

應用核酸逢機增殖多型性分子標記進行 番椒屬種原核心收集遺傳歧異之研究¹

范明仁² 陳述^{2,4} L. M. Engle³

摘 要

范明仁、陳述、L. M. Engle。2004。應用核酸逢機增殖多型性分子標記進行番椒屬種原核心收集遺傳歧異之研究。中華農業研究 53:165-178。

本研究之主要目的為針對利用性狀調查資料所建立的番椒屬種原核心收集,期望藉由 RAPD 分子標記,就分子層次瞭解該種原核心收集的遺傳歧異結構。本研究以 16 個逢機引子,針對番椒屬種原核心收集的 264 份種原進行 RAPD 分析,並據此進行集群分析結果發現,由兩群間最小距離(Mini Distance; MD)於 0.83 為分群依據時,可明顯的將番椒屬種原核心收集區分為 5 個子群,其中 *C. annuum* 的種原有 92%集中在第 1 子群,*C. baccatum* 亦有 92%的種原集中在第 4 子群,*C. chinense* 的種原為 86%集中在第 2 子群,*C. frutescens* 為 86%的種原集中在第 3 子群,而 *C. chacoense* 則是全部的參試種原皆集中於第 5 子群,顯示就分子層次而言,番椒屬內各不同“種”別的種原間具有顯著的遺傳歧異,因此在建立番椒屬種原核心收集時,應以儘量包含不同“種”別的種原為考量。針對同一“種”別之種原研究結果發現,仍有少部份的種原會散佈至其它子群中,顯示“種”內亦具有相當程度的歧異分化存在,以保存寬廣之遺傳歧異的觀點而言,這些具有歧異分化的種原納入在種原核心收集中是相當有意義的。經由 Shannon-Weaver 歧異指數之估算發現,第 1 子群(主要成員為 *C. annuum*)歧異指數較低(為 0.783),顯示群內種原間的遺傳相似性較其它群為高,研究認為應可藉由 RAPD 分子標記針對該群種原進行再篩減,以形成更具代表性的種原核心收集。因此本研究應用 RAPD 分析探討番椒屬種原核心收集之結果顯示,藉由分子標記不但有助於瞭解分子層次的遺傳歧異結構,並可應用於輔助種原核心收集之建立。

關鍵詞：番椒屬、核心收集、核酸逢機增殖多型性、遺傳歧異。

前 言

植物種原具有的多型性與遺傳歧異是作物育種的原動力,而保存種原的主要目的即為維持遺傳歧異以提供作為育種的基礎材料。由於未來可能的育種需求是無法預知的,因此一般認為進行種原保存時應以維持較寬廣的種原歧異範圍為原則。但當面對寬廣龐大的種原保存時,卻也相對地衍生出了另

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2201 號。接受日期：93 年 7 月 21 日。

2. 本所作物種原組研究員兼組長、助理研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。

3. 亞洲蔬菜研究發展中心種子及種原保存研究室遺傳學家兼主任。臺灣 臺南縣 善化鎮。

4. 通訊作者,電子郵件:cshu@wufeng.tari.gov.tw;傳真機:(04)23331673。

外一些問題:就種原的利用而言,育種學家們所關心的課題是如何能更有效率地由繁多的種原中篩選出所需的育種材料;而對於種原管理者而言,所關心的課題是應如何利用最經濟的資源來保存這些珍貴的種原,並設法提升種原蒐集及保存的效率。

Frankel(1984)首先提出了「種原核心收集」(core collection of germplasm)的概念,定義所謂的核心收集係指由現存的種原集中所選取出的一小部份種原,而這一小部份種原的主要特色為可代表現存種原收集的遺傳歧異;至於其餘未被選取作為核心收集的種原則稱之為「儲備收集」(reserve collection)。因此,在形成種原核心收集時,應以不包含重複(no duplicate),減少各種原間的相似性(similarity),並以可代表整個種原收集的遺傳梯度範圍(genetic spectrum; gradient)為原則(Brown 1995)。

基於種原核心收集在種原管理及育種研究上的潛力,目前有關種原核心收集的研究報告陸續出爐,其中較具研究規模或系統的作物有花生(Holbrook *et al.* 1993; Holbrook & Anderson 1995)、單年生苜蓿屬(Diwan *et al.* 1994; Diwan *et al.* 1995; Brummer *et al.* 1995)、一年生苜蓿屬(Basigalup *et al.* 1995; Bouton 1996; Jung *et al.* 1997)、菜豆(Tohme *et al.* 1995; Tohme *et al.* 1996; Skroch *et al.* 1998)、黑麥草(Charmet *et al.* 1993; Charmet *et al.* 1994; Balfourier *et al.* 1994)及小麥(Spagnoletti Zeuli & Qualset 1993)。

目前應用蛋白質或分子標記於種原核心收集的相關研究報告不多,可區分為以下 2 個方面來探討,即有關輔助種原核心收集之建立,以及種原核心收集建立之後的後續研究利用。

首先就輔助種原核心收集之建立的相關研究而言,在可可(*Theobroma cacao* L.)的研究方面,Ronning & Schnell(1994)針對由美國可可研究所(American Cocoa Research Institute; ACRI)所逢機選出的 86 份可可種原,以等位基因酵素(allozyme)評估其遺傳歧異,結果發現各不同形態群間的種原歧異較各不同地理來源間為高,故建議日後應結合形態特性與等位基因酵素,以建立可可的種原核心收集。Brummer 等人(1995)針對單年生苜蓿屬內分屬於 6 個物種(species)的 33 個種原,以 10 個 RAPD 逢機引子進行分析,嘗試了解 RAPD 對於物種內與物種間的解析力,研究結果發現分群結果與傳統分類的結果一致,於是提出分子標記可用於輔助種原核心收集之形成。Lerceteau 等人(1997)則是針對涵括有各不同地理來源,以及依據莢與豆之形態性狀所區分之各不同形態群(morphological groups)的 155 份可可種原,以 RAPD 與 RFLP 分子標記評估種原之遺傳歧異,並嘗試瞭解各不同形態群間之演化關係,結果認為這些資訊可提供作為日後建立種原核心收集之用。Dahlberg 等人(2002)針對 42,000 份的高粱種原保存,利用種子之性狀與 RAPD 分子標記分別進行集群分析,嘗試建立種原核心收集,並期望以 RAPD 集群分析結果為基礎,發展出能直接利用種子性狀即可得到與 RAPD 分群一致的結果,研究結果顯示無法直接利用種子性狀得到與 RAPD 多型性相符的分群結果。

