

以RAPD分析豌豆種源遺傳歧異度之研究¹

陳裕星、郭俊毅、秦立德²

摘 要

本研究藉由隨機複製多型性DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)技術，針對國家作物種源庫之收藏，探討種源間之遺傳歧異性，以作為種源研究及育種工作之參考。研究顯示所有種源可分為三群及五個單一品種，38個引子共產生232條帶，每組引子可產生3~11條帶，平均每組可產生6.1條帶，所有品種之遺傳相似度最低為0.626，最高0.978。由研究顯示RAPD可正確顯示種源間之親緣關係與遺傳歧異度。

關鍵字：RAPD、遺傳資源，豌豆、遺傳歧異度。

前 言

傳統農業生產之基礎奠基於各個不同且具長久風土適應性的獨立集團⁽⁸⁾，亦即地方品種(landraces)。而作物整體的基因歧異度則被保留在各不同的地理區中，或稱變異中心(centers of origin)⁽²⁴⁾。Vavilov認為作物變異中心歷經長時間各種突變之累積，具有適應不同環境與氣候變化等之豐富基因型，尤其突變經由人的審慎選種而被保存，對於作物育種具有極高之價值。隨著全球的工業化與國際化，基因流失的速度與廣度也日益增加。因此種源收集及保存的重要性早已被各國政府體認，然而可投注在種源庫運作經營之經費與人力有限，如何提昇種源庫收藏的品質並兼顧長期的風險管控與短期的使用便利性，且減少運作成本已成為亟待解決的問題。對於種源庫的管理者而言，與所收藏基因資源相關的議題包括：(1)正確性：各品系分類正確且名實相符。(2)遺傳結構及關聯性：所收集種源是否廣泛代表了各種基因或族群，以及該種源之地方品種、近親緣種或野生型等。(3)基因定位：所需求的基因位於何品系，乃至於染色體之位置⁽¹³⁾。

對於育種工作而言，在育種計劃中應包含具有廣泛基因型之育種材料，若親本使用親緣關係接近之品種，其後代往往無法突破親本之表現，在異交作物近親繁殖之情形甚或會產生自交劣勢，造成產量與活力低下。反之，具有廣泛基因型之組合其後代則常具雜種優勢，在作物之表現範圍包括了較高的活力、植株較高大、良質豐產及較能抵抗環境逆境與病蟲害等。雜種優勢的理論⁽⁸⁾包括超顯性學說，顯性學說，基因上位性等。以育種而言，若要育出具有新特性之品種，不論是抗病性，抗蟲性，早熟性或改良品質與產量，其興趣在於一基因或一

¹ 台中區農業改良場第 0530 號報告。

² 台中區農業改良場助理研究員，副研究員，助理。

基因群，均需引種以導入期待之性狀，因此，對於作物種源庫之收藏進行客觀之評估極為重要，以利育種者進行其育種計畫。種源庫之收藏便應循此目標，加強種源收集工作，因此，若能有一套技術可以迅速且詳實的分析種源之遺傳歧異度，對育種工作而言將會有莫大的貢獻。

關於遺傳歧異度之研究方面，Nei^(16,17)曾對遺傳歧異度下定義：遺傳歧異度乃「由一族群中隨機選取的兩個基因座為相異的頻率(the probability that two alleles taken at random within a population are different)」。在評估遺傳歧異度時，常用的指標包括在一族群中，變異個體的豐富性^(12,16,17,18) (variants richness, A)、變異個體出現之頻率(frequencies of variants, E)或稱異質結合性(heterozygosity, H)、以及變異出現之平均性(evenness of variants)。對遺傳歧異度之研究通常包括兩個目的：(1)在一特定族群之遺傳多型性，及(2)在不同族群中多型性之分布⁽¹⁶⁾。在傳統的評估鑑定方法中，除了以地理區區分之外，主要由農藝性狀分析，包括株高、產量、抗病性、花色、節間長度、分蘖數或其角度等；然而表型之調查常因基因與環境的交互作用而無法得到完整之資料。因此早期關於族群遺傳或族群遺傳歧異度之研究常以同功異構酶進行，所使用之指標為相似度(similarity, s)⁽¹²⁾，其實質為族群中兩個體具有相同條帶的係數(band-sharing coefficient)

$$s = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$$

其中 N_a ， N_b 為個體a及b分別能記錄到的條帶數目，而 N_{ab} 為此兩個個體具有相同電泳泳動距離及條帶濃度的數目。雖然同功異構酶方法具有相當多的優點，例如酵素條帶之遺傳行為符合孟德爾遺傳定律，然而以同功異構酶方法分析時，常受限於可用的標幟有限。目前在分子生物技術的輔助下，不論是RFLP，RAPD，AFLP或SSR等，均可產生不同質量之多型性^(20,21,23)，對遺傳資源的評估似已可迅速正確的分析，在這些評估方法之中，RAPD為廣泛使用之工具之一。RAPD技術乃於1990年末由Williams 氏等⁽²⁶⁾所發展之一技術，用以分析DNA樣品。此法利用隨機組合的鹼基(一般為十個)為引子，針對DNA進行煉合與擴大複製，這些隨機引子可以和DNA中數百個以上的互補序列進行雜交，通常在相鄰兩個雜合部位之距離小於2 kbp時，該段DNA可被複製出來，之後記錄條帶之有無據以比較不同種類或族群間之差異，稱為隨機擴大複製多型性DNA (Random Amplified Polymorphic, DNA)。由於此法步驟簡便並且直接分析基因組，因此廣被使用於多方面的分析如：分析種源之遺傳歧異度⁽²⁰⁾，包括十字花科之蔬菜如甘藍^(5,7,23) (cabbage)、芥藍(kale, *Brassica oleracea*)、油菜(rape, *B. napus*)、芥菜(mustard, *B. juncea*)以及菊科之萵苣(*lactuca sativa* L.)等⁽²⁸⁾；分析不同品系間之遺傳與譜系關係如馬鈴薯⁽¹⁵⁾ (potato, *Solanum tuberosum*)、大麥⁽²⁷⁾ (barley, *Hordeum vulgare*)，乃至於鑑定品種等。

