



番荔枝品種鑑定之

分子標誌

開發

文 / 圖 林延諭

一、前言

番荔枝為多年生異交作物，以外表特徵區分品種(系)，容易受到栽培管理及環境差異之影響，增加判斷上之不確定性，且最重要的果實特徵，需待開始結果後才可作為判斷的依據。若能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，縮減鑑定工作之時程與難度，並可藉由分析其遺傳歧異度，了解種原間的關係，作為品種蒐集、保存及育種應用之參考。在各種分子標誌中，簡單重複序列(Simple Sequence Repeat, SSR)標誌，因穩定性高、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。相較於其他作物，番荔枝分子標誌的研究時間較晚，於2004及2008年，Escribano等人陸續發表67組SSR標誌，主要應用於冷子番荔枝，儘管SSR標誌在相近物種中可轉移使用，但其成功率較低，而增加使用之困難。為進一步了解臺東地區之主要番荔枝品種(系)遺傳特性，本研究以鳳梨釋迦為材料，利用次世代定序開發SSR標誌，最後應用於番荔

枝科中最具經濟價值的番荔枝、鳳梨釋迦及冷子番荔枝三種作物，期望能對臺灣番荔枝作物之品種鑑定及育種工作有所助益。

二、開發流程與方法

(一) 定序材料選擇與次世代定序

與微生物相比，植物的基因組非常龐大，例如水稻的完整定序，便由10個國家組成的團隊，歷經7年才完成，獲得完整序列後，我們便像是擁有了一張水稻DNA地圖，接著就能針對感興趣的基因或是DNA序列，尋找獨特的地標，並設計分子標誌，以便未來能用更快速、穩定與較低的成本，檢測目標序列。在番荔枝這種基因組尚未被完全定序的作物上開發分子標誌，或許不用完全定序，但若序列量太少，便有如缺頁過多的地圖，常找不到目的地的位置。因此開發標誌的第一步便是大量定序，累積一定序列資料後，就能從中探勘興趣目標並開發分子標誌，再經過實際測試後便能應用在檢測上。為了要妥善利用資源，定序品種的選擇也是重要的課題，目前臺東地區栽種的番荔枝屬果樹，以番荔枝(釋迦)及鳳梨釋迦為主，其中鳳梨

釋迦為冷子番荔枝與番荔枝的種間雜交種，其遺傳與外表特性也介於兩親本之間，因此本研究選定鳳梨釋迦為定序材料，以期開發出的分子標誌在番荔枝、鳳梨釋迦及冷子番荔枝中，能有較好的共通性。

過去因為定序成本高及定序效率較低，使得許多作物的序列資料累積相當緩慢，如今因次世代定序(Next generation sequencing, NGS)的發展，定序效率大幅提高，只是NGS需要高品質的DNA，為了減少鳳梨釋迦葉片中多醣體的干擾，將葉片冷凍乾燥後，使用高鹽CTAB法萃取全基因體DNA，分次萃取達總量為10 μ g，並使用Beckman Coulter公司的核酸純化試劑(Agencourt AMPure XP PCR Purification)純化，再經定序前處理後，以Illumina MiSeq平台進行定序，在此階段總計獲得近2千萬筆序列。

(二)簡單重複序列探勘與引子設計

簡單重複序列(SSR)是指兩個或多個核苷酸重複排列(圖1)，這種序列在演化的過程中容易發生變異，造成品種間有不同的重複次數，藉由比較這些細微差異，我們便可以區分出不同品種(系)；比較多個SSR的異同後，便可由差異的多寡，了解品種間的親緣關係，較為熟知的應用便是人類的DNA檢測。

利用軟體(TRF)尋找鳳梨釋迦序列中的SSR，這個過程稱為探勘，本研究總計探勘到約2萬個SSR。接著根據SSR前後獨特的序列，以primer3軟體設計引子，後續便能利用聚合酵素連鎖反應(PCR)樣品DNA中這段SSR，以比較不同品種中，這些片段的長短(重複次數)是否有差異。

