

## 利用 SSR 標誌進行番椒雜交種子純度之檢測

王昭月<sup>1,\*</sup> 林大鈞<sup>2</sup> 林鳳琪<sup>3</sup>

### 摘要

王昭月、林大鈞、林鳳琪。2016。利用 SSR 標誌進行番椒雜交種子純度之檢測。台灣農業研究 65(4):406–419。

種子純度檢定是一代雜交種子生產中品質管控的關鍵性工作之一。利用生育特性的檢測 (grow out test; GOT) 方式僅比較植物生長至成熟期的外觀差異，檢測耗時且受制於環境；故亟需建立一個快速、可靠的 DNA 檢測模式。本研究目的擬開發具有專一性與共顯性的簡單序列重複 (simple sequence repeat; SSR) 標誌，應用於番椒雜交種親本與雜交種子純度之檢測。利用 2 個番椒雜交種及親本，篩選 374 組 SSR 引子對，結果獲得 12 個高訊息的 SSR 標誌；又取得其中 5 個關鍵性 SSR 標誌，進行 3 個番椒雜交種 (No. 5、No. 6、No. 7) 的種子純度之檢定，經各取 120 個樣品之檢測結果顯示，3 批次的雜交種子純度分別為 99.2%、98.3% 和 95.8%。利用 SSR-PCR (polymerase chain reaction) 分析可篩選出自交種子之污染株，也與 GOT 檢測結果吻合。試驗顯示，SSR 標誌可作為快速、有效之檢測工具，有效地應用於番椒商業雜交種子純度的檢定。

**關鍵詞：**番椒、簡單序列重複、雜交種子純度。

### 前言

國際間對於商業生產作為經濟栽培用的種子品質規範，多參照「國際種子檢查協會」(International Seed Testing Association; ISTA) 所訂定的種子發芽活力檢定與純度鑑定等相關標準。針對高價的一代雜交種子 ( $F_1$  種子)，除已具備的高生長勢、成熟期一致、優質、豐產以及抗病蟲等諸多優良特性外，對於品種純度的要求更嚴峻，檢測技術更需要快速、準確。一般業者較常採用傳統 grow-out test (GOT) 方式，進行品種純度檢定，依據其外觀性狀之差異，鑑別異型株 (off-type)，以取得純質的  $F_1$  種子。GOT 檢測方式需要較大的栽培空間和人力，檢定時程較長，成本花費也相對較高；易受季節或氣候環境限制，導致判讀困難或準確性不穩定。近 30 年間，全球的分生生物分析技術進步神速，已開發多種分子標誌包

含蛋白質分子標誌與核酸層次的 DNA 分子標誌等，在農業上已應用此類分子標誌 (markers) 作為品種鑑定 (Gong & Geng 2010)、種原遺傳歧異度分析 (Mujaju *et al.* 2010)、遺傳純度分析 (Ballester & Carmen 1998; Crockett *et al.* 2000; Liu *et al.* 2007)；或建構連鎖圖譜輔助選種 (Hashizume *et al.* 1996; McCouch *et al.* 2002; Hashizume *et al.* 2003) 等。利用 DNA 分子標誌的遺傳分析具備以下特質 (1) 直接以核酸作為分析樣品，在各個組織、各個發育時期均可檢測，不受季節、環境之限制。(2) 分子標誌種類多，可同時提供多個標誌進行鑑定或比對 (Jang *et al.* 2004; Mujaju *et al.* 2010)。(3) 高訊息的分子標誌，可延伸作為種間、種內多種作物的指紋分析之應用 (Wöhrmann & Weising 2011)。(4) 透過共顯性分子標誌 (co-dominance marker)，可鑑別

投稿日期：2015 年 12 月 17 日；接受日期：2016 年 3 月 1 日。

\* 通訊作者：jywang@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

出同質基因型或異質基因型，特別適合雜交種之鑑定；如簡單重複序列 (simple sequence repeat; SSR) 標誌，因其廣泛分布於生物基因組 (Condit & Hubbell 1991; Wang *et al.* 1994; Kumpatla & Mukhopadhyay 2005)，僅需微量 DNA 樣品，且分析方法簡便，目前已應用於茄子 (Arun Kumar *et al.* 2014)、花椰菜 (Ida *et al.* 2008) 以及水稻 (Komori & Nitta 2004) 等作物的雜交種之遺傳純度鑑定。

番椒 (*Capsicum*) 為茄科一或多年生果菜、香辛作物，栽培面積僅次於馬鈴薯和番茄。依據 2010 年聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) 生產年報統計，全世界番椒栽培面積為 185 萬公頃，亞洲地區約占總生產面積 60% 以上。依 2011 年台灣農業年報統計，國內栽培面積 2,087 ha，為重要經濟蔬菜，其中彩色甜椒 (*Capsicum annuum*) 富含花青素與胡蘿蔔素等，是高營養、高產值的蔬菜新寵。目前彩椒商業品種幾乎全為一代雜交種，並以亞洲地區為重要採種據點。番椒為高價採種作物，其  $F_1$  種子售價偏高 (約新台幣 10 元/粒)。商業生產雜交種子常利用雄不稔親本或以人工去雄後進行雜交授粉；鑑於雄不稔基因的不穩定或人工去雄未盡完善，時而導致採種純度下降；故需進行雜交種子遺傳純度檢定，避免母本自交種子污染，已成為  $F_1$  種子生產上必要之品管工作。本研究針對亞洲地區重要採種作物—番椒一代雜交種之純度檢測，擬建立精確、簡便的 DNA 鑑定平台，篩選共顯性的 SSR 分子標誌，提供種苗業界進行親本暨  $F_1$  品種純度之快速檢測。建立之核心 SSR 分子標誌或 DNA 檢定流程，期透過產學合作將相關技術轉移至種苗業者，以提升台灣採種產業在國際市場之競爭力。

## 材料與方法

### 植物材料與 DNA 萃取

由中興大學園藝系提供與亞蔬合作選育的彩色甜椒 (*Capsicum annuum*)  $F_1$  品種「興亞 3 號」(‘CA3’) 標準品 1 個，包含父本 (♂)

1 個、母本 (♀) 3 個重複性樣品；另由一個商業採種公司提供  $F_1$  品種 ‘360’ 之標準品 1 個，以及父本、母本各 1 個樣品。以上 2 個雜交組合，計 8 個樣品之葉片，參考 Iqbal *et al.* (1995) 方法進行 genomic DNA 萃取，提取之 DNA 經 NANODROP 1000 (Thermo Scientific) 定量，以  $OD_{260}/OD_{280}$  值 1.7–1.9 作為 PCR (polymerase chain reaction) 分析用樣品；DNA 濃度稀釋為  $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ，提供多型性 SSR marker 之篩選。

另由出口採種業者提供 3 個待檢測  $F_1$  種子純度的雜交組合 No. 5、No. 6、No. 7 一批，包含父本 (5P、6P、7P)、母本 (5M、6M、7M) 等，各品系約 150 粒種子，進行高訊息 SSR 分子標誌 (informative SSR markers) 之量化測試。3 組待測試的雜交組合種子依組合分批次播種，於幼苗期採嫩葉進行 genomic DNA 萃取，萃取方法同於 Iqbal *et al.* (1995) 之 DNA 萃取流程。

