

利用 RAPD 探討九孔 (*Haliotis diversicolor*) 歷年遺傳變異之變化

杜金蓮* · 朱惠真 · 王姿文 · 黃奕瑄 · 游蓁 · 曾福生

農業部水產試驗所水產養殖組

摘要

九孔 (*Haliotis diversicolor*) 為臺灣極具特色之養殖物種，本研究以 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技術，針對 P3 基因座樣態，比較歷年 (2008-2021) 採集之九孔的遺傳變異變化。結果顯示，早期採集的野生九孔具有 8 - 12 條多型性擴增帶，主要落於 0.1 - 1.0 kb 之間，而養殖九孔之多型性擴增帶則以 1.0、0.8 及 0.65 kb 為主，且部分樣本出現條帶之深淺差異及遺漏狀況，顯示經過長期之人為選配，養殖九孔有遺傳變異與存活率降低之現象。為改善育成苗存活率不佳之問題，產業界開始引入其他地理群之種貝進行配種，證實透過雜交來提高物種的遺傳變異，確實有助於強化生物體適應外界多變環境之能力；然而近年來所採集之九孔樣本又逐漸出現基因多樣性降低，呈現遺傳變異同質性之趨勢。根據本研究追蹤結果顯示，人為選育確實會造成九孔遺傳變異降低，透過選擇差異度較高的種貝進行雜交雖可改善，但更重要的是，這些高遺傳變異種貝的保種、選育與管理。另外，為使養殖生物具備優異的養殖性狀 (成長、耐寒、抗熱等)，如何維持雜交種的優勢也是關鍵因素。

關鍵詞：九孔、*Haliotis diversicolor*、遺傳變異、隨機擴增多態性 DNA

前言

隨機擴增多態性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析是利用逢機的 10 個核苷酸序列組為引子，進行生物體基因體之 PCR 擴增，以產生不同大小片段之 DNA 條帶，優點為操作簡單、快速、有效率且花費少，RAPD 屬於分子標誌的一種，此技術除了已廣泛應用於各生物領域 (動物、植物及微生物) 之遺傳多樣性監測、族群結構分析、遺傳距離、物種鑒定，以及建立遺傳圖譜等，亦大量應用於種群遺傳學、分類學、物種鑒定、系統發育評估和瀕危物種的管理等領域 (Ray *et al.*, 2022)。在水產養殖已有應用於評估 *Mugil cephalus*、*Liza ramad* 和 *Valamugil seheli* 等鯔科 (Mugilidae) 魚類的遺傳分化與系統發育關聯分析 (Hassanien *et al.*, 2020) 與吳郭魚的遺傳多樣性、遺傳變異、遺傳評估、區分地理群等相關分析等 (Al-Khafaji *et al.*, 2019; Mahboob *et al.*, 2019; Megbowon,

2019; Omer *et al.*, 2020; Parvez *et al.*, 2021)。近年，Malina *et al.* (2021) 以 RAPD 發展基因分型技術進行東南亞的金目鱸 (*Lates calcarifer*) 種群分析，結果可應用於野生金目鱸之種群管理與後續保護策略。另於淡水長臂大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 之選擇性育種研究中，亦應用建立之 RAPD 技術分析不同家系之生長和抗病性狀的遺傳變異 (Patra *et al.*, 2015)。雖然 RAPD 技術甚為便捷，但進行分析之前必須耗費相當多的時間篩選適用引子 (賴等, 2010)；曾等 (2008) 之研究亦敘明，在大量篩選適用引子與確認受檢測之樣本新鮮度之前提下，RAPD 方可應用於分析、追蹤遺傳歧異度或親緣鑒定等相關研究，併成兼具效率性及正確性之便捷工具。

基因歧異度又稱基因多樣性或遺傳歧異度，Nei 在 70 年代即對基因歧異度下定義：「由一族群中逢機選取的兩個交替基因 (alleles) 為相異的機率 (the probability that two alleles taken at random within a population are different)」(Nei, 1973)；族群中的每一個體 (基因體) 之不同的遺傳組合便可展現不同的性狀，族群中所有生物個體的基因總合即為此族群之基因庫 (gene pool)。當此族群的個體數

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02)2463-3101;
轉 2818; FAX: (02) 2462-8138; E-mail:
jlidu@mail.tfrin.gov.tw

愈多，通常也代表此族群的基因庫愈大，相對的基因歧異度也愈大；而基因歧異度之增加，將使同種內的個體差異性增加，也將使此群體對環境改變的適應力變大，增加生存機會；遺傳變異主要源於基因突變、基因重組和染色體變異等因素（童和李，2009）。

九孔為臺灣重要的養殖種類之一，屬暖水性物種，棲息水溫為 22 - 26 °C，最適鹽度為 30 - 34 psu，喜好深度為 3 - 10 m，種苗年產量曾達 2 - 3 億粒，成貝年產量、值將近 2,500 mt、新臺幣 20 億元。臺灣的九孔養殖於 1960 年代就已開始人工育苗及養殖（郭，2013），其養殖歷史摘錄如下：(1) 1970 年代：在臺灣東北部之潮間帶開挖養殖池，利用潮汐漲退進行九孔養殖，產量約 38 mt。1983 年，政府明令禁止開發新的潮間帶養殖池，惟原有已開發的九孔海底養殖池設施仍可維護使用；(2) 1986 - 2001 年：1986 年，高雄縣林園地區之立體式養殖法開發成功；1996 年，宜蘭縣及臺南縣境內之內陸鹹水九孔池養殖技術開發成功，養殖面積達 150 ha 左右，產量逐年提高；(3) 1995 - 2002 年：臺灣九孔養殖產量於 1995 年後逐年增加，2001 年達最高峰；然至 2002 年，養殖九孔陸續暴發大量死亡，產量驟跌；(4) 2004 年：因未能解決九孔死亡狀況，養殖戶紛紛棄養，只剩零星潮間帶及少數陸地池養殖（沈與趙，2003；郭，2013）；(5) 2009 年：堪稱是臺灣九孔養殖產業最寒冷的冬天，臺灣最大的九孔育苗場「新東洋九孔養殖場」放棄養殖九孔，只剩若干養殖業者仍堅持固守此產業；(6) 2010 年迄今：臺日雜交貝養殖測試成功，可耐低溫、輪捕。

傳統育種常由一個生物族群中，選拔最佳形質的親本進行配對，在人為的養殖環境，逐代選拔，但由於交配族群數量不足，易產生近交現象，逐代累積，造成遺傳變異下降；與自然野生族群相比，養殖族群所採用的繁殖樣本，數量相對很少，所以發生近交退化的可能性也相對增加，近交退化可能造成樣本早熟、成長緩慢以及族群適應力、存活率、繁殖力降低風險，對族群長遠發展而言並非好事（林與郭，2013；杜等，2015）；然於九孔的養殖過程中，養殖的幼貝主要由自家養殖場選取成長快、外型佳者為種貝繁育而成，因未有效管理種貝之選擇與配種策略，致使養殖九孔的遺傳變異逐年降低。這也造成自 2000 年起，臺灣各地的繁殖場紛紛發

