

番椒稔性調控基因分子標誌之開發

Development of molecular markers for male sterility and fertility restorer in

Capsicum annuum

龔美玲¹、張惠如²

¹ 種苗改良繁殖場 生物技術課 助理研究員

² 種苗改良繁殖場 生物技術課 副研究員兼課長

一、前言

番椒(*Capsicum annuum*)泛指辣椒(hot pepper; chili pepper)及甜椒(sweet pepper; bell pepper)，屬於茄科(Solanaceae)植物。2018年全球番椒栽培面積將近376萬公頃(FAO, 2020)，而根據107年農業統計年報，臺灣全年的番椒栽培面積為2,556公頃，總產量約2.9萬公噸，主要產區為南投、嘉義、屏東及雲林等地。番椒種子是我國重要進出口品項之一，占我國蔬菜種子出口第五名(丁等人, 2016)，在茄科作物中則僅次於番茄，財政部關務署統計108年種植用番椒種子出口總值約有1千4百萬元台幣。

目前番椒商業品種多為一代雜交種(F_1)， F_1 具有雜種優勢，表現優於父母本，其再繁殖的後代基因型會產生分離，優良特性無法重現，因此無法留種，雜交種子藉此維持商業利基。雜交種子生產常運用細胞質核互作雄不稔(Cytoplasmic-Genetic Male Sterility, CGMS)品系，包含雄不稔親(A line)、維持親(B line)及恢復親(C line)，所謂的雄不稔是指雄蕊無法產生正常花粉的現象，通常有花藥萎縮、不開裂或花粉無活力等型態；CGMS系統係透過特定的細胞核基因與細胞質基因之間的交互作用共同控制稔性表現(圖1)，當細胞核內的稔性恢復基因為顯性(Rf)時，即使細胞質帶有雄不稔基因(S)，仍可恢復成雄可稔。以雄不稔品系為母本時不必除雄，至少能節省40%的種子生產成本(Lin et al., 2014)，且容易繁殖與維持親本，藉由近似同源系的B line提供花粉繁殖A line，雄可稔的C line作為父本與雄不稔的母本A line雜交，所產生的一代雜交 F_1 因帶有顯性 Rf 基因，故仍可以產生正常花粉並結實。自Peterson (1958)首次發表番椒的細胞質雄不稔品系(PI 164835)，雄不稔已廣泛用於辣椒的雜交種子生產，番椒稔性外表型

請見圖2。育成CGMS品系時，利用分子標誌可幫助快速篩選出帶有目標基因的品系材料，本文針對番椒稔性調控基因分子標誌之研究進行介紹。

二、番椒細胞質雄不稔基因之介紹及鑑別用分子標誌之開發

作物細胞質雄不稔基因普遍發現在粒線體基因體中，因重組產生新的序列 (*open reading frame, ORF*) 嵌合在已知基因上或附近，例如T型CMS玉米的 *orf221*、*nap*型CMS油菜的 *orf222*、Bo型CMS水稻的 *orf79*、A3型CMS高粱的 *orf107* 等 (Schnable and Wise, 1998)。根據先前的研究指出番椒雄不稔細胞質 (S-cytoplasm) 粒線體的 *atp6-2* 及 *coxII* 基因有序列改變 (Kim and Kim, 2005)，而後 Kim 等人 (2007) 發現 *coxII* 基因 3' 端有 *orf456* 的插入，另外 Gulyas 等人 (2010) 也在相同位置偵測到有另一個片段較長的 *orf507* 基因轉錄。透過序列差異分析，陸續有文獻發表番椒雄不稔細胞質的專一性分子標誌，包含 *atp6-SCAR*、 Ψ *atp6-2*、*coxII* (Kim and Kim, 2005; 2006; 許, 2007)、*orf456* (Kim et al., 2007)、*orf507* (Gulyas et al., 2010)、*accD-U* (Jo et al., 2009)、*CMS-SCAR₁₃₀* (Ji et al., 2014) 等，但除了 *CMS-SCAR₁₃₀*，其餘標誌皆為顯性標誌；此外，有些標誌之專一性不足，例如 Ψ *atp6-2*、*coxII-SCAR* 及 *orf456*，在部分雄可稔細胞質 (N-cytoplasm) 品系亦會增幅出微弱的條帶；上述情形造成有誤判 (偽陰性或偽陽性) 的可能性。而 *CMS-SCAR₁₃₀* 雖然為對雄不稔 (S) 及雄可稔 (N) 細胞質都能增幅出專一條帶，但由於僅相差 10 個鹼基 (bp)，因此需要搭配高解析度的電泳分析。

依據許 (2007) 以於國內所蒐集之番椒品系測試 *atp6-2* 及 *coxII-SCAR* 標誌，發現 *atp6-2* 之專一性較 *coxII* 佳，以及 *CMS-SCAR₁₃₀* 在開發者的測試結果中顯示其比 *orf507*、 Ψ *atp6-2* 與 *accD-U* 等標誌之準確度高 (Ji et al., 2014)。因此，本研究利用公開之 *atp6-2* 基因序列上的 SNP 位點重新設計標誌 (CA-CMS-tss-1)，以及利用 *CMS-SCAR₁₃₀* 之序列差異設計標誌 CA-CMS-tss-2，經過最佳化條件測試，結果顯示與參試 CGMS 品系之類型皆相吻合，兩組標誌皆屬四引子組合之標誌，且都