不同的研究者曾比較利用RFLP、RAPD、SSR、及AFLP等技術進行包括大麥^(21,22,27)、馬鈴薯⁽¹⁵⁾、番茄⁽²⁵⁾、蕓苔屬蔬菜⁽²³⁾等作物之種源鑑定、遺傳相似度及親緣分析之優缺點，發現

此四種方法皆可用於種源鑑定，因為這四種方法皆能產生相當程度的多型性條帶，足以區分不同的作物品系。在遺傳相似度方面，以大麥而言，此四種技術皆能夠將大麥分成冬作及春作二型⁽²¹⁾，符合依型態及栽培特性的慣行區分方式，大麥與馬鈴薯遺傳相似度的數值在不同方法間也相當接近。而RFLP、AFLP及RAPD三者可將具有相同譜系關係及栽培習性的品系作進一步的歸類，但SSR技術則否⁽²¹⁾。以RFLP、及RAPD分析在親緣關係分析上分十字花科不同種屬蕓苔屬蔬菜⁽²³⁾，包括甘藍(*Brassica oleracea*)，芥菜(*B. juncea*)，油菜(*B. napus*)的不同品系，發現RFLP及RAPD二者均能呈現正確的譜系關係，並且其歸群分析結果相關性皆非常顯著。相對的，SSR與RAPD分析所得之結果則較不一致。Rus-Kortekaas⁽³³⁾認為在分析番茄品系間之親緣關係時，RAPD比SSR在不同品種間能產生較多共同條帶，因此能更正確的顯示不同品系的遺傳背景與親緣關係。Liu等⁽³¹⁾及Castiglione等⁽²⁹⁾分別分析白楊屬(*Populus* spp.)不同種及品系發現RAPD也可以得到與已知譜系關係品系一致的結果。這些研究結果皆顯示RAPD在分析作物遺傳相似度及譜系關係之效能並不遜於使用RFLP或AFLP，然而施行RAPD分析在方法上大為簡便。

但RAPD法並非全無缺點，在技術上，再現性是一個常為人詬病的問題^(10,14)，必須審慎的進行實驗步驟。引子的GC值也會造成RAPD法在篩選基因組時的偏差，使得條帶的產生或消失並非全然為隨機發生(non-arbitrary)，其次RAPD及AFLP條帶之發生為共顯性，並非隨機獨立⁽³²⁾。Chamberlain等⁽³⁰⁾曾比較AFLP、RAPD及ITS sequencing等三種技術分析石南屬(*Rhododendron* spp.)植物種間之親緣關係，發現以AFLP及RAPD所得之親緣關係樹狀圖僅能在品種間，或者種之下的層級可正確歸群，僅有約50%作出正確的分析，在種間(species level)其分析能力非常差(very poor fit)。反之，以ITS序列資訊則不論在種或屬內的階層其親緣關係分析皆可以得到相當好的結果(good fit to very good fit)。Peterson⁽³²⁾認為不論RAPD、AFLP或RFLP等技術均不適合作親緣關係的分析之用，僅DNA的序列資訊足以解決之。這是因為AFLP及RAPD，條帶產生為共顯性並非隨機獨立，且條帶的記錄相當主觀。而RFLP主要的缺點在於其假設條帶產生為獨立(character independence)與事實不符，而影響了資料的分析。

此外，RAPD法所產生條帶的方式與RFLP法中條帶的產生與否方式並不相同，二者條帶產生或刪除的機率並不相同。因此比較不同方法進行歸群分析時，AFLP與RFLP法所得到的結果相關係數一般較高，可能是因為這二個方法在第一階段都使用限制酶作處理之緣故，AFLP與SSR的分析結果相關係數則最低。

縱使RAPD法有這些缺點，Waycott⁽²⁸⁾仍認為RAPD有其無法被取代之優點，在篩選種源庫之萵苣屬(*Lactuca* spp.)種源中五個不同subsection及萵苣(*Lactuca sativa* L.)不同品系之變異時，利用鄰接法(Neighbor Joining, NJ)分析RAPD資料仍可以作出恰當的分群，由型態與基因型分析結果其相關係數為中等但仍顯著(0.53~0.8)，但以RAPD法較迅速簡便。DNA序列資訊(ITS sequence)雖然可以更準確的分析親緣關係，面對數量龐大的作物品系時，不僅序列資訊

