

ACC合成酶基因分子標誌在梨育種之應用¹

張瑞炘、徐錦木²

摘 要

梨的果實儲架壽命為影響商品價值的重要關鍵因素，參與果實後熟生理機制的植物荷爾蒙中以乙烯最為重要，前人之研究顯示梨ACC合成酶的基因型對果實的乙烯生成量有顯著影響，已經有2個ACC合成酶基因分子標誌被開發，其中包括PPACS 1和PPACS 2基因的CAPS分子標誌，分別以A與B表示其外表型，利用兩分子標誌可以進行梨的基因型分析(genotyping)，以預測果實中乙烯的合成量。本研究之目的為將這些分子標誌應用於國內的梨育種試驗，試驗結果顯示我國常用雜交親本「橫山梨」的基因型為AaBb，且呈現反式排列連鎖(repulsion linkage)，其F₁個體出現aabb基因型的機率由減數分裂時發生染色體互換的重組率所決定。如意梨×橫山梨的F₁後裔植株檢測結果，顯示各基因型所佔之比例分別為AaBb、Aabb、aaBb及aabb各佔17.0%、28.5%、40.2%以及14.3%。本篇報告發現之育種親本基因型與兩相關基因座連鎖情形對於未來育種家擬定育種策略有所助益，而試驗中輔助選拔的51個低乙烯型的植株，亦可作為未來育成耐貯運品種的潛力候選植株。

關鍵字：乙烯，ACC合成酶，分子標誌輔助育種。

前 言

梨為我國重要的果樹作物，梨的栽培在臺灣已有多年的歷史，2011年全國生產面積為6,555公頃，其中臺中市的栽培面積為4,378公頃，約佔三分之二。我國梨產業發展之限制因子為臺灣位於亞熱帶致使冬季低溫時數少，而梨為溫帶作物，冬季需足夠低溫時數才能打破休眠，目前國內以高接梨生產方式，克服冬季低溫不足的問題，但生產成本及風險過高，且產業競爭力偏弱。因此國內育種研究目標為育成低需冷性、平地適種的品種，以降低生產成本及提昇產業競爭力。另一方面，梨產期集中，需利用貯放以調節供需及穩定價格，因此梨的耐貯放性狀是影響商品價值的重要因素⁽³⁾，梨的幼年期約3~5年，如何在育種過程中，利用輔助篩選工具早期選拔並提高育種效率為重要的研究目標。

乙烯在許多作物的果實後熟過程扮演重要的角色，不同作物的果實依照其後熟的形式可分為「更年性」與「非更年性」果實。「更年性果實」是指對乙烯甚為敏感的作物，例如香蕉、木瓜及酪梨，此類作物果實接收到乙烯後即啟動自體催化機轉以釋出更多乙烯，並伴隨

¹行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第0803號。

²行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

著呼吸作用快速增加、澱粉水解成醣類、細胞壁分解、色素及香氣化合物的合成，為反應較為劇烈的後熟現象。而「非更年性果實」則對乙烯較不敏感，例如柑桔類果實。梨依品種的不同，有表現更年性的品種亦有表現非更年性的品種，主要的差異來自於合成乙烯的酵素活性，為提升耐儲性，選育品種時應考量乙烯合成途徑的酵素低活性者為佳⁽⁴⁾。

乙烯合成的生化途徑，首先是蛋胺酸(methionine)與三磷酸腺苷(ATP)經由SAM合成酶(S-adenosyl-methionine synthase)催化產生SAM，接著SAM被ACC合成酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase)催化產生ACC，而ACC為乙烯的前驅物，由ACC氧化酶(ACC oxidase)催化產生乙烯⁽¹¹⁾。其中ACC合成酶是控制整個反應速率的關鍵酵素，因此各項作物的ACC合成酶基因為各國學者亟力研究的目標，目前已有許多作物的ACC合成酶基因被成功選殖^(8,9,10)。

