

# 鳳梨釋迦 SSR 標誌之開發

林延諭<sup>1</sup> 張心怡<sup>2</sup> 胡凱康<sup>3</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會臺東區農業改良場斑鳩分場 助理研究員

<sup>2</sup>國立臺灣大學農系學系 研究助理

<sup>3</sup>國立臺灣大學農藝學系 副教授

## 摘要

本研究以臺灣重要的外銷果樹-鳳梨釋迦為定序材料，採用次世代定序方法結合生物資訊工具的應用分析，成功開發出 5,332 組鳳梨釋迦 SSR 標誌。篩選 48 組 SSR 標誌於番荔枝屬內 3 個種共 8 個品種（系）上驗證，結果有 42 組可在鳳梨釋迦上順利擴增，成功率為 87.5%，並有 25 組（52.1%）具有多型性；於番荔枝及冷子番荔枝之擴增成功率亦達 85.4%與 68.8%，顯示本研究所開發之 SSR 標誌具極高的應用潛力，可用於番荔枝屬內作物之親緣分析及品種鑑定中。

## 一、前言

鳳梨釋迦 (*Annona squamosa* × *A. cherimola*) 為冷子番荔枝 (*A. cherimola*) 與番荔枝 (*A. squamosa*) 的種間雜交種，與番荔枝同為臺東地區最重要之經濟果樹，根據 2014 年農糧署的統計資料，鳳梨釋迦與番荔枝於臺東縣種植面積為 4,952 公頃，占全臺 91.1%<sup>(1)</sup>，外銷量為 9,039 公噸，為 2014 年全臺外銷量最大之果樹<sup>(2)</sup>。鳳梨釋迦為多年生異交作物，以外表特徵區分品種（系），易受到環境因素影響，增加不確定性<sup>(3)</sup>，且最重要的果實形態特徵，需長達數年才得以作為判斷的依據<sup>(9,21)</sup>。利用分子標誌鑑別品種，則可以由任意的植物組織，於不同的發育階段進行，克服時間與環境的限制，縮減育種或鑑定工作之時程<sup>(5)</sup>。

在各種分子標誌中，簡單重複序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 標誌因具有再現性、可重複性、多對偶基因、共顯性、高多型性、易於操作與判讀、基因體中含量豐富，及相近物種可共通使用等優點，而被廣泛應用在各種植物育種與遺傳研究中<sup>(17)</sup>。

目前在番荔枝屬中，於冷子番荔枝有 67 組 SSR 標誌可供應用<sup>(10,11)</sup>，尚無

針對鳳梨釋迦開發的 SSR 標誌。儘管 SSR 標誌在相近物種中可轉移使用，但其成功率較低<sup>(19)</sup>，也容易產生無效對偶基因 (null allele) 而增加使用之困難<sup>(13)</sup>。過去 SSR 標誌開發代價相對昂貴且費時<sup>(8)</sup>，隨著次世代定序技術的推出，定序效率大幅提高，而定序成本也顯著的降低<sup>(15,16)</sup>，使各種作物的研究推進到基因體的層級<sup>(7)</sup>。本研究希望透過次世代定序系統的效能，結合生物資訊學的分析，以經濟、快速的方式開發鳳梨釋迦 SSR 標誌，供育種及品種鑑別上之應用。

## 二、材料與方法

### (一) 試驗材料

由本場斑鳩分場所蒐集的種原中，挑選 4 個鳳梨釋迦品種 (系) (‘斑鳩 1 號’、‘綠鑽’、‘African Pride’及‘Hillary’)，兩個冷子番荔枝品種 (‘Delciosa’與‘Spain’) 及兩個番荔枝品種 (‘臺東 2 號’、‘軟枝’) 為試驗材料 (表 1)，其中‘斑鳩 1 號’為定序材料。

