

台灣櫻花鉤吻鮭種內基因多樣性之研究

摘要

由於目前我國珍稀寶貴的國寶魚 - 台灣櫻花鉤吻鮭 (*Oncorhynchus masou formosanus*) 歷年的放流效果不明，因此極需要發展出一套可靠的調查技術來評估放流之成效，同時能持續監控整個台灣櫻花鉤吻鮭族群的經時遺傳結構的演變。建立台灣櫻花鉤吻鮭親子鑑定之技術，可以廣泛應用於每年的保育工作及各項後續的研究，尤其是評估及監測人工復育台灣櫻花鉤吻鮭放流之成效。

為求對國寶魚的傷害減低至最小，因此採用魚體身上之魚鱗與脂鱗為抽取基因組(Genomic)DNA 之材料。首先利用黑鯛為練習對象，研究抽取基因組 DNA 及尋找可攫取到黑鯛微衛星(microsatellite) DNA 之引子(primer)的技術。其次根據微衛星 DNA 種原相似性的原理，我們採用種原相近魚種(大西洋鮭魚、虹鱒)已發表的 6 對引子嘗試去攫取台灣櫻花鉤吻鮭的微衛星 DNA。

本計畫敘述從黑鯛和台灣櫻花鉤吻鮭微量樣本(鱗片、鱗、精液、體表黏液)即可抽取到基因組 DNA 之技術；同時也找到 2 對可攫取到台灣櫻花鉤吻鮭基因組 DNA 中的微衛星 DNA 之引子。

關鍵詞：台灣櫻花鉤吻鮭、微衛星 DNA、引子、遺傳、復育。

內政部營建署雪霸國家公園管理處九十一年度研究報告

台灣櫻花鉤吻鮭

(Oncorhynchus masou formosanus)

種內基因多樣性之研究

Studies on the intraspecific gene diversity of

Formosan landlocked salmon

(Oncorhynchus masou formosanus)

執行單位：內政部營建署雪霸國家公園管理處

研究機構：國立臺灣海洋大學水產養殖系

研究主持人：郭金泉

研究人員：郭孟杰

中華民國九十一年十二月三十一日

目次

摘要	2
一、前言	3
二、研究材料與方法	9
三、結果	14
四、討論	15
五、誌謝	19
六、參考文獻	20
圖與表	22

摘要

由於目前我國珍稀寶貴的國寶魚 - 台灣櫻花鉤吻鮭 (*Oncorhynchus masou formosanus*) 歷年的放流效果不明，因此極需要發展出一套可靠的調查技術來評估放流之成效，同時能持續監控整個台灣櫻花鉤吻鮭族群的經時遺傳結構的演變。建立台灣櫻花鉤吻鮭親子鑑定之技術，可以廣泛應用於每年的保育工作及各項後續的研究，尤其是評估及監測人工復育台灣櫻花鉤吻鮭放流之成效。

為求對國寶魚的傷害減低至最小，因此採用魚體身上之魚鱗與脂鱗為抽取基因組(Genomic)DNA 之材料。首先利用黑鯛為練習對象，研究抽取基因組 DNA 及尋找可攫取到黑鯛微衛星(microsatellite) DNA 之引子(primer)的技術。其次根據微衛星 DNA 種原相似性的原理，我們採用種原相近魚種(大西洋鮭魚、虹鱒)已發表的 6 對引子嘗試去攫取台灣櫻花鉤吻鮭的微衛星 DNA。

本計畫敘述從黑鯛和台灣櫻花鉤吻鮭微量樣本(鱗片、鱗、精液、體表黏液)即可抽取到基因組 DNA 之技術；同時也找到 2 對可攫取到台灣櫻花鉤吻鮭基因組 DNA 中的微衛星 DNA 之引子。

關鍵詞：台灣櫻花鉤吻鮭、微衛星 DNA、引子、遺傳、復育。

一、前 言

自從 1950 年以來，由於分析蛋白質和 DNA 技術的進步和漸趨完善，使族群遺傳 (population genetics) 學家能夠藉由觀察分析大量的基因座 (locus)，和各個基因座的多形性 (polymorphism) 說明遺傳多樣性 (genetic diversity)。所以從 1980 年代開始因為分子遺傳學 (molecular genetics) 可以從研究基因的表達 (expression) 過程和變異的情況來分析生物學性狀的發生和形成的機制，為遺傳育種學家提供了既明確又實用的分子遺傳標記 (molecular genetic markers) 來輔助育種 (marker assisted selection) 及追蹤遺傳變異工作的進行，因此分子遺傳學開始廣泛的應用於魚類遺傳育種 (genetic and breeding) 和水產資源的經營管理 (Allendorf and Ryman 1987 ; Wright 1993 ; Carvalho and Pitcher 1995 ; Takagi et al., 1997 ; O'Connell and Wright 1997 ; Perez-Enriquez and Taniguchi 1999 ; Taniguchi 1999 ; Takagi 2001)。

由於 DNA 是遺傳物質的載體，但並非所有的 DNA 序列都能編碼蛋白產物。脊椎動物 (包括魚類在內) 的基因組中，僅有 1 % 的序列是司職調控和編碼必需蛋白的區域，這些區域包括基因的外顯子 (exon) 和調節區域 (regulatory region) 等，因而蛋白電泳分析僅能反映基因組中的極少數的變化 (Wright 1993 ; Carvalho and Pitcher

1995) 根據順序的特點, DNA 又被分為非重覆(non-repetitive)和重覆(repetitive)DNA。非重覆 DNA 指的是在單倍體基因組中僅存在一次的 DNA 順序, 有時又稱為單拷貝 DNA。重覆 DNA 指的是那些在基因組中存在幾個到幾千個重覆拷貝的 DNA 順序, 又稱為 VNTR (variable number of tandem repeat; 可變數目串連重覆) 或 HVR (hypervariable regions; 超變異區)。編碼 rDNA 和組蛋白的 DNA 順序, 重覆單位的長度 10~100 個(十至數十)核甘的小衛星(minisatellite)DNA, 重覆單位僅長 1~6 個核甘的微衛星(microsatellite)DNA 和一些非串連的重覆子皆屬於重覆 DNA (圖一)。因為微衛星 DNA 是共顯性(codomint)、遵守孟德爾遺傳定律(圖二)、量多、具多形性、分析簡易、只須微量樣本、而且不必犧牲樣本、可應用於相近物種、敏感度特強, 是目前廣泛應用於水產資源管理的分子遺傳標記(圖三、圖四、圖五; Wright 1993; O'Connell and Wright 1997; Takagi et al., 1997; Perez-Enriquez and Taniguchi 1999; Taniguchi 1999; Stead and Laird 2001)。微衛星 DNA 又稱為單一的序列重覆(simple sequence repeat; SSR), 由 1~6 個鹼基對串聯重覆形成。由於其兩端經常是相對保守的單拷貝序列, 故分析微衛星 DNA 的多形性及其遺傳標記時, 通常是在分離出選殖殖株(clone)特定的微衛星 DNA 後, 據其兩端的序列設計一對特異引

子 (primer ; 啟動子) , 然後經 PCR 擴增、電泳後 , 來顯示和分析由於重覆次數有異的不同基因型個體間的多形性及其特異性。微衛星 DNA 的分離步驟是首先將酵素分解的基因組 DNA 經瓊脂膠分離後 , 切下特定大小(一般在 300~600bp 之間)的 DNA 帶 , 回收得到 DNA 後 , 將回收的 DNA 連接到特定的載體上 ; 然後轉化細菌 , 構建出含有部分基因組 DNA 的基因庫。再用特定重覆的探針 , 如 AT(n)等去呈現和篩選含有相對應微衛星 DNA 的殖株 , 獲得的陽性殖株經測序後 , 依據其微衛星 DNA 重覆序列兩端的互補序列 , 設計出用於聚合酵素連鎖反應 PCR 擴增分析的引子 (Wright 1993; O'Connell and Wright 1997 ; Takagi et al., 1997; Perez-Enriquez and Taniguchi 1999 ; Taniguchi 1999 ; Stead and Laird 2001)。

