

分子生物技術加速高適應性彩椒之選育

王昭月^{1,5} 王怡雯² 林大鈞³ 林鳳琪⁴

摘要

番椒 (*Capsicum annuum*) 涵蓋所有甜椒及部分辣椒商業品種；典型的番椒果實顏色為綠色或紅色(後熟果色)，但基於營養與美味，新興彩色甜椒已成為新寵。鑒於目前經濟生產的商業品種不具耐熱特性，在台灣平地進行設施周年生產的品質與產量低落。本研究利用多樣性種原，經純化與雜交育種技術，取得生長勢較佳之雜交種，進行周年生產能力評估，選拔高適應性之新品系。為因應早期選種或雜交種檢測目標，同時亦開發出多個果色、辣味分子標誌；並建置花粉保存與活力檢測技術，提升高適應性雜交種之選種效率。

關鍵詞：分子生物技術、高適應性、彩色番椒

前言

番椒 (*Capsicum* spp.) 是茄科 (Solanaceae) 蔬菜作物或香辛類作物。典型的番椒果實是紅色，但基於營養與美味需求，使色彩豐富的彩色甜椒 (*C. annuum*, 以下簡稱為彩椒) 也廣受歡迎。依據前人研究顯示番椒的老祖宗就是辣椒；但作為蔬菜用途的大果形甜椒 (英名俗稱為 bell 或 blocky)，則是十九世紀的產物，它的栽培歷史少於 400 年 (紀錄於前哥倫布時期：1864–1928 年)，最初的栽培地區為墨西哥 (Bosland & Votava 1999；Perry 2011)。有鑒於番椒的演化歷程久遠，所具備的生物多樣性高，蒐集具有耐逆境等優良特性之野生種，已成為現代耐逆境、高適應性彩椒育種上不可或缺的重要材料 (Kraft *et al.* 2013)。

近二十年間分子生物技術進步神速，在農業上已實際應用分子標誌 (markers) 進行：(1) 品種鑑定 (Prince *et al.* 1995)、種質遺傳歧異度 (germplasm diversity) 分

-
1. 行政院農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
 2. 行政院農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
 3. 行政院農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。
 4. 行政院農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。
 5. 通訊作者，電子郵件：dagin@tari.gov.tw；電話：(04) 23317353。

析、遺傳純度 (genetic purity) 分析；(2) 特定性狀連鎖圖譜之建構並輔助選種 (Paran *et al.* 2004；Minamiyama *et al.* 2006；Lee *et al.* 2009)；(3) 選殖並檢定特定功能性基因 (Minamiyama *et al.* 2006)。

利用核酸序列標誌進行遺傳分析具備多項優點：(1) 以 DNA 作為分析樣品，在各個組織、各個發育時期均可檢測，具有早期、快速篩選特定性狀的效益 (Rodriguez-Maza *et al.* 2012)；(2) 高訊息的序列標誌，可延伸至種間、種內多作物之遺傳分析 (Potis *et al.* 2007)；(3) 利用共顯性分子標誌 (co-dominance marker)，可鑑別出特定性狀的基因型為同質或異質基因型，適合目標性狀選種與遺傳分析 (Wyatt *et al.* 2012)。以簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR) 標誌為例，其分析方法簡便，已普遍應用於多種植物或作物之遺傳分析 (Kumpatla & Mukhopadhyay 2005；Yi *et al.* 2006)。

高適應性彩椒育種目標

目前經濟栽培的彩椒商業品種，源自歐美的種苗公司所選育，生長的適溫範圍 21–27°C，不具耐熱特性，較適合溫室栽培生產 (Erickson & Markhart 2002)。依據 FAO 統計，全球番椒栽培面積和生產總量係以亞洲 (亞熱帶、熱帶地區) 為主，占番椒總生產量 60% 或以上。但鑑於氣候劇烈變遷和全球性暖化趨勢，亟需因應高溫等逆境因子，選育高適應性的彩椒，提供生產之需。

高適應性彩椒育種的實施策略，是利用高生產力的番椒種原以及果形、果色優美的彩椒進行雜交，以選育出具有雜交優勢的高適應性雜交種。高適應性的選種目標包含 (1) 提高果實著果的溫度範圍 20–35°C；(2) 篩選具有半停心性的生長習性，提供省工栽培 (少除側芽)；(3) 篩選早生型雜交種，由播種到果實採收日數為 90 天以下 (day after seeding, 簡寫為 90 DAS)，有助於逃避逆境；(4) 篩選生長勢強健，果實採收期可延續 4 個月或以上；並單株產量 1 公斤以上，單株果實數 10 個以上等高生產力品系。

