

利用 DNA 分子標識確認落花生種間雜交種 ($4x \times 2x$) 基因組組成與外表型變異間之矛盾性¹

黃惠娟² 林順福³ 謝兆樞⁴

摘要：本研究利用 RAPD 及 SSR 分子標識來分析落花生不同倍數性種間雜種 ($4x \times 2x$) 的多型性產生之頻率，並探討不同倍數性之種間親本對後代 DNA 多型性之貢獻是否有差異存在。試驗結果顯示，使用水稻或玉米的 Intra-SSR 引子可由 PCR 增幅落花生基因組約 11 個 DNA 片段，而 Inter-SSR 則可由 PCR 增幅約 7 個落花生 DNA 片段。Intra-SSR 及 Inter-SSR 單一引子產生親本多型性之比率，平均分別為 45.4% 及 45.1% 高於 RAPD 的 41.3%。而 Intra-SSR 及 Inter-SSR 產生各個條帶之多型性比率分別為 34.2% 及 36.0%，亦高於 RAPD 的 33.6%。而不論是 RAPD 或 SSR 的分析，可發現 F_1 的 DNA 條帶形式與栽培種母本相近，且其多型性條帶平均有 66.8% 是來自母本，只有 33.2% 的條帶是來自野生種父本，此種結果與基因組來源及貢獻量相符，但是卻與種間雜交種之外表型變異傾向於野生種之結果不合。因此，本試驗由分子層次確認支持基因組大小與植株外表型變異之不一致性。建議本試驗結果，可提供作物基因組及基因表現研究與種間雜交利用於品種改良之參考。

關鍵詞：落花生、種間雜交種、分子標識。

前 言

栽培種落花生 (*Arachis hypogaea* L.) 在不同基因型間的植株型態及農藝性狀均有著明顯的變異存在，但在前人的 RAPD、RFLP 等分子標識分析，發現在各基因型間 DNA 層次的變異並不大，亦即在栽培種中其遺傳歧異度 (genetic diversity) 非常小，此現象在台灣之栽培種中情況更甚⁽¹⁾，而在野生種中同樣經由分子標識的分析，發現有非常大的變異存在^(5, 8, 9)。且早在 1972 年開始的前人研究中，陸續指出野生種落花生的抗蟲、抗病及抗旱等特性極具利用潛能^(4, 6, 11, 15)，並已育成許多優良的種間雜交後代品系或品種^(13, 14)。基於此黃等⁽²⁾自 1994 年開始進行落花生種間雜交之工作，期望能擴大台灣落花生栽培品種的遺傳變異性，並且將有利基因藉由種間雜交方式導入栽培種落花生。在已經完成的 9 個雜交組合中，已有台南 11 號 $\times$ *A. spegazzinii* 一組合繁衍至 F_6 世代，目前的觀察認為這些雜交後代對於未來的落花生抗銹病、抗葉斑病及抗紅蜘蛛的育種極具潛力⁽³⁾。而為進一步瞭解在落花生種間雜交後代中，野生種遺傳質導入 (introgression) 栽培種中的情形，可利用具特定來自栽培種或野生種的多型性 (polymorphism) 分子標識來追蹤、探討，亦即利用物種特定性的標識 (species-specific marker) 來標記及

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2075 號。
2. 本所農藝系助理研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
3. 前本所農藝系助理研究員，現任台灣大學農藝系助理教授。台北市。
4. 台灣大學農藝系教授。台北市。

追蹤染色體滲入的片段^(5, 9, 10)。

目前常用在植物育種上及鑑定雜交後代的分子標識有 RAPD (random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)、RFLP (restriction fragment length polymorphism)、SCAR (sequence characterized amplified region)、STS (sequence targeted site) 及 SSR (simple sequence repeat, or microsatellite DNA) 等, 各有其利用上及操作上之優缺點, 而以 PCR (Polymorphism chain reaction) 技術為基礎所發展的分子標識, 因其操作程序簡便及快速, 是植物分子遺傳分析及育種應用上最適當的分析工具之一。本研究室先前之研究發現四倍體栽培種落花生與二倍體野生種落花生雜交後代之變異傾向於野生種外表型⁽³⁾, 此種結果與兩種間雜交親本之基因組倍數性之貢獻並不符合, 可能係栽培種染色體的流失, 或四倍體栽培種在多倍體化過程並未增加遺傳變異性等原因所造成。利用細胞遺傳技術雖然可以追蹤種間雜交種之染色體來源, 但無法辨識不同來源染色體內 DNA 序列之差異性, 而新近發展之 DNA 分子標識則可彌補此項缺點, 但是目前尚未有詳細利用分子標識探討不同倍數性野生種與栽培種間雜種之研究, 即探討在 PCR 鑑定時產生 DNA 條帶是否等比例來自父本及母本, 抑或有不同的結果, 此種研究對基因組結構及其功能或與外表型間關係之瞭解, 將有很大幫助。本試驗即利用其中操作簡便的 RAPD 及多型性高之 SSR, 以分析台南 11 號 × *A. spegazzinii* 種間雜交組合之兩親本及其 F_1 之間的多型性, 探討落花生種間雜種基因組結構及多型性 DNA 條帶之來源, 並進一步驗證不同倍數性落花生其基因組大小對雜交種外表型之影響, 並提供日後引進野生種優良特性之參考。

材料與方法

一、材料：母本為四倍體栽培種落花生 (*A. hypogaea*) 台南 11 號 (TP11), 父本為二倍體野生種落花生 *A. spegazzinii*, 及其三倍體之種間雜交 F_1 植株, 三者取樣數均在 9 株上。