在種原核心收集建立之後的後續研究利用方面,Tohme 等人(1996)利用 AFLP 指紋分析技術,針對 CIAT 菜豆種原核心收集的 114 個種原進行分析,期望藉由核心收集,可對於 CIAT 整個菜豆種原保存的遺傳歧異結構有更進一步的瞭解,研究結果發現該種原保存可區分為中美(Mesoamerica)、哥倫比亞(Colombia)、厄瓜多爾-北祕魯(Ecuador-Northern Peru)與南安地斯山脈(Southern Andes)四個分群。Hokanson 等人(1998)針對美國植物種原系統的蘋果種原核心收集(Kresovich *et al.* 1995),以 SSR 分子標記就種原之重複與遺傳歧異進行探討,研究結果顯示 SSR 分子標記對於種原重複之判別具有高解析力,而遺傳歧異的分析結果亦與已知的地理來源和譜系資料一致,因此認為 SSR 可用以輔助種原之管理。Chavarriaga-Aguirre 等人(1999)針對藉由地理來源、農藝性狀與同功異構酵素(isozyme)所建立的樹薯種原核心收集中的 521 份種原,利用 SSR 分子標記探討其遺傳歧異,發現來自於不同國家來源之種原的基因座數目與序列具有差異存在,另亦探討合併使用同功異構酵素與 AFLP 分子標記,有助於鑑別種原重複,可輔助由核心集中挑選出唯一基因型(unique genotypes)的種原。

番椒(Pepper, *Capsicum* spp.)為茄科(Solanaceae)番椒屬(*Capsicum*)之一年或多年生作物，原產於中美洲的墨西哥及南美洲的秘魯、玻利維亞等地區，為全球性之茄科三大作物之一，僅次於馬鈴薯和番茄。番椒目前是亞洲地區相當重要的蔬菜作物(張 1988)，針對此重要的園藝作物，亞洲蔬菜研究發展中心與國家作物種原中心已利用性狀特性調查資料，建立了一個含有 264 份種原的番椒屬種原核心收集，本研究之主要目的為嘗試利用核酸叢機增殖多型性(RAPD)分子標記，就分子層次瞭解該種原核心收集的遺傳歧異結構，並探討應用分子標記輔助核心收集建立之可行性。

材料與方法

試驗材料

本研究參試材料為亞洲蔬菜研究發展中心針對番椒屬種原保存(共計 6,835 份)，利用性狀特性調查資料篩得的種原核心收集，共含有 264 份種原(表 1)，納入統計分析的為 12 個測度性狀(ratio scale traits)的特性調查資料，包括子葉長、子葉寬、成熟葉長、成熟葉寬、花冠長、心室數、開花日數、果長、果寬、果重、果壁厚、果梗長等 12 個性狀，首先進行 ANOVA (analysis of variance)分析檢測具顯著意義後，再進行集群分析，就同一子群(即相似性較高之群)內，依群內之個體數與總群之比例原則，於同一群內叢機抽取所需之樣品，結合各群所抽出之個體共同組成一番椒之種原核心收集，該種原核心收集中 *Capsicum annuum* (甜椒品種及多數辣椒商業品種)有 153 份，*C. frutescens* (辣椒) 43 份，*C. chinense* (辣椒) 28 份，*C. baccatum* (辣椒) 26 份，*C. chacoense* (野生種) 4 份，*C. praetermissum* (野生種) 1 份，另有 9 個尚無法確認“種”(species)之番椒屬種原。

植物體基因組 DNA 之萃取

主要參考 Doyle & Doyle(1990)所提之方法進行部份修改以萃取植物體基因組 DNA。取約 0.5 g 植株嫩葉，以液態氮研磨後迅速加入 500 μ l 已預熱至 60°C 的 DNA 萃取緩衝液，置於 60°C 水浴 30 分鐘，並間歇搖動。取出離心管靜置冷卻至室溫後，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液倒至另一新的 1.5 ml 小離心管中，並加入 500 μ l chloroform / isoamylalcohol (24 : 1) 溶液混勻，再以 14,000 rpm 離

表 1. 番椒屬種原保存及其核心收集中各不同“種”別種原之分佈

Table 1. The germplasm distribution in different species for the whole collection and core collection of *Capsicum*

Species	Whole collection		Core collection	
	No.	% of total	%	% of total
<i>C. annuum</i>	4089	59.82	153	57.95
<i>C. chinense</i>	378	5.53	28	10.60
<i>C. frutescens</i>	365	5.34	43	16.29
<i>C. baccatum</i>	356	5.21	26	9.85
<i>C. chacoense</i>	30	0.44	4	1.51
<i>C. pubescens</i>	30	0.44	0	0
<i>C. praetermissum</i>	4	0.06	1	0.38
<i>C. eximium</i>	4	0.06	0	0
Unclassified	1579	23.10	9	3.41
Total	6835	100	264	100

心 5 分鐘使兩液相分離，取上清液加入 300 μ l - 20 $^{\circ}$ C 的 isopropanol 以沉澱 DNA。以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 1 ml wash buffer(75% ethanol, 10 mM ammonium acetate)混勻，於 14,000 rpm 離心 10 分鐘後倒掉上清液，將 DNA 沉澱進行乾燥後加入 50 μ l 無菌水溶解，並加入 RNase(10 ug/ml) 於 37 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘。所抽得的 DNA 均經 OD 值測定與電泳，以判別 DNA 的濃度與品質檢測。

參試引子

本研究共採用 16 個逢機引子，針對番椒屬種原核心收集的 264 份種原，進行 RAPD 分析試驗，此 16 個逢機引子為 OPERON kit 之 OPE15、OPG16、OPK12、OPO10、OPQ16、OPQ18、OPQ20、OPR2、OPR8、OPR13、OPW16、OPX2、OPX8、OPX13、OPX16，以及 UBC (The University of British Columbia)引子組的 UBC475，這些逢機引子係為先以部份番椒屬種原進行初篩後，認為具穩定再現性且多型性較高的逢機引子(范等 2001)。

聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

反應液係參考 Oard & Dronavalli (1992)，反應總體積為 30 μ l，內含 1.2 unit *Taq* polymerase (Promega)、1X PCR buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.1% Triton 100)、2.5 mM MgCl₂、200 μ M dNTP、0.2 μ M primer 及 32 ng template DNA。聚合酵素連鎖反應係於 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600 進行，反應溫度條件設定為第 1 循環：94 $^{\circ}$ C，3 分；40 $^{\circ}$ C，1 分 20 秒；72 $^{\circ}$ C，1 分 30 秒。之後續以 94 $^{\circ}$ C，1 分 20 秒；40 $^{\circ}$ C，1 分 30 秒；72 $^{\circ}$ C，2 分 30 秒的反應溫度條件進行 44 個循環。反應完成後自動降溫保存於 4 $^{\circ}$ C 下。

