

# 微衛星DNA分子標誌應用於桃栽培種與雜交後代之遺傳相似性分析<sup>1</sup>

王昭月<sup>2</sup> 宋家瑋<sup>3</sup> 劉明穗<sup>3</sup> 歐錫坤<sup>3,4</sup>

## 摘 要

王昭月、宋家瑋、劉明穗、歐錫坤。2007。微衛星 DNA 分子標誌應用於桃栽培種與雜交後代之遺傳相似性分析。台灣農業研究 56:107-120。

桃栽培種及雜交後代計 34 個，各具有不同果實性狀，其中涵蓋有溶質、非溶質、硬質果肉；酸味、苦味；甜味、高甜味；果皮有毛、無毛等，應用微衛星 DNA 分子標誌 SSR (simple sequence repeat)；以及 ISSR (inter simple sequence repeat) 進行其遺傳相似性分析與品種鑑定。試驗結果自 17 個 SSR 引子組內，篩選得到 12 個具多型性之 SSR 引子組，分別可產生 3~9 個對偶基因，其中 UPD96-005 引子組可將本地種‘鶯歌桃’及‘八月桃’予以鑑別。進一步合併 12 個具多型性之 SSR 引子之產物計 87 個標誌片段，進行 UPGMA 分析結果可區分為兩大群集：第一群主要為‘鶯歌桃’與‘Premier’為親本之雜交後代；第二群則以‘Premier’與油桃 5-40N 為親本之雜交後代為主。UPGMA 群集樹狀圖分析結果顯示，桃雜交後代明顯與其母本連鎖於同一集群；另依果實糖、酸高低表現相近者，亦可聚於同一集群。綜合試驗結果顯示，微衛星 DNA 分子標誌可有效應用於桃之品種鑑定，並可輔助具有優良果實特性的雜交後代之早期選拔。

**關鍵詞：**桃、微衛星 DNA、遺傳相似性、果實特性。

## 前 言

桃 (*Prunus* spp.) 為薔薇科 (Rosaceae) 李屬 (*Prunus*) 重要果樹作物，原生於中國大陸西部山區，在中國有超過三千年栽培歷史，最早見於詩經記載。桃依植物分類可區分為六個種，其中普通桃 (*P. persica*) 是目前全球性的經濟栽培種，另包含油桃 (*P. persica* L. var. nectarine Maxim)、蟠桃 (*P. persica* L. var. compressa Bean.)、壽星桃 (矮性桃) (*P. persica* L. var. densa Makino) 等。普通桃染色體  $2n=16$ ，單倍體基因組為  $0.3 \times 10^9$  bp，約為阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因組的兩倍，是研究薔薇科植物基因組的理想材料 (Arumuganathan & Earle 1991; Baid *et al.* 1994)。

台灣桃的栽培始於民國初年自大陸廣東或福建地方引進。據台灣農業生產年報統計，近五年國內桃的栽培面積穩定維持於 2,900 公頃，年產值約 8.8 億元，是國內重要落葉果樹之一。唯台灣經濟生產的水蜜桃品種屬於高需冷性的引進品種，在高冷地栽培時容易造成土壤侵蝕、農藥、肥料與

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2287 號。接受日期 2007 年 5 月 10 日。

2. 本所生物技術組助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。

3. 本所作物組助理研究員、約僱助理、研究員兼組長。台灣 台中縣。

4. 通訊作者，電子郵件：skou@wufeng.tari.gov.tw；傳真：(04)23338162。

水源優氧化等問題。為確保高山自然景觀與生態平衡，農業試驗所自 1980 年開始從事低需冷性水蜜桃品種之選育，以緩和山地生產問題，目前已選育出 3 個低需冷性並可於平地栽培之優良新品種 (Ou & Wen 2003; Ou & Song 2006)。

分子標誌可應用於作物遺傳分析、輔助育種選拔 (marker-assisted selection, MAS)，兼具有快速、高鑑別力等特質，已成為作物選育或植物性狀評估的有效指標之一。MAS 標誌在桃樹育種與果實遺傳分析方面，國外已有多項選拔利用之實例，並陸續開發重要性狀指標，其中以 RAPD (random amplified polymorphic DNA)、SSR (simple sequence repeat) 以及 ISSR (inter simple sequence repeat) 利用最為廣泛，其他尚包含 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 與 AFLP (amplified fragment-length polymorphism) 等分子標誌 (Bergougnoux *et al.* 2002)。RAPD 分子標誌方面，可利用於輔助桃樹雜交後裔之選拔 (Pooler & Scorza 1995)，作為桃的果型基因連鎖分析之分子指標 (Guo *et al.* 2002)。SSR 標誌亦廣泛利用於栽培種之分子鑑定 (Badenes *et al.* 2002)、指紋分析 (fingerprinting)、親緣鑑定 (Dirlewanger *et al.* 2002)，或作為桃樹抗根瘤線蟲 (root-knot nematode, RKN) 基因篩檢之分子指標 (Bergougnoux *et al.* 2002; Yamamoto & Hayashi 2002)；並可應用於與果實特性相關的 QTL (quantitative trait loci) 分子遺傳圖譜之建立 (Etienne *et al.* 2002)。本研究藉由微衛星 DNA 分子標誌技術 (含 SSR 與 ISSR 分子標誌)，以本所特選桃育種親本與其雜交後裔為供試材料，進行具果實相對性狀諸如：果肉質軟與硬、糖酸度的高與低、以及果皮絨毛的有、無等，相關樣品之遺傳分析，並嘗試建立具有硬肉 (stony hard flesh) 特性的台灣本地種‘鶯歌桃’與引進種間之鑑別，篩選與果實性狀關聯之標誌基因，以期作為本地桃育種早期評估選拔之參考指標。

## 材料與方法

### 試驗材料

選取農業試驗所的桃育種計畫內引進之部分栽培種原，以及利用台農一號 - ‘春蜜’、‘台農甜蜜’-‘Premier’作為育種親本之雜交後代等 34 品系，各試驗品系之果實相對特性及育種組合，詳見表 1。另外，選取 5 個油桃品系：‘Sunhome’、9-8N、81-17N、‘Sunblaze’以及‘Sundollar’，作為毛桃與油桃檢測之對照品系，其相關之果實特性詳如表 2。