表 1. 參試材料

編號	品種 (系)	學名	類型	備註
X1	斑鳩 1 號	<i>A. squamosa</i> × <i>A. cherimola</i>	鳳梨釋迦	定序材料
X2	綠鑽	<i>A. squamosa</i> × <i>A. cherimola</i>	鳳梨釋迦	
X3	African Pride	<i>A. squamosa</i> × <i>A. cherimola</i>	鳳梨釋迦	
X4	Hillary	<i>A. squamosa</i> × <i>A. cherimola</i>	鳳梨釋迦	
X5	Delciosa	<i>A. cherimola</i>	冷子番荔枝	
X6	Spain	<i>A. cherimola</i>	冷子番荔枝	
X7	臺東 2 號	<i>A. squamosa</i>	番荔枝	
X8	軟枝	<i>A. squamosa</i>	番荔枝	

### (二) DNA 萃取與基因體文庫建置及定序

取 0.02 g 冷凍乾燥葉片，使用高鹽 CTAB 法 (portocol D)<sup>(20)</sup> 萃取全基因體 DNA，並以 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) 定量。定序用之 DNA 萃取採用相同步驟，分次萃取以達總量為 10 µg，並使用 Agencourt AMPure XP PCR Purification (Beckman Coulter, Brea CA, USA) 純化。DNA 基因體文庫的建置與定序委託威建股份有限公司 (WELGENE Biotech co., Ltd)，採用 Illumina MiSeq Reagent Kits v3 (Paired-end, 2 × 300 bp)。

### (三) 序列合併與簡單重複序列探勘

以 PEAR 0.9.6<sup>(23)</sup> 進行 Paired-end 序列的合併，合併之讀序匯入 CLC v. 6.5 (CLC bio, Denmark) 進行序列修剪 (trimming)，刪除品質較差或片段長度過短之讀序。

SSR 序列探勘使用 Tandem repeats finder (TRF) 軟體 (command line version 4.07b)<sup>(6)</sup>。探勘參數訂為 2 7 7 80 10 10 500 -f -d -h，分別代表 Match、Mismatch、Delta、PM、PI、Minscore、Maxperiod 及其他選擇性參數。

由於 TRF 對於重複單位大小及重複次數並無限制，可偵測多種重複序列類型，本實驗則依據 TRF 的結果，篩選重複單元為 3 至 5 個鹼基、重複次數 7 次以上且為完美重複 (perfect repeat) 之重複序列。由於目標重複序列兩側翼序列中包含其他重複序列，造成不同重複序列之變異疊加，導致分析時出現不符合預期之結果，故對此進行篩選及排除。

### (四) 引子設計與篩選

以 BatchPrimer3<sup>(22)</sup> 進行 Generic primers 設計，設定 PCR 產物大小為 60~500 個核苷酸、引子長度為 18~24 個核苷酸。設計完成之引子再以 BLASTN 2.2.30 + (NCBI, <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/executables/>) 及 MFEprimer-2.0<sup>(18)</sup> 軟體檢查其專一性。

### (五) SSR multiplex-ready PCR、毛細管電泳分析與分子標誌評估

本試驗採用 multiplex-ready PCR 技術<sup>(14)</sup>於正、反向引子之 5'端分別加上 5' ACGACGTTGTAAAA 3'與 5' CATTAAAGTTCCCATTA 3'序列，作為基因座專一引子組；標定不同螢光之通用引子組 tagF (5'Flu-ACGACGTTGTAAAA 3', Flu=VIC, 6-FAM, NED 和 PET) 與 tagR (5' GTTTAAGTTCCCATTA 3')，於二階段聚合酶連鎖反應時，將 PCR 產物標定螢光。

每個 PCR 反應中只擴增一個 SSR 產物，之後再將標定不同波長螢光者進行混合。每產物每反應總體積為 10  $\mu$ l，其中包括 0.2 mM dNTP、1x ImmoBuffer (Bioline) (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, 0.01% Tween-20, 100 mM