在魚類染色體工程和基因工程育種分析中 , 分子標記也是一項至關重要的評價體系。例如 , 人工雌核發育 (gynogenesis) 操作中精子輻射照射時間和劑量的改變 , 能允許完整精核或精核的部分遺傳物質整入雌核發育群體 (Carter et al., 1991)。Carter 等 (1991)發現在吳郭魚的人工雌核發育個體中 , 用微衛星 DNA 標記檢測到有父系精子小片段遺傳物質的滲入。在魚類基因轉移育種工作中 , 轉移基因的整合、表達和遺傳都有賴於 DNA 的分子技術去分析和評價 , 顯然 , 這是同工酵素標記技術所無法達到的 (Wright 1993 ; Taniguchi

1999)。

行政院農業委員會於 2000 年 4 月 10-13 日在台中縣集集鎮行政院農委會特有生物研究保育中心召集台灣、美國、加拿大、日本等專家學者及政府相關部門人員共五到六十人舉辦台灣櫻花鉤吻鮭保育研究國際研討會 (Workshop on conservation of the Taiwan masou salmon *Salmo(Oncorhynchus) masou formosanus* (Jordan and Oshima) 2000)。當年經由腦力激盪，群策群力，而擬出有具體時間表、踏實、可資評鑑的行動策略，堪稱是台灣保育歷史 (淡水魚類) 的一個里程碑。會後的結論甚至還以英文洋洋灑灑發表並刊登在美國重要的水產雜誌 - 漁業 (Fisheries) 昭告天下 (Healy et al., 2001)。茲摘錄部分決議之行動策略重點於下：『本研討會研議的「保育行動策略」，是結合國外鮭鱒魚類專家及國內真正關心台灣櫻花鉤吻鮭、真正希望解決台灣櫻花鉤吻鮭困境的專家學者集思廣益產生的結晶。研討會的結束絕不是一場學術大拜拜的休止符，而是台灣櫻花鉤吻鮭魚保育工作全新的開始，台灣保育史的另一個新里程碑。政策委員會及技術委員會在台灣櫻花鉤吻鮭的保育工作上將扮演相當吃重的角色，我們亟待主管機關儘速成立，未來能透過前揭二委員會發揮跨部會整合有限資源的功能，逐步落實與充實保育工作，徹底解決台灣櫻花鉤吻鮭的生存困境，為國寶魚打造永續生存的美麗未來。

為了達成上述總目標及工作目標，櫻花鉤吻鮭的復育策略 (Restoration strategy) 和工作項目 (Tasks) 如下：一、復育策略：為了台灣櫻花鉤吻鮭族群的復原並預防其絕種，復育策略有三，包括：保育養殖場之建立、棲地之復原、衛星族群之建立，其工作項目如下：

冷凍精液保存 (Semen cryopreservation)：為保存遺傳特性並預防族群滅絕，現階段應建立冷凍精液保存設備，未來更應發展魚卵或胚體的凍結保存技術。

養殖方法 (Culture methods)：於保育養殖場內維持能完成生活史的櫻花鉤吻鮭人工族群，在台灣仍在試驗階段。養殖技術與試驗研究需要密切結合，若欲吸取鮭鱒魚類人工繁養殖經驗與技術，可向美、日等國參觀與學習，或請國內、外專家學者協助。

放流與監測 (Release and monitoring)：七家灣溪櫻花鉤吻鮭放流已有10年之久，但卻無監測放流後仔魚之存活率及評估對野生族群之貢獻。在此建議保育養殖場開始運作前五年繁殖之仔魚不予放流，先作為建立人工養殖族群之用(第一優先)。人工養殖族群建立後能產生大量仔魚時才開始進行人工放流。放流魚類須進行標誌，俾利監測放流後在自然溪流中之生存率及死亡率，以判定對野生族群之貢獻，避免盲目放流。另亦同時研究放流仔魚最適大小、時間及位置，以提高放流生存率。』(Healy et al., 2001)。本計畫依據行政院農業委員會於2000年4月10-13日在台中縣集集鎮行政院農委會特有生物研究保育中心

召開之櫻花鉤吻鮭保育研究國際研討會的決議和共識，在雪霸國家公園境內的大甲溪流域七家灣溪進行建立櫻花鉤吻鮭 (*Oncorhynchus masou formosanus*)的分子遺傳標記調查。研究內容包括(1)尋找櫻花鉤吻鮭特有的分子標記 - 微衛星DNA ;(2)以上述微衛星DNA進行族群親子鑑定及族群的遺傳變異分析。(3)探討櫻花鉤吻鮭野外放流之效果。

二、研究材料與方法

(一)樣本採集與保存

實驗動物黑鯛(*Acanthopagrus schlegeli*)是於 2001 年 12 月採集自海洋大學水產養殖系濱海實習場，3 尾體長約 25 公分，成熟、外型健康之雄魚。台灣櫻花鉤吻鮭(*Oncorhynchus masou formosanus*)則是採集自 2002 年 3 月至當年 12 月期間於雪霸國家公園武陵農場復育場人工養殖過程中死亡的仔稚魚 (fry)。台灣櫻花鉤吻鮭魚隻樣本大小約 3~4 公分共 60 尾。樣本採獲後暫時置於 95%酒精中，運回實驗室後保存於-20 冷藏櫃。

(二)粹取基因組(genomic) DNA

實驗時每次取黑鯛的鱗片 (1、2、3 片) 精液 (25、50、100 μ l) 及體表黏液 (50、100、200、300 μ l) 粹取微量樣本之基因組 DNA。每次則取櫻花鉤吻鮭鱗片 (4、5、6 片) 脂鰭 (0.005、0.008、0.010 公克) 作為粹取基因組 DNA 用。於研鉢中添加 300 μ l 無菌水 (2 次蒸餾水再經高溫高壓滅菌) 研磨鱗片和脂鰭把之磨碎。精液、體表黏液則直接加入 300 μ l Rare DNA Reagent(I) 後靜置 5 分鐘。再加入 600 μ l Phenol/C/I (25:24:1) 後離心 (12,000 rpm) 10 分鐘，取出上層液。加入 300 μ l Isopropanol 後再離心 (12,000 rpm) 10 分鐘。倒出液體，只留下 DNA 的 pellet (顆粒物)。隨後加入 500 μ l 70 %

ETOH , 沖洗 1~2 次。將 pellet 置於真空恆溫乾燥器 (Anguilla AVHD03 , 台灣蛋白體生技公司,Taipei, Taiwan) 中 , 於 4 °C 下真空抽氣至乾燥為止。最後加入 50 μ l 1X TE 溶液(10mM Tris-Cl , 1mM EDTA , PH = 8.0) , 同時為去除樣品中的 RNA , 再加入 RNase 1 μ l (20m/ml , Promega Corp.)作用 , 即得到粗萃取的基因組 DNA , 保存於-20 °C 冷藏櫃中 , 供後續研究使用。

(三)在洋菜膠體進行電泳檢視基因組 DNA 片段

以 1X TBE 電泳緩衝液(Tris base,90mM ; boric acid,90mM; EDTA,2mM ; pH 8.0)配製 0.8~2%之洋菜膠體(Seakem LE Agarose, FMC, Maine, USA)。取 1~5 μ l DNA 溶液加入 1 μ l 6X loading dye (bromophenol blue,0.252% ; glycerol,30%) , 在石蠟封膠(parafilm)上以微量吸管混合均勻。加至製備好的膠體中 , 以電壓 (100V,30 分鐘)進行電泳。電泳完畢後 , 將膠體浸於 ethidium bromide (0.5 mg/ml) 中染色 5~10 分鐘 , 在 300 nm UV 燈 (UVB-101, Apices Scientific Co., Ltd, MA, USA) 下檢視 DNA 片段 (band)。