增殖產物之偵測

經聚合酵素連鎖反應所增殖之產物，以 2% agarose 在 TAE buffer (40 mM Tris acetate, pH 8.0; 1 mM EDTA) 進行 DNA 電泳，並以 DNA molecular weight marker XVI (250 bp ladder) (Roche, 德國)做為分子量標誌，電泳槽係採用 Mupid-2 (Cosmo, 日本)，電壓設定 100 伏特，經電泳 20~30 分鐘結束後置於 0.5 mg/ml 的 ethidium bromide 染色 10~20 分鐘，以 UV 光檢視 agarose 膠體上的 DNA 多型性片段，並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, 美國)，以進行後續的資料分析。

資料分析

集群分析：將上述貯存於 IS 2000 Digital Imaging System 中的 RAPD 產物電泳影像 TIF 檔，以 GelCompar 軟體(Applied Maths BVBA)將電泳條帶結果轉換為 +/− 型態之資料型式，再加以文書處理轉成 1/0 之資料型式。於 SAS 軟體中撰寫程式，將此 1/0 的資料檔，以 Jaccard's coefficient(Jaccard 1908)為基礎換算成歐式距離(Euclidean distance)矩陣，再針對此距離矩陣，以 SAS 軟體之 CLUSTER procedurce 進行集群分析。

Shannon-Weaver 歧異指數(diversity index ; H')之估算：藉由 Shannon-Weaver 歧異指數(Perry & McIntosh 1991)之計算，可以標準化後的數據瞭解與比較各群間的種原遺傳歧異度。

$$H' = - \sum_{i=1}^n P_i \log_2 P_i$$

n：每一個逢機引子下所可產生 RAPD 多型性的總條帶數；

P_i：第 i 個逢機引子之各條帶下的種原頻度；

所得之 H' 估值皆除以 log₂n 以進行標準化，使 H' 介於 0 到 1 之間。

結 果

本研究番椒屬種原核心收集係依據 12 個測度性狀進行集群分析後所挑選形成，就此 12 個性狀，針對核心收集的 264 份種原，應用 SAS 軟體進行敘述統計分析探討各不同“種”別種原之變域(range)與均值(mean)的結果詳如表 2，其中種原間果重的變域範圍為最大。就種原之種別與來源地區之分佈而言，該種原核心收集以 *C. annuum* 占了大部份，約 58% 之比例，其主要來源地區為亞洲、中美洲、歐洲與北美洲；*C. frutescens* 次之，主要來源地區為中美洲；再其次為 *C. chinense* 與 *C. baccatum*，主要來源地區皆為南美洲(表 3)。

本研究主要目的為期望藉由 RAPD 分子標記，瞭解番椒屬種原核心收集分子層次之遺傳歧異結構，本試驗針對番椒屬種原核心收集的 264 份種原，以 16 個逢機引子進行 RAPD 分析(圖 1)，共計得到了 485 條於參試種原間具多型性的條帶(polymorphic bands)，平均每個引子可產生約 30 個多型性條帶。依據此 RAPD 多型性進行集群分析所得的樹狀圖如圖 2，由兩群間最小距離約大於 0.83 為分群依據時，可明顯的將番椒屬種原核心收集區分為 5 個子群，以第 1 子群內所含的種原數目為最多，共計有 156 份種原，其中以 *C. annuum* 佔了大部分(141 份種原)；第 2 子群內計有 40 份種原，主要為 *C. chinense*(24 份)與 *C. annuum*(11 份)；第 3 子群內有 37 份種原，皆為 *C. frutescens*；第 4 子群內有 27 份種原，主要為 *C. baccatum*；第 5 群僅含 4 份種原，皆為 *C. chacoense*(表 4)。

Shannon-Weaver 歧異指數(H')之估算(表 5)，可用以比較各不同群間種原分子層次之遺傳歧異程度的大小。就番椒屬種原所區分出的 5 個子群而言，其群內種原之間的遺傳歧異程度依次為第 2 子群(0.863)，第 4 子群(0.856)、第 2 子群(0.830)、第 5 子群(0.812)與第 1 子群(0.783)，其中第 1 子群內的各種原間的遺傳歧異程度較其它子群為低。

以逢機引子偵測遺傳歧異的能力而言，就整個種原核心收集來看，OPK12 與 OPE15 的歧異指數較高，分別為 0.878 與 0.854，顯示由這兩個逢機引子所產生的 RAPD 多型性，在番椒屬種原核心收集中具有較高的遺傳歧異存在；反之，OPO10(歧異指數 0.611)，OPQ20(歧異指數 0.666)與 OPR2(歧異指數 0.672)這 3 個逢機引子，其所能值得的分子層次遺傳歧異則較低。

但若就各子群來看，同一逢機引子在各不同子群可值得之分子層次遺傳歧異的能力卻不盡相同，舉例而言，OPQ20 逢機引子在整個種原核心收集中偵得遺傳歧異的能力是屬於較低的(歧異指數 0.666)，但它在第 3 子群卻可偵得相當高的遺傳歧異；而 OPK12 逢機引子雖在第 1、2、3、4 子群可偵得較高的遺傳歧異，但卻在第 5 子群中的歧異程度較低。

綜合上述研究結果發現，我們可以由表 5 評估瞭解各子群的遺傳歧異程度，以及不同逢機引子在各不同子群內偵測遺傳歧異能力的差異，而這些資訊對於日後進行種原挑選或逢機引子選擇等相關研究時將有所助益。

討 論

本研究之主要目的為藉由 RAPD 分子標記，期望就分子層次瞭解番椒屬種原核心收集的遺傳歧異結構，並探討應用分子標記輔助種原核心收集建立之可行性。

經由 RAPD 分析，可明顯的將番椒屬種原核心收集區分為 5 個子群，由圖 2 與表 4 發現就 *C. annuum* 而言，有 92% 的種原集中在第 1 子群，*C. frutescens* 的種原有 86% 集中在第 3 子群，*C. chinense* 的種原亦有 86% 集中在第 2 子群，*C. baccatum* 為 92% 的種原集中在第 4 子群，而 *C. chacoense* 則是全部的參試種原都集中在第 5 子群。此結果顯示番椒屬內各不同“種”別的種原，不但在分類性狀上可以區分，其分子

