

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系

碩士論文

Department of Agronomy  
College of Bioresources and Agriculture  
National Taiwan University  
Master Thesis

開發鑑別台灣咖啡品種之分子標誌  
與外表性狀之調查

Development of Molecular Markers for Variety  
Identification of Taiwan Coffee  
and Morphological Traits

陳怡伶

Yi-Ling Chen

指導教授：王裕文 博士

Advisor: Yue-Wen Wang, Ph.D.

中華民國 99 年 1 月

January, 2010

# 目錄

目錄 .....	i
口試委員審定書 .....	iii
謝誌 .....	iv
圖目錄 .....	v
表目錄 .....	vii
附圖目錄 .....	viii
附表目錄 .....	ix
中文摘要 .....	x
Abstract .....	xi
第一章、前言 .....	1
第二章、前人研究 .....	3
一、咖啡的分類、起源及傳播歷史 .....	3
二、咖啡的育種改良 .....	5
三、咖啡外觀型態特徵及繁殖 .....	6
四、台灣咖啡歷史與育種研究 .....	7
五、品種鑑定 .....	9
六、分子標誌應用於品種鑑定 .....	11
七、分子標誌於咖啡上之應用 .....	13
第三章、材料與方法 .....	15
一、台灣咖啡種源外觀性狀調查與分析 .....	15
二、利用 ISSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異 .....	17
1. 參試材料 .....	17
2. 葉片 DNA 抽取、定量及定量 .....	17
3. 利用 ISSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異 .....	19
4. ISSR 之遺傳相似性分析 .....	20
三、利用 SSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異 .....	21
1. 參試材料 .....	21
2. 利用 SSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異 .....	21
3. 聚丙烯醯胺凝膠電泳分析 .....	22
4. 毛細管電泳分析及資料收集 .....	22
5. PIC 值之計算 .....	23
5. SSR 之遺傳相似性分析 .....	24

第四章、結果	25
一、台灣咖啡種源外觀性狀調查與分析	25
1. 台灣咖啡種源外觀性狀調查	25
2. 台灣咖啡種源植株性狀之主成份分析	32
2.1、採集區域間分群關係	34
2.2、海拔分佈分群關係	34
2.3、老樣與自播實生苗分佈分群關係	35
3. 台灣咖啡種源植株、種子性狀之主成份分析	39
3.1、採集區域間分群關係	39
3.2、海拔分佈分群關係	39
3.3、老樣與新苗分佈分群關係	39
二、利用 ISSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異	44
1. ISSR 分子標誌分析已知品種參試樣品	46
2. ISSR 分子標誌分析台灣咖啡種源	46
3. ISSR 分子標誌之主成份分析	47
三、利用 SSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異	52
1. 以 SSR 分子標誌判別非為 <i>C. arabica</i> 結果	52
2. 毛細管電泳分析結果	56
3. SSR 分子標誌分析參試已知品種參試樣品	62
4. 推估台灣咖啡種源可能之衍生系	63
5. SSR 分子標誌分析結果與外表性狀之主成份分析的比較	63
6. 誤判率之計算	64
第五章、討論	70
一、ISSR 及 SSR 分子標誌之綜合比較	70
二、ISSR、SSR 分子標誌在咖啡育種上的探討及應用	70
三、SSR 分子標誌與外表性狀在咖啡育種上的探討及應用	71
第六章、結論	74
參考文獻	76
附錄	82

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

開發鑑別台灣咖啡品種之分子標誌與  
外表性狀之調查

Development of Molecular Markers for  
Variety Identification of Taiwan Coffee  
and Morphological Traits

本論文係陳怡伶君（學號 R96621121）在國立臺灣大學農藝學系、所完成之碩士學位論文，於民國九十九年一月二十七日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

\_\_\_\_\_ (簽名)

(指導教授)

國立臺灣大學農藝學系

彭雲明教授

\_\_\_\_\_ (簽名)

國立臺灣大學農藝學系

胡凱康副教授

\_\_\_\_\_ (簽名)

系主任、所長

\_\_\_\_\_ (簽名)



## 謝誌

終於完成了碩士論文，即將邁向人生的另一段旅程，在台大求學的兩年半歲月中，由衷的感謝恩師 王裕文博士，除了在專業知識的傳授、思考邏輯的訓練外，也經常告訴我與人相處、進退應對之道，跟隨著老師實地走訪咖啡園、親自與農民溝通交流之採集經驗，令我永記在心；感謝彭雲明、胡凱康老師於試驗設計、分析以及人生方向上的指引給予我許多珍貴的意見，使得論文內容能更加完善，還有許多師長們的啟發，謝謝您們，使得我的求學生涯更充實。

這本論文得以順利完成，要感謝提供實驗材料的農民、採集時給予我許多幫助的大哥大姊們、還有在實驗方向及分析上給予我建議的東鴻學長，及在實驗技術上給於我指導的芳華、貝貝、權均、采文、群山、心平等，也感謝笨魚、東岳、科后、康樂、盟群、書弘、延諭等學弟妹們除了在實驗上的協助外，也提供實驗室更多的歡笑。

最後要感謝這一路來風雨無阻、陪在我身旁，給我無盡的支持與鼓勵的戚媽媽、小胖學長、心怡、秀慧、志玲、竹茵、陳玄、奕成等同伴們，及我親愛的家人們，謝謝你們的支持，我才能心無旁騖的完成學業。

## 圖目錄

圖 1、台灣咖啡 160 個種源樣品農藝外觀性狀之變異性與頻度分佈 .....	27
圖 2、台灣咖啡 57 個種源種子農藝特徵之之變異性與頻度分佈 .....	28
圖 3、台灣 <i>C. arabica</i> 咖啡種源之六個外觀性狀之變異性參數分佈圖。 .....	31
圖 4、152 個台灣咖啡種源以採集區域分群標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	36
圖 5、152 個台灣咖啡種源以海拔高度分群標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	37
圖 6、152 個台灣咖啡種源以樹齡分群標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	38
圖 7、56 個台灣咖啡種源以採集區域分群標示於 10 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	41
圖 8、56 個台灣咖啡種源以海拔高度分群標示於 10 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	42
圖 9、56 個台灣咖啡種源以樹齡分群標示於 10 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	43
圖 10、引子 UBC812 在 20 個台灣咖啡種源和已知品種的 6 個 <i>C. arabica</i> 與 1 個 <i>C. canephora</i> 表現之 ISSR 電泳圖 .....	45
圖 11、260 個參試咖啡樣品依 32 個 ISSR 分子標記分析結果，經 Jaccard 遺傳距離 運算及 UPGMA 分群分析後所得之遺傳相似度樹狀圖。 .....	49
圖 12、260 個參試種源依 32 個 ISSR 分子標記估算遺傳相似度進行 PCoA 分析之 前三個主成份關係圖 .....	51
圖 13、9 個外表性狀差異較大之非 <i>C. arabica</i> 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品 以 DCM05 引子所增值之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現結果 .....	54

圖 15、已知 <i>C. arabica</i> 品種以 CAM0011 所增殖 DNA 多型性片段形式， .....	58
圖 16、6 個 <i>C. arabica</i> 參試品種依 4 個 SSR 標誌分析結果經 Dice coefficient 轉換成遺傳相似性及 UPGMA 分群所得之樹狀圖.....	62
圖 17、158 個 <i>C. arabica</i> 參試品種依 4 個 SSR 標誌分析結果經 Dice coefficient 轉換成遺傳相似性及 UPGMA 分群分析後所得之樹狀圖.....	67
圖 18、152 個台灣咖啡種源以 SSR 分群結果標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	69
圖 19、114 個台灣咖啡種源以 SSR 分群結果為 Typica 品種標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	72
圖 20、26 個台灣咖啡種源以 SSR 分群結果為 Bourbon 品種於 6 個外觀性狀之主成份分析圖 .....	73



## 表目錄

表 1、夏威夷農業研究中心所提供種源品種名稱.....	17
表 2、台灣咖啡種源樣品之農藝性狀統計值.....	26
表 3、將離群值去除後之 152 個台灣 <i>C. arabica</i> 咖啡種源外觀性狀之統計值.....	30
表 4、152 個 <i>C. arabica</i> 種源之 6 個外觀性狀所建立前 6 個主成份之特徵根和其貢獻比例.....	33
表 5、152 個 <i>C. arabica</i> 種源之 6 個外觀性狀之前三個主成份特徵向量.....	33
表 6、56 個種源之 10 個外觀性狀建立前 10 個主成份之特徵根和其貢獻比例... ..	40
表 7、56 個種源之 10 個外觀性狀之前三個主成份特徵向量.....	40
表 8、ISSR 分析所使用可產生多型性條帶之 6 個引子序列.....	45
表 9、260 個參試種源依 32 個 ISSR 分子標記所建立的前 12 個主成份之特徵根及貢獻比例.....	48
表 10、30 組在品種間具多型性之 SSR 分子標誌.....	53
表 11、152 個台灣種源使用 CAM0011 及 CM16 增殖 DNA 多型性片段 (待續). ..	59
表 12、4 個 SSR 分子標誌所得 158 個 <i>C. arabica</i> 種源群聚分群表.....	65
表 13、CAM0011、CM16 產生 4 個標誌鑑別 6 個已知 <i>C. arabica</i> 品種之誤判率.....	66

## 附圖目錄

附圖 1、9 個外表性狀差異較大之非 <i>C. arabica</i> 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品 以 CofEST-SSR06 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 .....	82
附圖 2、9 個外表性狀差異較大之非 <i>C. arabica</i> 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品 以 CofEST - SSR10 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 ....	83
附圖 3、9 個外表性狀差異較大之非 <i>C. arabica</i> 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品 以 CAM0018 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 .....	84
附圖 4、9 個外表性狀差異較大之非 <i>C. arabica</i> 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品 以 CM5 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 .....	85
附圖 5、9 個外表性狀差異較大之非 <i>C. arabica</i> 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品 以 CofEST-SSR01 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 .....	86
附圖 6、9 個外表性狀差異較大之非 <i>C. arabica</i> 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品 以 CofEST-SSR01 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 .....	87
附圖 7、6 個已知 <i>C. arabica</i> 品種和 152 個台灣種源以 CM16 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 .....	89
附圖 8、將 6 個已知 <i>C. arabica</i> 品種和 152 個台灣種源以 CAM0011 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 .....	91

## 附表目錄

附表 1、160 個台灣咖啡參試種源之編號及採集來源 .....	92
附表 2、本試驗所調查咖啡種源外觀性狀及調查標準 .....	98
附表 3、5 個參試台灣咖啡老欖隨機取其各 20 個子代族群 .....	99
附表 4、本研究所使用 100 條 ISSR 核酸引子序列 .....	100
附表 5、本研究所使用 53 對 SSR 引子 .....	102
附表 6、152 個台灣 <i>C. arabica</i> 咖啡以海拔高度區分進行 6 個植株外觀性狀之變方 分析表 .....	105
附表 7、152 個台灣 <i>C. arabica</i> 咖啡以老欖與新苗區分進行 6 個植株外觀性狀之變 方分析表 .....	107
附表 8、56 個台灣 <i>C. arabica</i> 咖啡以海拔高度區分進行 4 個種子外觀性狀之變方分 析表 .....	109
附表 9、56 個台灣 <i>C. arabica</i> 咖啡以老欖與新苗區分進行 4 個種子外觀性狀之變方 分析表 .....	110



## 中文摘要

本試驗採集台灣現有栽培的咖啡莊園共 160 個種源，調查其 10 個外觀性狀進行分析，配合從夏威夷種源中心所獲得的 6 個已知 *C. arabica* 品種及 *C. canephora*，利用 ISSR 及 SSR 分子標誌探討台灣咖啡品種鑑定之可行性。調查的 10 個外觀性狀，葉片性狀包含葉長、寬、長寬比、及葉面積；植株性狀包含節間長度及主幹與一次分支之夾角；種子性狀包含帶殼種子長、寬、帶殼種子長寬比及帶殼種子厚的調查結果，變異係數在葉面積、節間長度及帶殼種子厚，分別為 33.57%、37.62% 及 34.12%，其餘的性狀的變異係數則小於 30%。分析結果顯示葉面積大小可做為判斷為 *C. arabica* 的重要指標。以 6 個外觀性狀進行主成份分析，結果在採集區域、及老叢新苗間分群雖略有群聚狀況，但種源間仍呈現彼此混雜而致分群不明顯；但高海拔種源在葉寬、葉面積顯著大於低海拔種源；而以 10 個外觀性狀進行主成分分析，結果在採集區域間及海拔分布分群間均勻分布、分群情況不顯著。

在 ISSR 與 SSR 兩種分子標誌分析下，ISSR 分析由 100 個 ISSR 引子中篩選出在 *C. arabica* 與 *C. canephora* 物種間具多型性的 32 個分子標誌，就採集的樣品所顯示的遺傳相似度介於 0.19 至 1 之間，可區別 *C. arabica* 與其他物種；而 SSR 分析則由 53 個 SSR 引子中篩選出在 *C. arabica* 品種間具多型性的 2 個引子，共獲得 4 個標誌，並依其所得的遺傳相似性可將台灣咖啡種源分成 4 群，包含 Bourbon 群、Typica 群、Caturra 群及 4 個台灣樣品，並顯示台灣現有栽培的咖啡種源其變異有限，或許仍有引種的需求。由於所取得的對照品種為數較少，與篩選所獲取的具多型性標誌不足，因此品種鑑別力仍有不足，僅能區分主要的分群。

關鍵字：咖啡、ISSR、SSR、品種鑑別、主成分分析、群聚分析



## Abstract

The purpose of this study was to establish the variety identification system of coffee in Taiwan by utilizing 10 morphological traits and ISSR and SSR molecular markers . The six *C. arabica* and *C. canephora* of HARC germplasm were used as reference, the DNA profile was established for the 160 coffee germplasm in Taiwan. According to the result of 10 morphological traits investigated, the frequency distribution of leaf length, leaf width, leaf shape, leaf area, length of plagiotropic internodes, the angle of the secondary branch at the insertion with the main one, seed length, seed width, seed shape, and seed thickness, except for leaf area, length of plagiotropic internodes, and seed thickness, the coefficient of variation of the others were estimated to be under 30%. Meanwhile, the trait of leaf area was a good indicator for discriminating between *C. arabica* and other species.

Thirty-two markers which showed polymorphism between species were identified from the 100 ISSR primers. The genetic similarity estimated by ISSR markers ranged from 0.19 to 1 between *C. canephora* and *C. arabica* accessions from HARC and Taiwan. The results showed ISSR markers could efficiently differentiate the *Coffea* species. In order to make up for the insufficient polymorphism between *C. arabica* cultivars, four polymorphic markers were identified after screened set of 53 SSR primers, which were then scored and used to estimate the genetic similarity and then clustering the *C. arabica* of HARC and of Taiwan. The result indicated the *C. arabica* germplasm could be divided into 4 groups: including Typica group, Bourbon group, Caturra group, and the unknown accessions, with the name after the known variety in the same cluster. Because of the narrow genetic base of *C. arabica* cultivars, the limited availability of the reference cultivars, the identified polymorphic markers, these markers were only able to discriminate the collected Taiwan *C. arabica* accessions into the same group as the reference Typica, Bourbon and Caturra variety.

Keyword: coffee, inter simple sequence repeat (ISSR), simple sequence repeat (SSR), variety identification, principal component analysis, cluster analysis

## 第一章、前言

咖啡為全球消費體系最大宗期貨農產品之一，國際咖啡組織 (International coffee organization, ICO) 指出全球咖啡生產出口總量從 2003 年的 103.912 百萬袋 (約 6,234,720 公噸) 至 2008 年的 127.005 百萬袋 (約 7,620,300 公噸)，成長 22.2%。台灣咖啡生豆、烘製咖啡豆和咖啡製品三大分類的整體進口量從 1997 年約 7,991 公噸至 2007 年咖啡進口量已達到 21,195 公噸，創下歷史新高 (財政部關稅總局，2007)，且咖啡消費族群有年輕化的趨勢，預估未來台灣咖啡市場還有很大的成長空間。

此股咖啡熱潮也同時帶動台灣本土咖啡種植，種植面積由 2006 年的 387.57 公頃增加至 2007 年的 561.03 公頃，總收量也增加至 452.67 公噸，其種植地區包含雲林縣、台南縣、屏東縣、花蓮縣等及許多日據時期已種植產地 (農情報告資源網，2007)。

台灣島內咖啡傳播歷史近一百年，其種源來源有：前人引進品種所繁衍之後代、種苗供應商所引進品種及農民自行留種。這些種源包含三個物種，分別為 *C. arabica*、*C. canephora* 及 *C. liberica*，其中以 *C. arabica* 為主要商業栽培種，但仍有其他野生物種如 *C. canephora* 與 *C. liberica* 保留在民間與林野之間。

一般而言，咖啡品種的判別評估是依照外表型態的差異，外表型態可以分成營養性狀與生殖性狀，營養性狀部分常用者如樹形、葉形、主幹與一次分支角度等，生殖性狀者如嫩芽顏色、花形、果實大小、果實形狀等，大多數發表的文獻著重於性狀觀察、抗病蟲害及產量之描述，並無客觀的統計與分析及評估標準，因此區分遺傳背景相似的栽培品種時，因品種間變異較物種間為小，且栽培生長環境變異程度大，故利用外表型態判定品種間差異較困難，因此可利用 DNA 分子標誌作為品種鑑別的工具，其優點為不受組織部位、發育時期、及環境條件影響，以增加品種鑑別的效率。

本研究所使用的 DNA 分子標誌為 SSR (simple sequence repeat) 與 ISSR (Inter

simple sequence repeat) 分子標誌。SSR 分子標誌是以 1 至 6 個核苷酸鹼基對為單位且重複數次的 DNA 序列，由於其廣泛地存在基因組內、豐富的多型性、可偵測到多重對偶基因座、及共顯性標誌等優點，使 SSR 分子標誌成為遺傳研究之重要工具，但最大的限制為須事先瞭解作物之遺傳背景，才能開發物種專一性的引子序列。另一種分子標誌為 ISSR，其原理在簡單重複序列末端加上 1 至 4 個核苷酸，使得基因組上需與此段互補的序列才可以黏合固定，提高 PCR 的專一性，且對 DNA 質與量要求不高、操作簡便、不需事前知道作物之遺傳背景，所以近年廣泛成為作物種源遺傳歧異性分析及品種鑑別之工具。

隨著咖啡風潮的帶動，許多咖啡愛好者堅持現烘培、現磨、及現煮的精品咖啡，從 2007 年咖啡進口量來看，其中咖啡生豆的進口量就高佔一半以上，再加上與日俱增的自家烘培咖啡店，可瞭解追求高品質的精品咖啡是未來的趨勢。精品咖啡的發展需要配合品種鑑別、適宜栽培管理及建立一套具有共同標準的生豆評鑑方式，品種鑑別可以區分出不同品種，因此在未來咖啡育種上可提供更穩定的品質保證外也可增加產品的附加價值，並依各莊園所種植的咖啡品種，發展具莊園特色的咖啡豆。

本研究採集台灣現有咖啡莊園，遍佈八個地區共 160 個種源，利用 ISSR 與 SSR 分子標誌偵測台灣現有咖啡種源與夏威夷農業研究中心所提供的 7 個已知種源之遺傳變異，以期篩選出能區別 *C. arabica* 不同品種的分子標誌並鑑別台灣咖啡種源，配合調查 10 個外觀型態資料分析，尋求在品種間有顯著差異的外表特徵，利用分子標誌與外觀性狀的結果，建立一套快速可靠品種鑑別系統，進而應用於咖啡育種上親本選拔與種源保存。

## 第二章、前人研究

### 一、咖啡的分類、起源及傳播歷史

咖啡屬隸屬於茜草科、仙丹花亞科之下的咖啡族，林奈氏於 1753 年描述第一個咖啡物種，但其分類系統仍在不斷更新中，可將之分成兩屬；咖啡屬 *Coffea*，其包含 *Coffea*、*Baracoffea* 亞屬與 *Psilanthus* 屬，其包含 *Psilanthus*、*Afrocoffea* 亞屬 (Bridson *et al.*, 1988)。咖啡亞屬內包含 80 個物種，其中 25 個分布起源於非洲大陸、55 個來自馬達加斯加 (Madagascar) 和馬斯克林群島 (Mascarene)。Lashermes 等學者 (1996) 以 RFLP 技術針對咖啡屬的 25 個物種和 *Psilanthus* 屬的 2 個物種研究其葉綠體 DNA 的變異，證實依據其地域來源自西、中、東部非洲和馬達加斯加，分成四群，並根據其序列的低歧異性，推測商業栽培種 *C. arabica* 為較新物種；Lashermes 學者於 1997 年進行粒線體 DNA 變異分析，與葉綠體 DNA 分析結果一致，顯示馬達加斯加豐富的氣候地形條件，使其表現出最大歧異度，且群內種間雜交後代表現出高度可稔性，其分子證據支持早期以組 (section)、或次組 (subsection) (Chevalier, 1947) 的分類單位，並顯示咖啡屬與 *Psilanthus* 屬間具高度遺傳相似 (Cros *et al.*, 1998; Lashermes *et al.*, 1997)，並成功產生雜交後代 (Couturon *et al.*, 1998)。

現今廣為商業栽培的物種主要有三種，一為 *C. arabica* L.，起源於衣索比亞西南區的雨林內，佔生產總量的大宗，以其優越品質著名，且為咖啡屬內唯一異源四倍體 (allotetraploid) ( $2n = 4x = 44$ )，二為 *C. canephora*，起源於西非幾內亞至烏干達的高原，為異交二倍體物種 ( $2n = 2x = 22$ )，第三種為 *C. liberica* (Berthaud and Charrier, 1988)，則佔總收量約 1%。

*C. arabica* 每個細胞中 DNA 含量為 2.6 pg，為其他咖啡屬物種之兩倍 (Cros *et al.*, 1995)；推測其起源為兩個二倍體物種自然種間雜交後代染色體倍加而得 (Carvalho, 1946; Sondahl and Sharp, 1979)。分子遺傳和細胞遺傳研究以 RFLP 結合原位雜合技術 (GISH) 指出 *C. eugenioides* 和 *C. canephora* 或 *C. eugenioides* 和 *C.*

*congensis* 最有可能為 *C. arabica* 之父母本，經雜合結果顯示兩個基因組表現出高度親合性且染色體無分化現象，且 *C. arabica* 族群的個體遺傳表現一致，推測 *C. arabica* 由單一植株從單一地區演化而來(Lashermes *et al.*, 1999; Raina *et al.*, 1998)。

Lashermes 等學者 (2000) 以 RFLP 分析 *C. arabica* 種內雜交 F<sub>2</sub> 子代的對偶基因分離比，並以 *C. arabica* 為母本，與染色體倍加為四倍體的 *C. Canephora* 為父本，產生人工雜交後代做為對照，證實 *C. arabica* 屬於二倍體遺傳配對的異源四倍體物種。

*C. arabica* 傳播始於葉門，依其傳播途徑的不同分為兩類 (botanical varieties)，一為約在西元 1706 於印尼由單株傳播，隨後馴化於荷蘭阿姆斯特丹皇家花園的 *C. arabica* var *arabica*，又稱 *Typica*；二為約在 1715 於葉門摩卡由幾株植株傳播至波旁島 (現今留尼旺島 Reunion Island) (Chevalier and Dagon, 1928) 的 *C. arabica* var *bourbon*，又稱 *Bourbon* (Krug, 1938)。





## 二、咖啡的育種改良

*C. arabica* 供應全世界大部分咖啡需求，傳統栽培種以譜系法 (pedigree method) 選拔 Typica 與 Bourbon 雜交後代表現優異的單株，如 Caturra、Pacas、及 Maragogipe 品種 (Krug and Carvalho, 1951)，傳統栽培種以優越的杯測品質聞名，但同時有易感病、產量低之缺點。近五十年來，新品種從 *C. arabica* 初級與次級基因庫選拔具有成熟期一致、抗病蟲性、耐逆境、穩定品質表現、或獨特杯測風味之物種與 *C. arabica* 進行回交育成，由於其高產且對咖啡主要病害具有抗性 (Medina-Filho *et al.*, 2006)，目前已取代傳統栽培種在許多國家大量種植，如 Catimor、Sarchimor、Icatu 等。

另外，基因組分析顯示咖啡與番茄呈現高度基因相似，且同時擁有相似基因組大小、染色體組型、及染色體結構，因此可互為共通網絡，共享其資源及資訊 (Lin *et al.*, 2005)，同時，*C. canephora* 連鎖圖譜已建構完成 (Hendre, 2006)，配合育種目標以期能縮短其育種年限，節省更多時間與人力。

### 三、咖啡外觀型態特徵及繁殖

*C. arabica* 樹高任其自由生長可達 4-6 公尺，其主幹垂直生長至 5-11 對葉片時，於芽點產生第一次側生分支 (primary plagiotropic branch)，若其垂直生長則稱為吸芽 (suckers)。*C. arabica* 分枝上的葉片沿節點對生呈矩圓形或披針形，顏色呈暗綠有蠟質，長約 10-15 公分、寬約 5-10 公分，波狀緣，兩面光滑無毛，屬於短日照植物；花呈聚繖花序，兩性花，數花輪生葉腋，花冠白色細長 5 裂狀，裂瓣因品種而變異，具茉莉花香，雄蕊 5 枚，花絲短，著生花筒喉部；果實呈子房下位，2 室，柱頭 2 歧，漿果卵形或橢圓形，長 12~18mm，成熟呈紅，漿果由外至內含外果皮 (pulp)、果肉 (mucilage)、內果皮 (parchment)、銀皮 (silver skin)、半圓形種子 2 粒，成熟後易剝落。與 *C. Canephora*、*C. liberica* 相比，*C. canephora* 葉較 *C. arabica* 大，而較 *C. liberica* 葉小，*C. canephora* 果肉較薄，易與種子分離，成熟後較不易剝落；*C. liberica* 果實為最大，且果皮、內果皮、種皮均厚，不易與種子分離且成熟後不易剝落。

咖啡屬花器型態表現出短花冠、長花柱、及外露的雄蕊，為異交作物，然而 *C. arabica* 為自交作物，只有少比例以風與昆蟲為媒介行異交，除此之外，雜交後代具有雜種優勢，可以產生更優異的外表型 (Charrier and Berthaud, 1985; Willson and Clifford, 1987)。

雖然 *C. arabica* 為自交作物，但研究指出栽培種 *C. arabica* 仍會進行天然異交，異交率介於 7 至 15% 之間 (Carvalho and Krug, 1949)，而 Meyer 等學者 (1965) 則指出衣索比亞的野生 *C. arabica* 表現出高比例 (40-60%) 的天然異交率，使族群具有高度的異質性 (Carvalho, 1988)。



#### 四、台灣咖啡歷史與育種研究

台灣最早記載咖啡的文獻為 Davidson (1903) 所著之「台灣島之過去及現在」，當中提到咖啡最初由 1891 年從美國舊金山傳至台灣三角湧 (今三峽)，而後澤田兼吉 (1933) 調查考證台灣咖啡最初應為 1885 年由德記洋行商人 Marshall 從錫蘭傳至三角湧而引進台灣。

