; 簡稱 mtDNA) 為具有高保守性 (highly conserved) 之基因組成，其核苷酸序列演化速度快，會累積差異，在估算品種間之遺傳距離上特別有價值 (Rafael *et al.*, 1995)。mtDNA 是由幾個基因片段所組成，其中，D-loop 部位是長鏈之非編碼區 (non-coding region) 序列，在 mtDNA 中變異性最大 (Menezes, *et al.*, 2006)。可以應用 PCR-RFLP 技術分析特定之限制酶對不同品種 mtDNA D-loop 片段之切割位及切割片段數目，以鑑別品種或比較各品種之遺傳變異 (Romana-Eguia *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2006)。

本中心台灣紅色吳郭魚品系之外部形態特徵相當接近，以肉眼區分並不容易。因此，本研究乃應用 RAPD 及 PCR-RFLP 技術鑑別品系並分析

各品系之遺傳變異，以輔助選種工作。同時就所鑑別之品系進行自交或雜交試驗，探究不同子代之純紅吳郭魚比例及比較不同色澤子代之成長情況，期望實驗結果與方法可作為選育品系之參考。

材料與方法

一、試驗魚種

選自本中心培育 A07r、C03r 及 C07r 等品系，體表完全無黑點之台灣紅色吳郭魚成魚。

二、試驗方法

(一) RAPD 及 PCR-RFLP 分析

1. DNA 萃取：

剪取 A07r、C03r 及 C07r 等品系各試驗魚 (每組八尾) 之少許臀鰭組織，分別使用 MasterPure DNA Purification Kit (EPICENTRE) 萃取 genomic DNA 後，以 GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences) 核酸分析儀測定濃度後保存於 -20 °C 冰箱。

2. Genomic DNA 之 RAPD 試驗：

以從生技公司購買之長度為 10 個核酸序列 (10-mer) 的 RAPD 隨機引子 OPA01 ~ OPA20 (波仕特) 分別與試驗魚之 genomic DNA 進行 PCR 反應。反應試液包含：genomic DNA (25 ng/μl) 1 μl、10 mM dNTP 1 μl、10 μM primer 1 μl、reaction buffer (10X) 5 μl、Supertherm Tag (5U/μl) 0.2 μl 及無菌水 41.8 μl，總體積 50 μl。PCR 反應機型為 MyCycler thermal cycler (Bio-Rad)。增幅反應條件：變性 (denaturation) 94 °C、2 mins；接著進行 45 個循環的變性 94 °C、1 min；煉合 (annealing) 36 °C、1 min 及延長 (extension) 72 °C、2 mins；最後再於 72 °C 延長 7 mins 後，降至 4 °C 終止反應。

3. mtDNA D-loop 片段之 PCR-RFLP 試驗：

選定一對引子 LN20: 5'-ACCACTAGCACCC AAAGCTA-3' (Forward) 以及 HN20: 5'-GTGTTA TGCTTTAGTTAAGC-3' (Reverse) (Agnès *et al.*, 1997; Bernatchez and Danzmann, 1993; Romana-

Eguia *et al.*, 2004) 與 genomic DNA 進行 PCR 反應，以增幅 mtDNA D-loop 長度約 1 kb 之片段。反應試液包括：genomic DNA (25 ng/ μ l) 1 μ l、10 mM dNTP 1 μ l、10 μ M LN20 1 μ l、10 μ M HN20 1 μ l、reaction buffer (10X) 5 μ l、SuperTaq (5U/ μ l) 0.2 μ l 及無菌水 40.8 μ l，總體積 50 μ l。PCR 反應機型為 MyCycler thermal cycler (Bio-Rad)。增幅反應條件為：變性 94 $^{\circ}$ C、2 mins；接著進行 30 個循環的變性 94 $^{\circ}$ C、1 min；煉合 55 $^{\circ}$ C、1 min 及延長 72 $^{\circ}$ C、1 min；最後再於 72 $^{\circ}$ C 延長 7 mins 後，降至 4 $^{\circ}$ C 終止反應。

4. 洋菜膠體電泳 (agarose gel electrophoresis) 與核酸序列分析：

製備 1.5% 洋菜膠體置於內含 0.5 $\times$ TAE buffer 之迷你電泳槽 (Bioer GE-100)，將 RAPD 增幅產物以微量吸管抽至洋菜膠體孔內，電壓 100 V。電泳結束後將膠體以 Ethidium bromide 染色，接著用影像處理系統 PHOTO-PRINT (VILBER LOVRMAT) 進行分析及儲存為影像檔案。

