

應用 ACC 合成酶 (CsACS1G) 分子標誌 於全雌胡瓜育種之探討¹

陳國憲、楊藹華²

摘 要

陳國憲、楊藹華·2011·應用 ACC 合成酶 (CsACS1G) 分子標誌於全雌胡瓜育種之探討。臺南區農業改良場研究彙報 57：20-27。

本實驗選用臺灣 27 個胡瓜商業品種，分析花性表現及 CsACS1G 基因關係，結果顯示其中只有 A07、C03 等 2 個品系表現全雌之形態，B06、B07 及 B11 等 3 個品系則表現高雌形態，但其植株均具有 CsACS1G 基因。分別分析 B06、B07 與 C06 雜交之 F₁ 及其 F₁ 自交第一代 (Fs₁)、自交第二代 (Fs₂) 植株花性表現及 CsACS1G 基因分離關係，F₁ 結果顯示：CsACS1G 基因/全部植株比例及全雌株/全部植株比例，分別為 26/47、10/47 及 23/38、7/38。Fs₁ 結果則分別為 38/49、11/49 及 31/50、7/50。Fs₂ 結果則分別為 39/50、5/50 及 35/49、8/49，其中 F₁、Fs₁、Fs₂ 之受測植株，全雌植株皆僅在具 CsACS1G 基因存在時出現。

關鍵字：胡瓜、全雌株、雌雄同株

接受日期：2011 年 5 月 13 日

前 言

胡瓜為探討作物開花機制的重要作物之一，胡瓜花性的表現至少包括雄雌同株異花、全雌株、兩性花株、高雄性花株、全雄花株等五種⁽⁹⁾，其中雄雌同株異花在胡瓜栽培利用上最為普遍。全雌植株胡瓜植株在早期即能產生果實，可提高產量，增加生產價值，因此育成全雌植株品系，為胡瓜育種重要目標之一。控制胡瓜性別表現基因，目前學者認為至少有三種主要基因，分別為 M/m、F/f 及 A/a 所控制，其中 M/m 決定其植株是否為單性花 (M₋) 或兩性花 (mm)；F 則為促進雌花發育之基因，A/a 則只在 ff 基因型時才發揮作用⁽⁹⁾ (附表 1)；除了受內在的基因調控外，也常受到環境因子影響而改變性別，如在長日照、較高溫環境及外加 GA₃、硝酸銀等處理，會促進雄花發育；在短日照及較低溫環境下，或以 auxin 處理，則會促進雌花之發育，而這些作用都與其內源乙烯合成調控有著密切正關係⁽¹⁴⁾。近年來由於對乙烯在植物組織內合成的調控機制，逐漸被了解^(7,13,17)；其中 ACC synthase 被認為是在乙烯產生過程扮演重要的關鍵酵素，且以多重基因家族形式存在同植物中^(2,3,12)，不同植物

1. 行政院農業委員會臺南區農業改良場研究報告第 380 號。

2. 臺南區農業改良場助理研究員、研究員。

種類、組織、發育階段及外在環境因子的影響，可能透過調控不同類型 ACC synthase 作用，影響乙烯合成，來控制不同性狀的表現^(1,10,11,19)，因而在胡瓜花性調控機制研究上，ACC synthase 也常被用來探討其基因表現與花性調控基因相關聯性；Treibsh (1997) 等人由數個具相同親緣背景所分離之雌雄同株／全雌品系 (isogenic lines) 進行 ACC synthase (CsACS1) 基因表現差異分析時，發現所有全雌之胡瓜品系除了含 CsACS1 基因外，還含一特有與額外的 DNA 片段“CsACS1G”，並認為其與胡瓜 F 基因座緊密連鎖。Mibus 等人 (2004) 利用其它 isogenic lines 之雌雄同株／全雌品系分析也得到相同結果，並將 CsACS1G 基因定序，發現其與 CsACS1 基因序列極為相似。本實驗收集國內 27 個商業品種，探討各品種花性表現與 CsACS1G 關係，並進一步選用其中 2 個高雌品種與 1 個雌雄同株品種進行雜交，比較其 F₁ 植株及其 F₁ 植株自交第一代 (Fs₁) 與自交第二代 (Fs₂) 子代之花性表現與 CsACS1G 關係，以評估運用於輔助胡瓜全雌品系育種之標誌基因可行性。

