

西瓜雜交一代品種純度檢定 SNP 標誌 之開發與應用

龔美玲¹、周佳霖²、林延諭³、陳哲仁¹、張惠如⁴、鍾文全⁵

一、前言

炎炎夏日，來吃片西瓜、喝杯西瓜汁消暑解渴吧！根據臺灣食品營養成分資料庫指出，西瓜 (*Citrullus lanatus*) 具有醣類、維生素 A、B1、B2、C 及 E、礦物質、鉀、鎂、磷等營養成分，西瓜 90% 左右都是水分，所以也是補充水分的好來源。據行政院農業委員會農糧署 106 年臺灣地區蔬菜生產概況調查，西瓜在臺灣栽培面積達 10,441 公頃，產量 210,661 公噸。西瓜的栽培密度每公頃約 2,500-2,800 株，平均種子售價約新台幣 0.8~1 元/粒，平均穴盤苗售價約 5-10 元/株，粗估臺灣每年西瓜市場種子種苗需求可達 2 千萬元以上。查詢財政部關務署統計資料庫，106 年度西瓜種子出口總量為 17,280 公斤，出口貿易額將近 1 億 2,400 萬元，是我國種苗產業重要經營作物品項之一。

西瓜商業品種目前多以雜交品種為主，雜交一代 (F1) 種子具有雜種優勢，表現優於父、母本。雜交種子生產過程，在將母本去雄後以父本花粉授粉的階段，容易有去雄不完全而造成自花授粉，或受

外來花粉污染等情形而影響種子純度。傳統以田間試種方式檢查幼苗至成株的外表型，需花費將近一期作時間才能確認該批種子的純度，以分子技術輔助種子 (苗) 遺傳純度檢測，可大幅縮短檢測時間，提昇檢測的效率與準確度，爭取最佳出貨時效。

二、SNP 基因座挑選策略

分子標誌是作物遺傳研究最常使用的工具之一，單一核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphic, SNP) 在同一物種內可通用，數量多且較具多型性，標誌的穩定性及再現性俱佳。隨著定序技術的進步，定序成本大幅降低，越來越多的作物基因體解序資料可從公開資料庫取得，定序數個品系即可同時完成大量 SNP 探勘及基因型分析；本研究利用 Guo 等人 (2013) 所發表之 6,784,860 個 SNPs 對 20 個西瓜收集系 (accession) 的基因型資料，為求有效率的篩選出多型性豐富的 SNP，需要將資料做進一步的分析。在將野生種與半野生種的資料剔除後，計算每個 SNP 基因座的次要對偶基因頻度 (Minor Allele Frequency, MAF) 值，保留 MAF 大於 0.47

¹ 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

² 種苗改良繁殖場屏東種苗研究中心 助理研究員

³ 臺東區農業改良場斑鳩分場 助理研究員

⁴ 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

⁵ 種苗改良繁殖場生物技術課 研究員兼課長

研究成果

者，剔除栽培種中沒有多型性且基因型分析有缺值的 SNP 基因座，另為避免挑選到基因型分析訊息重複的 SNP，透過計算相鄰 SNP 基因座間的相关性，淘汰基因型共分離（連鎖）者，結果總共留下 2,156 個的 SNP 基因座。

三、SNP 分子標誌設計與聚合酶連鎖反應

從葫蘆科基因體資料庫 (<http://cucurbitgenomics.org/>) 下載西瓜基因體序列，擷取 SNP 位點前後各 500 bp 的序列，批次送入 BatchPrimer3 線上軟體 (<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>)，選擇 'Allele-specific (AS) primers and allele-flanking primers'，設定引子大小介於 15~30 mer，偏好值為 20 mer、黏合溫度介於 57~63°C，偏好值為 58°C、側翼產物大小介於 200~1,000 bp，偏好值為 1,000 bp，勾選 3' 端倒數 3 mer 位置錯誤配對 (mismatch) 選項，進行引子設計；挑選 2 個側翼序列與 2 個 SNP 對偶基因皆設計成功，且側翼條帶與對偶基因專一性條帶大小差異大於 50 bp 的引子組合，再以收集之參試品種進行標誌評估及驗證。聚合酶連鎖反應總體積 10 μ l，含 20 ng DNA，0.4 μ M AS 引子，0.2 μ M 與 AS 引子同向之側翼引子，0.4 μ M 反向側翼引子，1X Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Ampliqon)；反應條件：94°C 2 分鐘；94°C 30 秒，58°C 30 秒，72°C 1 分鐘，34 cycles；72°C 5 分鐘；將 PCR 產物載入 2% 洋菜膠片 (含 SafeView DNA Stain (GeneMark)) 進行水平電泳，經 200 伏特