(三)分子標誌的評估與應用

為了比較片段大小的差異，利用DNA帶有負電的特性，透過外加的電

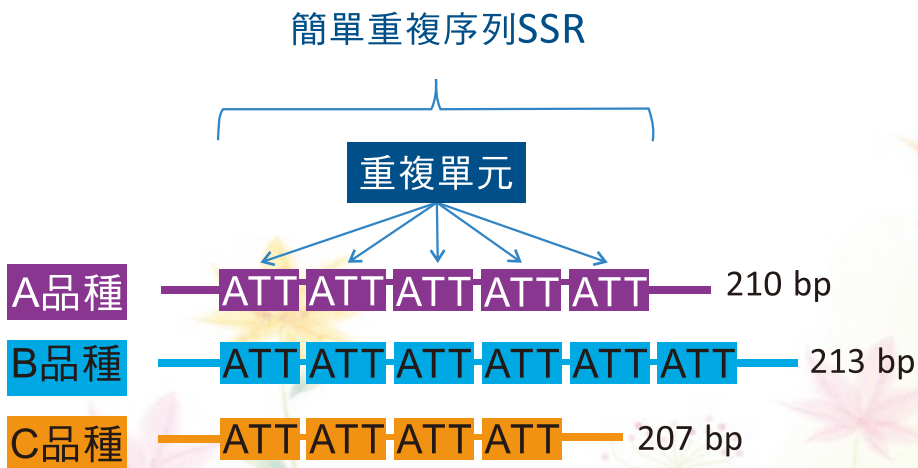


圖1. 簡單重複序列示意圖

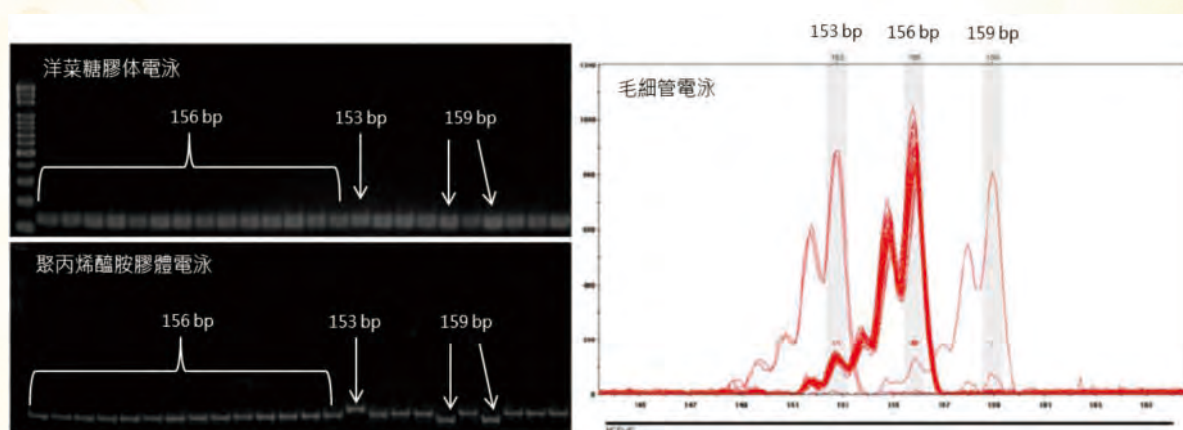


圖2. 電泳系統解析度差異，毛細管電泳具有較高解析度，可減少判讀錯誤。

表. 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。

場，使DNA在膠體中移動，片段較小的DNA移動較快，反之片段較大則慢，在一定時間內，藉由DNA片段移動距離便可判別SSR大小的差異。但在本次番荔枝的研究中，重複次數的差異較小，一些品種間只有2或3個鹼基(bp)的差異，因此必須仰賴解析度較高的毛細管電泳方能辨別差異(圖2)。在48組SSR分子標誌中，可區分鳳梨釋迦與番荔枝或冷子番荔枝的有34組，占70.8%；而於4個鳳梨釋迦間具有差異(多型性)的亦有25組，占52.1%(表)，所以這些標誌可用來鑑別上述8個品種(系)。

四、結語

因生物技術的進展，大量定序的門檻已逐漸降低，若具備分析巨量資料的能力，便能用較短的時間、更經濟的方式，為目標作物開發分子標誌。本研究中，藉由次世代定序系統，快速的開發出可應用在鳳梨釋迦、番荔枝及冷子番荔枝的分子標誌，是親緣分析與品種鑑定的穩定工具。隨著定序資料大量累積，以及相關研究的進展，未來番荔枝作物將有機會透過NGS，更快速的將外表型與基因型進行連結，加快育種的進程。