(四) 以 DNA 聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction; PCR)

引子攫取目標 DNA (微衛星 DNA)

將以下五種物質：DNA 聚合酵素(polymerase),2units ; 10X reaction buffer,10 μ l ; 2.5mM dNTP Mixture,8 μ l ; DNA template, 1 μ g ; 引子 U,0.2~1.0 μ M ; 引子 L,0.2~1.0 μ M 混合於 0.5 ml 微量離心管中 , 再覆蓋一層礦物油 (mineral oil Lot 49H0425, Sigma, MO. USA), 以 94 (a), 30 秒 (t1) 解開雙股螺旋(denature); 54 (b), 30 秒 (t2) 黏合(annealing,反應的溫度隨引子的不同而改變); 72 (c), 30 秒 (t3) 延長(extension)的反應條件 , 進行 30~35 個溫度和時間的循環反應 (圖六)。對每對引子 , 我們嘗試四個 (a) 的溫度 (92、93、94、95) , 五個 (t1) 的時間 (20、30、40、50、60) , 九個 (b) 的溫度 (48、49、50、51、52、53、54、55、56) , 五個 (t2) 的時間 (20、30、40、50、60) , 三個 (c) 的溫度 (72、73、74) , 和五個 (t3) 的時間 (20、30、40、50、60) , 所有的排列組合共有 13,500 個。但是一旦某個組合有產生聚合酵素連鎖反應 PCR 產物 , 就以那個組合的條件作為該對引子的聚合酵素連鎖反應 PCR 條件。

我們採用 Takagi 等(1997)為鯛科加臘 (*Pagrus major*) 所設計的五對引子 (Pma1、Pma2、Pma3、Pma4、Pma5) 當黑鯛攫取微衛星 DNA 的引子。台灣櫻花鉤吻鮭則使用大西洋鮭魚(*Salmo salar* ;

Atlantic salmon) 的 3 對引子(SSOSL311、 SSOSL417、 SSOSL436 ; Martinez et al.,2000) 和 Morris 等(1996)在虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss* ; rainbow trout) 所使用的 3 對引子(PuPuPy, Omy77、 2U)。 DNA 聚合酵素連鎖反應的條件完全按照上述文獻所述。

引子委託波仕特生物科技公司 (台北、 台灣) 合成 , 其序列如下 :

大西洋鮭魚

Oligo Nr	Type	Purification		Name	Sequence:(5'-3')	Size	Epsilon 1/(mMcm)	MW g/mole	Qty/tube		Concentration		Tm
		Desalt							OD	nmoles	μ M	μ g/μl	
189843	DNA	X	CHRO	SSOSL311U	5'-TAGATAATGGAGGAAGTGCATTCT-3'	24	244.3	7412	2.0	8.2	80	0.59	51
189844	DNA	X	CHRO	SSOSL311L	5'-CATGCTTCATAAGAAAAGATTGT-3'	24	249.2	7380	2.0	8.1	73	0.54	50
189845	DNA	X	CHRO	SSOSL417U	5'-TTGTTCAGTGTATATGTGTCCCAT-3'	24	230.8	7336	2.0	8.7	83	0.61	51
189846	DNA	X	CHRO	SSOSL417L	5'-GATCTTCACTGCCACCTTATGACC-3'	24	220.3	7220	2.0	9.1	91	0.65	56
189847	DNA	X	CHRO	SSOSL436U	5'-TAGTGTAGCGCCGATACGTCATA-3'	23	229.3	7060	2.0	8.7	156	1.1	54
189848	DNA	X	CHRO	SSOSL436L	5'-GAACCAGGGTGTTCAGAATGCT-3'	23	229.5	7100	2.0	8.8	172	1.22	56

虹鱒

Oligo Nr	Type	Purification		Name	Sequence:(5'-3')	Size	Epsilon 1/(mMcm)	MW g/mole	Qty/tube		Concentration		Tm
		Desalt							OD	nmoles	μ M	g/μl	
204796	DNA	X	CHRO	PuPuPyL	5'-GAGGGGGAGCATGCAGCGGATGTAGGGGA-3'	30	310.7	9502	2.0	6.4	60	0.57	76
204797	DNA	X	CHRO	PuPuPyU	5'-TTAAGTGAAAAGACGTAACCTACCTGTGTG-3'	30	305.6	9264	2.0	6.5	86	0.79	57
204798	DNA	X	CHRO	Omy77L	5'-GTCTTTAAGGCTTCACTGCA-3'	20	191.0	6080	2.0	10.5	161	0.98	58
204801	DNA	X	CHRO	Omy77U	5'-CGTCTCTACTGAGTCAT-3'	18	166.3	5438	2.0	12.1	195	1.06	52
204799	DNA	X	CHRO	2U	5'-AGATTTACCCAGCCAGGTAG-3'	20	204.2	6123	2.0	9.8	174	1.06	60
204800	DNA	X	CHRO	2L	5', -CATAGTCTGAACAGGGACAG-3 ,	20	205.0	6172	2.0	9.8	150	0.93	60

(五) 在洋菜膠體進行電泳檢視攫取微衛星 DNA 片段

以 1X TBE 電泳緩衝液(Tris base,90mM ; boric acid,90mM ; EDTA,2mM ; pH8.0)配製 1~2%之洋菜膠體。取 1~5 μ l 聚合酵素連鎖反應 PCR 產物加入 1 μ l 6X loading dye(bromophenol blue, 0.252% ; glycerol,30%) , 在石蠟封膠上以微量吸管混合均勻。加至備製好的膠體中 , 以適當的電壓進行電泳。電泳完畢後 , 將膠體浸於 ethidium bromide(0.5 mg/ml)中染色 5~10 分鐘 , 在 300 nm UV 燈下檢視 DNA 片段。圖七是整個實驗步驟之流程圖。

三、結果

1、建立由微量樣本粹取基因組 DNA 的技術：

我們成功地從 3 尾鮮活黑鯛和 15 尾死亡的台灣櫻花鉤吻鮭微量樣本（鱗片、體表黏液、脂鰭、精液等細胞或組織）中抽取到足夠的基因組 DNA。黑鯛只需 1 片鱗片或 100 μ l 體表黏液或 50 μ l 精液即可粹取到足夠的基因組 DNA 以供分析（圖八；表一）。台灣櫻花鉤吻鮭死亡仔稚魚只需 5 片鱗片或 0.008 公克脂鰭即可粹取到足夠的基因組 DNA（圖九；表二）。

2、建立攫取黑鯛和台灣櫻花鉤吻鮭微衛星 DNA 之技術：

我們已能從魚隻微量樣本所粹取出的基因組 DNA，經由聚合酵素連鎖反應 PCR 後，成功地攫取到黑鯛和台灣櫻花鉤吻鮭的微衛星 DNA（圖十；表三、表四）。黑鯛的 5 對引子（Pma1、Pma2、Pma3、Pma4、Pma5）都成功地攫取到黑鯛的微衛星 DNA（表三）。大西洋鮭魚的 2 對引子（大西洋鮭魚 SSOSL311、大西洋鮭魚 SSOSL417）可成功攫取出台灣櫻花鉤吻鮭的微衛星 DNA，但是虹鱒的 3 對引子（虹鱒 PuPuPy、虹鱒 Omy77、虹鱒 2U）及大西洋鮭魚 SSOSL436 這 1 對引子卻無法攫取出台灣櫻花鉤吻鮭的微衛星 DNA（表四）。