### DNA 萃取

各品系之桃樣品各取幼葉 50~80 mg，利用 DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) 試劑組，萃取 DNA。萃取得之 DNA 以分光光度計 (Hitachi U-2000) 測定 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值為 1.6~1.9，並以 OD<sub>260</sub> 測定值換算 DNA 濃度，經稀釋其濃度為 10 ng/μL，作為以下 SSR 與 ISSR 分子標誌分析之聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 用 DNA 模版。

### SSR 分子標誌分析

參考 Cipriani 等人 (1999) SSR 分析報告中，自桃基因組取得專屬之 SSR 引子對 17 組進行 PCR 反應，反應液總體積為 25 μL，內含 1.25 u Taq polymerase (Roche-FastStart)、1 × PCR buffer (50 mM Tris/HCl (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>, pH8.3)、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTP、0.2 μM primer 及 50 ng template DNA。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9700，SSR 分析之聚合酵素連鎖反應的溫度則設定為：95°C 5 min；再進行 35 次的 94°C 45 sec，56°C~58°C (依引子 T<sub>m</sub> 值調整) 45 sec，72°C 45 sec；最後 72°C 8 min；反應完成後貯放在 4°C，接續進行 PCR 產物之 DNA 電泳。

表 1. 提供微衛星 DNA 分析之 34 個桃樣品及其特性

Table1. Fruit characteristics of peach cultivars used for the microsatellite DNA marker analysis

No.	Cultivar or combination	Cultivar /line	Fruit weight (g)	Ttotal soluble solid (Brix <sup>o</sup> )	Acidity (%)	Flesh type	Remark
1	壽星桃	Swatow	16	11.2	0.89	Melting	Dwarf, sour, bitter
2	台農甜蜜 (Pr)	Premier	93	11.8	0.36	Melting	Sweet
3	台農 1 號-春蜜	Spring Honey	133	11.7	0.29	Melting	Sweet
4	苦桃	Ku Tao	22	12.3	0.92	Non-melting	Bitter
5	南山甜桃	Nan Shan Tian Tao	175	14.5	0.39	Melting	Sweet, big, fibrous
6	八月桃	Ba Yue Tao	118	12.6	0.77	Stony hard	Sour
7	鶯歌桃 (早生)	Ying Ge Tao	161	12.3	0.83	Stony hard	Early flower, sour
8	鶯歌桃 (Ig)	Ying Ge Tao	185	14.2	0.88	Stony hard	Late, Sour
9	Ig x Pr	E-16-7	97	12.9	0.37	Melting	Sweet
10	Ig x Pr	E-16-14	111	10.6	0.30	Melting	Sweet
11	Ig x Pr	D-16-7	97	12.8	0.36	Melting	Sweet
12	Ig x Pr	D-16-6	90	11.4	0.33	Melting	Sweet
13	Ig x Pr	B3-2-63	113	11.1	0.38	Melting	Sweet
14	Ig x Pr	B3-2-64	119	11.9	0.34	Melting	Sweet
15	Ig x Pr	E-16-2	106	10.2	0.91	Melting	Sour
16	Ig inbreds	E-16-15	70	12.1	1.02	Non-melting	Sour
17	Ig x Pr	E-16-16	97	11.8	1.14	Melting	Sour
18	Ig x Pr	E-16-28	63	8.6	1.00	Melting	Sour
19	Ig x Pr	E-16-48	110	14.0	1.13	Melting	Sour
20	Ig x Pr	E-16-51	102	12.3	1.06	Melting	Sour
21	(Nectarine)	5-40N	67	11.5	1.12	Melting	Sour
22	Pr x 5-40N	C1-46-1	32	12.3	0.37	Melting	Sweet
23	Pr x 5-40N	C1-46-4	50	11.9	0.32	Melting	Sweet
24	Pr x 5-40N	C1-46-7	60	12.2	0.27	Melting	Sweet
25	Pr x 5-40N	C1-46-9	71	12	0.55	Melting	Sweet
26	Pr x 5-40N	C1-46-11	76	13	0.26	Melting	Sweet
27		23-26	91	14.6	0.26	Non-melting	Very sweet
28	23-26 x Pr	C1-57-2	113	13.9	0.27	Melting	Very sweet
29		C1-57-3	128	14.9	0.51	Melting	Very sweet
30	Pr inbreds	B4-2-20	83	15.7	0.40	Melting	Very sweet
31	C1-57-2 inbreds	E-131-9	158	14.1	0.29	Melting	Very sweet
32	23-26 inbreds	B4-2-49	121	15.9	0.44	Non-melting	Very sweet
33	Tu-Tu	C1-74-26	130	16.4	0.46	Melting	Very sweet
34	(Nectarine)	9-17N	68	11.0	0.65	Melting	Yellow flesh

表 2. 以 ISSR marker 檢測油桃基因用的 5 個油桃品系及其特性

Table 2. Five genotypes of nectarine used for screening the glabrous gene by inter simple sequence repeat markers

Cultivar /line	Mean fruit Wt. (g)	Mean <sup>z</sup> TTS (Brix °)	Mean acidity (%)	Flesh type	Remark
Sunhome	61	11.0	1.15	Melting	Red flowers, sour, nectarine
9-8N	89	13.2	1.25	Melting	Yellow flesh, sour, nectarine
81-17N	92	10.6	1.15	Melting	Yellow flesh, sour, nectarine
Sunblaze	58	8.5	0.95	Non-melting	Yellow flesh, sour, nectarine
Sundollar	90				Yellow flesh, nectarine

<sup>z</sup> TTS: Total soluble solid.

