

# 台灣育成的花椰菜 $F_1$ 商業栽培品種 及其親本間遺傳歧異度之研究<sup>1</sup>

羅惠齡<sup>2</sup> 李碩朋<sup>2</sup> 陳綉萍<sup>2</sup> 蔡德琳<sup>2</sup> 林照能<sup>2</sup> 王三太<sup>2</sup> 陳甘澍<sup>3,5</sup> 楊堯文<sup>4,5</sup>

## 摘 要

羅惠齡、李碩朋、陳綉萍、蔡德琳、林照能、王三太、陳甘澍、楊堯文。2012。台灣育成的花椰菜  $F_1$  商業栽培品種及其親本間遺傳歧異度之研究。台灣農業研究 61:285-297。

本試驗在分析國內自行育成之花椰菜品種之親本之親緣關係及適合做  $F_1$  純度鑑定之分子標誌。參試品種 (系) 包括 16 個為  $F_1$  品種及其 32 個親本的自交系和 2 個固定品種。利用 120 個逢機引子 (Operon A, B, C, D, E, and L kits) 進行花椰菜品種 (系) 間多型性篩選，篩選出 OPA-1, OPA-13, OPA-18, OPB-5, OPB-15, OPE-15 及 OPL-18 等 7 個可產生多型性 DNA 條帶的逢機引子；再進一步針對國內 3 家花椰菜育種公司所提供的  $F_1$  品種及其親本自交系篩選試驗中，總計選獲 92 個多型性條帶，可以很明顯的把這 3 家公司品種分辨出來，而對同一家公司內大部分親本其親緣關係比較接近，不同公司則相似度較低，由此可知國內花椰菜育種公司，所使用花椰菜親本皆為其培育獨有之自交系。本研究亦找到至少 30 個以上只出現在  $F_1$  及父本上，而不出現在母本上的分子標誌，這些標誌不但可以種原間親緣關係之探討，更有機會發展應用作為花椰菜  $F_1$  品種的種子純度鑑定。

**關鍵詞：**花椰菜、品種、遺傳歧異度、分子標記。

## 前 言

花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.)，別名：花菜、菜花，為十字花科芸薹屬之多年生宿根性草本植物，是甘藍類的一個變種。原產於歐洲地中海沿岸一帶，再發展到英國及法國 (Song *et al.* 1990)。約在 85 年前由中國大陸

引進台灣栽種 (Chang 1998)。日治時期由農業試驗所從日本及印度引進試種及推廣，經過多年的馴化及適應，以及育種改良，有很多品種變得比較耐熱 (Chang 1998)。花椰菜年產量為 67,877 t，占蔬菜生產面積的 2.5% (2008 年農業統計年報)。台灣地區所選育的十字花科

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2706 號。接受日期：101 年 8 月 10 日。
2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系聘用助理研究員、助理研究員、研究助理、研究助理、助理研究員、副研究員兼主任。台灣 高雄市。
3. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所研究員兼分所長。台灣 高雄市。
4. 慶揚生技股份有限公司負責人。台灣 台南市。
5. 通訊作者，電子郵件：kschen@fthes-tari.gov.tw; yauwenyang@yahoo.com.tw；傳真機：(07) 7315590。

蔬菜，大多具有早生、耐熱及質優的特性，不僅是國內最大宗且重要的蔬菜，每年亦有大量種子外銷熱帶及亞熱帶地區或國家，是極具發展潛力的蔬菜種類。目前國內種苗業者所育成的花椰菜品種，大多具有早生及耐熱的特性，而此一特性正是世界上許多國家或地區所缺乏的。因此，如何進行品種鑑定，以保護育種者對其所育成具有早生、晚生、耐熱、抗病或其他特殊性狀等品種的權利保障，特別是鑑定新品種的特性、整齊性、穩定度及品種純度上，皆非常重要。而早期的品種鑑定，多是利用植物外觀形態標誌，做為品種間差異的主要依據，但是外表形態易受到環境因子影響而改變，不易正確鑑定各品種間之差異。近年來因為生物科技的發展，分子標誌技術大量被開發及利用 (Atienzar & Jha 2006)，且由於 DNA 是遺傳的基本物質，所以 DNA 分子標誌可說是最直接的鑑定依據。而應用生物 DNA 層次上所測得的現象和特徵來進行品種鑑定或品系親緣關係之建立，可提供育種者在進行品種改良，親本選擇時的重要參考依據。目前台灣一些商業的  $F_1$  種原大都由一些私人公司所生產，但是其育種過程的詳細資料卻常付之闕如。而過去已有許多報告關於利用不同 DNA 分子標誌如利用 RFLP (Song *et al.* 1988a, 1988b, 1990; McGrath & Quiros 1992)，RAPD (Hu & Quiros 1991; Mailer *et al.* 1994; Kresovich *et al.* 1995; Yang *et al.* 1997; Divaret *et al.* 1999; Saal & Struss 2005; Saha *et al.* 2008; Lu *et al.* 2009)、以及簡單重複序列 (Kresovich *et al.* 1995; Charters *et al.* 1996; Plieske & Struss 2001; Chen 2004; Chuang *et al.* 2004) 來研究十字花科植物種原遺傳歧異度及鑑定。過去我們對部分花椰菜遺傳歧異及品種鑑定已經有一些研究 (Yang *et al.* 1997, 1998; Chen 2004; Chuang *et al.* 2004)，目前將針對一些耐熱具有外銷潛力的商業品種及其親本利用分子標記從事遺傳標