二、方法：

(一) 種間雜交：於每日下午 5 時後去雄, 清晨 6~8 時授粉。

(二) DNA 萃取：葉片組織 DNA 的萃取依 Doyle *et. al.* (1990)⁽⁷⁾ 之方式進行。

(三) RAPD 分析：進行親本及種間雜交後代之 RAPD。RAPD 分析於總體積 23 μ l 的反應進行, 內容物含 60 ng 基因組 DNA、0.2 mM dNTPs、1.5U Taq polymerase、0.3 μ M 逢機引子 (10-mers)、10 X PCR 緩衝液, 反應條件為 94 $^{\circ}$ C (變性, denature) 5 分鐘後, 進行 45 循環的 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘、43 $^{\circ}$ C (黏接, annealing) 2 分鐘、72 $^{\circ}$ C (延伸, extension) 3 分鐘, 最後 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。逢機引子購自 British Columbia 大學 100 支及 Operon 公司 120 支, 總共 220 支, 分別以 UBC1-100 及 OPA1-20, OPB1-20, OPC1-20, OPD1-20, OPT1-20, OPAY1-20 為代號。

(四) SSR 分析 (simple sequence repeat, 簡單重複序列, 或稱 microsatellite DNA)：於總體積 23 μ l 的反應液進行, 內容物含量與 RAPD 相同, 依其 PCR 放大機制之不同, 可分為 Intra-SSR 及 Inter-SSR 兩種。Intra-SSR 引子以兩支為一組, 引子長度在 15~30 核苷酸對 (15-30 mers) 之間, 序列是依據水稻及玉米之簡單重複 DNA 序列所設計, 共有 67 組, 其 PCR 產物為重複序列片段。Inter-SSR 所用之引子為來自 British Columbia 大學所生產的 100 支簡單重複序列的 SSR 之商業產品, 以 UBC801-900 為代號。反應條件為 94 $^{\circ}$ C (變性, denature) 5 分鐘後, 進行 35 循環的 94 $^{\circ}$ C 30 秒、47 $^{\circ}$ C (黏接, annealing) 30 秒、68 $^{\circ}$ C (延伸, extension) 20 秒, 其 PCR 產物則為相鄰兩重複序列間之 DNA 片段。

(五) 電泳分析：上述 RAPD 分析之 PCR 產物以 1% 洋菜凝膠 (SeaKen LE agarose, FMC), 於 10 X TAE 緩衝液下, 75V 電壓下進行電泳; Intra-SSR 分析之 PCR 產物以 3% MetaPhore 凝膠 (FMC), 於 10X TAE 緩衝液下, 95V 電壓下進行電泳; 而 Inter-SSR 之 PCR 產物以 2% 洋菜凝膠 (SeaKen LE

agarose, FMC)，於 10X TAE 緩衝液下，95V 電壓下進行電泳；三者電泳後以溴化乙錠 (EtBr) 染色，在 UV 燈下照相紀錄結果。

三、有效引子之測定：PCR 反應後之產物經電泳分析，在父本或母本呈現具差異性的 DNA 條帶，亦即具有 DNA 片段多型性之引子，稱為有效引子；若父、母本 DNA 條帶無差異性則不予計算，參考自 He, G. and G. S. Prakash (1997)⁽¹²⁾。測定項目包括：

(一) DNA 條帶數 (number of bands)：在父、母本呈現的總 DNA 條帶數。

(二) 多型性 DNA 條帶 (polymorphic bands)：計算在父、母本呈現具差異性的 DNA 條帶。

(三) 多型性比率 (polymorphic rate, %)：多型性 DNA 條帶 ÷ 總 DNA 條帶數。

(四) F_1 的多型性條帶來源：判定在 F_1 植株的多型性條帶是來自父本或母本。

結 果

利用 RAPD 分析來偵測落花生種間雜交親本及 F_1 後代的 DNA 片段多型性結果列於表 1-2 及圖 1，在 UBC 系列 100 支引子，有 24 支引子可區別父母本 DNA 的條帶形式，每一引子之平均條帶數為 10.7，多型性條帶平均為 3.7 條，多型性比率為 34.6%，而 F_1 植株多型性條帶來源的測定，來自栽培種

表 1. 在落花生親本及種間雜交 F_1 具有多型性之 RAPD 引子 (UBC 系列)

Table 1. RAPD primers (UBC set) detecting polymorphic DNAs of parents from the interspecific hybrid (F_1) and parents

Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F_1 polymorphic origin	
				Female	Male
UBC5	8	4	50.0	2	1
UBC9	9	3	33.3	2	1
UBC10	11	4	36.4	1	2
UBC11	14	3	21.4	2	0
UBC14	9	4	44.4	1	2
UBC17	9	4	44.4	3	1
UBC19	12	6	50.0	2	2
UBC21	13	2	15.4	1	1
UBC23	10	4	40.0	1	2
UBC28	14	4	23.6	1	2
UBC29	13	3	23.1	1	2
UBC37	14	7	50.0	5	2
UBC41	7	2	28.6	0	2
UBC48	11	4	36.4	3	1
UBC51	14	6	42.9	3	2
UBC53	10	2	20.0	1	1
UBC54	11	7	63.6	3	2
UBC56	9	1	11.1	0	1
UBC59	8	2	25.0	1	1
UBC61	11	5	45.5	3	0
UBC62	11	4	36.4	3	1
UBC72	10	2	20.0	0	2
UBC73	9	2	22.2	1	0
UBC97	9	4	44.4	2	2
Total	256	89	---	42 (56%)	33 (44%)
Average	10.7	3.7	34.6	1.8	1.4

