

李種原評估及其親緣關係之 RAPD 標誌研究¹

溫英杰^{2,4} 劉怡伶³

摘 要

溫英杰、劉怡伶。2004。李種原評估及其親緣關係之 RAPD 標誌研究。中華農業研究 53:97-110。

台灣栽培的李(*P. salicina* L.)品種冬季休眠所需的低溫時數少，為世界上重要的低需冷性李種原基因庫。經過詳細的特性評估，顯示部分品種特性優異，如“黃肉李”、“黃柑李”具有獨特的香氣，“黑桃李”、“黑紫李”及“水李”的果皮不帶澀味，皆為育成高品質李的良好親本。利用 RAPD 技術對 30 個國內外李品種進行遺傳相似度分析，篩選出 30 條隨機引子共擴增 224 條條帶，其中多態性條帶 190 條占 84.8%。群集分析結果，30 個參試品種遺傳相似度係數介於 0.32-0.94 之間，共分為九群。其中台灣 22 個李品種介於 0.60-0.94，分為 4 群，顯示變異性高。第七群次亞群中“冬山沙連李”、“頭斑李”及“沙連李”的遺傳相似度係數達 0.94，為試驗品種中親緣關係最接近者。觀賞李(*P. pissardi*)與其他品種的親緣關係的遺傳相似度係數僅為 0.32，親緣關係最遠。

關鍵詞：東方李、種原評估、隨機擴增多型性 DNA。

前 言

東方李(*Prunus salicina* L.)起源於中國大陸，為薔薇科(Rosaceae)李屬(*Prunus*)的果樹，近緣種有三十種以上(俞德浚 1979)，西元前十世紀的古代詩歌集--詩經中有“丘中有李”和“華如桃李”等詩文的記載，表示三千年前在大陸華北一帶已有李的栽培。李是世界上第六大果樹產業，次於柑桔、葡萄、香蕉、蘋果、梨和桃，栽培面積 170 萬公頃，年產量約為 785 萬公噸(山東省果樹研究所情報資料研究室 1998)。李果果色艷麗，果實酸中泌甜而有清香，營養豐富，自古以來即是受到消費者歡迎的夏季水果。李果除了鮮食之外，還可加工製成蜜餞、果醬、果酒和果乾，是一種多用途的果樹。李樹對環境條件適應力強，栽培地區分布較其他核果類廣，而且開始結果早，經濟生產年齡較桃為長，栽培管理簡單，長久以來，人們喜歡在屋前、道旁或田埂種植李樹，供給自家消費。經濟栽培上，台灣李的栽培面積在 1990 年曾達 9,150 公頃，不過在 2002 年只剩 4,097 公頃，12 年間產業萎縮過半(農

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2192 號。接受日期：93 年 5 月 7 日。

2. 本所作物種原組副研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

3. 本所作物種原組前約聘助理。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

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

委會 2002)，而且栽培面積仍有繼續減少的趨勢，其原因在於缺乏優良品種和進口的李子競爭，導致價格長期低落。台灣李的種質資源豐富，尤其低需冷性種原，全球少有出其右者，有必要詳細調查、評估其種原特性，作為李品種改良工作的依據，以重振李產業榮景。

李為異交作物，經過長久的自然演進，演化出非常豐富的遺傳多樣性，經過人為的選拔，形成眾多的品種和類型，已知的東方李品種超過 1,000 種。李子果色豐富，有紅、黃、綠、紫、黑五種顏色，果肉有紅、黃兩色。台灣對於李品種的分類，有依產地者，如“宜蘭李”、“沙連李”，大部分依果色命名，如“紅肉李”、“黃肉李”、“大紅李”、“二紅李”等，因此同一種李子在不同地方可能有不同名稱，而同樣名稱的李子可能包含數個品種，此一情況對引種、種原保存及評估都會產生困擾。RAPD 是根據 DNA 聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，利用人工隨機合成的 DNA 分子作引子(primer)，將取自組織中的基因組 DNA 為模板，經過 PCR 反應器，進行 DNA 片段的隨機合成(Williams *et al.* 1990)。如果引子與某一片段的模板 DNA 具有互補核苷酸序列，則該引子就會結合到單鏈的 DNA 上去，因此可以對整個基因組 DNA 進行多型性分析，用以建立特定基因標誌，或供種和品種的演化、分類和鑑定等。利用一系列引子進行 PCR 反應，能獲得不同長度的 DNA 片段，這些 DNA 片段可作為鑑定不同分類等級的分子性狀，根據電泳譜條帶的差異，可以計算遺傳距離或相似系數，建立譜系關係樹狀圖，用來鑑別它們的差異程度及親緣關係。