增幅 mtDNA D-loop 片段之核酸序列經委外定序後，用 MegAlignTM 7.1 套裝軟體 (DNASTAR) 訂出共識序列及比較百分比相同性 (percent identity)，增幅片段對 *Asn* I, *Hinf* I, *Rsa* I, *Ava* II, *Msp* I, *Taq* I 等六種內切限制酶之切割片段及切割位 (Agnès *et al.*, 1997; Romana-Eguia *et al.*, 2004) 則分別以 SeqBuilderTM 7.1 套裝軟體 (DNASTAR) 進行分析，以鑑別品系及了解品系內之遺傳變異情形。另外，經分析後顯示對 A07r、C03r 或 C07r 品系有二種不同切割片段的 *Ava* II 及 *Msp* I 內切限制酶，予以實際進行電泳檢驗，方法為取 4 μ g 之增幅 D-loop 片段分別與 1 μ l *Ava* II 或 *Msp* I (New England Biolabs) 內切限制酶及相關緩衝液與滅菌純水等混合後，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴，過夜反應後，如前述方式做電泳分析及觀察結果。

(二)育種

對前述已經用生物技術鑑別品系之台灣紅色吳郭魚進行育種。分別為 A07r 自交 (雌 8 尾、雄 4 尾)、C03r 自交 (雌 15 尾、雄 8 尾)，雌 C03r (12 尾) 與雄 C07r (12 尾) 雜交之自然繁殖，雌種魚體重範圍 400 ~ 510 g，雄種魚體重範圍 605 ~ 800 g，種魚體表皆無黑點。

繁殖魚苗分別於室外水泥池 (6.0 $\times$ 3.5 $\times$ 1.0 m) 中飼育，每天投餵二次，以飽食為原則；魚苗成長約五個月後，採樣及測定各試驗組不同體色子代之數量、體長及體重，以了解其個體比例及成長差異；體色判定上，體表完全無黑點者才視為純紅。

(三) 統計分析

將各試驗組不同體色子代之體長及體重進行 *t* test (二種體色子代) 或 one-way *F* test (三種體色子代)，*F* test 結果顯著時，則進一步進行 Tukey test，以了解三種體色彼此間之差異性。顯著水準均為 $p = 0.05$ 。

結 果

應用生物技術鑑別 A07r、C03r 及 C07r 等品系之台灣紅色吳郭魚，在 RAPD 方面，一共使用了 20 個隨機引子，其中，對 OPA 07 引子 (核苷酸序列：GAAACGGGTG) 而言，C07r 品系之個體顯示出一致性，均可合成特定的片段 (約 3,000 bp)，C03r 品系之個體則均未合成此片段 (Fig. 1)，A07r 品系之個體則或有或無 (結果未顯示)；另外，對 OPA 15 引子 (核苷酸序列：TTCCGAACCC) 而言，C07r 品系之個體顯示出一致性，均可合成特定的片段 (約 1,500 bp)，A07r 品系之個體則均未合成此片段 (Fig. 2)，C03r 品系之個體則或有或無 (結果未顯示)。在 PCR-RFLP 方面，所增幅之 mtDNA 長度近 1kb D-loop 片段，其中，C03r 與其它二品系 (C07r 及 A07r) 核苷酸序列之百分比相同性均為 89.9%，C07r 及 A07r 彼此間則高達 100%。

分析 C03r、C07r 及 A07r 等品系之 D-loop 片段，對於 *Asn* I, *Hinf* I, *Rsa* I, *Ava* II, *Msp* I, *Taq* I 等六種內切限制酶之切割片段及切割位，顯示品系內之表現完全一樣，分別都只有一種單套體 (haplotype)，單套體變異 (haplotype diversity) 數值均為 0 (Tables 1 & 2)。選取具二種不同切割片段之 *Ava* II 及 *Msp* I 實際做電泳分析，可以清楚顯示 C03r 品系容易與其它二品系區別；對 *Ava* II 限制酶而言，C03r 品系為未切割，其它二品系為切成二個片段，對 *Msp* I 限制酶而言，C03r 品系為切成二個片段，其它二品系則為切成三個片段 (Figs. 3 & 4)。

