

櫻花種原評估及其親緣關係之研究¹

溫英杰^{2,4} 張靜誼³

摘要

溫英杰、張靜誼。2005。櫻花種原評估及其親緣關係之研究。台灣農業研究 54:245-256。

台灣山櫻 (*Prunus campanulata* Maxim.) 花色艷麗，為低需冷性櫻花與櫻桃育種的重要親本，台灣植物誌中只有緋紅色花、花朵懸垂鐘狀漏斗型之記載。本研究蒐集到花瓣白色、不同程度的紅色及粉紅色，花瓣閉合程度不同，花朵不具典型懸垂特性以及大果、果實較不澀等品系。利用 RAPD 分析 29 個櫻花品種進行遺傳相似度分析，由 300 條隨機引子中篩選出 11 條引子共擴增 147 條條帶，其中多態性條帶有 121 條占 82.3%。群集分析結果顯示，29 個試驗品系可分為四群，遺傳相似度係數介於 0.13-0.93 之間，重瓣山櫻 2 和 3 無法區分，顯示兩者可能為同一品系之無性繁殖植株，二者與重瓣山櫻 4 的遺傳相似度係數為 0.9，為試驗品種中親緣關係最接近者。蘭嶼野櫻(*Prunus grisea* Kalkm)與其他品種的遺傳相似度係數僅為 0.13，顯示其與其他品種的親緣關係最遠。

關鍵詞：櫻花、種原評估、隨機增殖多型性 DNA。

前言

櫻花屬薔薇科 (*Rosaceae*) 李屬 (*Prunus*) 的落葉喬木，主要作為觀賞花木之用。李屬 (*Prunus*) 是個大屬，包括桃、李、梅、杏、櫻桃等重要果樹，這些果樹果實大小和形狀差異很大，但花的構造基本上一致，因此歸為同屬。有些植物分類學者認為，這些果樹在芽的排列、花序、果實、核等均有差異，主張分為桃屬 *Amygdalus*，杏屬 *Armeniaca*，李屬 *Prunus*，櫻桃屬 *Cerasus*，稠李屬 *Padus* 等五屬 (俞 1979)，在此一分類法下櫻花則歸於櫻桃屬 *Cerasus*，由於並非所有分類學家皆支持此一分類方式，本文仍採用傳統分類方式將櫻花歸於李屬 *Prunus*。

台灣是多種櫻花的起源地，台灣山櫻 (*Prunus campanulata* Maxim.) 是世界上需冷性最少、花色最為濃艷的櫻花品種，花朵濃紅色、單瓣、吊鐘型，花冠筒中含蜜汁，果實成熟時呈艷紅色，是訪花昆蟲及鳥類的重要食物來源，對環境、土壤的適應性強，從平地到海拔 3000 m 的高山都可以生長的很好，為台灣春季重要觀賞樹木。霧社櫻 (*Prunus taiwaniana* Hayata) 是台灣特產的櫻花，花朵單瓣、白色，2-6 朵簇生，花萼筒膨大成圓形為其明顯特徵，樹形高大、枝條軟而細長，冬季休眠時所需低

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2244 號。接受日期：94 年 12 月 6 日。
2. 本所作物種原組副研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
3. 本所作物種原組研究助理。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：icwen@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23331673。

溫時數較高，自然分布地點在台灣的中、高海拔地區。阿里山山櫻 (*Prunus transarisanensis* Hayata.) 也是台灣特有的櫻花，分布於本省的高海拔地區，花朵中大、粉白色、2-3 朵叢生，小花梗較長是其特徵。這些台灣原生櫻花在自然的演化中，發展出豐富的類型，例如台灣山櫻的花色有白色、粉紅、濃紅，花型有單瓣、複瓣和重瓣，花瓣的寬窄也產生了變化；阿里山山櫻的花色也有白色、粉白及粉紅的變化，這些變化同時也帶來傳統分類上的困擾。因此同一種櫻花在地方可能有不同名稱，而同名的櫻花可能包含數個品種，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條帶，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研究有越來越多的趨勢，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 (溫等 2003)、李 (溫等 2004) 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櫻花種原超過 35 種，其中包括由其他國家引入的櫻花種原與本省的櫻花品種，彼此之間的親緣關係有待查明，以作為品種改良及種原核心保存之參考。

材料與方法

植物材料

試驗所用材料由定植於南投縣信義鄉海拔 850 m 之羅娜種原保存園保存之種原及霧社、阿里山、梨山、六龜、豐原、新社等地選取之試驗材料，羅娜種原保存園保存之種原嫁接於台灣山櫻實生砧，10 年生，其餘材料推估為 12-30 年生，其名稱及來源詳如表 1。

種原特性調查

調查項目包括：開花日期、花朵形態 (單或複瓣)、形狀、顏色及香味、果實顏色及食味 (甜或具澀味) 等。調查標準如下：開花日期：全株約有 50% 的花朵開花。

表 1. 試驗所用櫻花品種名稱及來源

Table 1. The original and name of 29 flowering cherry cultivars used in this study