生九孔幼生在附苗後，快者 1 週，慢者 1 個月內幼苗陸續白化脫落死亡，九孔成貝亦出現大量死亡狀況，導致業者重大損失，重創九孔產業發展（曾等，2008, 2013；郭，2013；杜等，2015）。面臨水產養殖物種的種種挑戰，除了積極提升養殖相關技術及改善養殖生態環境，針對養殖物種近親退化現象，使用雜交技術培育新品種為養殖貝類育種的重要方法（You *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012）。中國也朝著以雜交育種以防止種質退化之研究方向進行，目前已有不少關於雜色鮑種間雜交（柯等，2000；蔡等，2006）、群體間遠距離雜交（游等，2005；You *et al.*, 2009）、群體選育（You *et al.*, 2010a）和分子標誌輔助育種（Zhan *et al.*, 2009）等雜色鮑遺傳改良相關的研究。

本研究沿用曾等（2008）所篩選且經多年之驗證之引子，應用 RAPD 技術追蹤分析歷年採集之九孔遺傳變異，以作為未來九孔育種、資源管理與應用之根據。

材料與方法

一、九孔樣本

- (一) 2008 年之前收集的野生九孔 11 顆、野生九孔人工繁殖子代 12 顆、臺南養殖場九孔 12 顆、宜蘭九孔養殖場之養殖九孔 14 顆、養殖母貝配野生公貝之子代 15 顆及養殖公貝配野生母貝之子代 12 顆。
- (二) 2017 年收集的 5 群九孔，每群各 10 顆，其中 strain 1 - 4 為不同品系九孔，另外 strain 5 則為當年養殖之菜貝。
- (三) 2018 年於東北角海底池收集之九孔 30 顆。
- (四) 2020 年收集自宜蘭兩養殖場九孔各 10 顆、臺東九孔養殖場 16 顆及澎湖野生九孔 6 顆。
- (五) 2021 年收集自海大 108 品系 F₁ 15 顆及東北角海底池養殖之九孔 15 顆。

所有之樣本均為養殖現場採集後，以籠具攜回實驗室，經秤重、量測殼長及殼寬後，進行活體採樣，隨即進行體基因組之萃取，九孔樣本未經任何凍存，為新鮮採樣。

二、體基因組萃取

Table 1 Nucleotide sequences of target random primers and the number of amplified bands, as shown in the RAPD analysis of *Haliotis diversicolor*

| Primer | Sequences of primer (5'→3') | Total bands | Molecular weight (kb) |
|--------|-----------------------------|-------------|--|
| P3 | GACCGCTTGT | 12 | 1.0, 0.9, 0.85, 0.8, 0.7, 0.65, 0.59, 0.53, 0.4, 0.37, 0.3, 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 |

切取約 0.1 g 的肌肉組織均質後，再加 500 μ l lysis buffer (500 μ g/mL proteinase K、50 mM Tris-HCl [pH 7.5]、10 mM EDTA、0.5% SDS) 混合均勻，置於 55°C 下輕搖振盪 2 hr 後，加入等體積的 phenol/chloroform 均勻混合，於 4°C 以 12,000 \times g 下離心 10 min，取上清液加入 6 倍體積無水酒精，靜置於 -70°C 下 1 hr 後，以 12,000 \times g 於 4°C 離心 30 min 除去上清液，再以 70% 酒精離心清洗沉澱物，於室溫下陰乾，陰乾後加入適量 TE buffer 溶解，並於測定 OD260 及 OD280 後，稀釋定量，放置於 -25°C 冰箱保存備用 (曾等, 2008)。

三、RAPD 引子

本研究沿用曾等 (2008) 所篩選且經多年驗證之 P3、P5、P7、P8、P9 及 P12 等 6 組可清楚辨識且再現性高者作為樣本分析之隨機引子，其引子序列及基因座多型性擴增帶如 Table 1 所示。另，選用 P3 引子所得之 12 條基因座多型性擴增帶 (1.0、0.9、0.85、0.8、0.7、0.65、0.59、0.53、0.4、0.37、0.3、0.26 kb)，與歷年收集之九孔 P3 基因座進行比對分析。

四、聚合酶連鎖反應

取定量之九孔體基因組 DNA 樣品 1.0 μ l (30 ng/ μ l)、2.0 μ l 引子 (10 μ M)、0.5 μ l dNTP (10 mM)、1.0 μ l MgCl₂ (30 mM)、0.5 μ l polymerase (100 U/ μ l) 和無菌水 15.0 μ l，使之最終體積為 20.0 μ l。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 反應條件：預熱 94°C，15 min 後，執行 30 個循環，每依次循環依序為：變性 (denature) 94°C，45 sec；

煉合 (annealing) 42°C，45 sec；延長 (elongation) 72°C，30 sec；最後於 72°C 延伸 10 min 使作用完全，擴增產物於 4°C 儲藏備用。

五、瓊脂膠電泳觀察

PCR 產物以 0.5 倍 Tris-acetate (TAE) 溶液等倍稀釋，加入 1 μ l 6 倍 loading dye，混合後取 10 μ l 進行電泳分析，經 120 伏特電泳 30 min，電泳後膠體浸泡在 0.5 μ g/ml 溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 溶液中染色 1 min，再以蒸餾水退染 10 min，退染後於紫外燈下顯影，再由影像分析系統 (Bio Imaging System, SYNGENE, UK) 觀察和拍照 (曾等, 2008)。

六、聚類分析

受限於軟體輸出圖之解析度，僅針對 2020 年及 2021 年自 2 個宜蘭養殖場 (代號 I-lain I 及 I-lain II，樣本數量均為 10)、1 個臺東養殖場 (代號 TT，樣本數量 16)、海洋大學 108 品系九孔 F₁ (代號 ntou3，樣本數量 30) 及澎湖 (代號 ph，樣本數量 6) 採集之 77 個九孔樣本進行分析。

以 RAPD 之 P3、P5 及 P9 進行 PCR 擴增後，以 Bio Imaging System 影像分析系統中 GENE TOOLS 分析軟體判讀 P3、P5 及 P9 引子擴增所得基因座多型性擴增帶之電泳照片結果，求得數量化之數據。依 Nei and Li (1979) 之定義計算其遺傳相似係數。每一參試材料的運算分類單位以 OUT (operational taxonomic unit) 表示。P3、P5 及 P9 引子擴增所得基因座多型性擴增帶之結果如 Table 1 所列，將歷年收集之結果擴增條帶轉換為

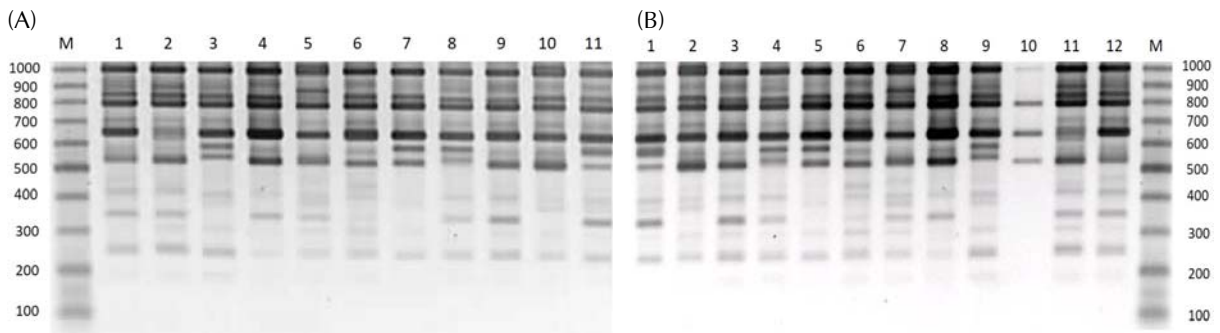


Fig. 1 Amplification products of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) from farmed abalone and wild abalone for comparison with genetic polymorphism. (A) Strain W (wild abalone); (B) Strain TT (inbred from wild of Taitung). M is the DNA ladder of molecular weight standards.