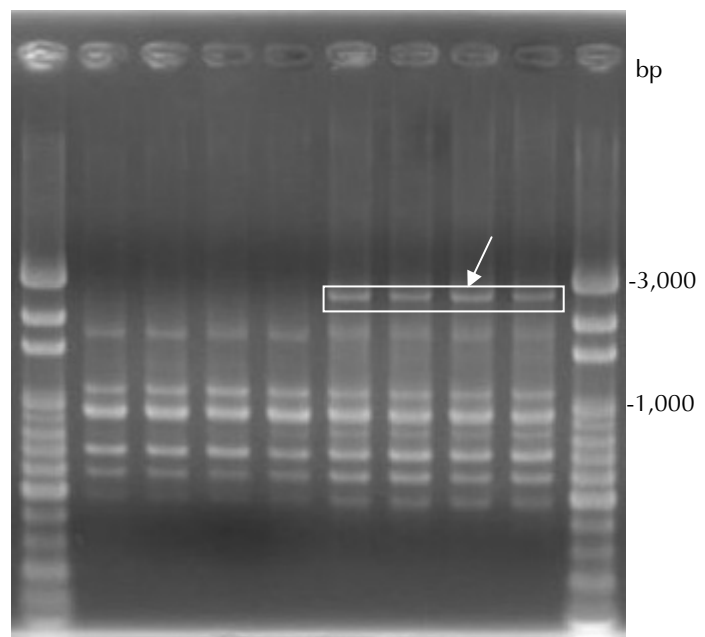


Fig. 1 RAPD patterns of amplified genomic DNA, for C03r and C07r strains, by using primer OPA 07. Arrow indicating the strain-specific marker. Lane 1~4: C03r, 5~8: C07r; M: 100bp DNA ladder marker.

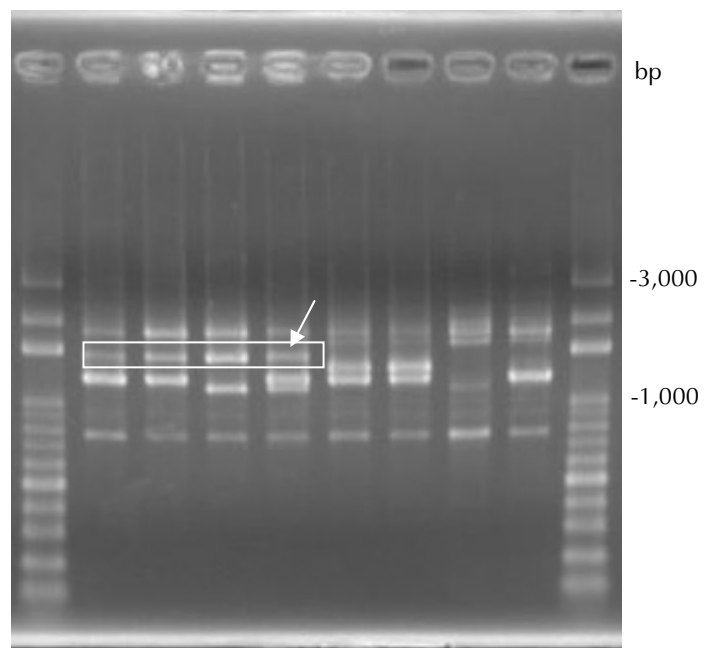


Fig. 2 RAPD patterns of amplified genomic DNA, for C07r and A07r strains, by using primer OPA 15. Arrow indicating the strain-specific marker. Lane 1~4: C07r, 5~8: A07r; M: 100 bp DNA ladder marker.

Table 1 Fragments produced by restriction enzyme digestions of amplified mtDNA D-loop region

Enzyme	<i>Asn</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Ava</i> II		<i>Msp</i> I		<i>Taq</i> I
Haplotype	A	A	A	A	B	A	B	A
Fragment size (bp)	898	898	615 242	898	506 392	779 119	480 296 112	441 430

$n = 8$ for A07r, C03r and C07r, respectively.
Fragments smaller than 50 bp were not shown.

