單核酸多型性分析在作物品種改良上的發展與應用

Development and application of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on crop improvement

◎農試所農藝組　王子明　曾東海　王強生

一、前　言

當DNA序列中具有單核酸變異時，稱爲單核酸多型性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)，通常會有二種，有時三種不同鹼基出現在單一位置上。在人類族群中，SNPs出現約爲1%對偶基因頻度，或是大約每1千個核苷酸會產生1個單鹼基多型性(Weaver, 2000)。在基因組內，SNPs非常多，並且是隨機分布的，此特性使得SNPs成爲代表每一個DNA樣本的專一性差異，進而具有做爲遺傳標誌之潛力。

隨著人類基因組迅速解序，SNPs首先在人類基因組中被研究，目前已應用於人類遺傳分析、種族學、遷移學、法醫學分析、比較遺傳學及演化學等研究。現在更有許多私人公司投入SNPs之研發，尤其是朝向高效能(high-throughput, HT) SNPs之探索與分類來開發，未來發展與應用似乎無法想像。

近來分子標誌技術在作物應用上發展迅速，種原之指紋分析(fingerprinting)結果可進行各品種(系)及野生種原的鑑別，以找尋最佳親本的變異組合進行作物改良；亦可藉分子標誌與基因連鎖分析(linkage analysis)的結果標定基因的位置，進而確認與目標性狀的遺傳關係，此種策略稱之爲標誌輔助選拔(marker-assisted selection, MAS)，可用在分離或變異後裔族群中進行目標基因(性狀)的選拔。種原保存的意義，即在保持生物多樣性，但大多數族群的多樣性都是由多基因(multigene)或微效基因(polygene)所控制的變異，如產量與株高。目前，分子標誌可以分析表現型(phenotype)的效力，僅限於單基因的性狀(monogenic trait)；要將呈現連續分布之表現型或爲非孟德爾遺傳(non-Mendelian heritance)之多因子性狀進行遺傳分析是非常困難的。以表現型的多樣性是由複等位基因(multiple alleles)所構築而成的概念來看待基因多樣性時，則相同或相似的表現型是由不

作者：王副研究員強生
聯絡電話：(04)23302301-137

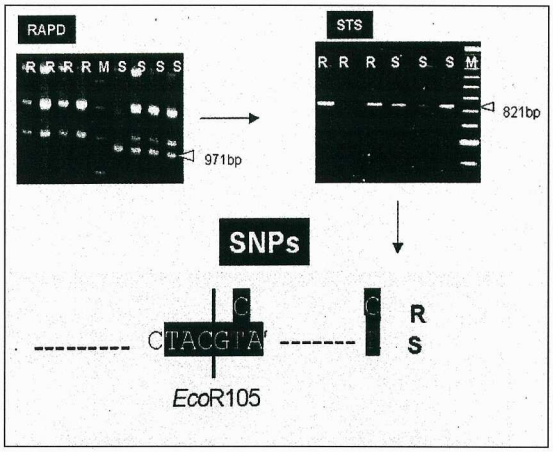
同的等位基因組合而成。所以蒐集及確認完整等位基因的變異，有助於提昇分子標誌在種原開發及性狀分析的價值。爲滿足這些需求，分子標誌必須與目標基因緊密連鎖，而且評估的費用必需少於直接調查性狀的費用，才有實用價值。爲降低以分子標誌篩選數千個雜交後裔族群的成本，最佳的解決方案是發展DNA晶片標誌(DNA chip-based marker)。

由於SNPs普遍存在於任何染色體組中的一種DNA多型性，經鹼基定序，並確認包含SNPs的DNA片段(稱爲SNP片段)，非常適合做爲篩選DNA晶片上的探針，而包含上萬個SNP片段的DNA晶片更可以進行指紋分析。在作物育種中，SNP標誌可開發爲種原指紋分析、標誌輔助選拔，並適合成爲自動化分析系統，更具有建立高密度遺傳圖譜(high-density genetic map)的潛力等諸多優點。然而SNPs在作物上之研究才剛開始，文獻極少。作者綜合Graner *et al.*(2000)及Bhattramakki *et al.*(2000)等資料，就作物SNPs標誌的發展及其在作物育種品種改良與種原上的可能應用進行討論。

二、建立作物單核酸多型性標誌之資料庫

由於SNP標誌DNA晶片具有高度多樣性，可發展爲自動化分析，亦能於同一時間內分析許多樣品。欲發展此種DNA晶片必須先建立目標作物的SNP標誌資料庫。其策略有四項：建立尋找SNP的技術、確定SNP在染色體組中的頻度、發展特定性狀的SNP分析系統及建立SNP資料庫。