提供高適應性雜交育種的親本，常來自小型果的野生馴化種 (果實重量普遍低於 50 g)，故雜交 F₁ 的果實傾向中型或小型果 (單果重約 150g–50g)，有別於現行的商業大果品種 (果重 200 公克以上)。但依照目前的消費型態，這種中、小型果，尚可符合一次食用多色蔬果之需求，可提供小家庭或個人料理食用。

彩椒核心種原與高適應性雜交組合之評估

因應耐熱性彩椒育種研究，本所於 1997 年至 2006 年期間，自亞蔬中心引進近 400 份的番椒種原，另收集來自歐美的商業品種、OP (open pollination) 品種等，歷經多年、多期作的園藝特性調查與遺傳歧異度分析(依據外表型與分子標誌分析)，篩選可採種之高生長勢品系，建立 250 個番椒核心種原。此番椒核心種原包含 7 種果色 (紫、黃、橘、褐、紅、乳白、蘋果綠)，7 種果形：bell、cayenne、cherry、squash、paprika、pimento、wax。核心種原的來源地區涵蓋 15 個國家 (包含義大利等歐洲 8 個國家；巴西；哥斯達黎加；美國；加拿大；澳洲；蘇聯與台灣等)，部分材料為地方品種 (OP 彩椒品種)。接續再藉由這些番椒核心種原材料，進行高生產力、早熟性、耐逆境 (耐病、耐熱) 等高適應性彩椒品系之選育。

高適應性彩椒核心自交系之建立

利用 250 個番椒核心種原，在 2005–2009 年期間，進行多期作 (含秋-冬期作) 的園藝性狀調查並自交純化，篩選取得 36 個生長勢較高的彩椒自交系 (自交 8 代以上，S8)。此 36 個彩椒自交系，仍具有果實多樣化特質，包含 7 種果色 (紫、黃、橘、褐、紅、乳白、蘋果綠)、5 種果形 (bell、squash、paprika、pimento、wax)，或早熟性 (播種至採收日數低於 95 天) 等；此外，部分品系特具有耐白粉病等耐逆境潛力。36 個自交系經初步的耐熱性篩選，評估指標為夏季期作的果實產量，篩選條件為單株果實數量 5 個以上，單株產量 250 公克或以上；合計篩選出 18 個生長勢較強 (或具耐熱潛力) 的核心自交系。此 18 個核心自交系的果實多樣化近似 36 個高生長勢較之自交系，仍包含 7 種果色 (紫、黃、橘、褐、紅、乳白、蘋果綠)、5 種果形 (bell、squash、paprika、pimento、wax)，早熟性 (播種至採收日數低於 95 天) 等。

建構高適應性彩椒雜交組合與性狀評估

利用 18 個核心自交系作為親本，於 2012–2017 年期間陸續建構 57 個雜交組合，並進行各雜交組合的園藝性狀調查與周年生產力評估。所建構的各雜交組合至少接受 2 個年度 3–4 個期作 (包含 2 個夏季期作) 的園藝性狀調查，以及產量穩定性評估。配合耐熱性選種目標，參考前人研究 (Reddy & Kakani 2007) 另建立熱

