

應用分子標誌

輔助選育高油酸落花生介紹



農試所作物組 戴宏宇

桃園場 許育鳴

一、前言

栽培種落花生(*Arachis hypogaea* L.)為異源四倍體(AABB, $2n = 4x = 40$)一年生豆科植物，為世界第六大油料作物(2013年栽培面積為2千5百萬公頃)，主要種植於熱帶及亞熱帶地區。落花生過去為台灣重要油料作物，隨著大豆油等廉價食用油引進，目前主要用作鮮食及加工用途，為台灣重要的雜糧作物之一。落花生含有豐富油脂(約40-54%)，其中油酸(Oleic acid, 單元不飽和脂肪酸)及亞油酸(Linoleic acid, 多元不飽和脂肪酸)佔了油脂80%以上，脂肪酸的飽和程度越高其化學性質亦相對越穩定，已有研究報告指出落花生提高油酸與亞油酸含量比(Oleic : Linoleic acid ratio, O/L)有助於延長落花生保存期限。此外，亦有研究報告指出適當攝取含高油酸的食用油對於健康可能有正面幫助，因此自Norden等人於1987年發表第一個高油酸品系後，將高油酸比性狀導入為目前落花生育種

的重要目標之一。目前研究指出高油酸比性狀主要由兩個基因共同控制，分別為ahFAD2A及ahFAD2B，隨著分子標誌技術的演進，針對高油酸對偶基因的分子標誌陸續被開發。其中一種基因型鑑定系統利用Taqman探針，以即時聚合酶連鎖反應(Real-time Polymerase Chain Reaction, Real-time PCR)快速檢測基因上的單一核苷酸多型性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)，捨棄傳統PCR系統需要等待膠體電泳的時間，藉由螢光放大的結果進行基因型鑑定。本文將介紹此系統的原理及流程，以及在高油酸落花生育種的應用現況。

二、Taqman探針系統原理

Taqman探針是一組具專一性的oligonucleotide，在5端位置連結一個螢光物質，在3端位置連結熄光物質(quencher)，當此螢光物質與quencher距離夠接近時，會構成螢光共振能量轉移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)的條件，使熄光物質吸收螢光物質所激發的能量，因此無法偵測到螢光物質的訊號。

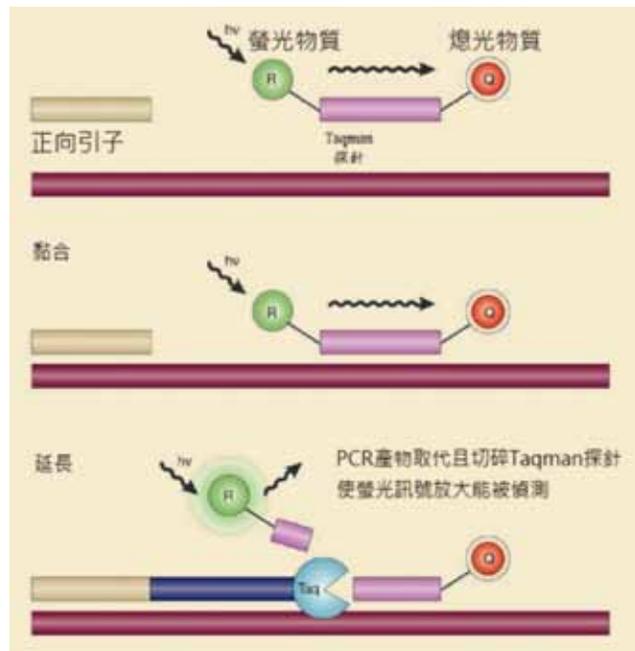
作者：戴宏宇助理研究員
連絡電話：04-23317111

在Real-time PCR設計流程中，Taqman探針黏合處會被設計在正向引子(forward primer)與反向引子(reverse primer)間，具有目標單一核苷酸多型性的核酸序列類(圖一)。PCR反應開始時，在黏合(annealing)過程中，探針與兩引子與模板黏合，接著聚合酶開始延長引子，當延長至Taqman探針黏合處時，由於聚合酶具有5端核酸外切酶(exonuclease)的活性，能將Taqman探針降解。此時螢光物質與熄光物質分離，不再具有螢光共振能量轉移的條件，因此得以偵測螢光物質的能量(螢光物質發光)，當PCR結束時，每一循環所偵測的螢光物質訊號積累量為目標DNA序列的放大量。