No.	Cultivar name	Scientific name	Locate of material	Country of origin
1	Wu-sheh Ying 1 霧社櫻 1	<i>Prunus taiwaniana</i> Hayata	Wu-sheh	Taiwan
2	Wu-sheh Ying 2 霧社櫻 2	<i>Prunus taiwaniana</i> Hayata	Wu-sheh	Taiwan
3	Wu-sheh Ying 3 霧社櫻 3	<i>Prunus taiwaniana</i> Hayata	Wu-sheh	Taiwan
4	Wu-sheh Ying 4 霧社櫻 4	<i>Prunus taiwaniana</i> Hayata	Wu-lin	Taiwan
5	Wu-sheh Ying 5 霧社櫻 5	<i>Prunus taiwaniana</i> Hayata	Wu-lin	Taiwan
6	Wu-sheh Ying 6 霧社櫻 6	<i>Prunus taiwaniana</i> Hayata	Wu-lin	Taiwan
7	Ryukyu Ying 1 琉球櫻 1	<i>Prunus campanulata</i> cv. Ryukyu-hizakura	A-li-shan	Japan
8	Ryukyu Ying 2 琉球櫻 2	<i>Prunus campanulata</i> cv. Ryukyu-hizakura	Wu-lin	Japan
9	Jyi-yee Ying 吉野櫻	<i>Prunus x yedoensis</i> cv. Yedoensis	A-li-shan	Japan
10	Da-dao Ying 大島櫻	<i>Prunus lannesiana</i> Wilson var. speciosa	A-li-shan	Japan
11	Taa-shan Ying 塔山櫻	<i>Prunus obtusata</i> Koehne	A-li-shan	Taiwan
12	Puu-shyan shianq Ying 普賢象櫻	<i>Prunus lannesiana</i> cv. Albo-rosea	A-li-shan	Japan
13	Jau-her Ying 昭和櫻	Unknow	Wu-feng	Japan
14	Pink lady	Unknow	Wu-feng	Japan
15	Lan-yeu yee Ying 蘭嶼野櫻	<i>Prunus grisea</i> Kalkm	Lan-yeu	Taiwan
16	Taiwan shan Ying 1 台灣山櫻 1(紅)	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Wu-sheh	Taiwan
17	Taiwan shan Ying 2 台灣山櫻 2(紅)	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	A-li-shan	Taiwan
18	Taiwan shan Ying 3 台灣山櫻 3(紅)	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Rona	Taiwan
19	Taiwan shan Ying 4 台灣山櫻 4(紅)	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Rona	Taiwan
20	Taiwan shan Ying 5 台灣山櫻 5(粉紅)	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Li-shan	Taiwan
21	Taiwan shan Ying 6 台灣山櫻 6(粉紅)	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	A-li-shan	Taiwan
22	Taiwan shan Ying 7 台灣山櫻 7(紅)	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Liow-guei	Taiwan
23	Taiwan shan Ying 8 台灣山櫻 8(粉紅)	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Liow-guei	Taiwan
24	Bai shan Ying 白山櫻	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Ba-ton-gum	Taiwan
25	Chornng bann shan ying 1 重瓣山櫻 1	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Feng-yuan	Taiwan
26	Chornng bann shan ying 2 重瓣山櫻 2	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Wu-feng	Taiwan
27	Chornng bann shan ying 3 重瓣山櫻 3	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Rona	Taiwan
28	Chornng bann shan ying 4 重瓣山櫻 4	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Shin-sheh	Taiwan
29	Chornng bann shan ying 5 重瓣山櫻 5	<i>Prunus campanulata</i> Maxim	Wu-feng	Taiwan

DNA 之抽取方法

從不同植株採取新鮮的嫩葉 0.1~0.2 g，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 [100 mM Tris-HCl, pH8.0; 20 mM EDTA; 1.4M NaCl; 2% (w/v) CTAB; 1% (v/v) PEG6000; 0.5% (v/v) 2-Mercaptoethanol] 600 µl，輕輕混勻後，置於 65°C 水浴鍋中 30 min，取出靜置至室溫。加入 600 µl chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1, v/v)混勻，以 9,000 rpm (MICRO 240A, Denville Scientific Inc.)離心 10 min。取上層液至新的微量離心管中，加入 400 µl 的異丙醇 (Isopropanol)混勻，再以 9,000 rpm 離心 10 min。去上清液，加入 1 ml 的洗滌緩衝液 (washing buffer) [76% (v/v) ethanol; 10 mM ammonium acetate] 清洗沈澱物，再以 9,000 rpm 離心 10 min。去上清液，沈澱物以真空乾燥之。沈澱物溶於 50 µl TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH7.4; 1 mM EDTA)中，加入 RNaseA，使其最後濃度為 50 mg/ml，於 37°C 下反應 1 hr。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 30 ng 的 genomic DNA 當模板，在反應溶液總體積 30 μ l 中進行聚合酵素連鎖反應。其溶液中另含有 10 mM Tris-HCl, pH9.0; 50 mM 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, USA.)，引子採用 Operon kit (Operon kit: OPAA-OPAE, OPA-OPJ 共 300 條)，並在溶液上層加入 50 μ l 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 $^{\circ}$ C 3 min \rightarrow 37 $^{\circ}$ C 1 min 20 sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 sec，當第一個循環(cycle)；再以 94 $^{\circ}$ C 1 min 20 sec \rightarrow 37 $^{\circ}$ C 1 min 20 sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 2 min 20 sec，進行 44 個循環，反應完成時自動保存於 4 $^{\circ}$ 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 1.5% 瓊脂膠體 (Agarose, Boehringer Mannheim GmbH Germany) 進行電泳，時間約 30 min。電泳後以 0.5 mg/ml ethidium bromide 染色 20-30 min，於 UV 燈下觀察膠體 DNA 多型性片段，照相及貯存影像於 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 片段相似性並建立其親緣關係圖。

