

豌豆品種分子鑑定之研究

張瑞炘

摘要

豌豆為國內重要之豆科蔬菜作物，近年來本場已育成之品種有臺中12號至臺中16號等品種。隨著作物品種權的觀念逐漸普及，發展分子鑑定技術以保護國內品種已成為十分重要的研發工作。本次試驗是利用78個SSR分子標誌，在21個豌豆品種間進行多型性試驗，藉此篩選穩定且具有高度多型性的SSR標誌，試驗結果顯示在78個SSR標誌中，有39個具有多型性，挑選其中17個容易判別的SSR標誌作為分型的依據，這17個SSR標誌平均對偶基因數為4.24個，PIC值平均為0.5847，利用這些SSR標誌可將21個豌豆品種個別獨立鑑定。本次試驗建立的豌豆品種分子鑑定技術，可作為日後進行豌豆品種侵權鑑定的參考依據。

中英文關鍵字：豌豆 Pea、品種鑑定 Variety Identification、簡單重複序列 Simple Sequence Repeat

前言

豌豆(*Pisum sativum* L.)俗稱荷蘭豆，適合栽培於冷涼乾燥氣候，在臺灣秋冬季節於平地可栽培，春夏季則需要在高山冷涼地區才可生產。蔬菜豌豆依用途不同，品種可分為嫩莢用、嫩豆用、葉用及甜豌豆等，近年來本場育成之新品種有臺中12號、臺中13號、臺中14號、臺中15號及臺中16號。

近年來保護植物品種權的觀念逐漸被重視，由於作物品種的研發需要投資大量的時間成本及人力、物力，每一個作物品種都是育種研發單位重要的智慧財產，為健全種苗產業之發展，保障育種者之權利，鼓勵研發新品種，必須發展可靠的作物品種鑑定技術。而自交作物或無性繁殖作物之種子、種苗十分容易被複製，其品種權更需要加以保護。作物品種鑑定的傳統作法是根據其生理特性或是外觀性狀特徵進行判定，然而種子或種苗本身無法在短時間內測量完整的生理資訊，例如早熟性、果皮顏色、產量、抗病性等等性狀，而這些外表型性狀亦容易受到栽培環境的影響而難以客觀認定，因此藉由DNA的檢測可以不受作物生育期的限制並且可避免環境的影響，只需少量作物組織即可提供客觀明確的證據，以作為品種鑑定之依據。

分子標誌(molecular marker)是指作物DNA的特定序列，可經由聚合酵素連鎖反應或是限制切割酵素的作用而被偵測，目前最廣泛應用的分子標誌為簡單重複序列(simple sequence repeat, SSR)，又稱為微衛星序列，SSR是指作物DNA序列中以1個到6個鹼基為單位重複排列的序列，這些序列的重複次數在不同品種間具有長度差異性，因此可作為品種鑑定的基礎，其優點是多型性及再現性高，可進行不同實驗室之間的資訊比對。

本次研究之目的是利用SSR分子標誌建立豌豆品種之鑑定技術，以保護國內豌豆之品種權。所採取的策略是蒐集文獻中的78個SSR引子序列，以國內的21個豌豆品種進行測試，之後篩選表現穩定的SSR作為未來品種鑑定之依據。

內容

一、SSR分子標誌多型性測試方法

本次試驗共蒐集21個豌豆品種，包括臺中11號、臺中12號、臺中13號、臺中14號、臺中15號、臺中16號、三十日、白仁、法國大莢、黑鼻豌豆、日本矮性黑目、在來白花、新黑目、乙女、紅花軟莢、薩摩、軟莢M.L.、泰國紅花、泰國白花、翠綠甜豌豆303號、黑目。以上種原由本場蔬菜研究室或農業試驗所國家種原中心提供，豌豆種原栽培後，摘取葉片並萃取DNA。SSR分子標誌的引子序列主要來自國外學者發表之豌豆基因圖譜，總共下載78組引子序列，聚合酵素連鎖反應(PCR)使用的試劑為Fast-Run Taq Master Kit (Protech Technology, Taiwan)，總反應體積為25 μ L，內含10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、0.01% Gelatin、1.5 mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、3.75 U Taq DNA polymerase、1 μ L DNA及0.4 μ M 引子，反應儀器為GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)，反應溫度及反應時間依各分子標誌之不同而調整。PCR產物以瓊脂膠進行電泳分離，如果品種間SSR片段之長度太過接近導致難以判定者，則使用毛細管電泳進行分析，SSR的分型效力以PIC(polymorphism information content)值表示，PIC值越大則代表分型效力越好。