能夠得到對細胞質稔性具有專一性的條帶(圖3)，以一般水平電泳即可分析，條帶清晰且容易判讀。

三、番椒稔性恢復基因(*Rf*)之研究近況及連鎖分子標誌之開發

透過F₂世代符合雄可稔：雄不稔=3:1的分離比，可推知番椒稔性恢復(*Rf*)由單一顯性基因控制，且被定位在第6條染色體上(Lee et al., 2008; Kim et al., 2006; Min et al., 2008, 2009)。許(2007)以顯性標誌CRF-SCAR₈₇₀(Gulyas et al., 2006)檢測國內所蒐集之141個番椒CGMS品系的*Rf*基因型，正確率達93%。2016年Jo等人利用chromosome walking選殖一段包含*Rf*基因、長821 kb的序列片段，並首次發表*Rf*候選基因，命名為*CaPPR6*；其他文獻指出一些作物的*Rf*基因與五肽重複(pentatricopeptide repeat, PPR)蛋白結構之基因家族有關連，例如高粱、溝酸漿屬(*Mimulus*)及玉米(CMS-S)等(Barr and Fishman, 2010; Klein et al., 2005; Xu et al., 2009)。而後Barchenger等人(2018)也發現數個與稔性恢復相關的PPR domain基因，除了1個基因位在第1條染色體，其餘皆位於第6條染色體上；Cheng等人(2020)及Zhang等人(2020)同樣利用fine mapping方法找出PPR基因作為*Rf*候選基因，但還需要進一步的驗證。本研究對與*Rf*連鎖之Co1Mod1-CAPS標誌(Jo et al., 2016)進行改良，同時結合以*CaPPR6*基因的SNP位點所設計成之標誌，組成multiplex PCR，能直接以水平電泳分析，且可同時偵測顯隱性*rf*基因，由於序列位置更靠近*Rf*基因，對*Rf*基因型預測的準確率比CRF-SCAR₈₇₀更高，測試蒐集之番椒CGMS品系的結果皆與Co1Mod1-CAPS一致(圖4)。

三、結語

優質的種子供應是確保農業永續發展的關鍵之一，種子產業可謂是各國的戰略級及攻擊型產業，當新品種推陳出新的時間間隔越來越短，市場上的品種越多也越發競爭，因此作物品種研發採用更精準、快速的分子標誌輔助育種

(marker-assisted selection, MAS)已成為必然的趨勢。雖然利用雄不稔特性生產 F_1 品種，可大幅降低人力成本，但若要將原本雄可稔的優良番椒品系轉成雄不稔親 ($S/rfrf$)及維持親 ($N/rfrf$)，由於需要導入隱性 rf 基因，傳統育種必須透過多一代的後裔檢定方能確認並選出異質結合體 ($Rfrf$)。而因顯性標誌(例如 CRF - $SCAR_{870}$)無法區分異質結合型，在分子標誌輔助育種有應用上的限制，因此本研究致力於開發共顯性標誌並增進檢測準確度，期望提升國內種苗產業在番椒 CGMS 品系育種的效率與在海外市場的競爭力。

致謝

感謝瑞成種苗有限公司提供番椒 CGMS 品系葉片材料供研究使用。

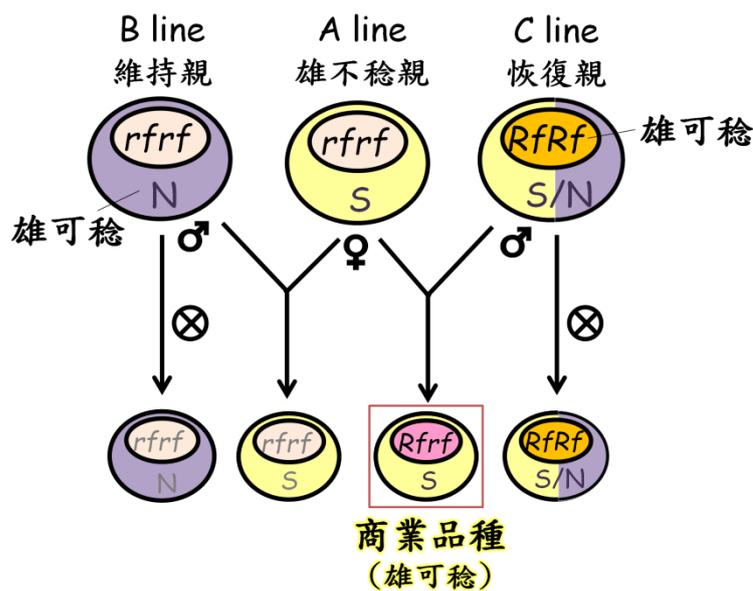


圖 1、細胞質核互作雄不稔系統示意圖。雄不稔親 ($S/rfrf$) 不會產生花粉，需藉由遺傳背景相似的維持親(近似同源系) ($N/rfrf$) 提供花粉來繁殖，雄不稔親與恢復親 ($RfRf$) 雜交則可產生雄可稔之 F_1 品種 ($Rfrf$)。N：雄可稔細胞質；S：雄不稔細胞質；稔性恢復基因顯性 (Rf) 為雄可稔。



