

利用微衛星序列作為台灣落花生栽培種DNA分子標誌¹

陳哲仁² 楊金興³ 曾東海² 鄭統隆² 吳明哲^{2,4}

摘 要

陳哲仁、楊金興、曾東海、鄭統隆、吳明哲。2007。利用微衛星序列作為台灣落花生栽培種 DNA 分子標誌。台灣農業研究 56:176-188。

本研究主要目的為建立國內落花生栽培種簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR) DNA 指紋資料與鑑定 SSR 基因座變異情形，一共選用國內 12 個落花生栽培種及 97 個 SSR 引子對，在 77 個可獲得清晰結果的 SSR 標誌觀測到 102 個條帶，其中有 26 個 SSR 基因座在樣品間呈現多型性，並且有 13 個品種專一性條帶可供品種鑑定。另外，有 6 個 SSR 基因座進行解序確認對偶基因型態，結果顯示有多種類型的變異，包括單核酸多型性、重複序列套數以及不含重複序列基因座，顯示相較於其他分子標誌系統，SSR 標誌在國內落花生栽培種呈現較高多型性比率。

關鍵詞：落花生栽培種、分子標誌、簡單重複序列。

前 言

落花生 (*Arachis hypogaea* L.) 屬於豆科 (Fabaceae) 植物，目前認為起源於南美洲，在玻利維亞南部或阿根廷北部為人馴化；落花生屬 (*Arachis*) 以型態、地理分布以及雜交親合性的不同，分為九個節 (section)，包括異質四倍體 (allotetraploid) 栽培種花生 (AABB) (Hung *et al.* 1996)。研究顯示可能涉及早期野生種 *A. duranensis* (A genome) 和 *A. ipaensis* (B genome) 雜交後，繼而自發性染色體倍加的結果；落花生根據主軸花序的有無分為兩亞種 *hypogaea* 和 *fastigiata*，再根據型態及生長特性 *hypogaea* 可分為 *hypogaea* 和 *hirsute* 兩變種；*fastigiata* 可分為 *fastigiata*、*vulgaris*、*aequatoriana* 以及 *peruviana* 四變種 (Moretzsohn *et al.* 2004)。栽培種花生的植株型態及農藝性狀有顯著的變異存在，但是，DNA 層級的變異如 RAPD (random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 以及 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 分析結果並不明顯，先前國內落花生研究也同樣得到落花生遺傳歧異度低，需要篩選較大量引子，才能獲得較多的多型性，以作為親緣關係及種原鑑定之判斷 (Fan *et al.* 1999)。造成 DNA 變異低落的可能原因包括：1. 近源二倍體與栽培種間的基因流 (gene flow) 障礙。2. 栽培種源自少數雜交個體染色體倍加。3. 育種材料重複使用等單一或複合因素 (Moretzsohn *et al.* 2004)。因此思考其他分子標誌利用的可行性。

現今 DNA 分子標誌技術的發展提供新的作物改良策略及瞭解物種內和物種間的演化關係，根據不同的 PCR 技術為基礎的方法，如 RAPD、AFLP、SSR (simple sequence repeat) 以及 ISSR

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2293 號。接受日期：2007 年 8 月 5 日。
2. 本所生技組聘用人員、副研究員及生技組研究員兼組長。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 本所作物組副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：wu@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

(Inter-SSR) 等分析方法，已經成功應用在落花生遺傳歧異度評估 (Hopkins *et al.* 1999)，其中 SSR 序列是由 1-6 個鹼基重複排列組成，遍佈在基因組中，具有高的多型性比例、共顯性標誌、結果可靠、分析容易等優點。Krishna 等人 (2004) 利用 18 個螢光標定的 SSR 引子分析 48 個 Valencia 基因型的落花生栽培種，一共測得 120 個不同基因座，經過未加權算數平均法 (UPGMA) 之集群分析，能夠區分為 3 個遺傳相似集群；Moretzsohn 等人 (2004) 選用 12 個 SSR 引子分析 96 個落花生品種 (系) 與 36 個近源野生種，野生種涵蓋異質四倍體 *A. monticola* (AABB)、DD 基因組 *A. gladiifera*、13 個 AA 基因組有關的 2 倍體 ($2n=20$)、2 個 $2n=18$ 以及 10 個 BB 基因組的野生種，建立落花生品種 (系) 群集，可作為育種上親本選擇的參考。此外，SSR 基因座 *Ah-041* 其中 292 bp 對偶基因型為 AA 基因組品種 (系) 所特有，顯示 SSR 適合落花生狹窄遺傳變異的研究。

傳統根據外表型態的鑑定，耗時且易受環境因素影響，更增加判別上之困難，面對實際流通產品更無法達到鑑定目的，需要使用其他技術克服問題，DNA 指紋分析是指具有個體專一性的遺傳組成分析 (Jeffrey *et al.* 1985)，不受到組織部位、發育時期與環境因素影響，Levy 等人 (1988) 首次以 M13 噬菌體迷你衛星體 (minisatellite) 序列，利用南方雜合法建構棉花、大麥、黃豆、柑橘以及枸橘等植物物種獨特 DNA 指紋，並可與其他動物和微生物有所區隔，現在 DNA 指紋分析用途可分為物種演化和遺傳圖譜建立兩大方面，包括品種鑑定和基因體分析等實際應用 (Staub *et al.* 1999)。本研究針對本所培育落花生品種台農 6 和 7 號及其相關親源共 12 個品種 (系)，使用 97 個 SSR 引子組合進行分析，其中 77 組獲得可分析條帶，26 組具有多型性片段，可作為品種鑑定及育種材料選擇的參考依據，是國內首次利用專一性 SSR 標誌建立落花生栽培種 DNA 指紋資料。