二、SSR分子標誌多型性測試結果

分析結果如表一所示，結果顯示在78個SSR中，共有39個具有多型性，挑選其中17個較易以肉眼判別的SSR，分別是AA238、AA446、AB31、AB33、AB40、AA321、A9、AB133、AC58、AD73、AD83、AD147、AD270、D21、D23、PSADH1以及P1109。這17個SSR所產生的對偶基因，最少為2個，最多為9

個，平均為4.24個。PIC值從0.2449到0.8980，平均為0.5847。將各個不同大小的對偶基因以大寫英文字母進行編碼，可方便未來採用代碼的方式進行各品種的鑑別。

表一、SSR分子標誌多型性測試結果。平均每個分子標誌可產生4.24個對偶基因，PIC值最低為0.2449，最高為0.8980，平均為0.5847。同一基因座上的不同對偶基因使用英文字母加以編碼。

Table 1. Results of polymorphism tests on 17 markers. Each SSR marker produces 4.24 alleles in average. The range of PIC is from 0.2449 to 0.8980, and the average is 0.5847. The allelic SSRs with different sizes of the same locus were symbolized by capital letters.

SSR name	Sizes of polymorphic SSR alleles (bp)									Sum of alleles	PIC	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I			
AA238	187	260								2	0.4082	
AA446	407	431	445	477						4	0.7302	
AB31	351	360	368	370	372	377	407			7	0.8390	
AB33	335	340	368							3	0.6349	
AB40	320	330	350							3	0.5261	
AA321	340	420								2	0.2449	
A9	340	350	360							3	0.6259	
AB133	340	350	360							3	0.5714	
AC58	203	205	207	208	213	219	236	239		8	0.7993	
AD73	223	225	227	229	231	268	270	272		8	0.7823	
AD83	250	260								2	0.3628	
AD147	304	310	331							3	0.6077	
AD270	250	252	280	282	284	307	309	311	319	9	0.8980	
D21	230	260	285							3	0.4989	
D23	260	270	295							3	0.3220	
PSADH1	343	382	384	386	390	395	409			7	0.6440	
P1109	375	390								2	0.4444	
										Average	4.24	0.5847

三、各品種之SSR鑑定結果

豌豆品種經由17個SSR分子標誌進行PCR反應及電泳分析後，試驗結果如表二所示，結果顯示21個豌豆品種皆可以各自被獨立鑑定，本次試驗篩選的17個SSR標誌可作為品種保護的依據。在表中SSR片段大小根據表一的編碼方式，以英文字母取代數字，如此可更加方便進行辨別。各品種在各個SSR標誌的17個代碼就是該品種獨一無二的DNA barcode，也就是所謂的分子身分證，未來可成為品種純化及侵權鑑定的有力工具。

結語

近年來農產品的國際貿易頻繁，許多我國重要的外銷農產品創造了無數佳績，其中最重要的優勢之一為作物的優良品種，然而許多作物容易被複製，例如蝴蝶蘭可使用花梗產生大量的分生苗，而水稻與豆類作物屬於自交作物，同樣容易複製大量種子，因此應用分子鑑定技術保護優良品種顯得格外重要。本次試驗所採用的SSR技術相較於其他分子標誌，是兼具經濟性與實用性的技術，未來的作物分子標誌開發研究趨勢應該是朝向單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP) 但是目前仍然是以SSR為主流。本場在品種分子鑑定技術方面的研究成果，目前已完成水稻、葡萄與豌豆的SSR鑑定技術，未來即將完成菊花、菜豆與梨的SSR鑑定技術，這些作物屬於無性繁殖或自交種子繁殖作物，較容易被複製因此亟待保護。另一方面，若是開放性授粉的品種或是F1雜交品種，需要有自交系親本或是控制授粉的專業技術，因此在品種保護方面較具有先天優勢。分子標誌的應用除了品種鑑定之外，也可應用在輔助育種以及品種的純化，對於國內的品種產出是相當有幫助的，在質的方面可確保單一品種的遺傳物質均一性，在量的方面可縮短育種年限、增進品種研發速率。因此分子標誌技術是未來育種研發單位的必備技術，對於提升國內作物品種的質與量都有良好的助益。

表二、各豌豆品種的分型結果。利用17個SSR標誌可將每一個品種各自獨立鑑定。

Table 2. The results of SSR genotyping on 21 pea varieties. Each variety can be distinguished by the 17 markers.