記分析及親緣鑑定。本研究乃針對國內 3 家主要生產花椰菜種子的公司，其自行育成花椰菜品種之  $F_1$  種子及親本的 DNA，以建立其 DNA 指紋分析資料庫，並利用遺傳分析，探討瞭解不同公司品種間遺傳的歧異度，作為將來品種鑑定及種原利用之參考。

## 材料與方法

### 供試品種來源

供試花椰菜品種 (系) 來源，係分別由國內農友 (Known-you Seed Co.)、慶農 (Chinglong Seed Co.) 及欣樺 (Singflow Seed Co.) 等 3 家種苗公司育成之內、外銷  $F_1$  商業栽培品種、自交系以及本分所收集之花椰菜品系等 18 個品種 (系) (表 1)。

### DNA 的萃取

DNA 的抽取採用 Junghans & Metzloff (1990) 所發展的方法稍加修正。首先稱取 0.1 g 各供試花椰菜品種 (系) 植株生長正常、健康、無病蟲害之新鮮嫩葉，加入適量液態氮，將葉片研磨成粉。於粉末將水化時加入 extraction buffer 1 mL 攪勻。然後倒入 1.5 mL 微量離心管中，於 65°C 水浴中搖晃 10 分鐘，再加入 350  $\mu$ L 的 5 M KOAc，翻轉離心管數次並確定混合均勻後，置於冰上 20 分鐘。以 13,000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5402, Germany) 4°C 離心 15 分鐘，將上清液倒入新的微量離心管中，並加入 phenol/chloroform 600  $\mu$ L，上下晃動混合 3 分鐘。再以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上層液，置入新的離心管中。加入 0.6 $\times$  體積 (約 600  $\mu$ L) 的 isopropanol 混合均勻，在室溫下靜置 30 分鐘。以 10,000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，倒掉上清液。其沉澱物以 70% 酒精 500  $\mu$ L 清洗兩次，再於真空濃縮機 STRATQENE 1800 (EYELA, Japan) 乾燥 7 分鐘 (離心轉速 4000 rpm)。加入 50  $\mu$ L 1 $\times$  TE buffer，並輕拍管壁使 DNA 溶解。加入 1  $\mu$ L RNase A 並保持在

表 1. 各公司供試花椰菜品種及其親本

Table 1. Different cultivars and their parental lines of cauliflower used in this study

Cultivar/line	Note	Seed source
M7	♀ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
M2	♂ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
M7 × M2	F <sub>1</sub> hybrid	Singflow Seed Co., Taiwan
M14	♀ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
E7	♂ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
M14 × E7	F <sub>1</sub> hybrid	Singflow Seed Co., Taiwan
E13	♀ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
M16	♂ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
E13 × M16	F <sub>1</sub> hybrid	Singflow Seed Co., Taiwan
M9	♀ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
M6	♂ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
M9 × M6	F <sub>1</sub> hybrid	Singflow Seed Co., Taiwan
M17	♀ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
E2	♂ parent	Singflow Seed Co., Taiwan
M17 × E2	F <sub>1</sub> hybrid	Singflow Seed Co., Taiwan
Snow Fang	♀ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Snow Fang	♂ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Snow Fang	F <sub>1</sub> hybrid	Known-you Seed Co., Taiwan
Johnson Snow	♀ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Johnson Snow	♂ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Johnson Snow	F <sub>1</sub> hybrid	Known-you Seed Co., Taiwan
Baixiu	♀ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Baixiu	♂ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Baixiu	F <sub>1</sub> hybrid	Known-you Seed Co., Taiwan
Known-you Early 2	♀ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Known-you Early 2	♂ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Known-you Early 2	F <sub>1</sub> hybrid	Known-you Seed Co., Taiwan
Li Xue	♀ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Li Xue	♂ parent	Known-you Seed Co., Taiwan
Li Xue	F <sub>1</sub> hybrid	Known-you Seed Co., Taiwan
H37	♀ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan
H37	♂ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan.
H37	F <sub>1</sub> hybrid	Chinglong Seed Co., Taiwan.
H41	♀ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan
H41	♂ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan
H41	F <sub>1</sub> hybrid	Chinglong Seed Co., Taiwan
H46	♀ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan
H46	♂ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan
H46	F <sub>1</sub> hybrid	Chinglong Seed Co., Taiwan
H55	♀ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan.
H55	♂ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan

表 1. 各公司供試花椰菜品種及其親本 (續)

Table 1. Different cultivars and their parental lines of cauliflower used in this study (continued)

Cultivar/line	Note	Seed source
H55	F <sub>1</sub> hybrid	Chinglong Seed Co., Taiwan
M45	♀ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan.
M45	♂ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan
M45	F <sub>1</sub> hybrid	Chinglong Seed Co., Taiwan
H80	♀ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan.
H80	♂ parent	Chinglong Seed Co., Taiwan
H80	F <sub>1</sub> hybrid	Chinglong Seed Co., Taiwan
Fengshan very Early	Open Pollinated	Chinglong Seed Co., Taiwan
Known-you very Early	Open Pollinated	Chinglong Seed Co., Taiwan

