出國報告（出國類別：實習）

水產生物分子遺傳育種技術

服務機關：行政院農業委員會水產試驗所
姓名職稱：鄭金華研究員
派赴國家：美國
出國期間：中華民國九十四年七月五日至九月四日
報告日期：中華民國九十四年十二月二日

摘要

本次研習爲參加經濟部國際合作處聯合技術協助訓練進修實施計畫，至美國研習「水產生物分子遺傳育種技術」，爲期六十天。主要目的在了解美國水產生物育種工作應用分子技術之研究發展現況，研習其目前已發展中之遺傳標記輔助育種之技術，並了解美國水產養殖產業發展現況、育種目標、研究重點、面臨之挑戰及未來之展望。本次研習地點以南加州大學生命科學系爲主。研習方式分爲與相關專家個別討論、實驗室研習與實作，及各繁殖場、養殖場的田間參訪等。本次研習主題鎖定在水產生物的分子輔助育種並與傳統育種作比較，並兼顧美國水產養殖產業現況及當前研究之重點。本次研習對美國分子技術輔助育種應用、水產養殖發展現況及研究資訊有充分之探討與交流，對國內水產養殖研究極有助益及啓發。

目　次

摘要----------2
目次----------3
目的----------4
過程----------5
心得----------5
建議事項----------10

目的

台灣水產種苗生產技術在國際上具有領先地位，尤其台灣以亞熱帶品種爲主，更是具有優勢。台灣因地小人多，較適合資本與技術密集的產業，水產種苗生產正是水產養殖業中符合上述條件的產業。有鑑於此，政府大力推動水產種苗生產專區，以優質的水產種苗外銷亞熱帶地區，以提昇我國加入 WTO 後在水產養殖業的競爭力。爲提高水產種苗的品質、並保持我國水產水產種苗的競爭優勢，逐年進行育種，是不可或缺的工作。爲此，水產試驗所近年來積極籌建的國家水產生物種原庫，其中鹿港與澎湖的硬體工程即將完工，95 年度即能正式運作。屆時將可逐年進行重要養殖種類的種原保存與利用，將可直接促進水產種苗生產的發展。

國家水產生物種原庫設立的目的在於保存重要經濟水產生物的優良基因，並應用於實際生產，以達到降低成本、增加利潤的目標。爲此，首先必須建立欲保存之水產生物之遺傳特性以作爲保存種原之依據，並建立性狀及其基因的資料庫。除了繼代培養，尙須建立欲保存種原之永久保存技術，如配子、胚體、細胞、組織的培養與超低溫冷凍保存等。保存之種原除了可直接提供生產所需外，尙可進一步利用遺傳育種與基因轉殖等技術，進一步提昇品種或單株的形質及其經濟利益。

遺傳育種在許多農藝、園藝及畜產作物均有良好的基礎與成果。以玉米爲例，經過 100 多年來不斷地雜交育種，雜交優勢使得玉米的生產力提昇約 5 倍；而雞、牛、豬的成長速度則在近 50 多年來分別提昇 1.8、1.5、1.1 倍。至於水產生物則還在起步的階段。台灣的水產養殖業雖然很發達、技術很先進，產量大、產值也高，但是對於養殖種類的育種卻遲無進展。其中的原因主要是台灣的水產養殖種類多，且多爲本地種，歐美等先進國家並無相關之研究，國內長期以來也欠缺相關之研究。

本次進修內容以水產生物先進之分子育種技術爲主，傳統育種技術爲輔。研習地點以南加州大學，生命科學系遺傳學教授 Dr. Hedgecock 之實驗室爲主。觀摩行程及訪問對象則以加州附近之水產生物之研究單位以及私人繁、養殖場爲主。。進修期間包括觀摩行程，爲期二個月。

因爲分子生物與生物資訊的相關技術在近年來快速地發展，使得利用遺傳標記輔助育種(Marker Assisted Selection)的應用條件已逐漸成熟。因此本次研習希望能了解美國水產育種界目前實際的遺傳標記輔助育種技術發展及應用現況，以供國內將來相關應用之參考。另一方面我國近年與美國水產試驗研究單位較少交流連繫，因此希望利用本次研習參訪之機會，了解美國水產界研究發展近況，並有助於彼此了解。