結 果

種原特性調查

台灣山櫻 (*Prunus campanulata* Maxim) 為櫻花品種中冬季休眠需冷量最低者，與桃指標品種如 'Okinawa' (150 chill unit, cu) 之開花期相比較 (Sherman *et al.* 1988)，推斷台灣山櫻之低溫需求單位介於 50-100 cu 之間。台灣山櫻花期早、花色艷紅，為早春時節重要觀賞花卉，在台灣一般以實生繁殖，提供搜尋實生變異種原的機會。表 2 列出參試 29 種櫻花種原之開花期、花朵形態、形狀、顏色及香味、果實顏色及食味。開花期早晚與樹體冬季休眠所需之低溫時數有關，台灣山櫻 1 採自霧社，12 月下旬即有 50% 花朵綻放，為所有參試櫻花種原中開花最早者，估計低溫需求單位為 50 cu。所調查的台灣山櫻種原不僅在花期產生變化，花型及花色也呈現多樣性。台灣山櫻在台灣植物誌 (黃 1993) 及台灣樹木誌 (劉等 1994) 皆只有緋紅色花、花朵懸垂鐘狀漏斗型之記載，但在多年種原採集中，筆者蒐集到花朵乳白色、不同程度的紅色、粉紅色、花瓣閉合程度不同及花朵不具典型懸垂特性的山櫻花。台灣山櫻 2 的花瓣完全閉鎖不會綻放，花色介於紅色及粉紅色之間；台灣山櫻 3 的花朵較直立，不具典型懸垂特性，萼筒則呈淺杯狀；台灣山櫻 4 的果實約為同種台灣山櫻的 3 倍大；台灣山櫻 5 及 6 為採集自梨山及阿里山的粉紅色台灣山櫻；台灣山櫻 7 採自六龜，果實澀味淡，可作為低需冷性櫻桃育種親本；台灣山櫻 8 亦採自六龜，花瓣粉紅色，較直立，不具典型懸垂特性，萼筒呈淺杯狀。白山櫻採自八通關，在發現粉紅色台灣山櫻時即已懷疑台灣山櫻應有開白色花之植株存在，惜未見諸文獻報導，在粉紅色台灣山櫻棲地附近搜尋多年仍無所獲，最後在八通關尋獲此一單株，補齊台灣山櫻花色遺傳上一個失落的環節。白山櫻雖然採集自高海拔地區，但其嫁接苗在海拔 850 m 的羅娜及 90 m 的霧峰皆能正常生育，且物候期與開紅花的台灣山櫻一致，展現其驚人的適應性，這個特性未見於霧

表 2. 試驗所用櫻花種原特性

Table 2. Tree and fruit characteristics of flowering cherry genotypes used in this study