37°C，30 分鐘後將試管移至 70°C 5 分鐘後，另取 5 µL 稀釋成 500 µL 測定其 OD<sub>260</sub> 之讀值，及計算 DNA 含量濃度，其餘 DNA 溶液儲存於 -20°C 備用。

### 逢機引子之篩選

以 6 組 Operon A, B, C, D, E, and L kits 的 120 個逢機引子 (Eurofins MWG Operon, Huntsville, Al, USA)，針對不同公司的種原進行初步的篩選，然後由其中選出可產生多型性 DNA 條帶的 7 個引子來做品種鑑定，每個試驗皆進行 3 個重複，來確定其再現性。

### PCR 反應及電泳膠分析

參考 Yang *et al.* (1998) 方法，進行 PCR 反應及電泳膠分析。將萃取得之花椰菜基因組 DNA 先稀釋濃度 10 ng/µL 作為模板 DNA (template DNA)，每一樣品反應總體積為 25 µL，內容物含 2.5 µL 的 10× PCR buffer，0.25 µL 的 10 mM dNTPs，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，0.4 µL 的 5 Unit Taq DNA polymerase (MDBio Inc., Taipei, Taiwan)，0.4 µL primer (20 µM) 及花椰菜 2.5 µL 的 DNA (10 ng/µL) 混合於 0.2 mL 微量離心管中。置於 PCR 熱循環儀 (Stratagene Cloning System)，型號 RoboCycler Gradient 96 temperature Cycler #400884，進行聚合反應。PCR 溫度條件設定為先進行 94°C 5 分鐘；再以 94°C

1 分鐘→ 37°C 1 分鐘→ 72°C 2 分鐘為 1 循環，如此做重複進行 40 個循環反應；最後以 72°C 10 分鐘使反應完全，反應完成時自動保存在 4°C。經 PCR 增殖之 DNA，加入 1 µL 6× sample loading dye [1.0 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 0.4% bromophenol blue (w/v), 0.4% Xylene cyand (w/v), 50% glycerol] 混合後，在 1.2% 的 Agarose 進行電泳，再以 ethidium bromide 染色，在 UV 燈下觀察並照相記錄。

### 親緣性之資料分析

PCR 增殖後之 DNA 條帶，根據不同樣本存在與否，存在標示為 1，不存在標示為 0，三重複中至少有 2 次試驗結果為一致才可算為入選分子標記，列表後參考 Chuang *et al.* (2004) 等方法，使用 Bayesian analysis (Huelsenbeck & Ronquist 2001)，進行親緣樹分析。本試驗用 Bayesian 方法以最大值 (maximum likelihood method) 將至少具有 50% 以上機率聚合在一起的樣本歸納在一起，建立樹狀圖。

## 結 果

### 逢機引子篩選

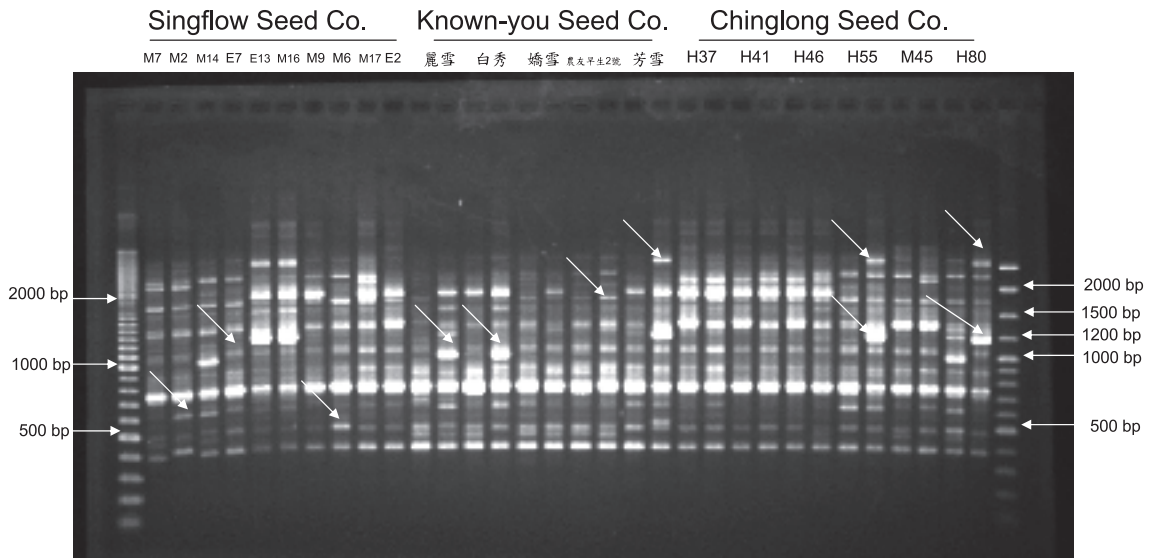
試驗之初，由三個公司各選出 1–2 個品種的親本當樣本，對 120 個逢機引子 (Operon

A, B, C, D, E, and L kits) 進行初步篩選，其中 OPA-1，OPA-13，OPA-18，OPB-5，OPB-15，OPE-15 及 OPL-18 等 7 個可產生具再現性之多型性 DNA 條帶。再利用此 7 個引子，進一步針對國內 3 家花椰菜育種公司所提供的親本自交系進行 DNA 分子標誌篩選 (表 1)，總計選獲 92 個多型性條帶。由這些多型性條帶，可以很明顯的把不同品種或雜交組合的親本分辨出來 (圖 1)。

