

利用 RAPD 分析台灣東部養殖及野生九孔的遺傳變異

曾福生* · 周賢鏘 · 朱惠真 · 余俊欣 · 盧民益 · 林金榮

行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

摘 要

本研究旨在利用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技術針對 7 個不同來源的九孔，進行遺傳變異分析。受試九孔分別購自台東縣 (TC1 和 TC2) 與宜蘭縣的養殖場 (YC1、YC2 和 YC3) 以及於花蓮縣的水璉、磯碇 (HW1) 和鹽寮 (HW2) 附近海域捕獲的野生九孔。篩選 6 條 (p3、p5、p7、p8、p9 及 p12) 產物清楚且重覆性高的逢機引子，共檢測出 61 條擴增條帶。

在養殖九孔部分，除了 YC3 場外，其他 4 場的等位對偶基因個數 (na) 為： $1.8033 \pm 0.4008 \sim 1.8852 \pm 0.3214$ ；有效的等位對偶基因個數 (ne) 為： $1.5023 \pm 0.3524 \sim 1.6469 \pm 0.3423$ ；基因歧異度 (h) 為： $0.2927 \pm 0.1830 \sim 0.3599 \pm 0.1638$ ；遺傳多樣性指數 (I) 為： $0.4360 \pm 0.2522 \sim 0.5233 \pm 0.2210$ ；多型性擴增帶數 (nL) 49 ~ 54 及多型性擴增帶比率 (pL) 達 80.33 ~ 88.52%。至於野生九孔部分，其 na = $1.8689 \pm 0.3404 \sim 1.9508 \pm 0.2180$ ；ne = $1.6677 \pm 0.3456 \sim 1.7397 \pm 0.2846$ ；h = $0.3659 \pm 0.1717 \sim 0.4048 \pm 0.1298$ ；I = $0.5268 \pm 0.2356 \sim 0.5823 \pm 0.1703$ ；nL = 53 ~ 58 及 pL = 86.89 ~ 95.08%。

經由上述結果及未加權算數平均法 (unweighted pair group method analysis, UPGMA) 求得相似性係數之數值矩陣，可將九孔分成台東、花蓮和宜蘭三群，其中花蓮野生九孔的遺傳變異、基因多型性及等位基因個數均明顯大於養殖九孔。

關鍵詞：九孔、逢機引子、遺傳變異、未加權算數平均法、等位基因

前 言

台灣的九孔養殖已經有 30 餘年的歷史，最早係於海中以竹籠蓄養 (林, 1964)，自從人工繁殖成功以來 (陳與楊, 1979)，種苗的供應充足，漁民開始大量開鑿海邊潮間帶做為養殖池，結果對台灣東北角珍貴的岩岸資源以及生態環境造成相當大的衝擊。政府為因應解決，除了強制拆除違法養殖池外，另一方面則責成農委會水產試驗所研發新的養殖方法，同時建議業者轉往東、南部地區發展。然而由於南部之天候條件不太適合九孔生長，加上沒有好的地點，所以業者的轉移意願始終不高，因而使得九孔養殖的發展暫告停頓，

其價格在供不應求下，於 1979 年飆升至每台斤 800 元。水試所在各界殷切盼望下，台南分所於 1985 年開發成功「陸上池九孔單層養殖法」，接著又研發改良為「陸上池深水立體式養殖法」 (楊與丁, 1989)，帶動九孔養殖事業的蓬勃發展，產量開始逐年增加，2001 年的年產量高達 2,497 mt，產值約新台幣 20 億元。然而自 2002 年起，台灣各地的繁殖場紛紛發生九孔附苗後，快者 1 個星期，慢者約在 1 個月內，幼苗變白脫落現象，造成業者重大損失。九孔養殖產業也因無法獲得足夠的種苗放養而大幅衰退。

台灣九孔養殖所需種苗均來自國內的繁殖場，人工苗年產量達 2 ~ 3 億個。業者繁殖所需之種貝，多半是由自家場中挑選成長快、外形佳者再分池培育而成，1 ~ 2 年繁殖一代，至 2002 年發生落板死亡問題，估計已近親交配約 20 代，潛伏著等位基因流失及遺傳變異降低的問題。

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02)2463-3101; FAX: (02)24628138; E-mail: fstseng@mail.tfrin.gov.tw

Table 1 Nucleotide sequences of six random primers, number of amplified bands, and molecular weight (MW) shown in the RAPD analysis in *H. diversicolor*

Primer	Sequences of primer	Total bands	Molecular weight (kb)
P3	GACCGCTTGT	9	1.0; 0.85; 0.8; 0.65; 0.59; 0.53; 0.4; 0.37; 0.26
P5	CAAACGTCGG	10	1.1; 0.93; 0.85; 0.8; 0.73; 0.68; 0.6; 0.31; 0.28; 0.2
P7	AGACGTCCAC	7	0.95; 0.81; 0.71; 0.6; 0.5; 0.45; 0.3
P8	TGTAGCTGGG	11	1.35; 1.2; 0.92; 0.8; 0.76; 0.64; 0.6; 0.5; 0.44; 0.35; 0.3
P9	AATGGCGCAG	11	1.3; 1.1; 0.9; 0.85; 0.7; 0.6; 0.55; 0.5; 0.4; 0.35; 0.3
P12	CCGCCTAGTC	13	1.1; 0.92; 0.84; 0.72; 0.66; 0.58; 0.55; 0.51; 0.47; 0.4; 0.36; 0.28; 0.22