層次的遺傳歧異亦有著明顯的差異存在，此結果與作者先前論文(范等 2001)的結果一致，該試驗亦顯示利用分子層次之RAPD分子標誌所進行的集群分析結果，可與以植物性狀為基礎所分類之“種”吻合。該先前論文中的94個參試樣品僅為逢機選出，當時主要係以可涵括到8個種的種原為目的，其94個樣品間最大的遺傳距離為1.128；而本研究的264個樣品間的最大遺傳距離約1.25，顯示本研究的遺傳歧異度較先前論文為大，究其原因由於本研究參試樣品是經由特性調查資料先進行

表 2. 番椒屬種原核心收集 12 個調查性狀之變域與平均值

Table 2. The ranges and means of 12 ratio scale traits for *Capsicum* core collection

Species	Cotyledonous leaf length (mm)			Cotyledonous leaf width (mm)			Mature leaf length (cm)			Mature leaf width (cm)		
	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean
<i>C. annuum</i>	10.9	30.0	20.1	4.1	11.0	6.6	2.7	15.9	9.0	0.9	11.5	4.4
<i>C. baccatum</i>	12.2	24.2	17.2	5.0	9.5	6.6	4.3	13.3	9.7	2.1	9.4	6.2
<i>C. chinense</i>	11.2	31.3	19.0	4.0	8.3	5.5	3.9	15.2	9.2	2.0	8.3	5.1
<i>C. chacoense</i>	13.5	18.2	15.6	5.2	6.1	5.8	3.1	6.5	4.3	1.7	3.9	2.4
<i>C. frutescens</i>	7.7	21.3	15.2	4.2	7.2	5.6	5.1	16.6	10.8	2.7	8.3	5.5
<i>C. praetermissum</i>	23.0	23.0	23.0	7.7	7.7	7.7	8.0	8.0	8.0	4.3	4.3	4.3
Unclassified	9.8	24.6	18.5	4.2	7.1	6.2	6.2	15.4	9.4	3.2	6.8	4.6
Core	7.7	31.3	18.8	4.0	11.0	6.3	2.7	16.6	9.3	0.9	11.5	4.8

Table 2. Continued

Species	Corolla length (mm)			Number of locules			Days to flower			Fruit length (cm)		
	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean
<i>C. annuum</i>	6.1	18.9	12.3	2.0	4.8	2.7	48.0	284.0	90.2	0.9	20.7	6.7
<i>C. baccatum</i>	1.2	14.1	10.3	2.0	5.1	3.0	66.0	244.0	104.4	0.7	14.3	4.8
<i>C. chinense</i>	4.8	14.7	9.5	2.0	5.1	3.3	67.0	225.0	105.3	0.7	10.7	4.0
<i>C. chacoense</i>	5.2	6.3	6.0	2.0	2.1	2.0	94.0	101.0	98.8	0.8	1.0	0.9
<i>C. frutescens</i>	5.0	13.9	8.2	2.0	3.9	2.3	66.0	248.0	107.9	0.9	6.9	2.9
<i>C. praetermissum</i>	11.7	11.7	11.7	2.0	3.2	3.2	82.0	82.0	82.0	6.3	6.3	6.3
Unclassified	7.6	13.8	10.5	2.0	2.8	2.5	62.0	108.0	92.4	1.2	6.3	3.8
Core	1.2	18.9	11.0	2.0	5.1	2.7	48.0	284.0	96.3	0.7	20.7	5.4

Table 2. Continued

Species	Fruit width (cm)			Fruit weight (g)			Fruit wall thickness (mm)			Fruit pedicel length (cm)		
	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean
<i>C. annuum</i>	0.4	9.8	2.6	0.1	205.1	20.0	0.2	6.7	2.2	1.2	6.8	3.4
<i>C. baccatum</i>	0.4	7.0	2.3	0.1	67.3	9.9	0.6	3.4	2.0	1.7	6.5	3.7
<i>C. chinense</i>	0.5	5.1	1.9	0.2	45.4	6.2	0.5	5.0	1.7	1.7	4.6	2.8
<i>C. chacoense</i>	0.4	0.6	0.5	0.1	0.2	0.2	0.3	0.6	0.4	1.4	2.0	1.6
<i>C. frutescens</i>	0.4	2.8	1.1	0.2	11.5	1.8	0.2	4.5	1.1	2.0	5.0	3.2
<i>C. praetermissum</i>	6.3	6.3	6.3	80.7	80.7	80.7	5.2	5.2	5.2	3.2	3.2	3.2
Unclassified	0.7	3.1	1.7	0.4	12.5	4.4	0.3	3.1	1.7	2.0	4.9	3.3
Core	0.4	9.8	2.2	0.1	205.1	13.9	0.2	6.7	1.9	1.2	6.8	3.3

表 3. 番椒屬種原核心收集 264 個種原“種”別與來源地區之分佈

Table 3. The origin of the 264 accessions of *Capsicum* spp. core collection

Species	Area of origin (No.)								Total
	Africa	Asia	Australia	Central America	Europe	North America	South America	Unknown	
<i>C. annuum</i>	9	56	1	29	25	25	4	4	153
<i>C. frutescens</i>	3	3	0	24	0	6	6	1	43
<i>C. chinense</i>	0	1	0	2	4	7	14	0	28
<i>C. baccatum</i>	1	1	0	1	3	3	15	2	26
<i>C. chacoense</i>	0	0	0	0	2	1	1	0	4
<i>C. praetermissum</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Unclassified	0	2	0	5	2	0	0	0	9
Total	13	63	1	61	37	42	40	7	264
Percentage(%)	5	24	0	23	14	16	15	3	100

表 4. 各“種”別種原於不同子群下之種原數目及其分佈比例

Table 4. The number and percentage of germplasm in different cluster for each species of *Capsicum* core collection

Species	<i>Capsicum</i> cluster No.										Total
	I		II		III		IV		V		
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
<i>C. annuum</i>	141	92	11	7	0	0	1	1	0	0	153
<i>C. frutescens</i>	3	7	3	7	37	86	0	0	0	0	43
<i>C. chinense</i>	4	14	24	86	0	0	0	0	0	0	28
<i>C. baccatum</i>	2	8	0	0	0	0	24	92	0	0	26
<i>C. chacoense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	100	4
<i>C. praetermissum</i>	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	1
Unclassified	6	67	2	22	0	0	1	11	0	0	9
Total	156		40		37		27		4		264