咖啡傳入始於台灣北部，經評估台灣氣候地理條件後，屏東、嘉義及花蓮最低溫度也適合咖啡種植，並於 1901 年由台灣北部移至台灣南部，於南部試驗單位進行研究。殖產局恆春熱帶植物殖育場 (今林業試驗分所前身) 於 1907 年引進 6 個 *C. arabica*、4 個 *C. liberica*、及 2 個 *C. canephora* 種源，開始為期 13 年的產量調查試驗，發現 *C. arabica* 產量最高。1917 年園藝試驗嘉義分場 (現嘉義農業試驗分所) 創立後，認為 *C. arabica* 最適合台灣種植，並提倡企業化栽培，於 1930 年開始大規模企業栽培，直至 1941 年，日本發動太平洋戰爭，海運受阻、勞力不足，咖啡事業便逐漸沒落 (黃，1955)。

光復以後，在士林園藝試驗分所、嘉義農業試驗所、高雄六龜金雞內試驗場與鳳山熱帶園藝試驗分所、屏東恆春林業試驗所、及台東農林改良場等試驗單位進行引種觀察、生理栽培管理、加工調製、病蟲害防治等研究，其中以嘉義農業試驗所之研究最完整，並於 1962 年推廣咖啡苗木 17320 株，包含夏威夷引進新品種 HAES 6550 (Kents)、6551、6552、S288、Caturra 等 19 個品種 (朱，1961)。

1948 年朱慶國技正觀察各咖啡物種果實特色，發現 *C. arabica* 表現較佳，針對 *C. arabica* 不同品種抗鏽病與豐產特性進行調查，其中 HAES 6591 Caturra 在產量、發育情形表現為最優但不抗鏽病，由印度引進之 S288、S333 抗病性強但果實充實不佳、浮豆多。在栽培管理上，朱建議適時的整枝與摘芯可以調整樹勢，避免主幹徒長、產生較多側枝增加開花結實率、方便其收穫管理，摘芯則須等其枝梢充分木質化後，以避免太過嫩弱，易由切口發生腐敗。

台灣種植咖啡地區，由平均溫度來看，比熱帶地區稍低，較類似夏威夷、巴

西的栽培環境，一般認為無須遮陰，但經遮陰處理的咖啡幼苗評估其葉與莖的乾重，比無遮陰的結果佳 (朱，1940)，且研究指出 *C. arabica* 在 30-50%遮陰處理可使其光合作用效率達最高 (Kumar and Tieszen, 1980)，台灣低海拔地區夏季面臨高溫及強烈日曬，因此夏季有適時遮陰為佳，遮陰樹的種類以木瓜、木棉、木薯、及油桐可做遮陰樹且產物亦豐富，值得提倡種植。但在冬季時正逢南部乾旱，遮陰樹反而會與咖啡競爭水分。另一方面，若無進行遮陰，而多施以肥料，提高其氮肥比例，其產量顯著地提高，但樹勢有提早衰退之現象。無遮陰是世界各國栽培咖啡的趨勢，就台灣情況而言，高海拔區域因其地勢高而日照較短，採用無遮陰栽培，並配合適當肥料，以提高產量 (朱，1958)。至於加工調製方面，評估種植於花蓮、南投、雲林、嘉義、高雄等六個地區的 *C. arabica*，發現海拔較高者，無論在外型、色澤、及風味上較低海拔者為佳 (朱，1970)。

1954年因國際咖啡價格高昂，在當時農復會和政府機關輔導下，栽培面積逐漸擴大，並派遣人員出國學習咖啡栽培及加工。1958年成立雲林縣經濟農場 (原圖南產業株式會社斗六咖啡農場)，備有現代化加工廠，並在嘉義、花蓮安東等地推廣，產量曾達到100多公噸，但之後因政府未繼續獎勵推廣而式微，直到九二一地震後，經由各地發展傳統產業結合觀光休閒事業，使咖啡產業正陸續在台灣嶄露頭角 (張等，2006)。

## 五、 品種鑑定

品種鑑定對於育種家、農業生產者或是消費者都有其不同意義。對於消費者而言，品種鑑定可以提供消費者於購買產品對產品品質有一定的保障、提高其附加價值、建立健全生產履歷系統；對農業生產者而言，品種鑑定可以提供更精準的生理栽培管理並可做為種苗生產者的品種管制之用；對育種家而言，品種鑑定可以保障其智慧財產權、鼓勵研發 (楊，2003)。

咖啡品種的判別評估是依照外表型態的差異，外表型態可以分成營養性狀與生殖性狀，營養性狀部分常用者如樹形、葉形、主幹與一次分支角度等，生殖性狀者如嫩芽顏色、花形、果實大小、果實形狀等 (International Plant Genetic Resources Institute, IPGIR, 1996)，這些應用於物種 (species) 的層次辨別上較容易，但在遺傳背景相似的栽培品種 (cultivar)、品系 (line) 進行區別時，由於外表性狀間可能會相互影響，或是差異呈現連續性的變化，再加上受環境條件影響甚巨，所以常會因為受到調查者主觀判定因素的影響，而降低品種判別的客觀性 (楊，2001)，再加上部份調查之性狀，如花形、果實大小等，須在特定生長、生理時期方能觀察，造成調查時的不便並提高人力及資源的成本。

因此除了上述所提之外觀型態的標誌外，也可利用細胞遺傳標誌、成份分析、或分子標誌等來幫助品種的鑑別。細胞遺傳標誌可藉由顯微鏡直接觀察到染色體數目與結構之差異，但因為材料建立與維持不易，且需較專業人員進行遺傳分析，故此種標誌通常利用於較具有經濟價值之作物之研究與利用 (林，2005)。

成份分析如近紅外線光譜分析 (NIR) (Esteban-Diez *et al.*, 2007) 及高壓液態色層分析 (HPLC) (Bertrand *et al.*, 2008)，近紅外線光譜分析和高壓液態色層分析是藉由分析樣品內成份的差異來進行區分，廣泛地應用於農產品品質分析 (Tsuta *et al.*, 2002)，但咖啡豆主要成份除了油脂含量 (fat content)、咖啡因 (caffeine) 及果實重量 (bean weight) 表現出較高的狹義遺傳率，其他性狀包含糖分含量 (sucrose content)、胡蘆巴鹼 (trigonelline) 及綠原酸 (chlorogenic acids) 則表現了較低的狹

義遺傳率，顯示這些成份受環境條件影響甚巨 (Montagnon *et al.*, 1998)。然而，由於成份分析在物種內缺乏足夠之變異，因此常應用於咖啡物種間的區別 (Bertrand *et al.*, 2008; Casal *et al.*, 2000)。

分子標誌部份如蛋白質標誌、DNA標誌等。蛋白質標誌因其能偵測到的多型性不多、易受環境、人為操作、及後轉譯 (post-translation) 修飾之影響，在應用上仍有所限制。近年來發展出利用DNA層次上差異的分子標誌，因為DNA為遺傳的基本物質，可提供最直接的鑑定依據，再加上其不受限於植物發育時期、對環境影響表現呈中性、少量樣品即可進行分析且取樣後並不干擾植物發育、標準化之操作步驟簡易且結果穩定，並具有高度的客觀性，所以目前廣泛的應用於遺傳歧異度之探討與品種鑑定。





## 六、 分子標誌應用於品種鑑定

分子標誌的利用須根據不同作物產業需要，開發高精確性且高效率之檢測系統或流程 (林，2005)。分子標誌種類眾多，因其多型性DNA片段產生方式不同，可分成下列三種：一、使用限制酶酶切而產生的限制片段長度多型性標誌，如RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 分子標誌等，前者利用限制性核酸內切酶將DNA切成小片段，然後用電泳將不同長度的片段分離，後者將基因組進行酶切後，再以PCR擴增特定片段，結合RFLP及PCR的增殖片段長度多型性DNA；二、以單一股逢機10個鹼基對作為引子逢機增幅DNA片段而產生不同片段大小的多型性，即RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)，三、以簡單重複序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 或稱為微衛星體 (microsatellite) 的差異所設計的分標誌，如SSR與ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 分子標誌，SSR分子標誌是由1至6個鹼基對作為重複單位，根據微衛星體序列與重複套數的差異產生多型性，ISSR分子標誌是利用SSR的3'或5'端加上1至4個核苷酸，擴增兩個相鄰反向之相反SSR之間的DNA片段。

微衛星體為1至6個鹼基對為單位且重複數次的DNA序列，也稱作簡單重複序列 (SSR) 廣泛地存在基因組內，由於豐富的多型性、可偵測到多重對偶基因座、及共顯性標誌，使SSR成為遺傳研究之重要工具，同時SSR標誌因穩定性高、操作步驟簡易，可作為跨實驗室比對、合作之技術，並由於SSR區域在物種內存在相對變異，所以大量被應用於蘋果(Oraguzie *et al.*, 2005)、葡萄(Regner *et al.*, 2000)、小麥(Röder *et al.*, 2002)、胡桃(Boccacci *et al.*, 2005) 之遺傳分析，然而SSR分子標誌最大的限制為物種專一性的引子序列之開發，不僅耗時、需大量資本、且須事先瞭解其遺傳背景。

ISSR分子標誌的特性為需基因組上與此段互補的序列才可以黏合固定，因而避免SSR在基因體中的滑動，而提高PCR的專一性 (鄒等人，2001)，且ISSR再現性較高 (Rao *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 1996)，目前已廣泛應用於分析作物種源之

DNA指紋圖譜之建立、遺傳歧異度、系統發育學分析 (phylogeny)、分子標誌輔助育種、基因定位 (gene mapping) 及族群與演化生物學等相關研究 (Reddy *et al.*, 2002)。



## 七、 分子標誌於咖啡上之應用

在咖啡中，SSR分子標誌可用於區分*C. arabica*和*C. canephora*，能夠有效的區別咖啡屬之物種，也同時用於評估生豆、熟豆及即溶咖啡的純度檢測，進一步應用於食品鑑別和追蹤混合物成份組成 (Martellosi *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002)。

咖啡的SSR分子標誌於近10年才開始發展，首先由Rovelli等學者 (2000) 從資料庫開發出13個SSR引子，在*C. arabica*選系間有多型性且能分辨其來源不同的二倍體親本，接著Combes等學者 (2000) 使用*C. arabica*資料庫設計的11個SSR引子對針對32個*C. arabica*、10個*C. canephora*及其他咖啡屬的13個物種，此11個SSR分子標誌在二倍體咖啡物種間皆成功增殖出條帶，在*C. arabica*間，11個引子中只有5個有多型性。Baruah等學者 (2003) 開發9個SSR標誌，並取45個*C. arabica*、*C. canephora*、及17個咖啡屬的其他物種，並計算多型性訊息含量 (Polymorphism information content, PIC) 值，在*C. arabica*與*C. canephora*，分別為0-0.6與0-0.78。Anthony等學者 (2002) 使用31個SSR標誌分析16個*C. arabica*與4個*C. arabica*和*C. canephora*雜交種，將*C. arabica*選系分成Typica和Bourbon兩群。Moncada and McCouch學者 (2004) 開發34組螢光標定SSR分子標誌分析23個*C. arabica*，包含栽培種與衣索比亞野生種，和5個二倍體物種，在*C. arabica*栽培種中表現較高的多型性比例 (56%)，且18%等位基因在栽培種間具有多型性，但由於其傳播歷史、繁殖方式的差異，使得栽培種的等位基因數目、PIC值皆小於野生種*C. arabica*與*C. canephora*，且野生種內有55%等位基因不存在於栽培種內，具有可提供*C. arabica*基因庫遺傳變異之潛力。

近年來則有利用表達序列標記 (Express Sequence Tag, EST) 進行SSR標誌的開發 (EST-SSR)，由於EST-SSR發展所需成本較低，且位於轉譯區域通常與功能基因有關，Aggarwal等學者 (2007) 從2553個咖啡EST資料庫中經由序列比對，發現425個SSR區域，平均咖啡轉錄區每2.16kb即有1個SSR，微衛星重複形式以AG為最多，並從所設計224個引子對中，取24個引子對針對23個*C. arabica*和*C. canephora*



進行多型性的測試，由於所設計的SSR位於基因組保守區域，在*C. arabica*間表現出較低的多型性，與前人研究結果相似，且咖啡屬其他14個物種中增殖情況良好。

ISSR 分子標誌自 1994 由 Zietkiewicz 等人所發展後，已被廣泛地應用於作物及果樹的品種鑑別，如草莓 (Arnau *et al.*, 2003)、可可樹 (Charters and Wilkinson, 2000)，桑樹 (Vijayan and Chatterjee, 2003)。ISSR 應用於咖啡上的例子亦有，Ruas 等學者 (2003) 利用 14 個 ISSR 標誌在 8 個咖啡屬的物種與 6 個種間雜交物種所產生 230 條具有多型性條帶進行分析，並以 GA 兩核苷酸重複片段產生最多多型性標誌，推測咖啡屬內有高頻度 GA 型式之微衛星體存在，顯示 ISSR 能將咖啡屬內物種有效地區分開來，並由遺傳相似性推論雜交種之父母本，結果與譜系資料一致。ISSR 分子標誌也有應用於咖啡屬內遺傳歧異度的探討與族群遺傳的研究 (Aga *et al.*, 2005; Masumbuko and Bryngelsson, 2006)，較少應用於遺傳背景相似的 *C. arabica* 物種內的區別。



## 第三章、材料與方法

### 一、台灣咖啡種源外觀性狀調查與分析

#### 1. 樣品來源

本試驗採集民國 98 年台灣現有栽培咖啡莊園，遍布台灣 8 個地區，包含花蓮 8 處，台東 9 處，屏東 14 處，台南東山 3 處，嘉義茶山 2 處，嘉義阿里山 7 處，雲林古坑 6 處，南投 7 處並選擇種源來源不同或外表性狀差異較大的莊園，進行取樣；考慮莊園內種苗來源大部份相同，以取其外表性狀變異較大或種苗來源不同的個體以代表莊園內的變異，平均每個莊園取 2~3 個樣品，包含 70 個莊園共 160 個樣品如附表 1。

#### 2. 外觀調查項目

每個採集樣品進行外觀性狀調查，包含植株、葉片和種子性狀，其中由於採集時間已經在採收末期，僅剩餘少數樣本尚有成熟漿果，因此本研究僅針對尚有漿果的 56 個樣品測量種子性狀。

調查項目參考 1996 國際植物遺傳資源所 (International Plant Genetic Resource Institute, IPGIR) 發表“咖啡之描述”和 Montagnon 等學者(Montagnon and Bouharmont, 1996) 所分析的結果；植株部份包含主幹與一次分支的夾角和節間長度，葉片部分包含葉長、葉寬、葉長寬比和葉面積，種子部分包含種子長、種子寬、種子長寬比和種子厚度，共 10 個數量性狀，其調查方法及標準如附表 2，其中葉面積 I 為葉長寬的乘積再乘以 0.66，此係數為 *C. arabica* 種植於均質的栽培環境下量測而得(Montagnon and Bouharmont, 1996)；葉面積 II 將葉片拍照紀錄，進行影像分析的結果。

#### 3. 外觀性狀統計分析

咖啡外觀性狀之估值

利用 Excel 軟體計算咖啡種源外觀性狀之平均值 (Mean)、標準偏差 (Standard deviation, SD)、變異係數 (CV)、偏態系數 (Skewness) 及峰度係數

(Kurtosis) 等估值、並以 R 軟體 (R Development Core Team, 2008) 進行變方分析。

#### 群聚分析、主成份分析及變方分析

將各樣品的外觀性狀測定值，利用歐幾里得 (Euclidean distance) 計算遺傳距離：

$$d_{ij} = \left[ \sum \lambda_p (y_{ip} - y_{jp})^2 \right]^{1/2}$$

$y_{ip}$  和  $y_{jp}$  分別是  $i$  和  $j$  在因素軸  $p$  上的因素分數 (component scores)， $\lambda_p$  為第  $p$  個因素之特徵根 (eigenvalue)，再根據種源間之遺傳距離分別進行群聚分析與主成份分析。

群聚分析利用 NT-SYS pc 2.0 (Rohlf, 2000) 之 Cluster 選項中的 SAHN (Sequential agglomerative hierarical nested cluster analysis) 將匯入的相似性資料以 UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic mean) 進行群聚分析，將結果以樹狀圖呈現。

主成份分析則利用 SAS 統計程式 (SAS Institute, Version 9.1.2 for Windows, 2004) 對 10 個調查外表性狀資料進行主成份向量分析，得到特徵根 (eigen value) 與其相對應的特徵向量 (eigen vector)，求得各種源標準化的主成份數值，分別以第一、第二、及第三主成份為座標軸做族群散佈圖，以統計繪圖軟體 SigmaPlot 8.0 (Inc, 2000) 繪出前三個主成份之種源分佈圖，以作為外觀性狀解釋種源間變異的重要性之判斷標準。

變方分析則利用 SAS 統計程式對 10 個調查外表性狀資料進行變方分析，將地區、莊園、個體三個因子視為固定型因子，使用一般線性模式 (General linear model, GLM) 探討類別型因子海拔高度、老欖或新苗對外表性狀的影響。

## 二、利用 ISSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異

### 1. 參試材料

本試驗所使用試驗材料包含兩部份，分別為已知品種和台灣採集材料。

已知品種使用夏威夷農業研究中心保存之 7 個種源之 DNA (表 1)，包含 6 個 *C. arabica* 商業栽培栽培品種和 1 個 *C. canephora*，其中包含來自瓜地馬拉抗咖啡鏽病栽培種 PROMECAFE1 和馬拉威努育種站 (HARC Maunawili Breeding Station) 所蒐集種源。

表 1、夏威夷農業研究中心所提供種源品種名稱

Table 1. List of the acquired coffee germplasm from HARC Maunawili Breeding Station.

label	tree name	plant genotype
H1	Promecafe 5175-1	Catimor
H2	KO34	Kona typicaKO34
H3	MO24C	Red Catuai MO24
H4	KA17C-4	Yellow Catuai KA17
H5	Yellow	Bourbon
H6	Red	Caturra
H7	<i>C. canephora</i>	

台灣採集材料則包含 160 個來源自台灣現有咖啡莊園之種源(附表 1)與種至台南、屏東及嘉義阿里山 5 個老欉 (透過詢問並經現場植株外觀確認為至少為 30 年以前) 樹冠下所衍生的各 20 個實生苗子代族群，計 100 個樣品如附表 3，共 260 個樣品。

### 2. 葉片 DNA 抽取及定量

葉片 DNA 的萃取方式，主要由 Doyle and Doyle (1990) 的 CTAB 法加以修改:

田間採集嫩芽以 95%酒精保存於 2.0 ml 離心管中，將其酒精移除後，取 0.05 g 葉片，置入冷凍真空乾燥機中乾燥 24 小時。乾燥後的樣品每管裝入玻璃珠，以均質機 (MINI-BEADBEATER™, 冷泉港公司) 震盪成細粉後並於 2.0 ml 離心管中加入 800  $\mu$ l CTAB-PVP 溶液 (2% CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide), 和 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid), 100 mM Tris-HCl, 100 Mm Trisma Base, pH 8.0, 0.2 %  $\beta$ -ME (2-mercaptoethanol), 及 1 % PVP (polyvinylpyrrolidone), 劇烈搖盪至溶液和粉末完全混合，放入 65°C 水浴槽中處理 30 分鐘，每隔 10 分鐘取出搖晃一次，完成後以 16000xg 離心 10 分鐘，取 500  $\mu$ l 上層液體倒入新的 1.5 ml 離心管中，加入 500  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalcohol (24:1), 以 Vortex 劇烈震盪 30 秒，再以 16000xg 離心 10 分鐘，吸取 400  $\mu$ l 至預先內裝 200  $\mu$ l 5 M NaCl 的離心管中，以滴管吸放數次使其混合均勻後，加入 360  $\mu$ l 異丙醇 (Isopropanol), 緩慢反轉小離心管使兩液均勻混合，在室溫下靜置 1 小時，管蓋柄向內以 16000xg 離心 5 分鐘。倒出上清液，加入 1 ml wash buffer, 上下搖動使 DNA 沈澱浮動起來，以 16000xg 離心 5 分鐘。倒出 wash buffer, 加入 1 ml 75% 酒精以清洗沈澱中的鹽類，上下搖動使 DNA 沈澱浮動起來，以 16000xg 離心 5 分鐘，倒出 75% 酒精，倒立於桌上乾燥 30 分鐘。每管加入 50-100  $\mu$ l TE, 必要時輕彈管壁，或用微量吸管吸放幾次以加速溶解，待 DNA 完全溶解，置於 -20°C 冰箱中保存。

取 2  $\mu$ l 抽取液加入 1  $\mu$ l 6x Stop dye (0.2 % bromophenol blue, 0.2 % xylene cyanol FF, 60 % glycerol, 60 Mm EDTA), 以 1 % Agarose I 膠片電泳檢查 DNA 之品質及產量，若 DNA 產物集中在高分子量處，則為品質較佳的 DNA 樣品；若呈現模糊帶狀 (及 DNA 樣品有不同大小的片段), 則表示 DNA 已裂解損壞，則再重新抽取。

取原液 1  $\mu$ l 以分光光度計 (NanoDrop-1000, Thermo Scientific) 進行濃度定量，測定完成的樣品，依其個別定量的結果，加入適量的 QH<sub>2</sub>O 稀釋至濃度 10ng/ $\mu$ l, 置於 -20°C 冰箱保存備用。



### 3. 利用 ISSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異

本試驗所使用的 ISSR 引子是由加拿大英屬哥倫比亞大學 (The University of British Columbia, UBC) 所發表的 100 條核酸引子，長度介於 17-20mer 之間，引子序列如附表 4。

PCR 反應總體積為 10  $\mu$ L，內含 20 ng 參試種源之 DNA、0.3  $\mu$ M 引子、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP 及 0.6 U Taq DNA polymerase (Biotool, B&M Labs)。PCR 反應以 Perkin Elmer 生產之 Gene Amp PCR system 9700 型熱循環反應器進行，為了獲得穩定、明確條帶而使用 touch-down program (Don *et al.*, 1991)，在進行大量增幅之前，外加入提高黏合溫度的 10 cycle，反應條件為 94°C 2 分鐘；94°C 1 分鐘 60°C/65°C/70°C 30 秒 (每循環一次下降 1°C)，72°C 90 秒，循環 10 次；94°C 3 秒，50°C/55°C/60°C 20 秒，72°C 90 秒，循環 38 次；72°C 4 分鐘，反應終了以 4°C 保存反應產物。

#### ISSR 多型性引子篩選

本試驗中 ISSR 多型性引子的篩選以 7 個已知種源對 UBC801~UBC900 共 100 個引子進行篩選，選出有穩定擴增出產物且多型性條帶清楚明顯的 ISSR 引子進行分析，針對有效引子進行最適黏合溫度之篩選，最後再進行所有參試種源 ISSR 分析。

#### PCR 擴增產物電泳分析及資料分析

將反應完成之 PCR 產物加 2  $\mu$ L 之 6X stop dye (6X, 0.2 % bromophenol blue, 0.2 % xylene cyanlo FF, 60 % glycerol, 60 mM EDTA)，以 1.5 % Agarose I 膠片，以 250V 電壓進行電泳分離，電泳完成後以 0.6  $\mu$ g/ml ethidium bromide (EtBr) 染色 10 分鐘後，再換以清水退染 15 分鐘，置於 UV 燈箱上觀察並以數位相機照像紀錄存檔。

根據電泳膠片所獲得的資料，選取在參試種源中有多型性且穩定表現的分子標誌進行分析，根據條帶之有無，分別以 1 和 0 紀錄之。

#### 4. ISSR 之遺傳相似性分析

樣品間的遺傳距離的估算採用 Jaccard's coefficient of community (Jaccard, 1908)：兩樣品間的遺傳距離計算公式如下 (genetic distance)：

$$Gd_{ij} = (N_i + N_j) / (N_{ij} + N_i + N_j)$$

$N_i$ ：膠片上相同位置處 i 品種有條帶且 j 品種無條帶之總數

$N_j$ ：膠片上相同位置處 i 品種無條帶且 j 品種有條帶之總數

$N_{ij}$ ：膠片上相同位置處 i 品種與 j 品種皆有條帶之總數

兩樣品間的遺傳相似性 (genetic similarity) 則為  $(1 - Gd_{ij})$

#### 群聚分析與 PCoA 分析

根據品種間遺傳相似性進行主成份向量分析，將資料匯入 NT-SYS pc 2.0 之 Transformation 中 Decenter 選項，得到校正過相似性後，再使用 Ordination 中的 Eigen 選項得到特徵根 (eigen value) 與其相對應的特徵向量 (eigen vector)，用以探討不同分子標誌對咖啡種源的鑑別效果，篩選出品種間差異性較大且條帶訊號較強的分子標誌，可提高品種鑑別之效率。

群聚分析是利用 NT-SYS pc 2.0 之 Cluster 選項中的 SAHN (Sequential agglomerative hierarchical nested cluster analysis) 將匯入的相似性資料以 UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic mean) 進行群聚分析，將結果以樹狀圖呈現。



### 三、利用 SSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異

#### 1. 參試材料

本試驗使用 7 個夏威夷農業研究中心已知品種和台灣採集材料，包含 70 個莊園共 160 個樣品。

#### 2. 利用 SSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異

##### SSR 引子對之選擇

本研究所選用的 SSR 引子根據設計來源有兩組，一是由 Aggarwal 等學者所設計 24 對 EST-SSR 引子。二是由前人所發表 SSR 中選取 PIC (Polymorphism Information Content) 較高的 29 對引子(Baruah *et al.*, 2003; Moncada and McCouch, 2004)，共計 53 對。所選的引子序列如附表 5。

##### 黏合溫度測試

將 53 對引子進行聚合酵素連鎖反應模板聯合溫度 (annealing temperature) 測試，分別以 50°C、53°C、56°C、59°C、62°C、65°C 進行測試。PCR 反應總體積為 10  $\mu$ L，內含 20 ng 參試種源之 DNA、正向及反向引子各 1  $\mu$ L (濃度為 4  $\mu$ M)、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP 及 0.6 U Taq DNA polymerase (Biotool, B&M Labs)，PCR 反應以 Perkin Elmer 生產之 Gene Amp PCR system 9700 型熱循環反應器進行，反應條件為 94°C 2 分鐘；94°C 1 分鐘，測試溫度 50°/53°/56°/59°/62°/65° 30 秒，72°C 1 分鐘，共循環 2 次；94°C 20 秒，測試溫度 50°/53°/56°/59°/62°/65° 20 秒，72°C 30 秒，循環 34 次；72°C 10 分鐘，反應終了以 4°C 保存反應產物。

將反應完成之 PCR 產物加 2  $\mu$ L 之 6X stop dye，以 2% Agarose I 膠片，以 300V 電壓進行電泳分離，20 分鐘電泳完成後以 0.6  $\mu$ g/ml ethidium bromide (EtBr) 染色 10 分鐘後，再換以清水退染 15 分鐘，置於 UV 燈箱上觀察並以數位相機照像紀錄存檔。

##### 多型性之測定

由於簡單重覆序列引子在品種間差異較小，約 20 個鹼基對以下，在 Agarose

I 膠片上無法判斷其片段大小的差異，所以在進行電泳分析 PCR 產物時，使用可以偵測至 3 個鹼基對差異的聚丙烯醯胺電泳系統(Wang *et al.*, 2003)。