不足，難以執行分析鑑定工作，對於族群遺傳結構的分析用處也不大。微衛星體序列雖可以分析族群之變異，但無法建構親緣關係，RFLP、RAPD及AFLP等技術則可針對作物種源進行親緣關係乃至於族群遺傳結構分析。

關於分子標記之異質性或歧異度與雜交後代表現之研究目前仍屬有限，雖然雜種優勢(Heterosis)在學理及實際育種工作中皆有佐証，育種時亦常以遺傳距離遠(依分類特性如型態及地理分布等區分)的品種雜交以改進一般組合力，甚或跨屬遠緣雜交以獲得特定性狀如抗蟲抗病性等。但是否以分子標誌所分析出之遺傳距離遠(異質性高)之親本其雜交後代便具有較高之雜種優勢仍待驗證。Zhang等⁽³⁵⁾ (1996)曾分析9個籼稻(indica)品系及11個粳稻(japonica)品系，以非正反交型式對籼稻與粳稻族群分別作了36種及55種的雜交組合，並評估F₁雜交種之基因異質性(以RFLP及SSR測定)及田間表現，在其評估的7個性狀中，發現除了分蘖數之外，抽穗期、株高、每穗種子數、穗長、種子重與產量等雜種優勢表現與異質性(Heterozygosity)大多呈正相關，株高此項目特別顯著，產量及每穗種子數量則與異質性呈中等相關。整體而言，籼稻品系之雜種優勢與異質性之相關性則又高於japonica品系，雖然雜種優勢產生的機制在不同性狀間相當不一致，也隨著所使用材料變化而不同，但分子標誌之異質性與雜種優勢有相當程度的一致性，值得作進一步探索。

豌豆為本省重要蔬菜之一，品種繁多，依用途可分為豆苗用、豆仁用、嫩莢用及甜豌豆等。本場依不同用途已育成台中11號、台中12號、台中13號及台中14號等豌豆品種^(1,2,3,4)。本研究乃以RAPD法對國家作物種源庫之豌豆種源收藏進行分析，期能了解這些種源的遺傳結構，對於種源保存提出核心清單，以減少保存及複製種源所需要之人力，作為種源研究工作之參考。對於育種工作進行者則建議使用種源材料之清單，以妥善運用人力與資源，以育出良質豐產之品種。

材料與方法

植物材料

本研究所用材料由國家種源庫提供共214份種源，由其中選取可能較具代表性之種源80份進行分析(表一)。首先將豌豆種子置於濕潤擦手紙之間再移至於半密閉塑膠盒中⁽⁹⁾，隨後放進20 生長箱內發芽，約五日後當第一片本葉完全展開時去除子葉，取全株以CTAB法萃取DNA。

試驗方法

1. DNA萃取：

用液態氮將幼苗在研鉢中研磨成粉，加入 700 μ l 65 $^{\circ}$ C 預熱過的 CTAB buffer，混勻後，置於65 $^{\circ}$ C 水浴下30分鐘，並常倒置混合。之後加入10 μ l 10mg/ml 的proteinase K在37 $^{\circ}$ C下反應30分鐘。然後加入700 μ l的phenol：chloroform=1：1 (v/v, phenol經Tris pH 8.0飽和

過), 充分混勻後於4℃下10,000 rpm離心10分鐘, 取上層液經過濾, 移至另一新的離心管, 並加入0.7倍體積的2-propanol與1/10體積4.4 M的NH₄OAc, 置於-20℃2小時以沈降DNA, 然後取出離心管於4℃下, 以10,000 rpm離心10分鐘, 倒掉上層液, 以1 ml 70%酒精清洗之後再離心, 倒掉酒精, 簡單乾燥後, 加入400 µl的TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)溶解DNA, 並加入5 µg RNase, 於65℃下反應10分鐘後, 加入500 µl同上的phenol:chloroform=1:1(v/v), 於4℃下10,000 rpm離心10分鐘, 取上層液移至另一新的離心管, 並加入45 µl 4.4 M NH₄OAc及3倍體積95%的酒精, 均勻混合, 置於-70℃下30分鐘以沈降DNA, 然後取出並於4℃下10,000 rpm離心10分鐘, 倒掉上層液, 以1 ml 70%酒精清洗並離心DNA二次, 最後倒掉上層液, 抽氣乾燥, 加入20 µl的TE buffer及180 µl的ddH₂O溶解DNA, 存於-20℃中備用。

2. DNA定量

取總DNA 抽取液5 µl溶於495 µl的水中, 注於石英比色管中, 經充分混合後, 將比色管置入分光光度計(Hitachi U-2001 Spectrophotometer)中, 以波長260 nm紫外光測定吸光度, 所得吸光值乘以50, 再乘稀釋倍數, 即得原抽取液之DNA濃度(ng/µl)。依不同樣品DNA 抽取液的濃度, 將各DNA樣本稀釋成10 ng/µl, 做為PCR反應之模板DNA用。