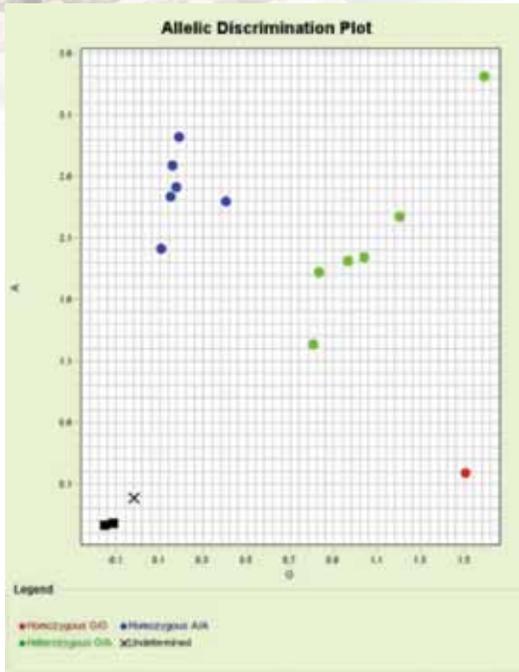
三、以Taqman探針系統進行高油酸比落花生基因型鑑定

落花生高油酸比性狀由ahFAD2A及ahFAD2B兩基因共同控制，野生型與突變型ahFAD2A於起始密碼子算起第448個核苷酸位點存在一個SNP，野生型ahFAD2A於此位點的基因型為G，而突變型ahFAD2A於此位點的基因型為A；而野生型與突變型ahFAD2B的差異於起始密碼子算起第441個及第442核苷酸位點間存在單一核苷酸插入，突變型ahFAD2B於此位點有一個A核苷酸插入。藉由上述SNP，設計專一性Taqman探針進行高油酸比落花生基因型鑑定。以ahFAD2B為

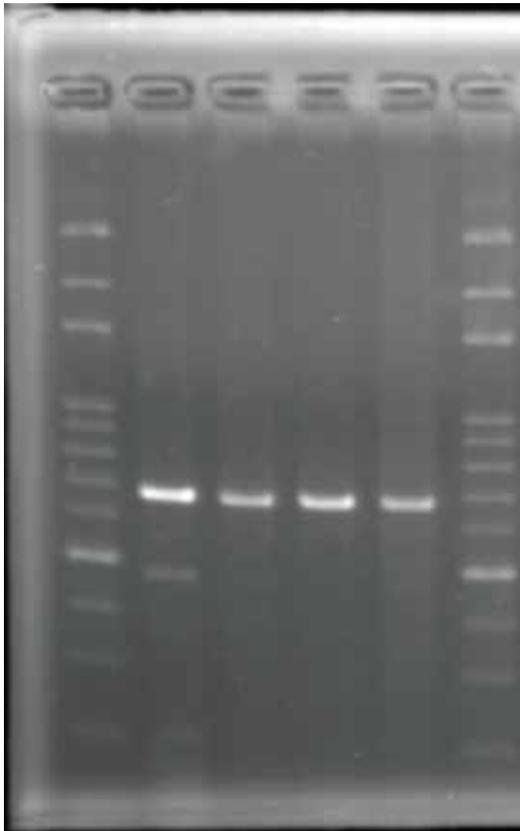
例，一組檢測ahFAD2B基因型的試驗試劑包含兩組專一性Taqman探針及一對引子。兩組Taqman探針中，一組為野生型ahFAD2B專一性探針，其5端所連結的螢光物質為VIC；另一為突變型ahFAD2B的專一性探針，其5端所連結的螢光物質為FAM。當Real-time PCR進行時，如試驗個體帶有野生型ahFAD2B同結合基因型，只會有VIC的螢光訊號被放大，在圖二中為紅點；如試驗個體帶有突變型ahFAD2B的同結合基因型，僅有FAM的螢光訊號被放大，在圖二中為藍點；如試驗個體為異結合基因型，則FAM與VIC的螢光訊號會同時被放大，在圖二中為綠點。目前本研究室已經成功以Taqman探針系統進行高油酸比落花生基因型鑑定，以選拔個體及推進育種世代。



圖一、Taqman探針系統原理 (Koch, 2004)。



圖二、ahFAD2B基因型鑑定之結果。



圖三、ahFAD2B的CAPS分子標誌。

四、結論

分子標誌輔助選種已經在育種上被廣泛利用，但使用分子標誌進行基因型鑑定時，因膠體電泳需進行膠體製備與PCR產物泳動才能完成分析，花費大量人力及時間成本，且有可能因酶切不完全、PCR產物濃度、染色及照相效果影響判讀(圖三)，Taqman探針系統以螢光訊號判定來進行SNP的基因型鑑定，能省下過往CAPS及dCAPS基因型鑑定中等待酵素酶切及膠體電泳所花費的時間。此外，目前Taqman探針系統等SNP基因型分析平台單位成本亦隨著技術發展下降，本研究室亦證明此系統可順利應用於多倍體作物之基因型鑑定，提升篩選雜交後代通量，有助於分子育種工作發展。

五、參考文獻

- Chu Y, Holbrook CC and Ozias-Akins P. 2009. *Crop Sci.* 49: 2029-2036.
- Koch, W. H. 2004. *Nat Rev Drug Discov*, 3(9), 749-761.
- Mienie, C. M. S. and Pretorius, A. E. 2013. *Afr. J. Biotechnol.* 12(27): 4283-4289.
- Norden, A. J., Gorbet, D. W., Knauff, D. A., & Young, C. T. (1987). *Peanut Sci.* 14(1): 7-11.