表 1. 主要控制胡瓜花性表現基因 (節錄自 Mibus et al. 2004)
Table 1. Major genes controlling sex expression in *Cucumis sativus*

Major genes controlling sex expression in *Cucumis sativus*

F		f	
(A or a)		A	a
M	Gynoecious	Monoecious	Androecious
m	Hermaphroditic	Andromonoecious	Androecious

材料與方法

試驗用材料為收集國內 27 個胡瓜商業品種，包括生生種苗公司：大瓜 2 號-7382 (A01)、大瓜 5 號-7387 (A02)、大瓜 3 號-7385 (A03)、秀玉-7398B (A05)、新玉-7398A (A04)、新翠-7399 (A06)、綠夢-7400A (A07)。農友種苗公司：HV004 (B01)、HV035 (B02)、HV036 (B03)、HV057 (B04)、V115 (B05)、麗翠 (B06)、群燕 (B07)、飛燕 (B08)、喜燕 (B09)、春燕 (B10)、密燕 (B11)、鳳燕 (B12)、秀燕 (B13)。欣樺種苗公司：河童盛夏-7 號 (C01)、河童盛夏-11 號 (C02)、夏笛 (全雌) (C03)、夏笛 (全雄) (C04)、碧湖 No.7 (C05)、北斗星 (C06)、黑皮 (C07) 等商業品種，於 2006 年冬季及 2007 年夏季定植於溫室中，每品種種植 6~12 棵、生育期間進行雌／雄花表現型態調查並記錄其每一結位開花之性別，並於植株生長至第三完全展開葉時以打孔機取其葉圓片 0.2 g，以 QIAGEN kit 抽

取 genomic DNA，取 2 μ l 混合 1 μ l 6 \times loading dye，以 1% SeaKem LE Agarose 膠片於 0.5 \times TBE 緩衝液進行電泳 (100 V, 25 min)，確定 DNA 品質。另取 2 μ l genomic DNA 加入 98 μ l H₂O 稀釋後，用分光光度計測定 260 nm 與 280 nm 兩波長的 O.D 值，260/280 值介於 1.8~2.0 為佳，換算得到 DNA 濃度為 μ g/ml；再將 genomic DNA 以 H₂O 稀釋成 20 ng/ μ l 的工作液，置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存，以作為檢測 CsACS1G 基因之聚合酵素連鎖反應 (PCR) 之模板 DNA 使用。

胡瓜花性檢定標準：檢定植株觀察其主莖 1~22 節位花性表現情況。全雌胡瓜：全株上下均開雌花無任何雄花的植株；高雌胡瓜：雄花僅在第 10 節以下出現，第一雌花節位則在 4 節以下就開始出現，且雄花節位 / (雄花節位 + 雌花節位) < 1/5；雌雄同株：1~22 節位雌、雄花不規則出現。

F₁ 分離之族群分析：選用 C06 為父本，B06 及 B07 為母本，分別進行人工雜交授粉，於 2007 年秋季進行，每天下午 4~5 時，分別將母本未成熟雌花 (隔日開花) 套袋，次日摘取父本 (C06) 花粉進行授粉，並於授粉後立即再套袋 2~3 天；每株留一果實，果實成熟後收取種子，隨機取 38~47 顆 F₁ 種子播種，調查其植株花性及 CsACS1G 基因分離情形。Fs₁ 分離族群分析：從 F₁ 調查族群中隨機選取 3~4 棵含 CsACS1G 基因，但為雌雄同株形態之植株進行自交 (Fs₁)，待果實成熟後收取種子混合，隨機取 50 顆 Fs₁ 種子播種，調查其花性及檢測其 CsACS1G 基因分離情形。Fs₂ 分離族群分析：從 Fs₁ 調查植株中隨機選 3~4 棵含 CsACS1G 基因，但為雌雄同株形態之植株進行自交 (Fs₂)，果實成熟後收取種子混合，隨機取 50 顆 Fs₂ 種子播種，調查其花性及檢測其 CsACS1G 基因分離情形。