表 2. 在落花生親本及種間雜交 F₁ 具有多型性之 RAPD 引子 (Operon 系列)Table 2. RAPD primers (Operon set) detecting polymorphic DNAs of parents from the interspecific hybrid (F₁) and parents

Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F ₁ polymorphic origin		Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F ₁ polymorphic origin	
				Female	Male					Female	Male
OPA1	12	7	58.3	3	1	OPC18	6	4	66.7	3	0
OPA2	15	9	60.0	4	0	OPC19	8	3	37.5	3	0
OPA4	7	3	42.9	2	1	OPC20	6	3	50.0	1	1
OPA5	8	4	50.0	3	0	OPD3	12	5	41.7	1	0
OPA9	7	4	57.1	4	0	OPD5	8	4	50.0	1	0
OPA10	9	3	33.3	3	0	OPD6	8	4	50.0	2	2
OPA11	11	7	63.6	3	2	OPD7	6	1	16.7	0	1
OPA12	9	5	55.6	2	2	OPD8	10	3	30.0	2	1
OPA14	9	4	44.4	1	2	OPD10	7	5	71.4	2	2
OPA15	9	4	44.4	2	2	OPD12	7	2	28.6	1	0
OPA17	7	4	57.1	3	0	OPD13	12	4	33.3	1	1
OPA18	9	5	55.6	3	0	OPD14	8	6	75.0	4	1
OPA19	9	4	44.4	3	1	OPD16	8	3	37.5	2	0
OPA20	13	9	69.2	2	2	OPD17	7	4	57.1	4	0
OPB1	11	5	45.5	4	0	OPD19	10	6	60.0	5	0
OPB2	14	9	64.3	4	3	OPD20	11	5	45.5	4	0
OPB3	5	1	20.0	1	0	OPT2	10	6	60.0	2	3
OPB4	14	4	28.6	0	1	OPT3	9	4	44.4	1	1
OPB5	10	4	40.0	3	1	OPT4	8	2	25.0	1	1
OPB6	10	5	50.0	3	0	OPT5	8	1	12.5	0	0
OPB7	14	8	57.1	7	1	OPT6	16	7	43.8	5	1
OPB8	8	6	75.0	1	1	OPT7	9	2	22.2	1	0
OPB9	11	5	45.5	4	1	OPT8	13	2	15.4	0	0
OPB10	10	6	60.0	3	2	OPT9	10	4	40.0	4	0
OPB11	11	7	63.6	4	2	OPT10	11	6	54.5	2	3
OPB12	16	11	68.8	5	3	OPT11	14	6	42.9	3	3
OPB13	13	8	61.5	3	0	OPT12	10	4	40.0	1	3
OPB14	11	3	27.3	2	0	OPT14	14	8	57.1	3	3
OPB15	12	5	41.7	3	1	OPT16	11	5	45.5	0	3
OPB16	11	7	63.6	3	2	OPT17	10	4	40.0	2	2
OPB17	9	3	33.3	2	1	OPT18	12	3	25.0	2	0
OPB18	9	3	33.3	1	2	OPT19	8	3	37.5	2	0
OPB19	13	5	38.5	3	1	OPT20	13	3	23.1	1	2
OPB20	11	7	63.6	3	1	OPAY1	4	1	25.0	0	0
OPC1	5	2	40.0	0	1	OPAY2	12	7	58.3	2	0
OPC2	8	4	50.0	2	1	OPAY3	12	7	58.3	2	1
OPC3	8	2	25.0	2	0	OPAY5	14	9	64.3	6	1
OPC4	8	4	50.0	2	0	OPAY6	14	6	42.9	2	1
OPC6	12	5	41.7	3	0	OPAY7	13	9	69.2	7	2
OPC7	9	6	66.7	3	1	OPAY9	11	4	36.4	2	2
OPC8	10	3	30.0	3	0	OPAY10	16	7	43.8	2	5
OPC10	7	4	57.1	2	0	OPAY11	11	6	54.5	4	1
OPC11	6	4	66.7	3	1	OPAY12	15	7	46.7	1	3
OPC12	6	3	50.0	2	1	OPAY13	12	8	66.7	3	4
OPC13	12	6	50.0	5	0	OPAY14	10	5	50.0	1	1
OPC15	6	2	33.3	1	0	OPAY17	9	3	33.3	1	2
OPC16	6	4	66.7	2	0	Total	942	451	229(70%)	99(30%)	
OPC17	9	7	77.8	5	1	Average	10.0	4.8	48.0	2.4	1.1

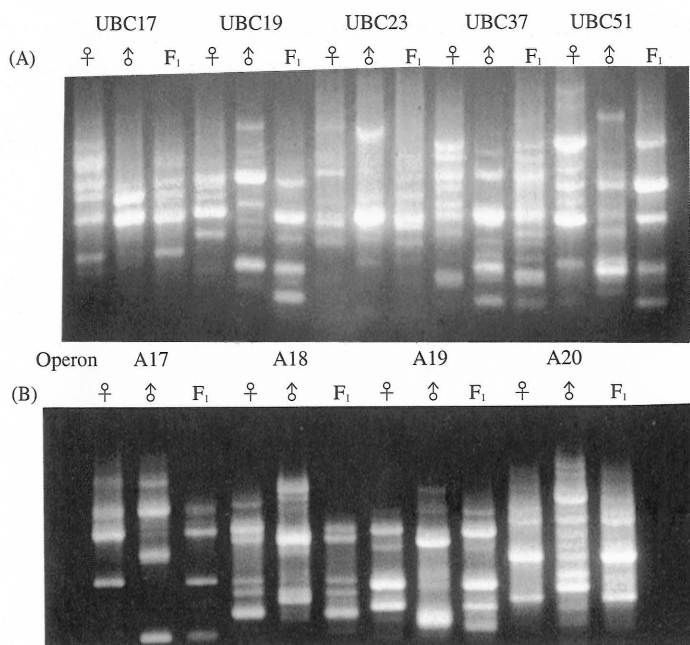


圖 1. 在親本及雜交後代具多型性的 RAPD 引子。

Fig 1. Primers detecting RAPD DNA markers .