由於不同的分子標記可以在不同的類群中產生獨特的帶型，或者得到種或種以上分類等級特異性的條帶，沒有傳統分類法易受環境及季節影響的缺點，因此 DNA 分子標記用於種級的分類的研究越來越多，國內利用此一技術來鑑定種原親緣關係的作物有百合(李 1997)、花生(范等 1999)、番椒(王等 1997；林 1998)、火鶴花(王等 2001)及白鶴芋(柯等 2003)等。國內利用 RAPD 技術來鑑定果樹種原親緣關係，見諸報導的有桃子(溫等 2003)及桶柑(翁等 2003)，其它國家則有許多報導。Lanham & Brennan(2001)曾對樹莓三個種的 37 個個體進行 RAPD 分類，在品種、品系間已進行分類鑑定的有蘋果(Harada *et al.* 1993；Koller *et al.* 1993)、梨(Botta *et al.* 1998；Oliveira *et al.* 1999)、桃(楊等 2001；程等 2001；Chaparro *et al.* 1994；Quarta *et al.* 2000；Warburton & Bliss 1996)、李(Bellini *et al.* 1998)、柿(羅等 1998)、栗(Botta *et al.* 1999)、杏(吳等 2003)、仁用杏(Bartolozzi *et al.* 1998)、芒果(鄧等 1999；Schnell *et al.* 1995)、枇杷(潘等 2002)、荔枝(Anuntalabhochai *et al.* 2002)、葡萄 (Fanizza *et al.* 1999；Moreno *et al.* 1995；Qu *et al.* 1996)、胡桃(Nicese *et al.* 1998)、木瓜(Sondur *et al.* 1996；Stiles *et al.* 1993)、香蕉(Damasco *et al.* 1996)、橄欖(Wiesman *et al.* 1998)、酪梨(Fielder *et al.* 1998)、阿月渾子(譚等 2003)，此說明 RAPD 技術已在許多種果樹上得到廣泛的應用。

農業試驗所羅娜種原保存園收集及保存李種原超過 50 種，來自其他國家的李種原與早年自華南地區引進的李品種及本省的地方品種，彼此的遺傳相似性有待明瞭，以作為育種及種原核心保存之參考，是為本試驗之目的。

材料與方法

植物材料

由定植於南投縣信義鄉海拔 850 公尺之羅娜種原保存園，選取嫁接於苦桃實生砧，12 年生，已穩定結實之李種原 30 種為材料，其名稱及來源詳如表 1。

表 1. 試驗所用李品種名稱及來源

Table 1. The original and name of 30 plum cultivars used in the assay

No.	Cultivar	Genetic background	Country of origin
1	87-6	<i>Pruns. salicina</i>	USA
2	87-7	<i>P. salicina</i>	USA
3	87-10	<i>P. salicina</i>	USA
4	87-11	<i>P. salicina</i>	USA
5	Gulfruby	<i>P. salicina</i>	USA
6	Reubennel	<i>P. salicina</i>	South Africa
7	Ornamental plum	<i>P. pissardi</i>	USA
8	Yi lan 宜蘭	<i>P. salicina</i>	Taiwan
9	Tzao sheng yi lan 早生宜蘭	<i>P. salicina</i>	Taiwan
10	Huang jou 黃肉	<i>P. salicina</i>	Taiwan
11	Huang kan 黃柑	<i>P. salicina</i>	Taiwan
12	Sha lien 沙連	<i>P. salicina</i>	Taiwan
13	Tung shan sha lien 冬山沙連	<i>P. salicina</i>	Taiwan
14	Woan sheng sha lien 晚生沙連	<i>P. salicina</i>	Taiwan
15	Tou pan 頭斑	<i>P. salicina</i>	Taiwan
16	Wu mei 烏梅	<i>P. salicina</i>	Taiwan
17	Hung jou 紅肉	<i>P. salicina</i>	Taiwan
18	Cheng kung ta hung jou 成功大紅肉	<i>P. salicina</i>	Taiwan
19	Ta hung 大紅	<i>P. salicina</i>	Taiwan
20	Erh hung 二紅	<i>P. salicina</i>	Taiwan
21	Hsieh ken 血根	<i>P. salicina</i>	Taiwan
22	Hung mei jen 紅美人	<i>P. salicina</i>	China
23	Hsi kua 西瓜	<i>P. salicina</i>	Taiwan
24	Chang yeh 長葉	<i>P. salicina</i>	Taiwan
25	Hei yeh 黑葉	<i>P. salicina</i>	Taiwan
26	Hshing tsai 杏菜	<i>P. salicina</i>	Taiwan
27	Hei tao 黑桃	<i>P. salicina</i>	Taiwan
28	Yen chih 胭脂	<i>P. salicina</i>	Taiwan
29	Shui Li 水李	<i>P. salicina</i>	Taiwan
30	Kou shih 狗屎	<i>P. salicina</i>	Taiwan

種原特性調查

調查項目包括：開花日期、果實成熟日期、果重、果色、果肉顏色、可溶性固形物及可滴定酸含量等。調查標準如下：

開花日期：全株約有 50% 的花朵開花。

成熟期：約有 25% 果實達到 8 分熟。

果重：10 果平均重量。

可溶性固形物及可滴定酸含量：可溶性固形物含量以屈折式糖度計測定，可滴定酸含量之測法如下：將果汁稀釋成 100ml，取 10ml 稀釋液置於燒杯中加入 2-3 滴酚酞溶液，以 0.1N NaOH 滴定至變色，可滴定酸之含量 = (滴定 ml × 6.7 × F) ÷ 樣本重，其中 F 為 0.1N NaOH 的力價。