Variety\ SSR	AA238	AA446	AB31	AB33	AB40	AA321	A9	AB133	AC58	AD73	AD83	AD147	AD270	D21	D23	PSADHI	P1109
Taichung 16	A	A	D	C	B	B	C	C	F	E	A	B	B	C	B	B	A
RFTP	A	C	E	C	C	B	B	A	B	D	B	C	H	B	B	B	B
Satsuma	A	C	G	A	B	B	B	C	E	F	B	C	I	B	B	A	A
Taichung 14	A	C	G	B	B	B	B	C	E	G	B	C	I	B	B	A	A
TLTWT 303	A	D	G	C	B	B	B	C	C	E	B	C	B	B	B	D	A
Taichung 13	A	D	G	C	B	B	B	C	D	E	B	B	B	B	B	D	A
Thailand RF	B	A	A	A	C	B	C	C	B	C	B	C	F	A	B	C	B
Taichung 12	B	A	D	B	C	A	C	B	F	E	A	B	B	C	A	A	A
Taichung 11	B	A	E	B	C	A	A	B	F	E	A	B	A	C	A	B	A
Odome	B	A	F	A	C	B	C	B	E	D	A	C	F	B	A	B	B
Thailand WF	B	B	A	A	C	B	A	B	H	D	B	B	F	A	B	C	B
Wu Sui	B	B	B	A	C	B	C	B	B	A	B	A	E	B	B	A	B
Japan AHHM	B	B	B	A	C	B	C	C	A	A	B	B	C	B	B	A	B
HPWT	B	B	B	A	C	B	C	C	A	B	B	B	C	B	B	A	B
New Wusui	B	B	B	A	C	B	C	C	B	B	B	A	C	B	B	A	B
Taichung 15	B	B	B	B	C	B	C	C	H	B	B	A	D	B	B	A	B
Native WF	B	B	C	A	C	A	B	C	H	E	B	B	H	A	B	C	B
Thirty days	B	C	A	A	C	B	A	B	B	D	B	B	F	A	B	C	B
TP ML	B	C	D	C	A	B	A	A	G	E	B	C	G	B	B	A	B
France GP	B	C	D	C	A	B	B	A	B	E	B	C	G	B	B	A	B
EP	B	D	F	B	B	B	C	C	E	H	A	B	I	B	C	A	B

參考文獻

1. 林順福 2001 分子標誌在作物育種上之應用 pp.21-30 生物技術在農業上之應用 楊盛行編 國立臺灣大學農業陳列館。
2. 謝廉一、吳岱融、胡凱康 2007 利用簡單重複序列標記建立台灣主要粳稻品種的鑑別技術 植物種苗 9(2):25-38。
3. Chuang, H. Y., H. S. Lur, K. K. Hwu and M. C. Chang. 2011. Authentication of domestic Taiwan rice varieties based on fingerprinting analysis of microsatellite DNA markers. Bot. Stud. 52: 4.
4. Gong, Y., S. Xu, W. Mao, Q. Hu, G. Zhang, J. Ding and Y. Li. 2010. Developing new SSR markers from ESTs of pea (*Pisum sativum* L.). Biomed. And Biotechnol. 11(9):702-707.
5. Loridon, K., K. McPhee, J. Morin, P. Dubreuil, M. L. Pilet-Nayel, G. Aubert, C. Rameau, A. Baranger, C. Coyne, I. Lejeune-Henaut and J. Burstin. 2005. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Theor. Appl. Genet. 111:1022-1031.
6. Prioul, S., A. Frankewitz, G. Deniot and G. Morin. 2004. Mapping of quantitative trait loci for partial resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.), at the seedling and adult plant stages. Theor. Appl. Genet. 108:1322-1334.
7. Rubiales, D., M. Rernandez-Aparicio, A. Moral, E. Barilli, J. C. Sillero and S. Fondevilla. 2009. Disease resistance in pea (*Pisum sativum* L.) types for autumn sowings in Mediterranean Environments. Czech J. Genet. Plant Breed. 45(4):135-142.
8. Singh, R. K. , R. K. Sharma, A. K. Singh, V. P. Singh, N. K. Singh, S. P. Tiwari and T. Mohapatra. 2004. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. Euphytica. 135:135-143.