### 3. 聚丙烯醯胺凝膠電泳分析

製作 6% 聚丙烯醯胺凝膠共 100 mL，其中包含 90 mL QH<sub>2</sub>O、12 mL 5X TBE buffer、18 mL acrylamide solution (acrylamide : bis = 19:1) (40%)；混合後以 840  $\mu$ l ammonium persulfate [ 10% (w/v) ] 與 96  $\mu$ l tetramethylethylenediamine (TEMED) 為催化劑，將未凝固的凝膠灌製成厚 1 公厘的膠片，待 1 小時膠片凝固後，先以含有  $1 \times 10^{-4}$  % (w/v) EtBr 的 0.5X TBE buffer 預染 90 分鐘，再將加有 2  $\mu$ l 6X stop dye 的 10  $\mu$ l PCR 產物以 350mV 進行 90 分鐘電泳；電泳完畢將膠片放置於 UV 燈箱上觀察並拍照記錄。

### 4. 毛細管電泳分析及資料收集

欲瞭解品種間 SSR 片段切確的大小及位置，進一步使用螢光電泳系統自動偵測儀，本試驗所使用多重 PCR 組合 (multiple-ready PCR) 方法，在多型性片段大小不重疊時，使用相同螢光標記的引子；而多型性片段大小重疊情況下，則可以不同螢光標定引子，一起進行電泳分析，如此一來可節省時間與成本，且螢光標記由原來標定 SSR 引子改為標定較短的特定序列 (Hayden *et al.*, 2008)。

從 53 個 SSR 引子中篩選出在品種間具有多型性的 2 組引子，CM16 與 CAM0011，在其片段大小重疊的情況下，使用不同的螢光標記，在 SSR 分子標誌的正向端引子在 5' 端上分別標定兩種螢光物質，其中 CM16 以 6-FAM，CAM0011 以 VIC 螢光標定，由源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech, Inc) 合成。

多重 PCR 組合聚合酶連鎖反應體積為 10  $\mu$ l，包含 20 ng 參試種源之 DNA、SSR 正向及反向引子共 0.2  $\mu$ l 或 0.4  $\mu$ l (濃度為 1  $\mu$ M)、tag 正向與反向引子 1.5  $\mu$ l (1  $\mu$ M)、1X PCR Buffer、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP 及 0.6 U Taq DNA polymerase (Biotool, B&M Labs)，PCR 反應以 Perkin Elmer 生產之 Gene Amp PCR system 9700 型熱循環反應器進行，反應條件為 94°C 3 分鐘；92°C 30 秒，63°C 90 秒，72°C 1

分鐘，共循環 22 次；92°C 15 秒，54°C 30 秒，72°C 1 分鐘，循環 40 次；72°C 30 分鐘，反應終了以 4°C 保存反應產物。

將反應後之產物，依 CM16 2X CAM0011 1X 的比例進行混合後稀，進行 multiplex 電泳，取出 0.5  $\mu$ l 混合稀釋液，再加入 0.25  $\mu$ l GeneScan-600 LIZ size standard (Applied Biosystems, ABI) 和 9.25  $\mu$ l Hi-Di Formamide，總體積為 10  $\mu$ l。均勻混合後，將各管置於 95°C 加熱 3 分鐘，隨即冰浴，接著以遺傳分析儀 (Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer, ABI) 進行毛細管電泳及螢光自動偵測，收集 SSR 片段螢光資料，所得資料以 GeneMapper<sup>®</sup> v4.0 (ABI) 軟體進行分析，先判讀每一管內偵測到的已知標準片段大小 (GeneScan-600 LIZ)，再利用兩側已知片段大小的區間，藉由內插法換算此區間內未知樣品片段大小。並且，將螢光強度最高之條帶，視為該 SSR 基因座上所帶之對偶基因，並將所偵測到的對偶基因片段大小記錄下來。

#### 5. PIC 值之計算

為了量測出 SSR 標記在不同品種間的多型性關係，使用 Anderson 等學者 (1993) 對自交作物所提出 PIC 值計算式：

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

其中  $p_{ij}$  是第  $i$  個基因座上所有  $j$  個對偶基因的頻度。基因座  $i$  的  $PIC_i$  即為 1 減去基因座上所有對偶基因頻度平方和。

#### 資料記錄

根據電泳膠片所獲得的資料，將 SSR 引子所增幅出來的條帶，依照其片段大小，由小至大分別依序標誌成 A、B、C...。再將數據轉換成此品種有無此 SSR 基因座上之某一個對偶基因，以 1、0 表示。

## 5. SSR 之遺傳相似性分析

*C. arabica* 為異源四倍體，個體中任一個基因座上最多有可能出現四個對偶基因，此次試驗中由於未知其譜系父母本，Lashermes 等學者 (2000a) 指出其表現出二倍體減數分裂的行為，若能正確地判別來源不同基因組，就能將其基因型判讀視為二倍體的判讀方式，由於其組成之兩親表現出低度的歧異性(Lashermes *et al.*, 1999)，難以判別個體基因型為同質結合或異質結合。

本研究所使用的兩個 SSR 引子在 *C. arabica* 中，皆以兩種對偶基因形式出現，因此，將 SSR 資料視為來源自任一親本基因座上之某個對偶基因存在與否的顯性標誌，以 1、0 表示(Manifesto *et al.*, 2001; Medini *et al.*, 2005; Montemurro *et al.*, 2005)，但以此方式判讀 SSR 資料易造成在異質結合率高的物種下損失一些可用的資訊(Maguire *et al.*, 2002)，但 *C. arabica* 為自交作物，異型結合的基因座則相對較少見(Lashermes *et al.*, 1999)，本研究採用 Dice coefficient 作為遺傳相似度之計算式(Aggarwal *et al.*, 2007; Maluf *et al.*, 2005; Moncada and McCouch, 2004)。

遺傳相似度係數使用 Dice coefficient 計算(Nei and Li, 1979)，將兩樣品 *i*、*j* 間的遺傳相似度定義為：

$$GS_{ij} = \frac{2N_{ij}}{2N_{ij} + N_i + N_j}$$

其中  $N_i$  表示，在特定片段大小下，樣品 *i* 有，而樣品 *j* 無的條帶數目， $N_j$  表示，在特定片段大小下，樣品 *j* 有，而樣品 *i* 無的條帶數目，而  $N_{ij}$  則是表示在特定片段大小下，樣品 *i* 及樣品 *j* 所共有的條帶數目，兩樣品間的遺傳距離  $GD_{ij}$  即是

$$GD_{ij} = 1 - GS_{ij}。$$

根據品種間遺傳相似性進行群聚分析，利用 NT-SYS pc 2.0 之 Cluster 選項中的 SAHN，將匯入的相似性資料以 UPGMA，進行群聚分析，將結果以樹狀圖呈現。

## 第四章、結果

### 一、台灣咖啡種源外觀性狀調查與分析

#### 1. 台灣咖啡種源外觀性狀調查

本試驗於民國 98 年 2 月初實地走訪調查遍布台灣八個縣市地區的現有咖啡栽培莊園，包含 70 個莊園共 160 個樣品。將每個採集樣品進行外觀性狀調查，包含植株、葉片和種子性狀，其中由於採集時間部份地區非逢漿果成熟，種子性狀則針對 57 個咖啡樹上仍有著果的樣品進行測量。

根據調查結果 (表 2、圖 1) 進行資料整理分析後，在葉片性狀部分，葉長平均為 14.03 公分，標準差為 4.02，偏態系數 (Skewness) 為 3.23，表示葉長為偏右分佈，峰度係數 (Kurtosis) 為 15.54，說明葉長為相當集中的高狹峰分佈；葉寬平均為 5.76 公分，標準差為 2.25，偏態係數為 4.15，表示葉寬為偏右分佈，峰度係數為 26.57，說明葉寬為相當集中的高狹峰分佈；葉面積平均為 65.8 平方公分，標準差為 60.16，偏態係數為 5.41，表示葉面積為偏右分佈，峰度係數為 33.76，說明葉面積為相當集中的高狹峰分佈；葉長寬比平均為 2.59，標準差為 0.47，偏態係數為 0.54，表示葉長寬比為接近對稱分佈，峰度係數為 0.61，說明葉長寬比為接近常態分佈。

植株性狀部份，節間長度平均為 35.87 公厘，標準差為 2.25，偏態係數為 1.11，表示節間長度為略偏右分佈，峰度係數為 1.45，說明節間長度為高狹峰分佈；主幹與一次分支夾角平均為 60.9 度，標準差為 10.28 度，偏態係數為 -0.26，表示主幹與一次分支夾角接近對稱分佈，峰度係數為 -0.04，說明主幹與一次分支夾角接近常態分佈。

種子考種部分 (表 2、圖 2)，帶殼 (內果皮) 種子長平均為 1.28 公分，標準差為 0.13，偏態係數為 1.27，表示帶殼種子長為略偏右分佈，峰度係數為 4.08，說明帶殼種子長為高狹峰分佈；帶殼種子寬平均為 0.87 公分，標準差為 0.08，偏態係數為 2.3，表示帶殼種子長為偏右分佈，峰度係數為 10.84，說明帶殼種子寬為



高狹峰分佈；帶殼種子長寬比平均為 1.48 公分，標準差為 0.11，偏態係數為 0.18，表示帶殼種子長寬比接近對稱分佈，峰度係數為-0.2，說明帶殼種子長寬比接近常態分佈；帶殼種子厚平均為 4.22 公分，標準差為 1.44，偏態係數為-1.36，表示帶殼種子長為略偏左分佈，峰度係數為 0.03，說明帶殼種子厚接近常態分佈。

11 個調查性狀中以葉面積的變異係數 (CV) 最高為 83.26%和 91.42%，種子性狀的變異量較葉片性狀小，推測為生殖性狀較不易受環境影響所致，其中帶殼種子厚的變異量相較於其他種子性狀大，為 34.12%，推測與種子充實程度有關，並以葉長寬比、主幹與一次分支夾角及帶殼種子長寬比的變異量最小，依次為 18.25%、16.87%、7.14%。

表 2、台灣咖啡種源樣品之農藝性狀統計值

Tabel 2. The distribution of 10 quantitative traits in the 160 Taiwan coffee germplasm.

外觀性狀 trait	種源數 N	平均值 Mean	標準差 SD	變異係數 CV	偏態係數 Skewness	峰度係數 Kurtosis
葉長	160	14.03	4.02	28.63	3.23	15.54
葉寬	160	5.76	2.25	39.12	4.15	26.57
葉面積 I	160	58.95	49.08	83.26	4.69	25.51
葉面積 II	160	65.80	60.16	91.42	5.41	33.76
葉長寬比	160	2.59	0.47	18.25	0.54	0.61
節間長度	160	35.87	13.61	37.95	1.11	1.45
主幹與一次分支夾角	160	60.96	10.28	16.87	-0.26	-0.04
帶殼種子長	57	1.28	0.13	9.97	1.27	4.08
帶殼種子寬	57	0.87	0.08	9.45	2.30	10.84
帶殼種子長寬比	57	1.48	0.11	7.14	0.18	-0.20
帶殼種子厚	57	4.22	1.44	34.12	-1.36	0.03

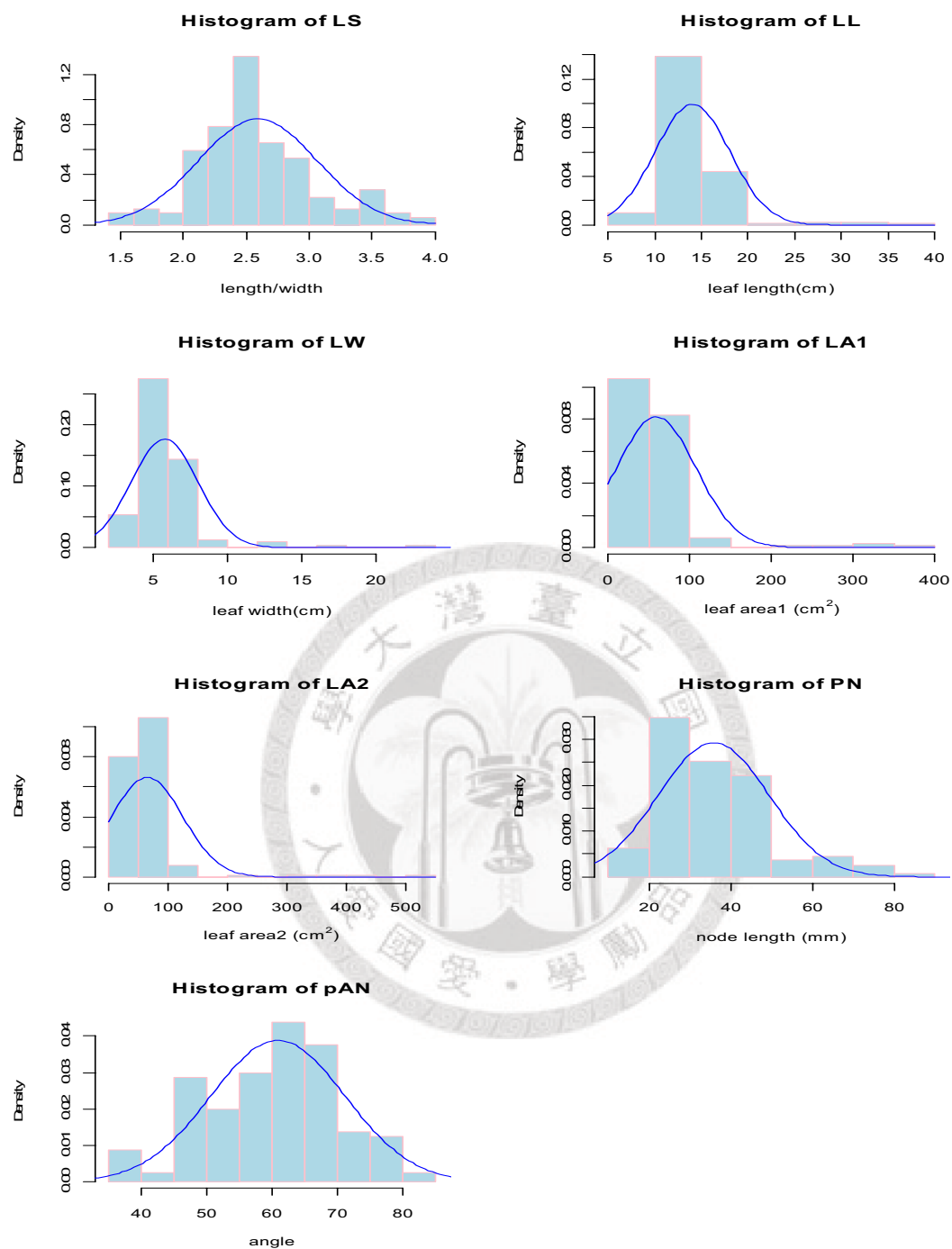


圖 1、台灣咖啡 160 個種源樣品農藝外觀性狀之變異性與頻度分佈

LS：葉形；LL：葉長；LW：葉寬；LA1：葉面積 I；LA2：葉面積 II；PN：節間長度；PAN：主幹與一次分之夾角

Fig. 1 The variability and frequency distributions of the eight agronomic traits of the 160 collected Taiwan coffee accessions.,LS: leaf shape, LL: leaf length,, LW: leaf width,, LA1: leaf area I, ,LA2: leaf area II, PN: plant node, PAN: the secondary veins at the insertion with the main one.

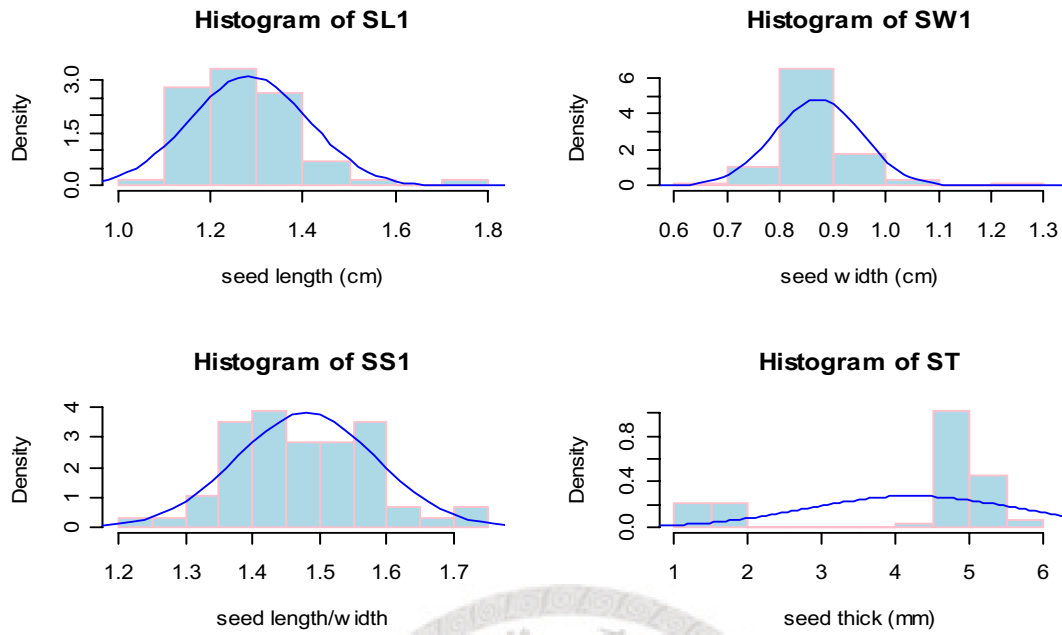


圖 2、台灣咖啡 57 個種源種子農藝特徵之變異性與頻度分佈

SL1：帶殼種子長；SW1：帶殼種子寬；SS1：帶殼種子長寬比；ST：帶殼種子厚

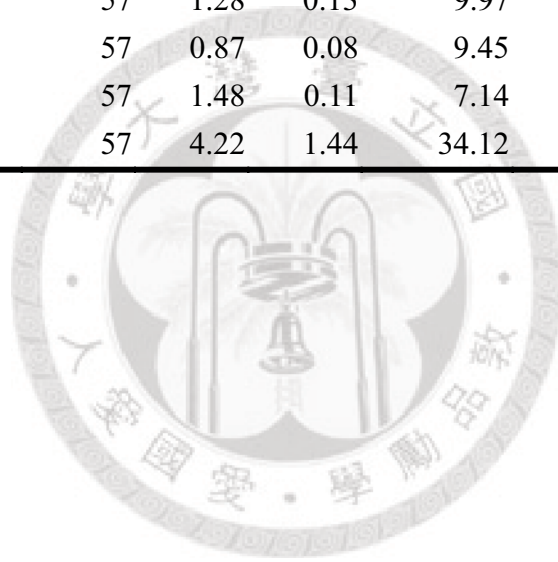
Fig. 2 The variability and frequency distributions of the seed agronomic quantitative traits of the 57 Taiwan coffee accessions, SL1:seed length 1; SW1: seed width 1; SS1: seed shape; ST: seed thickness.

台灣採集材料中包含 *C. canephora*、*C. liberica* 物種與 *C. arabica* 外觀性狀差異甚大，台灣採集的 9 個種源，包含花蓮黏阿瑞 (19)、台東天香 (25.27)、古坑劉易騰 (106)、古坑林亮宏 (122)、竹山林國隆 (135)、鹿谷許佑存 (138)、國姓林秀吉 (159)、國姓林秀吉 (161) 在葉長平均為 24.47 公分、葉寬平均為 11.61 公分、葉面積 I 平均為 207.3 平方公分、葉面積 II 平均為 238.98 平方公分及節間長度平均為 41.39 公分，顯著大於其他樣品，相對於 *C. arabica* 的樣品即屬於離群值，因此經外觀性狀判斷 9 個台灣採集樣品非為 *C. arabica* 去除後，所組成的樣品組群即可概判為 *C. arabica* 物種的樣品，重新分析其調查結果 (表 3、圖 3)，葉片性狀部分，葉長平均為 13.41 公分，標準差為 2.27，偏態係數、峰度係數分別為 0.04、2.05，說明葉長為對稱較集中的分佈；葉寬平均為 5.43 公分，標準差為 1.19，偏態係數、峰度係數分別為 0.1、-0.21，說明葉寬為接近常態的對稱分佈；葉面積 I 平均為 50.34 平方公分，標準差為 17.91，偏態係數、峰度係數分別為 0.57、0.55，葉面積 II 平均為 55.68 平方公分，標準差為 18.69，偏態係數、峰度係數分別為 0.57、0.8，說明葉面積為接近常態的對稱分佈；葉長寬比平均為 2.61，標準差為 0.45，偏態係數、峰度係數分別為 0.6、0.74，說明葉長寬比為的略偏右較分散的分布；節間長度平均為 3.55 公分，標準差為 13.37，偏態係數、峰度係數分別為 1.12、1.66，說明節間長度為的略偏右較分散的分布；主幹與一次分支之夾角平均為 61.13 度，平均標準差為 9.89，偏態係數、峰度係數分別為 -0.3、0.04，說明主幹與一次分支之夾角為的略偏左的常態分佈。

節間長度性狀的 CV 值最高為 37.62%，葉長性狀的 CV 值最小為 16.9%，本研究利用兩種量測葉面積方法測量採集的樣品，所得的結果有顯著差異 ( $p = 0.01$ )，其中葉面積 I 是利用一個係數配合實測的長寬值，所估算而得的，此一推測量測葉面積 I 的係數 (0.66) 所測得的環境為 *C. arabica* 種植於均質的栽培環境 (Montagnon and Bouharmont, 1996)，而此次採集的咖啡種源來自不同的栽培環境，所以此次實驗使用由影像分析程式直接量測所得葉面積 II 進行分析。

表 3、將離群值去除後之 152 個台灣 *C. arabica* 咖啡種源外觀性狀之統計值  
 Tabel 3. The distribution of 10 quantitative traits in the 152 Taiwan *C. arabica* germplasm without outliers.

外觀性狀 trait	種源數 N	平均值 Mean	標準差 SD	變異係數 CV	偏態係數 Skewness	峰度係數 Kurtosis
葉長	152	13.41	2.27	16.95	0.04	2.05
葉寬	152	5.43	1.19	21.92	0.10	-0.21
葉面積 I	152	50.34	17.91	35.57	0.57	0.55
葉面積 II	152	55.68	18.69	33.57	0.57	0.80
葉長寬比	152	2.61	0.45	17.15	0.60	0.74
節間長度	152	35.55	13.37	37.62	1.12	1.66
主幹與一次分支夾角	152	61.13	9.89	16.18	-0.30	0.04
帶殼種子長	57	1.28	0.13	9.97	1.27	4.08
帶殼種子寬	57	0.87	0.08	9.45	2.30	10.84
帶殼種子長寬比	57	1.48	0.11	7.14	0.18	-0.20
帶殼種子厚	57	4.22	1.44	34.12	-1.36	0.03





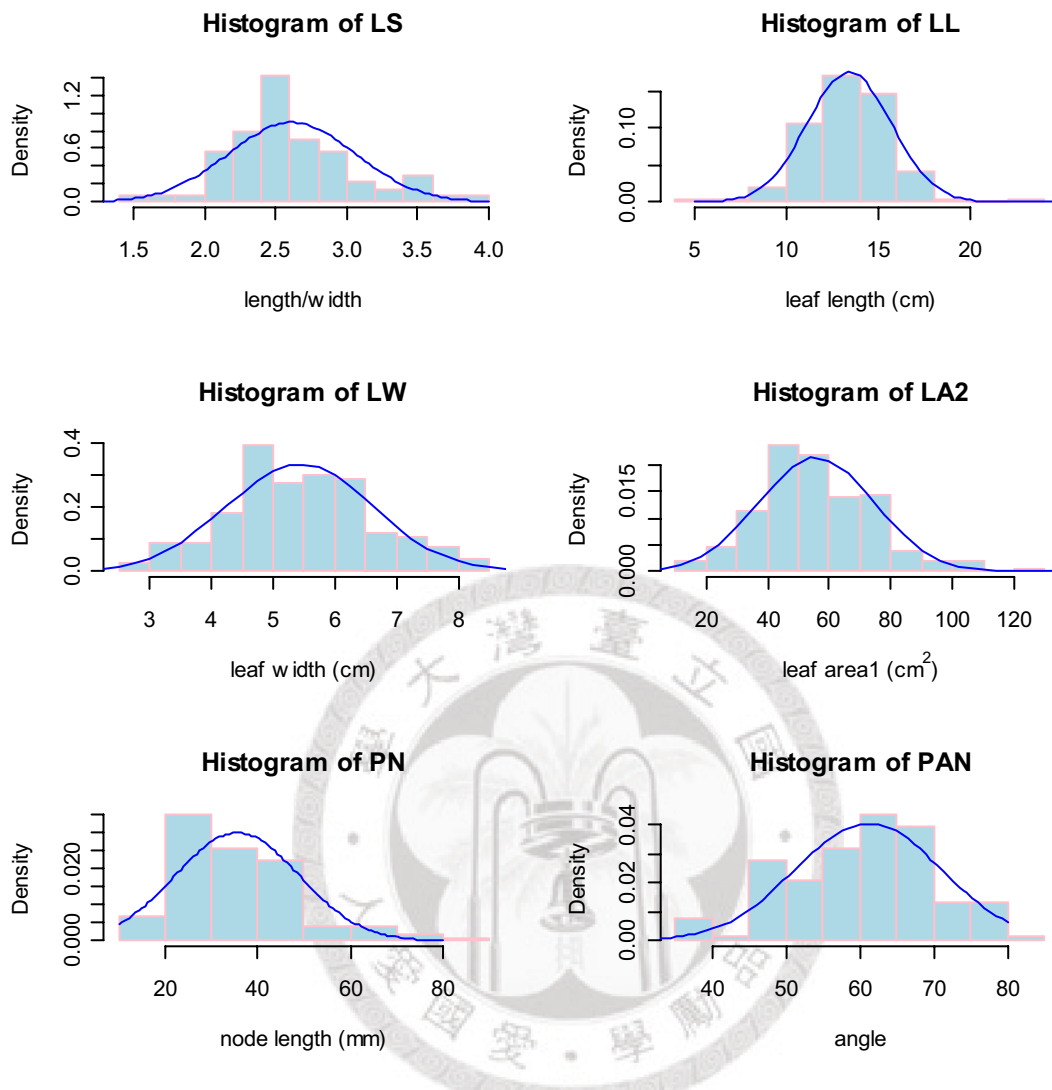


圖 3、台灣 *C. arabica* 咖啡種源之六個外觀性狀之變異性參數分佈圖。  
 將離群值去除非 *C. arabica* 樣品後之 152 個樣品的資料整理結果，LS：葉形；LL：葉長；LW：葉寬；LA2：葉面積 II；PN：節間長度；PAN：主幹與一次分之夾角  
 Fig. 3 The frequency and distributions of the six morphological traits of the *C. arabica* accessions of Taiwan. The population comprise 152 accessions after removing the outliers from the original sample, LS: leaf shape, LL: leaf length, LW: leaf width, LA2: leaf area II, PN: plant node, PAN: the secondary veins at the insertion with the main one.