集群分析後所再選出的種原核心收集，因此就樣品規模與遺傳歧異均較先前論文為大，也因此瞭解到應運用特性調查資料，輔以建立種原核心收集，擴大遺傳歧異保存之重要性。

該番椒屬種原核心收集原係利用性狀特性調查資料(表 2)經由統計分析後所挑選而成，經由本研究以 RAPD 分子標記探討分子層次之遺傳歧異發現，不同“種”別的種原之間的歧異程度是頗分歧的，因此認為倘日後需要由種原核心收集中的 264 份種原再挑選部份種原進行後續的育種或相關研究時，若是針對遺傳歧異進行種原之挑選時，應以儘量包括不同“種”別之番椒屬種原為考量。

就本研究之番椒屬種原核心收集(264 份種原)與整個番椒屬種原保存(6835 份種原)比較而言(表 1)，原種原保存中共計有 8 個“種”，而經挑選後所形成的種原核心收集中為 6 個“種”，已不包含 *C. pubescens*(辣椒)與 *C. eximium*(野生種)。由於該番椒屬種原核心收集係就園藝性狀特性調查資料為基礎所篩得的，但經由上述 RAPD 分子層次遺傳歧異之探討已發現不同種間的遺傳歧異頗為分歧，因此我們認為可進一步針對這兩個種的分子層次遺傳歧異進行探討，以瞭解是否有必要將其再加入現有的番椒屬種原核心收集中，以使該種原核心收集更具有遺傳歧異代表性。

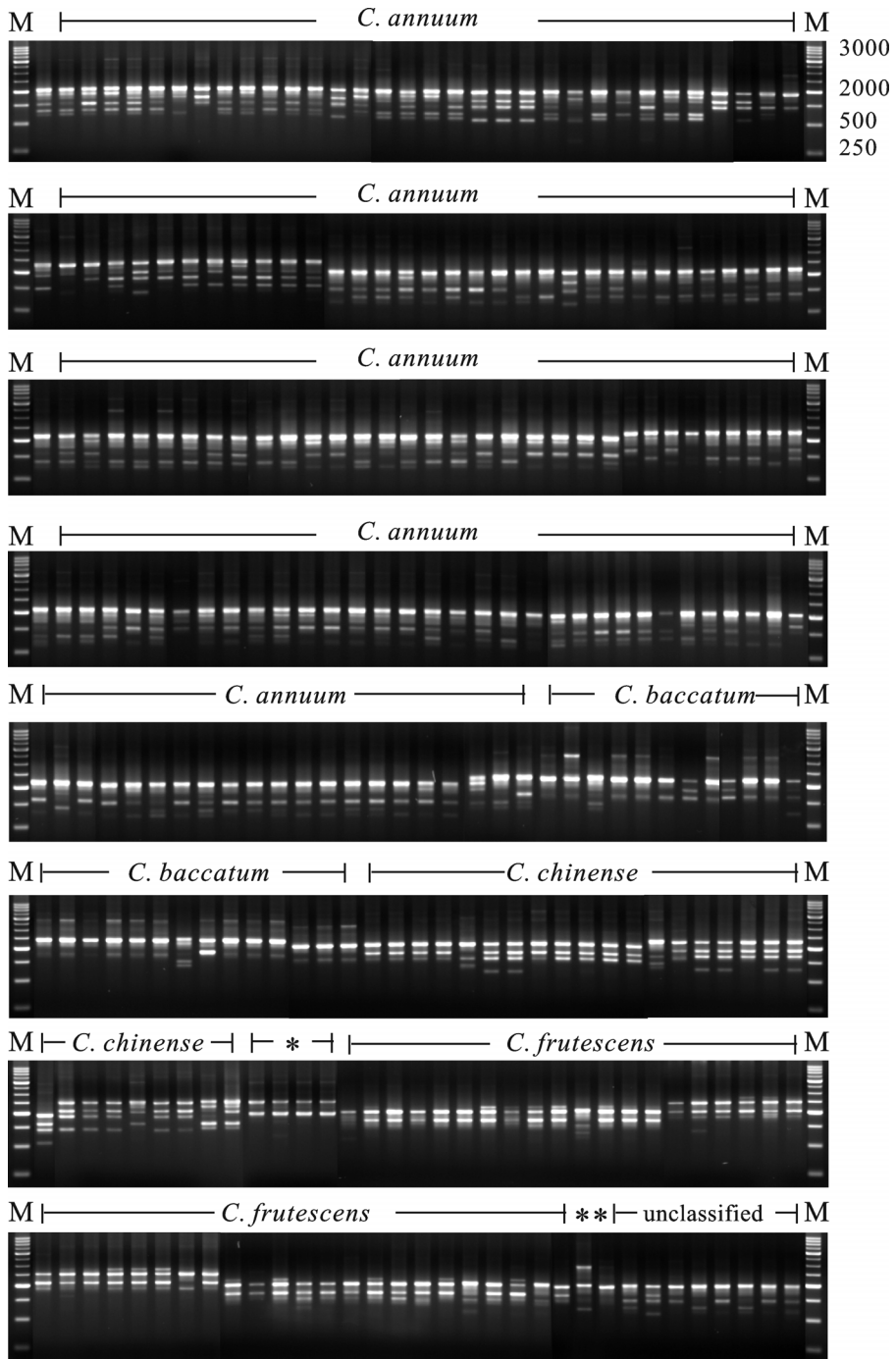


圖 1. 番椒屬種原核心收集 264 個樣品以 OPO10 引子進行 RAPD 分析之電泳圖譜。

Fig. 1. The electrophoretic profiles for 264 accessions of *Capsicum* core collection based on RAPD analysis with primer OPO10. (*:*C. chacoense*; **:*C. praetermissum*; M:marker (250bp ladder))