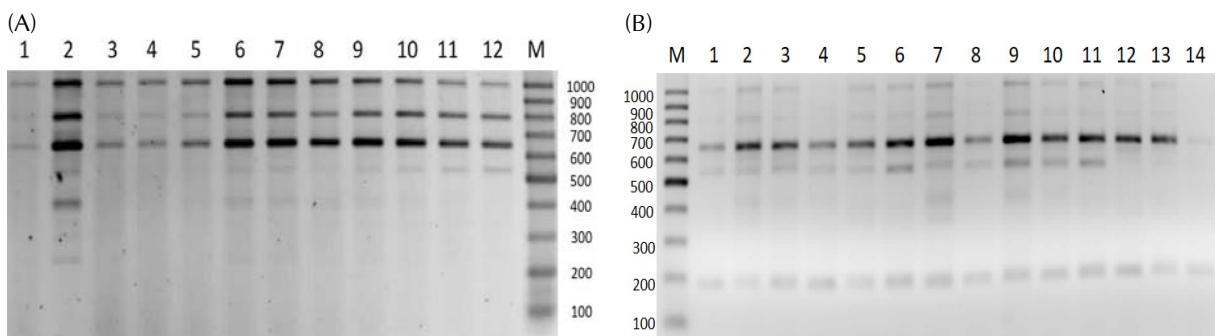


Fig. 2 Amplification products of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) for different farmed abalone compared to genetic polymorphism. (A) Inbred from farms in Tainan; (B) Inbred from farms in I-lian. All individuals were sampled before 2008. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

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，以清晰可辨的標記列入統計，來估計分析。其公式為： $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ，其中 F：表示遺傳相似度估計值。 N_{xy} ：表示在 x、y 二個體間，同時擁有之條帶數。 N_x ：個體 x 可紀錄的條帶數。 N_y ：個體 y 可紀錄的條帶數。由上述計算出的遺傳相似矩陣，以 PAST 軟體用未加權算數平均法 (unweight pair-grouping method with arithmetic mean, UPGMA) 進行聚類分析 (cluster analysis)，求出樣品間的親緣距離，以建立分群樹狀圖 (dendrogram) (呂等, 2008; 呂與呂, 2013)。

結 果

本研究主要目的在於追蹤比對歷年收集之九孔，主因曾等 (2008) 所發表 P3 引子擴增所得基因座多型性擴增帶結果，於野生九孔及養殖九孔有明顯之差異，且於歷年收集結果出現易觀察之變化，故可針對此引子，進行不同採集時間九孔樣

本擴增所得基因座多型性擴增帶加以追蹤比對。Figs. 1 - 3 為早期 (2008 年之前) 採集之九孔分析資料，Fig. 1A 為野生九孔，Fig. 1B 為野生九孔人工繁殖子代之 P3 基因座樣態，所獲得之 PCR 多型性擴增帶主要落於 0.1 - 1.0 kb 之間，其中野生九孔可擴增之條帶為 8 - 12 條，野生九孔人工繁殖子代 (strain TT) 則為 4 - 12 條，主要差異出現於 0.4 - 0.8 kb 部分條帶，此差異有 2 種，1 種為出現不同深淺之條帶 (拷貝數變異, copy number variation, CNV)，另一種則為擴增帶之有無。另於同時期收集不同養殖區之九孔，可以發現養殖九孔 strain TN 之 P3 基因座樣態以 1.0、0.8 及 0.65 kb 為主，其他擴增帶稀少甚至沒有 (Fig. 2A)，更甚者於部分養殖場採集之九孔如 strain Y，有部分樣本出現條帶 (1.0 kb、0.8 kb) 之出現 CNV 之差異及條帶遺漏的狀況，更有超過 40% 樣本之 0.8 kb 條帶遺漏 (Fig. 2B)。以野生與養殖九孔進行雜交，其中養殖母貝配野生公貝，除了可獲得 1.0、0.8 及 0.65 kb 之擴增帶，而於 0.4 - 0.8 kb 有部分條帶

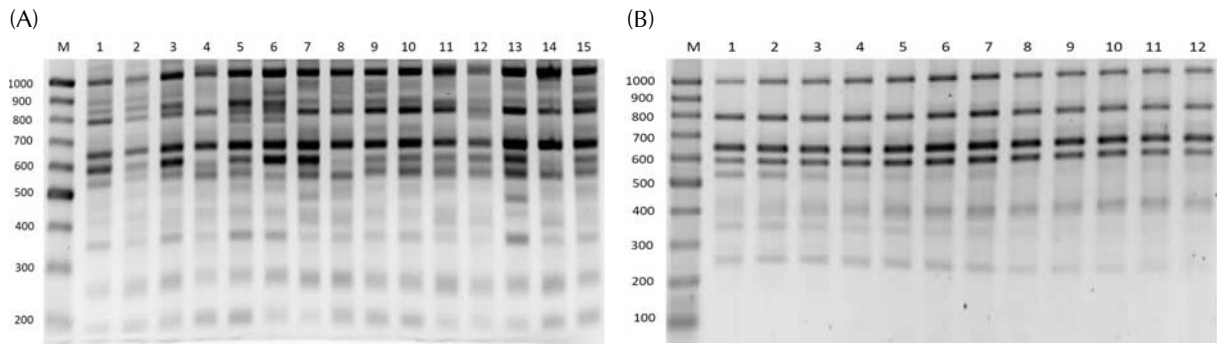


Fig. 3 Genetic polymorphisms of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products for different hybrid abalone. (A) from a hybrid farmed female crossing with a wild male; (B) individuals from a hybrid farmed male crossing with a wild female. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

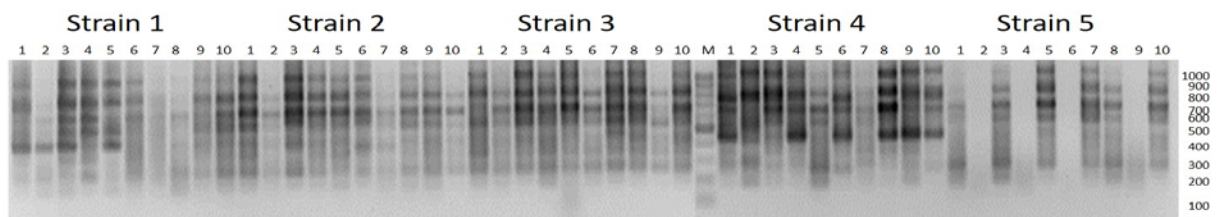


Fig. 4 Genetic polymorphisms of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products from five strains of small abalone in 2017. Strain 1 to strain 4 are samples from different farms; strain 5 are samples from the farmed abalone. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