四、討論

為了取得魚類的基因組 DNA，一般的做法是抽血或解剖犧牲魚隻後再摘取肝臟、腎臟、脾、腸與肌肉等組織或器官，磨碎後再進行粹取的程序 (Wright 1993 ; Carvalho and Pitcher 1995)。但由於櫻花鉤吻鮭為我國保育物種的珍稀國寶魚，必須要思考出一個不能犧牲魚隻而且對魚隻傷害最小的採樣方法。同時也必須兼顧建立一套快速簡便採樣微量 DNA 的技術，以便將來在野外進行採集時，對國寶魚的干擾和活存影響減少至最低。Takagi 等(1997)由鯛科的血液抽取基因組 DNA。Cummings and Thorgaard (1994)建議使用精液(25ul)抽取基因組 DNA。Pittman-Cooley and Tiersch (2000)則報導微量的凍結塘虱魚精液即可抽取足夠的基因組 DNA。抽血和採精都是可抽取大量優質 DNA 且比較不傷及魚隻之採樣方法 (Cummings and Thorgaard 1994 ; Takagi et al., 1997; Pittman-Cooley and Tiersch 2000)。在本實驗我們也同樣成功地從黑鯛微量的 (25ul) 精液抽取到足夠的基因組 DNA。但由於在本實驗由於台灣櫻花鉤吻鮭仔稚魚已經死亡因此不能抽血，其次仔稚魚的體型太小尚無法抽取到血液，再者仔稚魚也尚未成熟因此亦無精液可供採集。因此採其鱗片和脂鱗作為抽取基因組 DNA 之材料應是最不傷及台灣櫻花鉤吻鮭仔稚魚的魚隻之可行之計。台灣櫻花鉤吻鮭的雄成魚則可考慮以精液為粹取基

因組 DNA 的來源。

由於櫻鮭其分布僅侷限於西太平洋的日本、俄國、韓國及台灣，年產量以日本為大宗但也極有限 (Mayama 1990 ; Sanford 1990 ; 大熊 1991)，因此跟其他鮭鱒魚類比較，其對人類的重要性和各方面的研究報告並不多。尤其分子生物是近幾年來才開始蓬勃發展，櫻鮭的領域更是一片空白。陸封型台灣櫻花鉤吻鮭屬於櫻鮭是台灣的特有種，因此其基因組 DNA 之序列完全未知，有待探索。雖然微衛星 DNA 已是國際公認研究遺傳基因庫的重要標記，但開發具有種特異性 (species-specific) 的引子是相當昂貴且費時的 (Wright 1993 ; Carvalho and Pitcher 1995 ; Takagi et al., 1997)。幸好先前的研究已證實微衛星 DNA 基因庫在相近物種之間很保守，亦即相近的物種間若已開發一物種的引子，此引子也可以應用於其他相近的物種，即微衛星 DNA 具有種原相似性的性質 (Wright 1993 ; Brooker et al., 1994 ; Carvalho and Pitcher 1995 ; Taniguchi et al., 1997 ; Tseng et al., 2001)。例如，Taniguchi 等(1997)發現其設計的五對加臘魚引子也適用於相近的六個鯛科魚種。另外，Tseng 等(2001)亦證實日本鰻 (*Auguila japonica*)的六對引子可以適用於其他七種相近的鰻鱺科物種上。本實驗使用和台灣櫻花鉤吻鮭種原最相近的魚種 (大西洋鮭魚 ; 虹鱒 ; Sanford 1990) 的 6 對引子去攫取台灣櫻花鉤吻鮭的微衛

星 DNA，我們發現大西洋鮭魚其中的 2 對引子可成功攫取出台灣櫻花鉤吻鮭的微衛星 DNA，但是虹鱒的 3 對引子卻完全失敗。不能攫取出台灣櫻花鉤吻鮭微衛星 DNA 的大西洋鮭魚的 SSOSL436 引子和虹鱒的 3 對引子（虹鱒 PuPuPy、虹鱒 Omy77、虹鱒 2U）可能是聚合酵素連鎖反應 PCR 的條件不適必須再調整，或者是此四對引子具特殊種的特異性不適用於當作攫取台灣櫻花鉤吻鮭微衛星 DNA 的引子，或是需要尋找其他適合攫取台灣櫻花鉤吻鮭微衛星 DNA 的引子，則值得進一步探討。

雖然大西洋鮭魚的兩對引子可攫取出台灣櫻花鉤吻鮭的微衛星 DNA，但是尚需在更多（100 尾）的台灣櫻花鉤吻鮭魚隻上試驗以確認其有辨別個別台灣櫻花鉤吻鮭魚隻的能力（Awise 1994；Takagi et al., 1997；Taniguchi 1999）。此外本實驗使用洋菜膠體進行電泳檢視攫取微衛星 DNA 片段，其解析度尚待提昇。今後應該嘗試使用解析度更高，例如蛋白質（acrylamide gel）或序列（sequencing gel）電泳的方法，以證實此兩對大西洋鮭魚的引子切實具有辨別個別台灣櫻花鉤吻鮭魚隻的能力（Morris et al., 1996；Takagi et al., 1997；Martinez et al., 2000）。

其次單一對引子尚不足以達到鑑定台灣櫻花鉤吻鮭親子的關係，要達到 99% 的親子鑑定的程度，必須要有 4 到 5 對引子，也即其辨

識率接近 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ ，意即 2 個個體相同的機率是 1 億 7500 萬分之 1 (Takagi et al., 1997 ; Taniguchi 1999)。找尋更多能夠攫取到台灣櫻花鉤吻鮭微衛星 DNA 的引子是未來值得努力的方向。

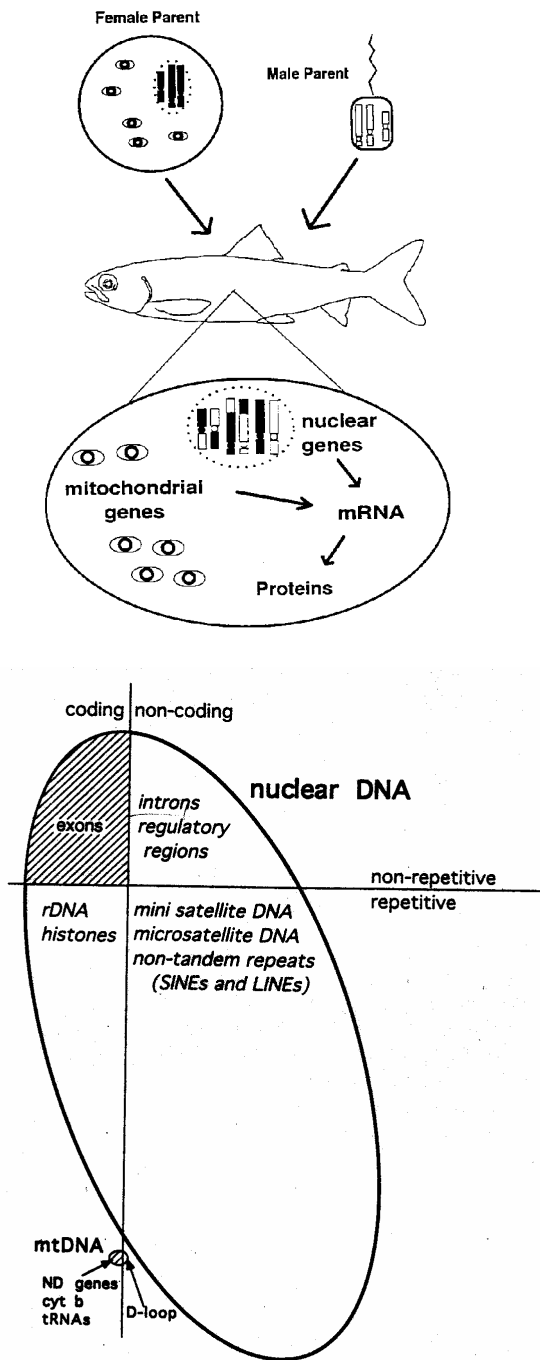
五、誌謝

本計畫進行期間，承蒙雪霸國家公園管理處處長、秘書、保育課諸兄姊（陳課長、于淑芬等）們的鼓勵、警察隊和武陵農場遊客中心全體同仁的幫忙、負責台灣櫻花鉤吻鮭人工養殖的廖林彥君與海洋大學水產養殖系低溫生物與育種實驗室全體成員的協助、海洋大學水產養殖系林正輝和陳榮祥教授、台灣大學動物系柯逢春、于宏燦教授、和師範大學生物系黃生、李壽先教授提供寶貴的建言和指教，才得以順利完成，在此一併致謝。