(A) UBC 17: CCTGGGCCTC	(B) Operon A 17: GACCGCTTGT
UBC 19: GCCCGGTTTA	Operon A 18: AGGTGACCGT
UBC 23: CCCGCCTTCC	Operon A 19: CAAACGTCGG
UBC 37: CCGGGGTTTT	Operon A 20: GTTGCGATCC
UBC 51: CTACCCGTGC	

母本有 42 個條帶 (佔 56%)，另有 33 個條帶 (平均為 44%) 起源野生種父本 (表 1)。另在 Operon 系列，多型性條帶平均為 4.8 條，多型性比率為 48.0%，兩者均比 UBC 系列高 (表 2)；而 F_1 植株多型性條帶來自母本有 229 個條帶 (佔 70%)，另有 99 個條帶 (平均為 30%) 來自父本，所以 RAPD 兩系列所測定 F_1 植株多型性條帶，均偏離預期之 50% 來自父本或母本，其平均有 271 個條帶 (平均為 67%) 來自母本，另有 132 個條帶 (平均為 33%) 起源野生種父本。

而像圖 1 中由 UBC19 引子所增幅的 F_1 DNA 最下方有一並非來自父母本的明顯條帶，這種 F_1 植株具有本身獨特的多型性條帶，在本試驗中偶而可見到 (資料未顯示)，此可能原因有二，一是在進行 PCR 熱循環增殖 DNA 時，原先給予的 DNA 模版 (template) 互相競爭引子所造成的試驗誤差；二可能為動態 (dynamic) 遺傳變異所造成的，係相對於靜態的遺傳變異 (指雜交後代個體之變異範圍，僅限於原親本之所有可能基因型之組合)，而此種新變異的主要來源可能為基因間相互作用所產生，或點的突變、不均等交換 (unequal crossing over)、甲基化 (methylation)、基因增幅 (gene amplification)、基因內重組 (intragenic recombination) 等原因所造成。而在本試驗所形成之原因，抑或兩者都有可能，此有待進一步詳細探討。

表 3 為綜合整理兩組 RAPD 的結果，整個有效 RAPD 引子產生 DNA 條帶數介於 5~16 條之間，平均產生的 DNA 條帶為 10.4 條，其中單一引子在親本之間顯現出多型性的條帶介於 1~11 條之間，平均為 4.3 條，多型性比率介於 11~80% 之間，平均為 41.3%，可見 RAPD 依使用引子種類之不同，即核苷酸序列不同，所產生 DNA 條帶、多型性條帶數及多型性比率有很大差異，而若能篩選到 DNA 條帶數適

表 3. RAPD 引子在落花生種間雜交兩親本之間產生的 DNA 條帶數、多型性條帶數及多型性比率程度及分佈範圍

Table 3. Number of bands, polymorphic bands amplified by RAPD primers and their polymorphic rate between the interspecific parents of peanut

No. of bands	No. of primers	Polymorphic bands	No. of primers	Polymorphic rate (%)	No. of primers
16	3	11	1	71-80	4
15	2	9	5	61-70	16
14	11	8	4	51-60	18
13	8	7	13	41-50	37
12	11	6	13	31-40	19
11	17	5	14	21-10	15
10	14	4	32	11-20	9
9	19	3	18		
8	15	2	13		
7	8	1	4		
6	7				
5	1				
Mean=10.4		Mean=4.3		Mean =41.3	

中（約 4~6 條），但多型性條帶數較多，即多型性比率高的引子如圖 1 之 Operon A 17-19，將能更有效的鑑定作物之雜交種或一般種原。

另利用 SSR（Inter-及 Intra-）分子標識的測定結果列於表 4-6 及圖 2，表 4 中 Intra-SSR 所能測到的

表 4. Intra-SSR 引子在落花生種間雜交兩親本之間產生的 DNA 條帶數、多型性條帶數及多型性比率程度及分佈範圍

Table 4. Number of bands, polymorphic bands amplified by Intra-SSR primers and their polymorphic rate between interspecific parents of peanut

No. of bands	No. of primers	Polymorphic bands	No. of primers	Polymorphic rate (%)	No. of primers
Rice					
15	2	8	1	71-80	1
14	3	7	1	51-60	2
13	3	6	7	41-50	13
12	6	5	8	31-40	8
11	6	4	7	21-30	4
10	4	3	2	11-20	2
9	4	2	3		
8	1	1	1		
6	1				
Mean =11.3		Mean=4.6		Mean =40.7	
Corn					
16	1	11	1	71-80	2
15	1	10	1	61-70	5
14	1	8	2	51-60	4
13	3	7	3	41-50	4
12	1	6	5	31-40	2
11	3	5	2	21-20	4
10	3	4	1		
9	4	3	2		
8	2	2	3		
7	2				
Mean =10.7		Mean =5.4		Mean =50.5	
Pooled mean=11.1		Pooled mean=5.0		Pooled mean=45.4	