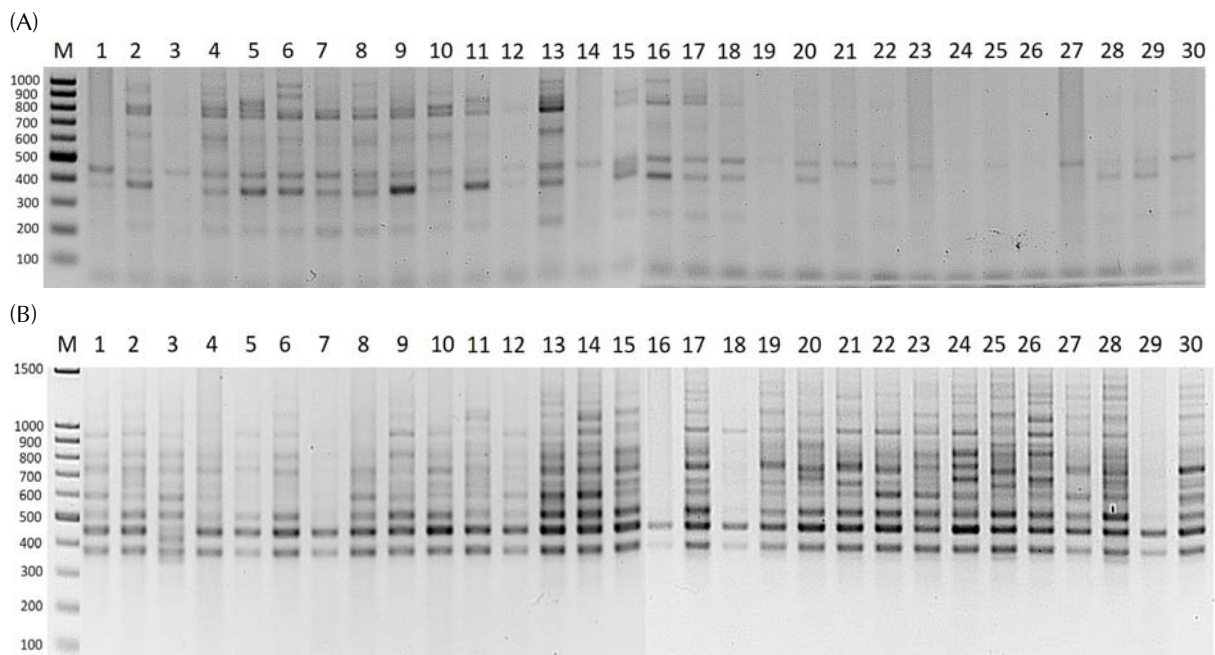


Fig. 5 Genetic polymorphisms of RAPD primer amplification products of abalone from abalone intertidal pool farming in the northeast corner in 2018; (A) RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products; (B) RAPD P7 primer (AGACGTCCAC) amplification products. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

有明顯之差異 (Fig. 3A)。另一雜交組為養殖公貝配野生母貝，主要獲得 1.0、0.8、0.65 及 0.59 之擴增帶，而於 0.2 - 0.55 kb 區域之條帶 (Fig. 3B)，兩個雜交配對方式所產生之子代有明顯之差異。

2017 年採集之 5 群九孔中，strain 1 - 4 為業者提供不同配對組合之九孔，strain 5 為當年採集之菜貝，在 P3 基因座檢測 5 組九孔基因多型性擴增帶比較分析如 Fig. 4，結果顯示，其擴增條帶為

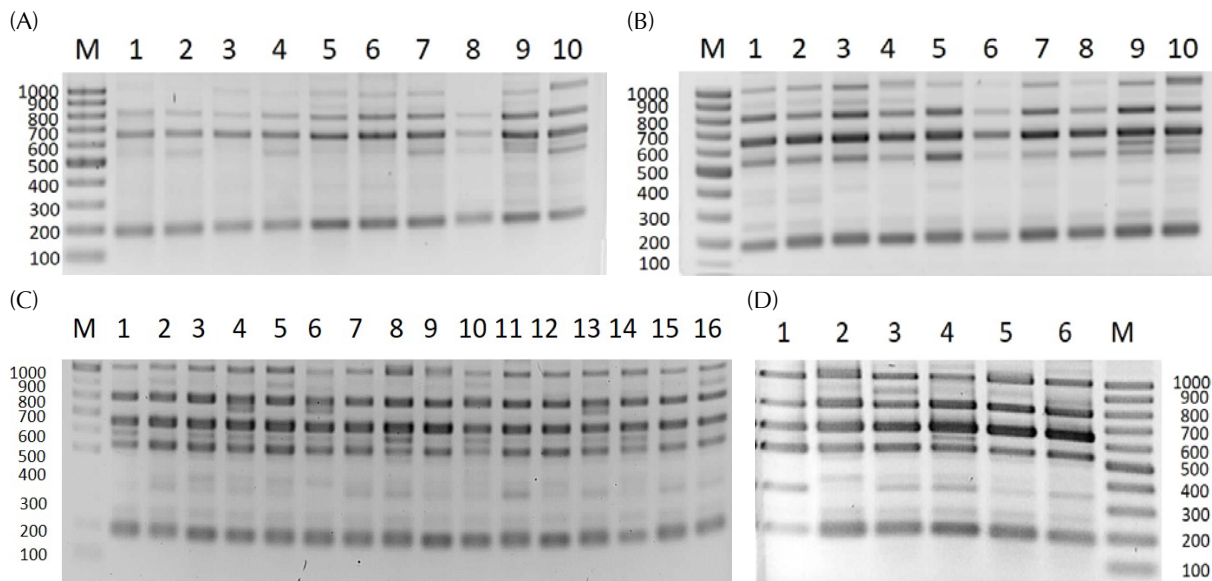


Fig. 6 Genetic polymorphisms of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products of abalone from different farms in 2020; (A) samples from I-lain farm A; (B) samples from I-lain farm B; (C) samples from Taitung farm; (D) samples from Penghu farm. M is the DNA ladder of molecular weight standards.

4 - 6 條之間，主要位於分子量 0.4 - 1 kb 之間，並有部分樣本出現條帶遺漏的狀況，其中基因擴增帶 (1.0、0.8 與 0.65 kb) 有逐漸遺漏，於分子量約 0.42 kb 有明顯產生 CNV 之差異，亦有明顯遺漏的情形。在檢測的 5 組中，10 - 30% 樣本出現多型性擴增帶 CNV 之差異，有條帶遺漏的狀況，尤其在第 5 組，甚至有 40% 的樣本整個基因座完全缺失。

而於 2018 年於東北角九孔養殖海底池所採集之 30 個樣本亦可觀察到條帶遺漏或基因座多型性擴增帶遺失之狀況。於此批樣本中，體基因組均已定量後再進行 PCR，於電泳時，每片電泳片均有標準品，再利用標準品進行定位，拼接同一個基因座所得之電泳片；P3 基因座已有超過 50% 樣本出現基因多型性擴增帶之差異，亦有整個基因座完全缺失現象 (Fig. 5A)，為釐清體是否人為操作導致之基因組樣態表現差異，另以 P7 基因座作為對照 (RAPD 引子 7: AGACGTCCAC，所得基因座多型性擴增帶為 0.95、0.81、0.71、0.6、0.5、0.45 與 0.3 kb 7 條)，結果顯示此 30 個均可獲得擴增條帶，可確認 P3 基因座之差異非實驗誤差導致。