材料與方法

供試材料品種來源

四倍體落花生栽培種 ($2n = 40$) 台農 6 號和台農 7 號及其相關親緣 (圖 1) 台農 5 號、台南 10 號、台南 11 號、南改系 141、CJ444、NcAcc17127、PI 240553、PI 314817、紅花以及西班牙白共 12 個品種 (系) (表 1)，94 和 95 年期作，按一般條件栽種於農業試驗所溫室和田間。

核酸萃取與分析

葉片 DNA 萃取方法根據 Borner 和 Branchard (2001) 的 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 方法進行。SSR 分析：於總體積 20 μL 的反應條件進行，包含 100 ng 基因組 DNA、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、2 mM MgCl_2 、200 μM dNTPs、0.6U Taq polymerase、0.25 μM SSR primer、5% DMSO 以及 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA，以聚合酶連鎖反應器 (MJ Research PTC-200) 進行反應，反應溫度參考 Ferguson 等人 (2004) 建議程序，開始 94°C 3 分鐘後，進行 40 循環的 94°C 45 秒、55°C 45 秒、72°C 1 分鐘，最後 72°C 10 分鐘。依據前人發表之 SSR 引子序列，挑選引子黏合溫度 55-60°C，PCR 擴增產物大小 500 bp 以下，且針對 2 至 4 鹼基簡單重複序列共 97 組 SSR 引子組 (He *et al.* 2003; Ferguson *et al.* 2004; Moretzsohn *et al.* 2005)。

電泳及影像紀錄

20 μL 聚合酶連鎖反應增殖的 DNA 產物，加入 4 μL 6X 的電泳緩衝液 (0.1% xylene cyanol 和 30% glycerol)，以 3% Agarose SFR™ 高解析度瓊膠 (Amresco Co., USA) 內含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙錠 (EtBr) 染色，在 1X TBE 緩衝液 (89 mM Tris-borate, pH 8.0 和 2 mM EDTA) 中進行電泳，電泳條件為 150 V 進行 90 分鐘，以紫外燈呈像後紀錄電泳圖譜。

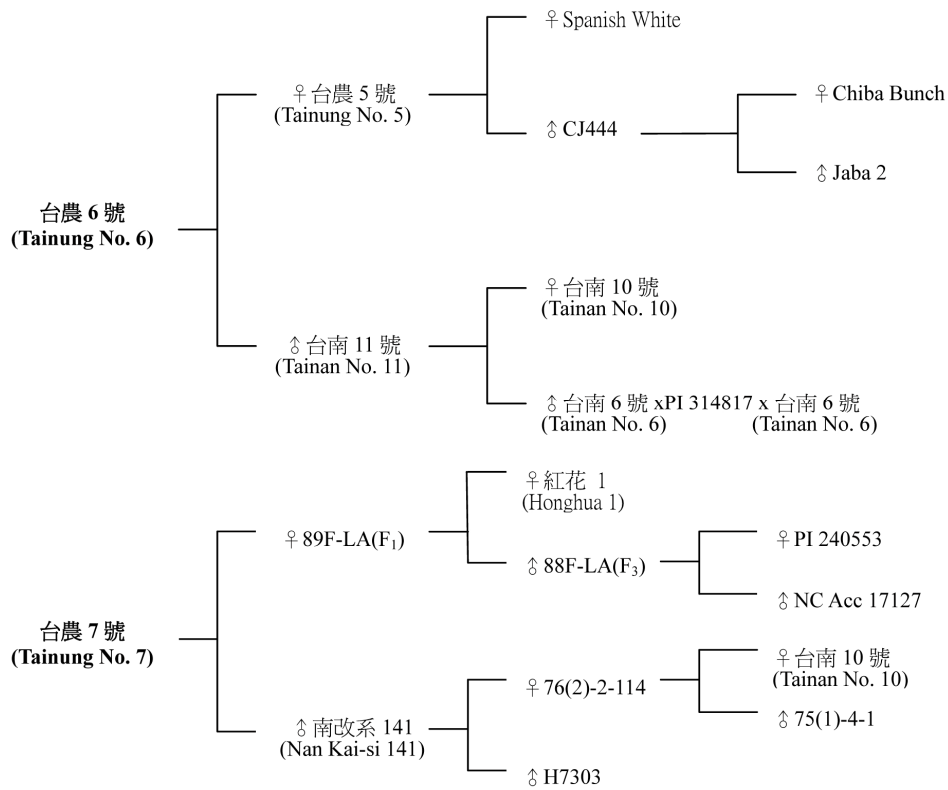


圖 1. 落花生台農 6 號和 7 號之譜系。

Fig. 1. The pedigree of peanut Tainung No. 6 and No. 7.