逆境下的花粉發芽活力分析或葉綠素螢光分析 (圖 1、圖 2) 等生理指標，以輔助雜交系與高適應性自交系之耐熱性評估。

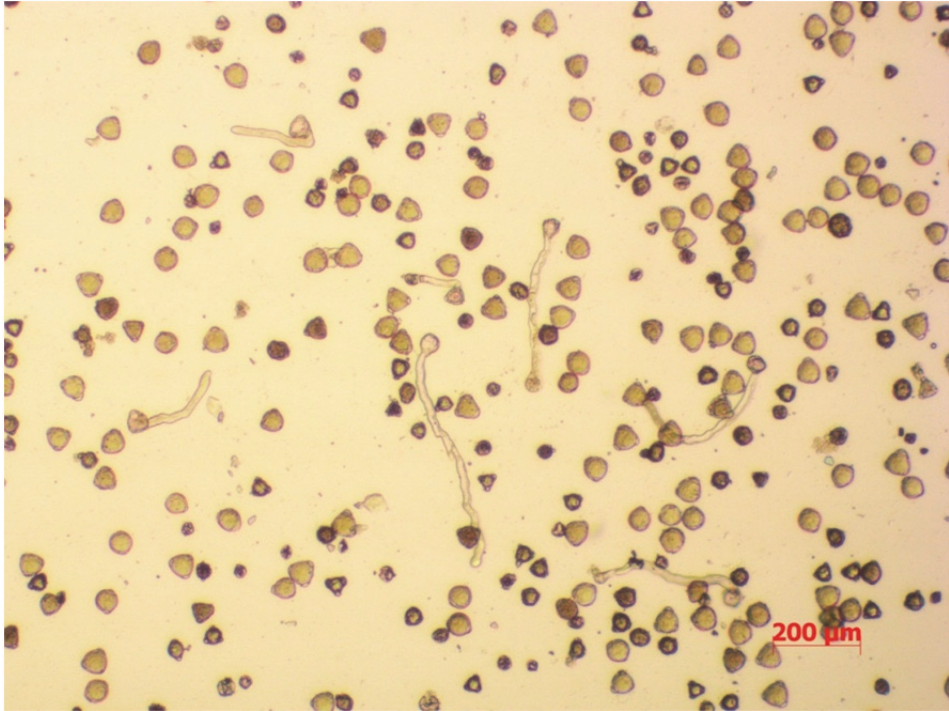


圖 1. 具耐熱潛力的彩椒雜交系‘0441’夏作(2016/08/15)的花粉發芽能力鏡檢。



圖 2. 利用葉綠素螢光評估彩椒在熱逆境下之光合效能。

經初步篩選獲得 8 個中、小型果 (單果的平均重量 80–100 公克) 之雜交系，具有高生產力表現 (圖 3)。以 7 吋盆栽的產量評估其 4 個月採收期的單株產量為 880–1,300 公克，平均每株 10 果以上。此外也以商業品種為對照，進行多期作的慣行栽培模式與產量穩定性評估 (圖 4)。

以上高適應性的雜交組合 (含耐熱性親本) 除進行多期作的產量評估，亦配合安全生產與永續農業生產目標，自 2015 年起開始使用天然資材或天敵防治害蟲等綜合防治方式，進行周年 (雙期作) 之生產評估，期兼顧果實經濟價值並減少農藥使用，建立友善的農業生產模式。

分子育種技術加速彩椒選種效率

參考前人有關番椒基因組之研究與茄科核酸序列資訊 (Kumpatla & Mukhopadhyay 2005 ; Yi *et al.* 2006 ; Wang & Bosland 2006 ; Ince *et al.* 2010)，合成 500 對 SSR 引子組，經測試、篩選計取得 323 對 SSR 引子組，符合預期之 PCR 產物且易於判讀，據此進行 36 個高生長勢自交系之遺傳歧異度分析，並提供建構雜

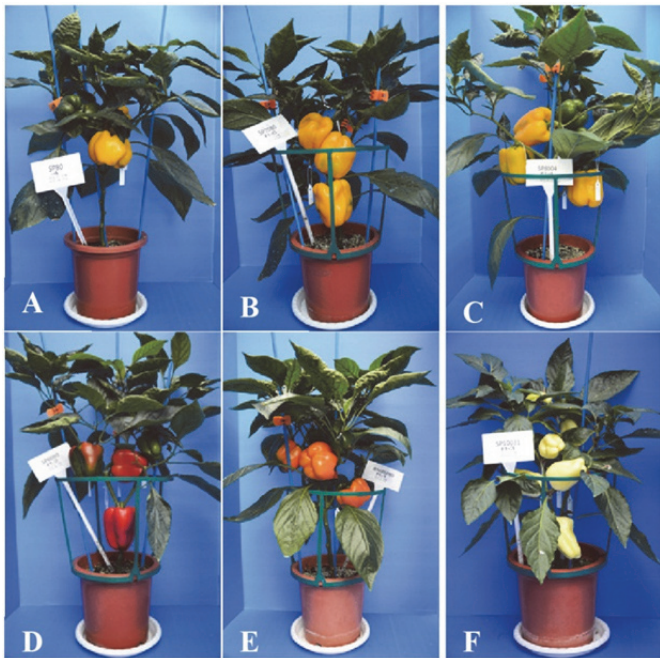


圖 3. 高產彩椒自交系(A)80；高產的新雜交系：(B) 20×80；(C) 80×04；(D) 60×80；(E) KM×80；以及 (F) 乳白果色早生系 100×31 的結果情形。