*C. arabica* 與 *C. canephora*、*C. liberica* 外觀差異明顯，因此可成功以外表性狀區分是否為 *C. arabica*；而 *C. liberica* 在樹勢、葉、花形、果實皆比 *C. canephora* 大許多，*C. liberica* 葉片呈革質較 *C. canephora* 厚，主脈反面隆起較顯著，進行判別因子分析 (discriminant factor) 時，發現 *C. liberica*、*C. canephora* 主要的差異反應在果實與開花型態上如果實大小、花絮數目，而葉片性狀如葉面積、葉長、葉寬、及葉面積為次要差異(N'Diaye *et al.*, 2005)，此次外表性狀調查中的 9 個離群值，依其傳播來源可判定非為 *C. arabica*，但由於未獲得其果實及花的性狀且也未針對葉厚進行調查，無法由此次外觀調查判別為 *C. liberica* 或 *C. canephora*。

## 2. 台灣咖啡種源植株性狀之主成份分析

原擬對採集材料的 10 個外觀性狀，包含主幹與一次分支的夾角、節間長度、葉長、葉寬、葉長寬比、葉面積、帶殼種子長、帶殼種子寬、帶殼種子長寬比、及帶殼種子厚進行調查，但由於採集樣品並未全數收集到種子，而將調查結果分成兩部分進行分析。並由於 *C. arabica* 為台灣地區現今商業栽培品種，因此不考慮非 *C. arabica* 種源。

### 葉及株型性狀分析

所採集的樣品材料中有一部分 (152 個) 未包含種子性狀，共調查 6 個外觀性狀之 *C. arabica* 種源，擬探討是否可以利用這些性狀的歧異性，分群歸類不同樣品，因此採用主成份分析統計法 (Principal component analysis) 分析資料。經考量性狀之間相關的主成份分析後，將各主成份貢獻的比例及特徵向量如表 4、表 5。

前 3 個主成份貢獻量依序為 50.1%，20.3%，14.6%，前三個主成份累積變異共達 85.03%，前三個主成份中，6 個外觀性狀所貢獻比例如表 4，其中第一主成份解釋大部分的變異，以葉長、葉寬、葉面積 II 之葉片性狀貢獻較大，而第二主成份中以節間長度、主幹與一次分支夾角之植株性狀及葉長寬比貢獻較大。

表 4、152 個 *C. arabica* 種源之 6 個外觀性狀所建立前 6 個主成份之特徵根和其貢獻比例

Table 4. Eigenvalues and proportions of the first 6 principal components among 6 leaf traits on 152 *C. arabica* germplasms.

主成份 Component	特徵根 Eigen value	貢獻比例 Percent (%)	累積貢獻比例 Cumulative (%)
1	3.00712557	50.12	50.12
2	1.21658747	20.28	70.40
3	0.87834304	14.64	85.03
4	0.74998311	12.50	97.53
5	0.09852957	1.64	99.18
6	0.04943123	0.82	100



表 5、152 個 *C. arabica* 種源之 6 個外觀性狀之前三個主成份特徵向量

Table 5. The first 3 principal components among 6 leaf traits on 152 *C. arabica* germplasms.

外觀性狀	Prin1	Prin2	Prin3
葉長寬比	-.343187	0.490860	-.129328
葉長	0.479324	0.319562	0.037491
葉寬	0.555915	-.094321	0.074152
葉面積II	0.554319	0.085900	0.142439
節間長度	0.155591	0.542627	-.678362
主幹與一次分支夾角	-.109323	0.588403	0.704206

## 2.1、採集區域間分群關係

以前兩個主成份為軸所繪製主成份向量分析圖 (圖 4)，採集自台灣 8 個地區的咖啡種源在地區內的種源有群聚的情況，以採集自南投地區的種源分布於第一主成份的左半邊正值部分 (以第一主成份的 0 為界)，屏東、台東地區的種源分布於第一主成份的右半邊負值部份 (以第一主成份的 0 為界)，台南東山地區的種源則分布於南投地區與屏東地區之間 (以第一主成份-2 至 2 之間)，此三個地區內群聚情況較明顯，而在雲林古坑、花蓮、嘉義阿里山、及嘉義茶山此四個地區內種源有較大的變異，其種源分佈較分散。整體而言，在台灣不同地區 *C. arabica* 咖啡間有群聚狀況，但種源間彼此混雜群聚成一團，推測與台灣咖啡種源跨地區傳播買賣行為有關。

由主成份分析結果顯示，透過所調查的性狀組合之後可以對採集的樣品概略分群，顯示這些性狀是具有鑑別力的，因此將包含 8 個地區 70 個莊園共 152 個樣品進一步進行 6 個外觀性狀之變方分析，探討各調查性狀的鑑別力 (附表 6)，變方分析是以採集地理區域，海拔與莊園為自變因子，調查的性狀為應變因子，結果發現地區間效應於葉長 ( $p = 0.0167$ )、葉寬 ( $p = 0.0167$ )、葉長寬比 ( $p = 0.0414$ )、節間長度 ( $p = 0.0001$ ) 及主幹與一次分支夾角性狀 ( $p = 0.033$ ) 呈顯著，表示採集自台灣不同地區間的咖啡種源在葉長、葉寬、葉長寬比、節間長度及主幹與一次分支夾角性狀有顯著的差別，而咖啡樹種植的海拔與莊園則無差異。

## 2.2、海拔分佈分群關係

欲探討海拔高度與外觀性狀分布的關係，仿照台灣茶葉高山茶分群通則，以海拔高度依一千公尺為界，將種源分成高海拔、低海拔兩部份，分別有 20 與 140 個樣品，並在以前兩個主成份為軸所繪製主成份向量分析圖上標示出來 (圖 5)，其採集自高海拔的種源均勻分散於低海拔樣品間，且在以植株性狀為主的第二主成份中，高海拔種源較低海拔種源密集，但分群關係並不明顯。將 6 個外觀性狀進行變方分析 (附表 6)，結果顯示高海拔種源在葉寬、葉面積顯著大於低海拔種源，

此與主成份分析結果所顯示的群聚分群不明顯有所出入，推測在單因子變方分析中顯著的效應，經考慮多因子的主成份分析稀釋其效應，而高海拔地區雲霧繚繞，日照較不足，適度遮陰可以造成葉片擴大 (朱，1940)，因此產生海拔間樣品在葉長寬、長寬比、葉面積等四個葉片性狀的差異，但仍須經分子標誌瞭解其遺傳背景才能探討海拔高度對葉片外觀的影響與遺傳的關係。

### 2.3、老欉與自播實生苗分佈分群關係

將早年 (1930 年代與 1960 年代) 引種至台灣，因故野放至山林，未經人為栽培、馴化之老欉種源，共計 17 個樣品，在以前兩個主成份為軸所繪製主成份向量分析圖上標示出來 (圖 6)，老欉種源均勻分散於其他種源間且老欉內群聚情況不明顯。由實地訪談中，發現農民的咖啡樹苗多採自山林間野生咖啡老欉下的實生苗，由某一個區域甚或某一株老欉為目前栽培咖啡樹苗的主要來源，因此透過外表性狀的比較，如圖 6 所示，可以發現老欉的資料點散佈在各栽培咖啡樣品之間，並無明顯的群聚現象，雖然在圖 6 的右邊緣發現採集來自花蓮富里協田土地銀行的老欉資料點獨立在其他資料點之外，但是大多數的老欉周圍都有一些栽培樹的資料點，因此可以推測的是目前大部分栽培的咖啡樹都是來自這些老欉及其衍生的種源樹叢，將 6 個外觀性狀進行變方分析 (附表 7)，顯示老欉樣品個體在葉長顯著小於自播實生新苗個體。



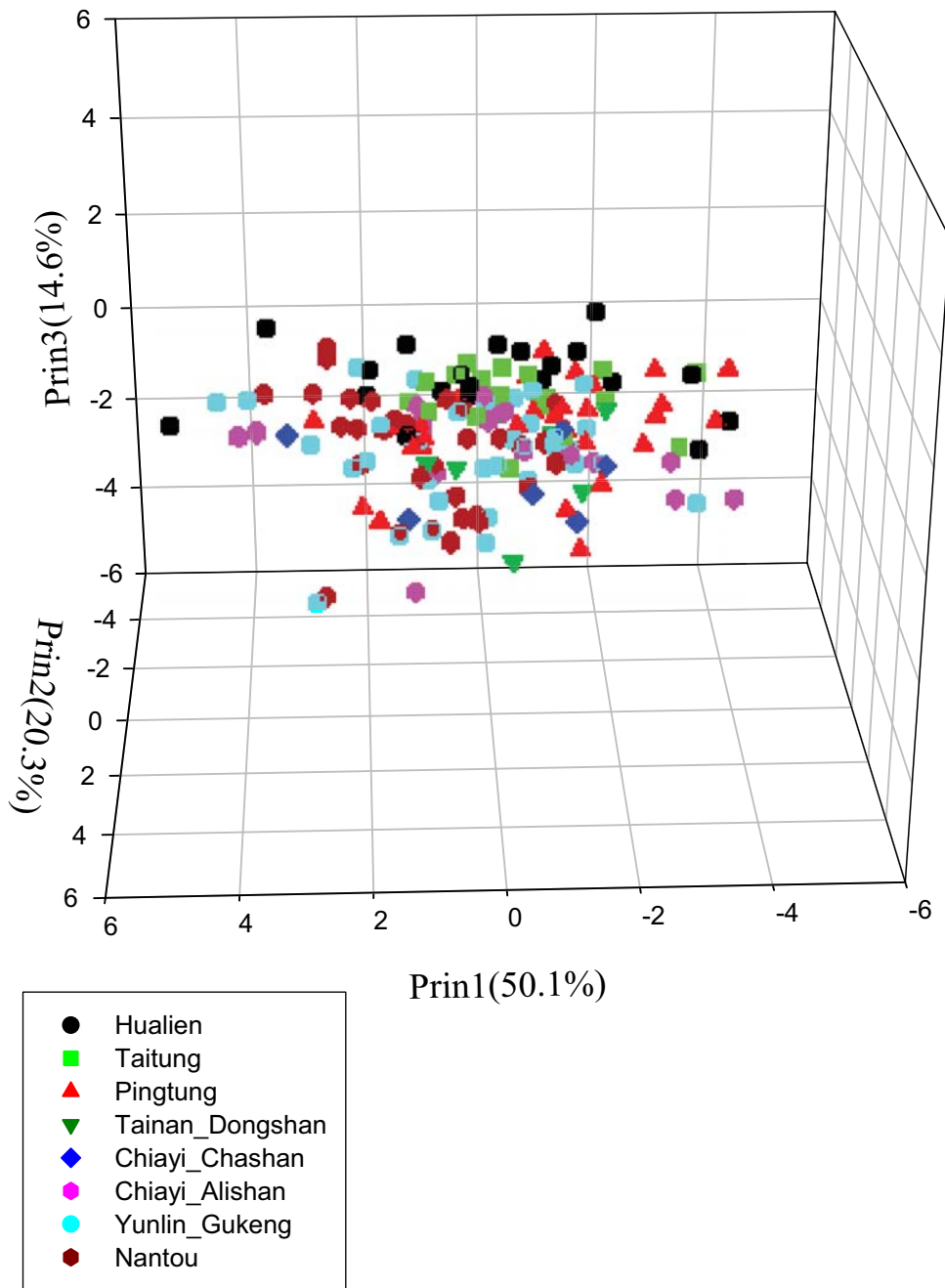


圖 4、152 個台灣咖啡種源以採集區域分群標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖  
將採集樣品包含葉片性狀的 152 個樣品，依採集區域為台灣的 8 個地區，利用 6 個外觀性狀進行分析後，取前三個主成份繪製的圖形。

Fig. 4. Plot of the first three principal components from the covariance matrix of 6 leaf traits for the 152 Taiwan *C. arabica* germplasm.

Plot of the first three principal components of accessions grouped by site. 152 accessions with leaf traits were grouped by site.

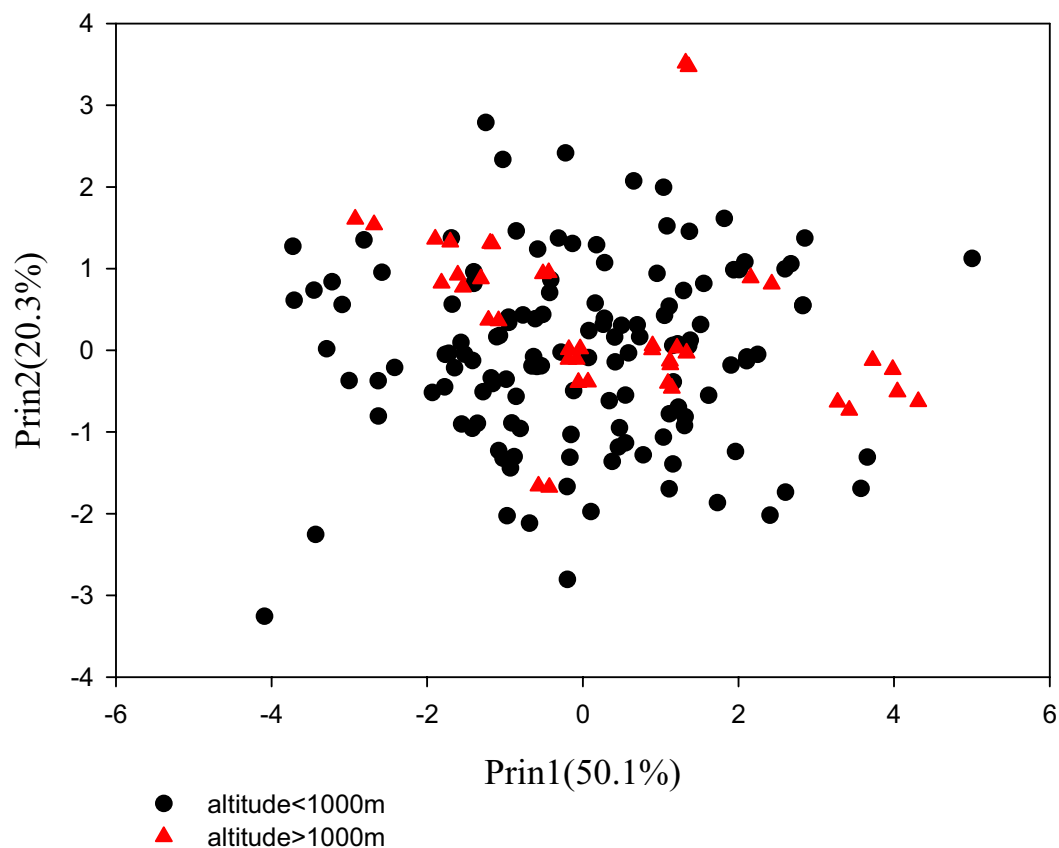


圖 5、152 個台灣咖啡種源以海拔高度分群標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖。將採集樣品包含葉片性狀的 152 個樣品，依海拔高度分為高海拔與低海拔，利用 6 個外觀性狀進行分析後，取前兩個主成份繪製的圖形。

Fig. 5. Plot of the first two principal components differentiated from altitude and the covariance matrix of 6 leaf traits for the 152 Taiwan *C. arabica* germplasm.

Plot of the first two principal components of accessions grouped by altitude. 152 accessions with leaf traits were grouped by altitude.

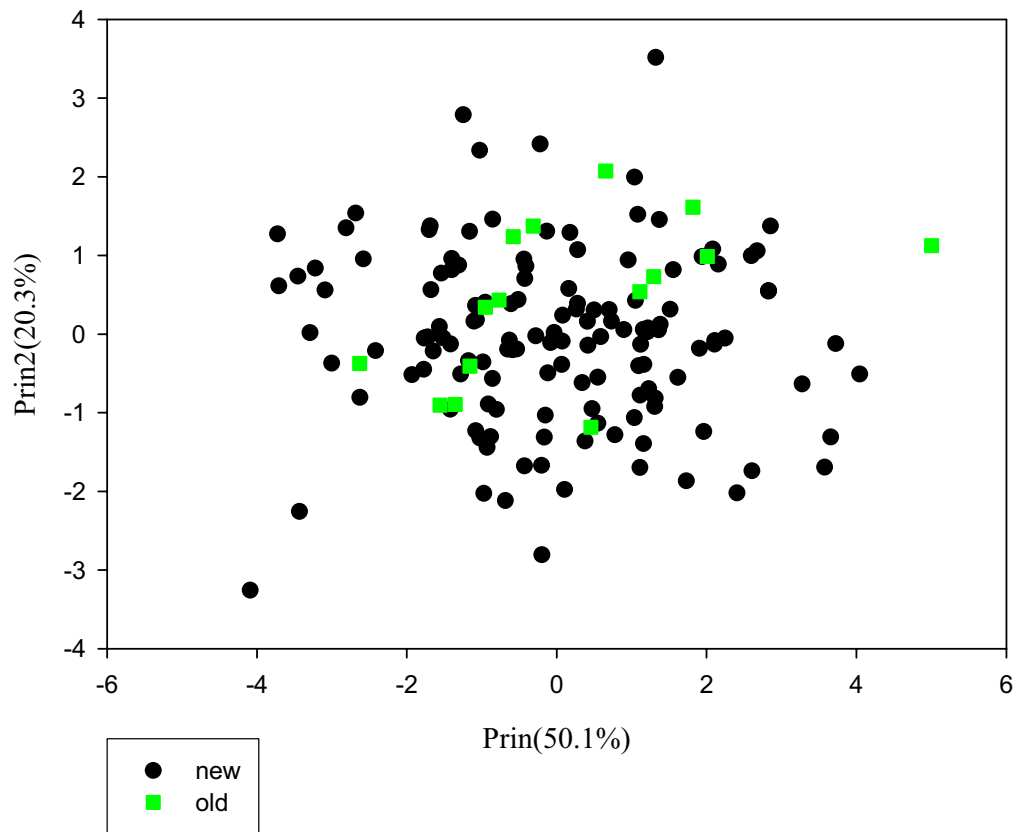


圖 6、152 個台灣咖啡種源以樹齡分群標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖  
將採集樣品包含植株性狀的 152 個樣品，依樹齡分為老樣與非老樣，利用 6 個外觀性狀進行分析後，取前兩個主成份繪製的圖形。

Fig. 6. Plot of the first two principal components differentiated from origin and the covariance matrix of 6 leaf traits for the 152 Taiwan *C. arabica* germplasm.  
Plot of the first two principal components of accessions grouped by age. 152 accessions with leaf traits were grouped by age.

### 3. 台灣咖啡種源植株、種子性狀之主成份分析

採集的樣品另一部份為 56 個種源包含種子性狀，共調查 10 個外觀性狀之種源，進行主成份分析，所得的 10 個主成份結果如表 6。

前 3 個主成份貢獻量依序為 34.5%，18.5%，12.7%，前三個主成份累積變異共達 65.6%，前三個主成份中，10 個外觀性狀所貢獻之比例如表 7，其中第一主成份解釋 39.6% 的變異，以葉長、葉寬、葉面積之葉片性狀貢獻較大，而第二主成份中以帶殼種子長、帶殼種子寬及帶殼種子厚之種子性狀貢獻較大，第三主成份則以主幹與一次分支夾角之植株性狀、帶殼種子厚及帶殼種子長寬比貢獻較大。

#### 3.1、採集區域間分群關係

以前三個主成份為軸所繪製主成份向量分析圖 (圖 7)，採集自台灣 8 個地區的咖啡種源的種源無群聚的情況且來源同地區的種源彼此分散，經由收集的種子性狀，配合葉部及樹型性狀進行分析，其分群結果反而不明顯，推測與種子性狀變異較小有關。

#### 3.2、海拔分佈分群關係

對於樣品的海拔分佈是否會影響性狀特性，也是一個有趣的議題，因此，以海拔高度依一千公尺為界，將種源分成高海拔、低海拔兩部份，各分別有 9 與 47 個樣品，並再以前兩個主成份為軸所繪製主成份向量分析圖上標示出來 (圖 8)，由圖中顯示採集自高海拔的種源均勻分散於低海拔樣品間，種源分散群聚情況不明顯，進行變方分析 (附表 8)，結果顯示高、低海拔間外觀性狀差異不顯著。

#### 3.3、老欖與新苗分佈分群關係

將早年 (1930 年代與 1960 年代) 引種至台灣，因故野放至山林，未經人為栽培、馴化之老欖種源，共計 9 個樣品，在以前兩個主成份為軸所繪製主成份向量分析圖上標示出來 (圖 9)，老欖種源較其他種源聚集於第一主成份偏負值的部分及第二主成份偏負值的部分 (以第一、二主成份的 0 為界)，顯示老欖相較其他種源在葉長、寬及葉面積性狀呈現較小與帶殼種子厚呈較大且帶殼種子長、寬較小，

可能與老欖未經人為栽培管理所致，但老欖內群聚情況不明顯，綜合而言，進行變方分析 (附表 9) 則顯示老欖和其他種源於外觀性狀觀察上並無顯著差異。

表 6、56 個種源之 10 個外觀性狀建立前 10 個主成份之特徵根和其貢獻比例  
Table 6. Eigenvalues and proportions of the first 10 principal components among 10 leaf and seed traits on the 56 *C. arabica* germplasms.

主成份 Component	特徵根 Eigenvalue	貢獻比例 Percent (%)	累積貢獻比例 Cumulative (%)
1	3.44961842	34.50	34.50
2	1.83544664	18.53	52.85
3	1.27075629	12.71	65.56
4	1.02913054	10.29	75.85
5	0.79878370	7.99	83.84
6	0.71285559	7.13	90.97
7	0.56542773	5.65	96.62
8	0.18518886	1.85	98.47
9	0.14519104	1.45	99.92
10	0.00760118	0.00	100.00

表 7、56 個種源之 10 個外觀性狀之前三個主成份特徵向量  
Table 7. The first three principal components among the ten leaf and seed traits on the 56 *C. arabica* germplasms.

外觀性狀	Prin1	Prin2	Prin3
葉長寬比	-.364548	-.005292	0.206093
葉長	0.440438	0.021452	0.200997
葉寬	0.499877	0.121060	-.025836
葉面積II	0.489352	0.136718	0.186894
節間長度	0.029979	0.078601	-.071169
主幹與一次分支夾角	-.222016	-.011138	0.617902
帶殼種子長	-.105691	0.654189	-.212995
帶殼種子寬	0.028704	0.659148	0.056950
帶殼種子長寬比	-.237068	0.064606	-.532631
帶殼種子厚	-.255716	0.305368	0.402933



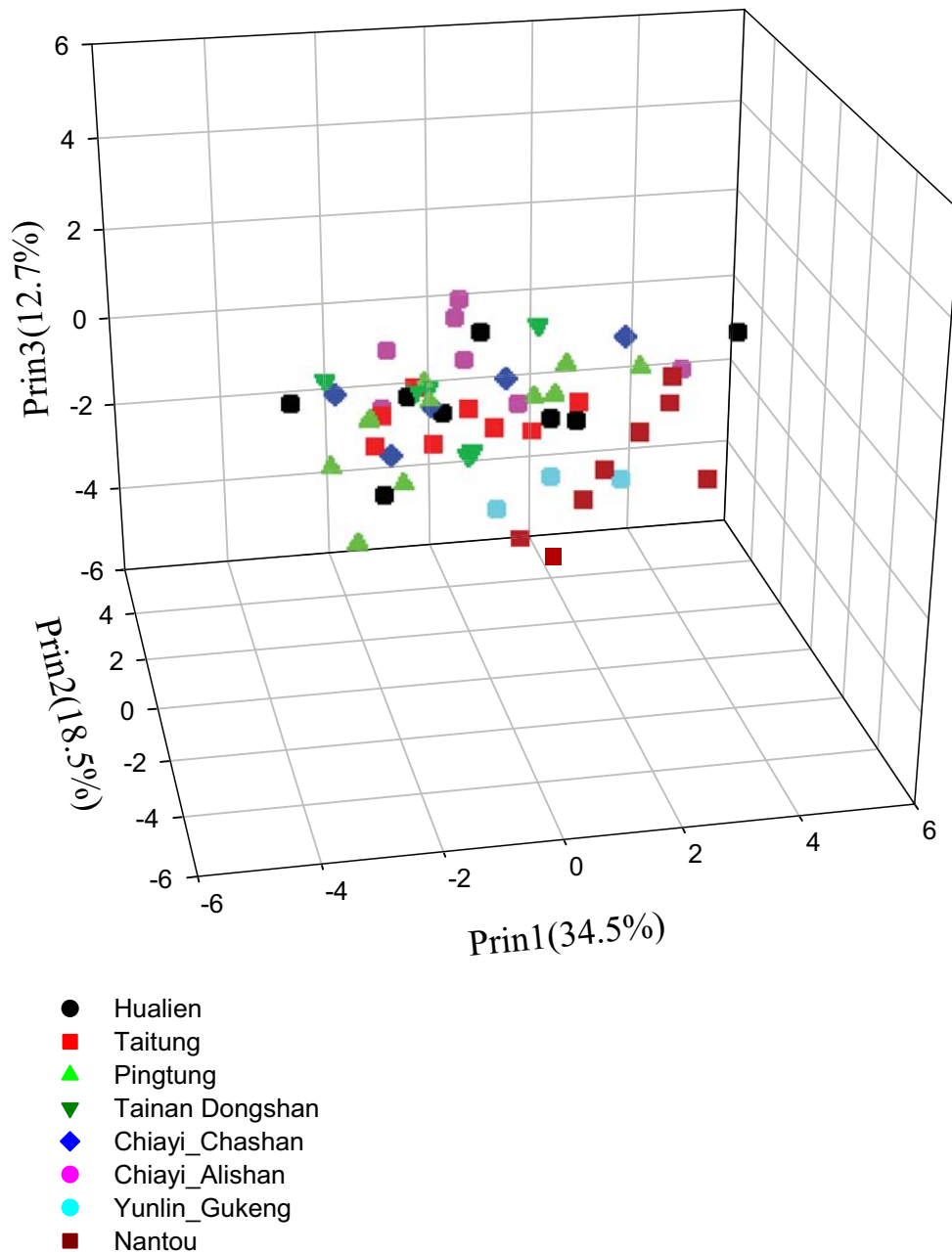


圖 7、56 個台灣咖啡種源以採集區域分群標示於 10 個外觀性狀之主成份分析圖。將採集樣品包含種子性狀的 56 個樣品，依採集區域為台灣的八個地區，利用 10 個外觀性狀進行分析後，取前三個主成份繪製的圖形。

Fig. 7. Plot of the first three principal components from the covariance matrix including 10 leaf and seed traits for the 56 Taiwan *C. arabica* germplasm. Plot of the first three principal components of accessions grouped by site. Fifty-six accessions with leaf and seed traits were grouped by site.