OPA1-600 可分辨欣樺 M7 和 M2 (為 M7 × M2 的親本)；OPA1-1000 可用於區別 M14 和 E7 (為 M14 × E7 的親本)。且有些分子標誌也可以用於區分不同公司的品種。如 OPA18-1700 及 OPA18-1850 兩分子標誌只出現在慶農種苗公司所育成花椰菜品種上而不出現在農友種苗公司育成花椰菜品種上 (圖 2)。

**由親緣關係看不同公司或不同品種的特性**  
使用 32 個不同公司親本及自交系來研究

不同種原之間的親緣關係 (表 2)，以慶農公司 H80 的晚生母本做為 outgroup，根據 Bayesian analysis 所產生的親緣關係圖，並探討不同群之間關係的可信度 (圖 3)。由試驗結果得知，對同一家公司內大部分親本其親緣關係比較接近。例如欣樺種苗公司的 M7 (A1) 及 M1 (A2) 品種，其聚合在一起的機率達 95%；M14 (A3) 及 M9 (A7) 品種，其聚合在一起的機率達 91%；除了 E2 (A10) 外，欣樺種苗公司的 9 供測試品種，聚合在一起的機率達 61%；農友種苗公司的鳳山極早生 (C1) 及農友極早生品種 (C2)，聚合在一起的機率達 89%，其和欣樺種苗公司的 9 供測試品種 (A1-A9) 及慶農種苗公司的 H41 父本 (D4) 聚合在一起的機率達 60%。另外麗雪母本 (B1)、芳雪母本 (B9) 聚合在一起的機率達 65% 然後再和麗雪父本 (B2)、白秀母本 (B3)、嬌雪母本 (B5) 及嬌雪父本 (B6) 聚合在一起的機率達 89%。而



**圖 1.** 三家種苗公司所提供的花椰菜之親本利用 OPA-1 引子所增幅出之 DNA 分子多型性。  
**Fig. 1.** DNA polymorphism produced by OPA-1 primer in parental lines of respective F<sub>1</sub> hybrid from three seed companies in Taiwan is shown. The arrows indicate some molecular markers which can be used to distinguish two parental lines of F<sub>1</sub>.

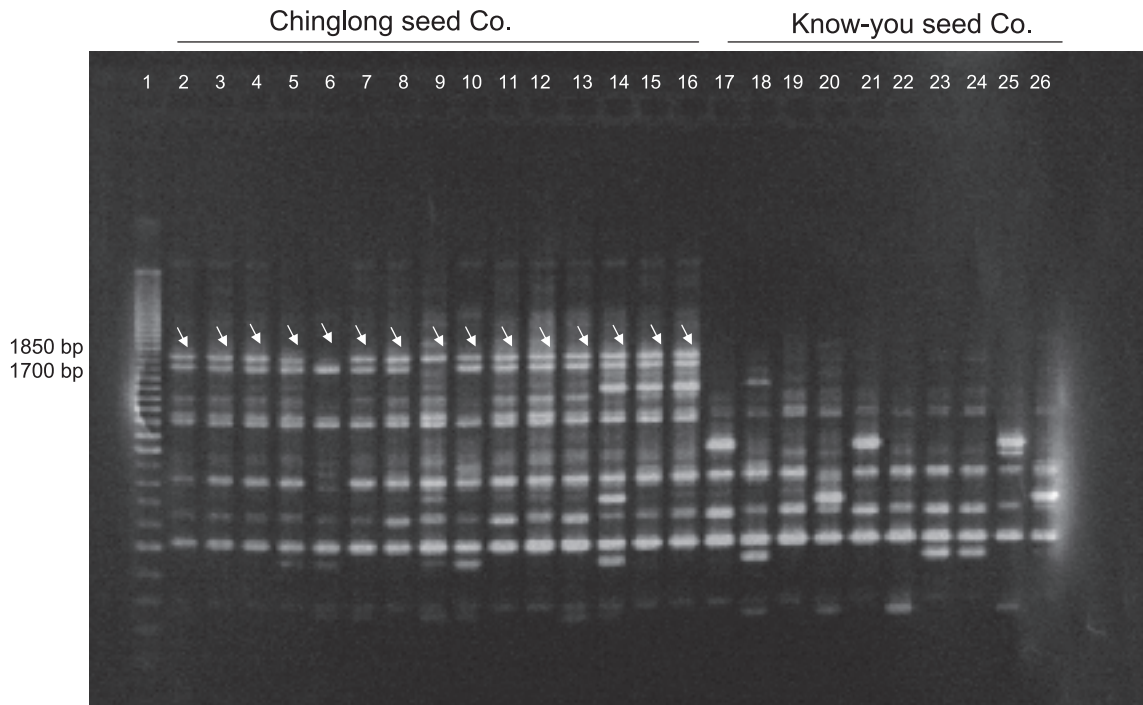


圖 2. OPA-18 產生的分子標誌圖，其中 OPA18-1700 及 OPA18-1850 的分子標誌只出現在慶農種苗公司所育成花椰菜品種上而不出現在農友種苗公司育成花椰菜品種上。行 2、4、6、8、10 及 14 為慶農種苗公司 H37、H46、H55、M45、S65 及 H68 之母本。行 3、5、7、9、11 及 13 為 H37、H46、H55、M45、S65 及 H68 之父本。行 17、19、21、23 及 25 為農友種苗公司麗雪、白秀、嬌雪、農友早生 2 號及芳雪母本。行 18、20、22、24 及 26 為農友種苗公司麗雪、白秀、嬌雪、農友早生 2 號及芳雪父本。