檢測 CsACS1G 基因之 Primer 設計：參考 Mibus (2004) 發表之全雌品系胡瓜 CsACS1 及其特有之 CsACS1G 基因序列差異，設計引子進行 PCR 反應，以作為檢測植株是否含有 CsACS1G 基因指標。CSACS1.1 引子序列為 5'-TAC-CTG-CTC-TGG-TCG-GAG-ACA-CT-3'；CSACS1.2 引子序列為 5'-TAC-CTG-CTC-TGG-TCG-GAG-ACA-CT-3'；CSACS1.3 引子序列為 5'-AGG-TGT-TCA-GCA-AAC-ATA-GGG-TG-3'。CSACS1.1 引子/CSACS1.3 引子進行 PCR 反應之產物，表示為一般胡瓜共有之 CsACS1 DNA 條帶 (CK)；以 CSACS1.2 引子/CSACS1.3 引子進行 PCR 反應之產物，表示為具有 CsACS1G DNA 條帶 (F 基因之連鎖標誌基因)。

PCR 反應條件：PCR 反應總體積 25 μ l，反應液組成為：12.3 μ l H₂O、1 \times PCR buffer、5mM MgCl₂、0.02mM primer、0.2mM dNTP、0.04U Taq DNA polymerase。PCR 反應以 Perkin Elmer 公司生產之 Gene Amp™ PCR System 9700 型熱循環反應器進行，反應條件分兩步驟，第一步驟為 94 $^{\circ}$ C，3 分鐘。第二步驟為 94 $^{\circ}$ C，1 分鐘；60 $^{\circ}$ C，1 分鐘；72 $^{\circ}$ C，2 分鐘 30 秒；共循環 32 次。第三步驟為 72 $^{\circ}$ C，5 分；最後降溫至 4 $^{\circ}$ C 保存至取出。取 4 μ l 混合 1 μ l 6 \times loading dye，以 1.5% SeaKem LE Agarose 膠片於 0.5 \times TBE 緩衝液進行電泳 (100 V, 25 min)，再取出置於顯影照相器觀察其 PCR 之 DNA 產物。

結果與討論

實驗結果顯示 27 個商業品種中，其中只有 A07 及 C03 等 2 個品系之植株於夏季或冬季栽培時皆出現全雌株之形態；B11 為冬/夏皆呈高雌性；B06 及 B07 等 2 個品系之植株於冬季栽培時出現高雌株之形態，夏季則表現雌雄同株 (未列出結果)，但其植株均具有 CsACS1G

基因。A01、A02、A03、A05、A04、A06、B01、B02、B03、B04、B05、B08、B09、B10、B12、B13、C01、C02、C04、C05、C06 及 C07 等 22 商業品種，夏季及冬季皆呈雌雄同株形態，且其植株均不具 CsACS1G 基因 (圖 1 及表一)。