圖 4. 高適應性的彩椒雜交系 '10404' 夏作(2016/06)田間的結果情形。

交組合之遺傳背景分析。此外，又利用篩選獲得之 18 個高適應性自交系間具多型性的 SSR 引子組，提供做為雜交組合檢定之用。另針對彩椒果實重要性狀，如辣味、果色或果形等，建立輔助選種之分子標誌，以提供苗期進行特定性狀之篩檢，加速選種之效益。(圖 5、圖 6)

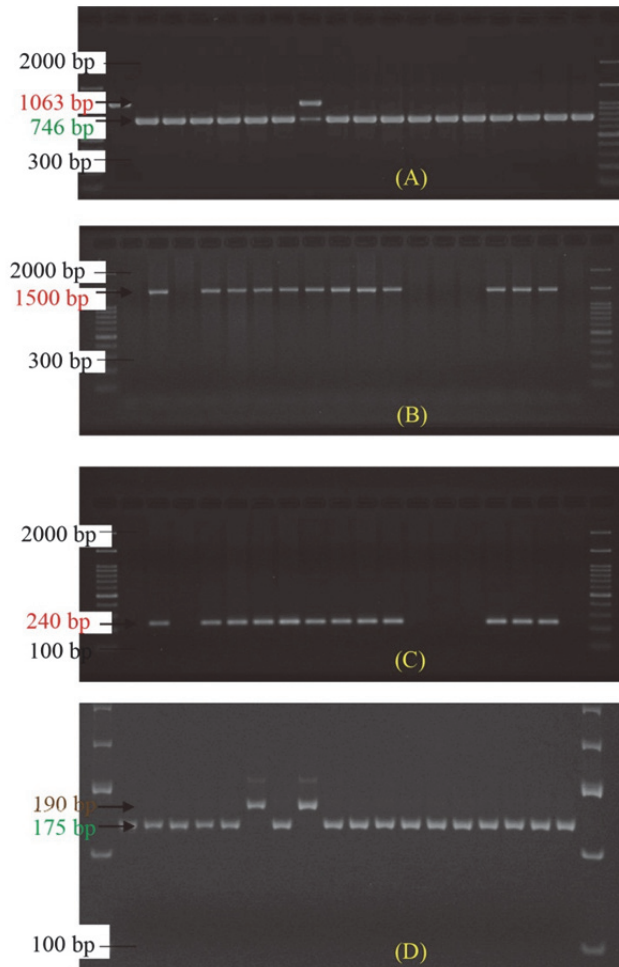


圖 5. 番椒 18 個自交系 (依序為 4、19、20、31、40、41、44、46、60、63、71、80、96、98、100、102、103、104)，分別進行(A)辣味缺失基因標誌 *pun1¹* 分析；(B)、(C)紅果色基因標誌 *CCS_1500bp* 和 *CCS_240bp* 分析；(D)以 SNP-CAPS 標誌(*CaSGR+FokI*) 進行橄欖綠色(或褐色)果色之基因型分析與圖譜。
註：(A) 具有 *Pun1¹*_1063 bp 片段有辣味，*pun1¹*-746 bp 為辣味缺失；(B) 出現 *CCS_1500bp* 或 (C)*CCS_240bp* 片段為紅色番椒；缺失 *CCS_1500bp* 或 *CCS_240bp* 片段為黃果(D)出現 SNP-CAPS 標誌(*CaSGR+FokI*)_190 bp 的後熟果色為橄欖綠色或褐色，而 (*CaSGR+FokI*)_175 bp 的綠果會在後熟期間退綠，呈現出黃果或紅果之外表型。