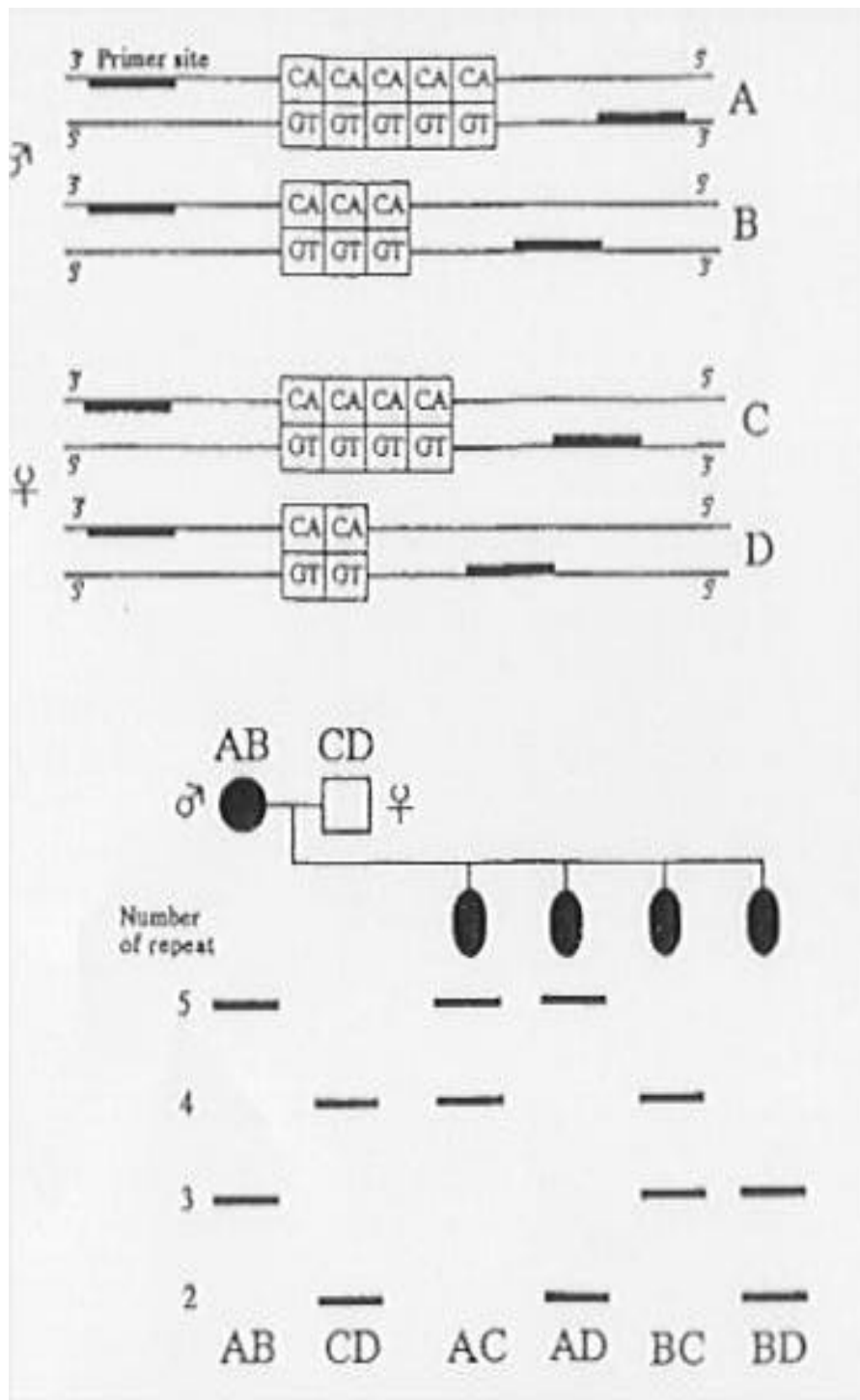
六、參考文獻

- 台灣櫻花鉤吻鮭保育研究國際研討會論文集。行政院農委會特有生物中心，內政部雪霸國家公園管理處主辦，2000。
- 大熊一正 (1991). Differences in scale characteristics taken from various parts of Masu Salmon, *Oncorhynchus masou* (Brevoort), and its scale development. *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, **45** 35-46.
- Allendorf, F.W. and Ryman, N. (1987). Genetic management of hatchery stocks, *Population Genetics and Fisheries Management* (eds N. Ryman and F. Utter), University of Washington Press, Seattle, pp. 141-60.
- Avise, J.C. (1994). Molecular Markers, Natural History and Evolution, Chapman and Hall, New York.
- Brooker, A., Cook, D., Bentzen, P., Wright, J.M. and Doyle, R.W. (1994). The organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **51** 1959-66.
- Carter, R.E., Mair, G.C., Skibinski, D.O.F., Parkin, D.T. and Beardmore, J.A. (1991). The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture*, **95** 41-52.
- Carvalho, G.R. and Pitcher, T.J. (1995). Molecular genetics in fisheries. Chapman & Hall, London, UK.
- Healy, M., Kline, P. and Tsai, C.F. (2001). Saving the endangered Formosa landlocked salmon. *Fisheries*. **26** 6-14.
- Mayama, H. (1990). Ecological notes on masu salmon. *Technical reports of Hokkaido salmon hatchery (Fish and egg)* **159** 7-21. (in Japanese)
- Morris, D.B., Richard, K.R. and Wright, J.M. (1996). Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53** 120-26.
- O'Connell, M. and Wright, J.M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **7** 331-63.
- Perez-Enriquez, R. and Taniguchi, N. (1999). Use of microsatellite DNA as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of red sea bream. *Fisheries Science* **65(3)** 374-79.

- Pittman-Cooley, L. and Tiersch, T.R. (2000). Isolation of DNA from cryopreserved fish sperm. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiana, pp. 310-13.
- Sanford, C.P. (1990). The phylogenetic relationships of salmonid fishes. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist(Zool)* **56(2)** 145-53.
- Stead, S.M. and Laird, L. (2001). Handbook of salmon farming. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.
- Taniguchi, N. (1999). Genetic diversity and its evaluation in fish and shellfish. *Aquabiology* **21** 280-89. (in Japanese)
- Takagi, M. Taniguchi, N. Cook, D. and Doyle, R.W. (1997). isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fisheries Science*. **63** 199-204.
- Takagi, M. (2001). Genetic and breeding studies on the hypervariable DNA markers in fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **67** 610-13. (in Japanese)
- Tseng, M.C., Chen, C.A., Kao, H.W., Tzeng, W.N. and Lee, S.C. (2001). Polymorphisms of GA/GT microsatellite loci from *Anguilla japonica*. *Marine Biotechnology*, **3** 275-80.
- Wright, J.M. (1993). DNA fingerprinting in fishes, in Biochemistry and Molecular Biology of Fishes (eds P.W. Hochachka and T. Mommsen), Elsevier, Amsterdam, pp. 57-91.