表 1. 供試落花生 (*Arachis hypogaea*) 之品種 (系) 代號、名稱以及植物型

Table 1. Code, cultivar name, plant botanical type and scientific name of subspecies and variety of peanuts used for SSR analysis

No	Variety (line)	Plant botanical type	Subspecies & variety
1	Tainung No. 5 (台農 5 號)	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
2	Tainung No. 6 (台農 6 號)	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
3	Tainung No. 7 (台農 7 號)	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
4	Tainan No. 10 (台南 10 號)	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
5	Tainan No. 11 (台南 11 號)	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
6	Nan Kai-si 141 (南改系 141)	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
7	CJ444	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
8	NC Acc 17127	Virginia bunch	<i>Hypogaea hypogaea</i>
9	PI 240553	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
10	PI 314817	Valencia	<i>Fastigiata Fastigiata</i>
11	Honghua 1 (紅花)	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>
12	Spanish white (西班牙白)	Spanish	<i>Fastigiata vulgaris</i>

SSR 基因座選殖及定序

SSR 基因座選殖利用 pGEM-T Easy Vector System (Promega Co., USA) 根據廠商建議步驟，取 3 μ L PCR 產物加入 5 μ L 2X rapid ligation buffer、3U T4 DNA ligase 以及 50 ng pGEM-T Easy Vector，混和均勻在室溫下反應 1 小時，同時取一管 ECOS™ 勝任細胞（益生生技，台灣），根據廠商建議步驟進行轉型作用，勝任細胞退冰後加入反應完成的接合質體震盪 1 秒，馬上放入冰上 2 分鐘，即可均勻塗佈 LB / Amp (LB broth with 1.5% agar and 50 ppm ampicillin) 平板培養基，於 37°C 恆溫箱倒置培養 12 小時以上，隔日挑選白色菌落，委託台灣波士特生技公司進行解序，所得序列上傳至 SDSC Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>) 網站進行相關比對分析。

結 果

落花生 SSR 標誌分析

以符合引子長度 18~26 鹼基、黏合溫度 55-60°C 以及 PCR 擴增產物大小 500 bp 以下條件之 97 組落花生 SSR 引子，對 12 個試驗材料進行分析（表 1），每個紀錄條帶經過至少 3 次重複的 SSR 分析，篩選可獲得清晰條帶、條帶數目及大小具有穩定再現性的 77 組引子，其中包括 28 組針對 di-nucleotide 重複序列（ga 重複有 17 組）、38 組針對 tri-nucleotide 重複序列（taa 重複有 23 組）、1 組 tetra-nucleotide（ctca 重複）以及 9 條含有 2 種 repeat motif 的重複序列，僅 SSR 引子 PM-73 未登載重複序列類型（表 2）（He *et al.* 2003）。每個 SSR 引子組可獲得 1~3 個可辨識條帶（圖 2），以 SSR 引子組 pPGSseq11E11, pPGPseq2G3, PM238, Ah-075, Ah-594 測得最多 3 個條帶，平均值為 1.33 條 / SSR 引子組（1 條：56 組，2 條：15 組，3 條：5 組），一共測得 102 個條帶，SSR 增幅產物（條帶）大小則介於 100 至 445 bp 之間（表 2）。

每個 SSR 引子組偵測到 1~6 個對偶基因，其中以基因座 pPGPseq5D5 和 PM36 觀測到最多 6 個（圖 3），計有 26 組具有多型性片段，平均 1.7 對偶基因 / SSR 基因座。在 102 個觀測條帶總共有 33 個多型性條帶約佔總數 32%。此外，有 13 個 SSR 引子組測得品種專一性條帶（表 3），栽培品種 PI 314817 和 NCAcc17127 分別觀測最多 5 個品種專一性條帶，其中 SSR 引子組 pPGSseq9B4 和 pPGSseq11G3 可同時區別兩者與其他試驗材料（圖 4），其次為 CJ444 觀測 4 個，國內育成品種台南 10 號僅發現一個專一性條帶（圖 4），可作為品種鑑定參考，PI314817 和 NCAcc17127 還同時共有 4 個與其他品種（系）不同之特殊條帶（pPGSseq9A7, pPGSseq19E9, pPGSseq16F1, pPGSseq10D4）。

落花生 SSR 序列分析

在本實驗的 77 組 SSR 引子分析，發現部份條帶與 He 等人 (2003) 和 Moretzsohn 等人 (2005) 的結果有差異，包括有 20 組引子產生的條帶數目與大小上有差異，另外，有 6 組 SSR 引子對並未記載預期片段大小（PM65, PM137, PM188, PM201, PM204, PM238），於是針對這兩部分有差異的 SSR 基因座，分別挑選 3 個 SSR 引子組及部分 PCR 產物有差異的樣品進行解序，利用商業化 pGEM-T Easy 殖體直接選殖 PCR 產物並作解序（表 4），結果落花生 SSR 引子組 pPGSseq17G6 觀測到 2 組相異條帶，分別為 pPGSseq17G6a 275~296 bp 和 pPGSseq17G6b 236~241 bp，此外，確認兩端序列與選用的專一性 SSR 引子序列相符，並且在序列中沒有發現任何明顯的 TTG motif；

