

梨分子標誌輔助育種技術之應用

張瑞炘、徐錦木

摘 要

梨的果實後熟生理機制中，乙烯的合成速率為重要關鍵因素，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，國外已經有2個ACC合成酶基因分子標誌被開發，包括PPACS 1和PPACS 2基因的分子標誌，分別以A、a、B、b表示顯隱性。利用兩分子標誌可以進行梨的基因行分析，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。如意梨雜交橫山梨的F₁後裔共植株檢測結果，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14.2%。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。

前 言

梨為我國重要的果樹作物，國內育種研究目標為育成低需冷性的品種，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⁽¹⁾，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，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。

乙烯合成的生化途徑中，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^(6,7,8)。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⁽³⁾，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⁽⁴⁾，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。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⁽⁴⁾。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⁽⁵⁾，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⁽²⁾。

內 容

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。

試驗結果顯示，在A基因座的部分，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)。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，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)。其中豐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。

本次試驗中檢測的雜交族群為如意梨雜交橫山梨的F₁族群，共358個單株，皆為民國96年度雜交的植株，各基因座基因型之檢測結果，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14.2%。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。

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，所得到的檢測的結果為 $X^2=48.01 > 3.84$ ($\alpha=0.05$, $df=1$)。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%。

結 語

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14.2%。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型僅佔14.2%。果樹之育種試驗通常歷程較久，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，在分子標誌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合成酶基因分子標誌的輔助育種法，期望未來可育成耐貯放梨品種，延長商品壽命。

參考文獻

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.