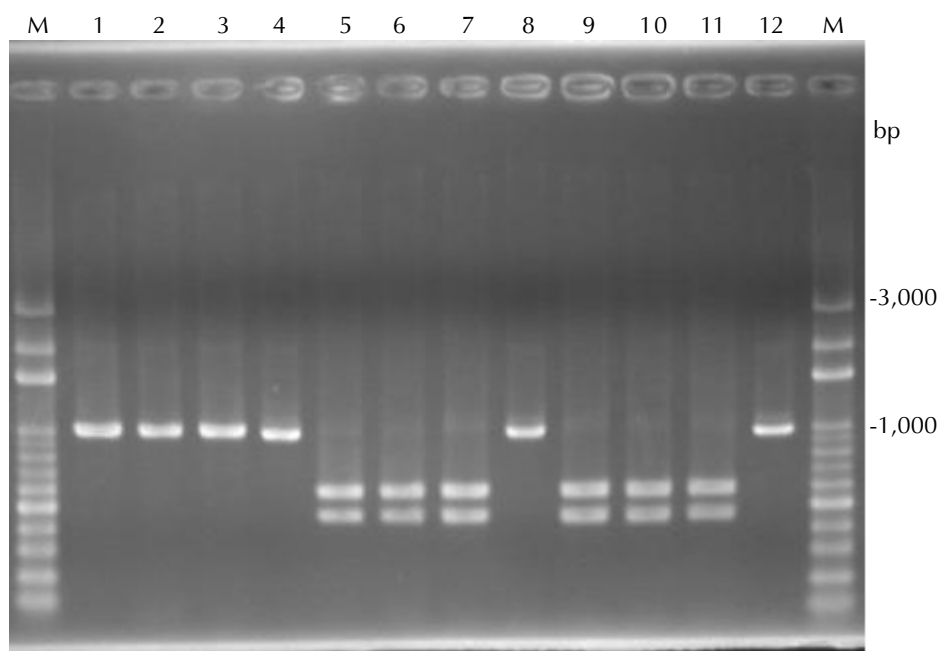


Fig. 3 Cleavage, with *Ava* II, of the amplified mitochondrial D-loop segment of red tilapia. 1~4: C03r; 5~8: C07r; 9~12: A07r; 4, 8, 12: controls (without digestions). M: 100bp DNA ladder marker.

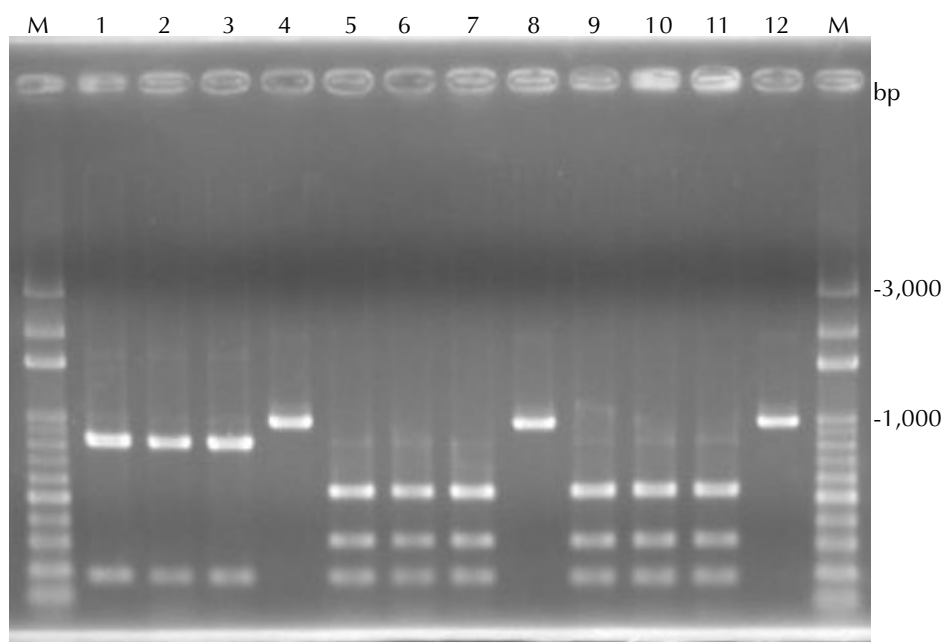


Fig. 4 Cleavage, with *Msp* I, of the amplified mitochondrial D-loop segment of red tilapia. 1~4: C03r; 5~8: C07r; 9~12: A07r; 4, 8, 12: controls (without digestions). M: 100bp DNA ladder marker.