### ISSR 分子標記分析

ISSR 分析之引子取自 UBC SSR Primer Oligonucleotide Set100/9 (John Hobbs, NAPs Unit, University of British Columbia, Vancouver, V6T1Z3, Canada), 共計 100 條。PCR 反應液總體積為 25  $\mu$ L, 內含 1.25 u Taq polymerase (Roche-FastStart)、1 $\times$  PCR buffer (500 mM Tris/HCl, (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>, pH8.3)、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ M dNTP、0.2  $\mu$ M primer 及 50 ng template DNA。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9700, ISSR 分析之聚合酵素連鎖反應的溫度則設定為: 95°C 5 min; 再進行 42 次的 94°C 45 sec, 53°C~58°C (依引子 Tm 值調整) 45 sec, 72°C 1 min 30 sec; 最後 72°C 10 min; 反應完成後貯放在 4°C, 接續進行 PCR 產物之 DNA 電泳。

### DNA 電泳

經 SSR 或 ISSR 分析之 PCR 反應產物 10  $\mu$ L 加入 6 倍電泳追蹤染劑 (6 $\times$  loading buffer: 0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol, 40% w/v sucrose), 以 3% Metaphor agarose 或 1.5% agarose (FMC Bio Products), 於 0.5X TBE 緩衝液 (40 mM Tris acetate, pH 8.0; 1 mM EDTA) 進行 DNA 電泳。電泳槽為 BIO-RAD SUB CELL GT, 電壓 100 伏特, 電泳時間約 100 分鐘, 結束後置於 0.5 mg/mL 的 ethidium bromide 中染色 20 分鐘, 並退染約 15 分鐘; 再置於 UV 光箱中, 檢視膠體上 DNA 多型性片段, 並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation), 提供進行 DNA 片段之資料分析。

## 結 果

### SSR 分子標記分析

自 Cipriani 等人 (1999) 桃的 SSR 分析中, 選取 17 組桃基因組專屬的 SSR 引子對, 經篩選具有清晰多型性的引子對 12 組, 其 PCR 擴增的對偶基因數為 3 至 9 個, 片段為 114 bp~291 bp (表 3); 其中 UDP96-013 引子組擴增的對偶基因片段 (214 bp、181 bp、184 bp), 可用以區別農試所育成的兩個低需冷性水蜜桃品種: 台農一號‘春蜜’、‘台農甜蜜’ (圖 1)。以 UDP96-015 引子組擴增的對偶基因片段, 亦可區分多個育種品系, 包含 159 bp 為矮性桃‘壽星桃’特有, 192 bp 片段為‘苦桃’特有, 而 180 bp 片段則為黃肉油桃品系‘9-17N’所特有 (圖 2, 表 4)。另外, 藉 UDP96-005 引子組擴增的對偶基因片段 (174 bp、149 bp、154 bp 三個片段), 則可利用於鑑別本地種‘鶯歌桃’及‘八月桃’ (圖 3)。

表 3. 桃 SSR 分子標誌分析用之引子及 PCR 產物

Table 3. List of simple sequence repeat primers used for peach genotype analysis and the products of PCR amplification

Locus code	Repeat motif	Product size (bp)	No. of alleles
From the (AC/GT) n enriched library			
UDP96-001	(CA) <sub>17</sub>	126~142	3
UDP96-003	(CT) <sub>11</sub> (CA) <sub>28</sub>	114~150	8
UDP96-005	(AC) <sub>16</sub> TG (CT) <sub>2</sub> CA(CT) <sub>11</sub>	149~199	8
UDP96-008	(CA) <sub>23</sub>	127~307	7
UDP96-010	(GT) <sub>21</sub> (GAGT) <sub>4</sub> (GA) <sub>18</sub>	131	1
UDP96-013	(AG) <sub>22</sub> (TG) <sub>8</sub> TT(TG) <sub>10</sub>	174~214	9
UDP96-015	(CA) <sub>31</sub>	150~192	7
UDP96-018	(AC) <sub>21</sub>	225~291	8
UDP96-019	(TG) <sub>18</sub> (AG) <sub>7</sub>	192~220	6
From the (AG/CT) n enriched library			
UDP97-401	(GA) <sub>19</sub>	123~462	9
UDP97-402	(AG) <sub>17</sub>	136	1
UDP97-403	(AG) <sub>22</sub>	136~163	7
UDP98-405	(AG) <sub>9</sub>	104	1
UDP98-407	(AG) <sub>15</sub>	173~230	7
UDP98-408	(CT) <sub>14</sub>	100	1
UDP98-409	(AG) <sub>19</sub>	124~266	8

表 4. 鑑別桃品種（系）之 SSR 分子標誌

Table 4. Simple sequence repeat markers for identification of specific genotypes of peach cultivars

Cultivar/line	Primers: <u>revealing specific band (bp)</u>
Swatow	UDP96-015: <u>159</u>
Ku Tao	UDP96-015: <u>192</u> ; UDP96-019: <u>192</u>
Nan Shan Tian Tao	UDP98-409: <u>159</u> , <u>266</u>
E-16-7	UDP96-008: <u>136</u>
9-17N	UDP96-015: <u>180</u>

合併 12 組 SSR 引子對完成之 PCR 產物片段，以 Dice's UPGMA 方式進行 34 個品種（系）遺傳相似性之群集分析，結果供試的品種（系）區分成二大群：第一群主要包含育種母本為‘鶯歌桃’及其雜交選拔後代 10 個品系，但另外的‘南山甜桃’、‘壽星桃’、‘苦桃’則因遺傳相似性較低而呈現單一的個別連鎖關係（圖 4）。第二群則區分成 4 小群，第一小群包含低需冷性且高精度‘台農甜蜜’、‘春蜜’品種及其作為育種母本的雜交後裔等 9 個品系；第二小群則包含‘台農甜蜜’品種為母本以

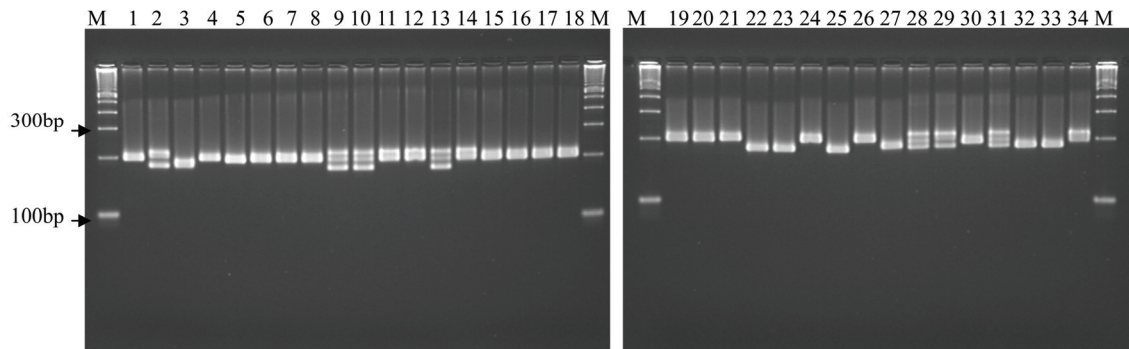


圖 1. 桃特定 34 個栽培種與雜交後代以 UDP96-013 引子進行 PCR 擴增之 SSR 分析圖譜。

Fig. 1. Amplified profiles of the 34 selected genotypes of peach cultivars using simple sequence repeat primer of UDP96-013. (The samples were as same as the list of Table 1: M: Gen100 DNA Ladder)