### SSR 分子標誌分析

進行番椒雜交種 SSR-PCR 分析的 374 組 SSR 引子序列資料，參考自前人文獻 (Lee *et al.* 2004; Minamiyama *et al.* 2006; Yi *et al.* 2006; Minamiyama *et al.* 2007; Portis *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009; Ince *et al.* 2010)，部分訊息則由世界蔬菜中心 AVRDC 的分子遺傳系 Dr. Roland 提供 (引子編號為 AVRDC-PP1–PP101)。以上引子由日本 Invitrogen 公司合成。PCR 分析之反應液體積為  $25 \mu\text{L}$ ：包含 DNA 50 ng、1U *Taq* polymerase (HOT FIRE, Solis BioDyne)、 $1 \times$  PCR buffer、2.0 mM  $\text{MgCl}_2$ 、200  $\mu\text{M}$  dNTP 及引子 0.4  $\mu\text{M}$ ，反應引子為上述 374 組 SSR 引子，進行多型性 SSR 標誌之篩選。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9700，反應溫度設定為：95°C 12 min；接續 95°C 1 min，55°C 1 min，72°C 1 min 30 s，35 個循環；最後 72°C 8 min；反應完成後保持於 4°C。PCR 產物取 10  $\mu\text{L}$  加入  $6 \times$  電泳追蹤染劑 ( $6 \times$  loading buffer: 0.25% bromophenol blue, xylene cyanol; 40% w/v sucrose)，以 6% 聚丙烯酰胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)，電泳緩衝液為  $0.5 \times$  TBE buffer (40

mM Tris acetate, pH 8.0; 1 mM EDTA)；電泳槽為 MGV-202-33C (C. B. S. Scientific)，電壓設定 100 V，電泳時間約 100 min。完成電泳之膠體以  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  ethidium bromide 染色；再於 UV 下檢視膠體上多型性之等位基因 (alleles) 片段，並照相、貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation) 系統。反應產物以 Gen 50 DNA ladder (GeneMark Technology Co., Taiwan) 計算各等位基因片段大小。

### 高訊息 SSR 標誌 (informative SSR markers) 與 $F_1$ 種子純度之鑑定

依據 2 個雜交種組合 ('360'、'CA3') 篩選 374 組 SSR 引子的 PCR 分析結果，搜尋在父、母本與  $F_1$  間具有共顯性 (co-dominant) 的多型性分子標誌，取易於判讀者，建立 10 個以上的高訊息 SSR 標誌，作為量化純度檢定之核心標誌。以出口採種業界提供的 3 批次商業雜交種 (No. 5、No. 6、No. 7) 及相關親本，進行核心 SSR 標誌之測試；再依據 3 個雜交種 SSR-PCR 的分析結果，分別取得 2–3 個關鍵性標誌 (key markers)。3 個商業雜交種 (No. 5、No. 6、No. 7) 各檢測 150 個樣品，依 SSR profile 取得各雜交組合之異型 (off-type) 株號，並計算各批次  $F_1$  種子的遺傳純度百分率。經 SSR-PCR 檢定獲得之異型株，連同親本株 (父本、母本)、標準  $F_1$  等各 1–2 株，繼續種植於溫室至結果期，期間進行園藝性狀記錄拍照，以及果實外觀等 GOT 調查，用以對照 SSR 分子標誌分析之結果。

## 結果

### 篩選多型性 SSR 基因座 (SSR loci) 用於番椒雜交種之鑑定

利用 2 個番椒 (*Capsicum annuum*) 雜交種組合 ('360'、'CA3')，進行 374 組 SSR 引子的 SSR-PCR 分析，搜尋在父、母本與  $F_1$  間具有共顯性 (co-dominant) 的多型性 SSR 分子標誌，初步建立 12 個高訊息且容易判讀之核心 SSR 標誌，核心標誌的 PCR 產物範圍為

84–401 bp (圖 1、表 1)。歸納此 12 個 SSR 基因座之重複基序 (repeat motif) 顯示，其中 8 個基因座為三核甘酸重複序列 (tri-nucleotide repeats motif) 型，另 3 個基因座屬於二核甘酸重複 (di-nucleotide repeats motif) 型，1 個為四核甘酸重複 (tetra-nucleotide repeats motif) 型 (表 1)。

### 篩選關鍵性 SSR 標誌利用於番椒雜交種之遺傳純度鑑定

利用 12 對核心 SSR 引子組進行 3 個商業雜交種之純度測試結果，獲得其中 3 個 SSR 基因座 (AVRDC-PP83、EPMS-747、BM59622) 可用於 No. 5 雜交種之鑑定 (表 2)；2 個 SSR 基因座 (AVRDC-PP83、CAMS-340) 可用於 No. 6 雜交種之鑑定 (表 3)；2 個 SSR 基因座 (CAMS-340、EPMS-712) 適用於 No. 7 雜交種之鑑定 (表 4)。綜合 3 個番椒商業雜交種 SSR-PCR 分析結果，共計取得 5 個關鍵性 SSR 基因座，分別為 AVRDC-PP83、EPMS-747、BM59622、AVRDC-PP83、CAMS-340 與 EPMS-712。

利用 SSR 分子標誌進行 No. 5 雜交種子純度之檢測：以 AVRDC-PP83 基因座進行 No. 5 雜交種子純度檢測結果，獲得 2 個等位基因 (alleles) 產物合計 4 個 SSR 片段 (191、203、248 及 257 bp)，其中 AVRDC-PP83<sub>(191 bp)</sub> 為 No. 5 雜交種父本的專一性等位基因片段，AVRDC-PP83<sub>(203 bp)</sub> 為 No. 5 雜交種母本的專一性等位基因片段，而 No. 5 雜交種則具有 AVRDC-PP83<sub>(191, 203, 248, 257 bp)</sub> 4 個片段 (圖 2、表 2)。依 AVRDC-PP83 基因座之純度檢測結果，120 個 No. 5 雜交種的發芽苗株中，編號 64 的苗株與母本的 SSR profile 相同，可能為母本自交污染，編號 103 的苗株無 SSR-PCR 產物，經計算雜交種子純度為 98.3% (圖 2、表 2)。

以 SSR X, Y (EPMS-747 基因座) 進行 No. 5 雜交種子純度檢測結果，獲得 2 個等位基因產物合計 4 個 SSR 片段 (270、286、326 及 351 bp)，其中 EPMS-747<sub>(270 bp)</sub> 為 No. 5 雜交種母本的專一性等位基因片段，EPMS-747<sub>(286 bp)</sub> 為父本的專一性等位基因片段，而 No. 5 雜交