養殖水產生物因近親繁養殖造成遺傳變異的降低已被多方面報導。魚類方面有鱒魚 (Allendorf and Phelps, 1980)、鮭魚 (Hansen *et al.*, 1997)、比目魚 (Exadactylos *et al.*, 1999); 貝類方面有牡蠣 (Hedgecock *et al.*, 1990)、扇貝 (Blake *et al.*, 1997)、耳鮑 (*Haliotis asinina*) (Selvamani *et al.*, 2000)、澳洲鮑 (*H. rubra*)、南非鮑 (*H. midae*) (Evans *et al.*, 2004) 及盤鮑 (*H. discus hannai*) (Sekino *et al.*, 2005) 等。又人工繁養殖時因選種育種方法不正確, 導致族群過小而引發近親交配問題, 則造成隱性的有害對偶基因 (deleterious alleles) 的累積, 影響子代的活存率 (Palti *et al.*, 2003; McCune *et al.*, 2004)。

台灣目前有關九孔族群遺傳結構的研究鮮少, 僅有 Jiang *et al.* (1995) 利用粒線體比較台北縣鼻頭角、台東縣成功和宜蘭縣頭城產九孔的遺傳距離。本研究應用 RAPD 標記技術檢視台東、宜蘭兩地區養殖九孔及花蓮地區兩個野生群之遺傳變異, 從基因層次比較各族群間的遺傳變異, 探討養殖族群遺傳變異情形, 作為九孔種源資源的管理及利用, 提供基礎資料和科學依據。

材料與方法

一、九孔樣本

(一) 養殖九孔

1. 購自位於台東縣成功 (TC1) 與胆曼 (TC2) 之養殖場, 樣本數分別為 34 個及 40 個。
2. 來自宜蘭縣頭城鎮的三家九孔繁養殖場

(YC1、YC2、YC3), 樣本各 37、37、31 個, 其中 YC3 近親育種 7 個世代以上。

(二) 野生九孔

自花蓮縣水璉、磯碯海域 (HW1) 和鹽寮海域 (HW2) 捕獲, 各 30 個。花蓮縣從花蓮溪以南至磯碯海岸之間從未設立任何九孔繁養殖場, 是野生貝的重要來源之一。

二、RAPD引子

委請國內生技公司訂製合成 100 條的隨機引子。以 YC3 所養殖九孔純化而來的體基因組 DNA 作為模板, 經由 PCR 反應, 篩選出 6 條產物可清楚辨識且再現性高的引子。以此 6 條引子分別對 TC1、TC2、YC1、YC2、YC3、HW1 及 HW2 等 7 個族群的九孔, 共 239 個樣本進行分析, 引子序列如 Table 1 所示。

三、基因組DNA的萃取

每個樣本來自九孔腹足肌肉組織 0.2 mg, 加入 500 μ L lysis buffer (50mM Tris-HCl [pH 7.5]、10 mM EDTA、0.5 % SDS、500 μ g/mL proteinase k) 均質, 以滅菌紗布過濾後置於 55 $^{\circ}$ C 下保溫輕搖消化 24 hrs, 加入等量之 phenol-chroform 反覆均勻 20 次, 於 4 $^{\circ}$ C 下以 12100 $\times$ g 離心 5 mins, 吸取上清液, 加入 6 倍無水酒精, 置於 -70 $^{\circ}$ C 沉澱 24 hrs 後, 於 4 $^{\circ}$ C 下以 12100 $\times$ g 離心 20 mins, 取沉澱物, 再加入 100 μ L 70% 酒精, 於 4 $^{\circ}$ C 下以 12100 $\times$ g 離心 5 mins, 沉澱物陰乾後溶於 20 μ L TE buffer 中, 檢測 DNA 的濃度 (Sambrook *et al.*, 1989), 將此

DNA 置於 -20°C 儲藏備用。

四、聚合酶連鎖反應

取 DNA 樣品進行聚合酶連鎖反應。每管反應物含有模版 DNA 樣品 $1.0\ \mu\text{L}$ 、 $2\ \mu\text{L}$ primer ($10\ \mu\text{M}$)、 $0.5\ \mu\text{L}$ dNTP ($10\ \text{mM}$)、 $1.0\ \mu\text{L}$ MgCl_2 (30mM)、 $0.5\ \mu\text{L}$ DNA polymerase ($100\ \text{U}/\mu\text{L}$) 和無菌水 $15.0\ \mu\text{L}$ ，使之最後反應總體積為 $20\ \mu\text{L}$ 。置於 PCR 反應器中 (GeneAmp PCR System 2400)，反應流程為：於 94°C 預先變性 15 mins；接著進行 30 週期反應，每週期依序有變性 (denature)、煉合 (annealing) 及延長 (enlongation) 三個反應，各反應之溫度及時間分別為 94°C 、45 secs； 42°C 、45 secs 及 72°C 、30 secs；最後於 72°C 下延伸 10 mins。擴增產物於 4°C 儲藏備用。

五、瓊脂膠電泳觀察

取 $20\ \mu\text{L}$ 的 DNA PCR 擴增產物與 $2\ \mu\text{L}$ $6\times$ loading dye 和 $5\ \mu\text{L}$ TE buffer 混合後取 $10\ \mu\text{L}$ 注入於 1% agarose gel (溶解於 $1\times$ TE buffer) 樣本槽中，於電壓 100 伏特下電泳分析，經溴化乙啶 (EtBr) 染色後於 UV 燈下顯影，再由 Bio Imaging System 影像分析系統 (SYNGENE, UK) 觀察和拍照。