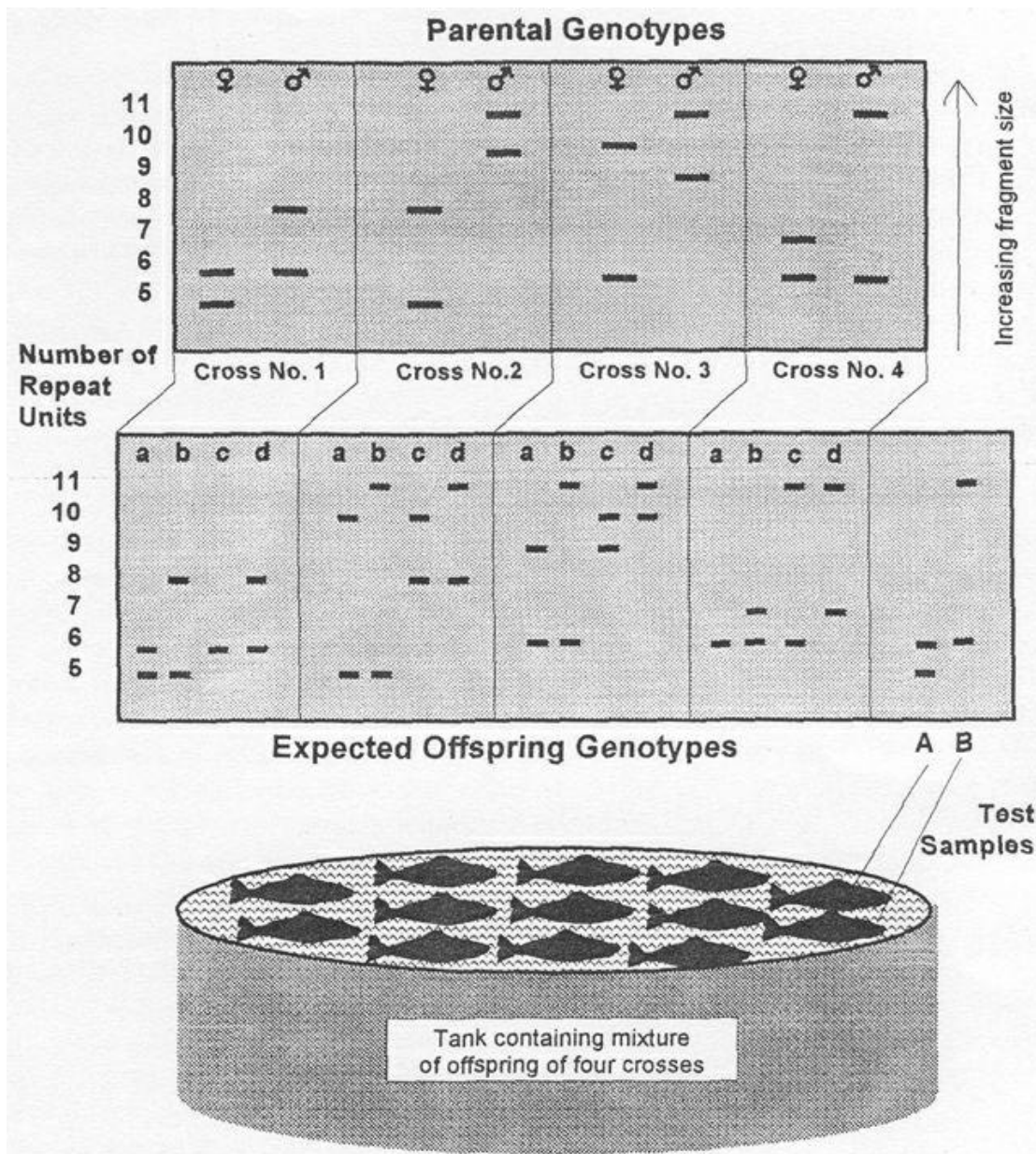


圖一：微衛星(microsatellite) DNA 是位於細胞核內的 DNA (nuclear DNA), 屬於非密碼(non-coding)DNA , 具有重複性(repetitive)。引用自 Carvalho and Pitcher (1995)。



圖二：微衛星 DNA 具共顯性 (codominant) 並且遵守孟德爾遺傳定律。

AB 雄 × CD 雌的子代只有四種可能的微衛星 DNA 組合：AC、AD、BC、BD)。引用自 Taniguchi 1999。



圖四：微衛星 DNA 是目前積極應用於水產資源管理的分子遺傳標記。可以廣泛地應用在各種種群或族群的遺傳分析、親子鑑定、基因組作圖和育種計畫。更可以作為探討養殖族群遺傳變異之減少、推定族群的近交係數、人工養殖族群的有效繁育族群數目等之評鑑。引用自 Stead and Laird 2001。