3. PCR反應及電泳染色

RAPD的反應內容物及濃度依Williams⁽²⁴⁾之方法所述, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8) 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) BSA, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dTTP與0.2 µM的隨機引子(Operon Co.: A1-A20; B1-B20; C1-C20), 1 unit的*Taq* DNA聚合酵素(GeneTaq, Gene Mark Co.), 最後加入50 ng的模板DNA, 加無菌水總體積補成25 µl, 置於0.2 ml的微量離心管, 反應器使用Biometra UnoII, 其熱循溫度及時間如下, 首先94℃3分鐘, 接下來三步驟進行40個循環, 分別為94℃1分鐘, 40℃1分鐘, 72℃2分鐘等, 最後72℃反應5分鐘。電泳使用TBE緩衝液, 以2%瓊脂膠(30x25 cm²)於大型電泳槽以200伏特電壓進行。電泳結束後膠體以EtBr染色, 在紫外燈下觀察、照相。

4. 統計分析

以1、0代表DNA條帶的有或無, 依此製作DNA條帶圖譜; 並以Lynch⁽¹¹⁾的方法, 計算出樣本間兩兩相似度:

$$\text{Similarity} = 2N_{AB}/(N_A + N_B)$$
, 其中 N_A , N_B 分別代表A, B二樣本的DNA條帶數, N_{AB} 為兩樣本共有的條帶數, 依此法將所有樣本的兩兩相似度排成一個三角距陣, 以不加權平均重方式(UPGMA)進行群叢分析(cluster analysis)繪製出樹狀關係圖(dendrogram), 相似度及群叢分析皆由NTSYS套裝軟體完成。

表一、本研究所使用之種源名稱與提供者¹

Table 1. The code or name of pea accessions and suppliers used in this research

Code	Name/code of accessions used	Source ²	Code	Name/code of accessions used	Source
1	VN89CKS085	NPGRC	41	Tender Pod M. L.	NCHU
2	VN89CKS095	NPGRC	42	R Freezer	NCHU
3	VN89CKS129	NPGRC	43	TK-L-1	NCHU
4	Ching Hsiao Yuan Wan Tou	NPGRC	44	30 days	NCHU
5	Hung Hsiao Yuan Wan Tou	NPGRC	45	Taichung Sel. 13	NCHU
6	Cheng Tu Ti Fang Chung	NPGRC	46	Taichung Sel. 1	NCHU
7	Wan Tou / TVI7556	TARI	47	Thailand White Flower	NCHU
8	Wan Tou / TVI7588	TARI	48	Wu Sui (CKW00072)	NCHU
9	Wan Tou / TVI7903	TARI	49	Native White Flower	NCHU
10	1-01	NCHU	50	Taichung Sel. 119-1	NCHU
11	1-02	NCHU	51	7-229	NCHU
12	1-03	NCHU	52	7-231	NCHU
13	1-05	NCHU	53	63-1	NCHU
14	1-06	NCHU	54	106-9-5	NCHU
15	1-08	NCHU	55	119-1	NCHU
16	1-09	NCHU	56	Early perfection	TDAIS
17	1-10	NCHU	57	Dely 2	TDAIS
18	1-11	NCHU	58	Satsuma	TDAIS
19	1-13	NCHU	59	Taichung Zen Shih 8	TDAIS
20	1-14	NCHU	60	Taichung Zen Shih 12	TDAIS
21	1-15	NCHU	60	Taichung Zen Shih 21	TDAIS
22	1-16	NCHU	62	Taichung No. 13	TDAIS
23	1-17	NCHU	63	Taichung No. 12	TDAIS
24	1-18	NCHU	64	New Wusui	TDAIS
25	1-28	NCHU	65	Good Farmer No. 1	TDAIS
26	1-29	NCHU	66	GPB-65-13	KYSEED
27	1-30	NCHU	67	GPB-67-2	KYSEED
28	1-32	NCHU	68	GPB-67-3	KYSEED
29	1-35	NCHU	69	GPB-68-3<A>	KYSEED
30	1-36	NCHU	70	GPB-70-2	KYSEED
31	1-38	NCHU	71	GPB-72-6<A>	KYSEED
32	1-39	NCHU	72	GPB-72-7	KYSEED
33	1-44	NCHU	73	GPB-72-8<A>	KYSEED
34	1-46	NCHU	74	GPB-72-10	KYSEED
35	1-48	NCHU	75	GPB-73-11<A>	KYSEED
36	1-49	NCHU	76	GPB-73-13<A>	KYSEED
37	1-51	NCHU	77	GPB-74-16<A>	KYSEED
38	1-52	NCHU	78	GPB-75-19	KYSEED
39	Bonnerille	NCHU	79	GPB-77-56	KYSEED
40	D. G-5	NCHU	80	Taichung No. 9	TDAIS

¹ Source of data: National Plant Genetic Resource Center.² Abbreviation: NPGRC, National Plant Genetic Resource Center; TARI: Taiwan Agriculture Research Institute; NCHU: National Chung Hsin University; TDAIS: Taichung District Agricultural Improvement Station; KYSEED: Know-You Seed Co.