DNA 之抽取方法

從不同植株採取新鮮的嫩葉 0.1~0.2g，利用液態氮脫水乾燥，再研磨成粉末。加入 65°C DNA 萃取緩衝液(100mM Tris-HCl, pH8.0; 20mM EDTA; 1.4M NaCl; 2%(w/v) CTAB; 1%(v/v) PEG6000; 0.5%(v/v) 2-Mercaptoethanol)600 μ l，輕輕混勻後，置於 65°C 水浴鍋中 30min，取出靜置至室溫。加入 600 μ l chloroform-isoamyl alcohol(24:1, v/v)，混勻，以 9,000rpm (MICRO 240A, Denville Scientific Inc.) 離心 10min。取上層液至新的微量離心管中，加入 400 μ l 的異丙醇，混勻，以 9,000rpm 離心 10min。去上清液，加入 1ml 的 washing buffer (76%(v/v) ethanol; 10mM ammonium acetate)清洗沈澱物，9,000rpm 離心 10min。去上清液，沈澱物以真空乾燥之。沈澱物溶於 50 μ l TE 緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.4; 1mM EDTA)中，加入 RNaseA，使其最後濃度為 50mg/ml，於 37°C 下反應 1 小時。將 DNA 稀釋 100 倍，利用光電比色計測定 OD₂₆₀ 的吸光值，計算 DNA 的濃度。

聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)與電泳分析

以 50 ng 的 genomic DNA 當模板，在總體積 25 μ l 反應溶液中進行聚合酵素連鎖反應。其溶液中另含有 10mM Tris-HCl, pH9.0; 50mM KCl; 0.1% Triton X-100; 2.5 mM MgCl₂; 200 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0.2 mM 引子(primer)及 0.5 unit Taq DNA polymerase (Promega)，引子採用 Operon kit (Operon kit: OPAA-OPAE, OPB, OPD, OPE, OPG, OPH 及 OPI)，並在溶液上層加入 50 μ l 左右的礦物油，置入 DNA 熱循環儀(STRATAGENE, RoboCycler Gradient 96 Temperature Cycler) 中。反應溫度條件為 94°C 3min→36°C 1min 20sec→72°C 1min 20sec，當第一個循環(cycle)；再以 94°C 1min→36°C 1min 20sec→72°C 2min 20sec，進行 44 個循環，反應完成時自動保存於 4°C 恆溫槽中。

取 12 μ l 經聚合酵素連鎖反應增殖的 DNA，加入 1 μ l 稀釋 6 倍電泳指示液(loading dye, 30% Glycerol; 0.025% Bromophenol blue)，以 2% 瓊脂膠體(Agarose, Boehringer Mannheim GmbH Germany) 進行電泳，時間約 25min。結束後以 0.5mg/ml ethidium bromide 染色 20-30min，於 UV 燈下觀察膠體 DNA 多型性片段，照相及貯存影像于 Kodak Digital Science ID Image Analysis (Eastman Kodak Co.) 影像分析系統，進行資料比對分析。

資料分析

依 Jaccard(1901)所提之相似度計算公式計算各族群間的相似度，其公式如下： $N_{ab}/(N_a + N_b - N_{ab})$ ，其中 N_a 是樣本 a 的條帶數， N_b 是樣本 b 的條帶數， N_{ab} 是樣本 a 和 b 共有的條帶數。依此法將所有樣本間兩兩的相似度計算出。並利用 NT-SYS 軟體(Exeter Software, Setauket, NY)所提供的未加權平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)來計算其放大 DNA 片段相似性，及建立其親緣關係圖。

結 果

種原特性調查

表 2 列出參試 30 種李種原之開花期、成熟期、果重、果色、果肉顏色、可溶性固形物及可滴定酸含量。開花期早晚與李樹冬季休眠所需之低溫時數有關，藉著與桃指標品種如“Okinawa”(150 chill unit, cu)，“Sunred”(250cu)，“Flordasun”(300cu)，“Sunlite”(450cu)之開花期相比較(Sherman *et al.* 1988)，推斷參試李種原之低溫需求單位介於 100-500cu 之間。“宜蘭李”、“早生宜蘭李”、“杏葉李”、“狗屎李”1 月 28 日開花，估計低溫需求單位為 100cu，“黑葉李”、“黑桃李”、“烏梅李”開花期為 2 月 18 日，推估低溫需求單位為 275cu，“紅美人”、“Reubenne1”及觀賞李(*P. pissardi*)花期在 3 月 20 日，推斷低溫需求單位為 500cu。

試驗中所用之李種原以“宜蘭李”及“早生宜蘭李”於4月底最早成熟，大部分李品種成熟期集中在5月底至6月初，“紅美人”及“Reubennel”7月10日成熟，熟期最晚，可能與其低溫需求量較高，導致花期較晚有關。早生或晚生的品種為育成可延伸產期的極早生或極晚生品種之重要親本（表2）。

由表2可見，國內李品種平均果重介於17.4至49.8公克，由美國引進的“87-6”平均果重達81公克。果實大小關係到價格高低與果品競爭力，國內李育種宜注重大果、優質品種的選拔，果實大的種原為育種重要親本。台灣固有李品種中“黃肉李”、“黃柑李”具有獨特的香氣，“黑桃李”、“黑紫李”及“水李”的果皮不帶澀味，皆為育成低需冷性和高品質李的良好親本。在調查的30個品種（系）中可溶性