尋找SNP的方法有二種：第一種爲找尋目標性狀專一SNP(trait specfic SNPs)，即在找尋與重要農藝性狀緊密連鎖的標誌，如抗病基因，發展一組性狀專一標誌，以提高分子標誌輔助選拔及種原庫篩選的效率。Graner *et al.*(2000)以RAPD分析種原庫中來自世界各地的160種大麥，其中包含野生種*Hordeum spontaneum*及40個高產栽培種*Hordeum vulgare*。發現有一971bp DNA片段與大麥黃鑲嵌病毒(yellow mosaic virus，BYMV)感病性有關，進一步獲得與抗性性狀相關之821bp片段。經定序後，設計等位基因之專一性引子，再進一步測試此一標誌與抗病基因的專一性(圖一)，最後，獲得此抗病基因的許多種等位專一SNP標誌。



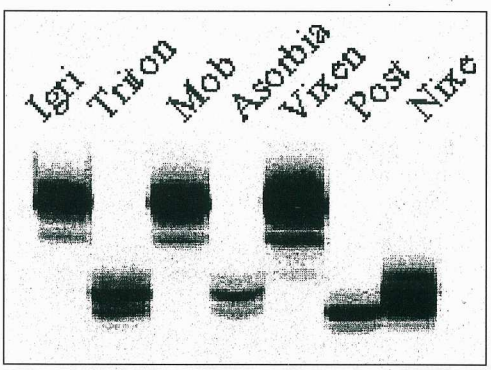
圖一、大麥黃鑲嵌病毒抗性連鎖RAPD片段的單核酸多型性分析(Graner *et al*, 2000)。

第二種方法係利用目標基因或分子標誌的序列設計引子，以PCR的方式找尋SNPs。Bhattramakki *et al.* (2000)自700個基因的ESTs資料庫中設計多種引子，分析兩玉米雜交親本及其雜種後代，結果發現測試的168個基因座中有41%有多型性片段，其中

以*Globulin1-S*基因座爲例，共有8種SNPs之基因型。

三、使用微衛星體(microsatellite)標誌分析作物的遺傳多樣性

微衛星體標誌，亦稱爲簡單序列重複(simple sequence repeat, SSR)，由於其片段小、普遍存在於各條染色體及等位基因變異中，因此，可用的標誌數量很多，且操作成本較低，亦同時清楚標誌在染色體上的位置。因此，利用微衛星體標誌分析作物種原及品種(系)可獲得較多的遺傳變異性，亦可獲得具種原特性的分子標誌資料，而此一資料可以提供育種者及研究者在改進及研究單基因及微效基因性狀上一種新的遺傳資訊。Ganal (2000)使用50個微衛星體標誌篩選來自大麥核心種原之1000個品種(系)，獲得各品種(系)間指紋分析的差異性及親緣的相關性，並進一步取得各品種(系)在某一段染色體片段上的差異分布(圖二)。

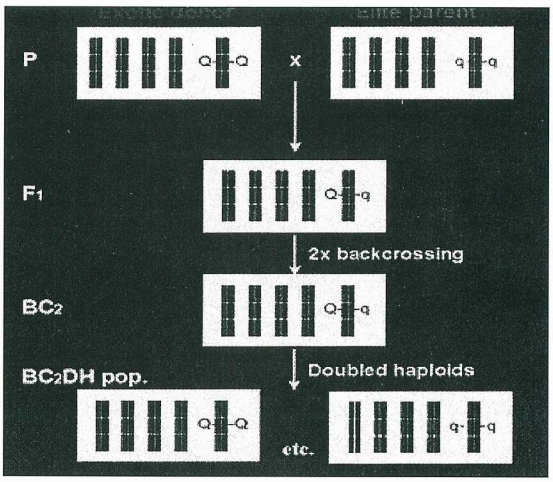


圖二、大麥不同品種之SSR指紋分析(Graner, 2000)。

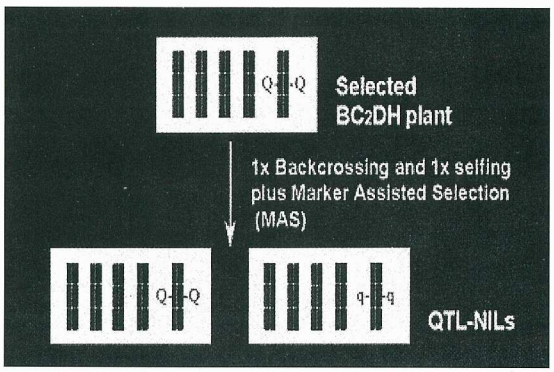
四、利用分子標誌進行大麥種間雜交後裔之品質及產量性狀分析

Pillen and Leon (2000)將利用AB-QTL方法(Tanksley and Nelson, 1996)分析大麥種原庫產量構成要素的數量性狀及品質組成份等性狀；以四個冬大麥及春大麥(*Hordeum vulgare*)與二個野生大麥(*Hordeum spontaneum*)進行雜交，共獲得四個回交二次族群(BC_2)。首先分別取得冬大麥及春大麥的單倍體倍加之雙單倍體(dihaploid，DH)族群各四百株，再雜交育成回交二次植株，爲快速獲得同質結合體，減少異質結合個體影響數量性狀的表現與分子標誌間的連鎖分析效果，將單倍體倍加以生成二倍體(BC_2DH)。以此BC_2DH族群找尋SNP標誌，獲得150個DNA分子標誌。並調查二種雙單倍體族群的400個系統在田間的各種農藝性狀表現，最後整理資料以獲得表現顯著的數量性狀基因座(QTLs)，在田間的表現。釐清先前所獲得的分子標誌與特定數量性狀之關係，找出與特定數量性狀基因座連鎖的分子標誌；藉以建立屬於栽培種大麥之數量性狀基因座的SNP分子標誌系統。