**Fig. 2.** RAPD banding profile of 25 cauliflower cultivars generated by OPA-18 primer. Two markers, OPA-1700 and OPA18-1850, were present in the accessions of Chinglong Seed Co. (lane 2–16, arrows) but they were absent in the accessions of Known-you Seed Co. (lane 17–26). Lane 2, 4, 6, 8, 10, and 14 are female parents of H37, H46, H55, M45, and S65, and H68 and lane 3, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 15, and 16 are male parents of H37, H46, H55, M45, S65, S85, S90, H68, and H80 from Chinglong Seed company. Lane 17, 19, 21, 23, and 25, are female parents and lane 18, 20, 22, 24, and 26 are male parents of Li Xue, Baixiu, Johnson Snow, Known-you early, and Snow Fang from Known-you Seed Company.

慶農種苗公司的 H37 之母本 (D1) 及 H41 之母本 (D3) 聚合在一起的機率達 53%，然後再和 H46 之父本 (D6)、母本 (D5) 聚合在一起機率達 70%。其 H55 父本 (D8)、H80 父本 (D12) 聚合在一起的機率達 96%；相似值數值越高代表可信度越高。由此可知國內花椰菜育種公司，所使用花椰菜親本皆為其培育獨有之自交系。就單一公司而言，早生親本和中晚生親本也可清楚分辨出來。例如慶農種苗公司的 H37、H41 及 H46 品種屬於早生親本，而 H55

及 H80 分別屬於中晚生親本。

### 尋找可作為品種純度檢定的分子標誌

收集不同種苗公司所提供之母本及父本自交系，利用 OPA-1、OPA-13、OPA-18、OPB-5、OPB-15、OPE-15 及 OPL-18 等 7 個可產生多型性條帶的逢機引子，分別進行種苗公司所提供花椰菜  $F_1$  商業品種及其自交系母本和父本之 DNA 分析，包括欣樺種苗公司 5 組雜交組合的父母本、農友種苗公司 5 組雜交組合的父母本及慶農種苗公司的 6 組雜交組合的父

表 2. 花椰菜指紋圖譜分析品種來源及代號

Table 2. Different parental lines from three seed companies are assigned with different codes in this study

Code	Cultivar/line	Seed source
A1	M7	Singflow Seed Co.
A2	M2	Singflow Seed Co.
A3	M14	Singflow Seed Co.
A4	E7	Singflow Seed Co.
A5	E13	Singflow Seed Co.
A6	M16	Singflow Seed Co.
A7	M9	Singflow Seed Co.
A8	M6	Singflow Seed Co.
A9	M17	Singflow Seed Co.
A10	E2	Singflow Seed Co.
B1	Li Xue ♀	Known-you Seed Co.
B2	Li Xue ♂	Known-you Seed Co.
B3	Baixiu ♀	Known-you Seed Co.
B4	Baixiu ♂	Known-you Seed Co.
B5	Johnson Snow ♀	Known-you Seed Co.
B6	Johnson Snow ♂	Known-you Seed Co.
B7	Known-you Early 2 ♀	Known-you Seed Co.
B8	Known-you Early 2 ♂	Known-you Seed Co.
B9	Snow Fang ♀	Known-you Seed Co.
B10	Snow Fang ♂	Known-you Seed Co.
D1	H37 ♀	Chinglong Seed Co.
D2	H37 ♂	Chinglong Seed Co.
D3	H41 ♀	Chinglong Seed Co.
D4	H41 ♂	Chinglong Seed Co.
D5	H46 ♀	Chinglong Seed Co.
D6	H46 ♂	Chinglong Seed Co.
D7	H55 ♀	Chinglong Seed Co.
D8	H55 ♂	Chinglong Seed Co.
D9	M45 ♀	Chinglong Seed Co.
D10	M45 ♂	Chinglong Seed Co.
D11	H80 ♀	Chinglong Seed Co.
D12	H80 ♂	Chinglong Seed Co.
C1	Fengshan very Early	Known-you Seed Co.
C2	Known-you very Early	Known-you Seed Co.

母本，合計 32 個花椰菜的雜交親本 (表 1)。尋找只出現於  $F_1$  及父本上，而不出現在母本上的分子標誌 (表 3)，期可作為品種純度的檢定。由試驗結果顯示，在欣樺種苗公司中找到 13 個分子標誌，可鑑定 6 個雜交組合。在

農友種苗公司中找到 7 個分子標誌，可鑑定 3 個雜交組合。在慶農種苗公司中找到 18 個分子標誌，可鑑定 8 個雜交組合。如慶農 H80 的 OPA1-1100 及 H90 的 OPA1-1200 等分子標記，已經用於  $F_1$  商業生產種子的純度鑑定。



圖 3. 花椰菜各親本及自交系依據 MCMC analysis 分析之親緣關係圖。

Fig. 3. Phylogenetic tree of generated by maximum likelihood method based on the data of 34 parental lines of cauliflower in this study. The tree generated by Bayesian analysis shows mean branch lengths of 50% majority-rule consensus tree from one-million generation MCMC analysis. The numbers on the branches represent posterior probability values.