表 2. 落花生 SSR 分子標誌分析之引子及 PCR 產物

Table 2. List of SSR primers used in 12 peanut cultivars, and the products of PCR amplification

Primer	Size (bp)	Number of bands	No. of distinguishable patterns	SSR Motif	Primer	Size (bp)	Number of bands	No. of distinguishable patterns	SSR Motif
pPGSseq11E11	186	3	2	ga	pPGSseq14F4	163	2	1	taa
pPGSseq13E6A	252	1	1	taa	pPGSseq15C12	274	2	3	taa
pPGSseq14E10	151	1	1	ttg	pPGSseq16F1	271	1	3	taa
pPGSseq15B1	116	1	1	taa	pPGSseq16G8	194	1	2	taa
pPGSseq17G6	249	2	5	ttg	pPGPseq2C11	264	1	1	taa/cac
pPGSseq18B8	254	2	1	taa	pPGPseq3A1	238	1	2	taa
pPGSseq18G10	254	1	1	ttg	pPGPseq2G3	215	3	1	taa
pPGSseq9A7	280	1	3	taa	pPGSseq11G3	224	1	3	ctt
pPGPseq3F1	290	1	1	ctca	pPGSseq16F10	298	1	1	ga
pPGPseq3E10	276	1	1	taa	pPGSseq15D3	289	1	2	ga
pPGPseq7H6	300	1	1	ctt	pPGPseq5D5	274	2	6	ga
pPGPseq3D9	292	1	1	ga/gt	pPGSseq18C2	139	1	1	at
pPGSseq9F1	240	1	1	at	pPGPseq3A8	152	1	1	taa
pPGSseq11H1	162	1	1	ga	pPGPseq2G4	289	1	2	taa
pPGSseq12E10	288	1	1	taa	pPGSseq19D9	271	1	3	taa
pPGSseq17E3	193	1	1	ctt	pPGPseq2D12B	265	1	3	taa
pPGSseq18A5	268	1	1	at/taa	pPGSseq15E12	135	1	1	at
pPGSseq19E9	255	1	2	taa	pPGSseq15E8	298	1	1	taa
pPGSseq9B4	254	1	3	ttg/taa	pPGSseq12B6	238	1	1	cta
pPGPseq1B9	282	2	1	ga	pPGSseq15F12	281	1	2	ga
pPGSseq12F7	290	1	1	taa	pPGSseq18G9	225	2	1	taa
pPGPseq8E12	198	1	3	ttg/taa	pPGSseq19F4	283	1	1	ga
pPGPseq8D9	132	2	3	ctt	PM-53	116	1	1	at
pPGPseq2F5	262	1	1	taa	PM-73	100	1	1	
pPGSseq18G1	277	2	1	taa	PM-210	179	1	3	ct
pPGPseq2E6	250	2	4	ga	PM65	210	1	1	ct
PM3	200	1	1	ga	PM137	150	1	1	ga
PM36	190	2	6	ga	PM188	100	1	1	ga
PM45	100	1	1	ga	PM201	223	2	1	ct
PM145	170	1	1	ct/ca	PM204	214	1	3	ga
PM183	100	1	5	ct	PM238	170	3	1	ct
PM200	150	1	1	ct/ca	Ah-075	149	3	1	aca
Ah-041	266	1	1	ctc/aac	Ah-325	230	1	1	ttg
Ah-193	445	1	1	aac/ga	Ah-594	184	3	1	aac
Ah-558	233	2	1	ttg	Ah-638	268	1	1	aac
Ah 4-26	150	2	3	ct	Ah-649	220	2	1	aac
PM-15	177	1	1	ga	Ah-715	112	1	1	aac
PM-32	103	1	1	ct					