分離 45 分鐘後以照相系統記錄。

四、結果

總共成功設計 857 組對偶基因專一性標誌 (allele specific marker, AS-marker)，在各染色體的分布數量以第 1 條染色體最多有 124 個，第 3 條染色體上最少僅 39 個。挑選每條染色體約 10 個等距位置分布的 AS 標誌進行引子合成及電泳分析，針對多型性標誌數較少之染色體再增加測試數量，總共合成 140 個 AS 引子組 (圖 1) 進行測試。以 140 個 AS 標誌分析 21 個西瓜雜交組合基因型，46 個標誌無法產生目標

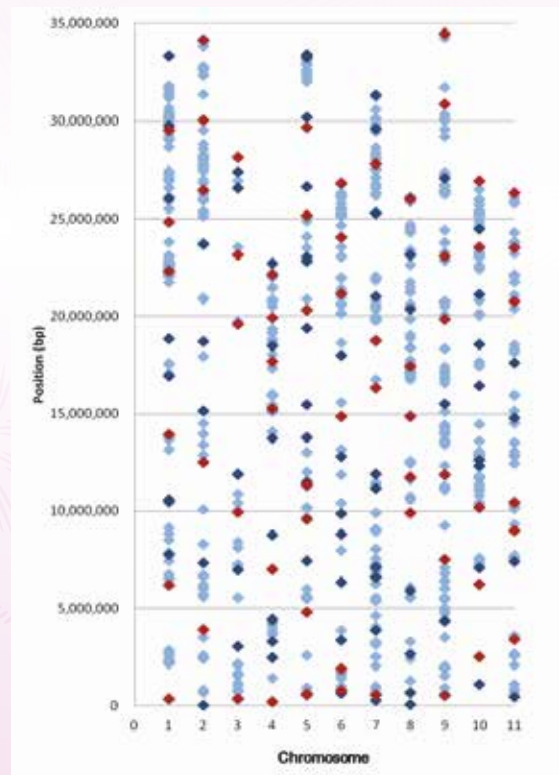


圖 1、本研究篩選設計之 SNP 對偶基因專一性 (AS) 標誌在西瓜基因體的分布情形。橫軸為染色體，縱軸為 base pair 位置。淺藍色點、深藍色及紅色點為 857 個初步挑選到的 SNP 基因座；深藍色及紅色點為實際合成測試的 140 組 SNP AS 標誌；紅色點為本次研究建立的 63 個候選標誌。

條帶，可成功增幅的 94 個標誌中，26 個標誌不具多型性，5 個標誌因判別困難而不採用，結果有 63 個標誌至少在 1 個雜交組合之父、母本與 F1 間具有多型性（電泳圖示請見圖 2），分佈位置涵蓋西瓜 11 條染色體，每條染色體上各有 4-8 個不等的西瓜純度識別候選標誌（圖 1）；進一步分析參試雜交組合親本基因型，可挑出其中 6 個 SNP 標誌之組合用於區分 22 個親本品系，在兩兩品系間至少有 1 個標誌具有多型性（表一）。

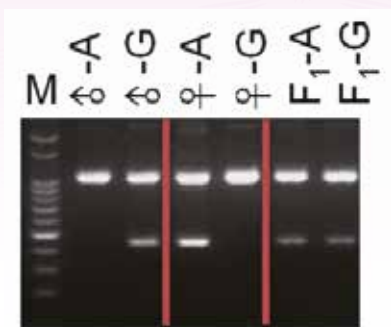


圖 2、對偶基因專一性 (AS) 標誌基因型電泳分析結果，以標誌 WM_SNP_7.4 為例，1,041 bp 為側翼條帶，專一性條帶 (AS) 約 433 bp，父本基因型為 GG，母本基因型為 AA，雜交一代 (F1) 為 AG 異質結合型。