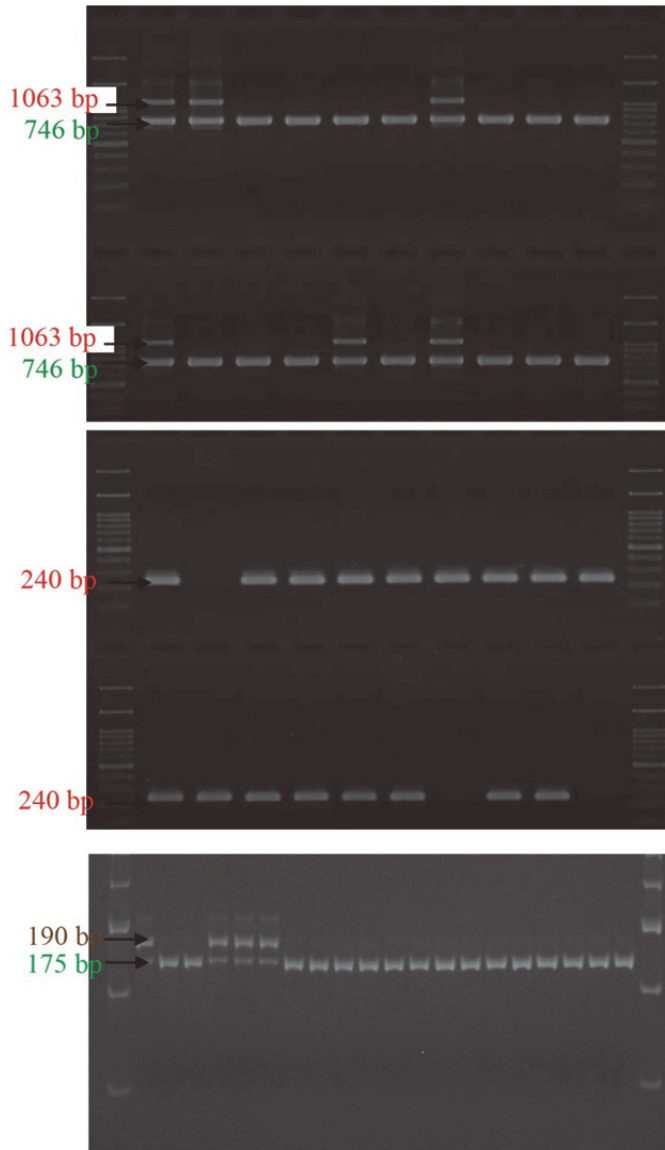


圖 6. 番椒 20 個 F₁ 雜交系(4×41、4×98、19×98、41×31、41×40、41×98、60×4、60×31、60×40、60×98、63×4、63×31、63×40、98×31、100×4、100×98、104×4、104×40、金明星、北極星)，分別進行(A)辣味缺失基因標誌 *pun1^l* 分析；(B) 紅果色基因標誌 *CCS_240bp*；(C) 以 SNP-CAPS 標誌(*CaSGR+FokI*) 進行橄欖綠色(或褐色)果色之基因型分析圖譜。

註：(A) 出現 *Pun1^l*_1063 bp 和 *pun1^l*-746 bp 異質結合型具有辣味，僅 *pun1^l*-746 bp 為辣味缺失；(B) 出現 *CCS_240bp* 片段為紅色番椒，缺失 *CCS_240bp* 片段為黃果；(C) 具 SNP-CAPS 標誌(*CaSGR+FokI*)_190 bp, 175 bp 異質結合型或僅(*CaSGR+FokI*)_175 bp，其果實在後熟期間葉綠素會降解，呈現出黃果或紅果之外表型。

辣味基因缺失之分子標誌輔助甜椒之選種

針對耐逆境的辣椒和果形、果色優質的甜椒進行之雜交後裔，或回交育種的後裔族群之辣味基因分析；參考前人辣味基因研究 (Stewart et al. 2005 ; Rodriguez-Maza et al. 2012) ，經篩選建立 2 個 InDel marker (*pun 1^l* 與 MAP1)，可提供彩色甜椒 (為辣味缺失基因型) 後裔之檢測。而合併利用辣味基因 *Pun 1* 共顯性標誌，以及 *pun 1^l* 隱性基因標誌，則可區分出具有辣味的雜交後裔為異質結合型或同質結合型，此利用於苗期篩選，可加速甜椒之選種效率。

番椒果色基因標誌輔助彩椒之選種

參考番椒果色基因，建立特定果色的基因標誌，可輔助特定果色的彩椒之選種 (Popovsky & Paran 2000 ; Efrati et al. 2005 ; Borovsky & Paran 2008)。控制番椒 (*C. annuum*) 成熟果轉紅的 *Y* (或稱為 y^+) 基因，位於 6 號染色體，為顯性基因。 y^+ 與辣椒紅素 (capsanthin) 生合成的關鍵基因 *Ccs* (capsanthin-capsorubin synthase) 連鎖；若 *Ccs* 基因缺失 (deletion)，則表現黃果。黃果基因型簡稱為 *y*，為隱性基因 (Thorup et al. 2000 ; Popovsky & Paran 2000)。