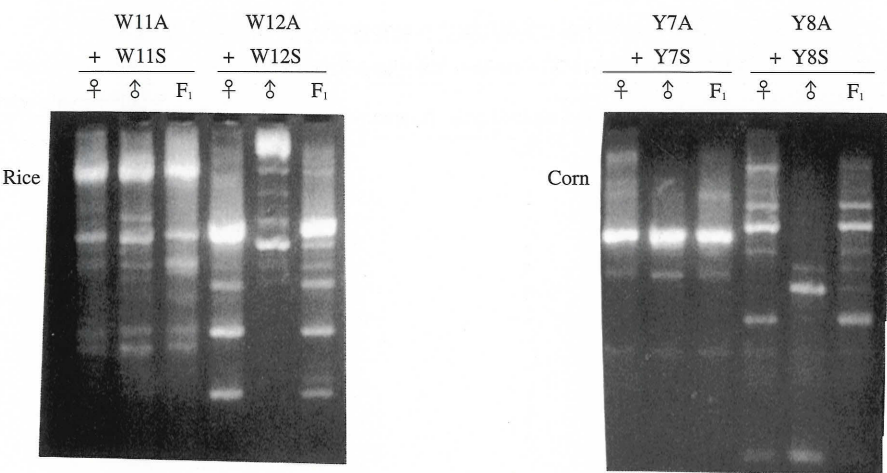


圖 2. 在親本及雜交後代具多型性的 Intra-SSR 引子。

Fig 2. Primers detecting polymorphic Intra-SSR DNA markers .

W11A + W11S: AAGCCTTTCCTGGTAACACG + AACTCATTGTGCACACGCACA
W12A + W12S: ACGAGATACGTACGCCCTTTG + AACGCGAGGACACGTACTTAC
Y 7A + Y 7S: ATTTCCAGTTGCCACCGACGAAGAACTT + TTGTCTTTCTTCCTCCACAAGCAGCGAA
Y 8A + Y 8S: GCGGCATCCCGTACAGCTTCAGA + TTACTCCCTATCCACTGCGGCCTGGAC

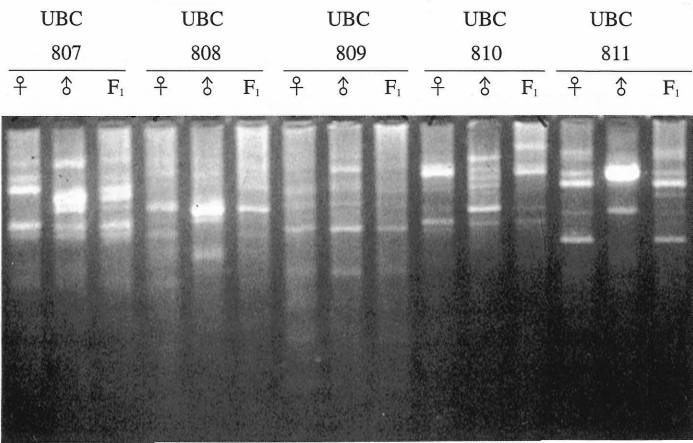


圖 3. 在親本及雜交後代具多型性的 Inter-SSR 引子。

Fig 3. Primers detecting the Inter-SSR DNA markers.

UBC 807: AGAGAGAGAGAGAGAGT
UBC 808: AGAGAGAGAGAGAGAGC
UBC 809: AGAGAGAGAGAGAGAGG
UBC 810: GAGAGAGAGAGAGAGAT
UBC 811: GAGAGAGAGAGAGAGAC



表 5. 在落花生親本及種間雜交 F_1 具有多型性之 Intra-SSR 引子Table 5. Primers detecting Intra-SSR DNA markers from parents and the interspecific hybrids (F_1) of peanut

Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F ₁ polymorphic origin	
				Female	Male
Rice					
W1A+W1S	9	2	22.2	1	1
W3A+W3S	10	3	30.0	2	0
W5A+W5S	9	4	44.4	2	2
W7A+W7S	6	1	16.7	1	0
W8A+W8S	13	5	38.5	2	2
W9A+W9S	15	4	26.7	2	2
W10A+W10S	8	2	25.0	1	0
W11A+W11S	11	4	36.4	2	2
W12A+W12S	11	8	72.7	3	4
W13A+W13S	14	6	42.9	3	3
3R+3F	11	2	18.2	2	0
13R+13F	12	6	50.0	4	0
22R+22F	12	6	50.0	5	1
24R+24F	12	4	33.3	4	0
26R+26F	11	4	36.4	2	1
27R+27F	12	6	50.0	4	2
30R+30F	12	5	41.7	3	0
34R+34F	12	5	41.7	2	0
38R+38F	9	5	55.6	3	1
41R+41F	15	7	47.7	1	2
44R+44F	9	4	44.5	3	1
51R+51F	10	3	30.0	1	0
53R+53F	14	6	42.9	2	2
55R+55F	14	6	42.9	4	1
60R+60F	10	5	50.0	3	1
80R+80F	13	5	38.5	5	0
83R+83F	10	4	40.0	2	1
202R+ 202F	11	6	54.5	4	0
204R+ 204F	13	5	38.5	3	1
205R+ 205F	11	5	45.5	2	1
Average	11.3	4.6	40.7		
Corn					
Y1A+Y1S	8	3	37.5	0	2
Y2A+Y2S	11	8	72.7	3	4
Y5A+ Y5S	9	6	66.7	3	2
Y6A+Y6S	15	10	66.7	6	3
Y8A+Y8S	12	7	58.3	3	3
Y9A+Y9S	10	3	30.0	2	0
Y10A+ Y10S	7	3	42.9	1	0
Y12A+Y12S	9	2	22.2	0	1
Y13A+Y13S	9	7	77.8	3	0
Y14A+Y14S	10	4	40.0	2	1
Y15A+Y15S	9	6	66.7	4	1
Y16A+ Y16S	7	2	28.6	1	0
Y17A+Y17S	8	2	25.0	1	0
Y18A+Y18S	13	7	53.8	5	0
Y19A+Y19S	11	5	45.5	2	2
Y20A+ Y20S	11	6	54.5	3	2
Y22A+Y22S	13	8	61.5	3	0
Y23A+Y23S	13	6	46.2	4	0
Y25A+Y25S	14	5	35.7	2	2
Y26A+Y26S	16	11	68.8	4	4
Y27A+Y27S	10	6	60.0	5	0
Average	11.1	5.0	50.5		
Total	564	255		135(70%)	58(30%)
Pooled average	11.1	5	45.4	2.6	1.1