表 2. 試驗所用李種原特性

Table 2. Tree and fruit characteristics of plum genotypes used in this assay

Cultivar	Flowering Date (m/d)	Harvest ² Date (m/d)	Fruit wt. (g)	Skin color	Flesh color	Soluble solids (°Brix)	Titrat. acid (%malic)
Chang yeh	2/11	5/30	19.2 ± 6.3	red	yellow	10.4 ± 1.1	1.7±0.2
Cheng kung ta hung jou	2/20	5/31	46.7 ± 11.3	red	red	13.0 ± 0.4	0.9±0.1
Erh hung	2/4	6/10	34.7 ± 4.3	red	red	13.1 ± 0.8	1.3±0.4
Gulfruby	2/26	5/20	45.0 ± 3.7	red	yellow	13.5 ± 0.8	2.1±0.1
Hei tao	2/18	5/20	45.1 ± 6.3	purple	red	12.7 ± 1.4	0.8±0.1
Hei yeh	2/3	6/10	41.5 ± 7.3	red	yellow	12.8 ± 0.4	0.9±0.2
Hsi kua	2/15	6/8	49.8 ± 7.2	red	red	12.4 ± 0.7	0.9±0.1
Hsieh ken	2/11	5/31	36.3 ± 8.4	red	red	10.2 ± 1.0	1.3±0.2
Hshing tsai	1/28	5/12	25.6 ± 10.2	red	yellow	11.2 ± 1.2	1.1±0.1
Huang jou	2/5	5/31	30.0 ± 3.4	yellow	yellow	10.3 ± 1.8	1.6±0.2
Huang kan	2/4	5/22	33.4 ± 4.5	yellow	yellow	10.1 ± 1.4	1.8±0.2
Hung jou	2/12	6/1	20.3 ± 4.5	red	red	12.1 ± 1.3	1.1±0.1
Hung mei jen	3/20	7/10	25.4 ± 4.2	red	red	13.5 ± 1.2	1.5±0.3
Kou shih	1/28	5/30	23.7 ± 5.7	red	yellow	9.3 ± 0.6	0.9±0.2
Ornamental plum	3/20	----	-----	----	----	----	----
Reubennel	3/20	7/10	57.5 ± 5.4	red	yellow	14.1 ± 0.7	1.8±0.1
Sha lien	2/8	5/30	17.4 ± 4.2	red	yellow	10.3 ± 1.1	1.5±0.2
Shui li	2/9	5/20	21.5 ± 4.7	red	yellow	11.5 ± 1.5	0.9±0.2
Ta hung	2/5	5/31	30.3 ± 6.2	red	red	11.7 ± 0.4	1.2±0.2
Tou pan	2/11	5/30	26.8 ± 4.3	red	yellow	11.0 ± 1.2	1.5±0.4
Tung shan sha lien	2/5	5/31	21.7 ± 4.1	red	yellow	11.1 ± 0.5	1.3±0.2
Tzao sheng yi lan	1/28	4/30	17.9 ± 4.5	red	yellow	10.2 ± 0.5	1.6±0.1
Woan sheng sha lien	2/4	5/31	20.6 ± 4.4	red	yellow	12.7 ± 0.5	1.3±0.1
Wu mei	2/18	6/8	43.8 ± 4.1	purple	red	13.5 ± 0.5	0.7±0.1
Yen chih	2/1	6/10	39.0 ± 5.2	red	yellow	11.0 ± 0.8	1.3±0.4
Yi lan	1/28	4/30	18.4 ± 3.1	red	yellow	10.4 ± 0.6	1.5±0.1
87-6	3/9	6/5	81.0 ± 16.3	red	yellow	9.3 ± 0.4	1.5±0.3
87-7	2/15	5/12	80.2 ± 8.9	red	yellow	11.3 ± 1.1	2.2±0.4
87-10	2/22	5/15	65.9 ± 4.7	red	yellow	10.4 ± 0.7	2.6±0.3
87-11	3/1	6/5	69.3 ± 5.4	yellow	yellow	11.0 ± 0.6	2.2±0.3

² 25% of the fruit on the tree have reached commercial harvest maturation.

固形物含量在 9.3~14.1 Brix 之間，可滴定酸的含量則介於 0.7~2.1%之間，品系間之差異甚大，為爾後品種改良工作，提供良好的種質資源基礎，台灣消費者偏好高糖、低酸型的李子，可滴定酸的含量在 1%以下的品種為品種改良上值得注意的親本。

DNA 抽取及純化

本作物因二次代謝物多，其 DNA 的抽取及純化較難。與李同屬的桃因單寧、多糖體、酚類及色素較多，DNA 抽取更為困難，其中酚類氧化後與 DNA 緊密結合，純化難度也較高(郭等 2002)。在試驗過不同時期及不同部位組織的 DNA 抽取率後，以春天剛萌芽之嫩葉 DNA 抽取百分率最高，純化也較容易。DNA 的抽取採用修正過之 CTAB 法，所得的 DNA OD₂₆₀ 值在 1.86 以上。