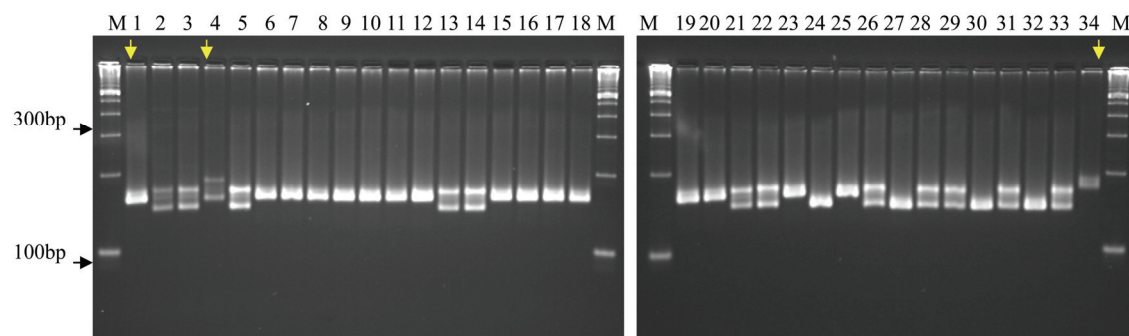


圖 2. 桃特定 34 個栽培種與雜交後代以 UDP96-015 引子進行 PCR 擴增之 SSR 分析圖譜。

Fig. 2. Amplified profiles of the 34 selected genotypes of peach cultivars using simple sequence repeat primer of UDP96-015. (The samples were as same as the list of Table 1: M: Gen100 DNA Ladder)

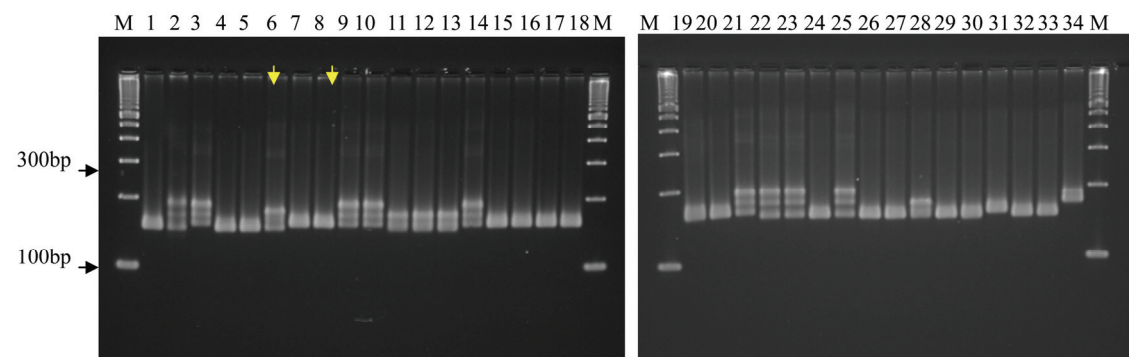


圖 3. 桃特定 34 個栽培種與雜交後代以 UDP96-005 引子進行 PCR 擴增之 SSR 分析圖譜。

Fig. 3. Amplified profiles of the 34 selected genotypes of peach cultivars using simple sequence repeat primer of UDP96-005. (The samples were as same as the list of Table 1: M: Gen100 DNA Ladder)