表 6. 在落花生親本及種間雜交 F₁ 具有多型性之 Inter-SSR 引子

Table 6. Primers detecting Inter-SSR DNA markers from the parents and interspecific hybrids (F₁) of peanut

Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F ₁ polymorphic origin	
				Female	Male
UBC801	7	4	57.1	2	2
UBC802	5	3	60.0	2	0
UBC804	6	2	33.3	1	0
UBC805	5	3	60.0	2	1
UBC807	7	3	42.9	1	2
UBC808	7	5	71.4	2	1
UBC810	7	4	57.1	2	0
UBC811	5	2	40.0	2	0
UBC812	8	4	50.0	4	0
UBC814	8	5	62.5	3	2
UBC815	6	4	66.7	2	1
UBC817	8	2	25.0	1	1
UBC820	5	3	60.0	0	0
UBC822	7	4	57.1	4	0
UBC827	9	4	44.4	2	2
UBC828	5	2	40.0	1	0
UBC830	7	3	42.9	2	1
UBC834	6	2	33.3	0	2
UBC836	7	4	57.1	3	1
UBC841	6	3	50.0	2	1
UBC843	5	3	60.0	2	1
UBC844	4	2	50.0	2	0
UBC845	7	3	42.9	2	0
UBC846	11	4	36.4	2	1
UBC850	9	3	33.3	2	1
UBC852	5	2	40.0	1	0
UBC855	7	4	57.1	2	0
UBC859	8	4	50.0	2	1
UBC864	8	2	25.0	1	1
UBC873	8	3	37.5	2	1
UBC880	8	3	37.5	1	1
UBC881	9	3	33.3	2	0
UBC884	8	4	50.0	2	2
UBC886	7	3	42.9	1	0
UBC887	10	4	40.0	2	0
UBC888	6	2	33.3	2	0
UBC889	9	4	44.4	1	2
UBC891	11	4	36.4	3	1
Total	271	123		70(71%)	29(29%)
Pooled average	7.1	3.2	45.1	1.8	0.76

條帶數介於 6~16 條之間，平均為 11.1 條，其中來自水稻簡單重複序列引子的為 11.3 條，玉米的為 10.7 條；而親本之間多型性條帶，則以玉米的 5.4 高於水稻的 4.6，兩者平均為 5.0 條，親本之間多型性條帶比率，同樣以玉米的 50.5% 高於水稻的 40.7%，平均則為 45.4%。表 5 則為 67 組 Intra-SSR 其中能顯現多型性的 51 組引子個別資料，而 Intra-SSR 引子在測定 F_1 的多型性條帶起源，與 RAPD 引子同樣來自栽培種母本較多，有高達 70%（135 個）條帶，另有 30%（58 個）條帶來自野生種父本。在表 6 中 100 支 Inter-SSR 有 38 支具有親本間之多型性，所能測到的條帶數介於 4~11 條之間，平均為 7.1 條，而親本之間多型性條帶為 3.2 條，其在親本之間多型性條帶比率平均為 45.1%，與 Intra-SSR 多型性條帶比率相近。在測定 F_1 的多型性條帶起源，同樣有高達 71%（70 條）條帶是來自母本，只有 29%（29 條）條帶來自父本。

綜合 RAPD 及 SSR 兩項分子標識測定落花生親本的結果（表 1-6），以 Intra-SSR 引子所能顯現的條帶最多，平均為 11.1 條，Inter-SSR 的平均條帶最低，平均為 7.1 條，而 RAPD 系列平均為 10.4 條，所以在條帶數的測定而言，RAPD 引子是高於 SSR 引子，但在測定親本之間多型性條帶的比率，則以 SSR 的 45.3%（Inter-SSR 之 45.1% 及 Intra-SSR 之 45.4%）高於 RAPD 的 41.3%，故可說 SSR 分子標識的多型性測定落花生種間雜交後代效率是高於 RAPD 的。

另外，由所有參試的 RAPD 及 SSR 引子來比較可在兩親本間偵測出多型性的有效引子百分比（表 7），平均 57.1% 的 SSR 引子數可偵測出親本之多型性，略高於 RAPD 之有效引子百分率（53.6%）。就個別在 F_1 植株上所能測到的多型性條帶而言，同樣以 SSR 條帶具有多型性百分比 35.1%（Intra-SSR 及 Inter-SSR 的 34.2% 及 36.0%）高於 RAPD 的 33.6%，所以針對落花生種間雜種鑑別利用而言，SSR 分子標識比 RAPD 分子標識有較高的多型性測定效率（表 7）。無論 RAPD 或 SSR 分析均顯示親本間多型性之條帶，來自栽培種與來自野生種之比例約為 2：1。