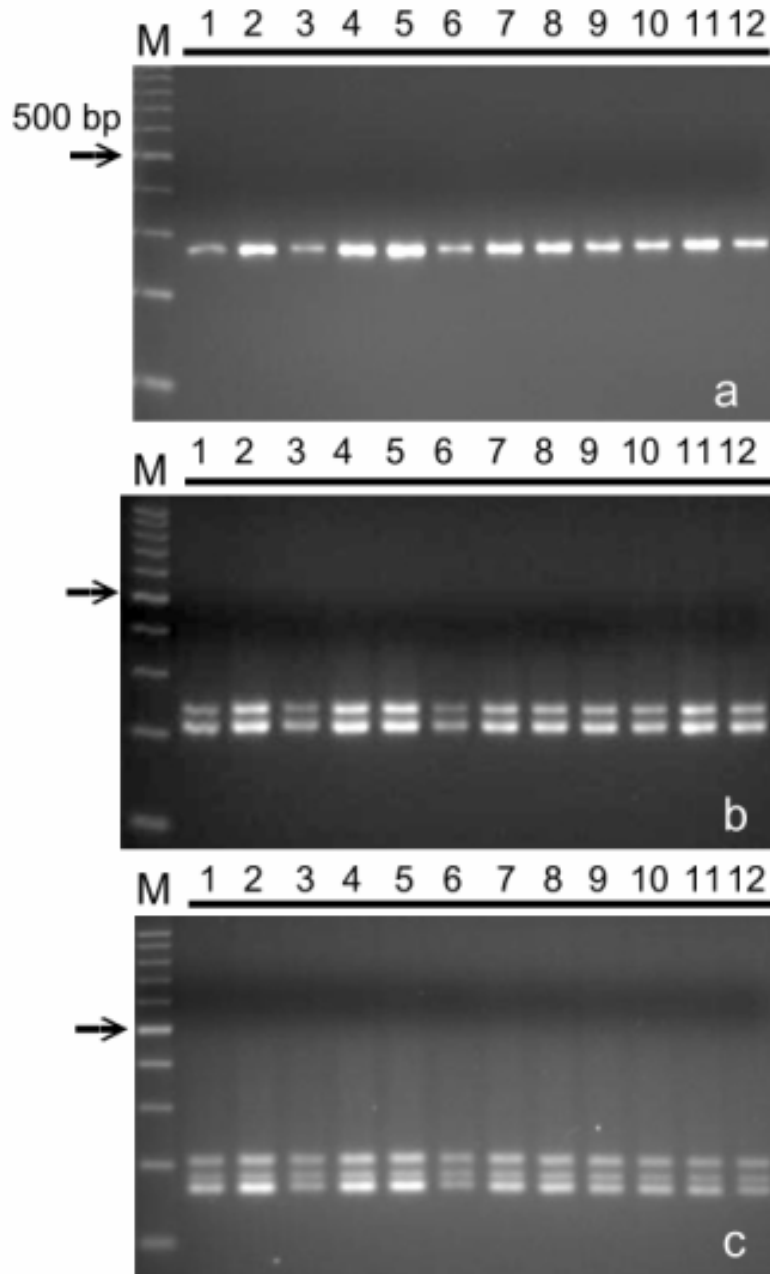


圖 2. 落花生以 (a). Ah-638、(b). Ah-649 以及 (c). Ah-594 引子擴增之 SSR 圖譜，每個 SSR 引子組分別測得 1-3 個條帶。(1~12 為落花生品種代號，詳見表 1)

Fig. 2. Amplification profiles of 12 cultivars (lines) of peanut using (a). Ah-638, (b). Ah-649, and (c). Ah-594 as SSR primers revealed 1-3 fragments. (Line numbers at top refer to the number in Table1. M=100 bp DNA ladder).

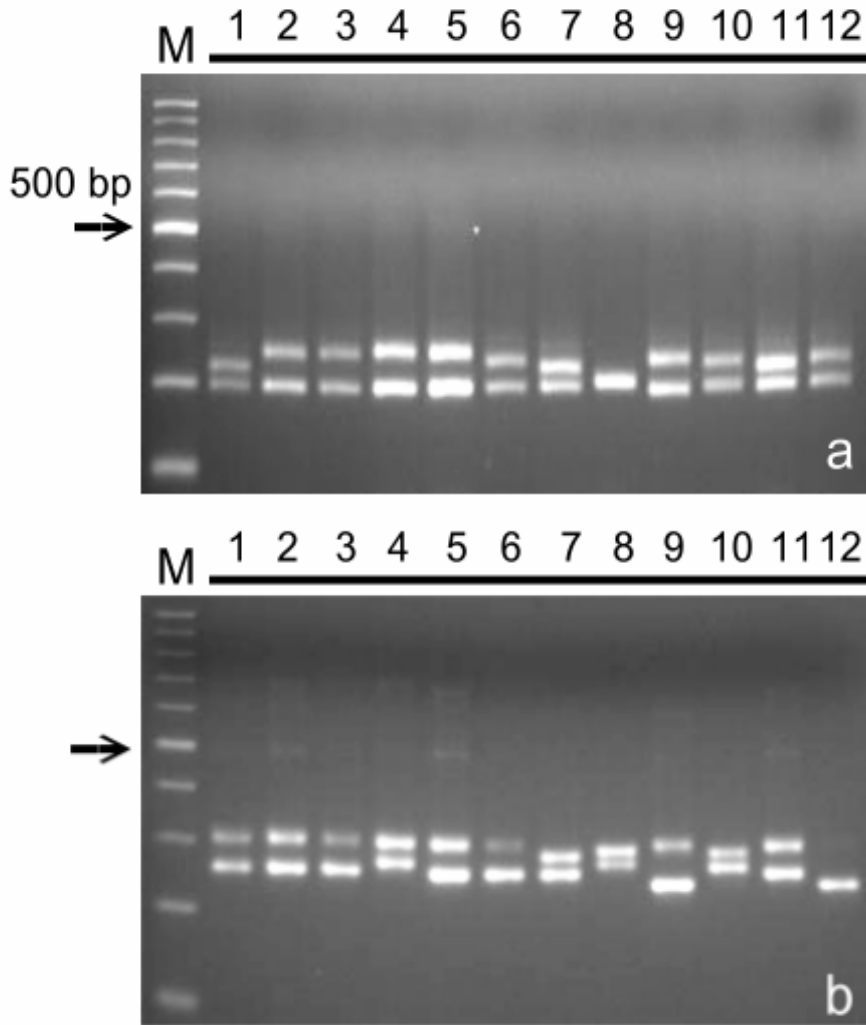


圖 3. 以 (a). PM36 和 (b). pPGPseq5D5 為引子之 12 個落花生 SSR 多型性圖譜。(1~12 為落花生品種代號，詳見表 1)

Fig. 3. The polymorphic SSR patterns of 12 cultivars (lines) of peanut obtained using primers PM36 and pPGPseq5D5. (Line numbers at top refer to the number in Table 1. M= 100 bp DNA ladder).