RAPD 分析

以 Operon kit OPA-OPJ, OPAA-OPAE 及 UBC1-20 共 320 條隨機引子篩選試驗材料，得到 30 個引子對試驗材料之 DNA 可呈現多型性且再現性良好(OPA2, OPA18, OPB10, OPB17, OPC11, OPF4, OPG2, OPG3, OPG5, OPG6, OPG10, OPG17, OPH3, OPH4, OPH8, OPH13, OPH18, OPH19, OPI2, OPI7, OPI9, OPI12, OPI14, OPI17, OPJ20, OPAA1, OPAA4, OPAA6, OPAC3, UBC17)。由此 30 個引子所獲得的 RAPD 產物在電泳膠片上總共產生 224 個可辨識之條帶，其中 190 條多型性條帶，占 84.8%。每個隨機引子擴增的 DNA 條帶數在 4-12 條之間，條帶大小介於 220bp 至 2500bp。整體而言，所篩選的隨機引子以 OPG, OPH 及 OPI 三組的擴增效果最好(表 3)。以 OPH8 引子進行 PCR 反應結果獲得最多之多型性片段，其中包含可供鑑別“黑葉李”的特殊片段(520bp)(圖 1 及表 4)。OPG5 引子擴增結果產生 9 條多型性 DNA 片段，其中 500 及 650bp 之片段，分別為“87-7”及“Reubennel”品種標誌之特定條帶(圖 2 及表 4)，總計 30 條隨機引子擴增結果共獲得 OPG3(1125), OPG2(1350), OPG5(650), OPG5(500), OPB10(850), OPAA(920), OPH8(580), OPI(880)等 8 條多型性 DNA 片段，依序作為觀賞李(*P. pissardi*)、 “紅美人”、“Reubennel”、“87-7”、“杏菜李”、“狗屎李”、“黑葉李”、“紅肉李”等 8 個李品種的鑑別標誌。各群或分群中也篩選出特殊 DNA 片段，如第一群中“紅肉李”及“大紅李”分群的 AA(500)，“黃肉李”及“黃柑李”分群的 AA6(480)，第二群“二紅李”、“西瓜李”分群的 H8(430)及 I14(640)，“黑桃李”、“血根李”、“烏梅李”、“成功大紅肉李”分群的 G5(850)及 H8(800)，第三群“沙連李”等四品種的 G17(630)，“長葉李”及“水李”的 AA6(750)，第四群的 H3(580)，第五群的 G5(900)，第六群的 H8(1600)(表 4)。

親緣關係分析

將篩選得到的 30 條隨機引子其 RAPD 產物產生之 224 個可辨識之條帶，進行未加權平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)群集分析，並以 Jaccard's 相似度係數分析，來估算試驗品種間之遺傳相似度係數。再以相似度係數矩陣(similarity coefficient matrix)繪製相似度樹狀圖(dendrogram)，相似度係數越高代表親緣關係越近。分析結果 30 個李種原可分為九群：第一群包括“黑葉李”、“紅肉李”、“大紅李”、“黃肉李”及“黃柑李”，這一群的五個品種中“黃肉李”及“黃柑李”為黃皮黃肉的品種，其餘三品種為紅皮紅肉的品種。第二群為“黑桃李”、“血根李”、“烏梅李”、“成功大紅肉李”、“二紅李”、“西瓜李”，六品種皆為紅皮紅肉的品種。第三群為“胭脂李”、“長葉李”、“水李”、“頭斑李”、“沙連李”、“冬山沙連李”、“晚生沙連李”和“狗屎李”八個紅皮黃肉的品種。第四群包括“杏菜李”、“宜蘭李”及“早生宜蘭李”。來自佛羅里達的“87-6”及“87-7”為第五群，“87-10”、“87-11”及“Gulfruby”為第六群，“Reubennel”、“紅美人”、觀賞李(*P. pissardi*)則各自成為一群(圖 3)。在所分析的 30 個品種中，遺傳相似度係數介於 0.32-0.94 之間，“冬山沙連李”、“頭斑李”、“沙連李”的遺傳相似度係數達 0.94，為試驗品種中親緣關係最接近者，“血根李”及“成功大紅肉李”，“烏梅李”和“黑桃

李”，“宜蘭李”及“早生宜蘭李”的遺傳相似度係數為 0.88，共為親緣關係次近的品種。觀賞李(*P. pissardi*) 與其他品種的親緣關係的遺傳相似度係數僅為 0.32，親緣關係最遠。“紅美人”與其他試驗品種的遺傳相似度係數為 0.45，為與其他品種親緣關係次遠的品種。

表 3. 30 個 RAPD 引子在李品種上擴增結果

Table 3. Observed polymorphism with 30 primers used for RAPD analysis in 30 plum cultivars

Primer code	Primer Sequence 5'→3'	No. of polymorphism bands	No. of amplified bands	Band size (bp)	
				Min.	Max.
OPA 2	TGCCGAGCTG	4	6	450	900
OPA 18	AGGTGACCGT	4	6	500	1100
OPB 10	CTGCTGGGAC	4	7	320	1500
OPB 17	AGGGAACGAG	5	7	550	1250
OPC 11	AAAGCTGCGG	2	3	450	550
OPF 4	GGTGATCAGG	8	8	800	2250
OPG 2	GGCACTGAGG	7	7	400	1900
OPG 3	GAGCCCTCCA	7	8	650	1850
OPG 5	CTGAGACGGA	9	9	480	1875
OPG 6	GTGCCTAACC	3	4	900	1750
OPG 10	AGGGCCGTCT	5	8	560	1550
OPG 17	ACGACCGACA	11	11	600	1500
OPH 3	AGACGTCCAC	5	7	420	1280
OPH 4	GGAAGTCGCC	5	5	830	1800
OPH 8	GAAACACCCC	12	12	430	1875
OPH 13	GACACCACAC	8	9	750	1600
OPH 18	GAATCGGCCA	7	7	650	1550
OPH 19	CTGACCAGCC	4	5	550	1450
OPI 2	GGAGGAGAGG	8	8	500	1550
OPI 7	CAGCGACAAG	6	6	500	2250
OPI 9	TGGAGAGCAG	8	8	500	1550
OPI 12	AGAGGCACA	10	11	450	1550
OPI 14	TCACGGCGGT	10	11	220	1850
OPI 17	GGTGGTGATG	3	4	380	950
OPJ 20	AAGCGGCCTC	8	12	400	2500
OPAA 1	AGACGGCTCC	6	7	400	1000
OPAA 4	AGGACTGCTC	3	5	500	1500
OPAA 6	GTGGGTGCCA	8	9	400	1150
OPAC 3	CACTGGCCCA	3	6	430	1250
UBC 17	CCTGGGCCTC	7	8	650	1600
TOTAL		190	224		