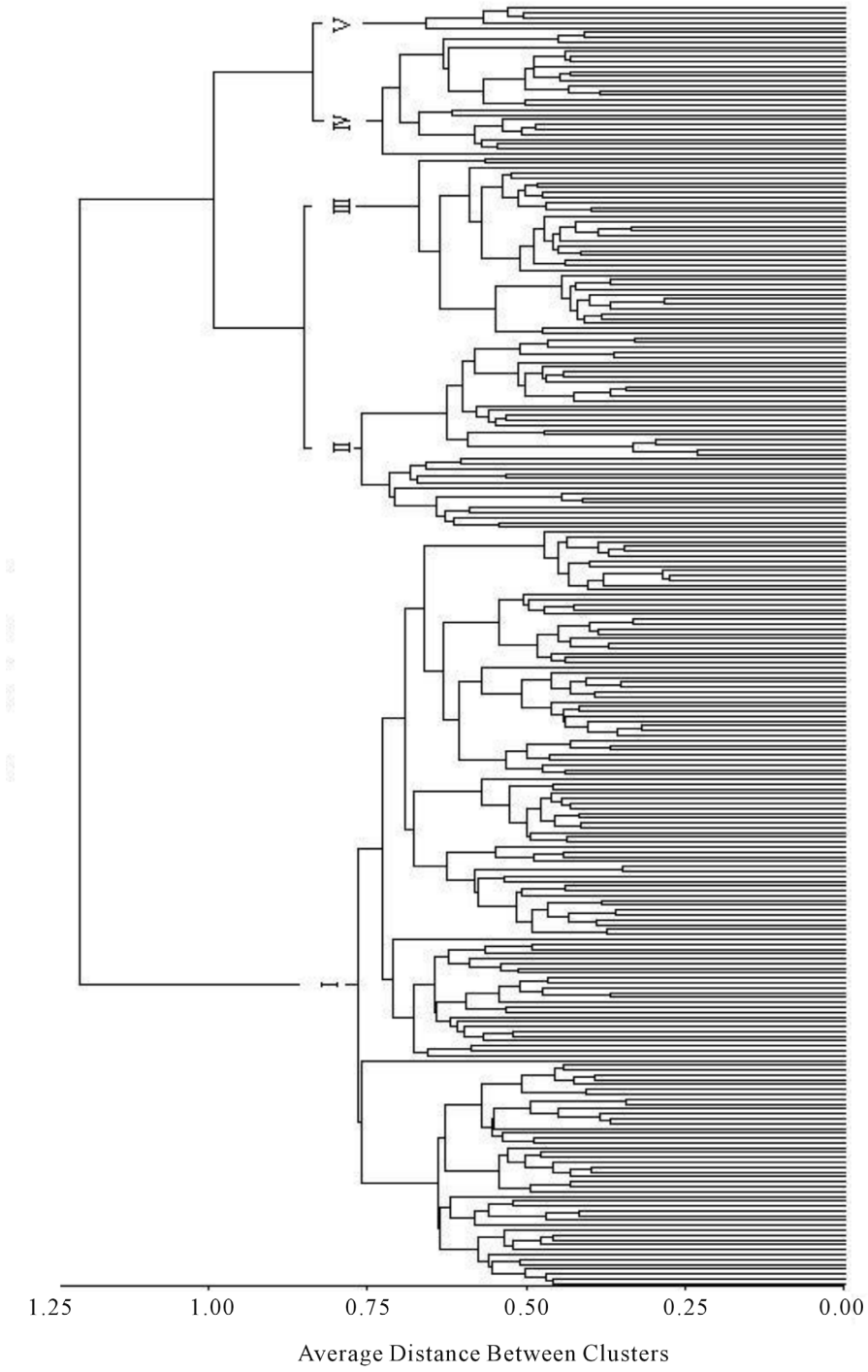


圖 2. 說明見下頁。

圖 2. 番椒屬種原核心收集以 RAPD 分子標記多型性為基礎進行集群分析之樹狀圖。

Fig. 2. Dendrogram of cluster analysis for *Capsicum* core collection based on RAPD data.

The germplasm included in cluster I from bottom to top are :

14380a, 39040a, 38370a, 02680a, 37450a, 38340a, 38970a, 37480a, 38690a, 38720a, 38820a, 38390a, 16980a, 49080a, 49090a, 2337A0a, 235400a, 24080a, 1502B0a, 07070a, 37630a, 55512a, 08010a, 08660a, 57210a, 12760a, 1892A0a, 57090a, 38490a, 393800a, 39470a, 26370a, 17270a, 26490a, 2782B0a, 08950a, 07950a, 12710a, 12830a, 12900a, 12950a, 13770a, 17170a, 17180a, 15750a, 17140a, 3289A0a, 57180a, 04080a, 0513B0a, 12270a, 08250a, 07750a, 07531b, 02221a, 48830f, 47050c, 16100f, 05381UN, 26460UN, 11690UN, 06330UN, 56811UN, 03390UN, 08310a, 09370a, 26610a, 41660b, 03081c, 09700c, 08730c, 02970a, 24120a, 20810a, 06160a, 08390a, 09610a, 20750a, 08420a, 09720a, 20730a, 14340a, 09190a, 08640a, 09260a, 07840a, 13110a, 12420a, 02690a, 06050a, 02940a, 50910a, 50950a, 18110a, 09180a, 2126B0a, 19900a, 19910a, 20080a, 21560a, 21530a, 21470a, 15860a, 18970a, 19940a, 14640a, 0823A0a, 08170a, 11370a, 50860a, 50620a, 50670a, 50720a, 1790A0a, 18030a, 1952B0a, 19530a, 19580a, 19270a, 19690a, 19050a, 56710a, 03301a, 18570a, 00141a, 11500a, 12260a, 05600f, 54591a, 00990a, 57200a, 03760a, 05690a, 04760a, 56700a, 56870a, 56890a, 57020a, 03120a, 57220a, 07990a, 04590a, 02651a, 03320a, 03380a, 03500a, 03770a, 03510a, 05000a, 05030a, 0511B0a, 0512B0a, 05150a, 0539A0a, 0512A0a, 05290a,

The germplasm included in cluster II from bottom to top are :

38650a, 02193a, 2354B0a, 15440a, 06390a, 18820a, 18840a, 18900a, 44260c, 00900a, 09690a, 14410a, 12550f, 06391UN, 26360UN, 13790c, 38730c, 38790c, 38900c, 09660f, 07760f, 46220c, 46130c, 02194c, 06600c, 47010c, 03041c, 0264A1c, 03030c, 03031c, 38510c, 4677B0c, 4679B0c, 46960c, 02640c, 03032c, 09430c, 26770c, 09170c, 09400c

The germplasm included in cluster III from bottom to top are :

06411f, 06421f, 24770f, 48030f, 08470f, 08740f, 4840B0f, 48410f, 48800f, 0055B0f, 0065A0f, 00660f, 48760f, 00840f, 06500f, 22590f, 07381f, 48440f, 26220f, 48470f, 48510f, 0777B0f, 17060f, 13820f, 48480f, 06430f, 0646B0f, 06550f, 37690f, 49540f, 08720f, 00980f, 03070f, 17310f, 013670f, 06431f, 16020f