六、資料分析

以 Bio Imaging System 影像分析系統中 GENE TOOLS 分析軟體判讀照片檔，將擴增條帶轉換為 0 和 1 數據，同分子量位置出現擴增條帶記為 1，未出現者記為 0，再將 (0、1) 數組輸入計算機中，以 POPGENE v.1.31 (Yeh *et al.*, 1997) 生物分析軟體進行處理。將 RAPD 標記作為遺傳變異的計算基礎，計算各族群的多型性擴增條帶比率 (pL)、族群內之遺傳多樣性值和族群間的遺傳距離等。其計算方法為：

多型性擴增條帶比率 (pL) = 多型性擴增條帶數 / 擴增總條帶數

個體間相似性指數 (S_{xy}) = $2N_{xy} / (N_x + N_y)$ (Lynch and Milligan, 1994)

遺傳多樣性值 (D) = $1 - S_{xy}$

群體間相對遺傳距離 (D_{ij}) = $-\ln(S_{ij} / S_i S_j)^{1/2}$ (Nei, 1987)

S_{xy} 個體間相似性指數，其中 N_{xy} 是個體 x 和個體 y 共有的條帶數； N_x 和 N_y 分別為個體 x 和個體 y 所擴增出的條帶數。族群內的相似性指數代表此族群內所有個體間相似性指數的平均值，族群間的相似性指數則為兩族群中任意兩個體的相似性指數的平均值， D_{ij} 為群體間相對遺傳距離， S_{ij} 為兩族群間的相似性指數； S_i 和 S_j 則代表族群 i 和族群 j 的相似性指數 (Nei, 1972, 1973)。Shannon 信息指數依據公式 $I = -\sum a_i \ln a_i / N$ 計算，其中 a_i 為某一條帶在族群中出現的頻率， $\ln$ 為自然對數，N 為族群總條帶數 (Wachira *et al.*, 1995)。

族群總基因多樣性 (Ht) 為族群內基因多樣性 (Hs) 和族群間基因多樣性 (Dst) 之總和，亦即 $Ht = Hs + Dst$ ， $Dst = Ht - Hs$ 。遺傳分化指數為族群間基因多樣性和族群總基因多樣性之比值，亦即 $Gst = Dst / Ht = (Ht - Hs) / Ht$ 。 $Ht = 1 - \sum a_i^2$ ， $Hs = \sum (1 - \sum a_i^2) / N$ ，其中 a_i 為某一條帶在族群中出現的頻率，N 為總條帶數。

結 果

一、RAPD擴增電泳結果

本研究從 100 個隨機引子篩選出產物清楚且重覆性高的引子 6 條 (p3、p5、p7、p8、p9、p12)，以這 6 條引子檢測 7 個 (TC1、TC2、YC1、YC2、YC3、HW1、HW2) 來源不同的養殖和野生九孔族群，經由 GENE TOOLS 軟體分析各引子之擴增帶，結果 p3 有 9 條擴增帶，p5 有 10 條，p7 有 7 條，p8 和 p9 有 11 條，p12 有 13 條，總共有 61 條擴增帶，擴增帶長度分子量如 Table 1。

以 p3 引子為例，檢測養殖和野生九孔的瓊脂膠電泳帶型，結果顯示養殖九孔的擴增電泳帶數量明顯少於野生九孔 (Fig. 1A & B)，顯示野生的九孔個體及族群間的多型性明顯的高於養殖九孔。野生九孔群除了三條主要擴增帶 (1.0kb、0.8kb、0.65kb) 外，尚有為數不少的其他擴增帶 (Fig. 1A)，但養殖九孔群則只有上述三條主要擴增帶，其他擴增帶稀少甚至沒有 (Fig. 1B)。擴增帶的有無會直接影響等位對偶基因，所以經由 6 條引子檢測結果，除 YC3 場外，等位對偶基因個

數(na) 介於 $1.8033 \pm 0.4008 \sim 1.9508 \pm 0.2180$ 之間,有效的等位對偶基因個數 (ne) 介於 $1.5023 \pm 0.3524 \sim 1.7397 \pm 0.2846$ 之間,野生九孔族群皆

比養殖者為高 (Table 2)。其中 YC3 場的養殖九孔,多年來自繁自養的結果,其 na 及 ne 皆降至 1.0000 ± 0.0000 ,已有基因流失的現象。