五、結語

AS 標誌適用低通量的膠體電泳分析，將已知具多型性之 SNP 轉換成高通量分析的即時聚合酶連鎖反應 TaqMan 螢光探針系統（圖 3），操作簡單且系統可自動判讀訊號，適合檢測大量樣品時使用。SNP 在基因體中分佈廣泛，基因型分析方法多元，包括酶切、探針、高解析度解離分析 (High Resolution Melting, HRM) 及直接定序等方式，可依據實驗室檢測能力、成本、操作方便性等考量選擇適合的檢測方式。本研究總共建立的 63 個 SNP 候選標誌，由於經過篩選分析可預期這些 SNP 基因座的多型性豐富，因此可廣泛供西瓜雜交組合純度檢定使用，也可應用於親本純度檢定、品種鑑定及分子標誌輔助育種，有助於西瓜種苗產業發展。

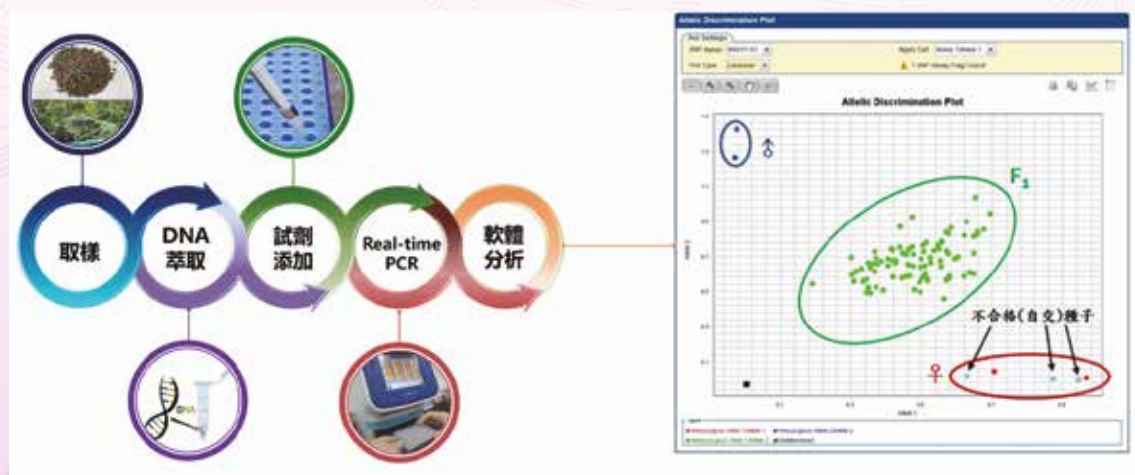


圖 3、西瓜雜交種子純度即時聚合酶連鎖反應檢測流程。利用即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 螢光探針系統偵測 SNP，單次可自動分析 96 個樣品，箭頭指向之淡藍色點代表不合格的母本自交種子。

表一、22 個參試親本品系對 6 個 SNP 標誌之基因型列表

品系 \ 標誌	WM_SNP_1.4	WM_SNP_2.5	WM_SNP_4.2	WM_SNP_4.3	WM_SNP_4.5	WM_SNP_5.1
AP2111	T	A	A	C	A	G
Cby F	T	G	A	C	A	A
D27	C	A	G	T	A	G
Fry 1w	C	A	G	C	A	G
Harris cs	C	G	G	T	G	A
ITL004 CS	T	A	G	C	A	A
LS20	C	A	G	C	G	G
M1015	T	A	G	C	G	A
M556-2F	C	A	G	T	G	G
RA108	C	G	G	C	G	A
RB308	C	G	G	T	A	G
UC12	T	G	A	T	G	G
UC3	C	G	G	T	A	A
UC4	C	G	A	C	A	G
UC8	C	G	A	C	G	G
UK48	C	A	A	C	A	G
UK75	T	G	G	T	A	G
UK76	C	G	A	T	A	G
WT1	T	A	A	C	G	A
WT41 bb	T	A	A	T	A	G
YVR as	T	G	G	T	G	A
英風 F8	T	G	A	C	A	G