而 *SGR* 基因調控葉片老化過程的葉綠素崩解，或後熟果實的葉綠素降解。Borovsky 與 Paran (2008) 發現番椒 *CaSGR* 基因發生單鹼基 (single nucleotide) 的錯義突變 (missense mutation)，導致第 114 個胺基酸由 W (tryptophan)→R (arginine)，使後熟果實的葉綠素不降解 (此基因型為 *sgr*, stay green)，與簡稱為 *cl* (chlorophyll retainer) 基因具相同表現；為隱性基因。*cl* 與 *Y* (或稱為 y^+) 基因同時存在時，果色表現為褐色且後熟果色不轉紅；*cl* 與 *y* 基因同時存在，則果色呈現橄欖綠且後熟果色不轉紅。參考番椒果色調控基因訊息，建立輔助彩椒苗期選種之分子標誌，可加速特定果色之選種效率。

依據 2014 年至 2016 年的前期研究，建構並利用 5 個特定的雜交 F_2 族群各 200 株以上，合計 1000 個以上的 F_2 後裔樣品，建立可用於紅果色 (*Y* 基因型) 分析的 SCAR (sequence characterized amplified region) 標誌，此即參照關鍵基因 *Ccs* 設計並篩選獲得 *Ccs*_1490 bp、*Ccs*_240 bp 兩個分子標誌，可用以檢測紅果彩椒。

另利用番椒葉綠素降解之關鍵基因 *CaSGR*，設計可用以檢測葉綠素不降解 *cl* 基因型之 *CaSGR*_dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequences) 標誌。經測試 2 個特定的雜交 F_2 族群各 200 株以上，合計 413 個 F_2 後裔樣品，已取得分

子標誌 *sgr*_195 bp，可用於檢定橄欖綠果色或褐色果等彩椒。

以上建立的辣味與果色之分子標誌，已實際利用於現行回交育種的後裔族群，進行特定果色之苗期選拔，可加速目標果色之彩椒選種效益。

結論

歸納近代番椒 (*C. annuum*) 品種改良的演進，多數著重於果實性狀的改變。以彩椒為例：主要的選種目標為多樣化的果色與果形；其次為果實風味 (香氣)、果肉厚度和固形物含量 (或乾製率) 等量的提高。而目前鮮食蔬菜用途的甜椒之選育目標，仍以果色多樣化、大果和提高可溶性固形物 (Brix) 等為訴求；但針對具有耐逆境潛力 (含耐熱、耐旱、耐病蟲等) 的野生種原之利用，乃至進一步開發高適應性彩椒 F_1 雜交品種，仍未見顯著之成效。目前農試所有跨單位的育種團隊，針對具耐熱潛力的種原進行純化並利用於雜交組合之建構，再以多年、多期作綜合性評估，篩選出高適應性之雜交系，以提供夏季或高溫環境下生產之利用。另利用篩選獲得的高適應性雜交系，嘗試結合天然資材與害蟲天敵等綜合防治方式，期減少化學農藥施用，維護生態安全，並建立友善的農業生產模式。

誌謝

本研究承蒙農委會農糧領域科技計畫 (103–105 年度) 之經費補助，謹此致謝。

引用文獻

- Borovsky Y. and I. Paran. 2008. Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. *Theor. Appl. Genet.* 117:235–240.
- Bosland, P.W. and E. Votava. 1999. *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Efrati, A., E. Yoram, and I. Paran. 2005. Molecular mapping of the chlorophyll retainer (*cl*) mutation in pepper (*Capsicum* spp.) and screening for candidate genes using tomato ESTs homologous to structural genes of the chlorophyll catabolism pathway. *Genome* 48:347–351.
- Erickson, A. N. and A. H. Markhart. 2002. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell and Environment*

25:123–130.