Tris-HCL, pH 8.3)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、40 nM 正向引子、40 nM 反向引子、80 nM 螢光標定之 tagF 引子、80 nM tagR 引子、20 ng DNA 及 0.25 U Immulase (Bioline)。聚合酶連鎖反應使用熱循環反應器 (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700, PE Applied Biosystems) 進行。反應條件為 95°C 10 分鐘；92°C 30 秒、63°C 1 分 30 秒、72°C 1 分鐘，共 20 個循環；92°C 15 秒、54°C 30 秒、72°C 1 分鐘，共 40 個循環；72°C 30 分鐘；最後 25°C 保存反應產物。標定 VIC、6-FAM、NED、PET 螢光物質之 PCR 產物，以 2:3:4:6 比例混合並以遺傳分析儀器 (Prism<sup>®</sup> 3730 Genetic Analyzer, ABI) 進行毛細管電泳。所得資料使用 GeneMapper<sup>®</sup> v4.0 (ABI) 進行資料分析與判讀。標定螢光物質之引子由 Applied Biosystems (ABI) 合成，一般引子由基龍米克斯生物科技股份有限公司 (Genomics BioSci & Tech, Inc.) 合成。螢光毛細管電泳則委託昕穎生醫技術股份有限公司 (SEEING Bioscience Co., Ltd.) 進行。

分子標誌可用性評估，分成擴增可行性與多型性評估兩部分。擴增可行性表示可穩定產生易判讀條帶之分子標誌，若有 3 個以上的擴增產物，因難以解釋其遺傳機制，故歸類於多基因座 (complex or multi-locus) 並排除。多型性評估分為種間與種內多型性，種間多型性表示鳳梨釋迦與冷子番荔枝、或與番荔枝之間具有多型性；種內多型性則表示 4 個鳳梨釋迦樣品間具有多型性。

### 三、結果與討論

本研究使用 IlluminaMiSeq 平臺進行 DNA 定序，共計獲得 19,877,481 組 Paired-end 序列，其中 17,803,736 筆 (89.6%) 序列可順利拼接。平均長度為 202.65 個鹼基，無法順利合併之序列是含有大量單鹼基重複之不良序列，因此將之排除於探勘 SSR 資料外。以 PEAR 軟體合併序列時，已包含部分序列修剪程序，故經 CLC 軟體修剪序列後，序列數量及長度變動幅度不大，最終共計有 17,793,823 筆序列可用於 SSR 探勘，其平均長度為 202.25 個鹼基，中位數及眾數為 190 及 173 個鹼基，顯示序列長度分布有偏短之趨勢 (圖 1)。

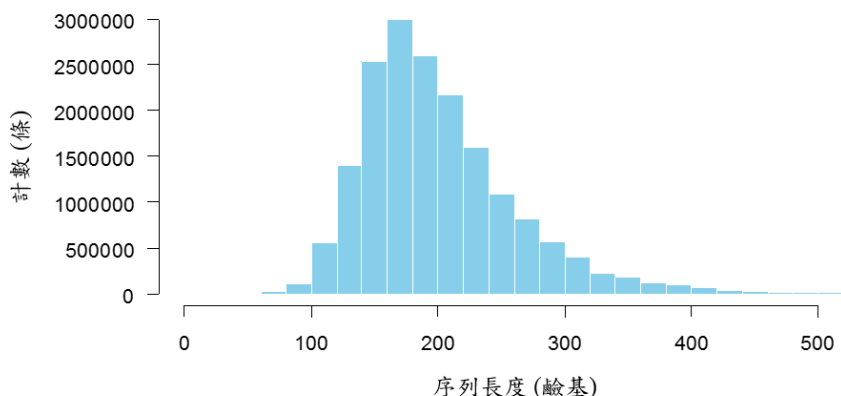


圖 1. 序列合併與修剪後之長度分布

使用 TRF 軟體探勘獲得 28,393,999 筆重複序列，篩選符合目標重複單位與重複次數的 SSR 共有 21,905 個，側翼序列修剪後之 SSR 共 6,642 個，引子設計後共計獲得 5,332 組 SSR 引子組。篩選出的 SSR 序列中，以 3 個鹼基 (trinucleotides) 為重複單位的引子組有 5,295 組 (99.3%)、4 至 5 個鹼基 (tetra-nucleotides and penta-nucleotids) 為重複單位的分別有 33 及 4 組 (圖 2 左)。以 3 個鹼基為重複單位的數量豐富且 10 種序列類型皆有出現，其中 AAT 最多 (32%)、ATC 次之 (25%)，其他類型依序遞減 (圖 2 右)。在設計引子後，預期擴增產物較原序列長度平均減少 29%，平均大小為 117.5 個鹼基 (圖 3)。