表 7. RAPD 及 SSR 引子測定落花生親本及種間雜交 F_1 之多型性效率

Table 7. Summary of primers tested in RAPD and SSR studies for the identification of DNA polymorphism in the parents and interspecific hybrid F_1

Type of primer	No. of primers tested	No. of informative primers	% of informative primers	No. of bands	No. of polymorphic bands	% of polymorphic bands
RAPD primer	220	118	53.6	1198	403	33.6
SSR primer	167	89		835	292	
Intra-SSR	67	51	76.1	564	193	34.2
Inter-SSR	100	38	38.0	271	99	36.0
Average			57.1			35.1
Total	387	207		2046	694	

雖然在先前研究發現四倍體栽培種與二倍體野生種落花生雜交所產生後代雜交種，其重要農藝性狀之外表型傾向於中間型或野生種⁽³⁾，然而本試驗結果發現，四倍體栽培種所提供之 DNA 多型性約為二倍體野生種之兩倍，即使如此，三倍體之種間雜交種外表型仍以二倍體野生種為主，故本試驗支持作物基因組大小與外表型變異之不一致性現象的存在。

討 論

物種基因組中具有短的核苷酸（1~6 個）重複性序列（short tandem repeat），能表現出明顯的多型性，可作為種原之鑑定，稱為簡單重複序列，簡稱 SSR。SSR 分子標識可分為 Intra-SSR 及 Inter-SSR

兩種，Intra-SSR主要利用簡單重複序列兩旁之保留性序列 (conserved sequence) 設計兩條引子，以放大 SSR 片段，其多型性來自重複序列數目之不同，所呈現的為共顯性 (codominant) 的標識，亦即為多重等位基因 (multiple alleles)，但是在本試驗因使用水稻及玉米之引子，其在落花生種間 F_1 產生之 DNA 條帶遠大於共顯性之 2 條 (水稻平均為 11.3 條，玉米平均為 10.7 條)，可知水稻及玉米 SSR 兩旁之單一片段保留性序列，在落花生卻有多個 copy 片段存在，由此推知落花生的基因組是較水稻 430Mb 及玉米為大。而 Intra-SSR 的缺點為設計引子時需有序列的相關資料 (sequence information)，且必需使用較昂貴的 MetaPhore gel 或定序用的膠 (sequencing gel)。另外利用物種之 SSR 序列所設計的引子，以放大兩個 SSR 間之片段，稱為 Inter-SSR，其多型性來自引子是否能與試驗材料的 DNA 黏接 (annealing) 上，此種 SSR 不需相關的序列訊息，亦可使用一般的 agarose gel，分析上較為簡單且費用低，惟其只是顯性 (dominant) 的標識，而非共顯性，但卻可在不同的物種間使用。而在本試驗中 Intra-SSR 能夠顯現多型性的引子比率為 76.1%，明顯的高於 Inter-SSR 的 38.0% (表 7)，可能是因為 Intra-SSR 使用成對 (2 條) 引子，較 Inter-SSR 僅用單一條引子，增值染色體組上 DNA 片段之專一性較高，故就本試驗結果而言，Intra-SSR 比 Inter-SSR 的有效引子百分比為高。

由前述可知 SSR 較 RAPD 在落花生種間雜交的親本及 F_1 均有較高的多型性測定效率的試驗結果 (表 1-7) 來看，在本試驗中 SSR 是比 RAPD 的測定效果為佳，且一般而言，SSR 的穩定性 (條帶的再現性) 較 RAPD 為好，原因為 SSR 的引子序列較 RAPD 的 10 氮基對 (bp) 為長，約為 15~30 氮基對，(一般為 20 左右)，所以引子在黏接上模版 DNA 的條件較嚴苛，且黏接的溫度較高，時間較短 (SSR 約為 47-55 °C，20-30 秒; RAPD 約為 37-50 °C，2~3 分鐘)，所以產生錯誤的機會較小，故 DNA 條帶再現性高。總結本試驗結果而言，RAPD 及 SSR 兩種分子標識在操作過程簡便，省時，有效率，且不使用放射線或銀染，可測定落花生不同種間的多型性及進行雜交種的鑑定，能有效的應用於本試驗主要目標落花生抗病育種上，及探討雜交後代中野生種種質滲入栽培種的程度，並可進一步廣泛的應用於其他作物的雜交育種上。