過程

本次前往美國研習共爲期六十天(94 年 7 月 5 日至 94 年 9 月 4 日)。研習地點以位於洛衫磯的南加州大學生命科學系爲主。該系遺傳學教授 Dr. Dennis Hedgecock 利用該校放暑假之空檔特地爲本人安排二個月的密集訓練，訓練項目包括 DNA 分析技術、基因圖譜建構技術、遺傳標記與計量遺傳在育種上之應用以及育種計畫之擬定與執行。並於星期假日安排觀摩實習活動。礙於出國三個月以上始得報支差旅費用之規定，上述觀摩實習活動均以自費進行。觀摩實習活動包括位於 Catalina Island 的美國南加州大學海洋實驗室(洛衫磯西方一小時車程與一小時船程)、位於 Carlsbad 之現代化大型海水魚種苗廠(洛衫磯南方二小時車程)、位於聖地牙哥之條紋鱸育種場(洛衫磯南方三小時車程)，位於 Coachella 之條紋鱸超級約養殖場(洛衫磯東南方三小時車程)，位於 Bodega Bay 的美國加州大學海洋實驗室(洛衫磯北方八小時車程)，位於西雅圖的二枚貝種苗廠(洛衫磯北方二小時飛程)，位於 Cayucos 之鮑魚繁養殖場(洛衫磯北方四小時車程)，位於阿拉巴馬州奧本大學之鯰魚育種中心，以及位於南卡洛利那州之 Waddell 海水養殖中心。

心得

美國的牡蠣養殖與育種：

Hedgecock 教授的實驗室以巨牡蠣(*Crassostrea gigas*)爲主要研究對象。巨牡蠣發源於日本海域，所以又稱太平洋牡蠣；因爲適合養殖，被世界各國大量引進，而成爲目前分布最廣，產量最大的水產養殖種類。目前，除了中國大陸及澳洲以外，世界上其他主要牡蠣養殖國家，均以巨牡蠣爲主要養殖對象；在 2003 年的總產量超過 437 萬公噸，總產值超過 36 億美金，是目前世界上產量與產值都排名第一的養殖種類。

美國西岸養殖巨牡蠣的種原是在1920年自日本引進的，在2003年的總產量超過4萬2千公噸，總產值超過3千5百萬美金，是美國西岸最重要的養殖種類，其產量與產值都超過總數60%。雖然供不應求，但是養殖海域受到都市化的限制，很難取得新的養殖執照。因此，爲了提高產量，唯有從提昇牡蠣生產力著手。因爲育種是提昇牡蠣生產力的最有效方法之一，所以被美國農業部西區水產養殖中心(Western Regional Aquaculture Center, WRAC)列爲最優先進行的工作。該中心自1996年起資助奧瑞崗州立大學及南加州大學進行種貝育種計畫(Molluscan Broodstock Program, MBP)。前者由Chris Langdon教授主持，負責牡蠣的種原保存與繼代培養；後者由Hedgecock教授主持，負責牡蠣的遺傳選育與核酸分析。該計畫亦邀集業者共同評估育種的成效並分享育種的成果。爲提高選拔子代生產力的評估效率與近親純種的雜交潛力，此計畫列舉五大工作目標：1. 由族譜牡蠣家族中利用同胞交配建立新的近親純種，利用微隨体分子遺傳標記確認親子

關係。2. 利用已建立之重複網袋養殖方法評估各近親純種以二變方距陣相互交配所產生之雜交子代之表現。3. 建立並評估牡蠣胚體與幼苗之冷凍保存方法以加速區域內之研究成果。4. 建立雜交子代的代謝表現或基因表現型式與成長到上市體型之間的關係,以證實優良的雜交子代不需要經由田間試驗就可以加以辨識的假說。5. 繪製近親純種的死亡基因與雜交優勢的計量性狀基因座圖譜，並利用其遺傳標記從近親純種種內與種間選育出最佳親貝。

該計畫的創始族群系由西岸五個不同海域所採集各 100 牡蠣所組成的。每年生產並評估 2 批各 50 個牡蠣家族的雜交子代。每一個新生家族都是由兩個不同家族的親代所產生的雜交子代。目前，育種的項目鎖定在生產力，生產力是成長與活存兩者加乘而來的。未來，育種的項目將包括呈色與風味。該計畫在 1998 選育出第一代高生產力牡蠣，目前已進入第三代，生產力平均每代提高 9.4%。另外，在這項計畫中亦發現兩個近親純種間的雜交子代呈現顯著的雜交優勢，其生產力較兩個純種親代都高出很多。南加州大學目前運用微隨体遺傳標記技術確認牡蠣雜交子代，建立牡蠣的基因連鎖圖譜。檢測程序中知 DNA 抽取發展成相當簡便之方式：利用一小片組織加入混合試劑即可抽出少量 DNA 供微隨体檢測，不需用傳統研磨抽取之繁瑣手續。PCR 產物則使用全自動之 96 孔核酸定序儀分析，電腦直接讀取分析數據，立刻得到 PCR 產物之核酸片段長度等資料。每天可分析數千個樣品，非常有效率。