而於 2020 採集來自 3 個九孔養殖場及澎湖野生九孔之樣本顯示，在 I-lain I 10 個樣本中，P3 基因座多型性擴增帶為 3 - 7 條之間，有 30% 的樣本之 1.0 kb 擴增帶已出現遺漏狀況 (Fig. 6A)，而於

I-lain II 場 10 個樣本中，可獲得 6 - 8 條的擴增帶 (Fig. 6B)。同年臺東九孔養殖場所採集之樣本 (TT)，於 P3 基因座可擴增出 5 - 7 條擴增帶，主要的 1.0、0.8 與 0.65 kb 擴增帶均存在 (Fig. 6C)；而於澎湖收集之九孔樣本 (ph)，因主要目的為後續之配種，故僅能採集較衰弱無法進行繁殖之種貝，數量較少，僅有 6 顆，可擴增出 6 - 8 條擴增帶，然其 P3 基因座之樣態於個體間呈現較相似的狀況，均有主要的 1.0、0.8 與 0.65 kb 擴增帶，另亦有 0.53 及 2.0 kb 擴增帶，各擴增帶之 CNV 也呈現較為一致的現象 (Fig. 6D)。

海大 108 品系 (代號 ntou 3) 係因應產業需求，收集自基隆嶼之野生九孔與海大原有之九孔選配而來，因樣品珍貴，待其 F₁ 子代足夠大時，方進行採樣分析。採樣日期為 2021 年，樣本可得 5 - 9 條基因多型性擴增帶 (Fig. 7A)。同年採集自東北角海底池之樣本則可獲得 5 - 8 條之擴增帶，15 個樣本中，主要的 1.0、0.8 與 0.65 kb 擴增帶均有 (除了樣本 15)，其他的擴增帶則有深淺或遺漏之狀況 (Fig. 7B)。

另針對 2020 年及 2021 年收集之九孔 (詳如材料方法中之聚類分析)，以 RAPD 之 P3、P5 及 P9 進行 PCR 擴增後，依其電泳擴增帶之有無，進行聚類分析，同分子量位置出現擴增條帶記為 1，未出現者記為 0，將擴增條帶轉換為 0 和 1 數據，

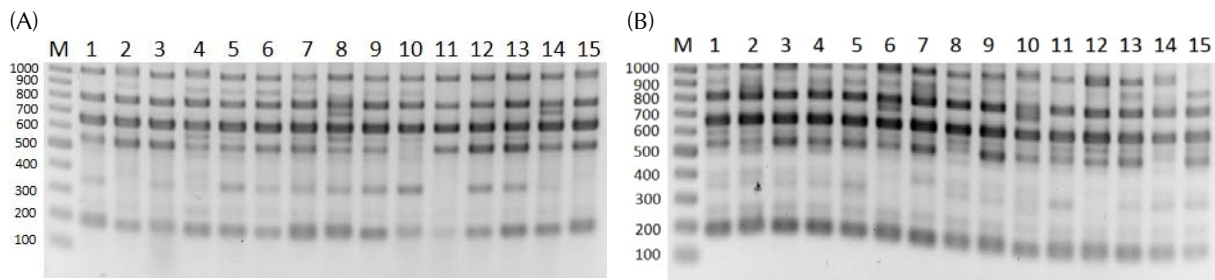


Fig. 7 Genetic polymorphisms of RAPD P3 primer (GACCGCTTGT) amplification products of abalone in 2021. (A) Samples from ntou; (B) samples from abalone artificial farms in the northeast coast intertidal pool farming region. M is the DNA ladder of molecular weight standards.



Fig. 8 UPGMA dendrogram with RAPD P3, P5, and P9 primer amplification products showing the relationships among abalones obtained from five domestic hatcheries and two wild samples in 2020 and 2021.

再以 PAST 軟體 UPGMA 進行聚類分析，限於 PAST 軟體之輸出版面與版面解析度，僅挑選部分樣品進行分析，結果顯示，雖僅用 3 組引子，已可將九孔分群，於相似度 0.41 時，可將這群九孔分成 6 群，包括 (1) 1 個宜蘭養殖場 I 採集之樣本；(2) 7 個宜蘭養殖場 I 採集之樣本(其中有 2 顆九孔基因型完全一樣) 及 1 個澎湖野生九孔；(3) 1 個宜蘭養殖場 II 採集之樣本；(4) 28 個 108 品系九孔 F₁；(5) 1 個 108 品系九孔 F₁、7 個宜蘭養殖場 II 採集之樣本和 5 個澎湖採集之野生九孔；(6) 1 個 108 品系九孔 F₁、7 個宜蘭養殖場 II 採集之樣本、2 個宜蘭養殖場 I 採集之樣本和 16 個臺東養殖場九孔 (Fig. 8)。

討 論

本研究以所建立之 RAPD 技術進行歷年蒐集之九孔樣本之遺傳變異分析，使用 RAPD 係為了研究多少個基因有同一個隨機引子的 10 個核苷酸序列，鑑於十餘年追蹤之結果，發現歷次分析九孔之 P3 基因座最容易觀察遺傳變異之變化，其中基因擴增帶 1.0、0.8 與 0.65 kb 尤為明顯，故本研究將此設定為目標追蹤區，追蹤爾後收集自各場域九孔之遺傳變異，且每個樣本均經過測定、定量後，再取定量樣本進行 RAPD 之 PCR 擴增。於 2008 年之前採集之九孔樣本可發現野生貝的遺傳變異明顯高於養殖九孔，在養殖貝 strain Y 甚至僅

出現 0.65 kb 之條帶，約有 40% 之個體在 0.85 kb 已出現條帶有明顯之差異，擴增帶的有無會直接影響交替基因，進而影響性狀之表現；為改善九孔養殖之狀況，部份業者亦收集野生之九孔進行雜交繁殖，如野生九孔自交、野生母貝配養殖公貝及養殖母貝配野生公貝等正反交不同組合等，於野生貝自交，其遺傳變異與野生貝較為相似，然尚未做好養殖管理或遺傳變異之監控，亦可能於子代中，不慎挑選到遺傳變異較少的九孔當作種貝進行後續繁殖，將會造成子代之遺傳漂變(曾等, 2008, 2014; 杜等, 2019)；雜交雖然可改善子代之遺傳變異，但是於養殖貝和野生貝之正、反交不同組合也可發現雜交子代的擴增帶介於兩親之間，但子代遺傳變異有甚大差異 (Fig. 3)，其中養殖母貝配野生公貝之子代遺傳變異較多元，除了主要基因擴增帶 1.0、0.8 與 0.65 kb 外，在 0.5 - 0.7 kb 間亦出現深淺不一之擴增帶，然於野生母貝配養殖公貝之子代遺傳變異卻呈現較一致之樣態，呈現趨於同質化之趨勢；另於海灣扇貝 (鄭等, 2004; Haibin *et al.*, 2007)、雜色鮑 (游等, 2010)、長牡蠣 (孔等, 2013)、櫛孔扇貝 (*Chlamys irregularis*) (劉等, 2003, 2005) 等研究發現正反交、自交配對等不同組合，確實影響子代存活率；本團隊之研究亦發現，雜交優勢確實影響子代之成長與活存率，且正反交亦有差異，另基因歧異度低的幼貝其存活率顯著較低，成長發育情形亦顯著較差。因此，親代的正反交組合也應列入育種之考量 (杜等, 2015)。