The germplasm included in cluster IV from bottom to top are :

39460a, 40860b, 41900b, 41890b, 43180b, 4180B0b, 41870b, 49570b, 13290Pr, 00670UN, 41910b, 07730b, 42000b, 43610b, 43720b, 43810b, 00440b, 09410b, 16620b, 11720b, 11780b, 50610b, 43670b, 07740b, 03131b, 26670b, 07390b

The germplasm included in cluster V from bottom to top are :

0849B0o, 05721co, 05720co, 11740co

然而，雖然大部份同“種”的種原在分子層次遺傳歧異分析時有集中成群的趨勢，但仍有少部份的種原會散佈至其它子群中(表 4)，其中 *C. annuum* 的種原大部份集中在第 1 子群(92%)，少部份散佈至第 2 子群(7%)與第 4 子群(1%)；*C. frutescens* 多集中於第 3 子群，其餘散佈至第 1 子群(7%)與第 2 子群(7%)；*C. chinense* 多集中於第 2 子群(86%)，其餘皆在第 1 子群(14%)；而 *C. baccatum* 多集中於第 4 子群(92%)，其餘皆在第 1 子群(8%)。此結果顯示就同一“種”種原的分子層次遺傳歧異而言，已經有相當程度的歧異分化存在，以種原核心收集保存遺傳歧異的觀點來思考，我們認為這些散佈於其它子群的少部份種原是相當有意義的，倘若我們要針對同一“種”的種原，以寬廣的遺傳歧異範圍為目標來挑選種原進行育種等相關研究時，這些具有歧異分化的少數種原應納入考量。這些例外的種原，可能是由於分布在各不同地理來源，已因農業環境或人為選拔等因素的影響，產生了性狀表現上的分歧現象，但由於種原的收集來源與地理分佈的資料不全，因此暫無法以 RAPD 探討其歧異分化與地理分佈之相關性。

針對番椒屬種原核心收集 RAPD 分子層次遺傳歧異指數之估算結果(表 5) 發現，第 1 子群的遺傳歧異指數較小(0.783)，顯示在第 1 子群內各種原間的遺傳歧異程度較低，該子群內共有 156 份種原，

表 5. 番椒屬種原核心收集不同子群之 Shannon-Weaver 歧異指數

Table 5. Estimates of the Shannon-Weaver diversity index for each cluster of *Capsicum* core collection

Capsicum Cluster	Diversity index via primer analysis								
	OPE15	OPG16	OPK12	OPO10	OPQ16	OPQ18	OPQ20	OPR2	OPR8
I	0.856	0.793	0.810	0.571	0.774	0.690	0.467	0.658	0.619
II	0.761	0.754	0.815	0.531	0.720	0.762	0.757	0.759	0.655
III	0.708	0.659	0.709	0.423	0.591	0.615	0.840	0.623	0.734
IV	0.809	0.919	0.777	0.576	0.758	0.769	0.794	0.712	0.755
V	0.769	0.713	0.598	0.396	0.609	0.869	0.544	0.668	0.680
Whole Core	0.854	0.787	0.878	0.611	0.783	0.756	0.666	0.672	0.774

Table 5. Continued

Capsicum Cluster	Diversity index via primer analysis							
	OPR13	OPW16	OPX2	OPX8	OPX13	OPX17	UBC475	All primers ^z
I	0.822	0.650	0.603	0.680	0.719	0.574	0.702	0.783
II	0.778	0.686	0.782	0.658	0.781	0.756	0.791	0.863
III	0.741	0.652	0.650	0.598	0.763	0.721	0.626	0.830
IV	0.699	0.784	0.723	0.697	0.790	0.764	0.653	0.856
V	0.712	0.661	0.546	0.775	0.603	0.621	0.613	0.812
Whole Core	0.774	0.727	0.749	0.735	0.773	0.759	0.787	0.877

^z merge the total bands produced from 16 random primers to estimate the Shannon-Weaver diversity index.

其中 141 份屬 *C. annuum*，我們認為係由於 *C. annuum* 為長久以來栽培種的主要來源，可能因人為育種或環境馴化等緣故，導致雖然 *C. annuum* 的種原數目最多，但其實各種原之間卻具有相當高的遺傳相似性，相較於 *C. annuum* 而言，其它子群與其它種別內的各種原間則具有較高的遺傳歧異度。

在形成種原核心收集時，應以不包含重複 (no duplicate)，減少各種原間的相似性 (similarity)，並以可代表整個種原收集的遺傳梯度範圍 (genetic spectrum; gradient) 為原則 (Frankel 1984; Brown 1995)。由表 1 得知 *C. annuum* 在整個番椒屬種原保存中計有 4089 份種原，約占整個番椒屬種原的 60%，在核心收集中仍有約 58% 的 *C. annuum* 種原，且經上述 RAPD 分子層次遺傳歧異之探討已發現 *C. annuum* 種內各種原間的遺傳相似性較高，因此我們認為應可藉由 RAPD 分子標記的輔助，就分子層次的遺傳歧異，搭配外表特性調查資料，針對第 1 子群內的種原進行再篩減，以形成更具代表性的種原核心收集。因此由本研究可以知道針對番椒屬種原核心收集，藉由 RAPD 分子標記，不但可以瞭解番椒屬種原核心收集的遺傳歧異結構，並可藉由分子標記輔助種原核心收集之建立。

