**分子標誌輔助育種方法介紹**

張瑞炘

**摘 要**

分子生物學的發展有助於人類對育種學的認識，也衍伸許多重要的實驗技術，例如限制切割酵素之利用與聚合酶連鎖反應。這些技術可應用在品種鑑定、判定遺傳歧異度、基因定位、加速作物育種的效率。分子標誌(molecular markers)是指某些DNA序列，可藉由PCR反應增幅而被偵測，這些序列若與理想性狀基因緊密連結，可有效率地輔助育種工作。本篇報告介紹以下五種分子標誌:RFLP(限制片段長度多型性)；AFLP(增幅片段長度多型性)；RAPD(逢機增幅多型性DNA)；SSRs(簡單序列重複)；以及ISSR(簡單序列重複區間)，以提供作物育種研究人員參考。

**前 言**

傳統生物學主要研究整個生物個體的形態，分子生物學則著重於研究細微的基因作用原理，1953年DNA的雙股螺旋結構被發現，開啟分子生物學的研究大門。從此之後許多重要的生物技術陸續被研發與應用，尤其最常用的兩種技術分別是限制切割酶(restriction enzyme, RE)與聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)。限制切割酶的作用是辨認DNA上的特定序列，將DNA切割成片段；PCR反應則是利用核酸引子與耐高溫的DNA聚合酶，以94℃、50℃、72℃的溫度使DNA分子進行雙股分離、黏合引子、複製延長等循環過程，每經過一個循環使DNA複製成兩倍，經過30-40個循環可使DNA的量達到可以偵測的程度。目前現有的分子標誌大部分都是以PCR技術為基礎，少部分是應用限制切割酶。

**內 容**

分子標誌輔助育種的優點有:可鑑別單一個體；不受環境影響；不受植物生長階段與生長情形影響；僅須少量組織。目前已有的分子標誌輔助育種方法包括下列數種:

1. RFLP (restriction fragment length polymorphism)

 限制片段長度多型性。使用限制切割酶對植物基因體DNA進行切割，形成長短不一的片段並以膠體電泳方式分離，由於各品種的切位分布狀態不同，切割反應後可產生核酸片段長度多型性，因此可以分析品種間的遺傳岐異度。

1. AFLP (amplified fragment length polymorphism)

 增幅片段長度多型性。先用限制切割酶將基因體切割成片段，再用雙股的轉接序列(adaptor sequence)接上這些片段的末端，接著針對轉接序列設計核酸引子進行PCR選擇性放大，以膠體電泳分離這些被複製的片段，呈現片段長度多型性並照相存檔。此法的優點為:具有較高的解析度；較為靈敏；再現性高；不須事先知道序列資訊。

1. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

 逢機增幅多型性DNA。使用較短的核酸引子序列(8-12 核苷酸)，任意隨機地進行PCR反應，引子之間互相對應的逄機片段小於2kb者可被複製放大，複製產物進行膠體電泳分析其片段多型性。此法的優點為:實驗前不需知道基因組的序列；能快速獲得資料；只須少量的DNA材料；較容易操作且較為便宜。

1. SSRs (simple sequence repeats)

 簡單序列重複。植物的基因組DNA的某些序列，以1到5個核苷酸為單位由前至後重複排列，重複的次數依不同品種而有所差異，利用重複序列前後的保守序列為引子進行PCR反應，可將重複序列放大，PCR產物可進行片段長度多型性分析，並且可進行定序，完成更精準的DNA分型與基因定位。

1. ISSR (Inter-SSR)

 簡單序列重複區間。簡單序列重複在DNA上的分布不平均，這些SSR序列兩兩之間所夾的片段稱之為簡單序列重覆區間(ISSR)，利用SSR序列設計引子，藉由PCR反應放大ISSR，PCR產物可藉由電泳或定序分析片段大小與序列，也可進行基因定位，作為目標基因的分子標誌。

**結 語**

分子標誌輔助育種方法從1980年代發展至今已逐漸成熟，可節省大量的人力和時間，以水稻為例，傳統方法育成一個品種需要8年，以分子標誌輔助育種法可縮短到3-5年。分子標誌輔助育種儼然已成為各國潮流，國內若能發展相關技術，可為作物育種研究注入新的能量，和世界各國並駕齊驅，更有效率地開發優良的作物品種。

**參考文獻**

1. Chao, Y. T., C. S. Chen, H. W. Chen, T. Y. Chow, M. C. Chung, J. S. Hsieh, Y. I. Hsing, P. F. Lee, Y. R. Lin and J. F. Shaw. 2003. Rice structure and functional genome research in ASPGC, Academia Sinica.  Journal of Genetics and Molecular Biology 14: 201-206.

2. Chen, Y. J., C.P. Li, H.J. Huang , J.Y. Jian and S.F. Lin. 2005. Genetic Diversity Evaluation for Glutinous Rice Germplasm Based on Agronomic Traits. Crop Environment & Bioinformatics 2(1):11-30.

3. Hu, C.Y., Y.Z. Tsai and S.F. Lin. 2005. Using ISSR DNA markers to evaluate genetic diversity of tea germplasm in Taiwan. J. Agri. Assoc. China 6(5): 463-480.

4. **Lin, Y. R.**, T. Y. Chow, M. Luo, D. Kudrna, C. C. Lin, R. A. Wing, and Y. I. C. Hsing. 2006. Two Highly Representative Rice BAC Libraries of Japonica cv Tainung 67, Suitable for Rice Structural and Functional Genomic Research. Plant Science 170: 889-896.

5. Watson, J. D. and F. H. Crick. 1953. [A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid](http://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf). Nature 171 (4356): 737–738.

6. Williams J.G., et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990 25;18(22):6531-5.