而於 2017 年採集之九孔樣本中發現於 P3 基因座中，除了主要基因擴增帶有逐漸遺漏，於 0.42 kb 擴增帶除了出現 CNV 之差異，亦有明顯遺漏的情形，在檢測的 5 組中，10 - 30% 樣本出現基因擴增帶 CNV 之差異，有條帶遺漏的狀況，尤其在第 5 組，甚至有 40% 的樣本整個基因座完全缺失；此狀況在 2018 年收集之樣本尤為嚴重，在所檢測樣本已有超過 50% 樣本出現基因擴增帶 CNV 之差異，有些擴增帶顏色極淺，亦有整個基因座完全缺失現象，經 P7 基因座檢測，每一個樣本均可擴增出條帶 (Fig. 5B)，故基因擴增帶之差異甚至缺失，並非因人工操作失誤所致，這極可能是長期人工選育之結果；臺灣九孔養殖已有很長一段時間，一來許多養殖戶已習慣了自繁自養的繁殖模式，便宜行事使用養殖貝作為繁殖的種貝，再則，以往九

孔繁殖時，養殖業者常以雌雄種貝以 20 : 1 (有些種貝場高達 30 : 1，甚至 35 : 1 亦有之) 的性比進行繁殖(曾, 2015)；在繁殖時會將雌雄種貝分為雌貝一群和雄貝一群，經由環境刺激方式催產，僅能知道哪一群已產卵排精，無法明確得知清楚知道後代的親本來源是哪一顆。這種雌雄比懸殊的繁殖方式，因雄貝的使用個數不多，間接造成人擇行為之瓶頸效應，進而導致遺傳漂變，亦提高了近交退化的機率，這將使九孔種質下降，遺傳基礎趨於狹窄，逐代降低九孔的遺傳變異，逐漸導致子代生長速度變慢，樣本變小，對環境的適應力降低，也會影響九孔幼生、附著苗的培育到養成等狀況，甚至造成嚴重的損失 (曾等, 2013; 郭, 2013; 蔣等, 2013; 杜等, 2015; 曾, 2015)。

而於 2020 年收集自養殖場或澎湖野生九孔，大多具備 P3 基因座主要基因擴增帶 (1.0、0.8 與 0.65 kb)，但可以發現臺東養殖場及澎湖野生九孔的擴增條帶多態性略優於宜蘭地區採集的兩場區，宜蘭兩場區的九孔亦有差異，II 場之遺傳變異略優於 I 場；而於 2021 年採集自海大 108 品系及東北角海底池之九孔，除了主要擴增帶，在約 0.9、0.6 及 0.53 kb 亦出現深淺不一之條帶；檢視本團隊於 2003 - 2007 年的調查結果，推估民間養殖場之九孔種貝基因因同質化現象，恐為九孔苗大量落苗原因之一 (曾等, 2008; 曾, 2015)，而於近年採集之九孔基因擴增條帶雖較 2008 年前採集之養殖貝稍多，但其遺傳變異卻有趨於同質性之趨勢，此為一重要警訊，遺傳變異於群體中出現同質性，並非壞事，如於合宜的環境中，子代同種內的個體性狀表現較整齊一致，有助於養殖管理，然而也意味著此族群對環境改變的適應力低，極可能年以因應環境之劇變，不甚將導致群體生存危機；此外，對育種者而言，遺傳變異同質性之群體亦是雙面刃，優點是不用再進行自交、純化等選配工作，即可在短時間獲得相對純的品系，而且在適合的養殖環境或可掌控之養殖條件下，或許可以培育經濟性狀優良的物種，然缺點卻是遺傳變異同質性將導致子代差異小，難以進行差異化選別 (曾等, 2011)。

另由 2020 及 2021 年收集之九孔進行聚類分析，雖僅使用 3 組 RAPD 引子 P3、P5 及 P9 結果，即可進行分析，其中 P3、P5 於各個體間，所呈現

之擴增帶歧異度較高，P9 之擴增帶則較為相似，將上述所有擴增帶一起比較時（最多為 33 條條帶），於相似度約 0.41 可將此 77 個樣本初步分成 6 群，幾乎已可將相同地方採樣之樣本歸納成群，亦可發現其中宜蘭 I 場有 2 顆基因型相似度為 1，而臺東樣本之基因型相似度相較於其他群高；本研究證明可利用 RAPD 結果，進行樣本之初步聚類分析，判斷各樣本群之相似度，亦可提供現場配種時，種貝選擇的重要參考。然此分析方式耗時費力，目前須由人工進行初步判讀登錄，故於時間較緊迫時，可以此 3 組引子作為初步分析，待另有時間可再加入其他合宜的 RAPD 引子之 PCR 擴增結果，可更提升聚類準確度，更有利於後續分析。

透過雜交選育確實可增加子代基因的歧異度，且經比對幼苗之存活率及成長情形後，發現基因歧異度低的幼貝其存活率顯著較低，成長發育情形亦顯著較差。在太平洋牡蠣 (Hedgecock and Davis, 2007)、扇貝 (Zhang *et al.*, 2007)、九孔 (曾等, 2008; 于, 2013; 杜等, 2019) 之研究顯示，經由具有顯著遺傳差異的種內群體雜交，可讓雜交子代之經濟性狀較自交子代表現優異；另外倘選配管理得當，可透過不同品系的九孔雜交擴增九孔之基因歧異度，可有效改良子代之成長與活存率，基因歧異度越高，其子代存活率也越高，基因歧異度與存活率呈正相關 (杜等, 2015)。Ray *et al.* (2022) 針對印度特有之鯉魚 (*Cirrhinus cirrhosus*) 進行遺傳變異分析，其樣本來自不同的 5 組孵化群，另外 1 組天然族群則採集自 Halda River，結果顯示這些群體之間的遺傳距離是多樣化的，但是，孵化的群體被發現有更多的同質性，缺乏遺傳變異性，從而導致生長性能下降，這也呼應另一學者早於 2006 提出之論證，近親繁殖是造成 *C. cirrhosus* 生長性能下降的原因，增加遺傳變異性是提高產量和生長性能的唯一解決方案 (Aflalo *et al.*, 2006)。

物種的遺傳變異增強了生物適應不斷變化的環境的能力，是物種生存的必要條件，然而在水產養殖的馴養過程，極易造成遺傳變異的降低。Radona *et al.* (2018) 利用 RAPD 針對施氏魷 (*Barbonymus schwanefeldii*) 連續三代群体世代進行遺傳變異監測，各世代之的育成係選擇上一世代優良生長的個體進行繁殖所形成，結果從第一