Cultivar name	Flowering date ^z	Flower type	Flower shape	Flower color	Flower fragrance	Fruit color	Fruit taste
Wu-sheh Ying 1 霧社櫻 1	early Mar.	single	flat	white	none	violet black	bitter sour
Wu-sheh Ying 2 霧社櫻 2	early Mar.	single	flat	white	none	violet black	bitter sour
Wu-sheh Ying 3 霧社櫻 3	early Mar.	single	flat	white	none	violet black	bitter sour
Wu-sheh Ying 4 霧社櫻 4	late Mar.	single	flat	white	none	violet black	bitter sour
Wu-sheh Ying 5 霧社櫻 5	late Mar.	single	flat	white	none	violet black	bitter sour
Wu-sheh Ying 6 霧社櫻 6	late Mar.	single	flat	white	none	violet black	bitter sour
Ryukyu Ying 1 琉球櫻 1	mid. Mar.	single	campanulate	pink	none	violet black	bitter
Ryukyu Ying 2 琉球櫻 2	mid. Mar.	single	campanulate	pink	none	violet black	bitter
Jyi-yee Ying 吉野櫻	mid. Apr.	single	flat	white pink	none	greenish red	bitter sweet
Da-dao Ying 大島櫻	early Apr.	single	flat	white	none	violet black	sour
Taa-shan Ying 塔山櫻	late Mar.	single	flat	white	none	red	bitter sour
Puu-shyan shianq Ying 普賢象櫻	late Apr.	double	flat	pink	none	-----	-----
Jau-her Ying 昭和櫻	mid. Apr.	single	flat	pink	none	yellow red	bitter sour
Pink lady	mid. Feb.	single	flat	pink	fragrant	yellow red	sweet sour
Lan-yeu yee Ying 蘭嶼野櫻	mid. Feb.	single	flat	white	none	black	bitter
Taiwan shan Ying 1 台灣山櫻 1(紅)	late Dec.	single	campanulate	deep red	none	violet black	bitter
Taiwan shan Ying 2 台灣山櫻 2(紅)	early Mar.	single	close campanulate	pink-red	none	violet black	bitter
Taiwan shan Ying 3 台灣山櫻 3(紅)	late Jan.	single	shallow cup	deep red	none	violet black	bitter
Taiwan shan Ying 4 台灣山櫻 4(紅)	early Feb.	single	campanulate	deep red	none	violet black	bitter
Taiwan shan Ying 5 台灣山櫻 5(粉紅)	mid. Mar.	single	campanulate	pink	none	violet black	bitter
Taiwan shan Ying 6 台灣山櫻 6(粉紅)	late Mar.	single	campanulate	pink	none	violet black	bitter
Taiwan shan Ying 7 台灣山櫻 7(紅)	late Feb.	single	campanulate	deep red	none	violet black	slightly bitter
Taiwan shan Ying 8 台灣山櫻 8(粉紅)	mid. Mar.	single	shallow cup	pink	none	violet black	bitter
Taiwan shan Ying 台灣山櫻(白)	early Feb.	single	campanulate	white	none	yellow	bitter
Chorng bann shan ying 1 重瓣山櫻 1	late Feb.	double	campanulate	deep red	none	violet black	bitter
Chorng bann shan ying 2 重瓣山櫻 2	late Feb.	double	campanulate	deep red	none	-----	-----
Chorng bann shan ying 3 重瓣山櫻 3	late Feb.	double	campanulate	deep red	none	-----	-----
Chorng bann shan ying 4 重瓣山櫻 4	late Feb.	double	campanulate	deep red	none	-----	-----
Chorng bann shan ying 5 重瓣山櫻 5	late Feb.	single & double	campanulate	deep red	none	violet black	bitter

^z 50% of the flower bloosm.

社櫻、阿里山櫻等其他台灣原生櫻花種類及參試之日本櫻花品種，說明了台灣山櫻蘊藏十分豐富的遺傳訊息。重瓣山櫻開花期較單瓣台灣山櫻約晚 1 個月，由於雄蕊花瓣化，花粉極少，大多不結果，重瓣山櫻 1 是個罕見的例子，約 1/3 的花會結果，這個特性使其成為低海拔重瓣櫻花育種上重要的親本。重瓣山櫻 5 的植株同時具有單、複瓣之花朵，會結少量果實，推測其為單瓣台灣山櫻演化為重瓣台灣山櫻的一個中間品系。

霧社櫻 (*Prunus tawianiana* Hayata) 1-3 為採自霧社之不同單株，4-6 為採自武陵之不同單株，小花，萼筒葫蘆型為其霧社櫻之特徵。琉球櫻 (*Prunus campanulata* cv. *Ryukyu-hizakura*) 分別採自梨山及阿里山地區，粉紅色懸垂鐘形花，枝條較台灣山櫻直立。吉野櫻 (*Prunus x yedoensis* cv. *Yedoensis*)、大島櫻 (*Prunus lannesiana* Wilson var. *speciosa*) 及普賢象櫻 (*Prunus lannesiana* cv. *Albo-rosea*) 採自阿里山地區，為日本普遍栽培的櫻花品種。昭和櫻與 Pink lady 為在低海拔地區生育較佳之日本櫻花品種，原名已不可考，現有名稱為商業上販售之商品名，二者皆開粉紅色單瓣花，都可結實，Pink lady 所結

果實可食用且花具香味，不論在低海拔櫻花或櫻桃育種上，皆為不可多得之親本。塔山櫻 (*Prunus obtusata* Koehne)與蘭嶼野櫻 (*Prunus grisea* Kalkm)為台灣原生櫻花種類，與其他參試品種不同點在於二者皆為穗狀花序。