圖 2、番椒雄可稔株(左)紫色花藥上帶有白色花粉，雄不稔株(右)則無花粉。

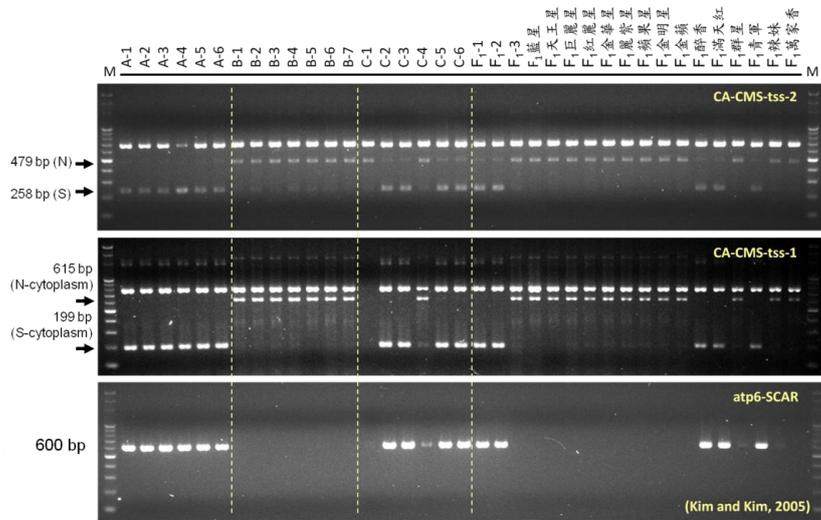


圖 3、農委會種苗改良繁殖場所開發之細胞質稔性分子識別標誌(CA-CMS-tss1 及 CA-CMS-tss2)與文獻標誌比較之電泳分析圖。A：雄不稔親；B：維持親；C：恢復親。

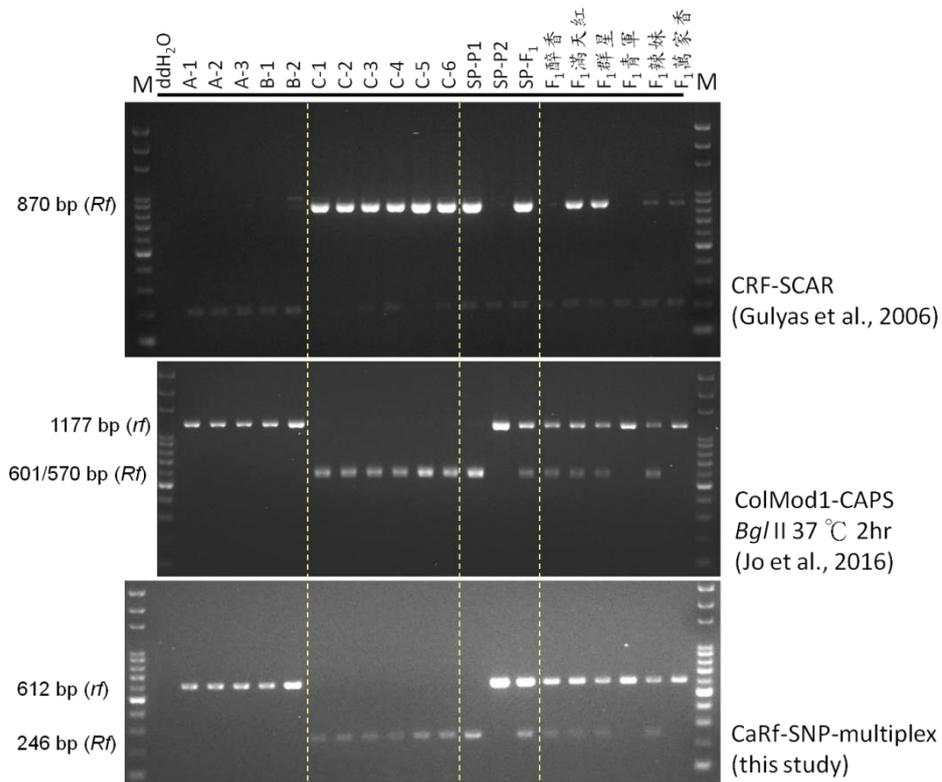


圖4、農委會種苗改良繁殖場所開發之稔性恢復基因連鎖分子標誌

(CaRf-SNP-multiplex)與文獻標誌比較之電泳分析圖。A：雄不稔親；B：維持親；

C：恢復親。SP：甜椒；P1、P2：親本。