氏等，進一步地將野生種與栽培種大麥雜交，並回交二次，以確保目標性狀基因已導入栽培種，同樣地以單倍體倍加的方式創造完全同質結合的個體，以減少異質結合型個體影響數量性狀的表現與分子標誌間連鎖分析的效果(圖三)，最後利用已知的分子標誌進行標誌輔助選拔(MAS)，將具同質結合個體之異質性族群中的二型(QQ及qq)分別選出。藉由此篩選，可得知所使用的分子標誌與目標性狀的連鎖效果，同時可以建立包含目標QTLs之二種等位基因的近同源系(QTL-NILs; 圖四)。



圖三、利用AB-QLT方法鑑定雙單倍體族群BC_2DH之目標(Q)等位基因座(Pillen and Leon, 2000)。

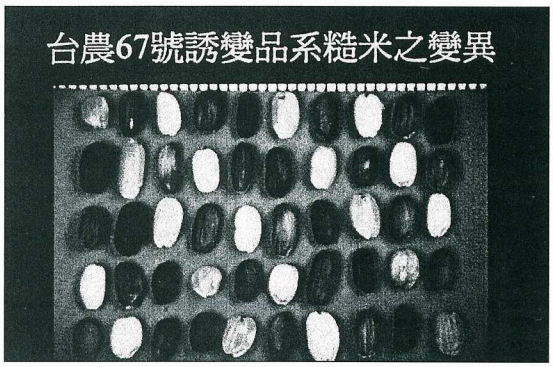


圖四、自雙單倍體族群BC_2DH育出二個含有不同QTL基因座之近同源系(Pillen and Leon, 2000)。

爾後，QTL-NILs可做爲育種及遺傳研究之材料應用：在育種利用上，由於具明確單一基因之特性，可做爲育種親本材料；因具明確分子標誌，可以標誌輔助法選拔雜種，或從核心種原中篩選出優良品種(系)，做爲雜交親本。此方法所得之標誌爲共顯性，標誌間亦具有SNPs之特性，進行雜種後裔選拔時，不但可以觀察基因之存在與否，更可了解目標植株所帶的等位基因是屬於那一型。在遺傳利用上，可做爲研究數量基因調控的分子機制；更可做爲篩選數量性狀基因的材料。

五、突變體的區分與應用

本所分子遺傳研究室利用一種鹼基取代誘變劑疊氮化鈉(NaN_3)，培育出二千多個突變品系，其中穀粒外觀性狀的變異就有上百種(圖五)，可能包含許多SNPs。未來將針對特定基因建立SNPs資料庫，做爲突變體指紋分析、品種保護及基因選拔與品種鑑定之依據。



圖五、水稻台農67號利用疊氮化鈉(NaN_3)誘變所得之糙米外觀突變品系。（曾文彬攝）。

六、結　語

利用單核酸多型性(SNPs)所發展的分子標誌可以做爲種原核心指紋分析、共顯性分子標誌輔助選拔，並且可發展成自動化分析，且利用此種SNPs探針的生物晶片更可以進行同步性分析及大量族群篩選。因此，SNPs分子標誌應用在作物育種和種原篩選上，可以省時省工，如能建構完整的SNPs

資料庫，將能使SNPs分子標誌的作用發揮至最大潛能。

七、參考文獻

Bhattramakki, D.,A. Ching,M. Dolan, J. Register, S. Tingey, and A. Rafalski. 2000. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in corn : early lessons. Maize Newsl 74:54. http://www.missouri.edu/mnl/74/86bhattramakki.html/

Ganal, M. 2000. Assessment of genetic diversity in barley germplasm and varieties using microsatellite markers. http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/gabi/projects/barleydiversity.html/

Graner, A., F. Ordon, and J. Weyen. 2000. Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers for barley. http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/gabi/projects/barleydiversity.html/

Pillen, K., and J. Leon. 2000. AB-QTL-analysis in barley : Detection of favorable genes for quality and yield traits from barley wild species and their introgression into the elite germplasm of cultivated barley by means of DNA markers. http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/gabi/projects/barleydiversity.html/

Tanksley, S. D. and J. C. Nelson. 1996. Advanced backcross QTL analysis : a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. Theor Appl Genet 92:191-203.

Weaver, T. A. 2000. High-throughput SNP discovery and typing for genome-wide genetic analysis. Trends in Genetics p36-42.