誌 謝

本研究感謝蔡曉郡、曾玲玫、李靜雯、董婉如、許庭榮、張幼姪、羅舜芳、王昭月等同仁於試驗、資料分析及材料資料收集上的協助，謹此特表謝忱。

引用文獻

- 范明仁、王昭月、羅舜芳、許庭榮、L. M. Engle。2001。應用多型性分子標誌進行番椒屬(*Capsicum*)種原種內與種間遺傳歧異度之分析。中華農業研究 50:29-42。
- 張連宗。1988。番椒品種改良。p.145-172。蔬菜品種改良研討會專集。農委會，農林廳及台東區農業改良場。
- Balfourier, F., G. Charmet, and C. Ravel. 1994. Conservation of allelic multiplicity and genotypic frequency by pooling wild populations of perennial ryegrass. *Heredity* 73:386-396.
- Basigalup, D. H., D. K. Barnes, and R. E. Stucker. 1995. Development of a core collection for perennial *Medicago* plant introductions. *Crop Sci.* 35:1163-1168.
- Bouton, J. H. 1996. Screening the alfalfa core collection for acid soil tolerance. *Crop Sci.* 36:198-200.
- Brown, A. H. D. 1995. The core collection at the crossroads. p.3-19. *in*: Core Collections of Plant Genetic Resources. (Hodgkin, T., A. H. D. Brown, T. J. L. van Hintum, and E. A. V. Morales, eds.) John Wiley and Sons press, Chichester, UK.
- Brummer, E. C., J. H. Bouton, and G. Kochert. 1995. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome* 38:362-367.
- Charmet, G., F. Balfourier, C. Ravel, and J. B. Denis. 1993. Genotype x environment interactions in a core collection of French perennial ryegrass populations. *Theor. Appl. Genet.* 86:731-736.
- Charmet, G., F. Balfourier, and P. Monestiez. 1994. Hierarchical clustering of perennial ryegrass populations with geographic contiguity constraint. *Theor. Appl. Genet.* 88:42-48.
- Chavarriaga-Aguirre, P., M. M. Maya, J. Tohme, M. C. Duque, C. Iglesias, M. W. Bonierbale, S. Kresovich, and G. Kochert. 1999. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. *Molecular Breeding* 5:263-273.
- Dahlberg, J. A., X. Zhang, G. E. Hart, and J. E. Mullet. 2002. Comparative assessment of variation among sorghum germplasm accessions using seed morphology and RAPD measurements. *Crop Sci.* 42:291-296.
- Diwan, N., G. R. Bauchan, and M. S. McIntosh. 1994. A core collection for the United States annual *Medicago* germplasm collection. *Crop Sci.* 34:279-285.
- Diwan, N., M. S. McIntosh, and G. R. Bauchan. 1995. Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. *Theor. Appl. Genet.* 90:755-761.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Frankel, O. H. 1984. Genetic perspective of germplasm conservation. p.161-170. *in*: Genetic Manipulation: Impact on Man and Society. (Arber, W.K., K. Limensee, W. J. Peacock, and P. Stalinger, eds.) Cambridge University Press, Cambridge.
- Hokanson, S. C., A. K. Szewc-McFadden, W. F. Lamboy, and J. R. McFerson. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. Core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97:671-683.
- Holbrook, C. C. and W. F. Anderson. 1995. Evaluation of a core collection to identify resistance to late leafspot in peanut. *Crop Sci.* 35:1700-1702.

- Holbrook, C. C., W. F. Anderson, and R. N. Pittman. 1993. Selection of a core collection from the U.S. germplasm collection of peanut. *Crop Sci.* 33:859-861.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sa. Not.* 44:223-270.
- Jung, H. G., C. C. Sheaffer, D. K. Barnes, and J. L. Halgerson. 1997. Forage quality variation in the U.S. alfalfa core collection. *Crop Sci.* 37:1361-1366.
- Kresovich, S., W. F. Lamboy, J. R. McFerson, and P. L. Forsline. 1995. Integrating different types of information to develop core collections, with particular reference to *Brassica oleracea* and *Malus x domestica*. p.147-154. *in: Core Collections of Plant Genetic Resources.* (Hodgkin, T., A. H. D. Brown, T. J. L. van Hintum, and E. A. V. Morales, eds.) John Wiley and Sons press, Chichester, UK.
- Lerceteau, E., T. Robert, V. Petiard, and D. Crouzillat. 1997. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:10-19.
- Oard, J. H. and S. Dronavalli. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random primer PCR. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:236-241.
- Perry, M. C. and M. S. McIntosh. 1991. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: I. Morphological traits. *Crop Sci.* 31:1350-1355.
- Ronning, C. M. and R. J. Schnell. 1994. Allozyme diversity in a germplasm collection of *Theobroma cacao* L. *J. Hered.* 85:291-295.
- Skroch, P. W., J. Nienhuis, S. Beebe, J. Tohme, and F. Pedraza. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. *Crop Sci.* 38:488-496.
- Spagnoletti Zeuli, P. L. and C. O. Qualset. 1993. Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resources collection of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87:295-304.
- Tohme, J., D. O. Gonzalez, S. Beebe, and M. C. Duque. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci.* 36:1375-1384.
- Tohme, J., P. Jones, S. Beebe, and M. Iwanaga. 1995. The combined use of agroecological and characterization data to establish the CIAT *Phaseolus vulgaris* core collection. p.95-107. *in: Core Collections of Plant Genetic Resources.* (Hodgkin, T., A. H. D. Brown, T. J. L. van Hintum, and E. A. V. Morales, eds.) John Wiley and Sons press, Chichester, UK.

The Study on Genetic Diversity of the Core Collection for *Capsicum* Using Random Amplified Polymorphic DNA¹

Ming-Jen Fan², Shu Chen^{2,4} and L. M. Engle³

Summary

Fan, M. J., S. Chen, and L. M. Engle. 2004. The study on genetic diversity of the core collection for *Capsicum* using random amplified polymorphic DNA. J. Agric. Res. China 53:165-178.

The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of *Capsicum* core collection by RAPD. The core collection which contains 264 accessions of *Capsicum* spp. was constructed with 12 ratio scale traits. The cluster analysis based on RAPD from 16 random primers showed the accessions of core collection could be divided into 5 clusters as the mini distance (MD) was greater than 0.83. Most (92%) of the *C. annuum* were assembled in cluster 1, 92% of the *C. baccatum* were in cluster 4, 86% of the *C. chinense* were in cluster 2, 86% of the *C. frutescens* were in cluster 3, and all of the *C. chacoense* were in cluster 5. Cluster analysis revealed there are obvious molecular diversity among species within *Capsicum*. Therefore, it is recommend that the *Capsicum* core collection should cover the germplasm from different species as many as possible. For the accessions from the same species, there are still some scattered to the other clusters. The result showed certain of molecular diversity existed within species. Aimed at the viewpoint to conserve broad genetic diversity, these distinct germplasm should be included in core collection. The Shannon-Weaver diversity index of the cluster which primarily composed of *C. annuum* was 0.783, which revealed there are higher similarity within this cluster. The accessions within the cluster could be reduced by way of RAPD analysis. This study showed the RAPD molecular markers not only provided insights into the genetic structure, but also assisted the construction of core collection for *Capsicum*.

Key words: *Capsicum*, Core collection, RAPD, Genetic diversity.

-
1. Contribution No.2201 from Agriculture Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: July 21, 2004.
 2. Respectively, Researcher and Director, and Assistant Researcher, Plant Germplasm Division, Agriculture Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Geneticist and Head, GSSU, Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Tainan, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: cshu@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23331673.