表 3. 鑑別落花生品種（系）之 SSR 引子

Table 3. SSR primers for differentiating peanut cultivars

Cultivar	Primer revealing specific fragments
Tainan No.10	pPGPseq2D12B
CJ444	pPGSseq18A5, pPGSseq13A10, pPGSseq16G8, pPGPseq5D5
NC Acc 17127	pPGSseq11E11, pPGSseq9B4, pPGSseq11G3, PM36, Ah 4-26
PI 314817	pPGSseq9B4, pPGSseq11G3, pPGSseq15D3, pPGPseq8D9, PM-210

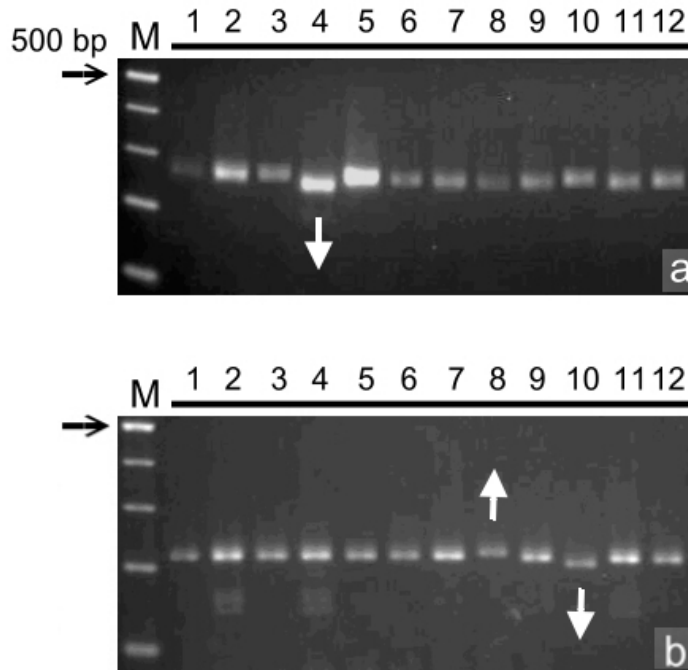


圖 4. 鑑別落花生品種之 SSR 標誌，以 (a). pPGPseq2D12B 和 (b). pPGSseq11G3 為引子可分別鑑別台南 10 號、NCAcc17127 以及 PI314817。(1~12 為落花生品種代號，詳見表 1)

Fig. 4. SSR markers for identification of peanut cultivars Tainan No. 10, NCAcc17127, and PI314817 obtained using primers (a). pPGPseq2D12B and (b). pPGSseq11G3, respectively. (Line numbers at top refer to the number in Table 1. M= 100 bp DNA ladder).

表 4. 國內落花生栽培種 SSR 引子序列、片段大小、重複序列類型以及解序樣品

Table 4. Characterization of SSR loci in Taiwan cultivated peanut primer pairs, fragment size, repeat motif, and sequenced samples

SSR locus	Primer pairs (5'→3')	Size (bp)	Repeat motif/ similar loci	Variety ^z
pPGSseq17G6a	AACGACAACGACAACGACAA TCCACTATACAGTTGGGGGC	296/288/276/275	Ah-371	2, 3, 6, 7, 10
pPGSseq17G6b		241/236	Ah-371	
pPGSseq9F1	GCCTAGTGTGCAAAGGTGCT CACCTGATGTGTAGTGAGGCA	240	(AT) 5	2, 5, 10
PM-32	AGTGTTGGGTGTGAAAGTGG GGGACTGGGAACAGTGTTTATC	103	(CT)8(CT/G)(CT)7	3, 8, 10
PM188	GGGCTTCACTGCTTTTGATT TGCGACTTCTGAGAGGACAA	100/102	(GA)7/6	3, 4, 10
PM201a	CCTTTATAGAGGACCTTCCCTCTC GCCTATTTGGTATCGGCTCA	223/225	(CT)19/20	2, 5, 10
PM201b		138	PM201/PM347a	
PM204	TGGGCCTAAACCCAACCTAT CCACAAACAGTGCAGCAATC	224/220/218/214	(GA)24/22/21/19	1, 3, 9, 10

^z Variety numbers refer to the number in Table1.