在梨的ACC合成酶方面，國外學者Itai等在1999年選殖了2個ACC合成酶的基因，分別是PPACS1和PPACS2⁽⁵⁾，並在2003年分別針對PPACS1和PPACS2基因設計兩組CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences)分子標誌，並命名為A基因座和B基因座的分子標誌⁽⁶⁾，可採用聚合酵素連鎖反應及限制酵素切割反應的簡易方式進行檢測。其中A基因座的顯性基因型為AA和Aa，隱性為aa；B基因座的顯性基因型為BB和Bb，隱性為bb。當植株的A基因座基因型為顯性則果實乙烯合成量高(如AAbb或Aabb)，若A基因座為隱性而B基因座為顯性(如aaBb或aaBB)，則果實的乙烯合成量為中等。若是A和B兩個分子標誌基因座皆為隱性(如aabb)則乙烯量低⁽⁶⁾。Itai等在2005年利用上述的CAPS分子標誌完成32個品種的基因型鑑定⁽⁷⁾，並在2008年發表152個亞洲的梨栽培品種的基因型，皆與各品種的乙烯合成量之表現型吻合⁽⁴⁾。

分子標誌輔助選種(marker-assisted selection, MAS)是近年來作物改良研究的國際趨勢，此技術可增進育種效率、減少資源浪費。目前國內主要應用MAS於水稻之育種^(1,2)，較少應用於果樹，本次研究是利用前人所開發兩個基因座之分子標誌，針對「橫山梨」、「如意梨」及358個如意梨×橫山梨的F₁後裔進行檢測，以期瞭解此2個品種的ACC合成酶基因的基因型，以及兩個基因座的連鎖情形，並利用此檢測方法選拔低乙烯型F₁單株。

材料與方法

植物材料

本次試驗採用的材料包括7個栽培品種，以及一個雜交組合(如意梨×橫山梨)的358個F₁後裔植株。栽培品種包括橫山梨、豐水梨、幸水梨及如意梨，以及本場育成之臺中1號、臺中2號及臺中3號，其中來自日本的豐水梨及幸水梨品種在Itai等的研究中亦曾經使用，可互相對照試驗結果，而橫山梨為台灣重要的地方品種及育種親本。

植物DNA萃取

採樣時每一單株採一片嫩葉，置於夾鏈袋並編號，採樣時需注意是砧木或接穗的葉片，避免造成品種的混淆。秤取0.1 g葉組織，以液態氮處理2分鐘，利用均質機磨碎組織，接著以

Smart LabAssist-32核酸萃取儀(圓點奈米公司, Taiwan)進行DNA萃取, 操作步驟依照產品使用手冊, 已萃取之DNA保存於-20°C 冰箱備用。

聚合酵素連鎖反應

聚合酵素連鎖反應(PCR)使用的試劑為Fast-Run Taq Master Kit (波仕特生物科技股份有限公司, 臺灣), 總反應體積為25 μ L, 內含40 ng DNA及0.4 μ M引子。核酸引子序列如表一所示, 核酸引子委託廠商合成(源資國際生物科技股份有限公司, 臺灣), 反應儀器為GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA), PPACS1基因座的PCR反應條件為94°C 3分鐘, 接著循環40次 94°C 60秒、60°C 60秒、72°C 90秒, 最後是72°C 10分鐘。PPACS2基因座的PCR反應條件為94°C 3分鐘, 接著循環40次 94°C 60秒、55°C 60秒、72°C 120秒, 最後是72°C 10分鐘, 黏合溫度(annealing temperature)依各分子標誌之不同而調整。PCR產物先以1.2%瓊脂膠電泳判斷產物片段大小是否正確, 及產物量是否足夠進行後續的酵素切割反應。

表一、本次試驗中所使用的兩組 CAPS 核酸引子序列

Table 1. Two CAPS primer pairs utilized in this research

Code	Sequence
PPACS1-F	5'-GATGAAATAAAGTCCACAATCAAG-3'
PPACS1-R	5'-GCGTTTCTGCATAACATGCG-3'
PPACS2-F	5'-GTCACAGAATCAACGATTGA-3'
PPACS2-R	5'-AGTAGAACGCGAAAACAAAT-3'