實驗中為評估 CsACS1G 基因在育種過程作為輔助篩選全雌品系親本的可行性，選用 B06 及 B07 為母本 C06 為父本，分別進行雜交授粉，並進行其 F₁、F_{s1} 及 F_{s2} 子代花性及 CsACS1G 基因分離關係。F₁ 分離族群結果顯示結果為：B06 × C06 雜交組合之 47 株 F₁ 中有 21 株不含 CsACS1G 基因，且皆為雌雄同株；26 株含 CsACS1G 基因，其中有 10 株為全雌株，16 株為雌雄同株。B07 × C06 雜交組合之 38 株 F₁ 中有 15 株不含 CsACS1G 基因，且皆為雌雄同株；23 株含 CsACS1G 基因，其中有 7 株為全雌株，15 株為雌雄同株。F_{s1} 分離族群結果顯示：B06 × C06 雜交組合之 49 株 F_{s1} 中有 11 株不含 CsACS1G 基因，且皆為雌雄同株；38 株含 CsACS1G 基因，其中有 11 株為全雌株，27 株為雌雄同株。B07 × C06 雜交組合之 50 株 F_{s1} 中有 19 株不含 CsACS1G 基因，且皆為雌雄同株；31 株含 CsACS1G 基因，其中有 7 株為全雌株，24 株為雌雄同株。F_{s2} 分離族群結果顯示：B06 × C06 雜交組合之 50 株 F_{s2} 中有 11 株不含 CsACS1G 基因，且皆為雌雄同株；39 株含 CsACS1G 基因，其中有 5 株為全雌株，34 株為雌雄同株。B07 × C06 雜交組合之 49 株 F_{s2} 中有 14 株不含 CsACS1G 基因，且皆為雌雄同株；35 株含 CsACS1G 基因，其中有 8 株為全雌株，27 株為雌雄同株 (圖 2)。本實驗結果與 Trebitsh 及 Mibus 等人利用相同親源背景胡瓜品系實驗結果相似，支持 CsACS1G 與 F 基因相連鎖之推論。因此可利用檢測 CsACS1G 有無，輔助篩選胡瓜性別決定之 F 基因，提升全雌品系 (親本) 之胡瓜育種效率。

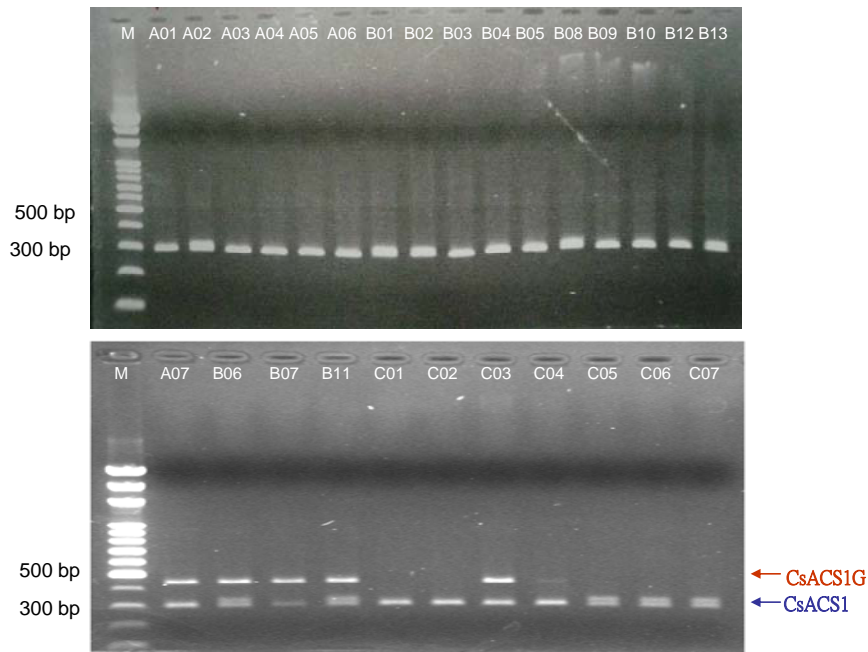


圖 1. 27 個胡瓜商業品種之 CsACS1G PCR 檢測之電泳圖

Fig. 1. Detection of CsACS1G gene in 27 commercial cucumber varieties

表 2. 27 個胡瓜商業品種之花性與 CsACS1G 檢測結果

Table 2. Detection of sex phenotype and CsACS1G gene in 27 commercial cucumber varieties