圖 2. SSR 核心序列長度比例(左)與 3 個鹼基之 SSR 核心序列類型數量(右)

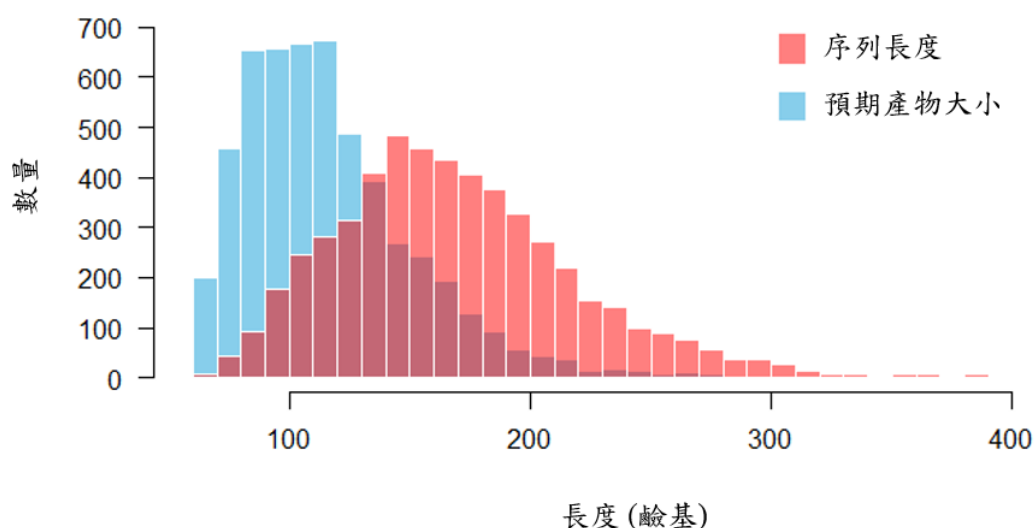


圖 3. SSR 標誌預期大小與原序列長度分布

表 2. SSR 標誌擴增能力及多型性比例評估結果

	擴增可行性			多基因座	多型性*	
	鳳梨釋迦	冷子番荔枝	番荔枝		種間	種內
標誌數量	42	33	41	11	34	25
比率 (%)	87.5	68.8	85.4	22.9	70.8	52.1

\*種間多型性為鳳梨釋迦與冷子番荔枝或鳳梨釋迦與番荔枝間具有多型性，種內多型性為鳳梨釋迦 4 個品種（系）間具有多型性。

經由 BLAST 和 MFEprimer 專一性篩選後，挑選出最佳的 48 組 SSR 分子標誌，分析番荔枝屬內 3 個種，共計 8 個品種（表 1）進行驗證。結果顯示鳳梨釋迦中有 42 組（87.5%）SSR 標誌可產生擴增產物，番荔枝中有 41 組（68.8%），而冷子番荔枝有 33 組（68.8%）。顯示以次世代定序方法直接定序目標作物可提供大量 DNA 序列資料，有別於經由富集文庫（enrich-library）之探勘方法，可有效降低實驗室花費成本並探勘大量具有多型性潛力的 SSR 分子標誌，提高分子標誌探勘之效率<sup>(4)</sup>。