繁殖子代在魚苗初期皆為白色，成長約五個月後，一共出現純紅、紅色具少數黑點、純白及白色具黑點等不同之體色組成 (Fig. 5)；黑點數量在 20 點以內，主要出現於體側上半部、眼眶或眼前上端等部位。本試驗雖然在同一天進行自然繁

殖工作，由於不同組別之仔魚出現時間及數量並不相同，所以在成長測定時，只比較同一組子代不同體色仔魚的體長與體重 (Table 3)。A07r 品系自交產生純紅及紅色具黑點子代，數量特別少，分別只有 13 尾及 14 尾（純紅與具黑點比例為



Fig. 5 Coloration of progeny. A: Pure red; B: Blotched red; C: White; Upper: ♀, Lower: ♂.

1.0 : 1.1), 兩種子代的平均體長與體重無顯著性差異 ($p > 0.05$)。C03r 品系自交產生純紅及紅色具黑點子代, 數量依序為 674 及 222 尾 (比例為 3.0 : 1.0), 兩種子代的平均體長與體重無顯著性差異 ($p > 0.05$); C03r 品系 (雌) 與 C07r 品系 (雄) 雜交產生純紅、紅色具黑點及白色子代, 數量依序為 417、320 及 182 尾 (比例為 2.3 : 1.8 : 1.0), 其中純紅及紅色具黑點子代的平均體長與體重無顯著性差異 ($p > 0.05$), 白色子代則不論是平均體長或體重都顯著低於前二類子代 ($p < 0.05$)。

Table 2 Haplotype diversity of mtDNA D-loop regions, amplified from A07r, C03r and C07r strains, respectively

Haplotype	A07r	C03r	C07r
AAAAAA		1.0	
AAABBA	1.0		1.0
No. of haplotype	1	1	1
Haplotype diversity (h)	0	0	0

Sample size for each strain is 8.

$h = (1 - \sum X_i^2) / n(n-1)$, X is the frequency of a haplotype and n is the sample size

討 論

本報告是台灣第一次應用生物技術比較台灣紅色吳郭魚品系之研究, 其中, 針對 A07r、C03r 及 C07r 等三種品系, 以 OPA07 及 OPA15 隨機引子增幅之 RAPD 電泳圖, 可以分辨出 C03r、C07r 品系及 A07r、C07r 品系之特定性片段。

在 A07r、C03r 及 C07r mtDNA D-loop 片段之差異性方面, A07r 與 C07r 品系 D-loop 序列完全

相同, C03r 品系具有獨特的序列。因 mtDNA 為母系遺傳, 所以 C03r 品系與其他二品系的差異應是有不同的母系遺傳來源所造成。另外, PCR-RFLP 分析 mtDNA D-loop 片段, 可以因限制酶切割片段之不同, 單獨鑑定出 C03r 品系; 也可以將前述 RAPD 尚未能鑑別的 A07r、C03r 品系予以區分。

A07r、C03r 及 C07r 品系都只有一種單套體, 遺傳變異均相當低。Romana-Eguia *et al.* (2004) 分析紅色吳郭魚五個品系的 mtDNA D-loop 片段, 發現都只有二種單套體存在, 單套體變異相當低, 在 0.183 ~ 0.499 之間, 作者認為原因是紅色吳郭魚不斷地被實施選種, 將白色、粉紅色或帶黑斑等魚體淘汰, 造成每一代之有效族群量 (effective population size) 受到限制, 也增加了親緣接近之個體一起繁衍子代之可能性。

紅色吳郭魚育種所遭遇之常見問題是無法純系繁殖 (breed true), 亦即: 表現型均為純紅 (pure red) 的親代, 其繁殖子代並非全部是純紅 (Wohlfarth *et al.*, 1990; Hussain, 1994; Garduño-Lugo *et al.*, 2004); 另外, 在幼魚期體表純紅之個體, 成長後不一定維持純紅, 例如可能會出現黑斑或若干黑點。經過多年來之培育, 本中心目前保育之紅色吳郭魚, 有純紅及紅色帶局部黑點等表現型。台灣紅色吳郭魚主要是莫三鼻克與尼羅魚之雜交種, 李與李 (1997) 之試驗結果顯示台灣紅色吳郭魚黑斑越多其成長越快, 推論可能是因為黑斑較多的個體來自尼羅吳郭魚遺傳基因之機率較高; 反之, 黑斑較少的個體來自莫三鼻克吳郭魚遺傳基因較高所致。本試驗中, 各組紅色子代與黑點子代之平均體重及體長無顯著性差異, 可能是因為即使有黑點之子代其體表僅有少數黑