代到第三代的多態性及雜合性下降了 30 - 40%，顯示在逐代選育馴養的過程會導致基因多樣性的減少；而於現今甚多水產養殖種苗場，仍採取「選魚頭」方式進行繁殖，而成長性狀較優異的個體，大多是因為雜交強勢所造成結果，此性狀並無法以遺傳方式於子代體現，這要是現在許多商用養殖苗於當代有極優異之養殖性狀，但其繁衍子代性狀出現參差甚至逐漸低下之原因，除了因無意的以人擇的方式促成近親繁殖，另外也是因為所擇之雜交親代性狀並未固定之緣故，此外在水產養殖業中，不同魚類具有各種具有經濟重要性的特徵，種苗生產者倘不及早建立正確之育種與保種之觀念，不但會一再陷入生產出經濟性狀欠佳、性狀不一、產業接受度差之泥沼，更難生產出好的種苗以因應未來氣候變遷之考驗。在不同種類的物種，重要經濟性狀的表現及養殖地區亦有所差異 (Fu and Yuna, 2022)。因此現今已有甚多國家開始制定自有之育種計畫，也開始明白育種計畫的成功及在水產養殖的可持續性在很大的程度上取決於遺傳多樣性評估和理解的結果，因此在制定育種計畫之前必須先事前確定目標選育物種之種群遺傳變異和種群結構 (Radona *et al.*, 2018; Adesola *et al.*, 2020; Omer *et al.*, 2020; Parvez *et al.*, 2021)，在制定良好的育種計畫後，加入妥適的追蹤監測，除了維持現有品種，亦須適時導入不同品種進行雜交以增加目標種群內之遺傳變異，進行後代選育，方能有效種原管理維持優異種質，永續經營水產養殖 (Eknath *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2022)。

於本研究追蹤歷年九孔之 P3 基因座遺傳變異調查結果顯示，適當的選配確實可以改良子代之 P3 基因座樣態，但是正、反交或選擇之種貝可能會造成子代遺傳變異之差異，在同一群體中未能獲得相同的擴增條帶，這表示經由人為選育配種的過程，已造成人為的遺傳漂變。因此，在配種時，需注意親本的質與量的選擇，除了不宜長期利用單一品系九孔，應適時利用不同養殖場間九孔品系之交換和雜交；另一方面要注意繁殖親本的數量，避免基因漂流效應 (曾等, 2008, 2011, 2012, 2014; 曾, 2015; 杜等, 2015)，再配合基因標誌輔助九孔選配，可明確管控那些基因型過量，那些基因型缺少，也可減少種貝的使用量，防止種原耗損，亦可對精卵品質進行篩選作為留種依據，達到種

貝配對管理和後代的基因型管理，建立遺傳育種資材，故未來應建立累積各性狀(如耐寒、耐熱、成長等)與基因資料之關聯分析，以提出最適性之配種策略，如此方可有效管理並維持九孔之基因歧異度，有效地防止養殖所造成的族群基因歧異度急劇降低和近交衰退，以利永續經營九孔產業。

謝辭

承蒙國立臺灣海洋大學副校長冉繁華特聘教授提供海大九孔 108 品系供測試分析，使本研究資料更加完整，特此致謝。

參考文獻

- 丁雲源, 楊鴻禧 (2003) 九孔種苗生產及幼生病害防治之對策. 水產試驗所特刊第1號 - 九孔種苗生產及病害防治, 47-50.
- 于淳康 (2013) 培育九孔種內雜交品系及應用於國內養殖. 國立臺灣海洋大學碩士論文, 基隆.
- 孔令鋒, 滕爽爽, 李琪 (2013) 長牡蠣中國群體與日本群體雜交子一代的生長和存活比較. 海洋科學, 37(8): 78-84.
- 呂秀英, 魏夢麗, 呂椿棠 (2008) DNA分子標誌資料之遺傳變異的歸群分析. 農業試驗所技術服務, 73: 25-27.
- 呂椿棠, 呂秀英 (2013) PAST統計軟體於DNA分子標誌多樣性分析之應用. 農業試驗所技術服務, 95: 8-12.
- 杜金蓮, 曾福生, 王姿文, 張錦宜 (2015) 九孔基因歧異度對幼苗活存率及幼貝成長表現之影響. 水產研究, 23 (1): 67-75.
- 杜金蓮, 王姿文, 曾亮瑋, 姜其平, 曾福生 (2019) 臺灣養殖九孔遺傳特性調查與耐低溫選育. 水產試驗所2019年年報, 39.
- 沈士新, 趙文榮 (2003) 附著板上附著性藻類對九孔幼苗之附苗及成長效應之探討. 水產試驗所特刊第1號 - 九孔種苗生產及病害防治, 31-40.
- 林凌霄, 郭金泉 (2013) 中國於鮑魚遺傳育種之研究. 農業生技產業季刊, 35: 59-67.
- 柯才煥, 田越, 周時強, 李復雪 (2000) 雜色鮑與皺紋盤鮑、盤鮑雜交的初步研究. 海洋科學, 24(11): 39-41.
- 郭金泉 (2013) 簡介中國「東優1號」九孔的育種研究(上). 漁友, 430: 26-28.
- 曾福生 (2015) 九孔鮑種貝選配方式及幼生培育季節適應探討. 豐年, 65(03): 38-43.
- 曾福生, 杜金蓮, 謝立偉, 王姿文, 張錦宜 (2014) 近親交配對紅色吳郭魚成長與死亡率之影響. 水產研究, 22 (1): 63-70.
- 曾福生, 周賢鏘, 朱惠真, 余俊欣, 盧民益, 林金榮 (2008) 利用RAPD分析臺灣東部養殖及野生九孔的遺傳變異. 水產研究, 16 (2): 49-58.
- 曾福生, 周賢鏘, 盧民益, 李憶如, 朱惠真, 林瑩祝, 林金榮 (2011) 以全同胞近親育種選育高度近親紅色吳郭魚品系. 水產研究, 19 (2): 55-62.
- 曾福生, 林金榮 (2012) 雜交育種改善九孔養殖成效佳. 水試專訊, 37: 9.
- 游偉偉, 駱軒, 王德祥, 林壯炳, 林煥陽, 柯才煥 (2010) “東優1號”雜色鮑及其親本群體的形態特徵和養殖性能比較. 水產學報, 34(12): 1837-1843.
- 童禕珊, 李冠群 (2009) 遺傳變異的產生方式 (Genetic Variation). 高瞻自然科學教學資源平台 - 科學online (<https://reurl.cc/ZyA2rp>).
- 劉小林, 常亞青, 相建海, 李富花, 劉憲傑 (2005) 櫛孔扇貝不同種群雜交效果的研究 - II. 中國種群和俄羅斯種群及其雜種F₁中期生長發育. 海洋學報, 27(2): 135-140.
- 劉小林, 常亞青, 相建海, 劉憲傑, 李富花, 劉保忠 (2003) 櫛孔扇貝中國種群與日本種群雜交一代的中期生長發育. 水產學報, 27(3): 193-199.
- 蔣湘, 劉建勇, 賴志服 (2013a) 九孔鮑養殖群體與野生群體雜交一代生長比較. 廣東海洋大學學報, 33(1): 22-27.
- 蔣湘, 劉建勇, 賴志服 (2013b) 九孔鮑選擇群體F₁的選擇反應與現實遺傳力估計. 南方水產科學, 9(2): 9-13.
- 鄭懷平, 張國範, 劉曉, 闕華勇 (2004) 海灣扇貝雜交家系與自交家系生長和存活的比較. 水產學報, 28(3): 267-272.
- 賴佩珊, 王婉伶, 陳瑞祥, 連大進, 吳昭慧, 蔡竹固 (2010) 利用隨機增幅多型性 DNA 技術分析大豆品系之遺傳歧異性. 稻江學報 4 (2): 1-15.
- Adesola, O. F., M. O. Awodiran, F. Olaleye and J. I. Awopetu (2020) Genetic characterization based on RAPD-PCR in cultured strains of *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae). Genet. Aquat. Org., 4(2): 81-88.
- Aflalo, E. D., T. T. T. Hoang, V. H. Nguyen, Q. Lam, D. M. Nguyen, Q. S. Trinh, S. Raviv and A. Sagi (2006) A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 256(1-4): 468-478.
- Al-Khafaji T. Y, M. S. F. Ziyadi and M. K. Musad (2019) DNA fingerprints of two tilapia fish species of Euphrates River at Governorate of Al-Muthanna