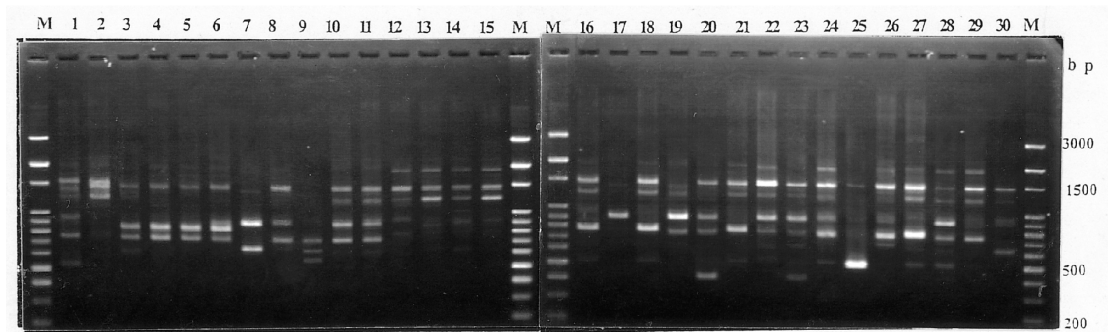


圖 1. 以 OPH8 為引子之 30 個李品種 RAPD 圖譜。(1~30 為李品種代號, 詳見表 1。)

Fig. 1. RAPD patterns of 30 plum cultivars obtained with primers OPH8. Line numbers at top refer to the number in Table 1. M= molecular weight marker.

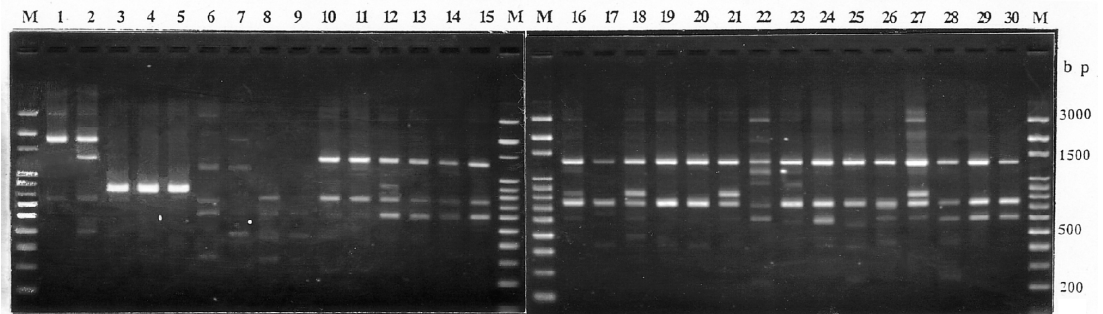


圖 2. 以 OPG5 為引子之 30 個李品種 RAPD 圖譜。(1~30 為李品種代號, 詳見表 1。)

Fig. 2. RAPD patterns of 30 plum cultivars obtained with primers OPG5. Line numbers at top refer to the number in Table 1. M= molecular weight marker.

討 論

果樹品種親緣關係是果樹種原保育研究的重要研究項目, 可以作為果樹引種及遺傳育種之科學依據。Bellini 等(1998)利用 RAPD 技術分析 20 種東方李、7 種歐洲李、杏李、櫻桃李、杏及桃的親緣關係, 結果顯示李的聚落(東方李及歐洲李)與杏及桃, 明顯區隔開來, 杏李與櫻桃李的聚落介於杏與李的聚落之間, 東方李的遺傳歧異度大於歐洲李, 此說明 RAPD 技術是研究果樹親緣關係的有效方法。本試驗 RAPD 分析結果, 可將 30 個參試李品種分為九群, 如同預期, 觀賞李 (*P. pissardi*) 因屬不同種, 與其他李品種親緣關係最遠。其餘 29 品種依來源國別不同, 而聚集為台灣品種、佛羅里達品種、南非品種及中國大陸品種四個區。佛羅里達李品種有台灣李的血統(Sherman & Lyrene 1985; Sherman *et al.* 1992), 因此其親緣關係與台灣品種較南非及大陸品種近。

本試驗首次揭明台灣李品種之親緣關係, 並篩選到品種、分群或群的 DNA 多型性片段, 下一阶段的工作則為評估利用這些 DNA 多型性片段作為分子標記協助選拔(Marker Assisted Selection, MAS)之可行性。AA(500)片段為黃肉黃皮品種之專一標記, 此一分群品種帶有特殊香氣, H3(580)片段則為早生品種群之專一標記, 如果這些分子標記可以運用在雜交後代選拔上, 有助於節省選拔所需的空間