台灣的牡蠣養殖：

牡蠣在台灣已經有三百年以上的養殖歷史了,而且一直是本省最重要養殖貝類。台灣養殖的牡蠣，平均養殖六個月就可採收；其成長快速，比起歐美的巨牡蠣(*C. gigas*) 養殖期間長達 2-4 年要快很多。台灣養殖的牡蠣採收的體型較小，主要是因應台灣牡蠣養殖方式以及台灣每年夏天颱風季節。台灣養殖牡蠣一般以牡蠣母殼之左殼作爲著苗之基質，每一母殼通常以附著 30 個苗爲標準，附著之牡蠣苗如果太多,不但影響成長且在未達上市體型就會因互相擠壓而脫落掉進海底。達到上市體型的牡蠣在颱風來襲之前若不加以採收或移到港灣內避風之處，也會因爲風浪太太，加上隔鄰牡蠣相互撞擊而掉落海底。若將達到上市體型的牡蠣放置在網籃中再加以飼養 2-4 個月，即可達到一般自歐美進口之帶殼單體牡蠣的體型。帶殼大型單體牡蠣上市前若以淨化處理，使之符合生食的衛生條件，則可大幅提高其售價。因此，台灣養殖牡蠣它不但可提供一般老百姓的家常菜，亦具有作爲五星級餐廳的高級美食的潛力。

台灣四面環海，最適於從事牡蠣養殖，牡蠣在海中養殖，不需要土地；牡蠣直接利用水域中的微細藻類，不必投餌。在世界人口持續增加，經濟持續發展的情況下，海產品之需求將成倍成長，增加養殖是唯一的解決途徑，尤其是增加不需要土地且不必投餌的貝類養殖。牡蠣養殖雖然如此重要，但是台灣牡蠣的研究非常少，爲改善目前的困境及因應將來的需求，加強牡蠣養殖技術改進的研究是非常必要的。若能利用人工苗同時進行遺傳育種，將可使台灣牡蠣養殖推向一個

新的里程碑。

分子遺傳標記：

個體間的血緣越相近，共同的對偶基因就越多，遺傳標記(DNA 指紋)就越相似。因此，遺傳標記可以用來作親子鑑定。更詳盡的遺傳標記甚至可以用來鑑定個體、品種以及雜交個體的品種組成。由遺傳的觀點來看，遺傳標記最大的好處在於提高選拔的正確度。配種時親代的遺傳資訊可由遺傳標記的確認而避免錯誤的發生。配種產生的子代的遺傳資訊也可由遺傳標記加以確認。如果大量的遺傳性狀與其遺傳標記的關聯性結合後，對商用品種來說，遺傳標記就成爲極爲珍貴的資料，因爲遺傳標記不但包含外觀或活體可測量的性狀，還包含活體不可測量如取肉率等，或不易測量的性狀如成長率、換肉率、抗病力、生殖力等。引進的種原之前也可由遺傳標記就能判別其所包含好的性狀與壞的性狀。進行配種時，利用親代的遺傳標記就能準確地預測雜交子代的性狀。利用遺傳標記也可以在雜交子代尚未長成前就將不含好性狀的個體淘汰。

可作爲分子遺傳標記的技術有很多種。例如：微隨体(microsarellite, or short sequence repeat, 微隨体)、隨機放大多型性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, or RAPD)、放大片段長度多型性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、限制脢切片段長度多型性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、單核酸多型性(SNP, single nucleotide polymorphism)等。其中微隨体是目前公認用途最廣的分子遺傳標記(O'connell & Wright, 1997)。其主要的原因在於微隨体具有高度的變異性、分怖均勻、同步顯性(co-dominant)、數量龐大、物種共通性強且可以用簡易 PCR 技術以及自動定序儀來分析。藉由微隨体的分析，可使選種更加快速且更加精確。