RAPD 分析

以 Operon kit OPA-OPJ, OPAA-OPAE 共 300 條逢機引子篩選試驗材料，得到 11 個引子(OPA 13, OPG 16, OPH 3, OPH 8, OPH 18, OPI 6, OPAA 1, OPAA 15, OPAB 3, OPAE 10, OPAE 14)對試驗材料之 DNA 可呈現多型性且再現性良好。由此 11 個引子所獲得的 RAPD 產物在電泳膠片上總共產生 147 個可辨識之條帶，其中多型性條帶 121 條，佔 82.3%。每個逢機引子擴增的 DNA 條帶數在 10-16 條之間，條帶大小介於 200 bp 至 1700 bp。整體而言，所篩選的逢機引子以 OPH, OPAA 及 OPAB 三組的擴增效果最好(表 3)。以 OPAA15 引子進行 PCR 反應結果獲得 11 條多型性片段，其中包含可供鑑別蘭嶼野櫻的特殊片段(650 bp)(圖 1 及表 4)。OPH3 引子擴增結果產生 7 條多型性 DNA 片段，其中 850bp 之片段為吉野櫻品種標誌之特定條帶 (圖 2 及表 4)，總計 11 條逢機引子擴增結果共獲得 OPH18 (700), OPG16(1000), OPI6 (1000), OPH18 (420), OPH3 (850), OPH18 (850), OPAA15 (650), OPAE14 (350), OPA13 (1000)等 9 條多型性 DNA 片段，作為琉球櫻、吉野櫻、蘭嶼野櫻等 3 個櫻花品種的鑑別標誌。部分群組或亞群中也篩選出特殊 DNA 片段，如第一群的 H18(700)和 G16(1000)，其中霧社櫻 5 及 6 亞群的 I6(1000)，第三群台灣山櫻 6 及 8 亞群的 A13(1000)(表 4)。

親緣關係分析

將篩選得到的 11 條逢機引子其 RAPD 產物產生之 147 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 29 個櫻花種原可分為四群：第一群包括霧社櫻 1-6、塔山櫻和吉野櫻，這一群的八個品種 (系)中，除了吉野櫻源自日本外，其餘為台灣原生高海拔櫻花品種，採自霧社及武陵的霧社櫻各自成群，塔山櫻與採自武陵的霧社櫻親緣關係較近。第二群為琉球櫻 1-2、普賢象、pink lady、昭和櫻和大島櫻等六個日本櫻花品種。第三群包括 9 個單瓣台灣山櫻及 5 個重瓣山櫻品系。蘭嶼野櫻自成第四群。第三群為台灣山櫻種內變異，大致

表 3. 11 個 RAPD 引子在櫻花品種上擴增結果

Table 3. Observed polymorphism with 11 primers used for RAPD analysis in 29 flowering cherry cultivars

Primer code	Primer Sequence 5'→3'	No. of polymorphism bands	No. of amplified bands	Band size (bp)	
				Min.	Max.
OPA 13	CAGCACCCAC	15	16	200	1700
OPG 16	AGCGTCCTCC	9	13	350	1400
OPH 3	AGACGTCCAC	7	11	430	1500
OPH 8	GAAACACCCC	9	11	410	1400
OPH 18	GAATCGGCCA	8	10	390	1600
OPI 6	AAGGCGGCAG	13	15	280	1300
OPAA 1	AGACGGCTCC	14	16	270	1350
OPAA 15	ACGGAAGCCC	11	13	310	1380
OPAB 3	TGGCGCACAC	13	15	390	1500
OPAE 10	CTGAAGCGCA	11	12	310	1450
OPAE 14	GAGAGGCTCC	11	15	350	1650
TOTAL		121	147		

表 4. 櫻花品種之特定 RAPD 片段

Table 4. Specific RAPD fragments of flowering cherry cultivars

Cultivar	Primer revealing specific fragments (base pair)
Wu-sheh Ying 1 霧社櫻 1	H18 (700), G16 (1000)
Wu-sheh Ying 2 霧社櫻 2	H18 (700), G16 (1000)
Wu-sheh Ying 3 霧社櫻 3	H18 (700), G16 (1000)
Wu-sheh Ying 4 霧社櫻 4	H18 (700), G16 (1000)
Wu-sheh Ying 5 霧社櫻 5	H18 (700), G16 (1000), I6 (1000)
Wu-sheh Ying 6 霧社櫻 6	H18 (700), G16 (1000), I6 (1000)
Ryukyu Ying 1 琉球櫻 1	H18 (420)
Ryukyu Ying 2 琉球櫻 2	H18 (420)
Jyi-yee Ying 吉野櫻	H3 (850), H18 (700), G16 (1000)
Taa-shan Ying 塔山櫻	H18 (700), G16 (1000)
Lan-yeu yee Ying 蘭嶼野櫻	H18 (850), AA15 (650), AE14 (350)
Taiwan shan Ying6 台灣山櫻6 (粉紅)	A13 (1000)
Taiwan shan Ying8 台灣山櫻8 (粉紅)	A13 (1000)