及金錢。國內李種原冬季休眠所需的低溫時數少，為世界上重要的低需冷性李種原基因庫（Wen & Sherman 2003），經過仔細的特性評估，發現部分品種特性優異，如“黃肉李”、“黃柑李”具有獨特的香氣，“黑桃李”、“黑紫李”及“水李”的果皮不帶澀味，皆為育成高品質李的良好親本，若有計劃進行育種，應可育出具有競爭力的優良品種，振興國內李產業。

表 4. 李品種之特定 RAPD 片段

Table 4. Specific RAPD fragments of plum cultivars

Cultivars	Primer revealing specific fragments (base pair)
Ornamental plum	G3(1125)
Hung mei jen 紅美人	G2(1350)
Reubennel	G5(650)
87-6	H8(1600)
87-7	H8(1600), G5(500)
87-10	G5(900)
87-11	G5(900)
Gulfruby	G5(900)
Hshing tsai 杏菜	H3(580), B10(850)
Yi lan 宜蘭	H3(580)
Tzao sheng yi lan 早生宜蘭	H3(580)
Kou shih 狗屎	AA1(1000), AA6(920)
Yen chih 胭脂	AA1(1000)
Shui li 水李	AA1(1000), AA6(750)
Chang yeh 長葉	AA1(1000), AA6(750)
Woan sheng sha lien 晚生沙連	AA1(1000), G17(630)
Tung shan sha lien 冬山沙連	AA1(1000), G17(630)
Sha lien 沙連	AA1(1000), G17(630)
Tou pan 頭斑	AA1(1000), G17(630)
Erh hung 二紅	H8(430), I14(640)
Hsi kua 西瓜	H8(430), I14(640)
Wu Mei 烏梅	G5(850), H8(800)
Hei tao 黑桃	G5(850), H8(800)
Hsieh ken 血根	G5(850), H8(800)
Cheng kung ta hung jou 成功大紅肉	G5(850), H8(800)
Huang jou 黃肉	AA6(480)
Huang kan 黃柑	AA6(480)
Hei yeh 黑葉	H8(520)
Hung jou 紅肉	AA6(500), I2 (880)
Ta hung 大紅	AA6(500)



圖 3. 30 個李品種之 RAPD 遺傳相似度聚類分析樹狀圖。

Fig. 3. Dendrogram illustrating genetic relationship among 30 plum varieties, constructed by Jaccard's distance and UPGMA clustering method from 224 RAPD markers.

引用文獻

- 王昭月、范明仁、羅舜芳。1997。利用 RAPD 分子標誌估測番椒屬種原歧異性之研究。中華農業研究 46(4):314-323。
- 王昭月、莊耿彰、范明仁。2001。以 ISSR 與 RAPD 分子標誌分析火鶴花栽培種間遺傳相似性。中華農業研究 50(1):54-67。
- 李文立。1997。台灣原生鐵炮百合及台灣百合形態調查與 RAPD 多型性分析。國立台灣大學碩士論文。72 pp。
- 林政潔。1998。利用型態性狀與 RAPD 標誌在番椒品種鑑別應用之研究。國立中興大學碩士論文。台中，台灣。146 pp。
- 吳樹敬、陳學森。2003。杏品種的 RAPD 分析。果樹學報 20(2):107-111。
- 范明仁、王昭月、羅舜芳、許庭榮、曹文隆、楊金興、鄭耀星。1999。台灣落花生種原親緣關係之研究 II。應用 RAPD 進行落花生種原親緣關係之研究。中華農業研究 48(2):67-85。
- 郭金英、范崇輝、王力榮、朱更瑞、方偉超、李紅娟。2002。桃基因組 DNA 提取方法及部位的比較研究。果樹學報 19(3):205-207。
- 程中平、陳志偉、胡春根、鄧秀新、羅正榮。2001。利用 RAPD 標記對桃品種特殊種質分析。果樹學報 18(4):217-220。
- 溫英杰、許財誠。2003。利用 RAPD 技術分析桃種原親緣關係。中華農業研究 52:143-151。
- 翁儷倩、楊雯如、張龍生、林宗賢。2003。桶柑遺傳崎異性之分析。中國園藝 49(1):19-32。
- 柯見螢、楊堯文、陳福旗。2003。利用逢機擴大多型性標記探討白鶴芋品種之遺傳變異性。中國園藝 49(1):45-54。
- 俞德俊。1979。中國果樹分類學。p.54。農業出版社。中國。北京。
- 楊新國、張開春、秦嶺、王永熙。2001。桃種質親緣演化關係的 RAPD 分析。果樹學報 18(5):276-279。
- 潘新法、孟祥助、曹廣力、徐春明。2002。RAPD 在枇杷品種鑑定中的應用。果樹學報 19(2):136-138。
- 鄧九生、賴至昌、彭民璋。1999。幾個芒果品種的 RAPD 分析。果樹科學 16(2): 156-158。
- 羅正榮、米森敬三、杉浦明。1998。應用 RAPD 技術研究柿品種間的親緣關係。果樹科學 15(4):311-316。
- 譚冬梅、羅淑萍、李疆、韓海濤。2003。阿月渾子性別鑑定的 RAPD 分析。果樹學報 20(2):124-126。
- Anuntalabhochai, S., R. Chundet, J. Chiangda, and P. Apavatjirut. 2002. Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. Acta Hort. 575:253-260.
- Bartolozzi, F., M. L. Warburton, S. Arulsekhar, and T.M. Gradziel. 1998. Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Am. Soc. Hort. Sci. 123(3):381-387.
- Bellini, E., E. Giordani, V. Nencetti, and D. Paffetti. 1998. Genetic relationships in Japanese plum cultivars by molecular markers. Acta Hort. 478:53-59.
- Botta, R., A. Akkarak, and V. Casavecchia. 1998. Identification of pear cultivars by molecular markers. Acta Hort. 457:63-70.
- Botta, R., A. Akkarak, D. Marinoni, G. Bounous, S. Kampf, H. Steinkellner, and C. Lexer. 1999. Evaluation of microsatellite markers for characterizing chestnut cultivars. Acta Hort. 494:277-282.
- Chaparro, J. X., D. J. Werner, D. O'Malley, and R. R. Sederoff. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. Appl. Genet. 87:805-814.