分子遺傳標記除了可以應用於標記輔助選拔(Marker Assistant Selection)，還可以應用於品種鑑定(stock identification)、親子鑑定(parentage testing)、系譜追溯(pedigree tracing)、族群間及品系間之親源及血緣關係分析、遺傳變異分析、雜交優勢(heterosis)分析、近親分析以及基因定位及其連鎖圖譜(linkage mapping)分析的研究。將所有遺傳標記整合於基因連鎖圖譜可以提高其功效。另外，遺傳標記也有可助於鑑別控制特定性狀的基因。因此，遺傳標記及其有用基因圖譜的研發將加經濟種類速優良品系的研發。不過，繁重複雜的工作需要多種領域的研究人員分工合作。

開發微隨体的方法簡述如下：將萃取後之 DNA 以限制脢(如 Sau3A)切割後，取片段長度 200-600 bp 者接上載體再轉殖到大腸桿菌中，然後以 DNA 探針(probe)篩選含有微隨体的菌落，最後將殖入的 DNA 進行定序分析。在 DNA 序列的兩端設計引子(primer)，再進行 PCR 測試是否適用。

標記輔助選拔：

標記輔助選拔(Marker Assistant Selection)就是在選拔配種之前利用遺傳標記

來得知配對者的基因型，以協助針對某一對偶基因的選拔，使選拔變得簡單、快速而正確。所謂遺傳標記就是與選拔性狀之對偶基因相連鎖的 DNA 指紋。可以作爲基因型的遺傳標記的數目正快速地增加。

利用微隨体於親源及血緣關係分析與基因定位及其圖譜分析上的研究，已廣泛被應用於人類、果蠅、線蟲及許多畜產。分子遺傳標記對水產動物更爲有用，因爲魚蝦貝類個體小，尤其是幼體，無法於體表烙上記號或將外加的標記物質植入體內。以微隨体作爲各子代的分子遺傳標記，再將數百個不同子代混合飼養在同一環境下一起評估其成長與活存，如此，不但可減少因隔離飼養所造成的設備及操作上的昂貴與不便，更重要的是可完全消除因隔離飼養所造成的環境效應。例如將 100 對虹鱒種魚之子代在同一魚池內養殖一年後，利用四組微隨体基因座分析，結果發現 91%之最大與最小體長之個體是由 100 對種魚中的 1～2 對所生產的子代。另外，微隨体亦廣泛地被利用在魚類基因圖譜分析上之研究，對象種包括吳郭魚、斑馬魚、大西洋鮭魚、虹鱒及鯉魚等。以吳郭魚爲例，目前已有 60 組微隨体基因座被發現；分離的基因座已分別被定位在遺傳圖上的 15 個連鎖群中。利用上述的分析方法也發現虹鱒耐高溫的基因座，與二個特定的微隨体基因座連鎖在同一條色體上；因此，利用這二個微隨体的分析，即可快速且精確地篩選出具有耐高溫基因的種魚。

近親純種的選育：

近親配種可增加子代的同質性，其中有優良基因，也有不良基因，如隱性基因或死亡基因。經由選拔只留下優良基因，不良的死亡基因會自動消失，而隱性基因則可人爲剔除。近親衰退的效應會隨著不斷地選拔而消退而消失。因此，高度近親配種可以達到基因淨化的效果。許多貓、狗、金魚的純種都是經由高度近親配種，不斷地剔除隱性不良基因得來的。

因此，應用近親配種可識別出之隱性不良基因，也可以增加子代的整齊性，便於純種的登錄。另外，近親配種也可以創造雜交優勢的機會，兩個近親純種間所產生的雜交子代若具有雜交優勢，則育種者只出售兩個近親純種之一的父系與另一的母系，或兩者的雜交子代而不用擔心智慧財產權受到侵犯。因爲第一雜交子代的雜交優勢最明顯，之後就快速遞減。因此飼育者會指定使用第一雜交子代，迫使繁殖者不斷地向育種者購買近親純種。

美國水產養殖基因體國家級計畫：

美國水產養殖基因國家級計畫(National Aquaculture Genome Projects)是動物基因體國家級計畫(National Animal Genome Project)的一個子計畫。而動物基因體國家級計畫則是由美國農業部研究教育推廣處(Cooperative State Research, Education, and Extension Service, CSREES)掌管，針對重要畜產及水產養殖種類之基因體進行基因定序、定位解析與繪製基因體圖譜。除此之外，動物基因體國家級計畫自 1992 起每年元月固定於聖地牙哥籌辦動植物基因體研討會(Plant and