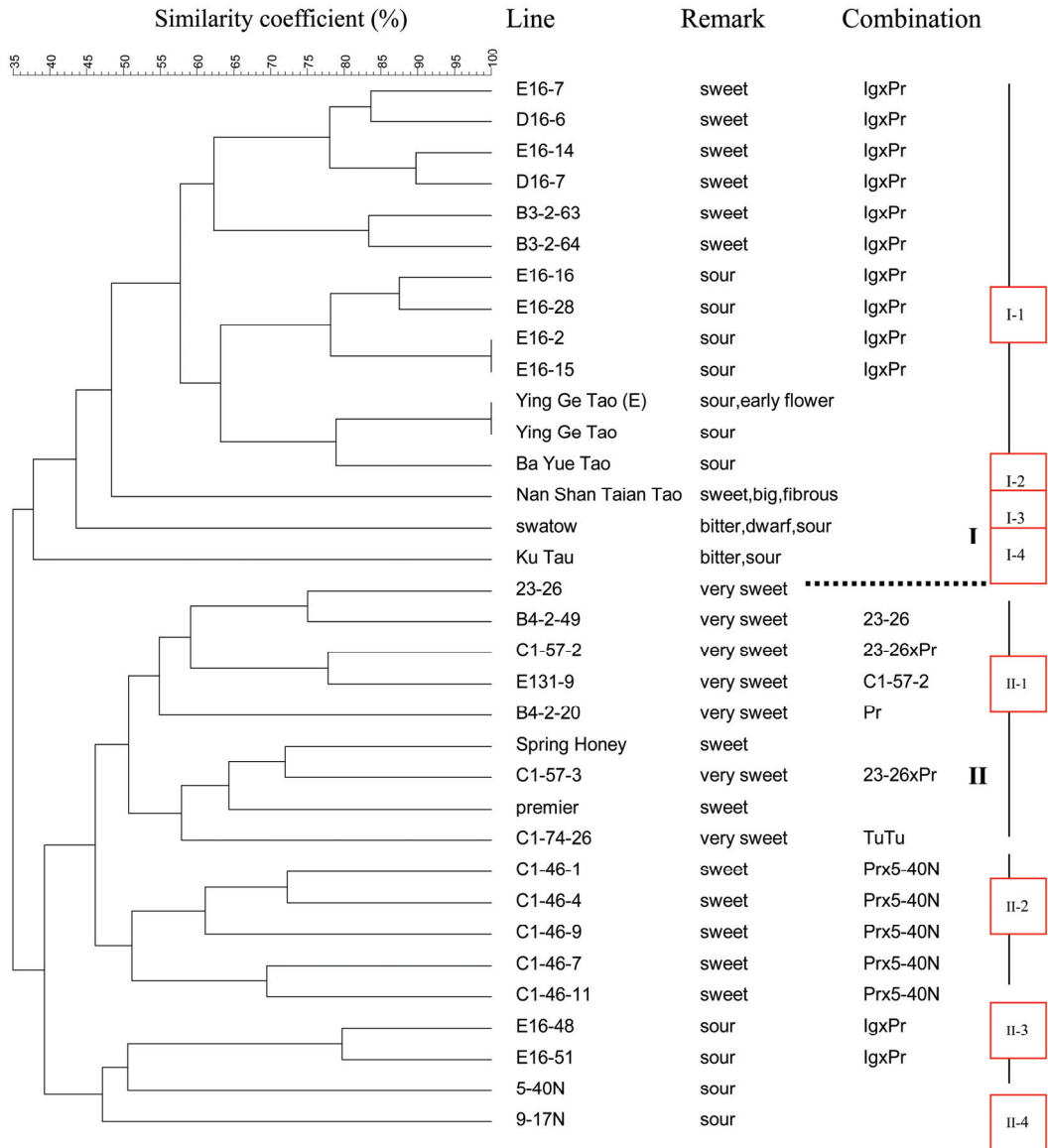


圖 4. 桃特定 34 個栽培種與雜交後代以 12 組 SSR 分析之 PCR 產物，經 UPGMA Dice's 計算之相似性樹狀圖。

Fig. 4. Dendrogram of 34 selected genotypes of peach cultivars based on PCR products of 12 simple sequence repeat primer analysis using UPGMA as the clustering method.

及油桃選種系‘5-40N’為父本的 5 個高酸性雜交後代；第三小群含有 3 個品系分別為‘5-40N’與 2 個高酸性鶯歌桃後裔；第四小群僅有 1 個品系，其遺傳相似性最低，為高酸性的黃肉油桃選種系‘9-17N’（圖 4）。

### ISSR 分子標誌分析

自 UBC ISSR Primer Oligo-nucleotide Set100/9 的 100 條引子，經 PCR 反應與產物電泳分析，篩選有穩定且清晰多型性表現的引子 19 個（表 5）：其中 di-nucleotide, 3' anchored 引子 14 個 (UBC809, UBC810, UBC811, UBC818, UBC826, UBC827, UBC828, UBC834, UBC840, UBC842, UBC845, UBC849, UBC857, UBC859)，tri-nucleotide motif 1 個 (UBC868)，penta-nucleotide motif 1 個 (UBC874)，di-nucleotide, 5' anchored (UBC889, 891)。其中 di-nucleotide, 3' anchored 引子 UBC859 獲得之 977 bp 標誌片段（圖 5-B），以及 UBC809 引子獲得之 1,013 bp 片段（圖 6-B），可能與油桃特性具有關聯性。經進一步以‘Sun Home’、‘Sun Dollar’、‘Sun Blaze’、‘81-17N’與‘9-8N’等 5 個油桃品系測試，結果顯示上述兩個片段（977 bp; 1,013 bp）確定存在油桃樣品中（圖 5-A; 圖 6-A）。而另一個 di-nucleotide, 3' anchored 引子 UBC840 引子擴增之 PCR 片段（428 bp），則可利用於區別本地種‘鶯歌桃’及‘八月桃’（圖 7）。

將 19 個 ISSR 引子之 PCR 產物 407 個片段，以 Dice's UPGMA 方式進行 34 個品系之遺傳相似性群集分析，結果供試的品系可分成二大群：第一群含 22 個品系，內分 2 小群，第一小群 8 個品系，包含‘台農甜蜜’、‘春蜜’、‘南山甜桃’與‘壽星桃’、‘苦桃’等 5 品種，以及以‘鶯歌桃’為母本‘台農甜蜜’為父本的高酸性雜交後裔 3 個品系；第二小群 14 個品系，包含 2 個油桃選種系‘5-40N’、‘9-17N’與高糖選種之雜交後代 7 個，並涵蓋以‘台農甜蜜’為母本與‘5-40N’為父本的 5 個高糖度雜交選後代（圖 8）。第二大群有 12 個品系，包含以‘鶯歌桃’為育種母本而‘台農甜蜜’為父本之雜交選後代 9 個品系，以及 stony hard 之本地種‘鶯歌桃’3 個品系（圖 8）。

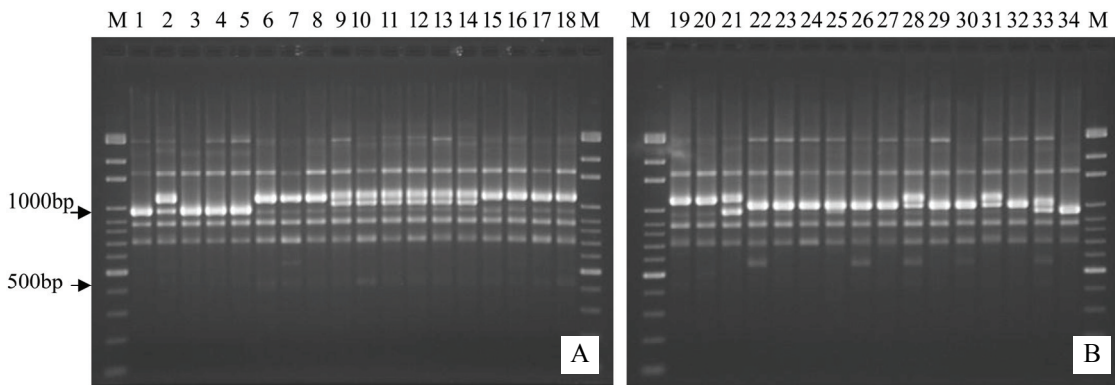


圖 5. 桃 34 品系以 UBC859 引子進行 PCR 擴增之 ISSR 分析圖譜。

Fig. 5. Amplified profiles of the 34 selected genotypes of peach cultivars using inter simple sequence repeat primer of UBC859. (Lane 1: ‘Sun Home’, 2: ‘Sun Dollar’, 3: ‘Sun Blaze’, 4: ‘81-17N’, 5: ‘9-8N’; from the sixth were as same as Table 1; M: Gen100 DNA Ladder)