限制酵素切割反應與電泳分析

本次試驗採用的限制酵素為 *Hind*III (New England Biolabs, USA), 原濃度為20,000 U/ml, 將1 μ L的 *Hind*III溶液與9 μ L PCR產物混合, 在37°C 反應4小時, 切割反應完成後以1.2%瓊脂膠進行電泳, 並拍照存檔。

統計分析

完成如意梨×橫山梨F₁族群的基因型檢測後, 採用Chi-square計算各基因型的數量是否符合孟德爾遺傳分離律, 並且利用其基因型頻度估測「橫山梨」兩基因座的連鎖情形。

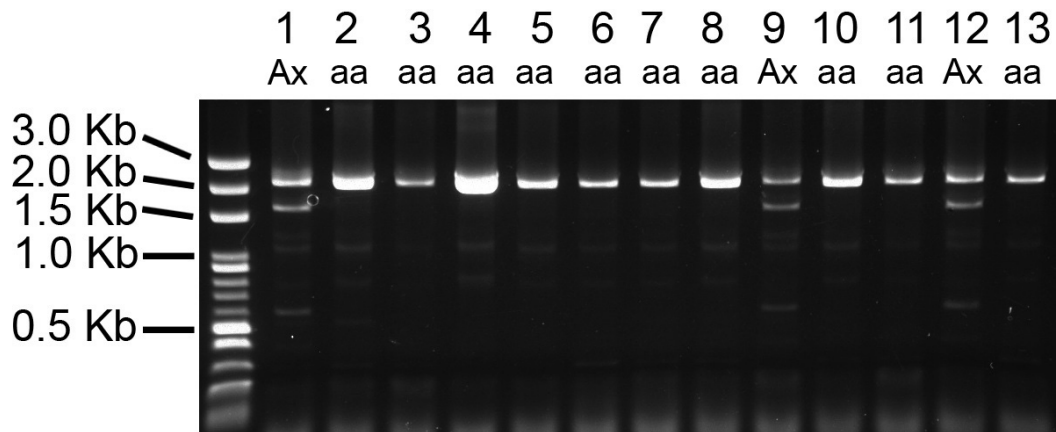
結 果

A基因座與B基因座之分子標誌檢測結果

前人的研究結果指出, A基因座的PCR增幅產物為2.2 kb的核酸片段, 若為A對偶基因, 則增幅核酸片段會被切割產生1.57 kb和0.63 kb的核酸片段, 若為a者僅在2.2 kb有條帶。而B基因座的PCR增幅片段為2.15 kb, B基因座若為B對偶基因者增幅片段會被切割產生0.35 kb、0.83 kb、1.06 kb及1.18 kb等片段, 若為b者僅在1.06 kb及1.18 kb有條帶。

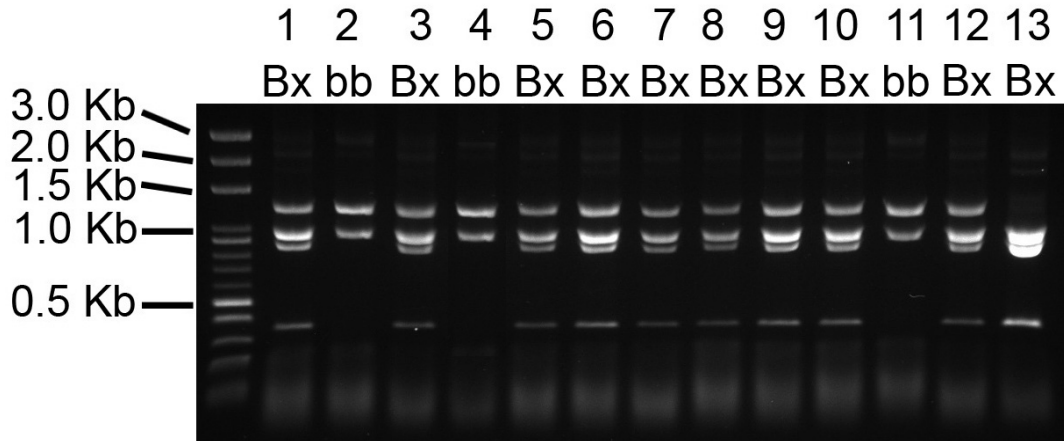
在A基因座的部分，本次試驗的結果如圖一所示，栽培品種的基因型分別是橫山梨(Ax)、豐水梨(aa)、幸水梨(aa)、如意梨(aa)、臺中1號(aa)、臺中2號(aa)、臺中3號(aa)，而358個F₁後裔的其中6個植株，其基因型分別是F₁-60101 (aa)、F₁-60102 (Aa)、F₁-60103 (aa)、F₁-60104 (aa)、F₁-60105 (Aa)及F₁-60106 (aa)。其中豐水梨和幸水梨的基因型檢測結果與前人的研究相符，而我國重要育種親本「橫山梨」則是呈現顯性的基因型，此項檢驗結果與橫山梨之不耐貯放性狀相符。在F₁後裔中aa基因型的出現可以推論橫山梨的基因型為Aa。