Animal Genome Conference)，2006 年即將邁入第十四屆。水產養殖基因體國家級計畫每年在該研討會中籌辦水產養殖基因體工作討論會。主要的研究對象包括鯰魚、鮭魚、吳郭魚、條紋鱸、蝦、牡蠣等六種重要水產養殖種類。

美國動物種原計畫：

動物種原國家級計畫(National Animal Germplasm Program)系由美國農業部農業研究處(Agricultural Research Service, ARS)掌管，針對重要畜產及水產養殖種類之遺傳資源加以蒐集保存與利用以對將來食物及纖維提供供給有用的基因及基因群取得之最適管道，蒐集與保存的內容包括精液、胚體與細胞。

我國水產養殖種類育種之潛力：

台灣近五年來產值在前十名的養殖種類，除了鰻魚、石斑魚、虱目魚以外，吳郭魚、文蛤、牡蠣、九孔、草蝦、白蝦、泰國蝦都在一年以內到達成熟體型，而且人工繁殖的難度都不高，加上具有國際市場，因此非常適合進行育種。上述排名前十名的養殖種類每台斤單價超過 100 元者，除了鰻魚外，石斑魚、對蝦、泰國蝦、九孔都嚴重遭受到病毒性疾病的感染而產生大量死亡。因此，抗病品系的選育是澈底解決上述種類疾病問題的有效途徑。

針對上述重要魚介貝類，逐步進行保種及育種。每年一代、一代地持續選種、育種，培育出具有高成長、高生殖力及抗病力佳之優良品系，並逐年提高各優良品系的品質與價值。育種相關技術與產品將可行銷全世界，其潛在的利益極爲龐大。台灣位處於亞熱帶，若及時發展重要水產種苗的保種與育種，並與的民間業者進行產學合作，將可達到將來營運自給自足、產官學相輔相成的效果，並使台灣的水產種苗生產永遠保持領先。爲此，應儘速發展水產生物遺傳育種相關的生物技術，並以既有的魚介貝類繁養殖技術爲基礎，配合現代生物技術，如基因轉殖、配子及胚胎冷凍保存、染色體操作、遺傳標記、以及疾病快速診斷等，以加速保種、育種成效的累積，並使智慧財產權得到保障。

育種計畫投資金額大、回收時間長，不是一般業者所能承擔。雖然如此，育種計畫的投資報酬率是很可觀的，以牛、羊、豬爲例，育種的投資報酬率在 5 倍至 50 倍之間。魚、蝦、貝類因爲生殖力，比牛、羊、豬高很多，加上管理成本較低，因此投資報酬率應更高。以挪威鮭、鱒魚的育種計畫爲例，挪威在 1975 年開始進行鮭、鱒魚育種計畫，1985 年起成爲國家級計畫。目前以民間養殖業者爲經營主體，已成功地培育出 240 個鮭魚品系及 120 個鱒魚品系。此項計畫每年均對這些品系進行成長、抗病、晚熟及肉質之評估，每年花費經費約 300 萬美金，每年因此育種計畫而獲益的金額則爲 4,500 萬美金，投資報酬率爲 15 倍(Gjedrem, 1997)。台灣養殖的魚介貝類大多不到一年就性成熟，較鮭、鱒魚之四年及二年要短得多，另外，台灣養殖的介貝類的生殖力也比鮭、鱒魚高得出，因此這些的育種計畫，不但投資成本將較低，且回收也將較快。

建議事項

1. 台灣重要養殖的魚介貝類大多不到一年就性成熟，非常適合進行育種。其中又以牡蠣最容易，應列爲優先考慮的對象種。
2. 育種工作需要長期不斷地研發，需要許多人力、設備與經費，更需要產業界的配合。因此育種計畫要非常嚴謹，人力、經費要充分支援。
3. 配子、胚體、細胞、組織的培養與超低溫冷凍保存等種原保存相關技術應一併研發。基因轉殖、染色體操作、遺傳標記、以及疾病快速診斷等現代生物技術，也應一併研發，以加速育種成效的累積，並使智慧財產權得到保障。冷凍保存等種原保存相關技術及遺傳標記等育種相關技術應一併研發。
4. 標記輔助選拔，可使選種更加快速且更加精確，應即早加入各育種計畫中，相關之技術應儘速研發確立。
5. 當控制特定性狀的基因被發現後，才是標記輔助選拔之真正使用時機。因此進行育種的初期應先建立品系，詳細評估比較各品系間在各項性狀的差異。在建立品系時可加入遺傳標記以進行親子鑑定、系譜追溯及近親分析。