結果與討論

RAPD為相當靈敏之方法，其缺點為實驗條件須嚴格控制，否則再現性會受到影響⁽¹⁴⁾。Jones氏等⁽¹⁰⁾曾探討在相同實驗條件但不同實驗室間，由RAPD法所產生多型性條帶之再現性，發現亮度最強之條帶在不同實驗室之間皆能被有效複製出來，而次強與次弱之條帶在1200 bp時被複製機率亦高(80%-100%)，有鑑於此，本研究於記錄條帶時，以明顯較亮之條帶為主。

本研究共篩選60條引子，並採用其中顯像較好的38組引子(表二)，共記錄了232條帶，每組引子可產生4至11組之多形性條帶，平均每組引子可產生6.1條帶，條帶大多落於300~2000 bp之間(表二，圖一)。

所有種源經群叢分析後可看出種源間之遺傳相似度，其中編號第1、2及11、12組之種源遺傳組成最為接近，高於0.95；相似度最低之種源則為3、21、60、64號，包括地方品種青小圓豌豆與新黑目、台中仁系12號及1-15號等(圖二)。所有參試品種以相似度0.8為基準可約略分成3群及5個獨立種，參照種源庫所提供之資料，第一群種源來源主要由中興大學所提供，亦包括3個農試所提供之種源，2個種源庫收集的種源，以及3個地方品種：紅小圓、海門小圓及成都地方種。紅小圓與海門小圓種之遺傳距離較近(SI=0.946)，成都地方種則與其餘種源相似度較低(SI=0.87)。

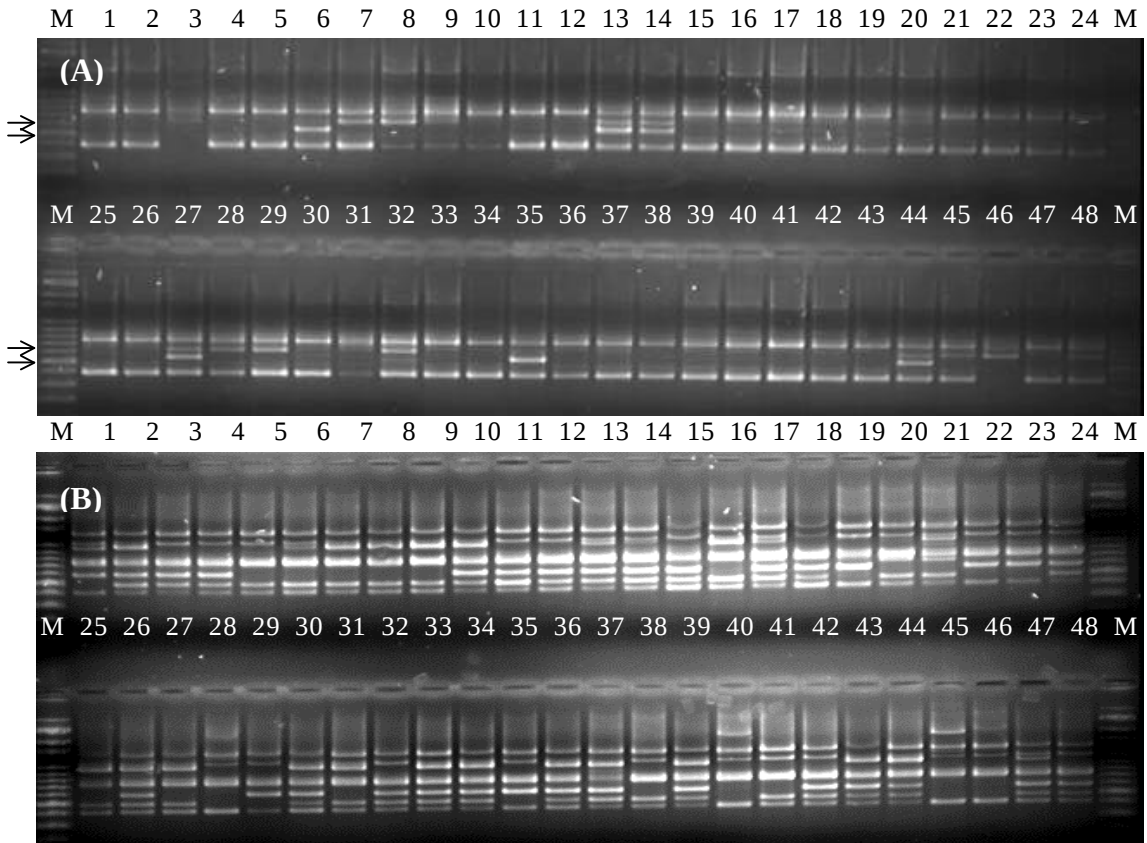
第二群種源之主要提供者亦為中興大學，本群種源中包括了一些種系或地方品種，例如Bonnerille，D、G-5，Tender Pod，R-freezer，TK-L-1，Thailand White Flower (泰國白花)、黑目、台中選育1號、119-1號等。