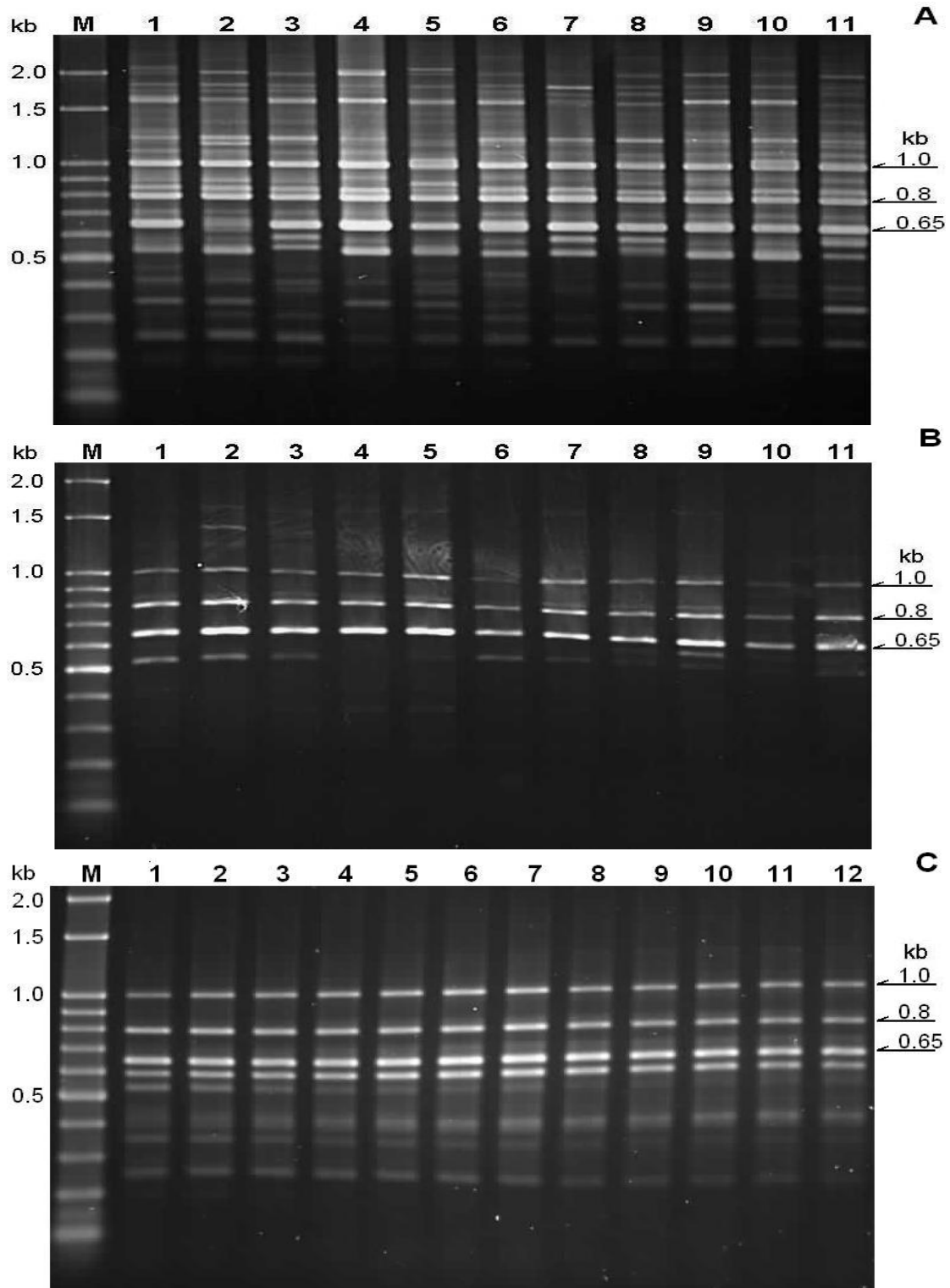


Fig. 1 RAPD patterns using primer P3. Column lane M: 100 bp DNA ladder; (A) lanes 1-11 individuals from wild; (B) lanes 1-11 individuals from domestic hatchery; (C) lanes 1-12 individuals from TC2 (wild crossed with domestic). Arrows indicate the bands that were always found on small abalone from the eastern Taiwan.

Table 2 POPGENE analysis of genetic variation of the *H. diversicolor*

Pop.	Sample size	Observed number of alleles (na $\pm$ sd)	Effective number of alleles (ne $\pm$ sd)	Genetic diversity (h $\pm$ sd)	Shannon's Information Index (I $\pm$ sd)	Total polymorphic loci (nL)	Percentage of polymorphic loci (pL%)
TC 1	34	1.8033 $\pm$ 0.4008	1.5457 $\pm$ 0.3521	0.3134 $\pm$ 0.1803	0.4609 $\pm$ 0.2519	49	80.33
TC 2	40	1.8852 $\pm$ 0.3214	1.6469 $\pm$ 0.3423	0.3599 $\pm$ 0.1638	0.5233 $\pm$ 0.2210	54	88.52
YC 1	37	1.8361 $\pm$ 0.3733	1.5023 $\pm$ 0.3524	0.2927 $\pm$ 0.1830	0.4360 $\pm$ 0.2522	51	83.61
YC 2	37	1.8525 $\pm$ 0.3576	1.5152 $\pm$ 0.3795	0.2939 $\pm$ 0.1898	0.4366 $\pm$ 0.2570	52	85.25
YC 3	31	1.0000 $\pm$ 0.0000	1.0000 $\pm$ 0.0000	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.0000 $\pm$ 0.0000	0	0.00
HW 1	30	1.9508 $\pm$ 0.2180	1.7397 $\pm$ 0.2846	0.4048 $\pm$ 0.1298	0.5823 $\pm$ 0.1703	58	95.08
HW 2	30	1.8689 $\pm$ 0.3404	1.6677 $\pm$ 0.3456	0.3659 $\pm$ 0.1717	0.5268 $\pm$ 0.2356	53	86.89
Total	239	2.0000 $\pm$ 0.0000	1.6970 $\pm$ 0.2752	0.3928 $\pm$ 0.1143	0.5745 $\pm$ 0.1352	61	100

二、遺傳多樣性分析

(一) 養殖九孔群間的比較

五個養殖九孔族群遺傳多樣性分析的結果如 Table 2。除了 YC3 養殖場外，其他 YC1、YC2、TC1、TC2 等四場之九孔的基因歧異度 (h) 遺傳多樣性指數 (I) 分別介於 $0.2927 \pm 0.1830 \sim 0.3599 \pm 0.1638$ 及 $0.4360 \pm 0.2522 \sim 0.5233 \pm 0.2210$ 之間，其順序為 TC2 > TC1 > YC2 > YC1，顯示台東地區的養殖九孔之基因歧異度及遺傳多樣性均高於宜蘭地區。另，在 nL 及 pL 方面，除了 YC3 場外，其餘四場分別介於 49 ~ 54 及 80.33 ~ 88.52% 之間，地區間的差異不大，但場間的差異顯著。