目前已公佈超過 400 個花生 SSR 基因座，每個 SSR 基因座的平均對偶基因數目介於 4.25-6.9 (He *et al.* 2003, Krishna *et al.* 2004)，本實驗測得數據 1.74 對偶基因 / SSR 基因座數目低於平均值，可能的解釋是在育種過程中因為重覆使用少數的優良親本，導致落花生栽培品種之遺傳變異狹小，如 SpanishWhite 同時是台農 4、5、6 號的親本 (Huang *et al.* 1996)，導致對偶基因數目的減少，在小麥栽培品種遺傳變異的研究中也發現相似的情形，人為的育種選拔造成的遺傳歧異的減少，比引種導入新的基因型的速度來的快 (Roussel *et al.* 2005)，此外，本實驗選用 3% Agarose SFR™ 瓊膠作為 SSR 基因座電泳分析，不論在膠體備製與染色上具有操作簡便的優點 (Huang *et al.* 1996)，但是解析度和靈敏度較利用傳統 6% 聚丙烯酰胺膠體差，造成觀測的對偶基因數目偏低，SSR 基因座解序資料也證實對偶基因的數目受到低估。此外，有 20 組引子的擴增產物無法精確鑑別，包含產生不專一的 PCR 產物，或是未能獲得清晰的結果，可能的原因有引子設計不良，造成 PCR 反應引子黏合效率不佳，部份的無效對偶基因 (null allele) 甚至可能是品種 (系) 特徵，但仍無法完全排除是過程中人為的實驗誤差。

本實驗中多型性引子組和多型性條帶數目約佔整體 32%，相近於國外栽培種花生 SSR 研究的結果 (34%)，較范等人 (1999) 以 RAPD 分析台灣落花生種原的引子多型性比率 5.5% 及條帶多型性比率 9.9% 高出 3 倍以上，顯示相較於 RAPD 可以減少實驗數目而達到相同的效果，同時 SSR 標誌不論在可靠性再現性也明顯優於 RAPD，因此適合作為落花生遺傳變異之研究。栽培種落花生分為 2 亞種 *Arachis hypogaea* spp. *hypogaea* 及 *Arachis hypogaea* spp. *Fastigiata*，依其植物型態共可分為 Spanish、Valencia、Virginia bunch、Virginia runner 四型，范等人 (1999) 以 11 個 RAPD 引子分析 30 個國內落花生栽培品種 (系)，雖然可以區分不同的育種系統及未參與的國外引種材料，但是同一育種系統內不同植物型材料卻落在相同分群，本實驗所使用落花生台農 6 號和 7 號及相關親緣共 12 個品種 (系)，除了 Virginia bunch 植物型 NCAcc17127 和 Valencia 植物型 PI314817 其餘都是 Spanish 植物型，並且兩者各有 5 個品種專一性條帶，及 4 個共通的多型性條帶，分別可以與台農 6 號和 7 號及其他 8 個 Spanish 植物型的育種系統區別，顯示相較於 RAPD 標誌，SSR 標誌更適合栽培種落花生種原管理之應用。

本實驗發現 26 個 SSR 基因座的參考資料不齊全或是與實驗觀測結果有明顯的出入 (He *et al.* 2003, Moretzsohn *et al.* 2005)，所以挑選 6 個落花生 SSR 基因座並針對部分的參試品種 (系) 進行解序分析，結果發現的確與資料有不相符之處，pPGSseq17G6 同時偵測到 2 個條帶，其中 pPGSseq17G6a 不同品種 (系) 的差異較大，先行確認 PCR 產物兩端的序列與參考資料一致，排除引子序列錯誤的可能性，台農 6 號 pPGSseq17G6a 序列與資料庫落花生 SSR 基因座 *Ah-371* 相似，pPGSseq17G6b 也同樣未發現記載的 TTG motif，顯示這一系列有比較大的變化，可能是因為落花生栽培種是異質四倍體，所以 SSR 引子增幅基因組中相似但不相同於目標 SSR 位置；pPGSseq9F1 基因座預期產物大小為 296 bp，而國內落花生栽培種觀測到 240 bp 片段，序列中確實有 SSR (AT)₅ motif，這樣的差異應該是品種特性的關係，前人研究中指出有越多的重複套數，多型性的程度也較高，而落花生 AT motif 有最高的平均 19.5 個重複套數 (Ferguson *et al.* 2004)；PM-32 基因座並未記載序列重複 motif 類型，經過選殖解序後確定屬於 CT motif，在 PI314817 品系序列中發現單一核酸變異 (SNP) 是最小的序列差異，並無法利用普通電泳分析發現此類多型性變異，須藉由特定的核酸內切酶如 *Cel I* 的作用，才能在傳統電泳分析中顯示出差異；引子 PM188 擴增產物解序得知條帶大小分別是 100 和 102 bp，不同對偶基因僅相差 2 bp，不容易利用瓊膠電泳找出差異；引子 PM201 同時測到兩個多型性條帶，分別以 PM201a 和 PM201b 表示，其中 PM201b 的序列未發現

CT motif，兩端序列相似於落花生 SSR 基因座 PM201 和 PM347a，由於微衛星序列大量遍佈在基因組中，可能是演化過程中退化喪失重複序列；PM204 基因座四個解序的樣品帶有不同的對偶基因，並未在高解析瓊膠電泳中發現差異，雖然瓊膠電泳可以簡化分析過程，加快分析效率，但是因此降低了條帶的解析度，整體而言 SSR 分析應根據不同的實驗需求選擇合適的 PCR 產物分析方式。本實驗發現栽培種落花生 SSR 標誌中存有許多遺傳變異，包括缺失、重複次數差異以及 SNP，較 RPAD 及 ISSR 標誌更適合落花生遺傳變異研究，值得進一步開發利用，但缺點是 SSR 分析成本高，限制應用的普遍性。台灣落花生栽培種的遺傳變異狹小，易引發遺傳脆弱性的問題，故近緣野生種引進有助於擴大變異及花生銹病與葉斑病抗性種原的利用 (Hung *et al.* 1999)，可是 DNA 層次的變異相對低落，為了達到育種與種原管理目的，需要建立新的遺傳分析系統，本實驗是國內首次採用落花生 SSR 標誌，建立落花生重複序列分析流程，完成初步的 DNA 指紋資料，並顯示 SSR 標誌可作為種原管理與品種鑑定；並且針對落花生多型性之重複序列進行鑑定與描述，希望將來能利用於落花生遺傳圖譜建立、分子標誌輔助育種、抗性基因選殖以及物種內演化關係建立等用途。