B基因座的試驗結果如圖二所示，栽培品種的基因型為橫山梨(Bx)、豐水梨(bb)、幸水梨(Bx)、如意梨(bb)、臺中1號(Bx)、臺中2號(Bx)及臺中3號(Bx)，而358個F₁後裔的其中6個植株，其基因型分別是F₁-60101 (Bx)、F₁-60102 (Bx)、F₁-60103 (Bx)、F₁-60104 (bb)、F₁-60105 (Bx)及F₁-60106 (Bx)。其中豐水梨和幸水梨的基因型為隱性，預期表現型為低乙烯合成量，檢測結果與前人的研究相符，而橫山梨、幸水梨、臺中1號、臺中2號及臺中3號則是呈現顯性的基因型，預期表現型為乙烯合成中等。因如意梨的基因型為bb，而橫山梨的基因型為Bx，F₁中出現bb基因型即可推論橫山梨的基因型為Bb。



圖一、A 基因座引子對針對國內常見栽培品種與 6 個 F₁ 植株之測試結果，字母大小寫分別代表顯性(A)與隱性(a)，各品種的名稱及基因型從編號 1 到 13 依序為橫山梨(Ax)、豐水梨(aa)、幸水梨(aa)、如意梨(aa)、臺中 1 號(aa)、臺中 2 號(aa)、臺中 3 號(aa)、F₁-60101 (aa)、F₁-60102 (Ax)、F₁-60103 (aa)、F₁-60104 (aa)、F₁-60105 (Ax)、F₁-60106 (aa)。

Fig. 1. The results of PCR-amplified products by primer pairs for A locus, the capital letter "A" means dominant and the lowercase letter "a" means recessive genotypes. The lanes number from 1 to 13 represent pear varieties Heng-Shang (Aa), Hosui (aa), Kosui (aa), Ru-Yi (aa), Taichung NO.1 (aa), Taichung NO.2 (aa), Taichung NO.3 (aa), F₁-60101 (aa), F₁-60102 (Aa), F₁-60103 (aa), F₁-60104 (aa), F₁-60105 (Ax) and F₁-60106 (aa) respectively.



圖二、B 基因座針對國內常見栽培品種與 6 個 F₁ 植株之測試結果，字母大小寫分別代表顯性與隱性，其中各品種的基因型從編號 1 到 13 依序為橫山梨(Bx)、豐水梨(bb)、幸水梨(Bx)、如意梨(bb)、臺中 1 號(Bx)、臺中 2 號(Bb)、臺中 3 號(Bx)、F₁-60101 (Bx)、F₁-60102 (Bx)、F₁-60103 (Bx)、F₁-60104 (bb)、F₁-60105 (Bx)、F₁-60106 (Bx)。

Fig. 2. The results of PCR-amplified products by primer pairs for B locus, the capital letter (B) means dominant and the lowercase letter (b) means recessive genotypes. The lanes number from 1 to 13 represent pear varieties Heng-Shang (Bx), Hosui (bb), Kosui (Bx), Ru-Yi (bb), Taichung NO. 1 (Bx), Taichung NO. 2 (Bx), Taichung NO. 3 (Bx), F₁-60101 (Bx), F₁-60102 (Bx), F₁-60103 (Bx), F₁-60104 (bb), F₁-60105 (Bx) and F₁-60106 (Bx) respectively.