表 5. 桃 34 品系以 ISSR 分子標誌分析之引子及其 PCR 產物

Table 5. List of inter simple sequence repeat primers used for analysis of the 34 selected genotypes of peach cultivars and the products of PCR amplification

Primer code	Sequence 5'→3'	Products size (bp)	No. of distinguishable genotypes
UBC809	(AG) <sub>8</sub> G	212~1,577	4
UBC810	(GA) <sub>8</sub> T	207~2,260	2
UBC811	(GA) <sub>8</sub> C	671~3,253	2
UBC818	(CA) <sub>8</sub> G	390~3,793	5
UBC826	(AC) <sub>8</sub> C	638~2,338	4
UBC827	(AC) <sub>8</sub> G	895~2,831	1
UBC828	(TG) <sub>8</sub> A	355~3,703	2
UBC834	(AG) <sub>8</sub> Y <sup>Z</sup>	455~2,422	2
UBC840	(GA) <sub>8</sub> YT <sup>Z</sup>	428~2,403	2
UBC842	(GA) <sub>8</sub> YG <sup>Z</sup>	762~1,480	0
UBC845	(CT) <sub>8</sub> RG <sup>Z</sup>	536~1,620	2
UBC849	(GT) <sub>8</sub> YA <sup>Z</sup>	311~2,208	3
UBC857	(AC) <sub>8</sub> YG <sup>Z</sup>	376~3,423	2
UBC859	(TG) <sub>8</sub> RC <sup>Z</sup>	717~1,207	1
UBC868	(GAA) <sub>4</sub>	351~2,133	1
UBC874	(CCCT) <sub>4</sub>	392~3,775	3
UBC889	DBD(AC) <sub>7</sub> <sup>Z</sup>	394~1,558	2
UBC891	HVH(TG) <sub>7</sub> <sup>Z</sup>	616~2,118	5
UBC895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	715~1,841	1

<sup>Z</sup> B:(C,G,T); D:(A,G,T); H:(A, C, T); R:( A,G); V:( A,C, G); Y:(C,T).

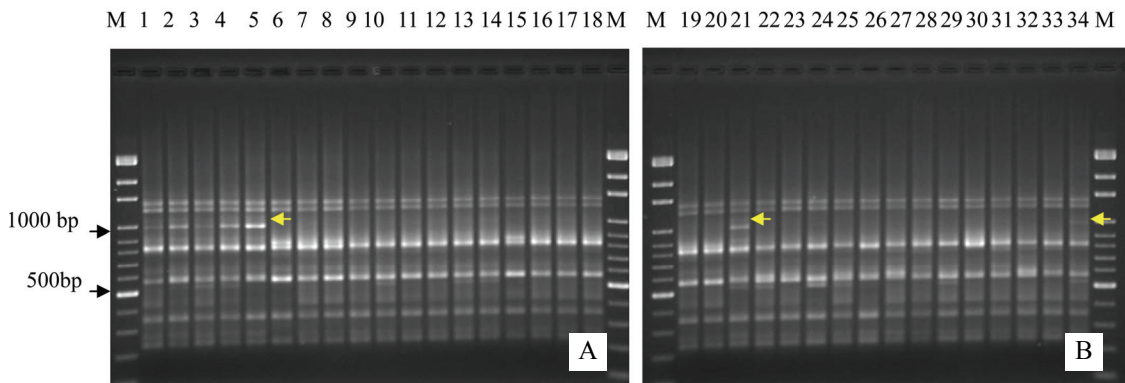


圖 6. 桃 34 品系以 UBC809 引子進行 PCR 擴增之 ISSR 分析圖譜。

Fig. 6. Amplified profiles of the 34 selected genotypes of peach cultivars using inter simple sequence repeat primer of UBC809. (Lane 1: ‘Sun Home’, 2: ‘Sun Dollar’, 3: ‘Sun Blaze’, 4: ‘81-17N’, 5: ‘9-8N’; from the sixth were as same as Table 1; M: Gen100 DNA Ladder)

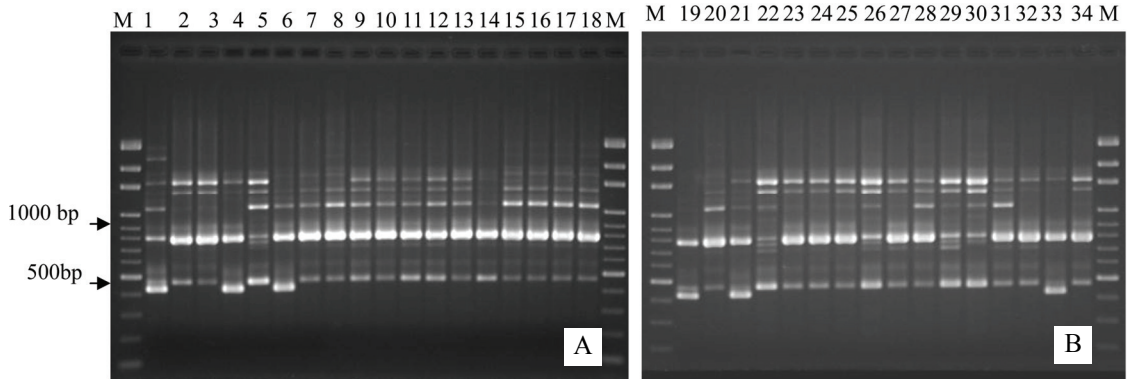


圖 7. 桃 34 品系以 UBC840 引子進行 PCR 擴增之 ISSR 分析圖譜。

Fig. 7. Amplified profiles of the 34 selected genotypes of peach cultivars using inter simple sequence repeat primer of UBC840. (The samples were as same as the list of Table 1)