第三群種源則包括農友公司所提供之品系以及本場所提供之種源，這些種源包括外國品種如薩摩、得利2號，台中13號等。其中台中13號為台灣最被廣為栽培的優良品種。本場所育成之優良品種其父母本皆為由國外進之品種^(1,2,3,4)，而由中興大學所提供之品系亦可經由RAPD分析區分出不同品種(第二群種源)，第一群種源極有可能為第二群種源所育出之選系(仍待查證)。在專一性條帶方面，可發現品系“1-15”“GPB72-8”及青小圓豌豆各具有2、1、1條專一條帶，這應是造成此三品種與其他品種遺傳距離較遠之情形之一。在以親緣關係或品種鑑定為目的時，具有高度多型性條帶的引子組合常被用來當作分析之依據⁶，但為了詳實的了解種源之遺傳歧異度，本研究並不排除產生同質性高的條帶的引子(圖一A)，而是將所有PCR結果清晰之引子組合皆納入分析，以避免人為選擇所造成的偏差。當以少數引子組(少於10組)作為分析基礎時可以發現，不同組合之引子組所解析之遺傳相似度變異極大，但若參與分析之引子組高於30組時，所有品種之遺傳相似度數值會漸漸穩定下來(資料未顯示)。本研究所有品種之遺傳相似度最低為0.626，最高0.978，平均為0.87，所採用之引子數是否已充分且均勻地代表豌豆之基因組成，而平均值0.87是否足以代表豌豆此一物種(species)之一般遺傳相似度數值仍待進一步探討，必需做更多種源比較。而由群叢分析及實際資料顯示，種源

表二、本研究所使用之逢機引子

Table 2. RAPD primers used for assay in this study

Primers	Sequence 5' 3'	Number of bands/assay	Size range of bands (bp)
OPA-01	CAGGCCCTTC	6	500-2000
OPA-02	TGCCCAGCTG	6	200-900
OPA-03	AGTCAGCCAC	7	500-3000
OPA-04	AATCGGGCTG	10	200-1500
OPA-05	AGGGGTCTTG	8	200-2000
OPA-08	GTGACGTAGG	8	200-1500
OPA-09	GGGTAACGCC	6	400-2000
OPA-11	CAATCGCCGT	7	300-1300
OPA-12	TCGGCGATAG	5	300-2000
OPA-13	CAGCACCCAC	6	500-2000
OPA-14	TCTGTGCTGG	8	300-3000
OPA-15	TTCCGAACCC	4	400-900
OPA-17	GACCGCTTGT	3	500-1500
OPA-18	AGGTGACCGT	7	200-1500
OPA-19	CAAACGTCGG	5	400-1500
OPA-20	GTTGCGATCC	7	300-2000
OPB-01	GTTTCGCTCC	6	400-1500
OPB-02	TGATCCCTGG	3	600-1500
OPB-03	CATCCCCCTG	4	500-1300
OPB-04	GGA CTGGAGT	3	600-800
OPB-05	TGCGCCCTTC	6	400-2500
OPB-06	TGCTCTGCCC	5	700-2000
OPB-07	GGTGACGCAG	8	300-1300
OPB-08	GTCCACACGG	7	300-1300
OPB-09	TGGGGGACTC	4	400-1300
OPB-10	CTGCTGGGAC	4	400-1300
OPB-13	TTCCCCCGCT	7	500-2000
OPB-14	TCCGCTCTGG	4	600-3000
OPB-15	GGAGGGTGTT	8	200-2000
OPB-16	TTTGCCCGGA	3	400-800
OPB-17	AGGGAACGAG	7	300-1300
OPB-18	CCACAGCAGT	6	200-1300
OPC-04	CCGCATCTAC	9	200-2000
OPC-05	GATGACCGCC	8	300-3000
OPC-06	GAACGGACTC	6	200-2000
OPC-07	GTCCCGACGA	9	400-1500
OPC-08	TGGACCGGTG	3	300-800
OPC-09	CTCACCGTCC	6	400-1300