來源公司	品種名	商業品種對花性 描述之標示	實驗中使 用之代號	實驗中調查 花性結果	CsACS1G 基因檢測 結果
生生種苗有限公司	大瓜 2 號-7382	—	A01	雌雄同株	ND
生生種苗有限公司	大瓜 5 號-7387	—	A02	雌雄同株	ND
生生種苗有限公司	大瓜 3 號-7385	—	A03	雌雄同株	ND
生生種苗有限公司	新玉-7398A	—	A04	雌雄同株	ND
生生種苗有限公司	秀玉-7398B	—	A05	雌雄同株	ND
生生種苗有限公司	新翠-7399	—	A06	雌雄同株	ND
生生種苗有限公司	綠夢-7400A	全雌性	A07	全雌性	+
農友種苗有限公司	HV004	—	B01	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	HV035	—	B02	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	HV036	—	B03	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	HV057	—	B04	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	V115	—	B05	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	麗翠	全雌性	B06	冬季高雌性夏 季雌雄同株	+
農友種苗有限公司	群燕	春、秋季全雌性	B07	冬季高雌性夏 季雌雄同株	+
農友種苗有限公司	飛燕	—	B08	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	喜燕	—	B09	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	春燕	雌花早又多	B10	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	密燕	全雌性	B11	高雌性	+
農友種苗有限公司	鳳燕	雌花多	B12	雌雄同株	ND
農友種苗有限公司	秀燕	雌花多	B13	雌雄同株	ND
欣樺種苗有限公司	河童盛夏-7 號	—	C01	雌雄同株	ND
欣樺種苗有限公司	河童盛夏-11 號	—	C02	雌雄同株	ND
欣樺種苗有限公司	夏笛 (全雌)	全雌性	C03	全雌性	+
欣樺種苗有限公司	夏笛 (全雄)	—	C04	雌雄同株	ND
欣樺種苗有限公司	碧湖 No.7	—	C05	雌雄同株	ND
欣樺種苗有限公司	北斗星	—	C06	雌雄同株	ND
欣樺種苗有限公司	黑皮	—	C07	雌雄同株	ND

註 1. 來源公司對花性描述中,「—」代表該公司無對該品種花性表現無特別之敘述

註 2. CsACS1G 基因檢測結果中「ND」表未測出,「+」表含有 CsACS1G 基因

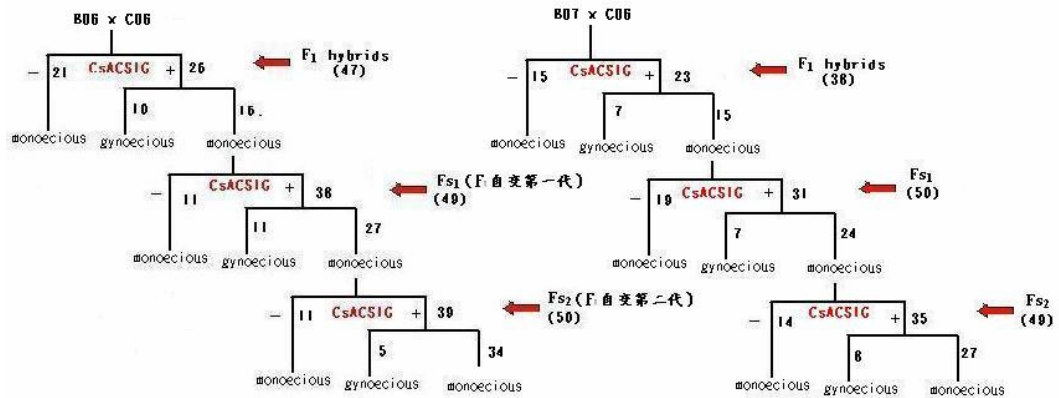


圖 2. B06 及 B07 與 C06 雜交 F₁ 植株及其自交第一、二代植株花性表現與 CsACS1G 檢測結果

Fig. 2. The relation of sex expression and CsACS1G gene contents in the B06 × C06 and B07 × C06 F₁ hybrids and its F_{s1}, F_{s2}