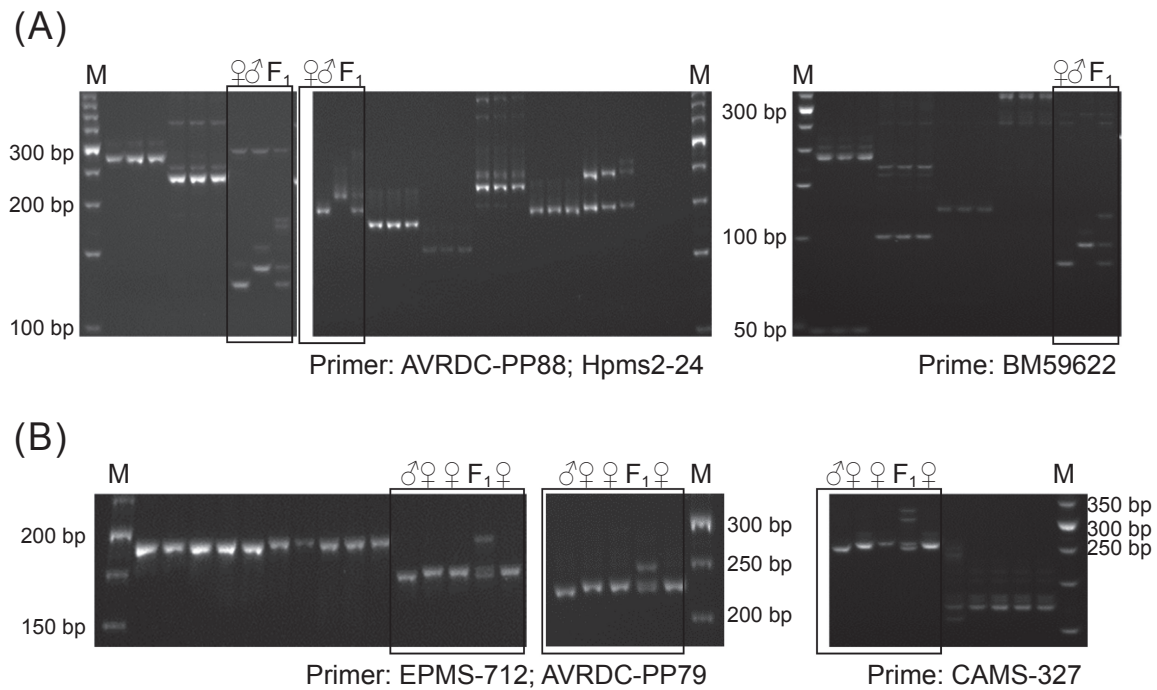


圖 1. 以番椒 F<sub>1</sub> 品種 ‘360’ 與 ‘CA3’ 連同親本 (♀、♂) 篩檢適用於雜交種子純度檢定的共顯性 SSR 標誌。

Fig. 1. Representative co-dominant SSR markers selected from pepper hybrid lines of ‘360’ and ‘CA3’. The SSR markers that produce distinguishable PCR products in parental lines and their F<sub>1</sub> hybrid are marked with black boxes. Co-dominant SSR markers, AVRDC-PP88, Hpms2-24, and BM59622 selected from hybrid ‘360’ (A) and co-dominant SSR markers, EPMS-712, AVRDC-PP79, and CAMS-327 selected from hybrid ‘CA3’ (B) are shown. M: 50 bp DNA Ladder from GeneMark.

表 1. 自 374 個候選 SSR 基因座篩選出 12 個高訊息 SSR 標誌及其 PCR 產物特性。

Table 1. Characteristics of the 12 selected informative SSR markers and their PCR products.

| Locus (accession no.) | Repeat motif   | Expected size (bp) | Product size (bp) |
|-----------------------|--|--------------------|-------------------|
| CAMS-327              | (TC) <sub>7</sub>                                    | 243                | 255–325           |
| CAMS-340              | (TA) <sub>3</sub> ...(AG) <sub>13</sub>              | 250                | 264–300           |
| CAMS-885              | (GAA) <sub>28</sub>                                  | 248                | 230–372           |
| AVRDC-PP79            | (ATT) <sub>8</sub>                                   | 218                | 227–251           |
| AVRDC-PP83            | (GAC) <sub>7</sub>                                   | 191                | 191–257           |
| AVRDC-PP88            | (CAA) <sub>8</sub>                                   | 114                | 126–186           |
| EPMS-709              | (GAG) <sub>6</sub>                                   | 272                | 260–401           |
| EPMS-712              | (GCA) <sub>6</sub>                                   | 148                | 151–175           |
| EPMS-747              | (TTCT) <sub>5</sub>                                  | 274                | 270–351           |
| Hpms2-24              | (CT) <sub>17</sub> (CA) <sub>5</sub> A <sub>21</sub> | 205                | 195–213           |
| BM59622               | (CTT) <sub>3</sub> (CAT) <sub>9</sub>                | 90                 | 84–120            |
| AGi056                | (AGA) <sub>9</sub>                                   | 240                | 234–347           |

種則具有 EPMS-747<sub>(270, 286, 326, 351 bp)</sub> 4 個片段 (圖 2、表 2)。120 個 No. 5 雜交種的發芽苗株經

EPMS-747 基因座檢測結果，編號 25 苗株的 SSR-PCR 產物不清晰，編號 64 的苗株與母本

表 2. 利用 3 個關鍵性 SSR 標誌鑑定 120 個 No. 5 雜交種之遺傳純度。

**Table 2.** Summary of genetic purity testing of 120 individuals from hybrid No. 5 by three identifiable SSR markers.

| SSR primer | Female parent specific band (bp) | Male parent specific band (bp) | F <sub>1</sub> profile (bp) | Putative false hybrid (plant no.) | Putative hybrid | Purity (%) |
|------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------|
| AVRDC-PP83 | 203                              | 191                            | 191, 203, 248, 257          | 64                                | 119             | 99.2       |
| EPMS-747   | 270                              | 286                            | 270, 286, 326, 351          | 64                                | 119             | 99.2       |
| BM59622    | 84                               | 96                             | 84, 96, 120                 | 64                                | 119             | 99.2       |

表 3. 利用 2 個關鍵性 SSR 標誌鑑定 120 個 No. 6 雜交種之遺傳純度。

**Table 3.** Summary of genetic purity testing of 120 individuals from hybrid No. 6 by two identifiable SSR markers.

| SSR primer | Female parent specific band (bp) | Male parent specific band (bp) | F <sub>1</sub> profile (bp) | Putative false hybrid (plant no.) | Putative hybrid | Purity (%) |
|------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------|
| AVRDC-PP83 | 191                              | 202                            | 191, 203, 248, 257          | 81, 85                            | 118             | 98.3       |
| CAMS-340   | 300                              | 264                            | 264, 300                    | 81, 85                            | 118             | 98.3       |

表 4. 利用 2 個關鍵性 SSR 標誌鑑定 120 個 No. 7 雜交種之遺傳純度。

**Table 4.** Summary of genetic purity testing of 120 individuals from hybrid No. 7 by two identifiable SSR markers.

| SSR primer | Female parent specific band (bp) | Male parent specific band (bp) | F <sub>1</sub> profile (bp) | Putative false hybrid (plant no.) | Putative hybrid | Purity (%) |
|------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------|
| CAMS-340   | 264                              | 276                            | 264, 276, 290               | 49, 68, 77, 81, 96, 119           | 114             | 95.0       |
| EPMS-712   | 157                              | 151                            | 151, 157, 166, 175          | 49, 68, 81, 96, 119               | 114             | 95.0       |