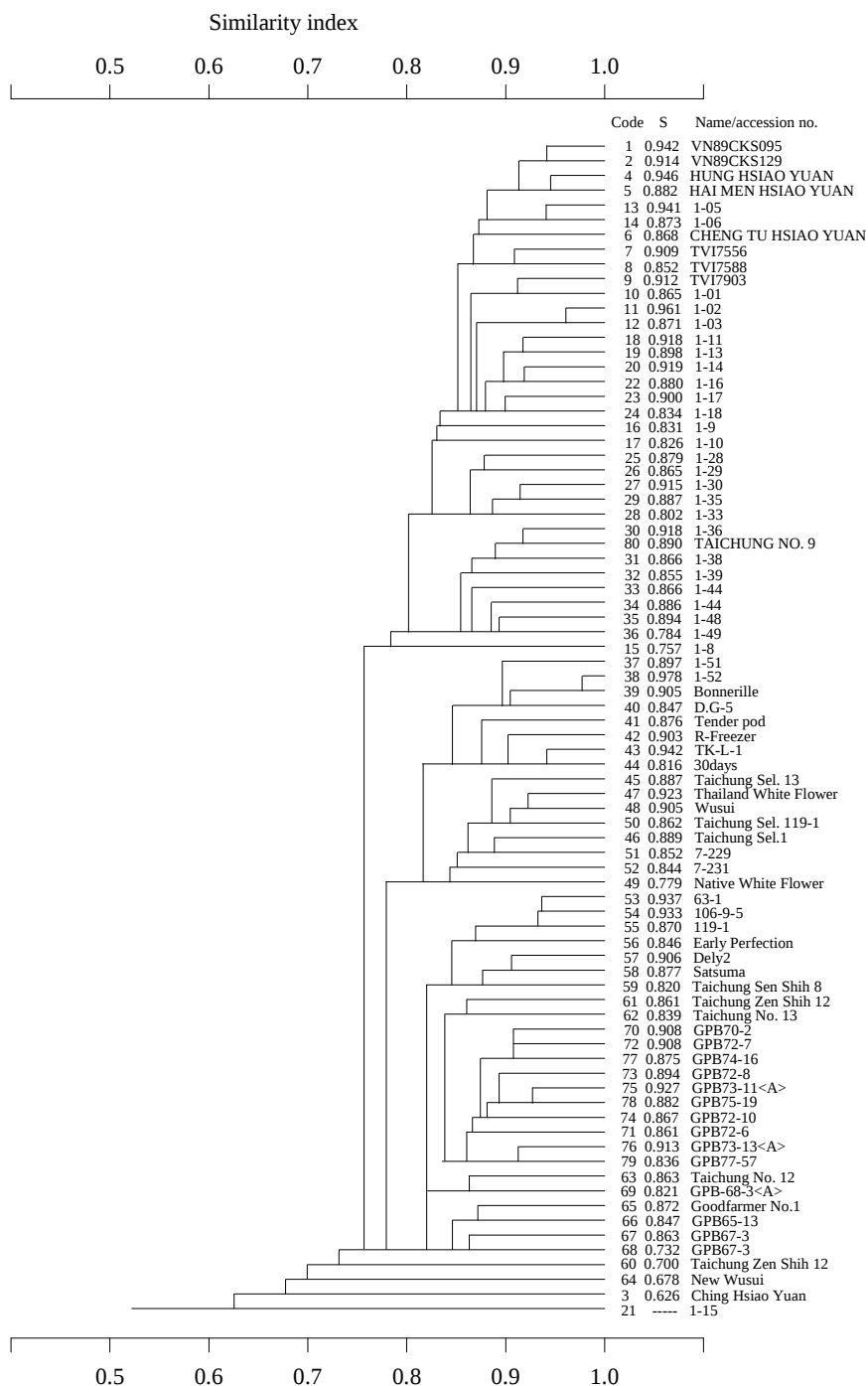


圖一、48 個豌豆品種以 OPC-06 (A), OPC-09 (B) 複製擴大之 RAPD 圖譜，圖左、右皆為 Bio-100 標誌，電泳圖內依序由左至右為品系第 1-24 (上排)，25-48 (下排) 號(如表一所示)，箭頭所指處為較少出現之條帶。

Fig. 1. Band patterns of 48 accessions of pea amplified with OPC-06 (A) and OPC-09 (B) primers. On the electrophoresis map, both lanes at the left and right margins are bio-100 markers (M), next to the marker are accessions 1-24 (upper row) and 25-48 (lower row) from left to right accordingly. Arrows indicate infrequent bands.

庫目前所收藏之豌豆種源來自於有限之地方品種或商業品種，例如成都小圓、自日本引進的薩摩等，各品系間之遺傳背景，種源間之親緣關係可由 RAPD 來解析。

Xiao 等⁽³⁴⁾曾利用 RAPD 探討水稻的分子標誌異質性與 F_1 的雜種優勢表現，發現其有顯著的正相關，顯示雜種優勢可從分子標誌所得到的遺傳距離的遠近來預期。目前在台灣栽培最廣之莢豌豆及甜豌豆分別為台中 11 號與台中 13 號，其親本包括了薩摩、得利等引進之品種，若要突破台灣地區目前優良品種之表現，育出具有更廣泛基因型之品系，可能需由第二群及第三群之種源間雜交再進行選拔，或再引進國外種源。同時 RAPD 也可以正確的分析譜系關係，將來也可以運用作為親緣關係與品種鑑定之用。



圖二、豌豆 80 個品系間之相似度。

Fig. 2. Similarity index of 80 accessions of pea.

RAPD、RFLP、及 AFLP 等以記錄條帶為主之方法有其限制之處，如共顯性及非獨立性等，縱使白楊屬研究為 RAPD 法提供了相當好的支持基礎，可能仍較不適合作為植物跨科、屬、種之演化與親緣關係分析，否則可能因為方法本身的特性造成了錯誤的結論，如石南屬之例子即是。然而，有關於作物之族群遺傳結構，遺傳歧異度(或相似度)乃至於品種鑑定分析時，RAPD 仍不失為一有效之方法，尤其是針對作物種源而言，在同一種內，往往就有以百計或更多野生種及地方品種，雜交商業品系更是不計其數，利用基因型作歸群分析可同樣得到與表現型相一致的結果，已在許多研究中得到驗證，如十字花科蔬菜、大豆、大麥、馬鈴薯、番茄、萵苣等，並且效率更高，可在短時間獲得大量的資訊。此外 RAPD 法常被運用於篩選遺傳變異，基因輿圖研究等，在正確的運用方式下會是極有用之輔助研究工具。