(二) 野生九孔族群間的比較

二個野生九孔族群的遺傳多樣性分析結果如 Table 2。於花蓮縣水璉、磯崎海域 (HW1) 和鹽寮海域 (HW2) 捕獲的野生九孔族群的 h 及 I 分別介於 $0.3659 \pm 0.1717 \sim 0.4048 \pm 0.1298$ 及 $0.5268 \pm 0.2356 \sim 0.5823 \pm 0.1730$ 之間，其中 HW1 又較 HW2 為高。至於 nL 及 pL 方面，則介於 53 ~ 58 及 86.89 ~ 95.08% 之間，兩者差異顯著，同樣也是水璉、磯崎海域之野生九孔高於鹽寮海域者。

(三) 養殖和野生九孔族群間的比較

野生九孔群之 h 與 I 都稍高於養殖群，但在 nL 及 pL 上，養殖九孔中的 TC2 組則高於 HW2 組。養殖九孔中，YC3 組之 h、I、nL 及 pL 等四項數值皆為零 (Table 2)，顯示該養殖場之九孔基因型皆為純合，有明顯的近交現象。在平均遺傳

變異 (Hs) 和平均分化程度 (Gst) 方面，養殖九孔的 Hs 為 0.2520 ± 0.0112 ，低於野生九孔的 0.3853 ± 0.0187 ；Gst 為 0.312，則遠高於野生九孔的 0.0394，顯示野生九孔族群具有較高的遺傳多樣性，沒有地理或生殖隔離等分化現象。反之，養殖九孔在各養殖場之間已有明顯的人為選汰而造成分化現象，其中尤以 YC3 最為明顯。

三、遺傳距離及類群分析

比較各場的遺傳相似度及遺傳距離 (Table 3)，七個來源不同的九孔族群以 TC1 及 TC2 的相似度最高，達 0.965；HW1 及 HW2 次之，為 0.959；YC3 和 TC2 最小，為 0.676。除了 YC3 外，其餘各場的遺傳距離均在 0.0354 ~ 0.1943 之間；其中，TC1、TC2 及 HW2 在 0 ~ 0.0415 之間，YC3 和其他各場在 0.2168 ~ 0.3920 之間。

利用 UPGMA 類群分析譜系圖分析 7 個不同來源之九孔的遺傳相關性 (Fig. 2)，結果可知，TC1、TC2 兩組九孔的遺傳距離為 0.0354；HW1、HW2 為 0.0415；YC1、YC2 為 0.0440。若以地區來分，台東和花蓮兩地區間約為 0.10，台東和花蓮歸群後和宜蘭地區間約為 0.15，其中又和 YC3 者的遺傳關係最遠，約 0.31。

討 論

RAPD 的分析標的是以對偶基因的顯性標記為主，因此用以分析群族的基因標誌時有兩個關鍵：

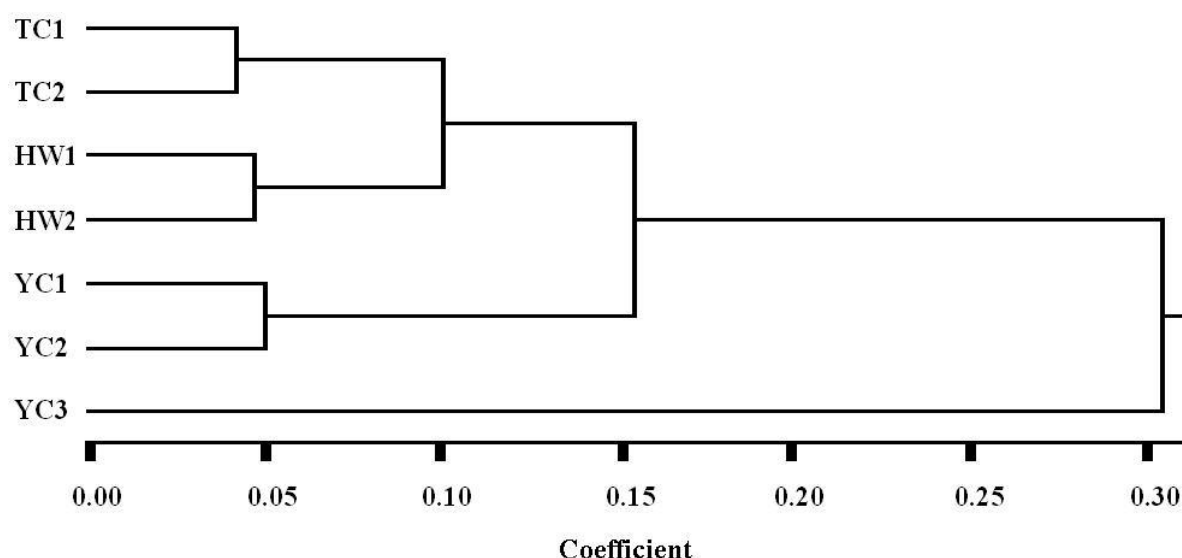


Fig. 2 UPGMA dendrogram showed the relationship among small abalones obtained from five domestic hatcheries and two wild samples from Hau-lien.