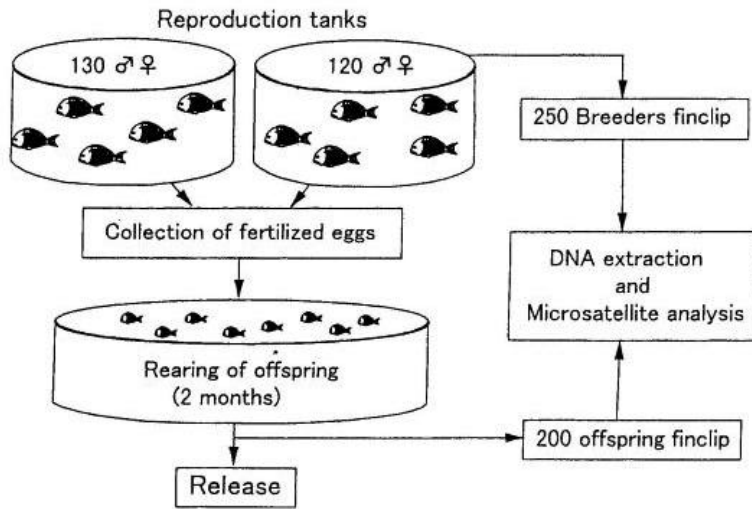
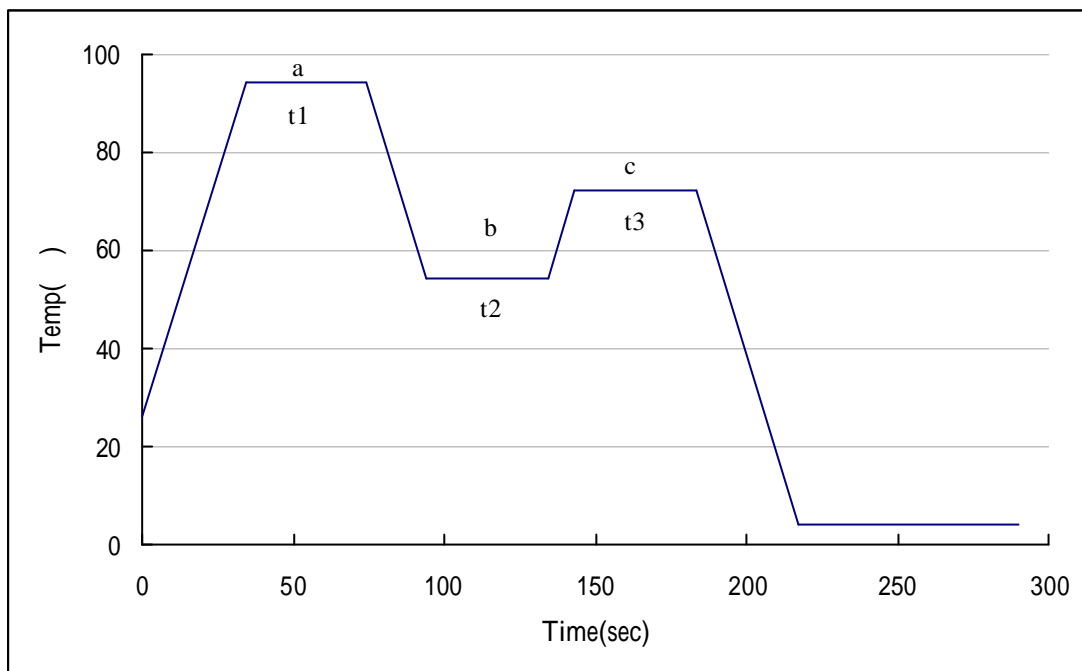
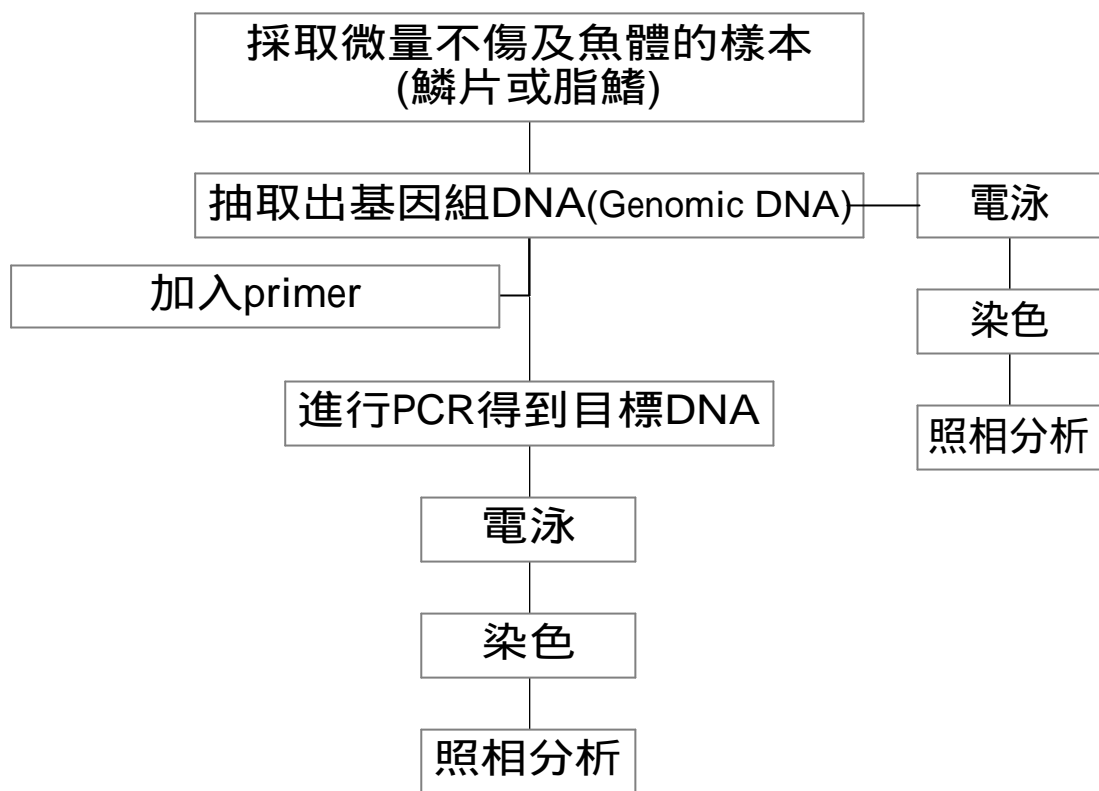


図8 DNA マーカーによる人工種苗の標識つけ作業の流れ図の一例。
産卵期が終わってから親魚の鰭のごく一部を切除して DNA を抽出する。稚魚は放流直前(ふ化後2ヶ月)に採集し、鰭の一部を切除して DNA を抽出する。抽出した DNA を鋳型として PCR を行い、遺伝子型を判定する。

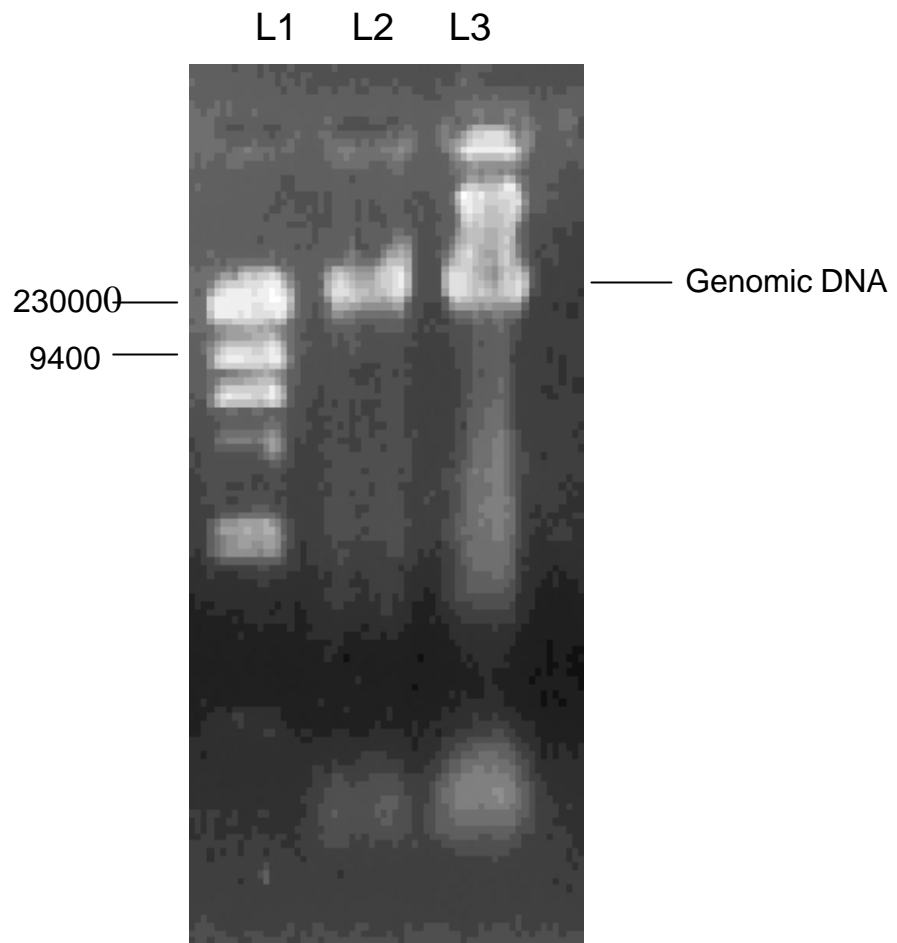
圖五：Taniguchi (1999) 以微衛星 DNA 當遺傳標記，調查養殖加臘魚 (*Pagrus major*) 人工種苗的親子關係。引用自 Taniguchi 1999。