的 SSR profile 相同，可能為母本自交污染，經計算其雜交種子純度為 98.3% (圖 3、表 2)。

以 BM59622 基因座進行 No. 5 雜交種子純度檢測結果，獲得 2 個等位基因產物合計 3 個 SSR 片段 (84、96 及 120 bp)，其中 BM59622<sub>(84 bp)</sub> 為 No. 5 雜交種母本的專一等位基因片段，BM59622<sub>(96 bp)</sub> 為父本的專一等位基因片段，而 No. 5 雜交種則具有 BM59622<sub>(84, 96, 120 bp)</sub> 3 個片段 (圖 4、表 2)。120 個 No. 5 雜交種的發芽苗株經檢測結果，編號 64 的苗株與母本的 SSR profile 相同，可能為母本自交污染 (圖 4)。依 BM59622 基因座 PCR 分析產物，經計算其雜交種子純度為 99.2% (圖 4、表 2)。故綜合 AVRDC-PP83、EPMS-747、BM59622 基因座之 SSR-PCR 分析結果，No. 5 雜交種子之遺傳純度為 99.2% (表 3)。另依據果實等園藝性狀之 GOT 鑑定結果，亦發現編號 64 的異型株確實與正常的 F<sub>1</sub> 植株 (編號 53) 性狀相異，但較近似於母本 (圖 5)。

利用 SSR 分子標誌進行 No. 6 雜交種子純度之檢測：以 AVRDC-PP83 基因座進行 No. 6 雜交種子純度檢測結果，獲得 2 個等位基因產物合計 4 個 SSR 片段 (191、203、248 及 257 bp)，其中 AVRDC-PP83<sub>(191 bp)</sub> 為 No. 6 雜交種母本的專一等位基因片段，AVRDC-PP83<sub>(203 bp)</sub> 為父本的專一等位基因片段，而 No. 6 雜交種具有 AVRDC-PP83<sub>(191, 203, 248, 257 bp)</sub> 4 個片段 (圖 6、表 3)。依據 AVRDC-PP83 基因座檢測結果，120 個 No. 6 雜交種的發芽苗中，編號 81 和編號 85 的苗株與母本的 SSR profile 相同，可能為母本自交污染，經計算其雜交種子純度為 98.3% (圖 6、表 3)。

以 CAMS-340 基因座進行 No. 6 雜交種子純度檢測結果，產物為 2 個等位基因合計 3 個 SSR 片段 (264、300 bp)，其中 CAMS-340<sub>(264 bp)</sub> 為 No. 6 雜交種母本的專一等位基因片段，CAMS-340<sub>(300 bp)</sub> 為父本的專一等位基因片段，而 No. 6 雜交種為 CAMS-340<sub>(264, 300 bp)</sub> 3 個片段 (圖 7、表 3)。120 個 No. 6 雜

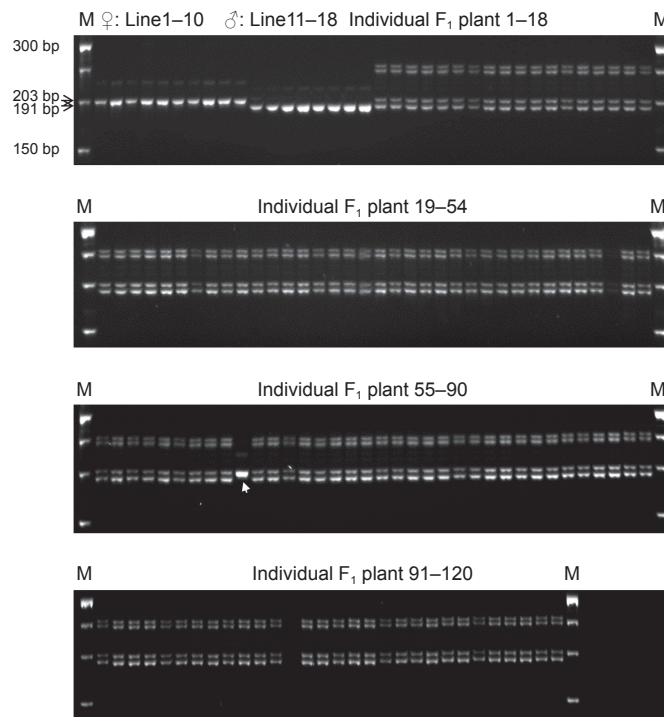


圖 2. 以 SSR 標誌 (AVRDC-PP83) 進行番椒 No. 5 的雜交種子純度之檢測。

**Fig. 2.** PCR results of 120 hybrid seeds of No. 5 and their parental lines (♀ and ♂) using AVRDC-PP83 SSR marker. F<sub>1</sub> individual #64 (indicated by arrow) shows the same product pattern as that of female parent represents a progeny produced from selfing. M: 50 bp DNA Ladder from GeneMark.

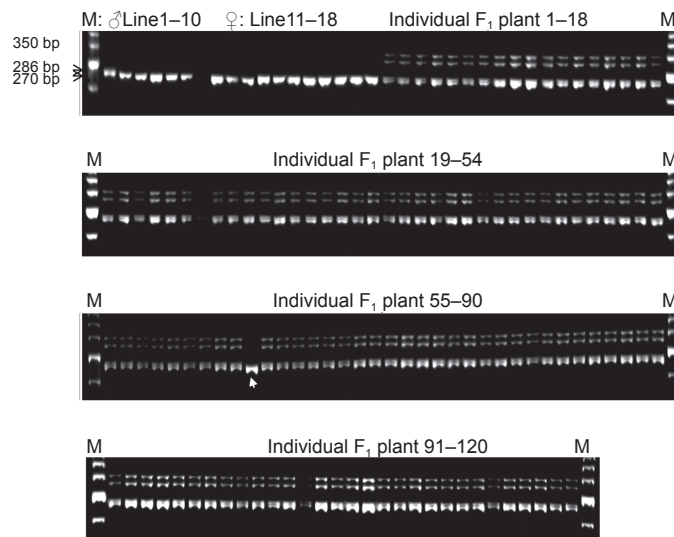


圖 3. 以 SSR 標誌 (EPMS-747) 進行番椒 No. 5 的雜交種子純度之檢測。

**Fig. 3.** PCR results of 120 hybrid seeds of No. 5 and their parental lines (♀ and ♂) using EPMS-747 SSR marker. F<sub>1</sub> individual #64 (indicated by arrow) shows the same product pattern as that of female parent represents a progeny produced from selfing. M: 50 bp DNA Ladder from GeneMark.

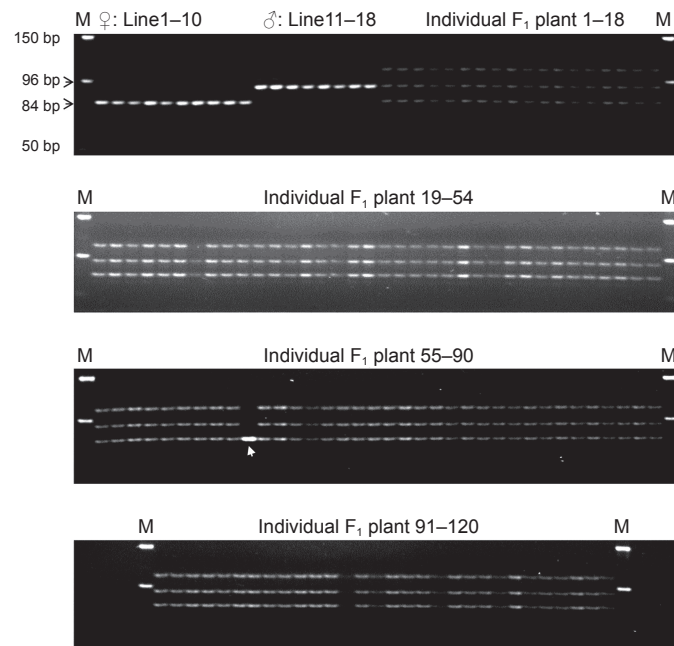


圖 4. 以 SSR 標誌 (BM59622) 進行番椒 No. 5 的雜交種子純度之檢測。

**Fig. 4.** PCR results of 120 hybrid seeds of No. 5 and their parental lines (♀ and ♂) using BM59622 SSR marker. F<sub>1</sub> individual #64 (indicated by arrow) shows the same product pattern as that of female parent represents a progeny produced from selfing. M: 50 bp DNA Ladder from GeneMark.

