

辣椒素DNA分子鑑定技術介紹

孫永偉¹、陳迪偉²、謝雪琴³、沈翰祖¹、張義弘⁴、陳駿季⁵

辣椒學名 *Capsicum annuum* L. 為茄科番椒屬，原產於中美洲、南美洲熱帶地區，為全世界最重要辛香作物之一，其中具有辛辣者稱之為辣椒 hot pepper，不具辛辣者稱為甜椒 sweet pepper，有許多辣椒與甜椒之果實外觀差異不大。辣椒之辛辣來源主要為辣椒素 (capsaicin)，具有促進食慾、舒緩脹氣、抑制幽門桿菌生長、減緩感冒、消炎、止痛及防癌等功效 (王及彭, 2007; Antonio et al., 2003; Sancho et al., 2002)，廣受世人喜愛。辣椒素主要位於果實之胎座 (placenta) 部位，故以該部位之辣椒素含量最高。一般檢測辣椒素含量常採用 HPLC 或 LISA 分析方式，但須經過一連串複雜之萃取、純化及分析步驟，因此不易進行大量樣品檢測分析。由於辣椒素含量為辣椒重要育種目標之一，因此利用分子標誌檢測技術快速鑑定辣椒之辣椒素有其必要性。

有關辣椒素生合成代謝所知尚不多，已知是由纈氨酸 (valine) 及苯丙胺酸 (phenylalanine) 經一系列代謝成支鏈脂肪酸，最後轉換成辣椒素。研究指出番椒之辣椒素為單一基因控制 (Andrews, 1995)，且其分子遺傳圖譜陸續被建立 (Lefebvre et al., 1995)。番椒第2條染色體之 C 基因座 (C locus) 為辣椒鹼 (capsaicinoid) 生合成代謝之基因，亦為決定辣味之關鍵基因 (Blum et al., 2002; Livingstone et al., 1999; Zewdie-Tarekegn, 1999)，早期研究指出番椒果實之辣味是由單一顯性 C 基因控制，C 基因表現攸關辣味之呈現，當 C 基因成一對隱性同質結合時，果實完全無辣味表現。有研究指出辣椒素生合成關鍵酵素為 capsaicin synthase (CS) (Prasad et al., 2006)，或支鏈脂肪酸醯化作用 (acylation) 之醯基轉移 (acyltransferase)。許多研究均確認 Pun1 基因編碼醯基轉移 (acyltransferase) 為辣椒素生合成限制因子 (Stewart Jr, et al., 2005)，當番椒植株出現同質顯性 Pun1/Pun1 基因型時，果實呈現明顯辣味，稱為辣椒；當番

1. 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

2. 瑞成種苗公司 總經理

3. 亞洲蔬菜研究發展中心育種系辣椒組 研究助理

4. 種苗改良繁殖場 研究員兼生物技術課課長

5. 種苗改良繁殖場 研究員兼副場長

椒植株出現同質隱性pun1/pun1基因型時，果實不產生辣椒素，稱為甜椒。檢測Pun1基因表現可即時反應辣椒之辣味（Stewart Jr et al.,2005）。由辣椒與甜椒之Pun1基因定序結果顯示，後者較前者短少2.5 kb核?酸，主要是甜椒Pun1基因序列第1個外顯子(exon)消失，造成辣椒素無法正常合成(Stewart Jr et al., 2007)。有關辣椒與甜椒雜交一代(果實辣味介於辣椒與甜椒之間)之辣椒素基因型探討較少，部分學者初步資料證明雜交種同時具有Pun1與pun1基因之DNA條帶。故目前推論辣椒素受一對Pun1基因控制。因此，可以Pun1基因作為檢測辣椒素之依據。儘管許多研究均顯示辣椒素受Pun1基因控制，但仍無法以該基因之轉錄(transcription)或轉譯(translation)調控，預測辣椒素含量或辣味表現程度，此可能與辣椒素表達量並非單一基因控制。

本實驗室篩選以NCBI基因庫之Pun1基因序列，利用位於甜椒pun1基因序列兩端設計專一性forward (F1) 與reverse (R) 引子，及辣椒Pun1基因序列中間再設計一條forward (F2) 引子，利用3條引子同時進行PCR反應。結果顯示，番椒品系AC162 (具有辣味) 出現1.7 kb之DNA條帶，番椒品系AS151 (完全無辣味) 出現1 kb之DNA條帶，辣椒與甜椒之雜交一代可同時出現1及1.7 kb之DNA條帶 (圖.)。將具有辣味之

1.7 kb DNA及無辣味之1 kb DNA解序並送至NCBI基因庫比對，結果顯示品系”AC162”之1.7 kb DNA片段序列與Thai Hot (具有辣味)之Pun1基因相似；品系”AS151”之1 kb DNA片段序列與甜椒pun1基因序列一致。將辣椒與甜椒之雜交一代之1.7及1 kb之DNA條帶解序，分別與辣椒Pun1及甜椒pun1基因序列吻合。由此可知，辣椒與甜椒雜交一代之辣椒素基因型為Pun1/pun1基因。此結果與許多學者之結論吻合。雖然本研究仍無法預測辣椒之辣椒素含量或辣味表現程度，但已對於辣椒、甜椒、或二者雜交一代均建立其專一性分子標誌，可於植株幼苗期即可清楚明顯鑑定未來植株果實是否具有辣椒素，無須以口嚐試或經過複雜之HPLC分析，極為簡單快速，可協助育種者大量篩選鑑定雜交後代是否具有辣椒素，甚至是辣椒與甜椒之雜交一代亦可確認，應具有產業利用價值。

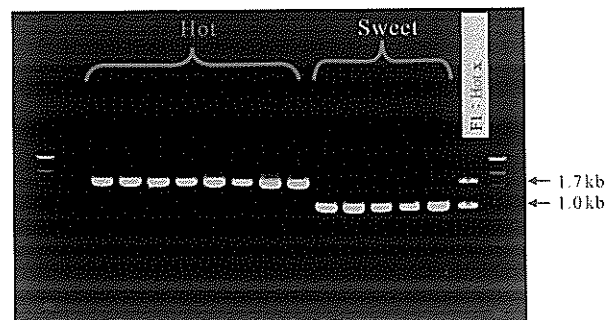


圖.利用26F1/54F2/R引子組檢測辣椒之辣椒素。有辣味者具有1.7 kb條帶，無辣味者具有1 kb條帶，辣椒與甜椒雜交種同時具有1及1.7 kb條帶。