如意×橫山之F₁後裔植株分子標誌輔助選種

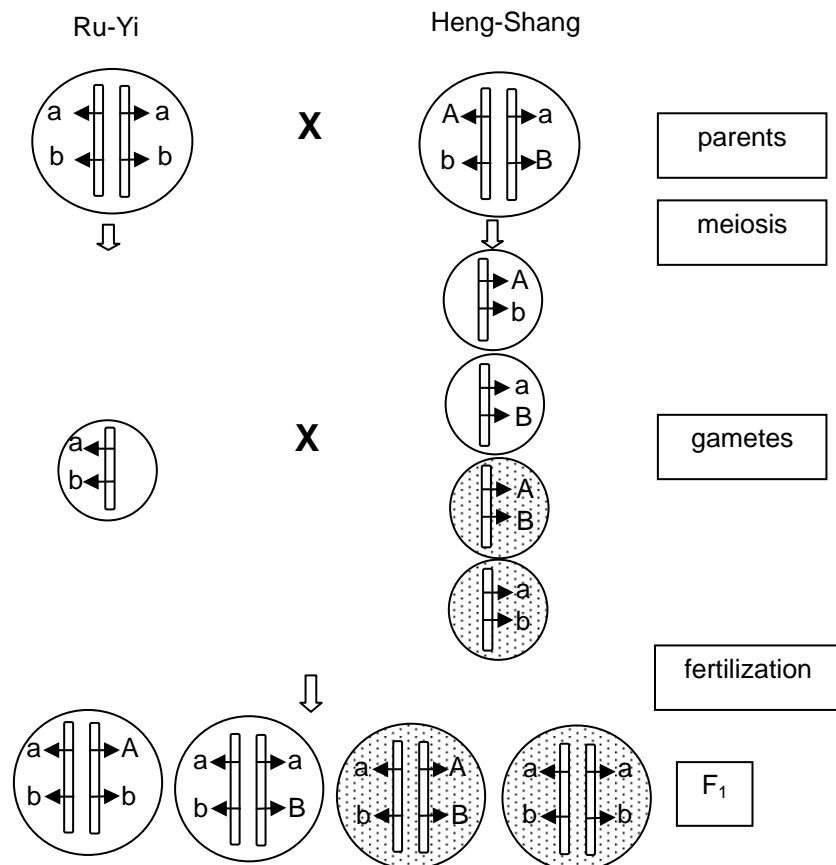
本次試驗中檢測的雜交族群為如意梨×橫山梨的F₁族群，共358個單株，皆為2007年度雜交的植株，各基因座基因型之檢測結果如表二所示，分別為AaBb:61株、Aabb:102株、aaBb:144株以及aabb:51株，所佔比例分別為17.0%、28.5%、40.2%以及14.3%。從親本基因型檢測結果可知如意的基因型為aabb，而橫山為AxBx。因F₁後裔出現51株aabb基因型的植株，由此可以判斷橫山梨的基因型為AaBb。

表二、採用 A、B 兩種標誌檢測如意梨×橫山梨 F₁ 族群之各基因型分佈

Table 2. The genotypic distribution derived from the recombinant F₁ population of the cross between Ru-yi and Heng-Shang

	Genotype				Total
	AaBb	Aabb	aaBb	aabb	
Plant number (%)	61 (17.0)	102 (28.5)	144 (40.2)	51 (14.3)	358 (100)
	163 (45.5)		195 (54.5)		