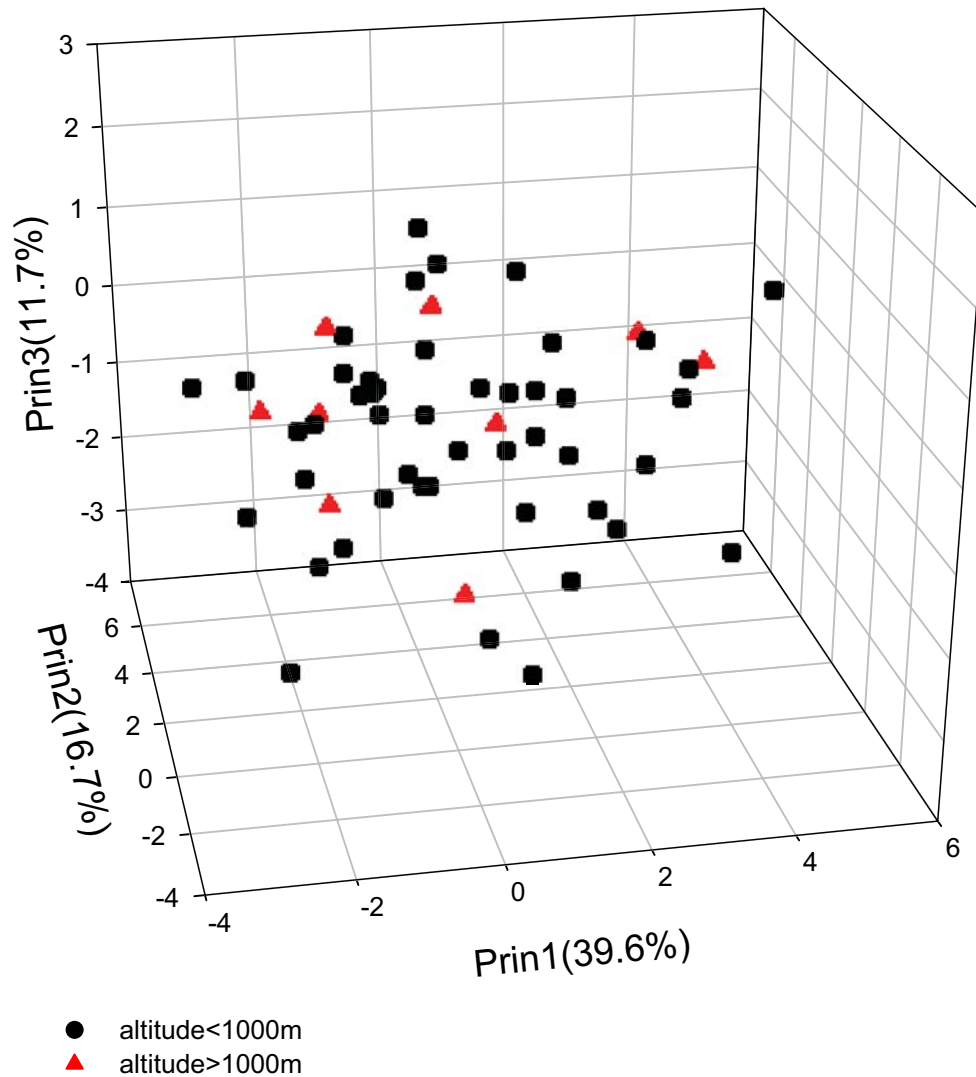


圖 8、56 個台灣咖啡種源以海拔高度分群標示於 10 個外觀性狀之主成份分析圖。將採集樣品包含種子性狀的 56 個樣品，依海拔高度分為高海拔與低海拔，利用 10 個外觀性狀進行分析後，取前三個主成份繪製的圖形。

Fig. 8. Plot of the first three principal components differentiated from altitude and the covariance matrix of including 10 leaf and seed traits for the 56 Taiwan *C. arabica* germplasm.

Plot of the first three principal components of accessions grouped by altitude. Fifty-six accessions with leaf and seed traits were grouped by altitude

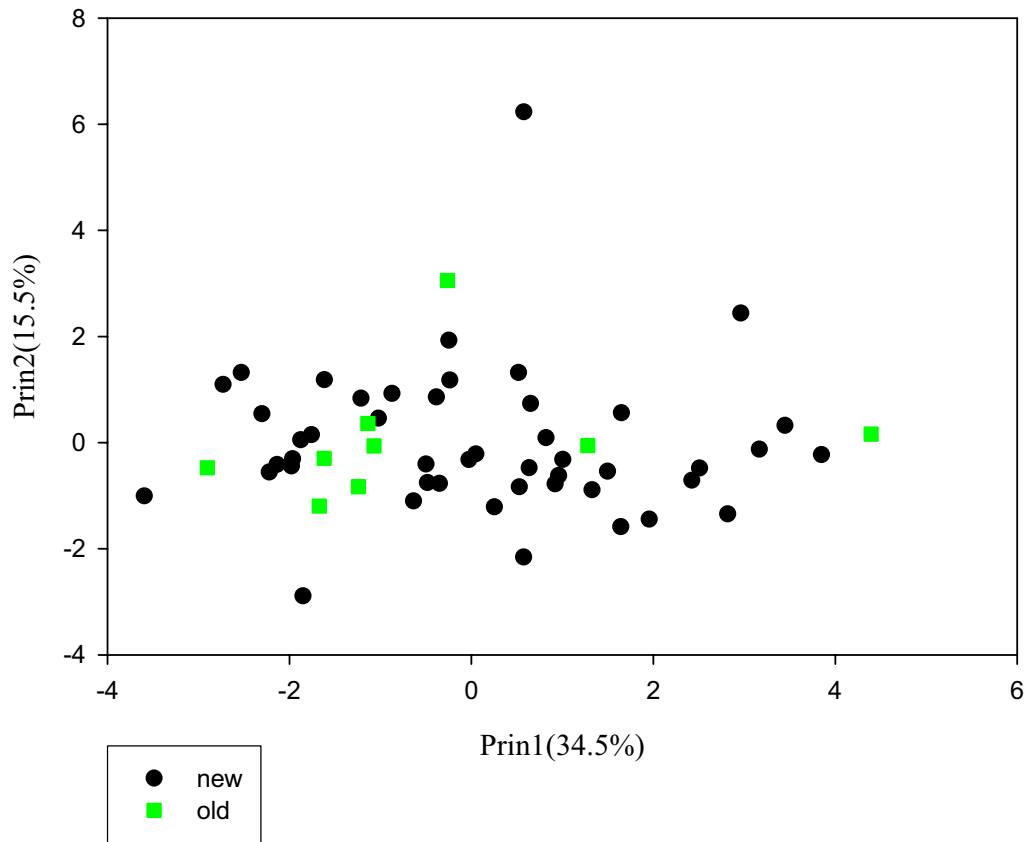


圖 9、56 個台灣咖啡種源以樹齡分群標示於 10 個外觀性狀之主成份分析圖  
將採集樣品包含種子性狀的 56 個樣品，依樹齡分為老樣與非老樣，利用 10 個外觀性狀進行分析後，取前兩個主成份繪製的圖形。

Fig. 9. Plot of the first two principal components differentiated from origin and the covariance matrix of including 10 leaf and seed traits for the 56 Taiwan *C. arabica* germplasm.

Plot of the first two principal components of accessions grouped by age. Fifty-six accessions with leaf and seed traits were grouped by age.

## 二、 利用 ISSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異

### 葉片萃取的 DNA 品質及濃度

採集葉片經酒精保存後，外觀因色素溶解呈褐色，利用分光光度計測量所抽取葉片 DNA 的結果，顯示 DNA 平均濃度為 1032 ( $\mu\text{g DNA/g}$  鮮葉)，DNA ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ) 純度為 1.9，落於最佳 OD 值 (1.8-2.0) 區間內，DNA ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ ) 品質為 1.93，稍低於最佳  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$  值 (2.0 以上)，推測可能為咖啡細胞內含有較高的次級代謝物所致，另由品質電泳圖判斷，所有 DNA 樣品皆出現單一明顯條帶，未模糊拖曳帶狀，顯示樣品 DNA 未發生裂解的情況。

### ISSR 標記多型性篩選

本實驗利用夏威夷農業研究中心提供的 7 個參試樣品中，選用其中兩個品種 Catimor、Typica 進行多型性因子的篩選，總共篩選了 100 個 ISSR 引子 (附表 4)，結果顯示 43 個引子有擴增產物 (43%)，57 個引子無擴增產物，其中有 12 個引子在物種間具有多型性 (12%)，對於這些有多型性的引子，再利用夏威夷農業研究中心提供的 7 個已知種源，進一步篩選出擴增條帶穩定、清楚且具多型性的 6 個引子，電泳圖如圖 10，編號依序為 807、809、812、816、817、840，其序列和最適黏合溫度如表 8。

表 8、ISSR 分析所使用可產生多型性條帶之 6 個引子序列.

Table 8. List of 6 ISSR primers producing polymorphic bands.

引子編號 primer code	鹼基對 重複數 repeat	引子序列 primer sequence (5'→3')	最適黏合溫度 annealing temperature (°C)	所增殖出清楚 條帶數 No. of Unambiguous bands	物種間多型性 條帶數 No. of polymorphic bands
807	2	(AG) <sub>8</sub> T	55	9	2
809	2	(AG) <sub>8</sub> G	55	7	3
812	2	(GA) <sub>8</sub> A	50	5	3
816	2	(CA) <sub>8</sub> T	55	5	3
817	2	(CA) <sub>8</sub> A	55	5	2
840	2	(GA) <sub>8</sub> YT	55	3	3

Note : Y= (C,T)

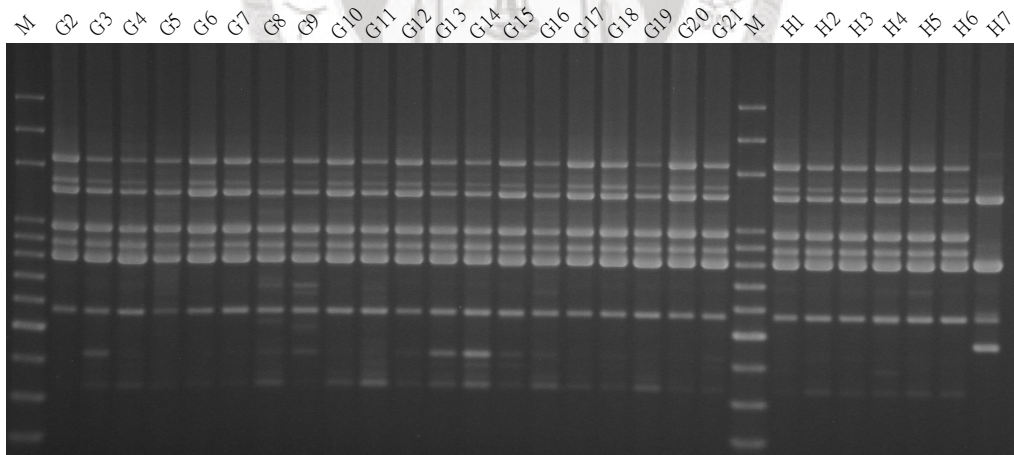


圖 10、引子 UBC812 在 20 個台灣咖啡種源和已知品種的 6 個 *C. arabica* 與 1 個 *C. canephora* 表現之 ISSR 電泳圖

Fig 10. DNA electrophoresis analysis of the ISSR primer UBC812.

## 1. ISSR 分子標誌分析已知品種參試樣品

本研究所使用的 6 個引子共擴增出 32 條明顯且穩定的條帶，其中有 16 個標誌在物種間具有多型性，但在已知品種的 6 個參試 *C. arabica* 樣品內並無穩定多型性條帶 (0%)，顯示篩選所得的 6 個 ISSR 引子無法區分來自夏威夷農業研究中心提供的 6 個 *C. arabica* 品種。本結果與該中心利用 AFLP 分析相似材料所得結果類似，六個 *C. arabica* 商業栽培種：Typica、Bourbon、Catimor、Catuai、Caturra、Mokka 雜交種顯示出其品種間與品種內之高度遺傳相似性且無法偵測到品種專一性條帶 (Steiger *et al.*, 2002)。Aga 等人使用 UBC 公佈 100 條 ISSR 引子分析衣索比亞的野生族群所得之多型性條帶比例達到 25%(Aga *et al.*, 2005)，與本實驗所使用的栽培品種結果相比，顯示野生品種的歧異度大於栽培品種。與前人研究指出二倍體 *C. canephora* 種源族群歧異度較野生 *C. arabica* 族群歧異度與 *C. arabica* 栽培種高 (Aga *et al.*, 2005; Chaparro *et al.*, 2004; Moncada and McCouch, 2004) 相符。

## 2. ISSR 分子標誌分析台灣咖啡種源

6 個 ISSR 引子共擴增出 32 條明顯且穩定的條帶，其中有 16 個標誌在物種間具有多型性，平均每一個引子可獲得 2.6 個多型性條帶，且多型性比例為 50%，以此 16 條多型性條帶資料利用 Jaccard's coefficient of community(Jaccard, 1908) 計算，而得 260 個台灣咖啡種源兩兩之間的遺傳相似度，其遺傳相似性範圍最小值為 *C. canephora* 與 G122 之間的 0.19 到已知品種與台灣大部份種源之間的 1。

依據上述參試台灣種源兩兩間的相似度矩陣以 UPGMA 方法進行群聚分析，所得之樹狀圖 (圖 11)，若依據遺傳相似性 0.35 作為分群依據，可將清楚地將栽培種 *C. arabica* 與其他物種區分成兩群，第一群包含已知種源中之 *C. canephora* 與 8 個採集樣品來源台東天香 (採集樣品編號 25, 27，以下相同)、古坑劉易騰 (106)、古坑林亮宏 (122)、竹山林國隆 (135)、鹿谷許佑存 (138)、國姓林秀吉 (159)、國姓林秀吉 (161) 之種源，第二群為其他 *C. arabica* 種源。



在第一群中 ISSR 分群與外表型態分群結果相符，此 8 個種源顯著的與其他台灣採集種源區分開來，顯示其非為 *C. arabica*，對應其外表型態在葉長、葉寬、葉面積性狀上顯著大於其他種源，其結果顯示 ISSR 標誌能夠有效地區別咖啡屬之物種；若再依據遺傳相似性 0.85 作為分群依據，台東王進福由日據時期加工廠移來之種源 (37) 與其他種源分開；再依據遺傳相似性 0.95 作為分群依據，可將台灣種源區分成 4 群，第 1 群包含來源為台東詹明崇 (39)、嘉義許進榮 (82)、嘉義方農夫 (89)、嘉義葉春成 (91)、鹿谷許佑存 (137)，台東詹明崇 (39)、嘉義許進榮 (82)，此群中嘉義許進榮 (82) 種源對應其外表性狀，全株葉片偏紅褐色且嫩芽呈紅色與其他明顯不同，第 2 群為鹿谷許佑存於 20 年前農試所取得之種源 (136)，第 3 群為南投水里民和陳蒼輝 (123)，第 4 群則包含由夏威夷農業研究中心提供的已知種源中 *C. arabica* 之品種：Typica、Bourbon、Catimor、Red Catuai、Yellow Catuai、Caturra 和其他台灣採集種源。

### 3. ISSR 分子標誌之主成份分析

在主成份分析方面，各主成份貢獻的比例與累積貢獻的比例如表 9，前中前三個主成份的貢獻量依序為 52.7%、7.5%、及 6.9%，前三個主成份共貢獻 67.1% 之變異，說明第一個主成份即可解釋超過 50.0% 的變異，以前三個主成份結果繪至主成份分析圖 (圖 12)。在第一主成份中，主要將參試種源分成兩群，第一群為非 *C. arabica* 物種，包含 8 個外表型態差異較大的台灣樣品和 *C. canephora*，第二群則屬於 *C. arabica* 物種，包含台灣大部分的採集樣品和 *C. arabica* 已知品種；而在第二、三主成份中，主要可將非 *C. arabica* 物種再細分成 3 群，分別為古坑林亮宏 (122)、台東天香 (25)、國姓林秀吉 (161)，與鹿谷許佑存 (138)、竹山林國隆 (135)、古坑劉易騰 (106) 及國姓林秀吉 (159)、台東天香 (27) 和 *C. canephora*，將 *C. arabica* 物種再細分為 4 群，分群結果與利用群聚分析所得之親源關係樹狀圖結果相似，無法將大部分台灣咖啡種源區分開來，此結果與 Tran(Tran, 2005) 利用 32 個文獻中篩選野生咖啡之 ISSR 引子分析 95 個樣品包含 7 個商業栽培種的結論相

同，由此顯示本研究所使用的 ISSR 分子標誌所產生的多型性條帶不足以區分所收集的 *C. arabica* 的栽培種，需要開發具有更多多型性的分子標誌系統。

表 9、260 個參試種源依 32 個 ISSR 分子標記所建立的前 12 個主成份之特徵根及貢獻比例

Tabel 9. Eigenvalues and proportions of the first 12 principal components among 260 coffee germplasms.

主成份 Component	特徵根 Eigenvalue	貢獻比例 Percent (%)	累積貢獻比例 Cumulative (%)
1	6.833414	52.727	52.727
2	0.978922	7.5534	60.2805
3	0.904469	6.9789	67.2594
4	0.724636	5.5913	72.8507
5	0.643848	4.968	77.8187
6	0.567166	4.3763	82.195
7	0.437628	3.3768	85.5718
8	0.425105	3.2801	88.8519
9	0.391922	3.0241	91.876
10	0.388168	2.9951	94.8711
11	0.347214	2.6791	97.5502
12	0.317487	2.4498	100%

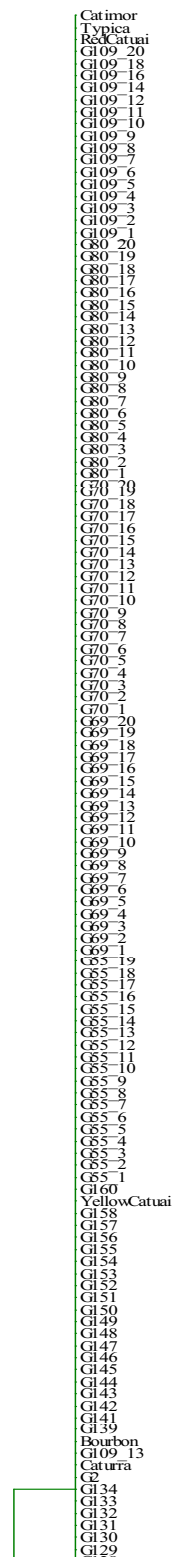


圖 11、260 個參試咖啡樣品依 32 個 ISSR 分子標記分析結果，經 Jaccard 遺傳距離  
 運算及 UPGMA 分群分析後所得之遺傳相似度樹狀圖。

Fig 11.The UPGMA dendrogram of genetic similarity based on 32 ISSR markers for  
 260 coffee germplasms in Taiwan.

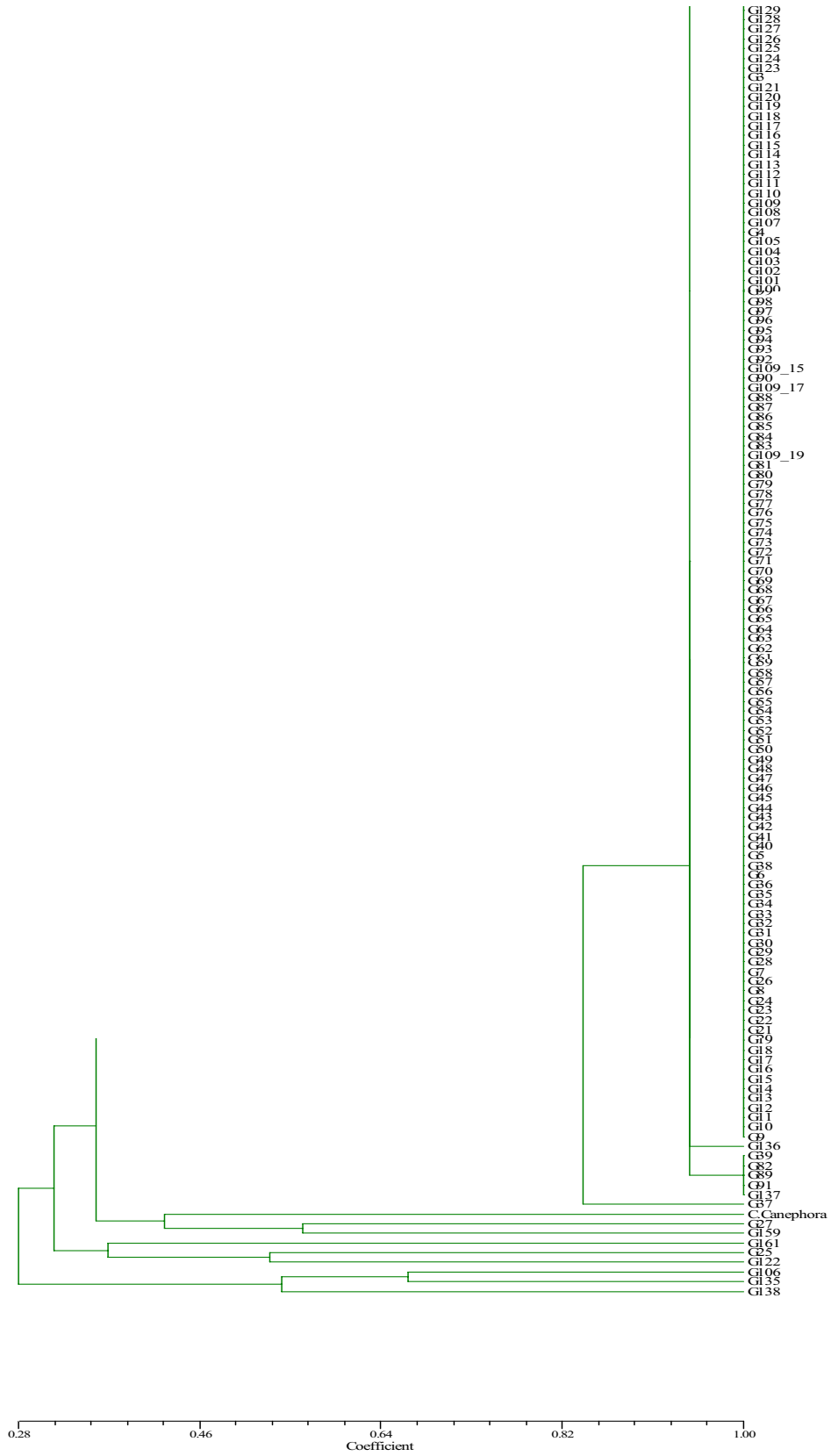


圖 11、(接續上頁)  
Fig 11. (continued)

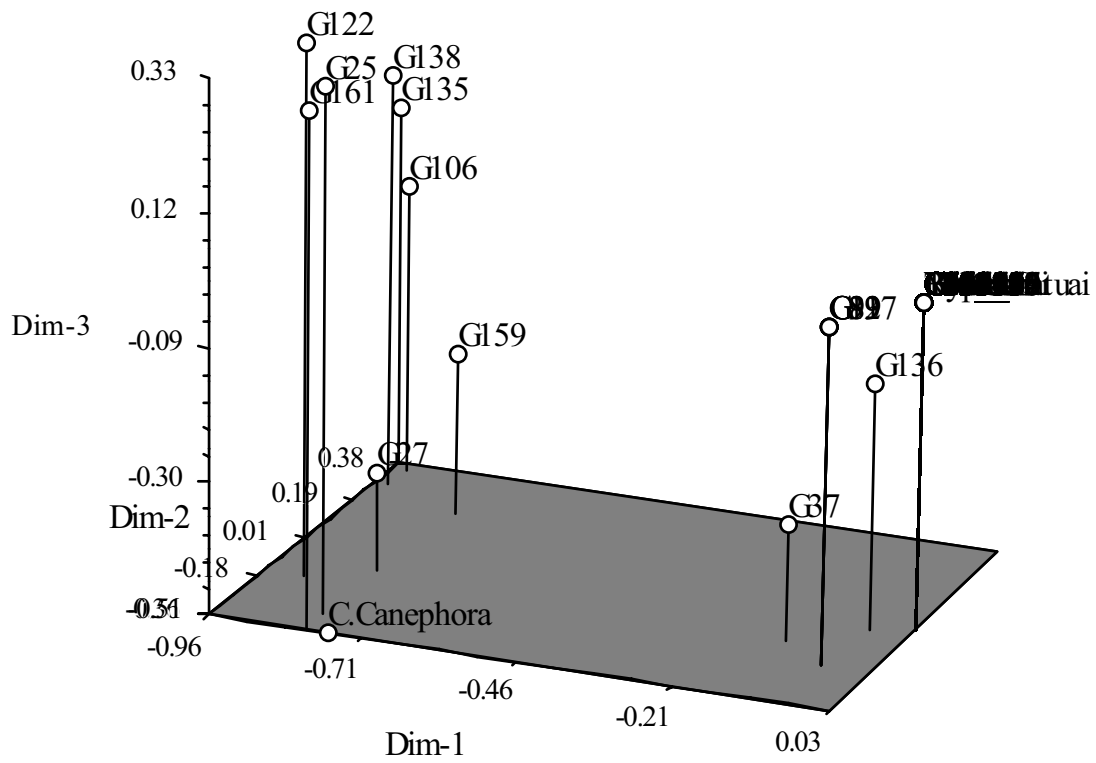


圖 12、260 個參試種源依 32 個 ISSR 分子標記估算遺傳相似度進行 PCoA 分析之前三個主成份關係圖

Fig 12. Plot of the first three principal components from the covariance matrix of 32 marker frequencies for 260 coffee germplasms.

### 三、 利用 SSR 分子標誌分析咖啡種源之遺傳變異

#### 黏合溫度測試結果

本試驗使用 7 個夏威夷農業研究中心提供的已知種源篩選了 53 對 SSR 引子，首先，根據各引子對 PCR 反應溫度進行測試，黏合溫度的選擇，使得其 PCR 反應後產物條帶呈現出清楚、專一性高的溫度條件，其中有 30 對 SSR 引子所增殖之 DNA 片段在 *C. arabica* 與 *C. canephora* 間有多型性，其測試的黏合溫度如表 10。

#### 1. 以 SSR 分子標誌判別非為 *C. arabica* 結果

欲判別台灣採集材料中非為 *C. arabica* 之種源，取 7 個已知種源、台灣採集材料中外表型態調查結果差異較大的 9 個種源，包含花蓮黏阿瑞 (19)、台東天香 (25.27)、古坑劉易騰 (106)、古坑林亮宏 (122)、竹山林國隆 (135)、鹿谷許佑存 (138)、國姓林秀吉 (159)、國姓林秀吉 (161)，和逢機選取的 80 個台灣採集種源，從 30 對多型性引子中取 7 對 SSR 引子進行增殖，並將結果以高解析度的聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 (圖 13) (附圖 1-6)。



表 10、30 組在品種間具多型性之 SSR 分子標誌

Tabel 10. List of the 30 SSR primers producing polymorphic bands.