- Ince, A. G., M. Karaca, and A. N. Onus. 2010. Differential expression patterns of genes containing microsatellites in *Capsicum annuum* L. *Mol. Breeding* 25:645–658.
- Kraft, K. H., J. J. Luna-Ru'z, and P. Gepts. 2013. A new collection of wild populations of *Capsicum* in Mexico and the southern United States. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60:225–232.
- Kumapatla, S. P., and S. Mukhopadhyay. 2005. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species. *Genome* 48:985–998.
- Lee, J. M., S. H. Nahm, Y. M. Kim, and B. D. Kim. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 108:619–627.
- Lee, H., I. Bae, S. Park, H. Kim, W. Min, J. Han, K. Kim, and B. Kim. 2009. Construction of an Integrated Pepper Map Using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC End Sequences. *Mol. Cell* 27:21–37.
- Lefebvre, V., M. Kuntz, B. Camara, and A. Palloix. 1998. The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the *y* locus controlling the red fruit color in pepper. *Plant Mol. Biology* 36: 785–789.
- Paran, I., J. R. van der Voort, V. Lefebvre, M. Jahn, L. Landry, M. van Schriek, B. Tanyolac, C. Caranta, A. Ben Chaim, K. Livingstone, A. Palloix, and J. Peleman. 2004. An integrated genetic map of pepper (*Capsicum* spp.). *Mol. Breeding* 13:251–261.
- Perry, L. 2011. Ethnobotany. In: Russo, V. M. (ed.) *Peppers: botany, production and uses*. CABI, Cambridge, pp.1–13.
- Popovsky, S. and I. Paran. 2000. Molecular genetics of the *y* locus in pepper: its relation to capsanthin-capsorubin synthase and to fruit color. *Theor. Appl. Genet.* 101: 86–89.
- Minamiyama, Y., M. Tsuru, and M. Hirai. 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breeding* 18:157–169.
- Minamiyama, Y., M. Tsuru, T. Kubo, and M. Hirai. 2007. QTL Analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper using a high density SSR-based map. *Breed. Sci.* 57:129–134.
- Potis, E., I. Nagy, Z. Sasvári, A. Stágel, L. Barchi, and S. Lantari. 2007. The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Sci.* 172: 640–648.
- Prince, J. P., K. L. Vincent, A. Carmichael, R. B. James, and M. K. Molly. 1995. A survey of DNA polymorphism with the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars.

- Genome. 38:224–231.
- Reddy, K. R. and V. G. Kakani. 2007. Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by *in vitro* pollen germination and pollen tube length. *Sci. Hort.* 112:130–135.
- Rodriguez-Maza, J., A. Garces-Claver, S. Park, B. Kang, and M. S. Arnedo-Andes. 2012. A versatile PCR marker for pungency in *Capsicum* spp.. *Mol. Breeding* 30:889–898.
- Stewart, C. Jr, B.C. Kang, K. Liu, S.L. Moore, E.Y. Yoo, D. Kim, I. Paran, M. Mazourek, and M. Jahn. 2005. The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant Journal* 42:675–688.
- Thorup, T. A., B. Tanyolac, K. D. Livingstone, S. Popovsky, I. Paran, and M. Jahn. 2000. Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11192–11197.
- Yi, G., J. M. Lee, S. Lee, D. Choi, and Byung-Dong Kim. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 114:113–130.
- Wang, D.L., and P. Bosland. 2006. The genes of *Capsicum*. *Hortscience* 41:1169–1187.
- Wyatt, L. E., N. T. Eannetta, G. M. Stellari, and M. Mazourek. 2012. Development and application of a suite of non-pungency markers for *Pun1* gene in pepper (*Capsicum* spp.). *Mol. Breeding* 30:1525–1529.

Acceleration of High Adaptability of Color Pepper Breeding by Molecular Biotechnology

Jau-Yueh Wang^{1,5}, Yi-Wen Wang², Da-Gin Lin³, Feng-Chyi Lin⁴

Summary

Peppers (*Capsicum annuum*) include all sweet pepper and some of chili varieties. The classic fruit color of pepper is green or red (ripening fruit color); however, the color peppers have become more and more popular in the markets based on their nutrition and flavor. Due to without heat-tolerant of commercial varieties, the yield and quality of year-round production in the facilities are poor in Taiwan. In this study, we have obtained the hybrids with better growth vigor from diverse germplasms through the techniques of purification and crossing. At the same time, the molecular markers linked with fruit color or pungency were also developed for the early selection of germplasms or hybrids. The techniques of pollen preservation and vitality investigation were also established for improving the efficiency for the selection of highly adaption hybrids.

Key words: Molecular biotechnology, High adaptability, Color pepper.

-
1. Assistant Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 2. Assistant Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Researcher Fellow, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Associate Researcher, Applied Zoology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, e-mail: dagin@tari.gov.tw; Tel: 886-4-23317353.