引用文獻

1. Abel, S., M. N. Nguyen, W. Chow and A. Theologis. 1995. ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol. Chem.* 270:19093-19099.
2. Destefano-Beltran, L. J. C., W. V. Caeneghem, J. Gielen, L. Richard, M. V. Montegu and D.V. D. Straeten. 1995. Characterization of three member of the ACC synthase gene family in *Solanum tuberosum* L. *Mol. Genet.* 246:496-508.
3. Huang, P. L., J. E. Parks, W. H. and A. Theologis., 1991. Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini(*Cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:7021-7025.
4. Kahana, A., L. Silberstein, N. Kessler, R. S. Goldstein and P. T. Rafael. 1999. Expression of ACC oxidase genes differs among sex genotypes and sex phases in cucumber. *Plant Mol. Biol.* 41:517-528.
5. Kamachi, S., H. Mizusawa, S. Mazuura and S. Sakai. 2000. Expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes, CS-ACS1 and CS-ASC2, correlated with sex phenotypes in cucumber plants (*cucumis sativus* L.). *Plant Biotechnol.* 17:69-74.
6. Kamachi, S., H. Sekimoto, N. Kondn and S. Sakai. 1997. Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices on *Cucumis sativus* L. *Plant and Cell Physiology.* 38:1197-1206.
7. Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:283-307.
8. Malepszy, S. and K. Niemirowicz-Szczytt. 1991. Sex determination in cucumber (*cucumis sativus* L) as a model system for molecular biology. *Plant Sci.* 80:39-47.

9. Mibus, H. and T. Tatlioglu. 2004. Molecular characterization and isolation of the F/f gene for femaleness in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109:16669-1679.
10. O'Neill, S. D., J. A. Nadeau, X. Zhang, A. Q. Bui and A. H. Halevy. 1993. Interorgan regulation ethylene biosynthetic genes by pollination. *Plant Cell.* 5:419-432.
11. Olson, D. C., J. H. Oetiker and S. F. Yang. 1995. Analysis of LE-ACS3, a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. *J. Biol. Chem.* 270:14056-14061.
12. Rottmann W. H., G. F. Peter, P. W. Oeller, J. A. Keller, N. F. Shen, B. P. Nagy, L. P. Taylor and A. Theologis. 1991. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a mutigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J. Mol. Biol.* 222:937-961.
13. Sato, T. and A. Theologis. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key regulatory enzyme for the ethylene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:6621-6625.
14. Trebitsh, T., J. Riov and J. Rudich. 1987. Auxin, biosynthesis of ethylene and sex expression in cucumber (*cucumis sativus* L). *Plant Growth Regul.* 5:105-113.
15. Trebish, S., J. E. Staub and S. D. O'Neill. 1997. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene linked to the female (F) locus that enhances female sex expression in cucumber. *Plant Physiol.* 113:987-995.
16. Yamasaki, S., N. Fujii and H. Takahashi. 2003. Photoperiodic regulation of CS-ACS2, CS-ACS4 and CS-ERS gene expression contributes to the femaleness of cucumber flowers through diurnal ethylene production under short-day conditions. *Plant Cell Environ.* 26:537-546.
17. Yang S. F. 1980. Regulation of ethylene biosynthesis. *HortScience.* 15:238-243.
18. Yin, T. and J. A. Quinn. 1995. Tests of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). *Am. J. Bot.* 82:1537-1546.
19. Zarembinski, T. I. and A. Theologis. 1993. Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Biol. Cell.* 4:363-373.

Study on the Application of ACC Synthase(CsACS1G) Molecular Marker Assisted Breeding in Gynoecious Cucumber¹

Chen, K. H. and A. H. Yang²

Abstract

27 Taiwan's commercial cucumber varieties were used to examine the relationship between the sex expression and CsACS1G gene contents. The results showed that the A07 and C03 were gynoecious, B06, B07 and B11 were sub-gynoecious, while all the A07, B06, B07, B11 and C03 contain the CsACS1G gene. The sex separated progeny from the cross B06 × C06 and B07 × C06 were employed to study the CsACS1G gene related to the sex expression of cucumber. The results showed that the ratio of gynoecious plants to tested progeny plants and containing CsACS1G plants to tested progeny plants in the F₁ hybrids, respectively, were 26/47 to 10/47 and 23/38 to 7/38, in the F_{s1} progenies progeny as 38/49 to 11/49 and 31/50 to 7/50 and in the F_{s2} as following 39/50 to 5/50 and 35/49 to 8/49. In fact, all the gynoecious plants contains the CsACS1G gene.

Key words : Cucumber, Gynoecious, Monoecious

Accepted for publication : May 13, 2011

1. Contribution No.380 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture.

2. Assistant Researcher and Researcher, Tainan District Agricultural Research and Extension Station.