引用文獻 (Literature cited)

- Bornet, B., and M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19:209-215.
- Fan, M. J., S. F. Lo, J. Y. Wang, T. R. Shu, W. L. Tsau, K. H. Yang, and Y. S. Cheng. 1999. Studies on the genetic relationship of peanut germplasm in Taiwan. *J. Agric. Res. China* 48:67-85. (in Chinese with English abstract)
- Ferguson, M. E., M. D. Burow, S. R. Schulze, P. J. Bramel, A. H. Paterson, S. Kresovich, and S. Mitchell. 2004. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108:1064-1070.
- He, G. R. Meng, M. Newman, G. Gao, R. N. Pittman, and C. S. Prakash. 2003. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) *BMC Plant Biol.* 3:3.
- Hopkins, M. S., A. M. Casa, T. Wang, S. E. Mitchell, R. E. Dean, G. D. Kochert, and S. Kresovich. 1999. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop Sci.* 39:1243-1247.
- Huang, H. J., W. L. Tsau, K. H. Yang, and J. N. Tsai. 1996. Evaluation of agronomic characteristics for the introduced wild peanut. *J. Agric. Res. China* 45:15-25. (in Chinese with English abstract)
- Huang, H. J., W. L. Tsau, S. F. Lin, J. S. Hsieh, and J. N. Tsai. 1999. Identification and characteristic analysis of interspecific hybrids of peanut. *J. Agric. Res. China* 48:40-51. (in Chinese with English abstract)
- Huang, H. J., S. F. Lin, and J. S. Hsieh. 2001. Identification of the inconsistency between genomic constitution and phenotypic variation in interspecific hybrids (4x × 2x) of peanut with DNA marker. 2001. *J. Agric. Res. China* 50:12-24. (in Chinese with English abstract)
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thien. 1985. Individual-specific "fingerprinting" of human DNA. *Nature* 316:76-79.

- Krishna, G. K., J. Zhang, M. Burow, R. N. Pittman, S. G. Delikostadinov, Y. Lu, and N. Puppala. 2004. Genetic diversity analysis in Valencia peanut (*Arachis hypogaea* L.) using microsatellite markers. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9:685-697.
- Moretzsohn Mde C., M. S. Hopkins, S. E. Mitchell, S. Kresovich, J. F. Valls, and M. E. Ferreira. 2004. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biol.* 14:4-11.
- Moretzsohn Mde C., L. Leoi, K. Proite, P. M. Guimaraes, S. C. M. Leal-Bertioli, Ma. A. Gimenes, W. S. Martins, J. F. M. Valls, D. Grattapaglia, and D. J. Bertioli. 2005. A Microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theor. Appl. Genet.* 111:1060-1071.
- Roussel, V., L. Leisova, F. Exbrayat, Z. Stehno, and F. Balfourier. 2005. SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theor. Appl. Genet.* 111:162-170.
- Staub, J. E., and F. C. Serquen. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortic. Sci.* 31:729-739.



Microsatellites as DNA Markers in Taiwan Cultivated Peanut¹

Jen-Ren Chen², Kin-Hsing Yang³, Tung-Hai Tseng³, Toong-Long Jeng³
and Min-Tze Wu^{2,4}

Abstract

Chen, J. R., K. H. Yang, T. H. Tseng, T. L. Jeng, and M. T. Wu. 2007. Microsatellites as DNA markers in Taiwan cultivated peanut. *J. Taiwan Agric. Res.* 56:176-188.

The objectives of this work were to establish simple sequence repeat (SSR) DNA fingerprinting database and characterized SSR polymorphism in local peanut cultivars (*Arachis hypogaea* L.). In this investigation, 12 peanut cultivars were analyzed by using 97 SSR primer pairs. Seventy-seven SSR markers showed clear patterns and a total of 102 bands were recorded. Twenty-six SSR loci revealed polymorphism 13 of them were specific for cultivar identification. The average number of alleles per locus was 1.74, and up to 6 alleles were found at one locus. Six SSR loci in tested cultivars were sequenced for allele identification. The results indicated that different type of variation in SSR loci, including single nucleotide polymorphism (SNP), tandem repeat numbers, and non-repeat sequence locus. The results revealed that SSR markers produced a higher level of DNA polymorphism than other DNA markers in cultivated peanuts.

Key words: Cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.), Molecular marker, Simple sequence repeat (SSR).

1. Contribution No. 2293 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: August 5, 2007.

2. Respectively, Research Assistant, Researcher and Senior researcher and Head of Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Researcher, Crop Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

4. Corresponding author, e-mail: wu@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.