Table 3 Mean body weight, body length and numbers in different patterns of crossbreeding progeny

Crossbreeding	Progeny						No. of pure red/ blotched red /white (ratio)
	Mean body weight (g)			Mean body length (cm)			
	Pure red	Blotched red	White*	Pure red	Blotched red	White*	
A07r × A07r	183.0 ^a	201.5 ^a		16.2 ^a	16.3 ^a		13/ 14 (1.0:1.1)
C03r × C03r	27.2 ^a	30.7 ^a		8.5 ^a	8.9 ^a		674 / 222 (3.0:1.0)
C03r × C07r	65.5 ^a	64.9 ^a	36.0 ^b	11.9 ^a	11.4 ^a	9.7 ^b	417/320/182 (2.3:1.8:1.0)

The sample size for measurement was 15, except group of A07r × A07r (13 for pure red and 14 for blotched red).

Same superscripts in the measurement per cross indicated no significant difference ($p > 0.05$).

*Including blotched white

點，沒有黑斑，外觀乍看之下與純紅無異，因此，兩者之遺傳基因可能差異不大。

三組育種試驗之結果以 C03r × C03r 自交子代之純紅比例最高，表現最佳，C03r × C07r 雜交子代之純紅比例則較低，所出現的白色子代，其平均體長與體重均顯著地比黑點子代或純紅子代低。白色子代生命力低，個體亦顯得瘦弱，通常在性成熟前即死亡，此與 Wohlfarth *et al.* (1990) 之結果相同。

紅色吳郭魚之產生「黑斑、黑點」(blotch) 的遺傳機制尚未清楚 (McAndrew *et al.*, 1988)。本試驗嚴格地將「純紅」定義在體表完全無黑點；McAndrew *et al.* (1988) 及 Hilsdorf *et al.* (2002) 認為黑色素面積不大於體表 24.6% 之紅色吳郭魚皆屬 blotched type；Hussain (1994) 則認為大於體表 10% 時即為 blotched type。若依照此標準，本研究之紅色子代黑點少，總面積顯然小於體表之 10%，都可稱為純紅色吳郭魚。

淡水繁養殖研究中心的台灣紅色吳郭魚從 1968 年起，在有限的數量與空間之條件下，不斷地被實施選種、繁殖及培育工作，遺傳變異情形難免偏低，也許可以從國外引進成長體型較大之單一種突變品系，例如 Stirling Red *O. niloticus*，以開發優良的新品種及增加紅色吳郭魚基因之多樣性。

謝 辭

本研究承淡水繁養殖研究中心同仁吳旻益、

周柏勳及張根彰先生在池魚管理及測定上之鼎力協助，得以順利完成，謹致謝忱。

參考文獻

- 郭河 (1979) 紅吳郭魚研究開發記實. 漁友, 2(6): 35-38.
- 郭河, 蔡添財 (1984) 紅色吳郭魚育種改良研究 – 紅色吳郭魚什交種性狀變異之探討. 台灣省水產試驗所試驗報告, 36: 55-67.
- 郭河, 蔡添財 (1990) 紅色吳郭魚育種改良研究 – 紅色吳郭魚什交種性狀變異之探討. 台灣省水產試驗所試驗報告, 48: 151-160.
- 李家樂, 李思發 (1997) 台灣紅羅非魚子代的體色分離及與生長繁殖相關的初步研究. 水產科技情報, 24: 65-69.
- 張湧泉, 簡茂盛, 賴仲義, 劉正義 (1999) 應用隨機增幅多型性去氧核糖核酸 (RAPD) 及聚合酶連鎖反應 – 限制酶切割片段多型性 (PCR-RFLP) 方法, 鑑別日本鰻 *Anguilla japonica*、美洲鰻 *A. rostrata* 與歐洲鰻 *A. anguilla*. 水產研究, 7(1&2): 11-24.
- 蔡添財 (2004) 穿上鮮艷亮麗彩衣的紅色吳郭魚. 水試專訊, 6: 34-35.
- Agnèse, J. F., B. Adépo-Gourène, E. K. Abban and Y. Fermon (1997) Genetic differentiation among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). Heredity, 79: 88-96.
- Angela, A. M., L. M. M. Heden and W. S. H. Alexandre (2005) Comparative growth performance of two Nile tilapia (Chitralada and Red-Stirling), their crosses and the Israeli tetra hybrid ND-56. Aqua. Res., 36: 1049-1055.