- using RAPD markers. Eng. Technol. J., 37(3): 345-349
- Eknath, A. E., M. M. Dey, M. Rye, B. Gjerde, T. A. Abella, R. Sevilleja, M. M. Tayamen, R. A. Reyes and H. B. Bentsen (1998) Selective breeding of Nile tilapia for Asia. Proc. 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 27: 89-96.
- Fu, G. and Y. Yuna (2022) Phenotyping and phenomics in aquaculture breeding. Aquacul. Fish., 7(2): 140-146.
- Haibin, Z., L. Xiao, Z. Guofan and W. Chunde (2007) Growth and survival of reciprocal crosses between two bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck. Aquaculture, 272: S88-S93.
- Hassanien, A. H., R. M. Abou Zied, A. K. Eldeeb (2020) Genetic divergence and phylogenetic relationship among three species of mullet inferred from RAPD markers in Egypt', Egypt. J. Aquat. Biol. Fish., 24(3): 389-401.
- Hedgecock, D. and J. P. Davis (2007) Heterosis for yield and crossbreeding of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 272: S17-S29.
- Liu, F., W. Zhan, Q. Xie, B. Lou, M. Han, W. Xu and S. Tao (2022) First genetic evaluation of growth traits in *Larimichthys polyactis* to guide the formulation of selective breeding programs. Aquaculture, 554: 738141.
- Luo, X., C. Ke, W. You, D. Wang and F. Chen (2010) Molecular identification of interspecific hybrids between *Haliotis discus hannai* Ino and *Haliotis gigantea* Gmelin using amplified fragment-length polymorphism and microsatellite markers. Aquac. Res., 41(12): 1827-1834.
- Mahboob, S., K. A. Al-Ghanim, F. Al-Misned, H. F. A. Al-Balawi, A. Ashraf and N. M. A. Al-Mulhim (2019) Genetic diversity in tilapia populations in a freshwater reservoir assayed by randomly amplified polymorphic DNA markers. Saudi. J. Biol. Sci., 26(2): 363-367.
- Malina, A. C., A. A. Husain, A. R. Annisa, I. A. K. Kadriah and A. Alimuddin (2021) Genetic variation in the Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) from Wallacea region estimated using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. In IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, IOP Pub., Vol. 763(1): 012010.
- Megbowon, I. (2019) Genetic evaluation of some tilapiine fishes using varying RAPD markers. Int. J. Fisheries and Aqu. Stu, 7(4): 275-279.
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 3321-3323.
- Nei, M. and W. H. Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. PNAS, 76(10): 5269-5273.
- Omer, O. M., A. E. W. H. Abdalla and Z. N. Mahmoud (2020) Genetic diversity of two tilapia species (*Oreochromis Niloticus* and *Sarotherdon Galilaeus*) using random amplified polymorphic DNA. Open Biol., 8(1): 22-28.
- Parvez, M., M. Sarower, M. Hasan, S. Debnath, S. Aktar and M. Ahsan (2021) Monitoring of genetic variation in mono-sex tilapia stocks using randomly amplified polymorphic DNA markers in some private hatcheries of Bangladesh. Egypt. J. Aquat. Biol. Fish., 25(1): 1017-1030.
- Patra, G., J. Mohanty, S. K. Garnayak, P. K. Sahoo and B. R. Pillai (2015) Genetic variations among families of selectively bred *Macrobrachium rosenbergii* (de man) by RAPD-PCR analysis. J. Aqua., 23: 17-36.
- Radona, D., I. I. Kusmini, M. H. F. Ath-thar, S. Sundari and R. Gustiano (2018) Genetic diversity of three generations tinfoil barb *Barbonymus schwanenfeldii* (Bleeker 1854) from West Kalimantan, Indonesia. Int. J. Fish Aquat. Stud., 6(4): 111-114.
- Ray, S., S. M. R. Hossain, U. Kumar, S. K. Biswas, A. K. Ghosh and M. G. Sarower (2022) Genetic variation of wild and hatchery populations of the mrigal Indian major carp (*Cirrhinus cirrhosus*) conferred by RAPD markers. AACL Bioflux., 15(4): 2132-2141.
- Xu, F., G. Zgang, X. Liu, S. Zhang, B. Shi and X. Guo (2009) Laboratory hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. sikamea*. J. Shellfish Res., 28(3): 453-458.
- You, W. W., C. H. Ke, X. Lou and C. H. Wang (2009) Growth and survival of three small abalone *Haliotis diversicolor* populations and their reciprocal crosses. Aquac. Res., 40(13): 1474-1480.
- Zhang, H., X. Liu, G. Zhang and C. Wang (2007) Growth and survival of reciprocal crosses between two bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck. Aquaculture, 272: S88-S93.
- Zhang, Y., Z. Wang and X. Yan (2012) Laboratory hybridization between two oysters: *Crassostrea gigas* and *Crassostrea hongkongensis*. J. Shellfish Res., 31(3): 619-625.

Using Random Amplified Polymorphic DNA to Study Historical Genetic Variation in the Abalone (*Haliotis diversicolor*)

Jin-Lien Du*, Huei-Jen Ju, Zi-Wen Wang, Yi-Hsuan Huang, Chen Yu and Fu-Sheng Tseng

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The small abalone (*Haliotis diversicolor*) is an extremely distinctive cultured species in Taiwan. The present study used the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique with the P3 locus pattern, to compare the genetic variation of small abalone collected from 2008 to 2021. Early results showed that small wild abalone had 8-12 polyphenotypic amplification bands, primarily between 0.1 kb and 1.0 kb, whereas the polyphenotypic amplification bands of cultured small abalone were mostly 1.0 kb, 0.8 kb, and 0.65 kb. In addition, some cultured small abalone samples presented differences in band depth (e.g., copy number variation, CNV) and also showed band omission, indicating that the genetic variation and survival rate of cultured small abalone have declined as the result of constant artificial selection.

The industry has improved the survival rate of cultured seedlings by introducing abalones from other geographic populations, which demonstrates that it is feasible to enhance the genetic variation of species through hybridization and to subsequently strengthen the ability of organisms to adapt to a changing environment. However, the samples collected in recent years have begun to show a reduction in genetic diversity and a trend in homogeneity of genetic variation.

In summary, this study demonstrated that genetic variation can be improved by selecting breeds with higher genetic variation for crossbreeding; however, the preservation, selection, and management of breeds with a higher degree of genetic variation are key factors for the success of this industry. Moreover, it is equally important to maintain and sustain the benefits of crossbreeding, in order to promote excellent breeding performance in the cultured organisms, including growth, cold tolerance, and heat resistance, among other factors.

Key words: small abalone, *Haliotis diversicolor*, genetic variation, random amplified polymorphic DNA (RAPD)

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung, Taiwan 202. TEL: (02)2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jl原因@mail.tfrin.gov.tw