通過擴增可行性評估的標誌中，有 11 組產生 3 個以上之對偶基因，因其遺傳形式難以判定，故將之淘汰。鳳梨釋迦與其他兩個物種間具有多

型性的分子標誌有 34 組，而鳳梨釋迦種內具多型性的分子標誌有 25 組(表 2)，占全部標誌之 52.1%，顯示本試驗開發的 SSR 分子標誌，可用於鳳梨釋迦種內之品種鑑別。以 19 組分子標誌在 8 個品種(系)中無缺值之基因型資料進行主成分分析(Principle coordinate analysis, PCoA)，結果顯示第 1 與第 2 主成分共可解釋 65.1% 的總變異量，且可將三個物種明確的劃分為不同群集。鳳梨釋迦介於番荔枝與冷子番荔枝間，且較偏向番荔枝(圖 4)，與利用 ISSR 標誌分析之結果相符<sup>(3)</sup>。

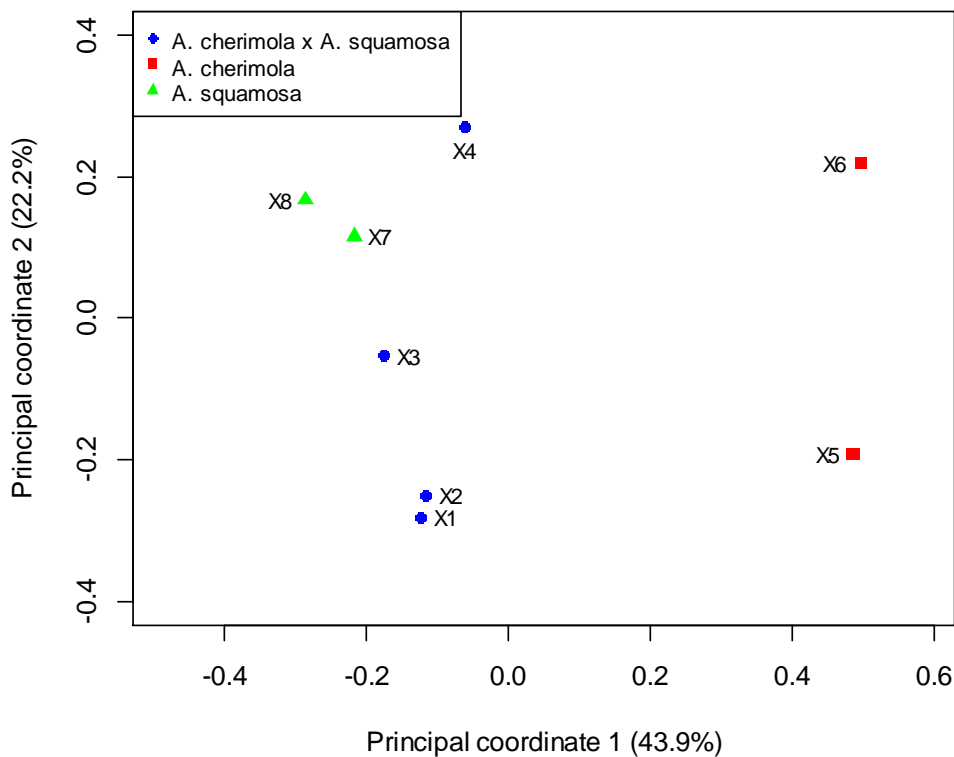


圖 4. 以 19 個 SSR 標誌對本試驗參試品種(系)進行之主成分分析結果。X1 至 X8 依序為‘斑鳩 1 號’、‘綠鑽’、‘frican Pride’、‘Hillary’、‘Delciosa’、‘Spain’、番荔枝‘臺東 2 號’及‘軟枝’。

#### 四、結論

本試驗以臺東地區之主要鳳梨釋迦品種(系)為參試材料，以次世代定序方法成功開發出 5,332 組鳳梨釋迦 SSR 標誌，篩選出的 48 組 SSR 分子標誌，於番荔枝科最具經濟價值的 3 種作物中，皆具有高擴增成功率，且在鳳梨釋迦與番荔枝上高達 87.5% 與 85.4%。在鳳梨釋迦種內可成功擴增的分子標誌中，