前人的研究指出此二基因座有連鎖，本試驗中的4種F₁後裔基因型分離比為61AaBb:102Aabb:144aaBb:51aabb，此結果可利用Chi-square關聯表檢定此兩對基因是否獨立分離，所得到的檢測結果為 $X^2=48.01 > 3.84$ ($\alpha=0.05$, $df=1$)。由此可知A與B基因座確實如前人研究所述，是位於同一染色體。在F₁後裔植株中，Ab型與aB型的比例明顯高於AB型與ab型，表示橫山梨的基因型為「A與b連鎖且a與B連鎖」，重組率為31.3%。此雜交組合的配子基因型與合子基因型的遺傳模式以圖三表示。



圖三、如意 X 橫山的配子基因型與 F₁ 基因型之說明圖。橫山之基因型為 AaBb，A 與 b 連鎖且 a 與 B 連鎖，橫山之配子基因型為 ab 者，是經由減數分裂的互換(crossing over)而獲得，在圖中以網點為底的配子和合子代表互換而來的部分，比例由互換率決定，而 aabb 型的 F₁ 為選種目標。

Fig. 3. The illustration of the genotypes formation of the gametes and the F₁ based on the cross between Heng-Shang and Ru-Yi. The genotype of Heng-Shang is AaBb, and "A" is linked to "b" whereas "a" is linked to "B". The gametes of Heng-Shang which belong to "ab" were generated by crossing over during meiosis. The spotted cells represent the gametes and F₁ generated by the effect of recombination. The genotype "aabb" is the idea type to breeders.

討 論

我國梨產業目前常用高接梨的生產模式，將已打破休眠之接穗，高接於橫山梨植株，因高接梨的生產成本高，每年每公頃約需100萬元，因此育成免高接、可直接於低海拔地區栽培的低需冷性品種，是降低產業生產成本的最佳方法⁽¹⁾。育種家為達成此目標，以本土低需冷性品種「橫山梨」作為雜交父本，然而橫山梨的果實後熟速度快，不耐儲藏，其雜交後裔也很容易遺傳此一性狀，因此亟需一個有效的選拔方法，以更有效率的方式早期篩選果實儲架壽命較長的品種。

本篇論文為國內少見應用ACC合成酶基因分子標記輔助梨育種的研究報告，本次研究成功將7個重要的品種的基因型鑑別完成，其中最重要的「橫山梨」為育種常用父本品種，而豐水、幸水、如意則是因為食味品質及耐貯放性狀較佳，為育種常用母本品種，而臺中1號、臺中2號及臺中3號為國內近年來新育成的品種，未來也可作為育種的材料，這7個品種的基因型檢測結果可作為未來的梨育種試驗親本選擇時的重要參考依據。

本次試驗首度發表「橫山梨」的ACC合成酶基因型為AaBb，連鎖的情況為A與b連鎖且a與B連鎖，此一發現對育種者而言是非常重要的參考資訊。若選種目標為低乙烯合成量的aabb基因型，必須仰賴配子體形成時期的染色體互換，在本次的試驗中，因染色體互換而獲得的F₁包含AaBb及aabb基因型，分別佔17.0%以及14.3%。Itai等在2003年的文獻中提到，此二基因座之交換率為 $20.8 \pm 3.6\%$ ，即代表橫山之配子有約有20.8%是(AB+ab)，約有79.2%為(Ab + aB)的基因型，其中ab型的配子估計僅佔10.4%，而本次試驗的檢測結果重組率為31.3%，其中ab型為14.3%，互換率高於Itai等發現的值⁽⁶⁾。

表二中F₁的檢測結果，預估高乙烯合成量的基因型(AB或Ab)共佔45.5%，預估中等乙烯合成量者(aaBb或aaBB)佔40.2%，而預估低乙烯合成量的aabb型則佔14.3%，透過分子標記檢測可在358株F₁個體中選拔51株基因型為aabb的個體。果樹之育種試驗通常歷程較久，因雜交實生苗發芽後五年內為幼年期，僅有營養生長而不會開花結果，育種人員無法進行果實性狀的評估，幼年期投入的成本甚鉅，包括土地、人力、資材、時間等等，在分子標記輔助選種法導入後可在幼苗就進行檢測，使育種成本的運用更加經濟。透過ACC合成酶基因分子標記的輔助育種法，期望未來可育成耐貯放梨品種，以加大運銷市場，延長商品壽命，創造農民福祉。