Locus name	Repeat type	溫度	Size range
CM2	(AC) <sub>10</sub> (AT) <sub>9</sub>	60	200
CM5	(CCT) <sub>7</sub>	62	180
CM16	(GA) <sub>14</sub>	60	120
CFG75	(AG) <sub>16</sub>	60	130
CFG92	(AG) <sub>5</sub> N <sub>8</sub> (AG) <sub>5</sub>	60	300
CFG100	(AG) <sub>15</sub>	50	250
CFG202	(AG) <sub>11</sub>	60	400
CFG249	(AG) <sub>13</sub>	60	300
CFG281	(AG) <sub>12</sub>	65	400
CFG465	(AG) <sub>18</sub>	60	230
CFG502	(AG) <sub>27</sub>	65	250
CMA0004	(CA) <sub>7</sub>	60	180
CMA0007	(CT) <sub>12</sub> (CA) <sub>11</sub> (CA) <sub>7</sub>	60	200
CMA0011	(CA) <sub>12</sub>	60	150
CMA0018	(CA) <sub>14</sub>	65	180
CMA0020	(CA) <sub>8</sub>	65	100-250
CofEST-SSR01	(TC) <sub>13</sub>	50	150
CofEST-SSR02	(AAG) <sub>4</sub> N(GAA) <sub>6</sub>	55	150
CofEST-SSR04	(AC) <sub>10</sub>	50	160
CofEST-SSR06	(AAAGG) <sub>4</sub>	50	150
CofEST-SSR07	(GGT) <sub>6</sub>	50	200
CofEST-SSR10	(CT) <sub>10</sub>	50	200
CofEST-SSR11	(CA) <sub>5</sub> (TA) <sub>4</sub>	50	130
CofEST-SSR13	(CT) <sub>12</sub>	55	130
DCM02	(GAG) <sub>6</sub>	50	160
DCM03	(ACG) <sub>4n</sub> (ATG) <sub>6</sub>	50	250
DCM04	(ATA) <sub>6</sub>	50	140-260
DCM05	(CGG) <sub>6</sub>	62	180
DCM06	(T) <sub>10</sub> (TTC) <sub>5</sub>	50	220
DCM07	(TC) <sub>8</sub>	50	150

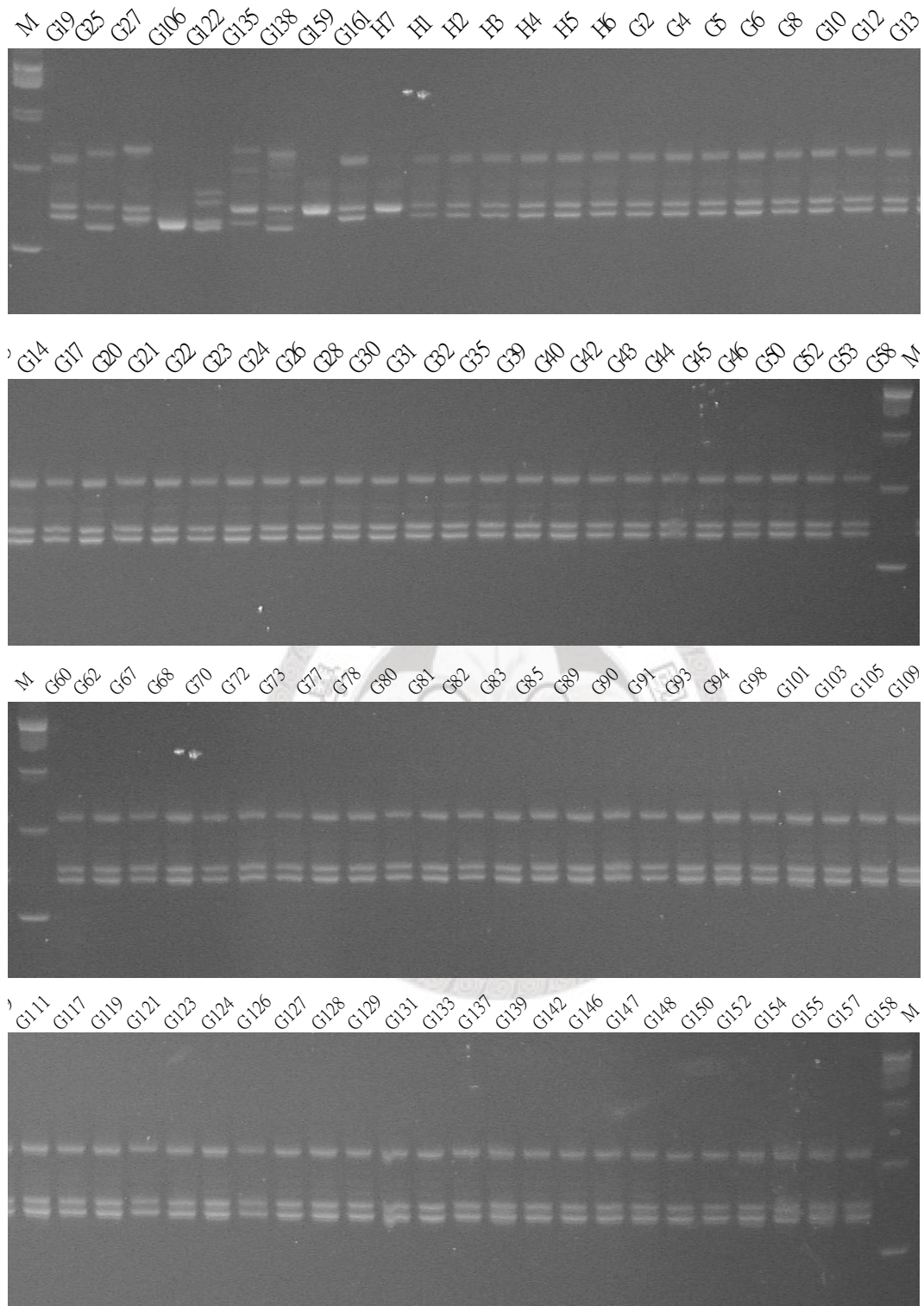


圖 13、9 個外表性狀差異較大之非 *C. arabica* 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品以 DCM05 引子所增值之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現結果

Fig 13. DNA polyacrylamide gel analysis of DCM05.

結果顯示外表型態分析判別非為 *C. arabica* 的 9 個台灣採集樣品，除了花蓮黏阿瑞 (19)，其餘八個樣品；台東天香 (25.27) 古坑劉易騰 (106) 古坑林亮宏 (122) 竹山林國隆 (135) 鹿谷許佑存 (138) 國姓林秀吉 (159) 國姓林秀吉 (161) 跟已知 *C. arabica* 品種和逢機選取的 80 個台灣種源，在 7 個 SSR 所增殖 DNA 片段表現不完全相同，證實此 8 個樣品非為 *C. arabica*，其中花蓮黏阿瑞 (19) 跟已知 *C. arabica* 品種和逢機取 80 個台灣種源，在 7 個 SSR 所增殖 DNA 片段表現完全相同，顯示此種源與採集台灣種源皆為 *C. arabica* 物種。

53 個 SSR 引子中，30 個 SSR 引子所增值之 DNA 片段在 *C. arabica*、*C. canephora* 物種間具有多型性，但只有 2 個 SSR 引子，CM16 與 CAM0011，在 *C. arabica* 品種間具有多型性。將 6 個夏威夷農業研究中心提供的已知 *C. arabica* 品種和 152 個台灣種源以 CM16 與 CAM0011 進行增殖，並將結果以高解度的聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現 (附圖 7、附圖 8)。

CM16 所增殖 DNA 片段 (附圖 7)，可將已知 *C. arabica* 品種區分為兩群：第一群為 *Typica* 衍生品種包含 *Typica*、*Red Catuai*，第二群為 *Bourbon* 衍生品種包含 *Bourbon*、*Catimor*、*Yellow Catuai*、*Caturra*，符合 *Typica*、*Bourbon* 為 *C. arabica* 內的兩個主要品種(Anthony *et al.*, 2002)。

CAM0011 所增殖 DNA 片段 (附圖 8)，可將已知 *C. arabica* 品種區分為兩群：第一群為 *Caturra*，第二群則包含非為 *Caturra* 的其他品種，但由於此 2 個 SSR 引子所增殖的多型性片段差異極小，進一步使用解析度較佳的毛細管電泳系統，確認其大小及位置

## 2. 毛細管電泳分析結果

利用 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer 毛細管電泳螢光偵測系統進行毛細管電泳，並由儀器上所收集產物的螢光訊號以 GeneScan 3.7 進行分析 SSR 訊號，以條帶位置和強度作為 PCR 產物分析結果。CM16 與 CAM0011 等 2 組引子對在 *C. arabica* 品種間具有多型性，各分別以 2 種對偶基因的形式呈現 (圖 14、圖 15)，其位置分別為 134bp (A<sub>16</sub>)、138bp (B<sub>16</sub>) 與 134bp (A<sub>11</sub>)、136bp (B<sub>11</sub>)，分別以 A<sub>16</sub>、B<sub>16</sub> 及 H<sub>16</sub> 表示在 CM16 基因座上的對偶基因形式為 2 種同質結合型及異質結合型；而以 A<sub>11</sub>、B<sub>11</sub> 及 H<sub>11</sub> 表示在 CAM0011 基因座上的對偶基因形式為 2 種同質結合型及異質結合型，並使用 Auto Bin 功能判別異質結合型，軟體會挑分析後有通過門檻值且品質較佳的樣品作為參考樣品，依據參考樣品的表現及重複形式，選出參考對偶基因，標訂出各個 bin 的範圍，並依據其對偶基因的相對表現量來判別為雜訊干擾或異質結合型。

本研究所使用的兩個 SSR 引子對的 PIC 值分別在 CM16 為 0.34，CAM0011 為 0.12，與文獻以 CM16 引子篩選 45 個 *C. arabica* 選系的數值 0.42 相比 (Baruah *et al.*, 2003)，此次實驗結果較低，將 152 個台灣採集材料以此 2 引子增殖之多型性結果呈現 (表 11)。且此次實驗篩選 53 個 SSR 引子中只有 2 個引子在品種間具有多型性，相較於其他研究，其多型性比例較低，與前人研究中所分析的 *C. arabica* 材料包含野生種有關，同時顯示 *C. arabica* 栽培種由於其自交繁殖特性、傳播歷史、及人為選種馴化而表現極低的歧異度 (Martellosi *et al.*, 2002; Moncada and McCouch, 2004; Steiger *et al.*, 2002)。

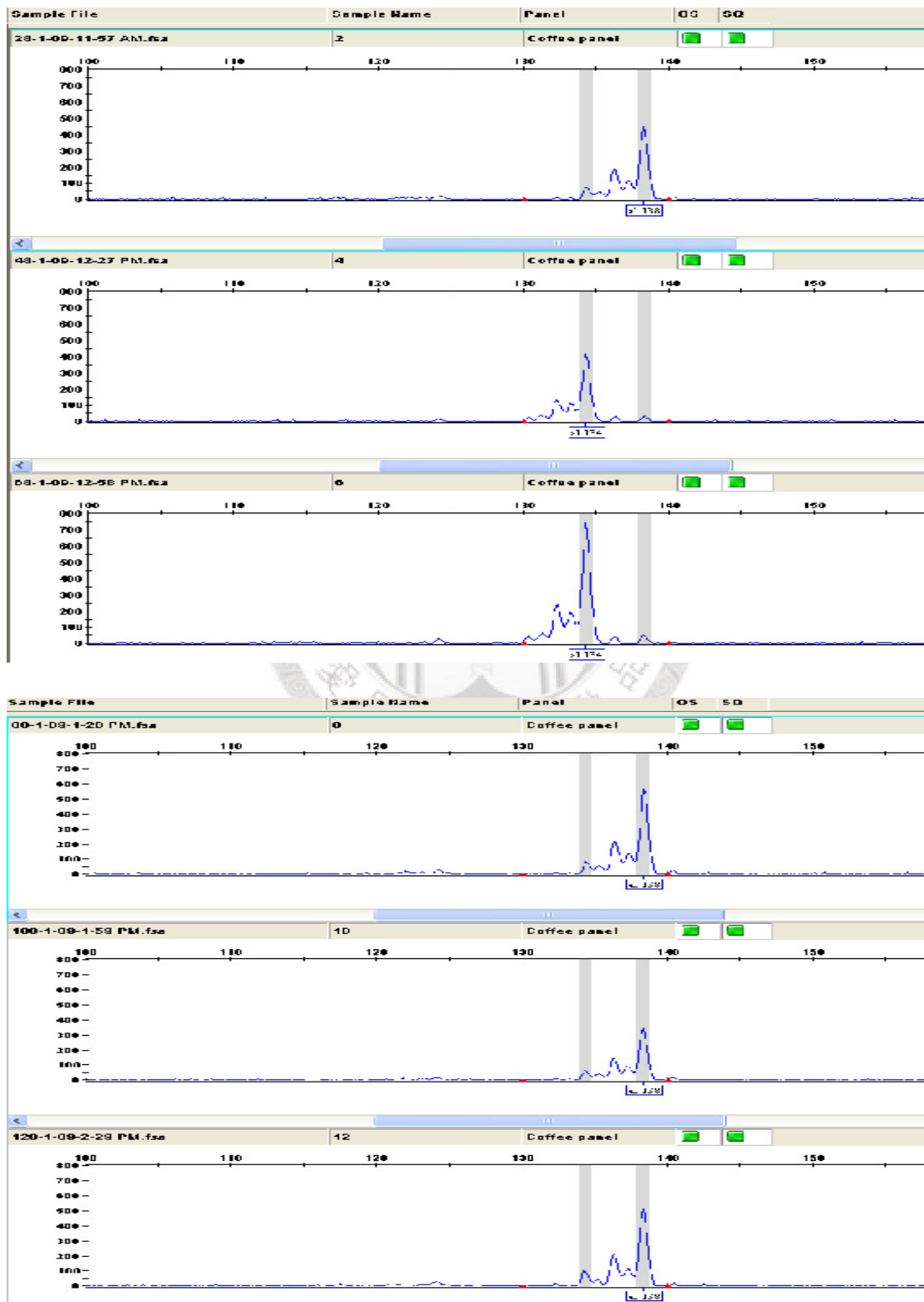


圖 14、已知 *C. arabica* 品種以 CM16 所增殖 DNA 多型性片段形式，

有兩種多型性，分別為 134bp (A16)、138bp (B16)

Fig 14. DNA capillary electrophoresis analysis of CM16.

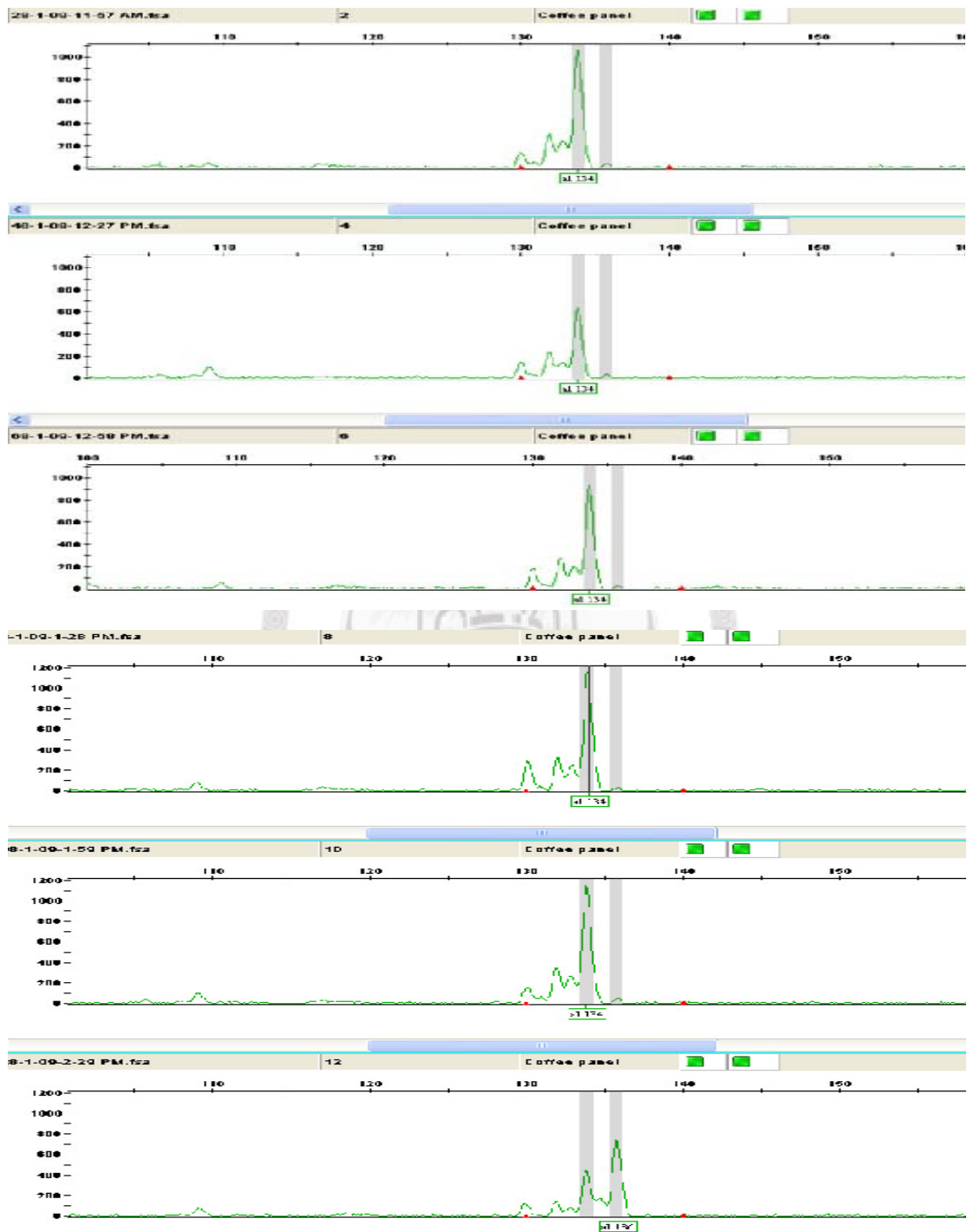


圖 15、已知 *C. arabica* 品種以 CAM0011 所增殖 DNA 多型性片段形式，有兩種多型性，分別為 134bp (A11)、136bp (B11)

Fig 15. DNA capillary electrophoresis analysis of CAM0011.



表 11、152 個台灣種源使用 CAM0011 及 CM16 增殖 DNA 多型性片段 (待續)

Table 11. The 152 *C. arabica* genotypes in Taiwan evaluated by 4 SSR markers.

material	CAM0011	CM16	material	CAM0011	CM16
Catimor	A11	B16	G32	A11	A16
Typica	A11	A16	G33	A11	A16
RedCatuai	A11	A16	G34	A11	A16
YellowCatuai	A11	B16	G35	A11	A16
Bourbon	A11	B16	G36	A11	B16
Caturra	B11	B16	G37	A11	H16
G2	B11	B16	G38	A11	A16
G3	A11	A16	G39	A11	A16
G4	A11	A16	G40	A11	A16
G5	A11	A16	G41	A11	A16
G6	A11	A16	G42	A11	B16
G7	A11	A16	G43	A11	A16
G8	A11	H16	G44	A11	A16
G9	B11	B16	G45	A11	A16
G10	A11	A16	G46	A11	A16
G11	A11	B16	G47	A11	A16
G12	A11	A16	G48	A11	A16
G13	A11	A16	G49	A11	A16
G14	A11	B16	G50	A11	A16
G15	A11	H16	G51	A11	A16
G16	A11	A16	G52	A11	A16
G17	A11	A16	G53	A11	A16
G18	A11	A16	G54	A11	A16
G19	A11	B16	G55	A11	A16
G20	H11	B16	G56	A11	A16
G21	A11	A16	G57	A11	A16
G22	A11	A16	G58	A11	A16
G23	A11	A16	G59	A11	A16
G24	A11	A16	G60	A11	A16
G26	A11	A16	G61	H11	B16
G28	A11	A16	G62	A11	A16
G29	A11	A16	G63	A11	A16
G30	A11	A16	G64	A11	A16
G31	A11	A16	G65	A11	A16

表 11、(續)

Table 11. (continued)

material	CAM0011	CM16	material	CAM0011	CM16
G66	A11	A16	G100	A11	A16
G67	A11	A16	G101	A11	A16
G68	A11	A16	G102	A11	A16
G69	A11	A16	G103	A11	A16
G70	A11	A16	G104	A11	A16
G71	A11	A16	G105	A11	A16
G72	A11	A16	G107	A11	A16
G73	A11	A16	G108	A11	A16
G74	B11	B16	G109	A11	A16
G75	A11	A16	G110	A11	A16
G76	A11	A16	G111	A11	A16
G77	A11	A16	G112	A11	A16
G78	A11	A16	G113	A11	B16
G79	A11	A16	G114	A11	H16
G80	A11	A16	G115	A11	H16
G81	A11	A16	G116	B11	A16
G82	A11	A16	G117	A11	B16
G83	A11	A16	G118	A11	B16
G84	A11	A16	G119	A11	B16
G85	A11	A16	G120	A11	A16
G86	A11	A16	G121	A11	A16
G87	A11	A16	G123	A11	A16
G88	A11	B16	G124	B11	H16
G89	A11	A16	G125	A11	A16
G90	A11	B16	G126	A11	A16
G91	A11	B16	G127	B11	A16
G92	A11	B16	G128	A11	A16
G93	A11	A16	G129	A11	H16
G94	A11	A16	G130	A11	A16
G95	A11	A16	G131	A11	A16
G96	A11	A16	G132	A11	A16
G97	A11	B16	G133	A11	A16
G98	A11	B16	G134	A11	A16
G99	A11	B16	G136	A11	H16

表 11、(續)

Table 11. (continued)

material	CAM0011	CM16
G137	A11	A16
G139	A11	A16
G140	A11	A16
G141	B11	H16
G142	B11	B16
G143	A11	A16
G144	A11	A16
G145	A11	A16
G146	A11	A16
G147	A11	B16
G148	A11	A16
G149	A11	B16
G150	A11	A16
G151	A11	B16
G152	A11	H16
G153	A11	A16
G154	A11	A16
G155	A11	A16
G156	A11	A16
G157	A11	A16
G158	A11	A16
G160	A11	H16



### 3. SSR 分子標誌分析參試已知品種參試樣品

根據 Dice coefficient 計算兩樣品間的遺傳相似性，再以 UPGMA 法進行分群 (圖 16)，結果顯示根據此 4 個 SSR 標誌能將 6 個 *C. arabica* 參試品種區分成 Typica、Red Catuai 與 Bourbon 衍生品種包含 Bourbon、Catimor、Yellow Catuai 之兩群，與先前研究結果相符(Anthony *et al.*, 2002; Moncada and McCouch, 2004; Orozco-Castillo *et al.*, 1994)，且可將 Caturra 與其他品種區分開來。

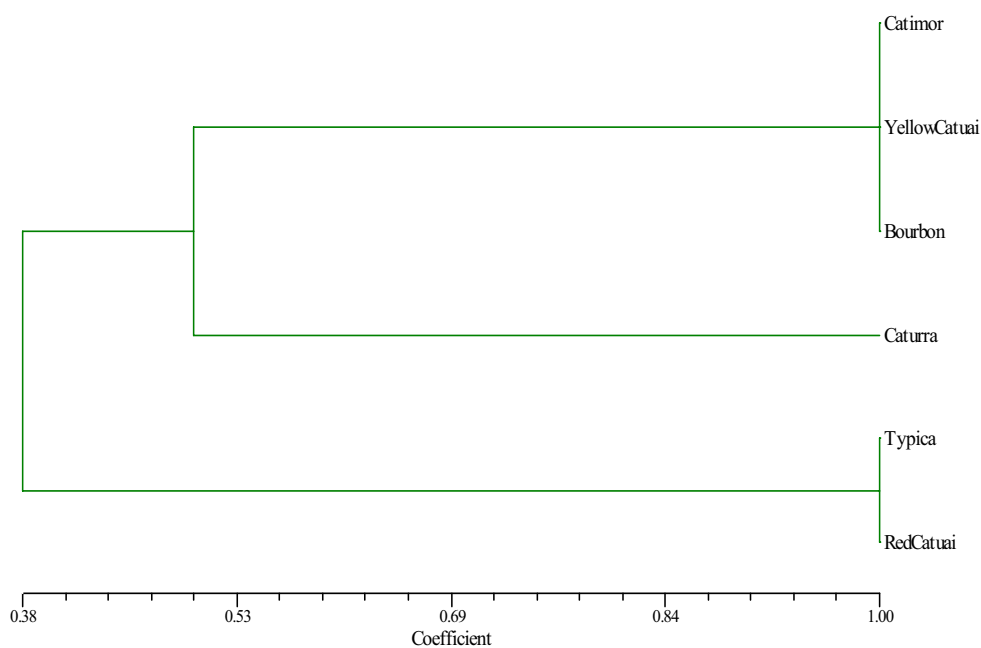


圖 16、6 個 *C. arabica* 參試品種依 4 個 SSR 標誌分析結果經 Dice coefficient 轉換成遺傳相似性及 UPGMA 分群所得之樹狀圖

Fig 16. The UPGMA dendrogram of genetic similarity based on 4 SSR markers for HARC coffee germplasm.

#### 4. 推估台灣咖啡種源可能之衍生系

依據參試種源間的相似度矩陣以 UPGMA 方法進行群聚分析，所得之樹狀圖 (圖 17)。可將台灣採集的材料大致分為 4 大群，7 小群 (表 12)，第一群為 Bourbon 衍生品種包含 Bourbon、Catimor、Yellow Catuai 且包含 28 個台灣種源，第二群為 Typica、Red Catuai 且包含 113 個台灣種源，第三群為 Caturra 和 4 個台灣種源，第四群則為台灣種源編號 116、127 和 124、141 與 6 個已知 *C. arabica* 品種分在不同群，其中第一群中可分為兩小群，I-1 為 Bourbon、Catimor、Yellow Catuai 與 16 個台灣種源，I-2 為 8 個台灣種源，此群中的台灣種源與 Bourbon 衍生品種表現出較高的遺傳相似性；而第二群為 Typica、Red Catuai 與 156 個台灣種源，此群包含大部分的台灣種源，顯示台灣現有咖啡莊園栽培的 *C. arabica* 品種與 Typica 遺傳相似性較高；第三群可分為兩小群，III-1 為 Caturra 與 4 個台灣種源，III-2 為 2 個台灣種源。第四群可分為兩小群，IV-1 為 2 個台灣種源，編號雲林劉慶松 (116) 與南投李玉煌 (127)，IV-2 為 2 個台灣種源，編號為南投陳佳瑩 (124) 與南投張順利 (141)。

#### 5. SSR 分子標誌分析結果與外表性狀之主成份分析的比較

將 SSR 分群結果標示於依 6 個外觀性狀進行主成份分析而得前兩個主成份所繪製 152 個台灣咖啡種源關係 2D 圖 (圖 17) 上，發現 Typica 與 Bourbon、Caturra 在以葉片性狀為主的第一與以植株性狀為主的第二主成份上有各自群聚的現象，Bourbon、Caturra 相較於 Typica 聚集於第一主成份右半邊正值部分 (以第一主成份的 0 為界)、第二主成份下半部負值部份 (以第二主成份的 0 為界)，依前人觀察指出 Bourbon 在外觀上較 Typica 表現出節間較短、主幹與一次分支夾角較小、及帶殼種子長寬比較小、較渾圓 (Rothfos,1985)

將其 Typica 與 Bourbon 群的外觀性狀進行均值比較 (t-test)，發現在葉長寬、葉長寬比、葉面積、主幹與一次分之夾角及種子厚度呈顯著差異，Typica 群葉長寬比顯著地大於 Bourbon 群且 Bourbon 群葉面積顯著大於 Typica 群，與 Bourbon

葉片較寬之結果一致且 Typica 群主幹與一次分支的夾角顯著地大於 Bourbon 群與 Typica 樹勢較水平、主幹與一次分支夾角較大結果一致，而此次外表調查性狀指出 Typica 在外觀上較 Bourbon 表現出葉長、葉寬、及葉面積較小、主幹與一次分支夾角較大、樹勢較水平。

#### 6. 誤判率之計算

多個分子標誌的誤判率因分子標誌間彼此獨立，其誤判率可利用各分子標誌的誤判率乘積表示(Kaundun and Matsumoto, 2003)，本次實驗共分析 158 個種源，以 CM16<sub>134</sub> 條帶為例，出現此條帶的種源數目為 128 個，未出現此條帶的種源數目為 29 個，已知 Typica 品種具有此條帶，則非 Typica 之種源，因擁有此條帶而判斷為 Typica 之誤判率為 118/158 (74.6%)，而 Bourbon 品種不具有此條帶，則將種源判斷成 Typica 之誤判率為 29/158 (18.4%)，從此次分析所使用 4 個 SSR 標誌之誤判率 (表 13) 可發現只有在鑑別 Bourbon 與 Caturra 時誤判率所得誤判率較低 (16.7%、1%)，若欲使誤判率降低，可增加分子標誌的數目或開發品種專一性的分子標誌，以獲得更精準可靠的品種鑑別結果。



表 12、4 個 SSR 分子標誌所得 158 個 *C. arabica* 種源群聚分群表

Table 12. The classification of 158 coffee gerplasms based on cluster analysis from 4 SSR markers.