## 討 論

花椰菜原產於地中海沿岸，台灣於六十餘年前(日治時代)開始引進試種，經多年馴化育種改良至今已發展出非常多的品種，依定植後到採收的天數分為早生、中生、晚生系統，不僅成熟早晚不同，且春化作用所需的溫度及時間長短亦不同(Chang 1998)。目前台灣所栽培的花椰菜品種大部分為民間種苗公司育成的雜種一代，其育成譜系及其親緣關係多為商業機密。因此若能建立不同成熟期花椰菜品種間的親緣關係資訊，並建立園藝性狀相關之分子標誌，將有助於品種的鑑別、雜交育種時的親本選擇及種源利用時的參考(Chen 2004)。Hu & Quiros (1991)以 RAPD 分子標誌研究美國花椰菜品種的遺傳變異，來自相同種苗公司的品種有相似的條帶表現。Yang (1998)以 RAPD 標誌研究台灣一些花椰菜與青花菜商業用品種的遺傳變異，結果顯示花椰菜品種間的遺傳變異小於青花菜品種間的遺傳變異，不同公司的品種可以加以區分。而本文要以台灣具有外銷潛力的商業品種及其親本來探討不同花椰菜品種的親本之遺傳變異，並找出可用的分子標誌，來檢測商業品種  $F_1$  的純度。

自 RAPD 分子標誌發展出來(Welsh & McClelland 1990; Williams *et al.* 1990)其再現性一直受到許多人的質疑，但是在 1990–2005 年仍然有 9000 篇文章發表(Atienzar & Jha 2006)。在 PCR 反應時，有些條件經適當的調整，RAPD 分子標誌仍然是一個可信賴用於偵測 DNA 變異的方式。近年來 DNA microarray 及 SNP 利用可用來偵測基因體的變化，但是 RAPD 分子標誌的分析比以上的方法來的快速及便宜，且可以偵測整個基因體的變化。

根據本研究比較國內 3 家花椰菜育種公司所使用親本的親緣性關係(表 1、圖 3)。結果顯示，3 家公司花椰菜品種的親本(為自交系)

皆可獨立區分出來，足以建立不同自交系的親緣關係。同一家公司內大部分親本其親緣關係比較接近，不同公司則相似度較低，由此可知國內花椰菜育種公司，所使用花椰菜親本皆為其培育獨有之自交系。Hu & Quiros (1991)的研究不同種子公司花椰菜及青花菜也有類似的現象。另一方面不同公司的品系大部分早生種和中晚生種，如慶農公司晚生品種 H80 的親本 D11 和 D12 可以和早生品種 H37 或 H41 的親本(D1, D2, D3, D4)，可明顯區分出來(圖 3)，Chen (2004)利用 SSR 分子標誌所得到的結果也很一致。而根據文獻報導，親本親緣關係較遠時，其  $F_1$  雜種優勢較強，根據圖 3 之親本親緣關係，也許可以協助我們瞭解台灣  $F_1$  品種其雜種優勢(Abel *et al.* 2005; Chen *et al.* 2005; Astarini *et al.* 2006; Teklewold & Becker 2006)。

另一方面，利用比較父母本及  $F_1$  分子標記的表現，我們找到至少 30 個以上的分子標誌，只出現在  $F_1$  及父本上，而不出現在母本上的分子標誌(表 3)，這些標誌的組合可以協助分別不同  $F_1$  品種；並且可以辨別是否為母本自交系自交種子所造成  $F_1$  品種的種子不純率(Crockett *et al.* 2000)，可應用在  $F_1$  品種的種子純度鑑定上。這些資料我們已建成立 Excel 的資料檔，可供廠商檢測其  $F_1$  純度的參考；目前我們已知至少有一家公司已利用這些結果從事其商業生產  $F_1$  種子的純度鑑定。並且我們可以根據這些特定分子標誌的 DNA 序列去合成專一的引子(Saal & Struss 2005; Zhang *et al.* 2008)應用在  $F_1$  品種的種子純度鑑定上。

## 結 論

利用分子標誌除了可以區分不同公司的親本外，亦利用  $F_1$  品種父母本具有不同的分子標誌來檢測其  $F_1$  品種後代的純度。根據國內不同私人種苗業者或公家機關育種者所提供之

表 3. 各花椰菜品種之指紋圖譜用來分析 F<sub>1</sub> 的特異性條帶

Table 3. The putative specific DNA markers for testing cauliflower cultivars from three seed companies in Taiwan