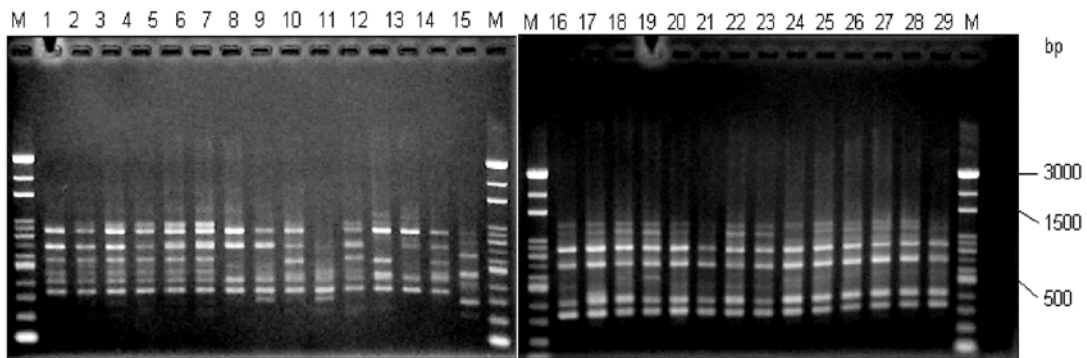


圖 1. 以 OPAA15 為引子之 29 個櫻花品種 RAPD 圖譜。(1~29 為櫻花品種代號，詳見表 1。)

Fig. 1. RAPD patterns of 29 flowering cherry cultivars obtained with primers OPAA15. Line numbers at top refer to the number in Table1. M= molecular weight marker.

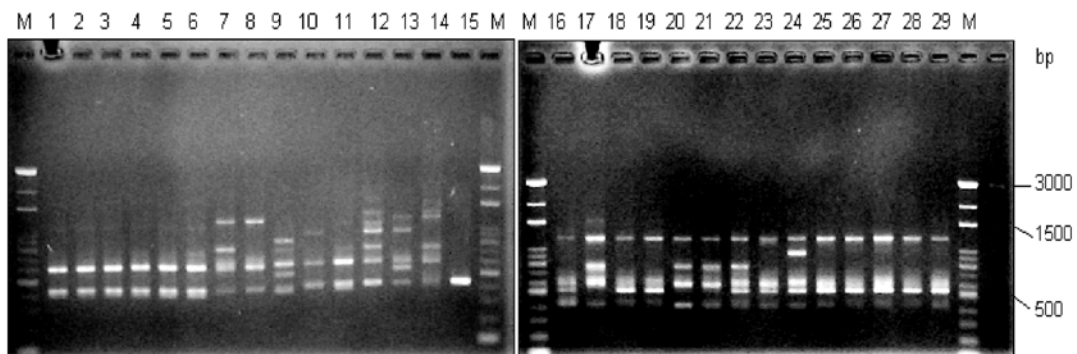


圖 2. 以 OPH3 為引子之 29 個櫻花品種 RAPD 圖譜。(1~29 為櫻花品種代號，詳見表 1。)

Fig. 2. RAPD patterns of 29 flowering cherry cultivars obtained with primers OPH3. Line numbers at top refer to the number in Table1. M= molecular weight marker.

上以花色及花瓣數目分為四個亞群，紅花與白花台灣山櫻成一亞群，開粉紅花的品系成一亞群，重瓣山櫻 1-4 成一亞群，單、複瓣花並存的重瓣山櫻 5 自成一亞群 (圖 3)。在所分析的 29 個品種中，遺傳相似度係數介於 0.13-0.93 之間，重瓣山櫻 2 和 3 無法區分，顯示兩者為同一品系。蘭嶼野櫻與其他品種的親緣關係的遺傳相似度係數僅為 0.13，親緣關係最遠。