Table 3 Similarity coefficients, Nei's genetic identity (above diagonal), and genetic distance (below diagonal), for the domestic hatchery and the wild samples of *H. diversicolor* using RAPD analysis

	TC 1	TC 2	YC 1	YC 2	YC 3	HW 1	HW 2
TC 1	****	0.9652	0.8234	0.8319	0.7295	0.8807	0.9039
TC 2	0.0354	****	0.8470	0.8580	0.6757	0.9115	0.9312
YC 1	0.1943	0.1660	****	0.9570	0.8051	0.9294	0.8461
YC 2	0.1841	0.1531	0.0440	****	0.7640	0.9219	0.8406
YC 3	0.3155	0.3920	0.2168	0.2692	****	0.7651	0.7128
HW 1	0.1270	0.0927	0.0732	0.0813	0.2678	****	0.9593
HW 2	0.1010	0.0713	0.1671	0.1736	0.3385	0.0415	****

一、篩選適用的逢機引子

以 RAPD 擴增顯性基因，係使單一或許多量的對偶基因，在低溫 (37~42°C) 條件下發生鏈合作用 (annealing)，其會左右 PCR 產物的穩定性，進而影響電泳條帶的再現性，所以需要大量篩選適用的引子。

二、受檢測樣本的新鮮度

因 PCR 檢測靈敏度高，僅需少量樣本，所以確採取樣及保存過程不受污染及自家消化至為重要，尤其是海洋生物，因自家消化速率快，再加

上溫度的變化，常會影響體基因組 DNA 的完整性，導致 PCR 的檢測結果失真。

Lynch and Milligan (1994) 認為以顯性標誌來評估不同族群的遺傳變異時，常會受到樣本數多寡的影響。O'Brien *et al.* (1996) 與 Nei (1987) 同時指出，在體基因組的非編碼區的序列核苷酸取代率是編碼區的兩倍；Charlesworth *et al.* (1994) 則發現，非編碼區內之重覆性序列具有大量重覆重組的突變序列以及不符合孟德爾遺傳定律的序列，其經再重組後所產生之不規則的重組序列，有較高的多型性，因此以 RAPD 作為遺傳歧異度或親緣鑑定的工具，會比使用來自編碼區的同功酶 (allozyme) 基因座更具效率與正確性。



Fig. 3 Two-week-old larvae obtained from YC3 appeared the retarded growth (as indicated by arrows) due to inbreeding.

Hirschfeld *et al.* (1999) 利用 RAPD 技術比較一個養殖和四個野生牡蠣 (*Crassostrea virginica*) 族群的遺傳多樣性，顯示野生族群的多型性擴增帶比率達 74%，明顯高於養殖族群的 54%，Tassanakajon *et al.* (1995) 利用 6 條具再現性的 RAPD 引子，分析泰國不同海域的野生草蝦族群的遺傳變異。本研究之九孔的多型性擴增帶比率，同樣以野生群為高，尤其 2002 ~ 2004 年間，九孔大量落苗、繁殖困難時，在宜蘭地區 YC3 養殖場採集的九孔樣本，其 n_a 及 n_e 皆為 1.0000 ± 0.0000 ， h 、 I 、 nL 及 pL 數值則均為零。另亦發現，該段期間內宜蘭地區之養殖場所繁殖的九孔幼苗發生齒舌缺陷以及成長退化現象的比例高達 40% 左右 (Fig. 3)。

養殖九孔的遺傳變異之所以下降，與業者的繁殖習慣有極為密切的關連。在九孔繁殖過程中，雌雄種貝的配對比約 20:1，所以人工培育的九孔很容易發生瓶頸效應 (bottle neck effect)，導致遺傳變異逐代下降。這種因為人為操作造成遺傳多樣性及基因歧異度下降，進而影響生物的生長率、抗病力、子代的活存率和繁殖率等，普遍見於所有人工繁養殖的物種，例如草蝦 (Garcia and Benzie, 1995) 與白蝦 (Alcivar-Warren *et al.*, 1997) 等。從 Fig. 1 可以清楚的看出，即使以野生貝和養殖貝配對，使其子代的擴增帶介於兩親之

間，但子代的擴增帶的態樣仍然相當一致，個體間的差異小，不像其親代的野生貝的多態性。此意味著並非所有的野生貝都可以成功的繁衍下一代，子代的基因頻率有時會偏離均值，若沒有適度修正，往往造成基因流失，這也代表人工培育的幼苗遺傳變異流失之危機更為嚴重。目前在牡蠣 (Hedgecock and Sly, 1990)、扇貝 (Blake *et al.*, 1997)、鮑魚 (Li *et al.*, 2004)、鮭魚 (Hansen *et al.*, 1997; Norris *et al.*, 1999)、比目魚 (Exadactylos *et al.*, 1999) 都已發現類似的現象。

分析台東及宜蘭地區的養殖九孔及花蓮地區的野生九孔族群，結果顯示，無論在遺傳多樣性指數或基因歧異度方面，都以花蓮地區的野生九孔較高。至於各場之養殖九孔的 H_s 為 0.2520 ± 0.0112 ， G_{st} 為 0.312，顯示各場之養殖九孔間已有明顯的分化現象，其中以 YC3 最為明顯。而捕自花蓮縣的鹽寮、水璉和磯碇海域的野生九孔，其 H_s 為 0.3853 ± 0.0187 、 G_{st} 達 0.0394，顯著低於養殖九孔的 0.312，顯示花蓮縣的野生九孔分化程度低，平均遺傳變異大於養殖九孔，同時也反應出鹽寮、水璉和磯碇海域雖然相距約 8 ~ 11 公里，但其九孔的繁殖季節一致，配對較為隨機，沒有地理和生殖隔離。Sokal and Oden (1978) 指出自然界的族群分化模式有四種：(一) 隨環境