由先前的落花生種間雜交後代的鑑定試驗⁽⁹⁾得知， F_1 植株之外表型態，除花之旗瓣呈桔黃色與栽培種母本相同外 (野生種為黃色)，其餘大部分之外表型態均呈現中間型，包括半匍匐性的植株生長型態，花器的大小，葉片的大小、型態、色澤，及果莢、籽粒的大小等。另外植株生長習性是呈現與父本相同的多年生習性，而在 F_1 植株上可得到的少數果莢，亦均與父本相同為單粒莢型態，且果莢網紋明顯，莢喙突出，可知植株外表型態多呈現父母本之中間型，或偏向父本，少數性狀才與母本相近的結果，但本試驗中不論是 RAPD 或 SSR 的分析，可發現在落花生種間雜交的 F_1 的植株，其 DNA 多型性條帶高達 66.8% 來自栽培種母本 (RAPD 為 67%，Intra-SSR 為 70%，Inter-SSR 為 71% 表 1-2，5-6)，來自父本的僅有 33.2%，探究其主要原因可能是四倍體的栽培種母本 (AABB) 與二倍體的父本 (AA)，雜交所得之三倍體 F_1 (AAB) 植株，其中 2 個單倍體 A、B 基因組 (genome) 均來自母本，僅一個 A 基因組來自父本所致，所以 F_1 植株的 DNA 組成理論上有三分之二來自母本，三分之一來自父本，而以 PCR 為基礎的 SSR 或 RAPD 分子標誌有較高增幅母本染色體的機會，使得在 F_1 植株測得多數的 DNA 條帶來自雌親，而非各 50% 的雌、雄親量，此種結果與細胞遺傳之染色體數分析結果相符⁽³⁾，說明並無染色體流失現象發生。而在 F_1 植株呈現外表型偏向父本或中間型，其原因可能是控制這些主要性狀的基因大都位在 A 基因組上，且在野生種中多為顯性性狀，或是四倍體栽培種在多倍體化或在馴化選拔過程中，不具作用或隱性對偶基因的頻度增高所致，仍有待進一步研究。而不同倍數性之親本對後代 DNA 多型性來源之貢獻不同，像具異元多倍體 (AABB) 之栽培種，有利於種間雜交種之 DNA 多型性，進而提供較多有用的 DNA 標識，供基因定位或分子育種上之利用。

引用文獻

1. 張同吳。1995。台灣落花生品種（系）之遺傳研究。中興大學農藝學研究所碩士論文。
2. 黃惠娟、曹文隆、楊金興、蔡志濃。1996。引進落花生種原之特性評估。中華農業研究 45: 15-25。
3. 黃惠娟、曹文隆、林順福、謝兆樞、蔡志濃。1999。落花生種間雜交種之鑑別及其特性分析。中華農業研究 48: 40-51。
4. Bromfield, K.R., and W.K. Bailey. 1972. Inheritance of resistance to *Puccinia arachidis* in peanut. *Phytopathology* 62: 748.
5. Burow, M.D., C. E. Simpson, A.H. Paterson, and L. J. Starr. 1996. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. *Mol. Breed.* 2: 369-379
6. Coffelt, T.A. 1974. Inheritance of growth habit in an intraspecific-cross population of peanut. *J. Hered.* 65: 160-162
7. Doyle, J.D., J.L. Doyle, and L.H. Bailey. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
8. Garcia, G.M., H.T. Stalker, and G. Kochert. 1995. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. *Genome* 38: 166-176.
9. Halward, T.M., H.T. Stalker, E.A. Larve, and G. Kochert. 1991. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resource of cultivated peanut and related wild species. *Genome*. 34: 1013-1020.
10. Halward, T.M., H.T. Stalker, and G. Kochert. 1993. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. *Theor. Appl. Genet.* 87:379-384.
11. Hammons, R. O. 1973. Genetics of *Arachis hypogaea*. Pp.135-174. *In* Peanut: culture and uses. Am. Peanut Res. Edu. Asso. OK. USA.
12. He, G., and G. S. Prakash. 1997. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, L). *Euphtica* 97: 143-149.
13. Reddy, L.J., A.G.S. Subrahmanyam, D. McDonald, and R.W. Gibbons. 1992. Registration of icgv 87157, an elite peanut germplasm with multiple resistance to diseases. *Crop Sci.* 32:837.
14. Simposon, C. E., S. C. Nelson, J. L. Starr, K. E. Woodard, and O. D. Smith. 1993. Registration of TXAG-6 and TXAG-7 peanut germplasm lines. *Crop Sci.* 33: 1418.
15. Singh, A.K., and J.P. Moss. 1984. Utilization of wild relatives in the genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Fertility in triploids: cytological basis and breeding implication. *Peanut Sci.* 11: 17-21.



Identification of the Inconsistence between Genomic Constitution and Phenotypic Variation in Interspecific Hybrids ($4x \times 2x$) of Peanut with DNA Marker¹

Huey-Jiuan Huang², Shun-Fu Lin³ and Jaw-Shu Hsieh⁴

Summary

In this study RAPD and SSR markers were used to analyze genomic context of interspecific hybrids (*A. hypogaea* L. $\times$ *A. spegazzinii* L.) of peanut. Frequencies and parental origins of DNA polymorphic bands were investigated for the interspecific hybrids ($4x \times 2x$). The results indicated that about 11 bands were PCR amplified from total genomic DNA of peanuts with intra-SSR primers of rice or corn, and about 7 bands were amplified with inter-SSR primers. The averaged polymorphic rates were 45.4% and 45.1% for a pair of intra-SSR primer and an inter-SSR primer, respectively. However, the averaged polymorphic rate for a RAPD primer was 41.3%. The percentages of a (pair of) primer with polymorphic bands between interspecific parents were 34.2, 36.0% and 33.6% for intra-SSR (rice/corn), inter-SSR, and RAPD primers, separately. About twice (66.8%) polymorphic bands were contributed from allotetraploid parent compared to diploid parent (33.2%) providing molecular evidence of genomic context of interspecific hybrids and inconsistency between genomic contribution and phenotypic variation. This information is valuable for genome and gene expression studies as well as the utilization of interspecific hybridization in plant breeding.

Key words : Peanut (*Arachis hypogaea*), Interspecific hybrids, Molecular marker.

1. Contribution No.2075 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.

2. Assistant Agronomist, Department of Agronomy, TARI., Wufeng, Taichung, Taiwan.

3. Former Assistant Agronomist, Department of Agronomy, TARI and currently Assistant Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University (NTU), Taipei, Taiwan.

4. Professor, Department of Agronomy, NTU, Taipei, Taiwan.