- Avtalion, R. R. and L. Reich (1989) Chromatophore inheritance in red tilapias. *Israeli J. Aqua.-Bamidgeh*, 41: 98-104.
- Bardakci, F. and D. O. F. Skibinski (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73: 117-123.
- Bernatchez, L. and R. G. Danzmann (1993) Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Mol. Biol. Evol.*, 10: 1002-1014.
- Garduño-Lugo, M., G. Muñoz-Córdova and M. Á. Olvera-Novoa (2004) Mass selection for red colour in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). *Aqua. Res.*, 35: 340-344.
- Hilsdorf, A. W. S., D. J. Penman, E. C. Farias and B. McAndrew (2002) Melanophore appearance in wild and red tilapia embryos. *Pigment Cell Res.*, 15: 57-61.
- Hussain, M. G. (1994) Genetics of body color inheritance in Thai and Egyptian red tilapia strains. *Asian Fish. Sci.*, 7: 215-224.
- Mather, P. B., S. N. Lai and J. Wilson (2001) Experimental evaluation of mass selection to improve red body colour in Fijian hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*). *Aqua. Res.*, 32: 329-336.
- McAndrew, B. J., F. R. Roubal, R. J. Roberts, A. M. Bullock and I. M. McEwen (1988) The genetics and histology of red, blond and associated colour variants in *Oreochromis niloticus*. *Genetica.*, 76: 127-137.
- Menezes, M. R., M. Ikeda and N. Taniguchi (2006) Genetic variation in skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* (L.) using PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. *J. Fish Bio.*, 68 (supplement A): 156-161.
- Popma, T. and M. Masser (1999) Tilapia life history and biology. SRAC publication No. 283.
- Rafael, Z., G. P. Amando and M. B. José (1995) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Mol. Evol.*, 41: 942-951.
- Romana-Eguia, M. R. R., M. Ikeda, Z. U. Basiao and N. Taniguchi (2004) Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, 236: 131-150.
- Wohlfarth, G. W., S. Rothbard, G. Hulata and D. Szweigman (1990) Inheritance of red body coloration in Taiwanese tilapias and in *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 84: 219-234.

Application of RAPD and PCR-RFLP on the Selective Breeding of Taiwanese Red Tilapia (*Oreochromis* sp.)

Yuon-Chuan Chang^{*}, Rong-Hwa Chen, Ke-Chuan Chang and Fu-Guang Liu

Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The A07r, C03r and C07r strains of Taiwanese red tilapia (*Oreochromis* sp.) stocked at Freshwater Aquaculture Research Center were discriminated and their genetic variations were analyzed by using RAPD and PCR-RFLP. Besides, breeding of A07r x A07r, C03r x C03r and C03r x C07r was carried out to obtain the pure red strain.

In regard of RAPD analysis, C03r strain could be distinguished from C07r strain by using OPA 07 random primer, and C07r strain could be distinguished from A07r strain by using OPA 15 random primer. In the use of PCR-RFLP analysis on the mtDNA D-loop region, C03r strain could be distinguished from A07r and C07r strains. Haplotype diversity of the mtDNA D-Loop region in A07r, C03r and C07r strains was 0, demonstrating a very low genetic variation within the strain.

In breeding, all fry were white. Their color changed as they grew up. After five-month growing period, the crosses of A07r × A07r yielded two types of progeny-pure red and blotched red patterns, but their mean body weight and body length were not significantly different ($p > 0.05$). There was a similar result in the crosses of C03r × C03r. However, the crosses of C03r × C07r yielded three types of progeny as pure red, blotched red and white ones. The mean body weight and body length between pure red and blotched red types was not significantly different ($p > 0.05$), while white-type progeny had lower mean body weight and body length as compared to pure red and blotched red types ($p < 0.05$). Since the growth of pure and blotched red progeny was not significantly different within each breeding group, and the blotched red type had only a few blotches, it was speculated that there was little difference of genetic factors between these two types.

Key words: Taiwanese red tilapia, marker-assisted selection (MAS), RAPD, PCR-RFLP, genetic variation

^{*}Correspondence: Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute, 106 Hai-Pu, Lukang 50562, Taiwan. TEL: (04) 777-2175; FAX: (04) 777-5424; E-mail: yungchuan@mail.fwlrk.tfrin.gov.tw