的梯度變異呈現漸層式的族群分化；(二) 不同生態環境所造成的族群分化；(三) 地理隔離造成的族群分化；(四) 因生長發育過程不同步，成熟期不同所致。

根據各組九孔的遺傳相似性與親緣關係，以 Nei (1978) UPGMA 歸群分析結果如 Fig. 2 所示。除了 YC3 自成一品系外，其餘皆以地區歸群，儘管 TC1、TC2 同屬台東地區，但其遺傳變異比宜蘭地區的 YC1、YC2 及 YC3 來得大。TC1 場的種貝皆為養殖貝，每年固定將部分的九孔苗移至東北角的海底池放養，待其成長後，再挑選適當者當種貝，因此遺傳變異小；TC2 場的九孔是由養殖貝和來自花蓮鹽寮海域，及水璉、磯碯海域的野生貝繁殖而來，因此遺傳變異較大，這也是 HW2 和 TC2 這兩群的遺傳變異相近的主要原因。另，因為 TC1 和 TC2 兩場偶爾會彼此就近交換種貝，以致於本研究之台東地區的養殖九孔與花蓮海域的野生九孔親緣關係較為相近。Jiang *et al.* (1995) 從九孔的粒線體基因組的 *Kpn* I 和 *Hind* III 核酸限制酵素圖譜，分析台北縣鼻頭角、宜蘭縣頭城、花蓮縣磯碯、台東縣成功野生九孔及宜蘭的養殖九孔，可分為 A、B 及 C 三型圖譜，將鼻頭角和磯碯、成功歸為一群，同屬 A 型；宜蘭（養殖九孔）和頭城歸為另一群，屬 B 及 C 型，但 B 及 C 型非常相似無法區隔，其中鼻頭角和成功所有樣本，磯碯 12 個樣本中有 9 個 A 型，宜蘭 12 個樣本中 11 個 B 型，1 個 C 型，頭城 12 個樣本中 6 個 B 型，6 個 C 型，磯碯樣本中有 3 個 B 型。九孔大致可分為花蓮台東地區和宜蘭地區兩個族群，結果和本研究相似。上述九孔的粒線體基因組的酵素圖譜分析，並無法區分同屬 A 型，但來自鼻頭角、磯碯和成功三個地區的野生九孔。而本研究以 RAPD 方法即可區別花蓮鹽寮海域，及水璉、磯碯海域的野生貝，甚至可區別同宜蘭地區養殖場間的差異。

遺傳變異隨著近親繁殖而下降，在自然界因族群大且配對隨機，所以遺傳變異相當穩定。但人工繁殖時，因為野生種貝無論在取得、活存、催熟與產卵量等方面都不易控制，在經濟及效率考量下，業者使用野生種貝的意願低，而往往大量使用容易取得的養殖種貝，再加上繁殖時雄貝量少的瓶頸效應，遺傳變異隨著近親繁殖而下降

可說是必然的結果。因此，究竟該如何取得平衡是相當重要的。本研究利用 RAPD 分析目前養殖及野生九孔的遺傳結構及基因頻率，作為配種的參考，藉以防止近親繁殖的惡化，相信能有助於九孔養殖產業榮景的恢復與未來的發展。

謝 辭

本研究得以順利完成，承蒙台東縣成功鎮九孔養殖業者翁進益，長濱鄉新東洋何金隆以及宜蘭縣竹田李啟銘等先生熱心提供九孔樣本，特此誌謝。

參考文獻

- 丁雲源、楊鴻禧 (2003) 九孔種苗生產及病蟲害防治。水產試驗所特刊, 1: 1-79.
- 李國誥 (2002) 養殖九孔苗與稚貝感染細菌性疾病與附着之相關研究。行政院農業委員會漁業署91年度科技研究計畫研究報告, 91農科-2.5.3-漁-F1(2).
- 林書荻 (1964) 九孔之蓄養調查及低溫乾燥試驗。中國水產, 138: 13-16.
- 陳弘成、楊鴻禧 (1979) 九孔 (*Halotis diversicolor* supertext) 之人工繁殖。中國水產, 314: 3-9.
- 張本恆 (2003) 養殖九孔苗死亡原因初步調查。水產試驗所特刊, 1: 41-45.
- 楊鴻禧、丁雲源 (1989) 九孔陸上多層式養殖方法之研究。台灣省水產試驗所試驗報告, 48: 209-216.
- Alcivar-Warren, A., R. M. Overstreet, A. K. Dhar, K. Astrofsky, W. H. Carr, J. Sweeney and J. M. Lotz (1997) Genetic susceptibility of culture shrimp *Penaeus vannamei* to infection hyperdermal and hematopoietic necrosis virus and Baculovirus penaei: possible relationship with growth and metabolic gene expression. J. Invertebr. Pathol., 70: 190-197.
- Allendorf, F. W. and S. R. Phelps (1980) Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. Trans. Am. Fish. Soc., 109: 537-543.
- Blake, S. G., N. J. Blake, M. J. Oesterling and J. E. Graves (1997) Genetic divergence and loss of diversity in two cultured populations of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). J. Shellfish Res., 16: 55-58.
- Charlesworth, B., P. Sniegowski and W. Stephan (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature, 371: 215-220.
- Evans, B., J. Bartlett, N. Sweijid, P. Cook and N. G.