大群	大群 類別	小群 代號	咖啡種源
I	Bourbon 群	I-1	Bourbon, Catimor, Yellow Catuai, 11, 14, 19, 36, 42, 88, 90, 91, 92, 97, 98, 99, 113, 117, 118, 119
		I-2	8, 15, 37, 114, 115, 136, 152, 160
II	Typica 群	II-1	Typica, RedCatuai, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 93, 94, 95, 96, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 120, 121, 123, 125, 126, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 137, 139, 140, 143, 144, 145, 146, 148, 150, 153, 154, 155, 156, 157, 158
III	Caturra 群	III-1	Caturra, 2, 9, 74, 142
		III-2	20, 61
IV	無對照品種	IV-1	116, 127
		IV-2	124, 141

表 13、CAM0011、CM16 產生 4 個標誌鑑別 6 個已知 *C. arabica* 品種之誤判率  
 Table 13. Identification of 158 coffee germplasms in Taiwan based on 4 SSR markers.

引子名稱	CAM0011		CM16		誤判率
	電泳結果	出現機率	電泳結果	出現機率	
Catimor	AA	147/158	BB	29/158	0.1674
Typica	AA	147/158	AA	118/158	0.6975
RedCatuai	AA	147/158	AA	118/158	0.6975
YellowCatuai	AA	147/158	BB	29/158	0.1674
Bourbon	AA	147/158	BB	29/158	0.1674
Caturra	BB	9/158	BB	29/158	0.0108



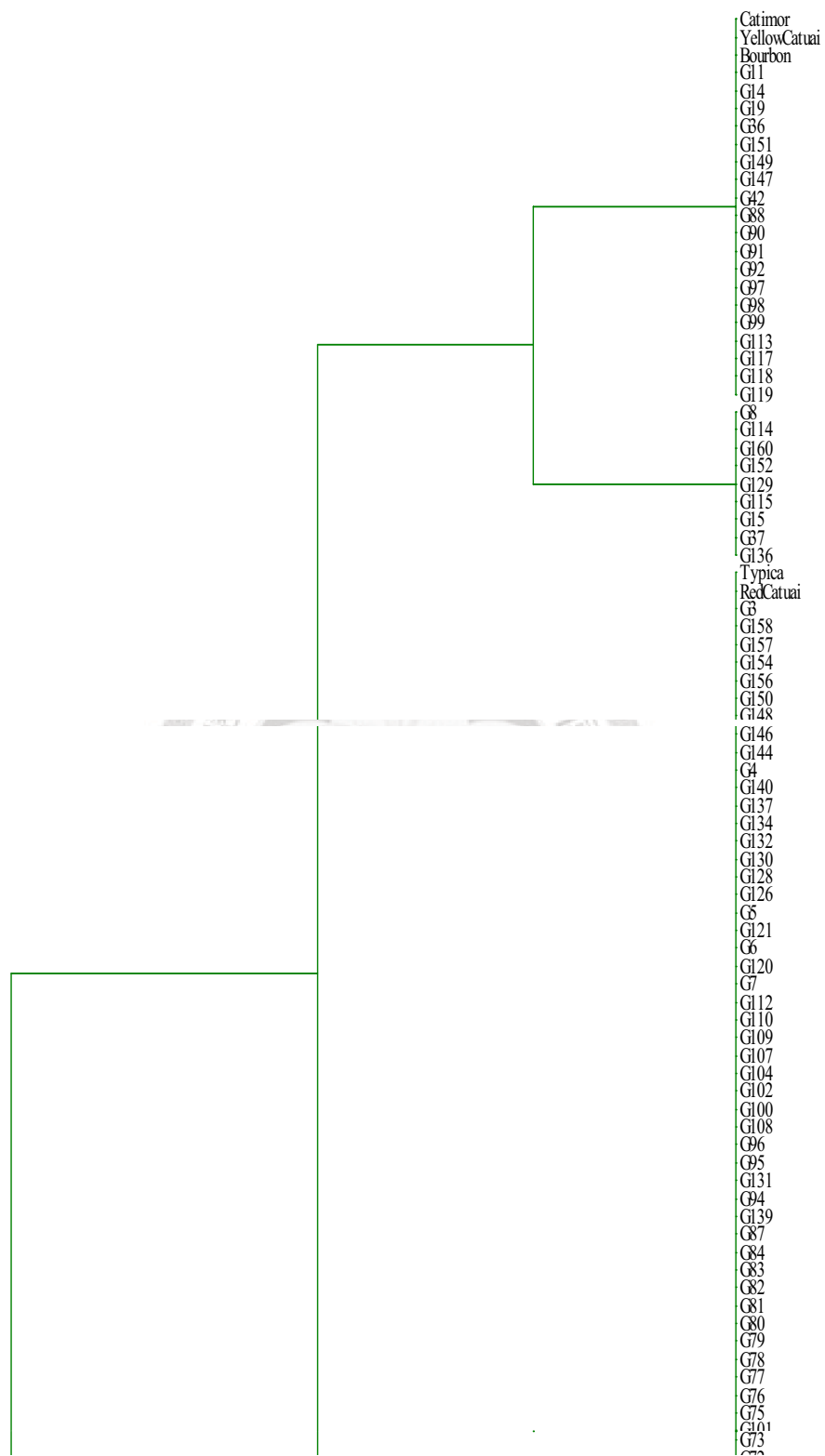


圖 17、158 個 *C. arabica* 參試品種依 4 個 SSR 標誌分析結果經 Dice coefficient 轉換成遺傳相似性及 UPGMA 分群分析後所得之樹狀圖

Fig 17. The UPGMA dendrogram of genetic similarity based on 4 SSR markers for 158 coffee germplasms in Taiwan.

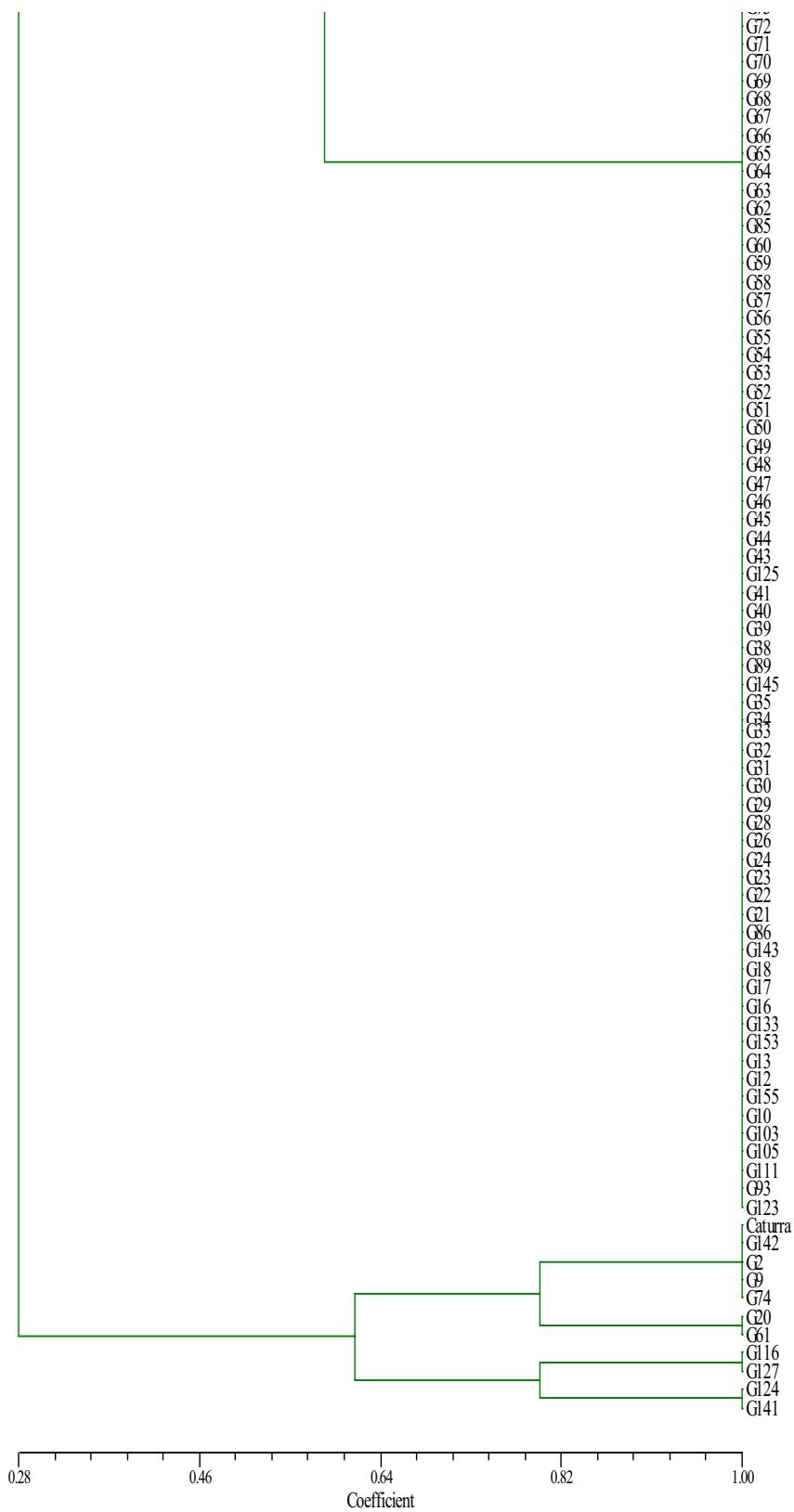


圖 17、(續上圖)  
Fig 17. (continued)

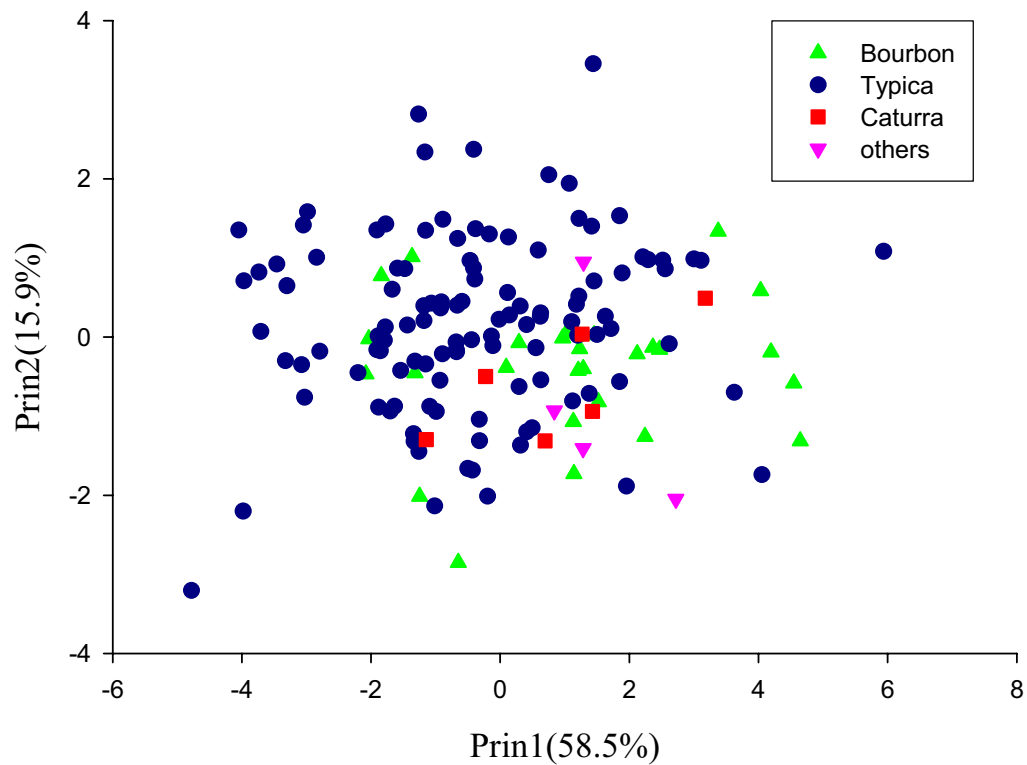


圖 18、152 個台灣咖啡種源以 SSR 分群結果標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖。將採集樣品包含葉片性狀的 152 個樣品，依 SSR 分群結果分為四群，利用 6 個外觀性狀進行分析後，取前兩個主成份繪製的圖形。

Fig. 18. Plot of the first two principal components from the covariance matrix of 6 leaf traits for the 152 Taiwan *C. arabica* germplasms, based on cluster analysis of 4 SSR markers.

Plot of the first two principal components of accessions grouped by 4 SSR markers. 152 accessions with leaf traits were grouped by 4 SSR markers.

## 第五章、討論

### 一、 ISSR 及 SSR 分子標誌之綜合比較

ISSR 分析使用 32 個在物種間具多型性標誌，但在已知 *C. arabica* 品種間並無增殖出穩定的多型性標誌，顯示所選用的 ISSR 片段只能區別咖啡屬內物種；SSR 分析則使用 4 個在品種間具多型性標誌，結果可區別 *C. arabica* 種內 Typica 與 Bourbon 衍生品種。比較 ISSR 及 SSR 遺傳相似度樹狀圖的結構，發現在 ISSR 樹狀圖中第一群判別非為 *C. arabica* 之台灣種源與 SSR 分析結果一致，但在 ISSR 樹狀圖中第二、三、四群判別為 *C. arabica* 種內與已知 *C. arabica* 品種遺傳相似度較低之台灣種源，跟 SSR 樹狀圖中第四群種源不相同，顯示以 ISSR 與 SSR 分子標誌分析本研究之台灣種源樣品，只能粗略地區別 *C. arabica* 品種，無法確切得知品種間的遺傳距離，進行遺傳歧異度之評估。期望能建立更精確的品種區別，則需要更多在品種兼具多型性之標誌或開發品種專一之標誌。

### 二、 ISSR、SSR 分子標誌在咖啡育種上的探討及應用

*C. arabica* 屬自交四倍體作物，其商業繁殖方式經由實生苗，而 *C. canephora* 為異交二倍體作物，則使用無性繁殖方式，包含扦插、嫁接、及組織培養(Clifford and Willson, 1985)，咖啡扦插雖較嫁接具備快速繁殖大量相同基因型，但嫁接可產生較具活力、產生根系較強健的子代 (Clarke and Macrae, 1987)，故 *C. arabica* 遺傳變異來源取決於其雜交親本之選擇，除了考慮其本身優良性狀或具備的特殊性狀之外，最重要還需考慮親本間的遺傳歧異度，植物種源所具有的遺傳歧異度是作物育種的原動力，因此成功的種源收集保存與育種計劃皆賴對物種歧異度的瞭解 (陳與范，1999)。

本次 ISSR 分析結果，將台灣種源中非為 *C. arabica* 區別出來，若能配合增加其外觀性狀如葉片厚度、葉脈觀察、花冠裂數、花絮數目、及果實大小，則可進一步用於區別 *C. liberica* 與 *C. canephora*。前人研究指出 *C. arabica* 商業栽培種遺傳背景窄化，林 (2008) 利用 RAPD 分析 2006 台灣咖啡節所收集 11 個台灣咖啡族



群，結果發現遺傳歧異度除了在南投縣與雲林縣表現略高外，其他族群內則表現偏低，且族群間分化程度不明顯，而此次實驗 SSR 分析結果也表現出偏低的遺傳歧異度，所篩選的 53 個 SSR 引子，只有 2 個 SSR 在 *C. arabica* 間具有多型性，且無法將 6 個已知栽培種完全區別，但根據其遺傳相似度可將台灣 *C. arabica* 咖啡種源分成 4 群，其中第 4 群的台灣咖啡種源未與本研究所使用的已知品種分在同群，即表示此種源在遺傳背景上與這些已知品種親緣較遠，但探究其原因，天然淘汰導致基因突變幾乎不可能，因為咖啡傳入台灣的歷史約莫一百多年、所歷經的世代數目太短，或經人為選拔馴化而導致與特定功能連鎖區域變異大，但整個遺傳背景相似，觀察台灣咖啡商業栽培仍在初期摸索階段，農民自行留種選拔不頻繁，所以推測可能為所使用的多型性標誌不夠多而導致取樣偏差；綜合而言，此次分析可根據種源間遺傳相似性作為選擇親本的考量，進一步分析植株若包含優良的外觀特性，可以充分利用其特性改良現有品種且導入其他物種，除了在遺傳背景上也可以增加其育種親本之豐富性。

### 三、SSR 分子標誌與外表性狀在咖啡育種上的探討及應用

選擇 SSR 分子標誌分析後遺傳背景較相似的種原，進一步探討海拔高度與外觀性狀分布的關係，分別將 SSR 分子標誌分群為 Typica 群、Bourbon 群之咖啡種源於 6 個外觀性狀之前三個主成份的繪製 3D 圖依海拔高度區別標示 (圖 19、圖 20)，結果顯示採集至高海拔之 Typica 群較低海拔密集，但分群關係並不明顯，此次採集高海拔種源數比低海拔少許多，需再增加取樣點才能進一步其群聚關係；而採集自高海拔之 Bourbon 群與低海拔種源有分群關係，高海拔 Bourbon 較低海拔種源在第二主成份上分佈偏右、偏正值部分，即在主幹與一次分之夾角、節間長度及葉長寬比有較大的趨勢，但分佈情況分散，需再增加取樣點才能進一步其釐清其趨勢。

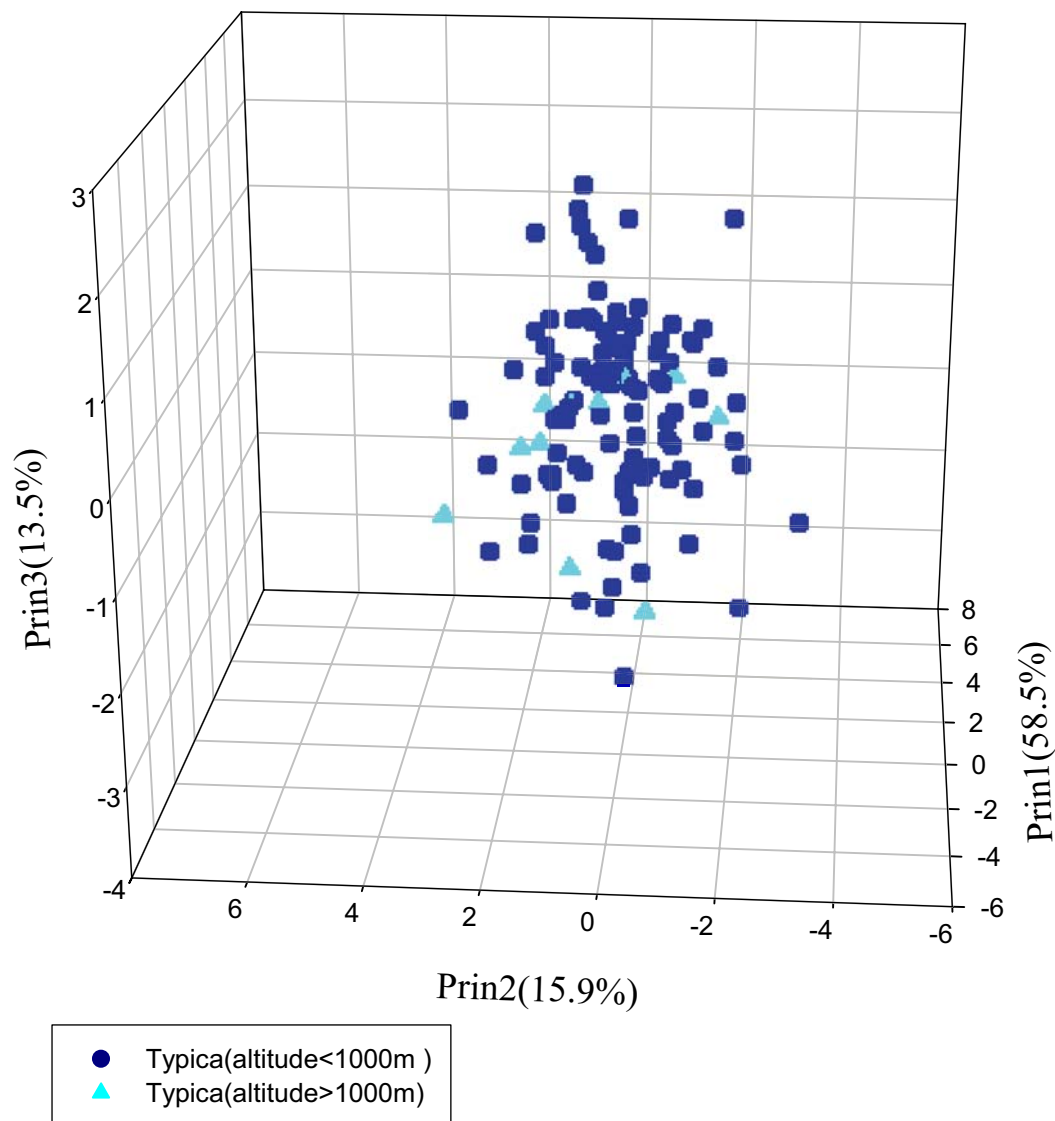


圖 19、114 個台灣咖啡種源以 SSR 分群結果為 Typica 品種標示於 6 個外觀性狀之主成份分析圖

將採集樣品包含葉片性狀的 114 個樣品，依 SSR 分群結果與 Typica 同群之種源，利用 6 個外觀性狀進行分析後，取前三個主成份繪製的圖形

Fig. 19. Plot of the first three principal components from the covariance matrix of 6 leaf traits for the 152 Taiwan *C. arabica* germplasms based on cluster analysis of 4 SSR markers.

Plot of the first three principal components of accessions grouped by 4 SSR markers. 152 accessions with leaf traits were grouped by 4 SSR markers.

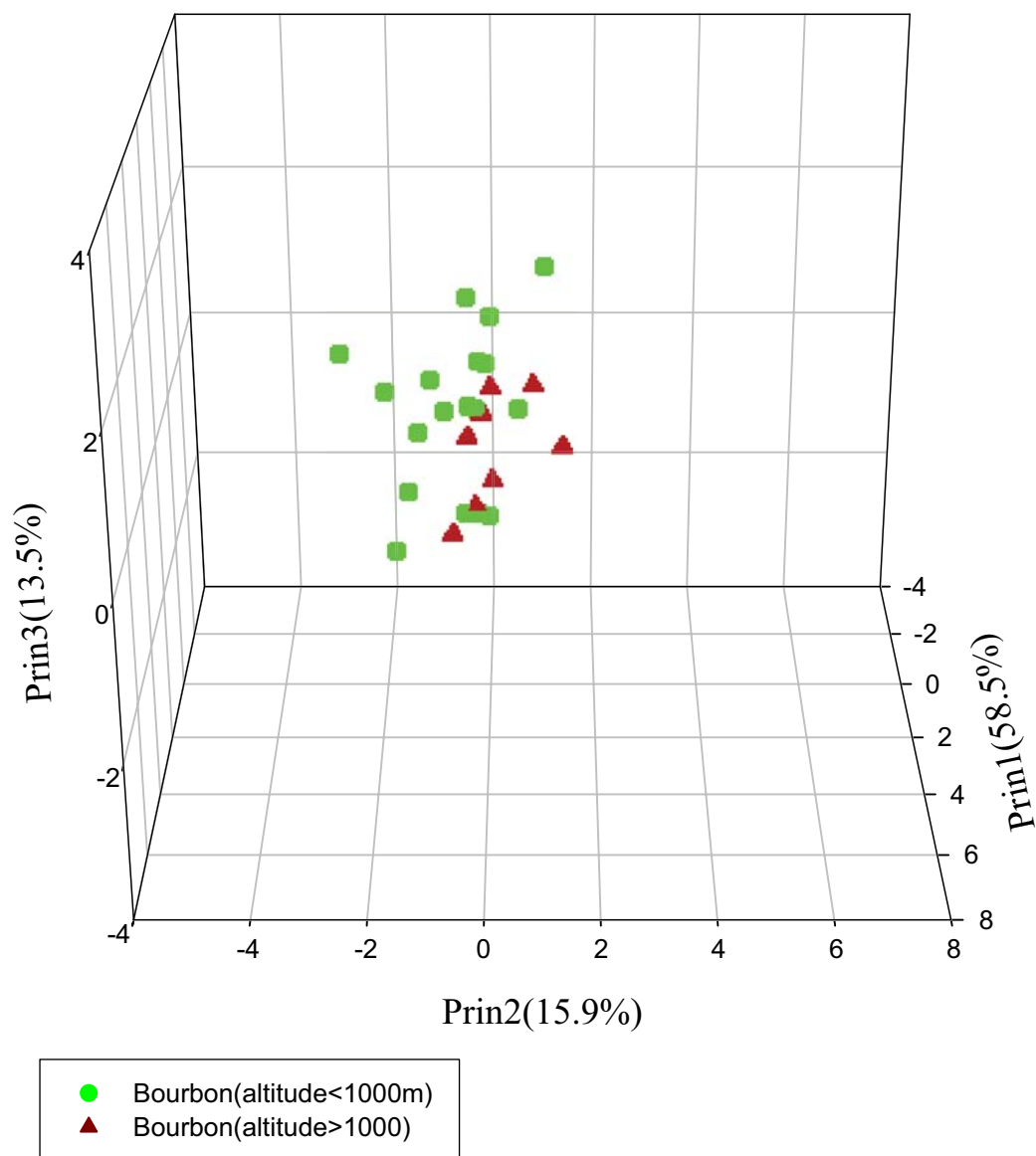


圖 20、26 個台灣咖啡種源以 SSR 分群結果為 Bourbon 品種於 6 個外觀性狀之主成份分析圖

將採集樣品包含葉片性狀的 26 個樣品，依 SSR 分群結果與 Bourbon 同群之種源，利用 6 個外觀性狀進行分析後，取前三個主成份繪製的圖形

Fig. 20. Plot of the first three principal components from the covariance matrix of 6 leaf traits for the 152 Taiwan *C. arabica* germplasms based on cluster analysis of 4 SSR markers.