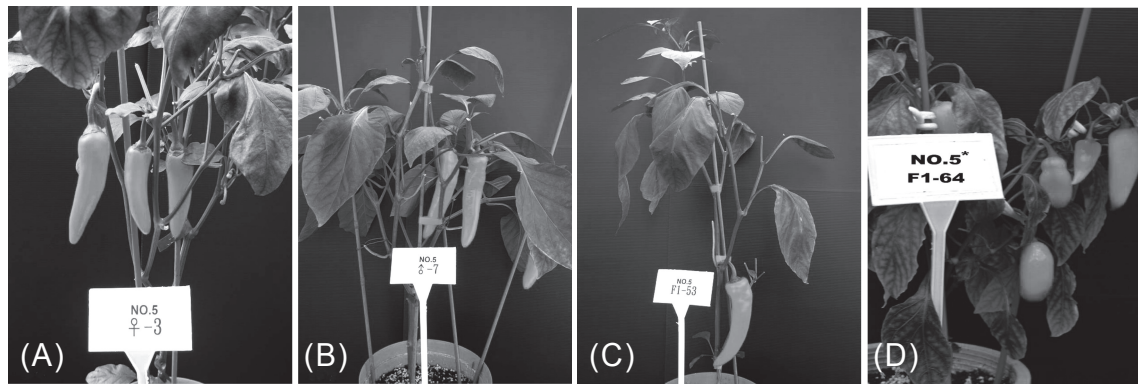


圖 5. 番椒雜交種 No. 5 與其親本的外觀性狀 (A) No. 5 的母株；(B) No. 5 的父株；(C) 正確的 No. 5 之 F<sub>1</sub> 株；(D) 異型的 No. 5 F<sub>1</sub> 株 (off-type F<sub>1</sub>)。

**Fig. 5.** Morphological comparisons of matured pepper from typical F<sub>1</sub> (C), off-type F<sub>1</sub> (D) hybrids of No. 5 and parental plants (A: female parent; B: male parent).

交種的發芽苗株經 CAMS-340 基因座檢測結果，編號 81 和編號 85 的苗株與母本的 SSR profile 相同，可能為母本自交污染，經計算其雜交種子之遺傳純度為 98.3% (圖 7、表 3)。故綜合 AVRDC-PP83、CAMS-340 基因座之

SSR-PCR 分析結果，No. 6 雜交種子之遺傳純度為 98.3% (表 4)。另依據果實等園藝性狀之 GOT 鑑定結果，亦發現編號 81 和編號 85 的異型株確實與正常的 F<sub>1</sub> 植株 (編號 24) 性狀相異 (圖 8)。

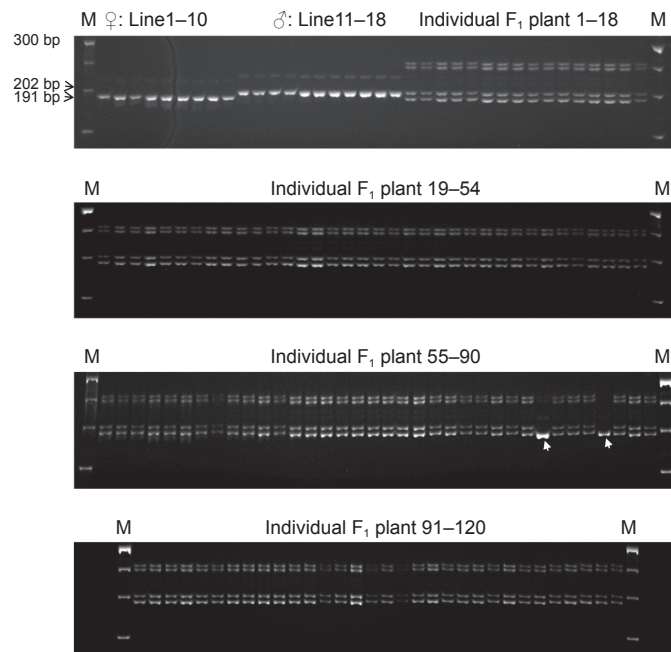


圖 6. 以 SSR 標誌 (AVRDC-PP83) 進行番椒 No. 6 的雜交種子純度之檢測。

**Fig. 6.** Assessment of seed purity in hybrid No. 6 and respective parental lines (♀ and ♂) using the SSR marker of AVRDC-PP83. M: 50 bp DNA Ladder from GeneMark; F<sub>1</sub> plant numbers of 81 and 85 (arrow) represent selfed plants.

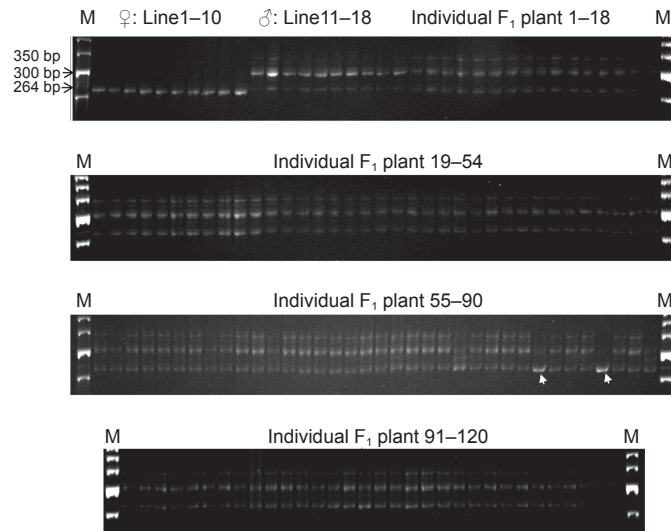


圖 7. 以 SSR 標誌 (CAMS-340) 進行番椒 No. 6 的雜交種子純度之檢測。

**Fig. 7.** Assessment of seed purity in hybrid No. 6 and respective parental lines (♀ and ♂) using the SSR marker of CAMS-340. M: 50 bp DNA Ladder from GeneMark; F<sub>1</sub> plant number 81 and 85 (arrow) represents selfed plants.