- Damasco, O. P., G. C. Graham, R. J. Henry, S. W. Adkins, M. K. Smith, and I. D. Godwin. 1996. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Rep.* 16:118-123.
- Fanizza, G., G. Colonna, P. Resta, and G. Ferrara. 1999. The effect of the number of RAPD markers on the evaluation of genotypic distances in *Vitis vinifera*. *Euphytica* 107:45-50.
- Fielder, J., G. Bufler, and F. Bamgerth. 1998. Genetic relationships of avocado using RAPD markers. *Euphytica* 101:249-255.
- Harada, T., K. Matsukawa, and T. Sato. 1993. DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* 65:87-91.
- Jaccard, P. 1901. Study of comparative distribution of flower in the portion of Alpes and Jura. (Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura.) *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 37:547-549. (with English Abstract)
- Koller, B., A. Lehmann, J. M. McDermott, and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:901-904.
- Lanham P. G. and R. M. Brennan. 2001. Genetic diversity in *Ribus*. *Acta Hort.* 546:135-144.
- Moreno, S., Y. Gorgocena, and J. M. Ortiz. 1995. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hortic.* 62:237-243.
- Nicese, F. R., J. I. Hormaza, and G. H. McGranahan. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut genotype based on RAPD markers. *Euphytica* 101:199-206.
- Oliveira, C. M., M. Mota, L. Monte-Corvo, L. Goulao, and D. M. Silva. 1999. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. *Sci. Hortic.* 79:163-174.
- Qu, X., J. Lu, and O. Lamikanra. 1996. Genetic diversity in Muscadine and American bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121:1020-1023.
- Quarta, R., M. T. Dettori, I. Verde, U. Marchesi, and M. A. Palombi. 2000. Characterization and evaluation of genetic diversity in peach germplasm using RAPD and RFLP markers. *Acta Hort.* 546:489-496.
- Schnell, R. J., C. M. Ronning, and R. J. Knight, Jr. 1995. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:269-274.
- Sherman, W. B. and P. M. Lyrene. 1985. Progress in low-chill plum breeding. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 98:164-165.
- Sherman, W. B., P. M. Lyrene, N. F. Childers, F. G. Gmitter, and P. C. Andersen. 1988. Low chill peach and nectarine cultivars for trial in Florida. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 101:241-244.
- Sherman, W. B., B. L. Topp, and P. M. Lyrene. 1992. Japanese-type plums for subtropical climates. *Acta Hort.* 317: 149-153.
- Sondur, S. N., R. M. Manshardt, and J. I. Stiles. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 93:547-553.
- Stiles, J. I., C. Lemme, S. Sondur, M. B. Morshidi, and R. Manshardt. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 85:697-701.

- Warburton, M. L. and F. A. Bliss. 1996. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121:1012-1019.
- Wen, I. C. and W. B. Shermam. 2003. Developing low chill, high quality Japanese plums in subtropical Taiwan. *Acta Horti.* 622:437-441.
- Wiesman, Z., N. Avidan, S. Lavee, and B. Quebedeaux. 1998. Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the west bank using randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123(5):837-841.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18:6531-6535.

Evaluation and Genetic Relationship Analysis by RAPD on Oriental Plum Germplasm¹

Ien-Chie Wen^{2,4} and Yi-Ling Liu³

Summary

Wen, I. C. and Y. L. Liu. 2004. Evaluation and genetic relationship analysis by RAPD on oriental plum germplasm. *J. Agric. Res. China* 53: 97-110.

Taiwan local plums are adapted to subtropical climates with a low cu winter and become the important low chill plum genepool in the world. Varieties “Huang jou” and “Huang kan” have a distinct aroma, and “Hei tao”, “Hei tzyy”, and “Shui li” have sweet skin (non-astringent). All of them are valuable parents for low chill plum breeding. The genetic relationships of 30 plum cultivars were analyzed by using RAPD markers. A total of 320 primers were screened for their ability to produce strongly amplified products. Out of 30 primers amplified 224 DNA bands, 190 of which were polymorphic (84.8%). A dendrogram based on the UPGMA cluster analysis was constructed. All tested plum cultivars were divided into nine groups, including 4 groups of local varieties. Varieties “Tung shan sha lien”, “Sha lien” and “Tou pan” had 94% similarity indexes, indicating that they have the closest genetic relationship. Nevertheless, variety *P. pissardi* has the farrest genetic relationship with other tested plum variety due to only 32% similarity indexes among them.

Key words: *Prunus salicina*, Germplasm evaluation, RAPD.

-
1. Contribution No.2192 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted : May 5, 2004.
 2. Associate Researcher, Plant Germplasm Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Former project assistant, Plant Germplasm Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: icwen@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23331673.