誌 謝

本研究承農委會計畫(020101CSD1)經費補助，分析試驗工作由賴月櫻、曹淑娟小姐協助，特此誌謝。

參考文獻

1. 郭俊毅 1981 豌豆新品種台中11號之育成 台中區農業改良場研究彙報 5:24-29。
2. 郭俊毅 1988 抗白粉病豌豆台中12號之育成 台中區農業改良場研究彙報 20:49-60。
3. 郭俊毅 1990 甜豌豆台中13號之育成 台中區農業改良場研究彙報 27:49-63。
4. 郭俊毅 1998 豌豆台中14號之育成 台中區農業改良場研究彙報 58:21-32。
5. dos Santos, J. B., J. Nienhuis, P. Skroch, J. Tivang and M. K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 87:909-915.
6. Grog, R., U. Schachtschabel, E. Ritter, F. Salamini and C. Gerbhardt. 1992. Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Science*, 32: 815-819.
7. Hallden, C., N. O. Nilsson, I. M. Rading and T. Sall. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 88:123-128.
8. Harlan, J. F. 1992. *Crops and man*. Amer. Soc. Agron., Madison, Wisc.
9. International Seed Testing Association. 1996. International rules for seed testing. Rule 1996. *Seed Science and Technology* 13:299-355
10. Jones, C. J., K. J. Edwards and S. Castiglione. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*. 3(5): 381-390.

11. Lu, J. Knox, M.R. Ambrose, M.J. Brown, J.K.M. Ellis, T.H.N. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical & Applied Genetics*. 93 (7): 1103-1111.
12. Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 7:478-484.
13. McFerson, J. R. 1998. From *In Situ* to *Ex Situ* and back: the importance of characterizing germplasm collections. *HortScience*, 33:1134-1135.
14. Meunier, J. R. and P. A. Grimont. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*. 144:373-379.
15. Milbourne, D., R. Meyer, J. Bradshaw, E. Baird, N. Bonar, J. Provan, W. Powell and R. Waugh. 1997. comparison of PCR based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3:127-136.
16. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Science*, 70:3321-3323.
17. Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Science*, 76:5269-5273.
18. Pons, O. and R. J. Petit. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. I. Haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics*. 90:462-470.
19. Pons, O. and K. Chaouche. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. II. Diploid locus. *Theoretical and Applied Genetics*. 90:471-478.
20. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. vogel, S. Tingey and A. Ralfaski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
21. Russell, J. R., J. D. Fuller, M. Macaulay, b. G. Hatz, A. Jahoor, A. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics*. 95(4): 714-722.
22. Russell J, Fuller J, Young G, Thomas B, Taramino G, Macaulay M, Waugh R and Powell W. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40(4): 442-50
23. Thormann, C. E., M. E. Ferreira, L. E. A. Camargo, J. G. Tivang and T. C. Osborn. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics*. 88:973-980.
24. Valvilov, N. I. 1926. Studies on the origin of cultivated plants. *Inst. Appl. Bot. Plant Breeding*, Leningrad.

25. Vosman, B., P. Arens, W. Rus-Kortekas and M. J. M. Smulders. 1992. Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 85:239-244.
26. 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 Acids Res.* 18: 6531-6535.
27. Tinker, N. A., M. G. Fortin and D. E. Mather. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 85:976-984.
28. Waycott, W. and S. B. Fort. 1994. Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphological analyses. *Genome* 37: 577-583.
29. Castiglione, S. Wang, G. Damiani, G. Bandi, C. Bisoffi and S. Sala, F. 1993. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theoretical & Applied Genetics* 87 (1/2) p. 54-59.
30. Chamberlain, D. 1996. The genus *Rhododendron*: its classification & synonymy. Edinburgh: Royal Botanic Garden, Edinburgh. viii, 181 p. Edinburgh.
31. Liu, Z. and G. R. Furnier. 1993. Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers to estimating variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics* 87:97-105.
32. Petersen G and O. Seberg. 1997. Phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae) based on *rpoA* sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:217-230.
33. Rus-Kortekaas, W., M. J. M Smulders, P. Arens and B. Vosman. 1994. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 37:375-381.
34. Xiao, J., J. Li, L. Yuan, S. R. McCouch and S. D. Tanksley. 1996. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. *Theoretical & Applied Genetics*. 1996. 92: 637-643.
35. Zhang, Q., Z. Q. Zhou, G. P. Yang, C. G. Xu, K. D. Liu and M. A. Saghai-Maroo. 1996. Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice. *Theoretical & Applied Genetics*. 1996. 93: 1218-1224.

The Analysis of Genetic Diversity of Germplasm Collections of Pea (*Pisum sativum* L.) by RAPD¹

Yuhsin Chen, Jiun-Yi Kuo and Li-Te Chin²

ABSTRACT

In this study, the genetic diversity of pea accessions collected by the NPGRC are analyzed via RAPD techniques as basic information for germplasm research and breeding programs in the future. The results indicated that all the pea accessions analyzed could be divided into 3 groups and 5 individual accessions. 3-11 polymorphic bands were generated by 38 random primers, with an average of 6.1 bands each. The lowest and highest genetic similarity recorded were 0.626 and 0.978, respectively. The phylogenetic relationships and genetic diversity tested by RAPD in this research can be revealed accurately.

Keywords: RAPD, germplasm, pea (*Pisum sativum* L.), genetic diversity.

¹. Contribution No. 0530 from Taichung District Agricultural Improvement Station (TDAIS).

². Assistant researcher, associate researcher and assistant of TDAIS, respectively.