## 討 論

微衛星 DNA 普遍存在脊椎動物與植物的基因組 (Lagercrantz *et al.* 1993)，在遺傳上表現為共顯性，對於不同親緣的雜交種分析或基因圖譜的建立，具有很大的實用性，在薔薇科也有相關的遺傳分析與基因圖譜之建立 (Cipriani *et al.* 1999; Yamamoto *et al.* 2002)。微衛星 DNA 分子標誌研究上，發現植物基因組的簡單序列重複 (simple sequence repeat, SSR)，係以兩個核苷酸序列重複 (di-nucleotide motif) 較為普遍 (Condit & Hubbell 1991; Wang *et al.* 1994; Guilford *et al.* 1997)，此與本研究的 SSR 與 ISSR 分子標誌分析結果相符，研究結果自 100 條 ISSR 引子中，篩選得 19 條具有清晰多型性產物的引子，其中屬於 di-nucleotide motif 的引子就佔有 14 條，故未來植物基因組之 SSR & ISSR 分析，應可以 di-nucleotide motif 為主，可利用於品種及果實遺傳特性之分析。

早期 Connors (1920) 在桃的果實遺傳特性研究中，已發現白色果肉或黃色果肉表現是由一對基因所調控，白果肉則為顯性；而果皮有毛 (毛桃) 或光滑 (油桃) 的表現也是由一對基因調控 (Blake 1932)，毛桃為顯性。本研究在 SSR 分子標誌與遺傳相似性的群集分析中，發現以白肉油桃品系 '5-40N' 為父本之雜交後代，亦明顯連鎖於同一小群 (圖 4)。而在 ISSR 分析中獲得特定的分子標誌可能與油桃具有關聯性。唯黃肉油桃品系 '9-17N' 雖與油桃品系連鎖於同一大群內，但遺傳上則與其他白肉桃表現出較低的遺傳相似性，是較特殊的一個品系 (圖 4、表 3)，未來針對桃雜交後代果實特性評估時可考慮選殖該片段，或定序驗證以實際利用之。另外，SSR 分子標誌的群集分析結果，亦發現品系群集的關係與果實糖度表現似乎也具有相關性，相同雜交組合之後代，依照其果實糖度較高的品系或高酸性的品系，有聚集於同一小群之趨勢 (圖 4)，故未來配合本地桃雜交後裔之果實糖度評估時可參考或進一步再驗證之。

比較 SSR 與 ISSR 兩種 DNA 分子標誌在桃雜交育種上之應用，發現兩者均可利用於品系間之鑑別。唯針對在親緣與遺傳特性評估時，SSR 應較優於 ISSR 分子標誌，更可以反應雜交組合來源，以及特性相關之遺傳相似性 (圖 4，圖 8)。鑒於薔薇科是全球主要經濟果樹與花卉的主力，在基

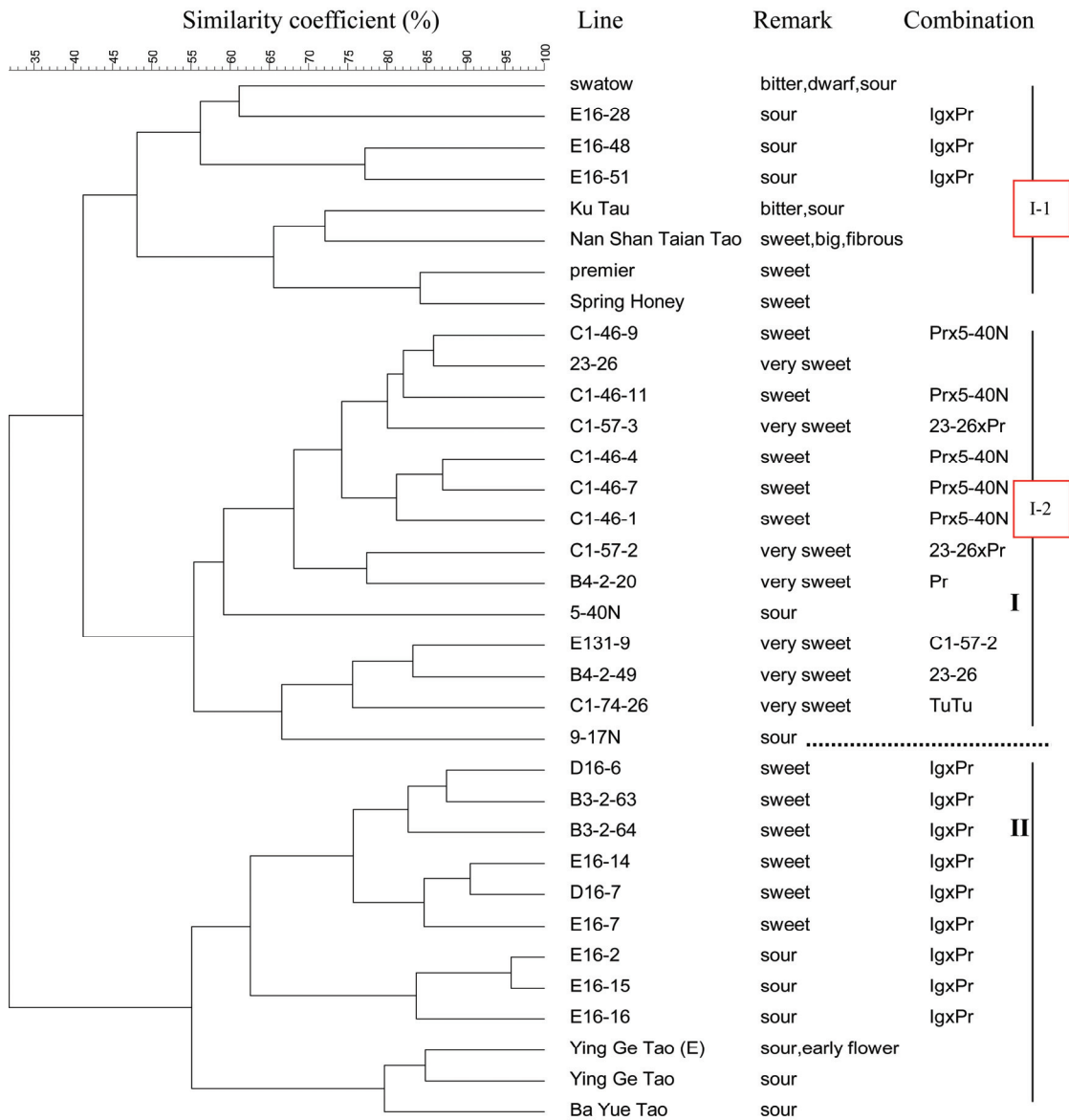


圖 8. 桃特定 34 個栽培種與雜交後代的 19 個 ISSR 分析之 PCR 產物，經 UPGMA Dice's 計算之相似性樹狀圖。  
 Fig. 8. Dendrogram of 34 selected genotypes of peach cultivars based on PCR products of 19 inter simple sequence repeat primer analysis using UPGMA as the clustering method.