Primer	DNA size (bp)	Clone	Cultivar	Seed source
OPB-5	1800	OPB5-1800	M14 × E7	Singflow Seed Co.
OPB-15	1200	OPB15-1200	M14 × E7	Singflow Seed Co.
OPA-18	1900	OPA18-1900	E13 × M16	Singflow Seed Co.
OPL-18	800	OPL18-800	E13 × M16	Singflow Seed Co.
OPA-1	2500	OPA1-2500	M9 × M6	Singflow Seed Co.
OPB-15	500	OPB15-500	M9 × M6	Singflow Seed Co.
OPB-15	1000	OPB15-1000	M9 × M6	Singflow Seed Co.
OPA-18	1900	OPA18-1900	M17 × E2	Singflow Seed Co.
OPL-18	800	OPL18-800	M17 × E2	Singflow Seed Co.
OPB-5	1800	OPB5-1800	M14 × E7	Singflow Seed Co.
OPB-15	1200	OPB15-1200	M14 × E7	Singflow Seed Co.
OPA-18	1900	OPA18-1900	E13 × M16	Singflow Seed Co.
OPL-18	800	OPL18-800	M17 × E2	Singflow Seed Co.
OPA-1	1000	OPA1-1000	Baixiu	Known-you Seed Co.
OPA-18	700	OPA18-700	Baixiu	Known-you Seed Co.
OPL-18	800	OPL18-800	Baixiu	Known-you Seed Co.
OPL-18	1500	OPL18-1500	Johnson Snow	Known-you Seed Co.
OPA-18	700	OPA18-700	Snow Fang	Known-you Seed Co.
OPB-5	1000	OPB5-1000	Snow Fang	Known-you Seed Co.
OPB-15	1250	OPB15-1250	Snow Fang	Known-you Seed Co.
OPB-15	1250	OPB15-1250	H-41	Chinglong Seed Co.
OPA-1	1100	OPA1-1100	H-55	Chinglong Seed Co.
OPA-13	1250	OPA13-1250	H-55	Chinglong Seed Co.
OPB-5	1000	OPB5-1000	H-55	Chinglong Seed Co.
OPE-15	1000	OPE15-1000	H-55	Chinglong Seed Co.
OPE-15	1400	OPE15-1400	H-55	Chinglong Seed Co.
OPE-15	450	OPE15-450	H-68	Chinglong Seed Co.
OPL-18	840	OPL18-840	H-68	Chinglong Seed Co.
OPA-1	1100	OPA1-1100	H-80	Chinglong Seed Co.
OPB-15	500	OPB15-500	H-80	Chinglong Seed Co.
OPE-15	450	OPE15-450	H-80	Chinglong Seed Co.
OPL-18	840	OPL18-840	H-80	Chinglong Seed Co.
OPE-15	950	OPE15-950	M-45	Chinglong Seed Co.
OPB-15	350	OPB15-350	S-65	Chinglong Seed Co.
OPA-13	1250	OPA13-1250	S-85	Chinglong Seed Co.
OPA-1	1200	OPA1-1200	S-90	Chinglong Seed Co.
OPE-15	450	OPE15-450	S-90	Chinglong Seed Co.
OPE-15	850	OPE15-850	S-90	Chinglong Seed Co.

花椰菜主要商業栽培品種，建立 DNA 指紋分析資料庫，並利用遺傳分析，瞭解不同品種間

遺傳的歧異度，可作為品種鑑定及種原利用之參考。另一方面，我們找到至少 30 個以上的

分子標誌，只出現在  $F_1$  及父本上，而不出現在母本上的分子標誌，這些標誌不但可以鑑別這些品種的親緣性，且可作為種原間親緣關係之探討，也可應用作在  $F_1$  品種的種子純度鑑定上。利用分子標記及田間形態、生長調查之特徵，以建立台灣重要耐熱花椰菜商業品種之鑑定技術，配合快速抽取單一  $F_1$  種子 DNA 的方法，不但可保護種苗業者在  $F_1$  商業品種專利，並可有效提高生產  $F_1$  雜交種子的純度及檢定技術。最終目的希望促成我國蔬菜產業升級及提高國際市場競爭力。

### 引用文獻 (Literature cited)

- Abel, S., C. Mollers, and H. C. Becker. 2005. Development of synthetic *Brassica napus* lines for the analysis of 'fixed heterosis' in allopolyploid plants. *Euphytica* 146:157–163.
- Astarini, I. A., J. A. Plummer, R. A. Lancaster, and G. Yan. 2006. Genetic diversity of Indonesian cauliflower cultivars and their relationships with hybrid cultivars grown in Australia. *Sci. Hortic.* 108:143–150.
- Atienzar, F. A. and A. N. Jha. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat. Res.* 613: 76–102.
- Chang, L. C. 1998. Varietal improvement of cruciferous vegetables in Taiwan. p.35–53. *in* the Proceedings of Symposium on Industrial Development of Cruciferous Vegetables. Taoyuan Dist. Agric. Improv. Sta. Taoyuan. (in Chinese)
- Charters, Y. M., A. Roberson, and M. J. Wilkinson. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.* 92:442–447.
- Chen, L. P., M. F. Zhang, C. S. Li, and Y. Hirata. 2005. Production of interspecific somatic hybrids between tuber mustard (*Brassica juncea*) and red cabbage (*Brassica oleracea*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 80:305–311.
- Chen, Y. T. 2004. Genetic Variation of *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* and *B. rapa* L. in Taiwan as Depicted by Simple Sequence Repeat Markers. Master Thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University. Taipei. 87 pp.
- Chuang, H. Y., S. J. Tsao, J. N. Lin, K. S. Chen, T. D. Liou, M. C. Chuang, and Y. W. Yang. 2004. Genetic diversity and relationship of non-heading Chinese cabbage in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:331–337.
- Crockett, P. A., P. L. Bhalla, C. K. Lee, and M. B. Singh. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar. *Genome* 43:317–321.
- Divaret, I., E. Margalé, and G. Thomas. 1999. RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of a *Brassica oleracea* L. collection. *Theor. Appl. Genet.* 98:1029–1035.
- Hu, J. and C. F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10:505–511.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755.
- Junghans, H. and M. Metzloff. 1990. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *BioTechniques* 8:176.
- Kresovich, S., A. K. Szewc-McFadden, S. M. Bliet, and J. R. McFerson. 1995. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.* 91:206–211.
- Lu, X., L. Liu, Y. Gong, L. Zhao, X. Song, and X. Zhu. 2009. Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR markers. *Sci. Hortic.* 122:645–648.
- Mailer, R. J., R. Scarth, and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphism amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* 87:696–704.
- McGrath, J. M. and C. F. Quiros. 1992. Genetic diversity at isozyme and RFLP loci in *Brassica campestris* as related to crop type and geographical origin. *Theor. Appl. Genet.* 83:783–790.
- Plieske, J. and D. Struss. 2001. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. Development