圖六：DNA 聚合酵素連鎖反應 (PCR), 反應溫度 (a,b,c) 及時間 (t1,t2,t3)。

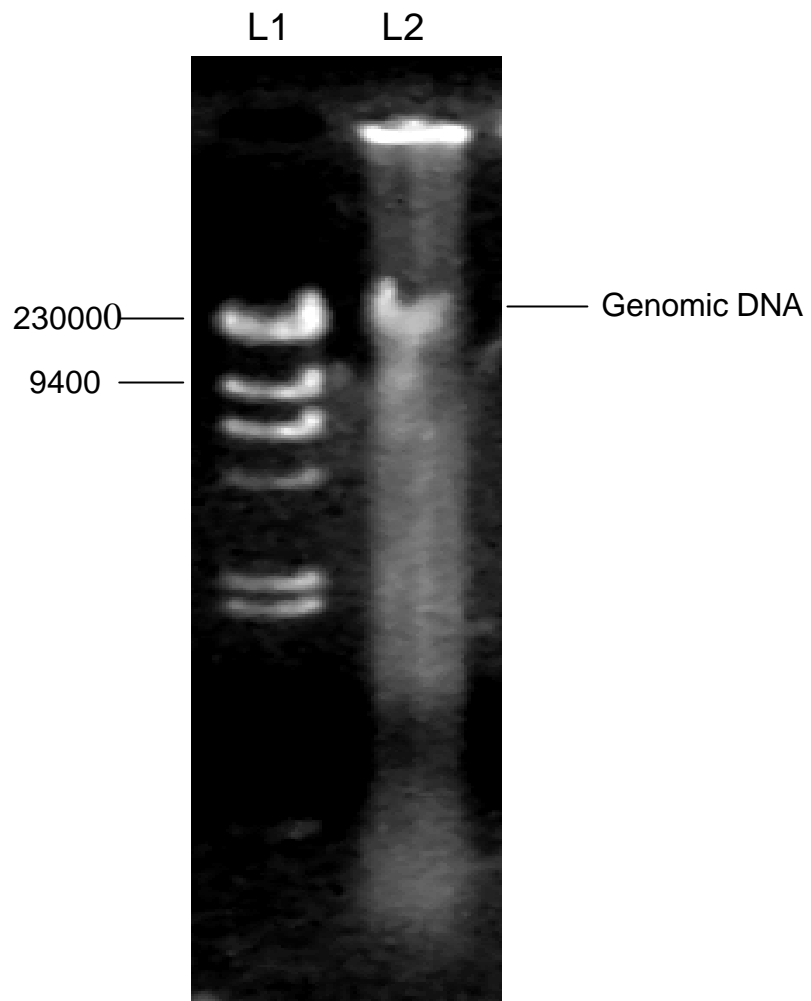


圖七：實驗步驟流程圖

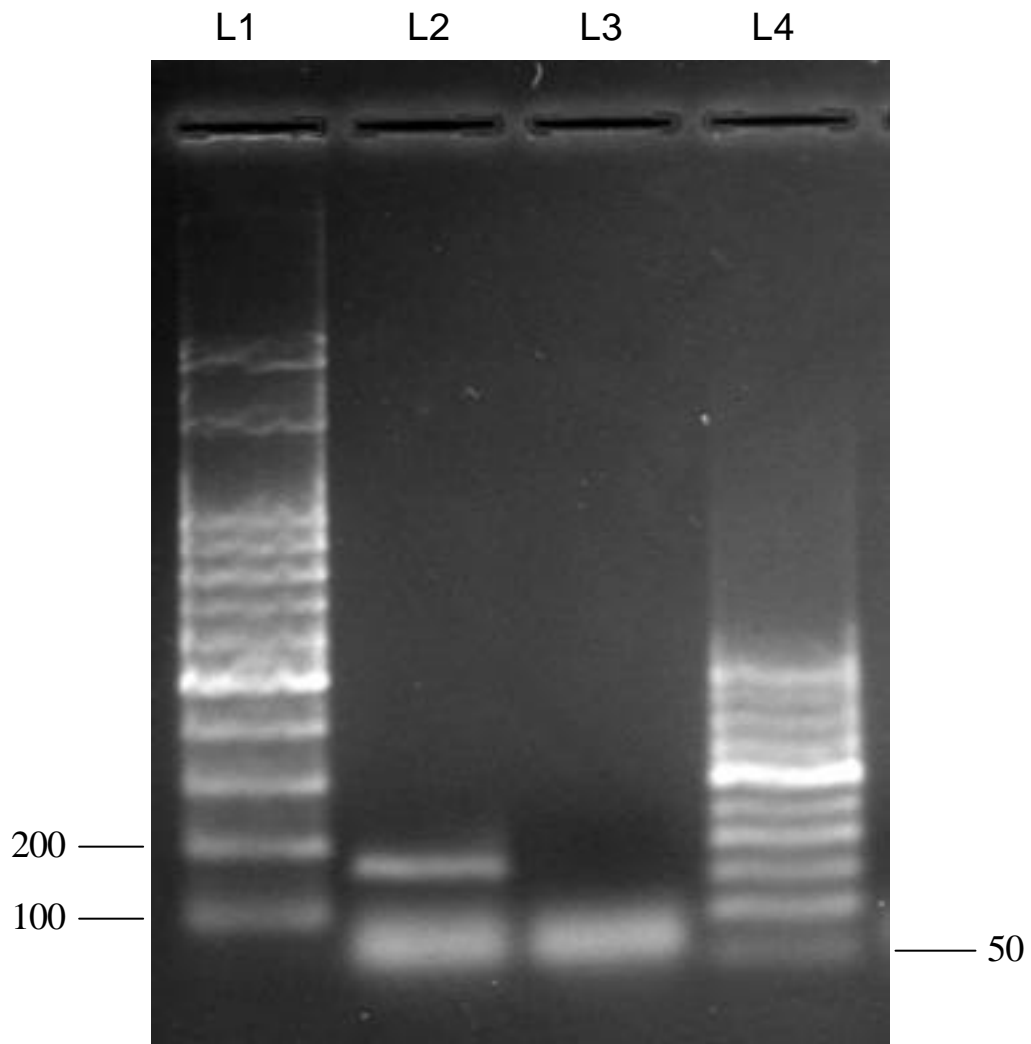


圖八：黑鯛基因組 DNA 之電泳圖。L1：Marker(DNA Hind)，

L2：黑鯛鱗片 1 片，L3：黑鯛體表黏液 100 μ l



圖九:台灣櫻花鉤吻鮭之基因組 DNA 電泳圖, L1:marker: DNA Hind
, L2:脂鱸(0.008 公克)。



圖十：台灣櫻花鉤吻鮭的微衛星 DNA 在聚合酵素連鎖反應 PCR 之後的電泳圖。L1:marker:100bp , L2:脂鱸(0.008 公克) , L3:引子 , L4: marker:50bp。

表一：黑鯛基因組 DNA 之粹取

微量樣本	基因組 DNA
鱗片 3 片	+
鱗片 2 片	+
鱗片 1 片	+
黏液 300 μ l	+
黏液 200 μ l	+
黏液 100 μ l	+
黏液 50 μ l	-
精液 100 μ l	+
精液 50 μ l	+
精液 25 μ l	-

+ : 可以粹取出基因組 DNA ; - : 無法粹取出基因組 DNA。

表二：台灣櫻花鉤吻鮭基因組 DNA 之粹取

微量樣本	粹取基因組 DNA
鱗片 6 片	+
鱗片 5 片	+
鱗片 4 片	-
脂鱗 0.010 公克	+
脂鱗 0.008 公克	+
脂鱗 0.005 公克	-

+：可以粹取出基因組 DNA；-：無法粹取出基因組 DNA。

表三：黑鯛微衛星 DNA 之攫取

引子	聚合酵素連鎖反應(PCR)後的結果
Pma 1	+
Pma 2	+
Pma 3	+
Pma 4	+
Pma 5	+

+：可以攫取到微衛星 DNA；-：無法攫取到微衛星 DNA。

表四：台灣櫻花鉤吻鮭微衛星 DNA 之攫取

引子	聚合酵素連鎖反應(PCR)後的結果
大西洋鮭魚 SSOSL311	+
大西洋鮭魚 SSOSL417	+
大西洋鮭魚 SSOSL436	+ -
虹鱒 PuPuPy	-
虹鱒 Omy77	-
虹鱒 2U	-

+：可以攫取到微衛星 DNA；-：無法攫取到微衛星 DNA

+ -：攫取到微衛星 DNA 的片段 (band) 不明顯。