利用 SSR 分子標誌進行 No. 7 雜交種子純度之檢測：以 CAMS-340 基因座進行 No. 7 雜交種子純度檢測結果，獲得 2 個等位基因產物合計 3 個 SSR 片段 (264、276 及 290 bp)，其

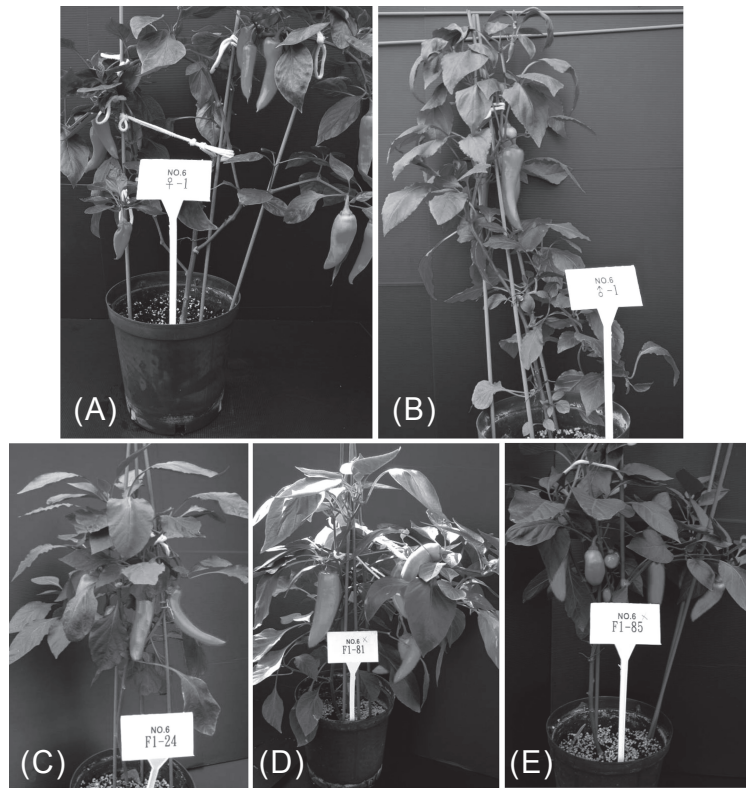


圖 8. 番椒雜交種 No. 6 與其親本的外觀性狀 (A) No. 6 的母株；(B) No. 6 的父株；(C) 正確的 No. 6 之  $F_1$  株；(D)、(E) 異型的 No. 6  $F_1$  株 (off-type  $F_1$ )。

**Fig. 8.** Morphological comparisons of matured pepper from typical  $F_1$  (C), off-type  $F_1$  (D and E) hybrids of No. 6 and parental plants (A: female parent; B: male parent).

中 CAMS-340<sub>(264 bp)</sub> 為 No. 7 雜交種母本的專一性等位基因片段，CAMS-340<sub>(290 bp)</sub> 為父本的專一性等位基因片段，而 No. 7 雜交種則為 CAMS-340<sub>(264, 276, 290 bp)</sub> 3 個片段 (圖 9、表 4)。120 個 No. 7 雜交種的發芽苗株經 CAMS-340 基因座檢測結果，編號 77 苗株的 SSR-PCR 產物未能清晰判讀，而編號 49、68、81、96、119 等 5 個苗株均與母本的 SSR profile 相同，可能為母本自交汙染；依據 CAMS-340 基因座的 PCR 分析產物結果，計算其雜交種子純度為 95.0% (圖 9、表 4)。

以 EPMS-712 基因座進行 No. 7 雜交種子純度檢測結果，產物為 2 個等位基因合計 4 個 SSR 片段 (151、157、166 及 175 bp)，其中 EPMS-712<sub>(151 bp)</sub> 為 No. 7 雜交種父本的專一性等位基因片段，EPMS-712<sub>(157 bp)</sub> 為母本的專一

性等位基因片段，而 No. 7 雜交種則為 EPMS-712<sub>(151, 157, 166, 175 bp)</sub> 4 個片段 (圖 10、表 4)。120 個 No. 7 雜交種的發芽苗株經 EPMS-712 基因座檢測結果，編號 77 的苗株無 SSR-PCR 產物 (圖 10)；編號 49、68、81、96、119 等 5 個苗株均與母本的 SSR profile 相同，可能為母本自交汙染，經計算其雜交種子純度為 95.0% (圖 10、表 4)。綜合 CAMS-340 和 EPMS-712 基因座之 SSR-PCR 分析結果，No. 7 雜交種子之遺傳純度為 95.0% (表 4)。對照果實等園藝性狀之 GOT 檢定結果，亦發現編號 77 和編號 119 的異型株確實與正常的  $F_1$  植株 (編號 80) 性狀相異 (圖 11)。

## 討論

栽培種番椒的染色體組  $2n = 2x = 24$ ，基

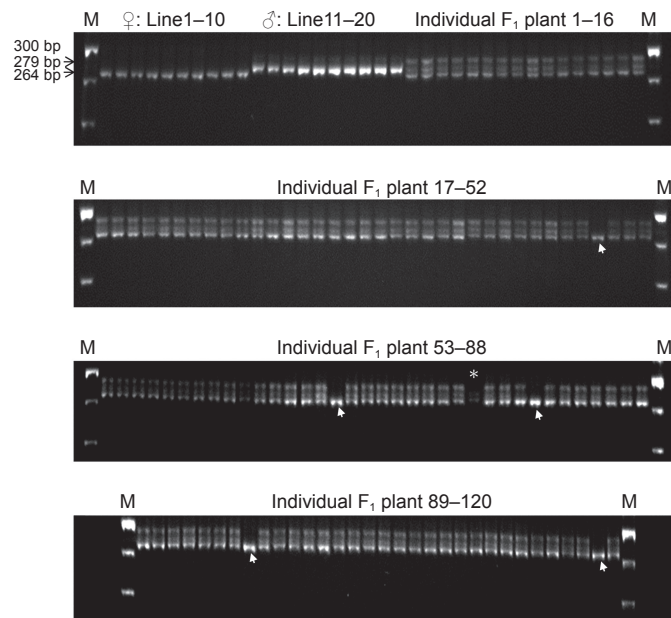


圖 9. 以 SSR 標誌 (CAMS-340) 進行番椒 No. 7 的雜交種子純度之檢測。

**Fig. 9.** Assessment of seed purity in hybrid No. 7 and respective parental lines (♀ and ♂) using the SSR marker of CAMS-340. M: 50 bp DNA Ladder from GeneMark; F<sub>1</sub> plant number 49, 68, 81, 96 and 119 (arrow) represent the selfed plants; F<sub>1</sub> plant number 77 (star) represent a mixture plant.

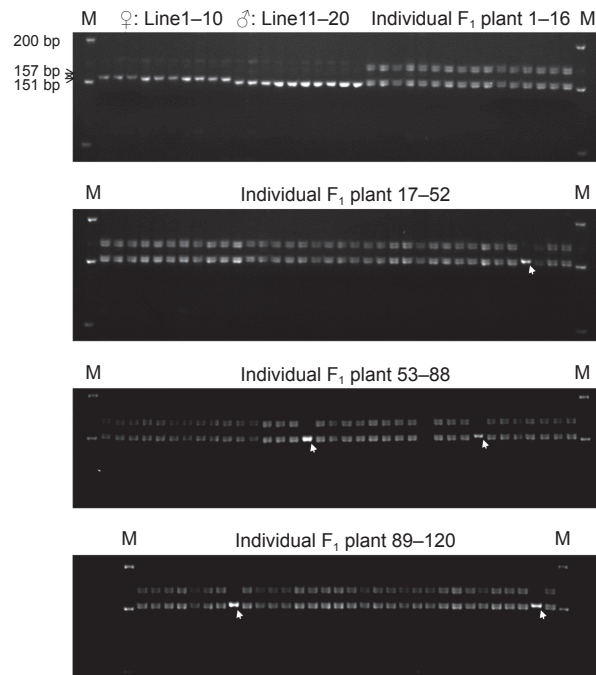


圖 10. 以 SSR 標誌 (EPMS-712) 進行番椒 No. 7 的雜交種子純度之檢測。

**Fig. 10.** Assessment of seed purity in hybrid No. 7 and respective parental lines (♀ and ♂) using the SSR marker of EPMS-712. M: 50 bp DNA Ladder from GeneMark; F<sub>1</sub> plant number 49, 68, 81, 96, and 119 (arrow) represent the selfed plants.