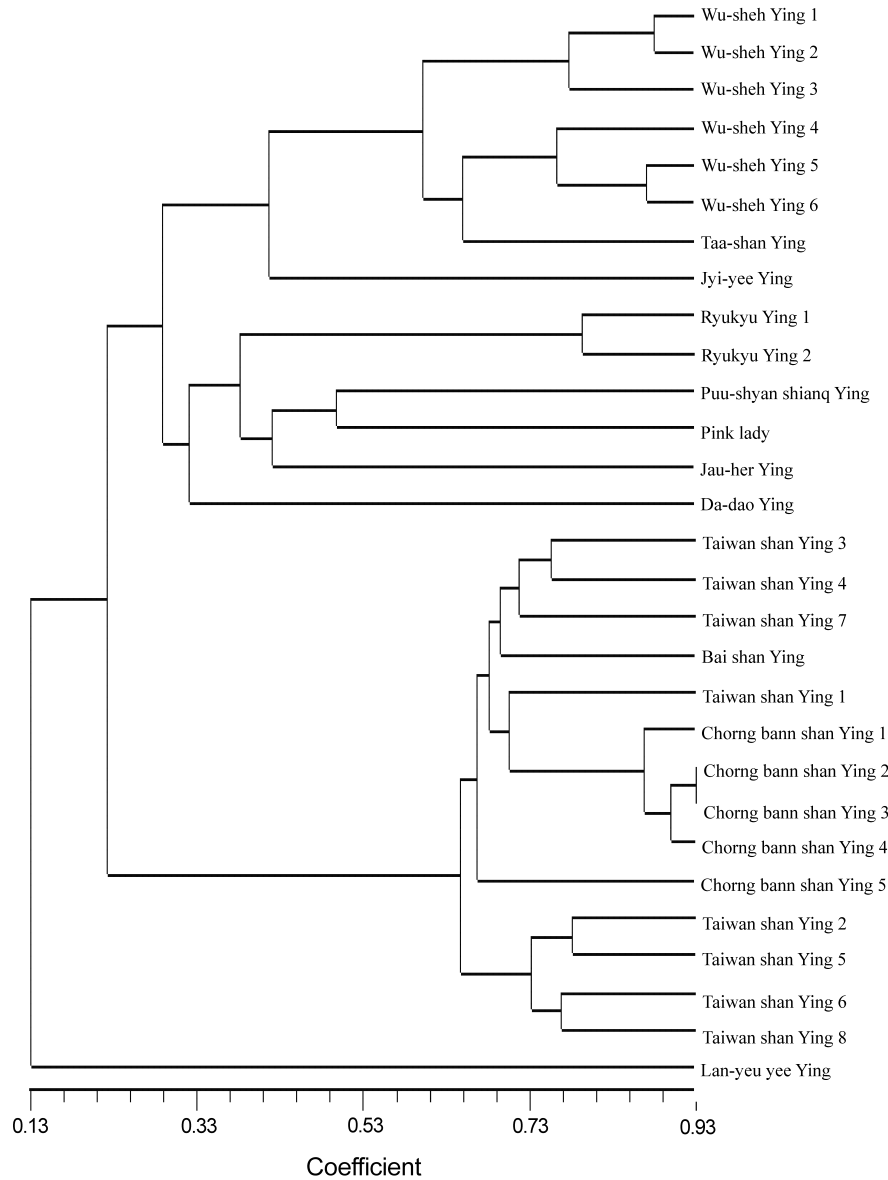


圖 3. 29 個櫻花品種之 RAPD 遺傳相似度聚類分析樹狀圖。

Fig. 3. Dendrogram illustrating genetic relationship among 29 flowering cherry varieties, constructed by Jaccard's distance and UPGMA clustering method from 147 RAPD markers.

討 論

在育成低緯度地區能夠種植，冬季休眠所需低溫時數少的櫻花及櫻桃品種，目前尚無突破性的進展，其原因在於缺乏低需冷 (low-chill) 的親本。本研究經過多年的探查，蒐集到乳白色、不同程度的紅色、重瓣、花瓣閉合程度不同及花朵不具典型懸垂特性的台灣山櫻，台灣山櫻又名緋寒櫻，以花色艷紅而得名，廣植於本省中低海拔地區，為台灣重要春季觀賞花木。在本省中部高海拔山區所採集的白色品系便顯得彌足珍貴。此一色系之出現不僅可為台灣的春天增添不少色彩，在遺傳育種上，更是育成新花色如淡紅、粉紅、淡粉之櫻花品系不可缺的親本。美國佛羅里達大學及澳洲西雪梨大學皆利用台灣山櫻作為育成低需冷性櫻桃之親本 (Byrne *et al.* 2000)，但是台灣山櫻的果實小且澀，無食用價值，育種上需要多次與食用櫻桃回交，才能達成目的，櫻桃的幼年性約 5 年，若需要回交 3 次，育種工作將因過於漫長而無法進行。台灣山櫻 4 的果實約為同種台灣山櫻的 3 倍大，台灣山櫻 7 的果實澀味極淡，這些珍貴的特性，可大大縮短育成低需冷性櫻桃品種所需之年限。

本試驗首次揭明本省櫻花種原之親緣關係，重瓣山櫻有人稱為八重櫻，並謂其源自日本，根據 RAPD 親緣關係分析結果，重瓣山櫻實為台灣山櫻族群裡的一個成員，重瓣山櫻 5 的花單、複瓣皆有，為演化上之佐證。白山櫻在高海拔地區發現，文獻上並無此種花色之記載，在台灣觀光地區所植數十萬株的台灣山櫻實生苗中，亦未見分離出白色者，一度懷疑其為日據時代遺留品種，RAPD 親緣關係分析結果，亦證實其為台灣山櫻族群裡的一個成員。不同地區採集到的霧社櫻在聚類分析圖上各自成群，顯示演化上已有分流趨勢，值得進一步研究兩個族群間之差異。川崎哲也將對日本的櫻花分成七群，吉野櫻屬於江戶彼岸櫻群，本群植物學上的特徵在於花之萼筒披覆細毛，呈葫蘆形，葉之蜜腺在葉身，依據此一分類法，霧社櫻屬於江戶彼岸櫻群 (川崎 1994)。RAPD 親緣關係分析結果支持此一論點，吉野櫻與霧社櫻在聚類分析樹狀圖上歸於一群，顯示親緣關係較近，而與其他源自日本的櫻花，親緣關係反而較遠，整體而言，RAPD 為櫻花種原親緣關係分析上十分有用的技術。利用 RAPD 分析本省桃、李種原之親緣關係，參試 30 個桃種原其遺傳相似度係數介於 0.73-0.93 之間 (溫等 2003)，所分析的 30 個李種原遺傳相似度係數介於 0.32-0.94 之間 (溫等 2004)。本研究在所分析的 29 個櫻花品種 (系) 中，遺傳相似度係數介於 0.13-0.93 之間，顯示本省櫻花種原遺傳歧異度較桃、李種原高。