- Elliott (2004) Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture*, 233: 109–127.
- Exadactylos, A., A. J. Geffen and J. P. Thorpe (1999) Growth and genetic variation in hatchery-reared larval and juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture*, 176: 209–226.
- Garcia, D. K. and J. A. H. Benzie (1995) RAPD markers of potential use in penaeid prawn *Penaeus monodon* breeding programs. *Aquaculture*, 130: 137–144.
- Hansen, M.M., Mensberg, K.D., Rasmussen, G. and Simonsen, V. (1997). Genetic variation within and among Danish brown trout (*Salmo trutta* L.) hatchery strains, assessed by PCR–RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Aquaculture* 153, 15–29.
- Hedgecock, D. and F. Sly (1990) Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 88: 21–38.
- Hirschfeld, B. M., A. K. Dhar, K. Rask, and A. Alcivar-Warren (1999) Genetic diversity in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, from Massachusetts using the RAPD technique. *J. Shellfish Res.*, 18: 121–125.
- Jiang, L., W. L. Wu and P. C. Huang (1995) The mitochondrial DNA of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor* Reeve, 1846 (Gastropoda: Archaeogastropoda: Haliotidae). *Mol. Mar. Bio. Biotechnol.*, 4: 353–364.
- Li, Q., C. Park, T. Endo and A. Kijima (2004) Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture*, 235: 207–222.
- Lynch, M. and B. G. Milligan (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD marker. *Mol. Biol.*, 3: 91–99.
- McCune, A. R., D. Houle, K. McMillan, R. Annable and A. Kondrashov (2004) Two classes of deleterious recessive alleles in a natural population of zebrafish, *Danio rerio*. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 271: 2025–2033.
- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283–292.
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70: 3321–3323.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 19: 583–590.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press, 257pp.
- Norris, A. T., D. G. Bradley and E. P. Cunningham (1999) Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 180: 247–264.
- O'Brien, I. E. W., D. R. Smith, R. C. Gardner and B. G. Murray (1996) Flow cytometric determination of genome size in Pinus. *Plant Sci.*, 115: 91–99.
- Palti, Y., A. Shirak, A. Cnaani, G. Hulata, R. R. Avtalion and M. Ron (2003) Detection of genes with deleterious alleles in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). *Aquaculture*, 206: 151–164.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sekino, M., T. Saido, T. Fujita, T. Kobayashi and H. Takami (2005) Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): A preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas. *Aquaculture*, 243: 33–47.
- Selvamani, M. J. P., S. M. Degnan, D. Paetkau and B. M. Degnan (2000) Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Mol. Ecol.*, 9: 1171–1193.
- Sokal, R. R. and N. L. Oden (1978) Spatial autocorrelation in biology some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biol. J. Linnean. Soci.*, 10: 229–249.
- Tassanakajon, A., S. Pongsomboon, V. Rimphanitchayakit, P. Jarayabhand and V. Boonsaeng (1997) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mol. Mar. Bio. Biotechnol.*, 6: 110–115.
- Wachira, F. N., R. Waugh, C. Hackett, and W. Powell (1995) Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, 38: 201–210.
- Yeh, F. C., R. C. Yang, T. B. J. Boyle, Z. H. Ye and J. X. Mao (1999) POPGENE 3.2: The User-friendly Shareware For Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton.

Genetic Variation of Farmed and Wild Small Abalone (*Haliotis diversicolor*) in Eastern Taiwan Using RAPD Method

Fu-Sheng Tseng^{*}, Shiarn-Chiang Chou, Huei-Jen Chu, Chun-Shin Yu,
Min-Yih Lu and King-Jung Lin

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Cultured small abalone, *Haliotis diversicolor*, collected from five farms strains (two 【TC1 and TC2】 from the county of Taitung and three 【YC1, YC2 and YC3】 from the county of Yilan). Wild abalone were from the coast of Shueilian-Jichi (HW1) and Yanliao (HW2) of Hualian County. RAPD was then used to analysis genetic variation of seven strains. Six random primers (p3, p5, p7, p8, p9 and p12) were used to amplify 61 clear and reproducible bands. The results showed that observed number of alleles (na), effective number of alleles (ne), gene diversity (h), Shannon's Information Index (I), the number of polymorphic loci (nL), and the percentage of polymorphic loci (pL) of farmed strains except YC3 were $1.8033 \pm 0.4008 \sim 1.8852 \pm 0.3214$, $1.5023 \pm 0.3524 \sim 1.6469 \pm 0.3423$, $0.2927 \pm 0.1830 \sim 0.3599 \pm 0.1638$, $0.4360 \pm 0.2522 \sim 0.5233 \pm 0.2210$, 49~54, and 80.33 ~ 88.52%, respectively. On the other hand, the na, ne, h, I, nL and pL of wild abalone were $1.8689 \pm 0.3404 \sim 1.9508 \pm 0.2180$, $1.6677 \pm 0.3456 \sim 1.7397 \pm 0.2846$, $0.3659 \pm 0.1717 \sim 0.4048 \pm 0.1298$, $0.5268 \pm 0.2356 \sim 0.5823 \pm 0.1703$, 53 ~ 58, and 86.89 ~ 95.08%, respectively. Based on the results and through the Unweighted Pair Group Method Analysis (UPGMA), these small abalone can be divided into three subgroups: Taitung, Haulian, and Yilan. Compared to farmed strains, the wild abalone from Haulian displayed a greater genetic variation, polymorphism, and number of alleles.

Key words: small abalone, random primer, genetic variation, UPGMA, allele

^{*}Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 24633101; FAX: (02)24628138; E-mail: fstseng@mail.tfrin.gov.tw