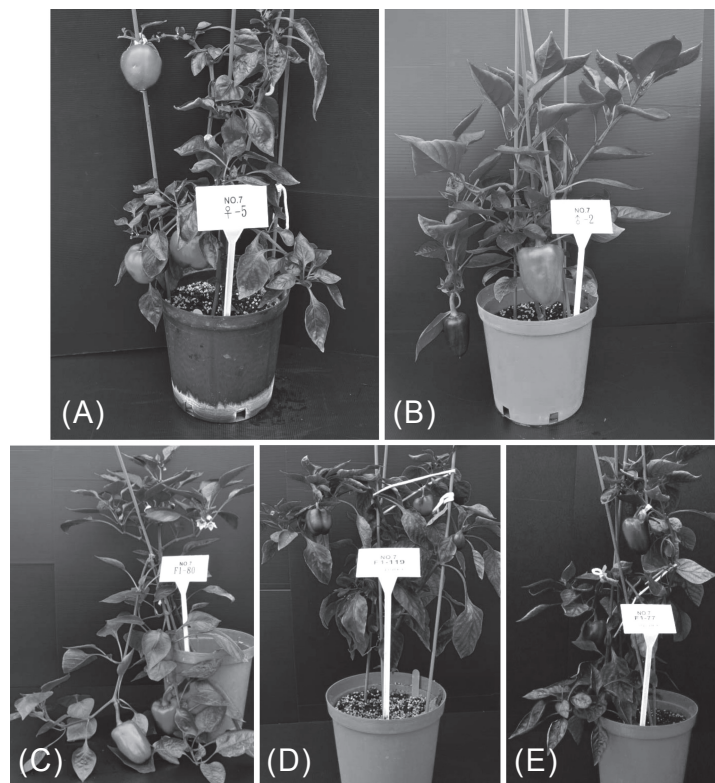


圖 11. 番椒雜交種 No. 7 與其親本的外觀性狀 (A) No. 7 的母株；(B) No. 7 的父株；(C) 正確的 No. 7 之  $F_1$  株；(D)、(E) 異型的 No. 7  $F_1$  株 (off-type  $F_1$ )。

Fig. 11. Morphological comparisons of matured pepper from typical  $F_1$  (C), off-type  $F_1$  (D and E) hybrids of No. 7 and parental plants (A: female parent; B: male parent).

因組大小約 3.3 Gb (Moscone *et al.* 2007)，全基因組於 2014 年完成定序 (Cheng *et al.* 2014)。目前針對番椒特定性狀的遺傳連鎖圖譜，以 SSR 標誌最為廣泛，如用於探索花期相關的 QTL (quantitative trait locus) 圖譜，係以 InDel 標誌和 SSR 標誌共同建構 (Tan *et al.* 2015)。Ince *et al.* (2010) 則利用番椒的根、莖、葉、花、果、種子等不同組織，並以不同發育階段的 cDNA，探勘 genic-SSR 結果顯示，相對於組織專一性的基因 (tissue-specific genes) 以 dinucleotide 雙核苷重複基序較多，而管家型基因 (housekeeping genes) 則以 trinucleotide 重複基序較多。Minamiyama *et al.* (2007) 又以 SSR-based 圖譜進行番椒疫病 (*Phytophthora capsicum*) 抗性之 QTL 分析。鑑於 SSR 存在基因組的豐富性與多型性，加

上其遺傳分析的技術門檻較低，極適合作為例行性的種子遺傳純度檢定之利用。本研究自前人探勘的番椒 SSR 標誌中，選取種間或種內具多型性的候選引子 374 組，測試 8 個  $F_1$  品種純度之檢測 (有 3 個  $F_1$  品種之檢測數據未列於本文)，初步已建立核心引子 12 組，可提供商業雜交種子純度檢測之利用。

歸納前人對番椒基因組的 SSR 基序分析結果，以三核苷酸序列重複最為普遍，其次為二核苷酸序列重複；而三核苷酸重複基序 (trinucleotide repeat motif) 中又以 GAA/AGA/AAG (CTT/TTC/TCT) 出現頻度較高；二核苷酸重複基序 (dinucleotide repeat motif) 則以 AG/GA (TC/CT) 出現頻度較高 (Minamiyama *et al.* 2006; Yi *et al.* 2006; Lu *et al.* 2011; Ahn *et al.* 2013)。本研究針對番椒雜交種鑑別而建

立的 12 個高訊息 SSR 標誌，其中 3 個屬於二核苷酸重複序列且基序為 AG (TC/CT)，另 3 個三核苷酸重複基序則為 AGA/GAA (CTT)，與前人針對番椒基因組之 SSR 分析結果吻合。唯針對 SSR-PCR 多型性產物的判讀能力，以三核苷酸重複基序或組合型核苷酸重複基序 (compound perfect repeat motif) 的多型性片段差異性較大於二核苷酸序列重複基序的產物，較利於判讀，可利用 Agarose 或 PAGE 膠體電泳方式，提供例行性檢定之利用。

種苗公司生產高價的 F<sub>1</sub> 種子，必需確保出售的 F<sub>1</sub> 種子純度達於標準 (98%) 或以上，而異型種子來源不外乎自交種子污染，或是考種、包裝期間的外來種原混雜污染。為確保或提升採種品質，必須釐清種子污染的緣由，以判斷是否需要加強雄不稔性狀穩定性的監測，或去雄操作的確實性，或嚴格掌控種子調製的潔淨度等環節。分子標誌正是快速檢測與評估異型種子基因型的優選工具，有助於品管人員發覺種子污染來源，進一步針對缺失而改善之。GOT 是 ISTA 等國際種苗組織與業界傳統使用的純度檢查方法，首先得建立正確且具有代表性的標準品 (雜交種) 之園藝性狀資料庫，再依個別作物發生自交的頻度，分別取 100–1,000 個雜交種之抽樣檢定樣品，進行對照栽培比較，依其性狀差異性說明 off-type 發生的情形與比率，並取得各批次種子之純度。目前國際間開發多種快速、簡便的 DNA 分子標誌 (RAPD、SSR、ISSR 以及 SNP 等)，可提供雜交種鑑定或種子純度之檢測；其中 SSR 分子標誌分析兼具簡易、穩定、精確性等多項優點，所需檢測時程僅需 1–2 wk，相較於傳統 1–3 mo 的 GOT 方式更節省人力、物力成本，可爭取出貨時效；其檢測材料可使用單粒種子或發芽苗等微量樣品 (5–20 mg)，配合操作簡易的 DNA 萃取技術，即可提供 SSR-PCR 分析用，迅速取得各採種批次之種子純度，是現代商業種苗生產品管上實務應用之利器。