台灣山櫻冬季休眠所需的低溫時數少，為世界上重要的低需冷性櫻花種原基因庫，經過仔細的種原調查、蒐集與特性評估，發現許多品種特性優異，為育成低需冷性櫻花及櫻桃的良好親本。若有計劃進行育種，應可育出具優良品種，為台灣春天增添顏色。

誌 謝

本文部份經費承蒙行政院國科會計畫補助 (計畫編號：94-2313-B-055-006)，謹致謝忱。

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 46:314-323。
- 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 50:54-67。
- 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。國立台灣大學園藝研究所碩士論文。台北。台灣。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。國立中興大學園藝研究所碩士論文。台中。台灣。146 pp.
- 吳樹敬、陳學森。2003。杏品種的 RAPD 分析。果樹學報 20:107-111。
- 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 49:45-54。
- 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 48:67-85。
- 俞德浚。1979。中國果樹分類學。農業出版社。北京。中國。54 pp.
- 翁儷倩、楊雯如、張龍生、林宗賢。2003。桶柑遺傳歧異性之分析。中國園藝 49:19-32。
- 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 18:217-220。
- 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。
- 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。
- 黃增泉。1993。Flora of Taiwan vol. III. Second edition. p.96-104。國家科學委員會。台北。台灣。
- 劉業經、呂福原、歐辰雄。1994。台灣樹木誌。國立中興大學農學院。台中。台灣。149 pp.
- 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 18:276-279。
- 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 19:136-138。
- 鄧九生、賴至昌、彭民璋。1999。幾個芒果品種的 RAPD 分析。果樹科學 16:156-158。
- 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 15:311-316。
- 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 20:124-126。
- 川崎哲也。1994。日本の櫻。山と溪谷社。東京。日本。383 pp.
- 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. Hortic. Sci. 123:381-387.
- 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. Akkac, and V. Casavecchia. 1998. Identification of pear cultivars by molecular markers. Acta Hort. 457:63-70.
- Botta, R., A. Akkac, D. Marinoni, G. Bounous, S. Kampfer, H. Steinkellner, and C. Lexer. 1999. Evaluation of microsatellite markers for characterizing chestnut cultivars. Acta Hort. 494:277-282.
- Byrne, D. H., W. B. Sherman, and T. A. Bocon. 2000. Stone fruit genetic pool and its exploitation for growing under warm winter conditions. p.157-230. in: Temperate Fruit Crops in Warm Climates (Erez, A. ed.) Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- 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. Theor. 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.* 123:837-841.
- 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 Using RAPD on Flowering Cherry Germplasm¹

Ien-Chie Wen^{2,4} and Ching-Yi Chang³

Summary

Wen, I. C. and C. Y. Chang. 2005. Evaluation and genetic relationship analysis using RAPD on flowering cherry germplasm. J. Taiwan Agric. Res. 54:245-256.

Taiwan cherry (*Prunus campanulata* Maxim.) with the reddest flowers and less chilling requirement in the world, is an important parent in breeding cherry and flowering cherry. In Flora of Taiwan, Taiwan cherry only has red, campanulate flowers record. In this research, we collected Taiwan cherry with white, pink and light to dark red, close to open campanulate and slightly upright flowers for further breeding use. The genetic relationships of 29 flowering cherry cultivars were analyzed by using RAPD markers. A total of 300 primers were screened for their ability to produce strongly amplified products. Out of 11 primers amplified 147 DNA bands, 121 of which were polymorphic (82.3%). A dendrogram based on the UPGMA cluster analysis was constructed. All tested flowering cherry cultivars could be divided into four groups, including 2 groups of local varieties, 1 group of local high chill varieties with one Japanese variety and 1 group of Japanese varieties. Chong bann shan ying 2 and 3 have the same polymorphic DNA band, indicating they may be the same variety. Chong bann shan ying 2 and 3 and Chong bann shan ying 4 had 93% similarity indexes, indicating the closest genetic relationship. Nevertheless, Lan-yeu yee Ying (*Prunus grisea* Kalkm) having 13% similarity indexes showed the farthest genetic relationship with other tested flowering cherry varieties.

Key words: Flowering cherry, Germplasm evaluation, RAPD.

-
1. Contribution No.2244 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 6, 2005.
 2. Associate Researcher, Plant Germplasm Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Research Assistant, Plant Germplasm Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: icwen@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23331673.