參考文獻

1. 李長沛、黃守宏、陳哲仁、曾東海、賴明信、古新梅 2011 野生稻*Oryza officinalis*基因導入系統褐飛蟲抗性的研究 臺灣農業研究 60: 263-278。
2. 張瑞炘、楊嘉凌、許志聖 2011 水稻抗白葉枯病之分子標記輔助育種 臺中區農業改良場研究彙報 110: 55-70。

3. 廖萬正、張林仁、張致盛 2005 梨臺中三號晶翠梨之育成 臺中區農業改良場研究彙報 88: 51-59。
4. Itai, A. and N. Fujita. 2008. Identification of climacteric and nonclimacteric phenotypes of Asian pear cultivars by CAPS analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes. Hort. Science 43: 119-121.
5. Itai, A., T. Kawata, K. Tanabe, F. Tamura, M. Uchiyama, M. Tomomitsu and N. Shiraiwa. 1999. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes controlling the ethylene level of ripening fruit in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Mol. Gen. Genet. 262: 42-49.
6. Itai, A., T. Kotaki, K. Tanabe, F. Tamura, D. Kawaguchi and M. Fukuda. 2003. Rapid identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase genotypes in cultivars of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) using CAPS markers. Theor. Appl. Genet. 106: 1266-1272.
7. Itai, A., T. Kotaki, K. Tanabe, M. Fukuda, Y. Kawata, Y. Amano and N. Fujita. 2005. Determination of ethylene synthetic genotypes related to ripening in Japanese pear cultivars. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 74: 361-366.
8. Lay-Yee, M. and M. L. Knighton. 1995. A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple. Plant Physiol. 107: 1017-1018.
9. Nakajima, N., H. Mori, K. Yamazaki and H. Imaseki. 1990. Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane -1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. Plant Cell Physiol. 31: 1012-1029.
10. Sato, T. and A. Theologis. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6621-6625.
11. Yang, S. F. and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 155-189.

Application of ACC Synthase Gene-Related Molecular Markers on Pear Breeding¹

Ray-Shin Chang and Chin-Mu Hsu²

ABSTRACT

The storage life time of pear fruit is a very important factor that affects the price. Ethylene is the most critical plant hormone that participates in the fruit ripening mechanism. Previous studies showed that the ACC synthase genotypes of pear varieties affect their ethylene production potential, and two ACC synthase gene-related CAPS markers have been successfully developed. The functional markers of PPACS1 and PPACS2 genes are named as A and B markers respectively. When the genotype of A locus is dominant, the tested variety is predicted to be high ethylene producing potential. When the genotype of A locus is recessive and B locus is dominant, the tested variety is predicted to be moderate ethylene producing potential. The ideal genotype is aabb in which the ethylene producing potential is predicted to be low. The aim of this study is to apply these molecular markers on the pear breeding and to examine the genotypes of the local varieties that are often utilized as parents in breeding plans in Taiwan. The results show that the genotype of the variety Heng-Shang is AaBb in which the two genes are linked in a repulsion phase. The number of the offspring plants with aabb genotype in Heng-Shang's progenies is controlled by recombination rate during meiosis. The results of genotyping of F₁ progenies derived from Ru-Yi × Heng-Shang showed that the proportion of AaBb, Aabb, aaBb and aabb were 17.0%, 28.5%, 40.2% and 14.3% respectively. The information revealed in this report, including the genotypes and linkage model of the parental varieties, is critical for pear breeders during strategic planning in Taiwan. Moreover, the 51 F₁ individuals with "aabb" genotype could be the potential candidates for new varieties.

Key words: Ethylene; ACC synthase; marker-assisted selection.

¹ Contribution No. 0803 from Taichung DARES, COA.

² Assistant Researcher of Taichung DARES, COA.