## 誌謝

本研究承蒙農委會農糧領域科技計畫 (103 農科-9.1.1-農-C5) 經費補助，謹此致謝。

## 引用文獻

- Ahn, Y., S. Tripathi, Y. Cho, J. Kim, H. Lee, D. Kim, J. Woo, and M. Cho. 2013. *De novo* transcriptome assembly and novel microsatellite marker information in *Capsicum annuum* varieties Saengryeg 211 and Saengryeg 213. *Bot. Stud.* 54:58–67.
- Arun Kumar, M. B., M. Dadlania, R. Kumarb, and S. R. Jacob. 2014. Identification and validation of informative SSR markers suitable for ensuring the genetic purity of brinjal (*Solanum melongena* L.) hybrid seeds. *Sci. Hortic.* 171:95–100.
- Ballester, J. and de V. M. Carmen. 1998. Determination of F<sub>1</sub> hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. *Euphytica* 103:223–226.
- Cheng, Q., C. Yu, Y. Shen, X. Fang, L. Chen, J. Min, J. Cheng, S. Zhao, M. Xu, Y. Luo, Y. Yang, Z. Wu, L. Mao, H. Wu, C. Ling-Hu, H. Zhou, H. Lin, S. Gonzalez-Morales, D. L. Trejo-Saavedra, H. Tian, X. Tang, M. Zhao, Z. Huang, A. Zhou, X. Yao, J. Cui, W. Li, Z. Chen, Y. Feng, Y. Niu, S. Bi, X. Yang, W. Li, H. Cai, X. Luo, S. Montes-Hernandez, M. A. Leyva-Gonzalez, Z. Xiong, X. He, L. Bai, S. Tang, D. Liu, J. Liu, S. Zhang, M. Chen, L. Zhang, Y. Zhang, M. Wang, X. Lv, B. Wen, H. Liu, H. Luan, Y. Zhang, S. Yang, X. Wang, J. Xu, X. Li, S. Li, J. Wang, A. Palloxi, P. W. Bosland, Y. Li, A. Krogh, R. F. River-Bustamante, L. Herrera-Estrella, Y. Yin, J. Yu, K. Hu, and Z. Zhang. 2014. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:5135–5140.
- Condit, R. and S. P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34:66–71.
- Crockett, P. A., P. L. Bhalla, C. K. Lee, and M. B. Singh. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar. *Genome* 43:317–321.
- Gong, L. and Z. Geng. 2010. EST-SSR markers for gerbera (*Gerbera hybrida*). *Mol. Breeding* 26:125–132.
- Hashizume, T., I. Shimamoto, and M. Hirai. 2003. Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] using RAPD, RFLP and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 106:779–785.
- Hashizume, T., I. Shimamoto, I. Y. Harushima, M. Yui, T. Sato, T. Imai, and M. Hirai. 1996. Construction of a linkage map for watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica* 90:265–273.
- Ida, A. A., J. A. Plummer, R. A. Lancaster, and G. Yan. 2008. Identification of ‘Sib’ plants in hybrid cau-

- liflowers using microsatellite markers. *Euphytica* 164:309–316.
- 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.
- Iqbal, M. J., D. W. Paden, and A. L. Rayburn. 1995. Assessment of genetic relationships among rhododendron species, varieties and hybrids by RAPD analysis. *Sci. Hortic.* 63:215–223.
- Jang, I., J. H. Moon, J. B. Yoon, J. H. Yoo, T. J. Yang, Y. J. Kim, and H. G. Park. 2004. Application of RAPD and SCAR markers for purity testing of F<sub>1</sub> hybrid seed in chili pepper (*Capsicum annuum*). *Mol. Cell* 18:295–299.
- Komori, T. and N. Nitta. 2004. A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. *Plant Breed.* 123:549–553.
- 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, 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.
- 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.
- Liu, L. W., Y. Wang, Y. Q. Gong, T. M. Zhao, G. Liu, X. Y. Li, and F. M. Yu. 2007. Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) hybrid using molecular markers. *Sci. Hortic.* 115:7–12.
- Lu, F., M. Yoon, Y. Cho, J. Chung, K. Kim, M. Cho, S. Cheong, and Y. Park. 2011. Transcriptome analysis and SNP/SSR marker information of red pepper variety YCM334 and Taaan. *Sci. Hortic.* 129:38–45.
- McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9:199–207.
- 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. *Breeding Sci.* 57:129–134.
- Moscone, E. A., M. A. Scaldaferrro, M. Grabielle, N. M. Cecchini, Y. Sánchez García, R. Jarret, J. R. Daviña, D. A. Ducasse, G. E. Barboza, and F. Ehrendorfer. (2007). The evolution of chili peppers (*Capsicum* - Solanaceae): A cytogenetic perspective. *Acta Hortic.* 745:137–170.
- Mujaju, C., J. Sehic, G. Werlemark, L. Garkava-Gustavsson, M. Fatih, and H. Nybom. 2010. Genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. *Hereditas* 147:142–153.
- Portis, 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.
- Tan, S., J. Cheng, L. Zhang, C. Qin, D. Nong, W. Li, X. Tang, Z. Wu, and K. Hu. 2015. Construction of an interspecific genetic map based on InDel and SSR for mapping the QTLs affecting the initiation of flower primordia in pepper (*Capsicum* spp.). *PLoS One* 10:e119389. doi:10.1371/journal.pone.0119389.
- Wang, Z., J. L. Weber, G. Zhong, and S. D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88:1–6.
- Wöhrmann, T. and K. Weising. 2011. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor. Appl. Genet.* 123:635–647.
- Yi, G., J. M. Lee, S. Lee, D. Choi, and B. Kim. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 114:113–130.

## Analysis of Seed Purity for the Bell Pepper (*Capsicum annuum*) Hybrid Using SSR Markers

Jau-Yueh Wang<sup>1,\*</sup>, Da-Gin Lin<sup>2</sup>, and Feng-Chyi Lin<sup>3</sup>

### Abstract

Wang, J. Y., D. G. Lin, and F. C. Lin. 2016. Analysis of seed purity for the bell pepper (*Capsicum annuum*) hybrid using SSR markers. *J. Taiwan Agric. Res.* 65(4):406–419.

Identification of seed purity of F<sub>1</sub> hybrids is a critical factor of quality control in the production of hybrid seeds. The grow out test (GOT) is based on the morphological characters of plants grown to maturity. However, GOT may influence by the environment and is time consuming, there is necessary to identify a rapid and reliable test like DNA based assay for this purpose. The objective of this study was to generate specific and co-dominant SSR (simple sequence repeat) markers for discrimination of parental lines and the subsequent assessment of seed purity in pepper hybrids. Genomic DNA from two hybrids and their parental lines were screened with 374 SSR primer pairs and 12 informative SSR markers were identified. Among the informative SSR markers, five key markers were selected for seed purity test for No. 5, No. 6, and No. 7 hybrids. A total of 120 hybrid individuals from each hybrid were tested using the identified markers, and results showed the seed purity rate for the three hybrid seed lots were 99.2, 98.3 and 95.8%, respectively. The contamination of inbred seeds obtained by SSR-PCR analysis was comparable to the GOT method. These results indicated that SSR markers could be used as a rapid and efficient tool in testing the seed purity of the commercial pepper hybrid.

**Key words:** *Capsicum annuum*, Simple sequence repeat, Hybrid seed purity.

---

Received: December 17, 2015; Accepted: March 1, 2016.

\* Corresponding author, e-mail: jywang@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.