因組的分析具有極豐富的資料庫，藉由在同‘科’內 SSR 序列的保守性，實際可以跨‘屬’利用之 (Abbott *et al.* 2002)；另外，SSR 分析具有穩定的『再現性』，使其兼具成為理想的品種鑑定工具之一。

## 誌 謝

本研究承蒙國科會 (NSC94-2313-B-055-004) 與農委會 (95 農科-6.1.3-農-C3) 計畫經費補助，並感謝計畫雇用之技術人員陳小萍與林美君小姐協助試驗分析，謹致謝忱。

## 引用文獻 (Literature cited)

- Abbott, A. G., A. C. Lecouls, Y. Wang, L. Georgi, R. Scorza, and G. Reighard. 2002. Peach: the model genome for Rosaceae genomics. *Acta Hort.* 592:199-209.
- Arumuganathan, K. and E. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:208-218.
- Badenes, M. L., J. Cuenca, C. Romero, J. Martinez, and G. Llacer. 2002. Description of peach cultivars from Spain –Identification of closely related clones by SSR markers. *Acta Hort.* 592:211-216.
- Baid, W. V., A. S. Estager, and J. Wells. 1994. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119: 1312-1316.
- Blake, M. A. 1932. The J. H. Hale as a parent in peach crosses. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 29:131-136.
- Cipriani, G., G. Lot, W. G. Huang, M. T. Marrazzo, E. Peterlunger, and R. Testolin. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 99:65-72.
- Condit, R. and S. P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34:66-71.
- Conner, C. H. 1920. Some notes on the inheritance of unit characters in the peach. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 16:24-36.
- Dirlwanger, E., P. Cosson, and M. Tavaud. 2002. Development of peach SSRs and their use in fingerprinting peach and sweet cherry cultivars. *Acta Hort.* 592:245-252.
- Etienne, C., E. Dirlwanger, and P. Cosson. 2002. QTLs and genes controlling peach fruit quality. *Acta Hort.* 592:253-258.
- Guilford, P., S. Prakash, J. M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett, and R. Foster. 1997. Microsatellite in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94:249-254.
- Guo, J., Q. Jiang, K. Zhang, J. Zhao, and Y. Yang. 2002. Screening for the molecular marker linked to saucer gene of peach fruit shape. *Acta Hort.* 592:267-271.
- Lagercrantz, U., H. Ellegren, and L. Andersson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plant and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21:1111-1115.

- Ou S. K., and C. W. Song. 2006. 'Xiami' peach. Hort. Sci. 41(5):1362-1363.
- Ou S. K., and I. C. Wen. 2003. 'SpringHoney' peach. Hort. Sci. 38(4):633-634.
- Pooler, M. R. and R. Scorza. 1995. Aberrant transmission of RAPD markers in haploids, doubled haploids, and F1 hybrids of peach: observations and speculation on causes. Sci. Hort. 64:233-241.
- 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.
- Yamamoto, T., and T. Hayashi. 2002. New root-knot nematode resistance genes and their STS markers in peach. Sci. Hort. 96:81-90.
- Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, T. Imai, T. Saito, Y. Sawamura, K. Kotobuki, T. Hayashi, and N. Matsuta. 2002. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. Theor. Appl. Genet. 106:9-18.



# Analysis of Genetic Similarity in Selected Peach Cultivars and Their Hybrids by Microsatellite DNA Markers<sup>1</sup>

Jau-Yeuh Wang<sup>2</sup>, Chia-Wei Song<sup>3</sup>, Min-Huai Liou<sup>3,4</sup> and Shyi-Kuan Ou<sup>3</sup>

## Abstract

Wang, J. Y., C. W. Song, M. H. Liou, and S. K. Ou. 2007. Analysis of genetic similarity in selected peach cultivars and their hybrids by microsatellite DNA markers. *J. Taiwan Agric. Res.* 56:107-120.

The typical fruit characteristics of 34 selected peach cultivars and the hybrid seedlings were selected for genetic similarity analysis and identification by microsatellite DNA markers (including SSR: simple sequence repeat; and ISSR: inter simple sequence repeat). The selected typical fruit characteristics included melting, non-melting and stony hard types, sour versus bitter, sweet versus very sweet and with versus without pubescence. Amplification of SSR locus was screened from 17 primer pairs and 12 polymorphic SSR markers had been selected which had 3 to 9 alleles each. One of the SSR markers UPD-96-005 could be used to distinguish the domestic cultivar of 'Ying Ge Tao' and 'Ba Yue Tao'. Furthermore, combining all of the 87 SSR markers and assessing the genetic similarity by cluster analysis of UPGMA (un-weighted pair-group mean arithmetic). It revealed that 34 genotypes could be divided into two main groups: the first group contained 16 genotypes including 'Ying Ge Tao' and its hybrid progenies; the second group was composed by 18 genotypes including 'Premier' and its hybrid progenies. From the dendrogram of UPGMA analysis showed the progenies would be grouping with parent and accompanied with the level of TSS (total soluble solid) and acidity separately. The results reveal that microsatellite DNA markers are useful in cultivars identification of peach and allow to early selection of the progenies with superior fruit characteristics.

**Key words:** Peach, Microsatellite DNA, Genetic similarity, Fruit characteristics.

---

1. Contribution No.2287 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: May 10, 2007.

2. Assistant Horticulturist, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Assistant Horticulturist, Associate Horticulturist and Senior Horticulturist, Crop Science Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

4. Corresponding author, e-mail:skou@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04) 23338162.