- in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theor. Appl. Genet.* 102:689–694.
- Saal, B. and D. Struss. 2005. RGA- and RAPD-derived SCAR markers for a *Brassica* B-genome introgression conferring resistance to blackleg in oilseed rape. *Theor. Appl. Genet.* 111:281–290.
- Saha, S., R. Molla, D. Chandra, and L. Rahman. 2008. Assessment of genetic variation and relationships within the varieties of four *Brassica* species by RAPD markers. *Aus. J. Crop Sci.* 2:105–114.
- Song, K. M., T. C. Osborn, and P. H. Williams. 1988a. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs): 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor. Appl. Genet.* 75:784–794.
- Song, K. M., T. C. Osborn, and P. H. Williams. 1988b. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs): 2. Preliminary analysis of subspecies within *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 76:593–600.
- Song, K. M., T. C. Osborn, and P. H. Williams. 1990. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs): 3. Genome relationship in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *campestris*). *Theor. Appl. Genet.* 79:497–506.
- Teklewold, A. and H. C. Becker. 2006. Comparison of phenotypic and molecular distances to predict heterosis and  $F_1$  performance in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun). *Theor. Appl. Genet.* 112:752–759.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* 18:7213–7218.
- 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.
- Yang, Y. W., S. F. Hung, T. H. Wong, T. L. Chang, H. Huang, and C. T. Tsai. 1997. Using RAPD markers to study genetic variation among  $F_1$  hybrids and their parents of broccoli and cauliflower. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 43:306–313.
- Yang, Y. W., W. H. J. Kuo, and T. H. Wong. 1998. Genetic polymorphism of seven populations of *Capsella bursa-pastoris* based on RAPD markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39:17–21.
- Zhang, F., G. Wang, M. Wang, X. Liu, X. Zhao, Y. Yu, D. Zhang, and S. Yu. 2008. Identification of SCAR markers linked to or, a gene inducing beta-carotene accumulation in Chinese cabbage. *Euphytica* 164:463–471.

# Studies on Genetic Variation among Commercial Cultivars and Parental Lines of Cauliflower in Taiwan<sup>1</sup>

Hui-Ling Lo<sup>2</sup>, Shough-Peng Lee<sup>2</sup>, Xiu-Ping Chen<sup>2</sup>, De-Lin Cai<sup>2</sup>, Jaw-Neng Lin<sup>2</sup>,  
San-Tai Wang<sup>2</sup>, Kan-Shu Chen<sup>3,5</sup>, and Yau-Wen Yang<sup>4,5</sup>

## Abstract

Lo, H. L., S. P. Lee, X. P. Chen, D. L. Cai, J. N. Lin, S. T. Wang, K. S. Chen, and Y. W. Yang. 2012. Studies on genetic variation among commercial cultivars and parental lines of cauliflower in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:285–297.

This study was to investigate genetic variation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), using 16 commercial hybrid cultivars developed in Taiwan and their parental lines and two open pollinated lines; and to find molecular markers which can be used for testing F<sub>1</sub> seed parity. Seven oligomers from initial screening were selected and used to generate 92 polymorphic molecular markers for studying phylogenetic relationships among these 34 cauliflower Cultivars/lines from three seed companies. The phylogenetic tree of the 34 cauliflower Cultivars/lines showed that seed source was an important factory affecting genetic relationships of cauliflower, Cultivars/lines from same company were more closely related than Cultivars/lines from different companies. Moreover, more than 30 molecular markers were present in F<sub>1</sub> hybrids and male parent but were absent in female parent. These molecular markers can be used to test the purity of F<sub>1</sub> seeds of cauliflower and, are of potential for commercial production of hybrid cultivars.

**Key words:** Cauliflower, Variety, Genetic diversity, Molecular marker.

- 
1. Contribution No. 2706 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: August 10, 2012.
  2. Respectively, Assistant Researcher, Assistant Researcher, Assistant, Assistant, Assistant Researcher, Associate Researcher and Head, Department of Vegetable Crops, Fengshan Tropical Horticulture Experimental Station, TARI, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
  3. Researcher and Director, Fengshan Tropical Horticulture Experimental Station, TARI, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
  4. Research Scientist, Kale Biotechnology, Tainan, Taiwan, ROC.
  5. Corresponding author, e-mail: kschen@fthes-tari.gov.tw; yauwenyang@yahoo.com.tw; Fax: (07)7315590.