高達 52.1% 之分子標誌具多型性。對於尚未具有參考基因體序列的非模式作物而言，次世代定序系統產生龐大的序列資料，可以在較低實驗室成本與較短的時間內，獲得目標研究物種之序列，提高探勘分子標誌的成功率。同時，龐大的資訊量允許開發者以更嚴格的條件對標誌進行篩選，提高擴增成功率與多型性比例，減少後續驗證引子之成本<sup>(4,12)</sup>。本研究為以鳳梨釋迦序列開發 SSR 標誌之首例，所開發之標誌可作為親緣分析與品種鑑定應用上，穩定的分析工具。

### 參考文獻

1. 行政院農業委員會。2014。農業統計年報。台北：行政院農業委員會。網址：<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>。上網日期：2015-10-08。
2. 財政部關務署。2014。統計資料庫查詢系統。台北：財政部關務署。網址：<https://portal.sw.nat.gov.tw/APGA/GA03>。上網日期：2015-10-8。
3. 詹雅勳、江淑雯、丁文彥、盧柏松。2011。臺東地區水稻及番荔枝主要栽培品種之分鑑定及遺傳歧異性分析。臺東區農業改良場研究彙報 21:1-16。
4. 林延諭。2012。低覆蓋倍率隨機定序開發 SSR 標誌及其策略探討。國立臺灣大學農藝系碩士論文。
5. Arias, R.S., J.W. Borrone, C.L. Tondo, D.N. Kuhn, B.M. Irish and R.J. Schnell. 2012. Genomics of tropical fruit tree crops. In “Genomics of Tree Crops”, 209-239, Heidelberg: Springer.
6. Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:573–580.
7. Bräutigam, A. and U. Gowik. 2010. What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant Biol.* 12:831–841.
8. Dutech, C., J. Enjalbert, E. Fournier, F. Delmotte, B. Barres, J. Carlier, D. Tharreau and T. Giraud. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 44:933–949.



9. Ellstrand, N.C. and J.M. Lee. 1987. Cultivar identification of cherimoya (*Annonacherimola* Mill) using isozymemarkers. *Sci. Hortic.* 32:25–31.
10. Escribano, P., M.A. Viruel and J.I. Hormaza. 2004. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annonacherimola* Mill., Annonaceae). *Mol. Ecol. Notes* 4:746–748.
11. Escribano, P., M. Viruel and J. Hormaza. 2008. Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annonacherimola* Mill.): transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. *Mol. Ecol. Resour.*
12. Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais, C. Lepoittevin, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin and others. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11:591–611.
13. Hardy, O.J., N. Charbonnel, H. Fréville and M. Heuertz. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163:1467–1482.
14. Hayden, M., T. Nguyen, A. Waterman and K. Chalmers. 2008. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9:80.
15. Hudson, M.E. 2008. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Mol. Ecol. Resour.* 8:3–17.
16. Imelfort, M., C. Duran, J. Batley and D. Edwards. 2009. Discovering genetic polymorphisms in next-generation sequencing data. *Plant Biotechnol. J.* 7:312–317.
17. Powell, W., G.C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1:215–222.
18. Qu, W., Y. Zhou, Y. Zhang, Y. Lu, X. Wang, D. Zhao, Y. Yang, C. Zhang. 2012. MFEprimer-2.0: a fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity. *Nucleic Acids Res.* 40:W205-W208.

19. Rossetto, M. 2001. Sourcing of SSR markers from related plant species. *Plant Genotyping DNA Fingerprinting Plants* 1:211–224.
20. Souza, H.A.V., L.A.C. Muller, R.L. Brandão and M.B. Lovato. 2012. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandramollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genet. Mol. Res.* 11:756–764.
21. Thomson, P. 1970. The cherimoya in California. *Calif. Rare Fruits Grow. Handb.* 20–34.
22. You, F., N. Huo, Y. Gu, M. Luo, Y. Ma, D. Hane, G. Lazo, J. Dvorak and O. Anderson. 2008. BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics* 9:253.
23. Zhang, J., K. Kobert, T. Flouri and A. Stamatakis. 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAdmergeR. *Bioinformatics* 30:614–620.