Plot of the first three principal components of accessions grouped by 4 SSR markers. 152 accessions with leaf traits were grouped by 4 SSR markers.

## 第六章、結論

隨著台灣本土咖啡抬頭，許多日據時期咖啡著名產區紛紛復出，並帶動觀光咖啡園的熱潮，種植面積、產量增加近一倍，因此，為有效管理咖啡種源並增加其農產品的附加價值，鑑別不同咖啡種源及提供育種改良之參考。本試驗採集台灣現有栽培的咖啡莊園共 160 個種源，調查其 10 個外觀性狀進行分析且從夏威夷種源中心所獲得的 6 個已知 *C. arabica* 品種及 *C. canephora* 並利用 ISSR 及 SSR 分子標誌探討台灣咖啡品種鑑定之可行性。

根據 10 個外觀性狀，葉片性狀包含葉片長、寬、長寬比、及葉面積；植株性狀包含節間長度及主幹與一次分支之夾角；種子性狀包含帶殼種子長、寬、帶殼種子長寬比及帶殼種子厚的調查結果，葉面積可做為判斷是否為 *C. arabica* 的重要指標，若能配合增加其外觀性狀如葉片厚度、葉脈觀察、花冠裂數、花絮數目、及果實大小，則可進一步用於區別 *C. liberica* 與 *C. canephora*。以 152 個樣品所調查的 6 個外觀性狀與 56 個樣品所調查的 10 個外觀性狀進行主成份分析，結果顯示皆以葉片長、寬、及葉面積之葉片性狀貢獻量最多，在 6 個外觀性狀則主幹與一次分支之夾角為其次；而在 10 個外觀性狀以帶殼種子長、寬、及厚度之種子性狀為其次，最後為主幹與一次分支之夾角，以前三個主成份為軸之分析圖，發現採集自不同地區、海拔高度、老欖或現有栽培種苗間，分群關係不明顯，即地區、海拔高度、老欖或現有栽培種苗對此次採集台灣咖啡樣品間外觀性狀變異量貢獻不大，探究其原因可能為台灣咖啡跨地區傳播買賣、種植馴化歷時短、及採集取樣數目不足所致。

在 ISSR 與 SSR 兩種分子標誌分析下，ISSR 分析由 100 個 ISSR 引子中篩選出在 *C. arabica* 與 *C. canephora* 物種間具多型性的 6 個引子，共獲得 32 個訊號較強且具再現性的標誌，可區別 *C. arabica* 與其他物種；SSR 分析則由 53 個 SSR 引子中篩選出在 *C. arabica* 品種間具多型性的 2 個引子，共獲得 4 個標誌，依其所得的遺傳相似性將台灣咖啡種源分成 4 群，包含 Bourbon 群、Typica 群、Caturra 群及

4 個台灣種源，配合外觀性狀資料，得知 Typica 群的台灣種源在葉長寬、葉長寬比、葉面積、主幹與一次分支夾角及帶殼種子厚度與 Bourbon 群之種源有顯著差異，且以外表性狀進行主成份分析圖中 Bourbon 群的台灣種源與 Caturra 群的種源跟 Typica 群相比在以主幹與一次分支夾角、節間長度、葉長寬比之植株性狀貢獻較大的第二主成份上在以 0 為界的右半部有聚集的情況。

本研究以 SSR 分子標誌建立咖啡品種鑑別系統，可做為種苗保護進而提高其農產品附加價值，並由依各莊園所種植多種咖啡，發展莊園專屬的混合豆，且配合調查 11 個外觀型態資料分析，得知在品種間有顯著差異的外表特徵，可用於建立一套快速可靠品種鑑別系統，應用於咖啡育種上親本選拔與種源保存研究。





## 參考文獻

- 朱慶國。1958。台灣咖啡問題。中國園藝 4:26-30.
- 朱慶國。1940。臺灣省農業試驗所嘉義農業試驗分所研究試驗工作簡報。1961 pp.216
- 朱慶國。1961。臺灣省農業試驗所嘉義農業試驗分所研究試驗工作簡報。1961 pp.99
- 林順福。2005。21 世紀農業發展與新興科技應用研討會。作物品種之 DNA 鑑定技術
- 財政部關稅局。2006、2007。我國進出口貨物數量與價值查詢表：烘製咖啡和咖啡及其製品三大分類的整體進口量
- 黃弼臣。1955。台灣之咖啡。台灣銀行季刊第六卷第一期
- 張淑芬。2006。台灣咖啡之介紹。嘉義農業試驗所技術服務。67 卷
- 陳述、范明仁。1999。淺談 AFLP 分子標誌-種源遺傳歧異度分析與品種鑑定的新寵兒。台灣省農業試驗所技術服務 37:21-25
- 殖產局農務課。1935。熱帶產業調查會調查書：咖啡。pp.1-23
- 楊藹華。2001。如何利用分子生物技術鑑定作物品種。台南區農業專訊 38:10-14
- 楊雯惠。2003。南印度型培地茅品系指紋圖譜與 SCAR 標誌之建立。國立台灣大學農藝學研究所碩士論文
- 農情報告資源網。2006;2007。各項作物種植面積查詢。
- 澤田兼吉。1933。臺灣農事報三二一號別刷。台灣に於ける咖啡栽培歷史
- 謝際爭、陳江濱。2008 臺灣咖啡市場成長驚人 進口量五年增加 1.6 倍
- Aga, E., E. Bekele, and T. Bryngelsson. 2005. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica* 124:213-221.
- Arnau, G., J. Lallemand, and M. Bourgoïn. 2003. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129:69-79. (ed.) 1997.
- Aga, E., E. Bekele, and T. Bryngelsson. 2005. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica* 124:213-221.
- Aggarwal, R., P. Hendre, R. Varshney, P. Bhat, V. Krishnakumar, and L. Singh. 2007. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 114:359-372.
- Anthony, F., M. Combes, C. Astorga, B. Bertrand, G. Graziosi, and P. Lashermes. 2002. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 104:894-900.



- Arnau, G., J. Lallemand, and M. Bourgoïn. 2003. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129:69-79.
- Baruah, A., V. Naik, P. Hendre, R. Rajkumar, P. Rajendrakumar, and R. Aggarwal. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. *Mol. Ecol. Notes* 3:647-650.
- Bertrand, B., D. Villarreal, A. Laffargue, H. Posada, P. Lashermes, and S. Dussert. 2008. Comparison of the effectiveness of fatty acids, chlorogenic acids, and elements for the chemometric discrimination of coffee (*Coffea arabica* L.) varieties and growing origins. *J. Agric. Food Chem.* 56:2273-2280.
- Boccacci, P., A. Akkak, N. Bassil, S. Mehlenbacher, and R. Botta. 2005. Characterization and evaluation of microsatellite loci in European hazelnut (*Corylus avellana* L.) and their transferability to other *Corylus* species. *Mol. Ecol. Notes* 5:934-937.
- Bridson, D., B. Verdcourt, and R. Polhill. 1988. *Flora of tropical East Africa: Rubiaceae* (part. 2). Rotterdam: AA Balkema.
- Carvalho, A. 1988. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. *Coffee: agronomy* 4:129-165.
- Carvalho, A., and C. Krug. 1949. Genetica de *Coffea* XII: Hereditariedade da cor amarela da semente. *Brapantia* 9:193-202.
- Casal, S., M. Oliveira, M. Alves, and M. Ferreira. 2000. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. *J. Agric. Food Chem* 48:3420-3424.
- Chaparro, A., M. Cristancho, H. Cortina, and A. Gaitan. 2004. Genetic variability of *Coffea arabica* L. accessions from Ethiopia evaluated with RAPDs. *Genet. Resour. Crop Evol.* 51:291-297.
- Charrier, A., and J. Berthaud. 1985. Botanical classification of coffee. *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*. London: Croom Helms:167-195.
- Charters, Y., and M. Wilkinson. 2000. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 100:160-166.
- Chevalier, A. 1947. Les jujubiers ou ziziphus de l'ancien monde et l'utilisation de leurs fruits.
- Chevalier, A., and M. Dagron. 1928. Recherches historiques sur les debuts de la culture du cafeier en Amerique. *Communications et Actes de Academie des Sciences Coloniales*, Paris.
- Clarke, R., and R. Macrae. 1987. *Coffee Volume 4: Agronomy*. Elsevier Applied

- Science, London.
- Clifford, M., and K. Willson. 1985. *Coffee: Botany, Biochemistry and production of beans and beverage* Croom Helm London.
- Combes, M., S. Andrzejewski, F. Anthony, B. Bertrand, P. Rovelli, G. Graziosi, and P. Lashermes. 2000. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Mol. Ecol.* 9:1178-1180.
- Couturon, E., P. Lashermes, and A. Charrier. 1998. First intergeneric hybrids (*Psilanthus ebracteolatus* Hiern x *Coffea arabica* L.) in coffee trees. *Canadian Journal of Botany* 76:542-546.
- Cros, J., M. Combes, N. Chabrilange, C. Duperray, A. Angles, and S. Hamon. 1995. Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): inter- and intra-specific variation in African species. *Canadian Journal of Botany* 73:14-20.
- Cros, J., M. Combes, P. Trouslot, F. Anthony, S. Hamon, A. Charrier, and P. Lashermes. 1998. Phylogenetic Analysis of Chloroplast DNA Variation in *Coffea* L. *Mol. Phylogen. Evol.* 9:109-117.
- Don, R., P. Cox, B. Wainwright, K. Baker, and J. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008.
- Esteban-Diez, I., J. Gonzalez-Saiz, C. Saenz-Gonzalez, and C. Pizarro. 2007. Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy. *Talanta* 71:221-229.
- Hayden, M., T. Nguyen, A. Waterman, and K. Chalmers. 2008. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9:80.
- Inc, S. 2000. SIGMA Plot Version 6.10 for windows. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Jaccard, P. 1908. *Nouvelles recherches sur la distribution florale.*
- Kaundun, S., and S. Matsumoto. 2003. Identification of Processed Japanese Green Tea Based on Polymorphisms Generated by STS RFLP Analysis. *J. Agric. Food Chem* 51:1765-1770.
- Krug, C. 1938. The genetics of *Coffea*. *Journal of Genetics* 37:41-50.
- Kumar, D., and L. Tieszen. 1980. Photosynthesis in *Coffea arabica*. I. Effects of light and temperature. *Exp. Agric.* 16:13-19.
- Lashermes, P., M. Combes, P. Trouslot, and A. Charrier. 1997. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 94:947-955.
- Lashermes, P., M. Combes, J. Robert, P. Trouslot, A. D'hont, F. Anthony, and A. Charrier. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Genet. Genomics* 261:259-266.
- Lin, C., L. Mueller, J. Carthy, D. Crouzillat, V. Petiard, and S. Tanksley. 2005. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of

- seed and cherry transcripts. TAG Theoretical and Applied Genetics 112:114-130.
- Maguire, T., R. Peakall, and P. Saenger. 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.(Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. TAG Theoretical and Applied Genetics 104:388-398.
- Maluf, M., M. Silvestrini, L. Ruggiero, O. Guerreiro Filho, and C. Colombo. 2005. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. Scientia Agricola 62:366-373.
- Manifesto, M., A. Schlatter, H. Hopp, E. Suarez, and J. Dubcovsky. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. Crop Sci. 41:682-690.
- Martellosi, C., S. Doveri, J. Bates, E. Taylor, D. Lee, G. Graziosi, and P. Donini. 2002. Microsatellite analysis of green and roasted coffee blend for authenticity and traceability. National Institute of Agricultural Biology.
- Masumbuko, L., and T. Bryngelsson. 2006. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis of Diploid Coffee Species and Cultivated *Coffea arabica* L. from Tanzania. Genet. Resour. Crop Evol. 53:357-366.
- (ed.) 2006. ISHS.
- Medini, M., S. Hamza, A. Rebai, and M. Baum. 2005. Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers. Genet. Resour. Crop Evol. 52:21-31.
- Moncada, P., and S. McCouch. 2004. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. Genome 47:501-509.
- Montagnon, C., and P. Bouharmont. 1996. Multivariate analysis of phenotypic diversity of *Coffea arabica*. Genet. Resour. Crop Evol. 43:221-227.
- Montagnon, C., B. Guyot, C. Cilas, and T. Leroy. 1998. Genetic parameters of several biochemical compounds from green coffee, *Coffea canephora*. Plant Breeding 117:576-578.
- Montemurro, C., R. Simeone, A. Pasqualone, E. Ferrara, and A. Blanco. 2005. Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. J. Horticult. Sci. Biotechnol. 80:105-110.
- N'Diaye, A., V. Poncet, J. Louarn, S. Hamon, and M. Noirot. 2005. Genetic differentiation between *Coffea liberica* var. *liberica* and *C. liberica* var. *Dewevrei* and comparison with *C. canephora*. Plant Syst. Evol. 253:95-104.
- Nei, M., and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences 76:5269-5273.
- Oraguzie, N., T. Yamamoto, J. Soejima, T. Suzuki, and H. Silva. 2005. DNA

- fingerprinting of apple (*Malus* spp.) rootstocks using Simple Sequence Repeats. *Plant Breeding* 124:197-202.
- Orozco-Castillo, C., K. Chalmers, R. Waugh, and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 87:934-940.
- Röder, M., K. Wendehake, V. Korzun, G. Bredemeijer, D. Laborie, L. Bertrand, P. Isaac, S. Rendell, J. Jackson, and R. Cooke. 2002. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 106:67-73.
- Raina, S., Y. Mukai, and M. Yamamoto. 1998. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theoretical and Applied Genetics (Alemania)* 97:1204-1209.
- Rao, L., P. Usha Rani, P. Deshmukh, P. Kumar, and S. Panguluri. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54:1235-1244.
- Reddy, M., N. Sarla, and E. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17. (ed.) 2000. ISHS.
- Rohlf, F. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software.
- Rovelli, P., Mettullo, R., Anthony, F., Anzueto, F., Lashermes, P., and Graziosi, G. 2000. Microsatellites in *Coffea arabica* L. in Sera, T., Soccol, C. R., Pandey, A., and Roussos, S., eds. *Coffee Biotechnology and Quality*. Kluwer Academic Publishers. PP. 123-133.
- Steiger, D., C. Nagai, P. Moore, C. Morden, R. Osgood, and R. Ming. 2002. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 105:209-215.
- Taylor, E., R. McGirr, J. Bates, P. Rovelli, D. Lee, G. Graziosi, and P. Donini. 2002. Modern technology for traceability and authenticity of coffee throughout food processing. National Institute of Agricultural Biology.
- Tran, T. 2005. Genetic variation in cultivated coffee (*Coffea arabica* L.) accessions in northern New South Wales, Australia. Theses:45.
- Tsuta, M., J. Sugiyama, and Y. Sagara. 2002. Near-infrared imaging spectroscopy based on sugar absorption band for melons. *J. Agric. Food Chem* 50:48-52.
- Vijayan, K., and S. Chatterjee. 2003. ISSR profiling of Indian cultivars of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs. *Euphytica* 131:53-63.
- Wang, D., J. Shi, S. Carlson, P. Cregan, R. Ward, and B. Diers. 2003. A low-cost,

high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop Sci.* 43:1828-1832.

Willson, K., and M. Clifford. 1987. *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage.*

Yang, W., A. de Oliveira, I. Godwin, K. Schertz, and J. Bennetzen. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36:1669.

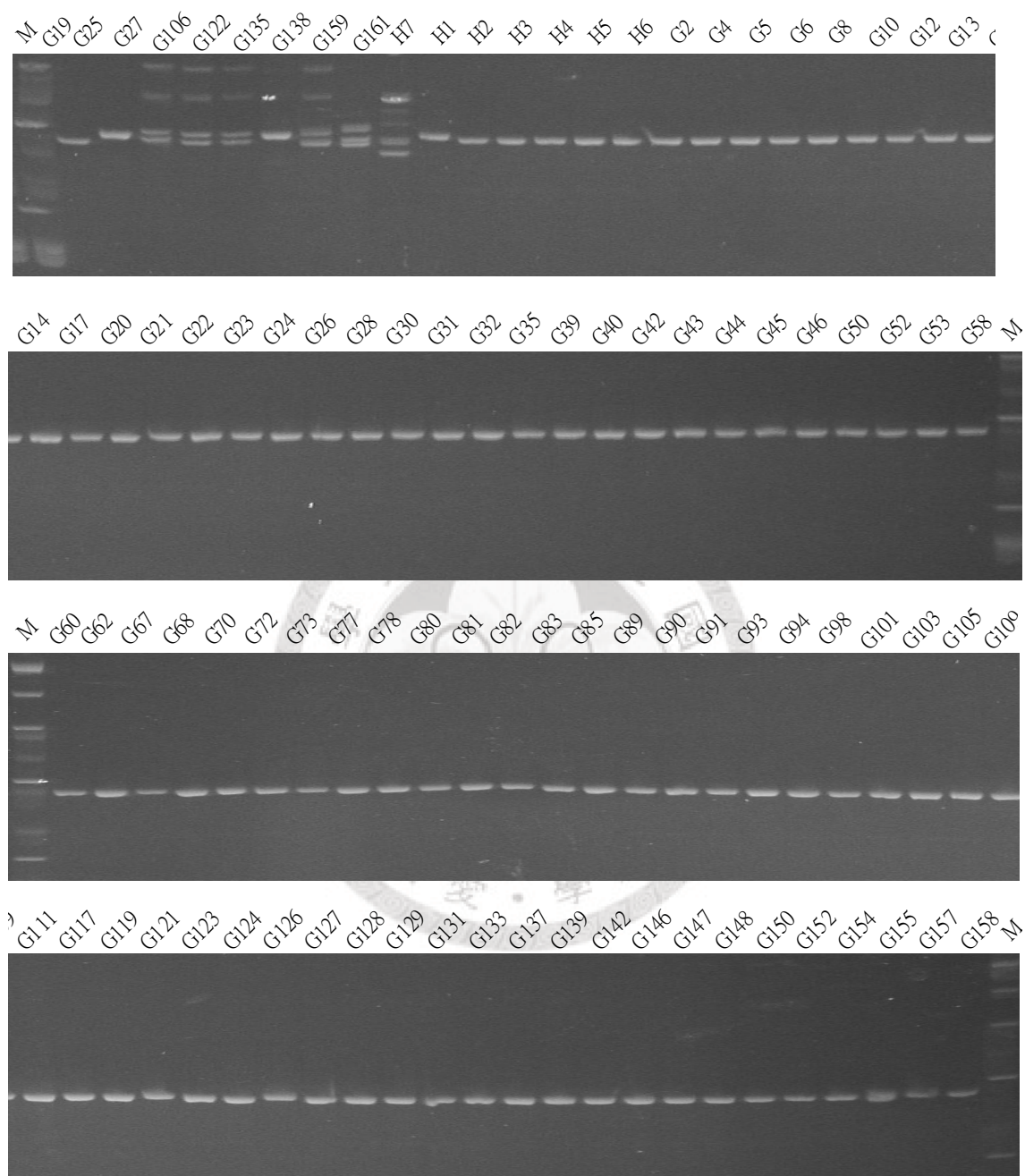
Willson, K., and M. Clifford. 1987. *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage.*

Yang, W., A. de Oliveira, I. Godwin, K. Schertz, and J. Bennetzen. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36:1669.





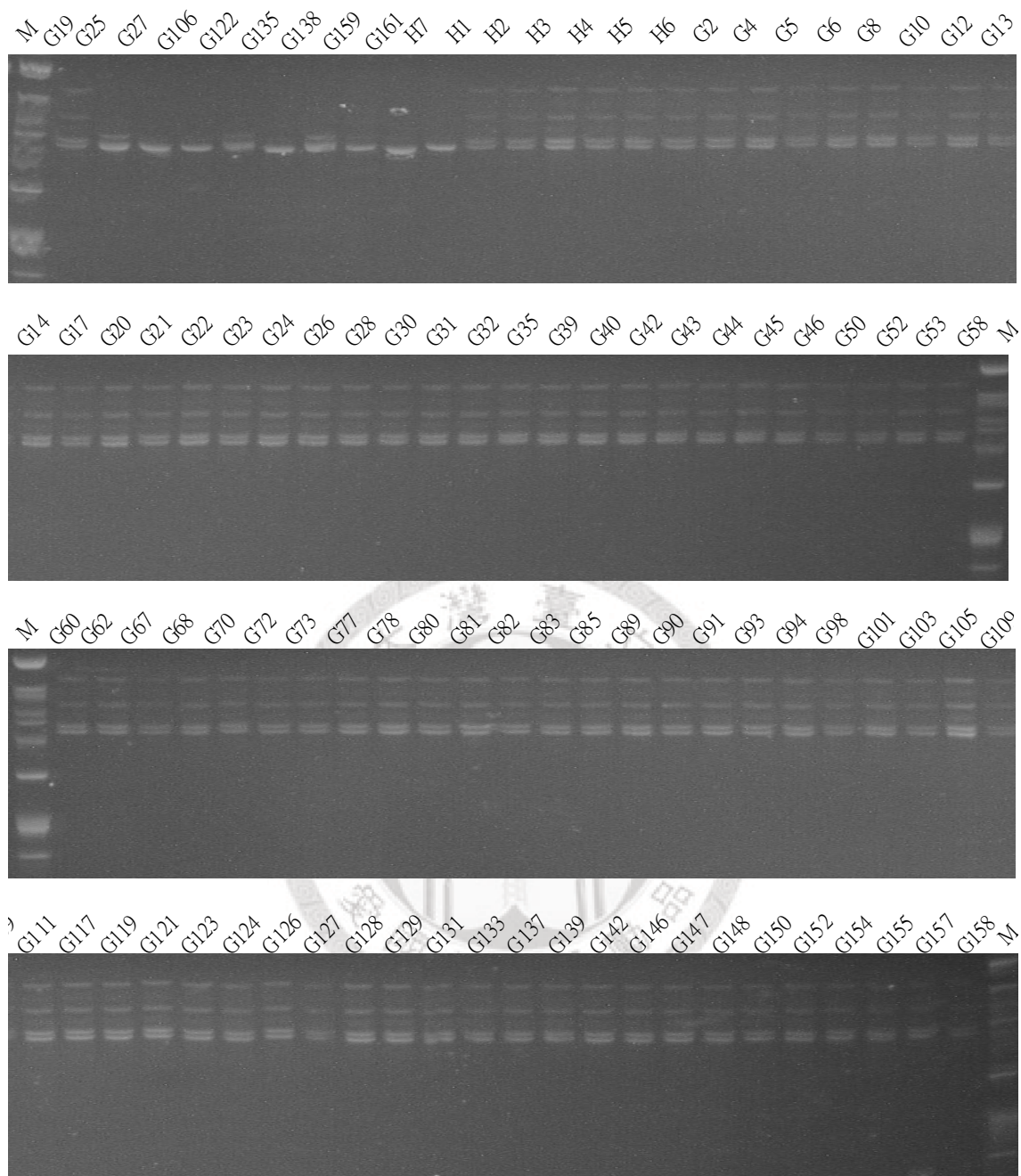
## 附錄



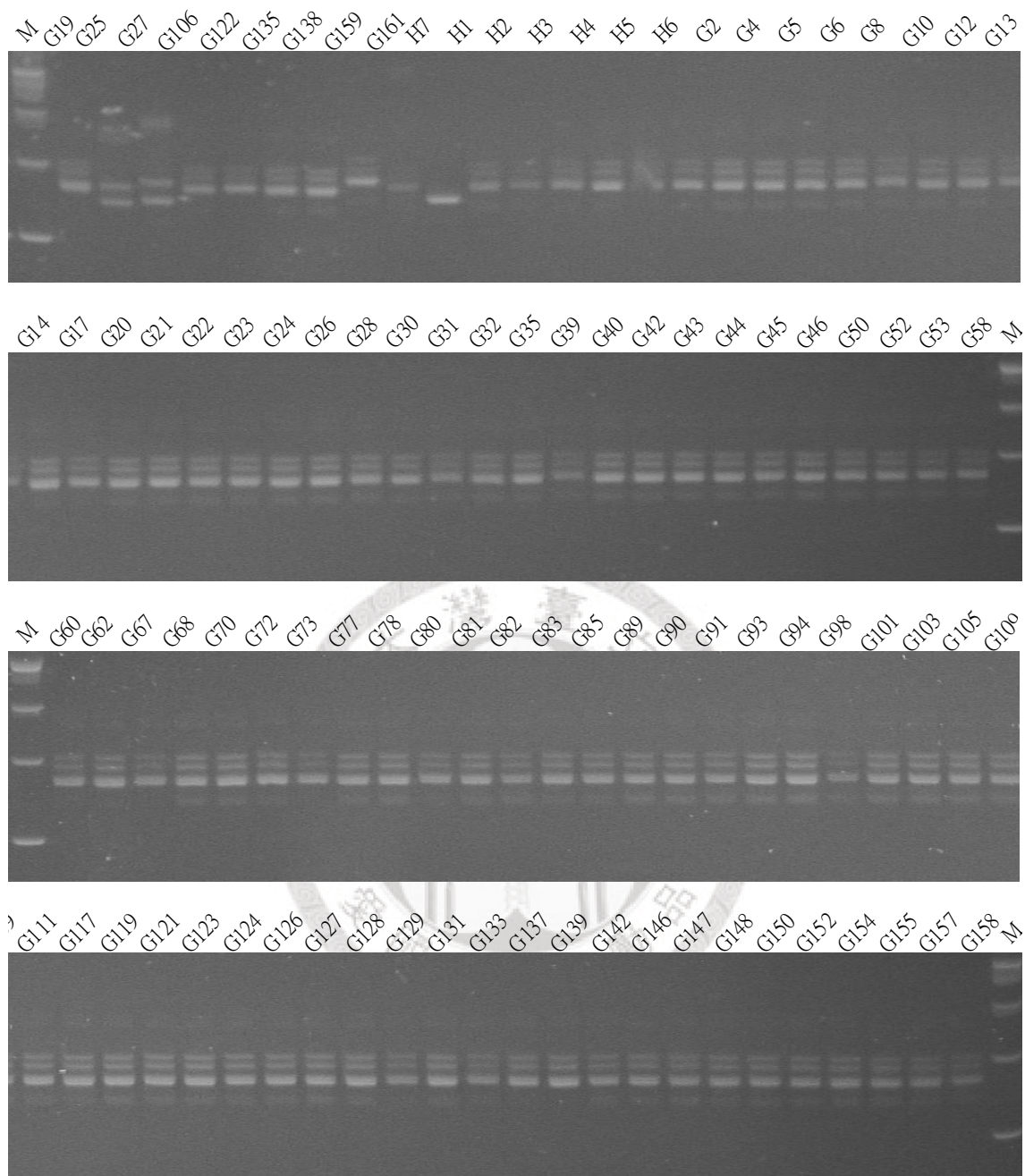
附圖 1、9 個外表性狀差異較大之非 *C. arabica* 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品以 CofEST-SSR06 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現

App. Fig 1. DNA polyacrylamide gel analysis of CofEST-SSR06



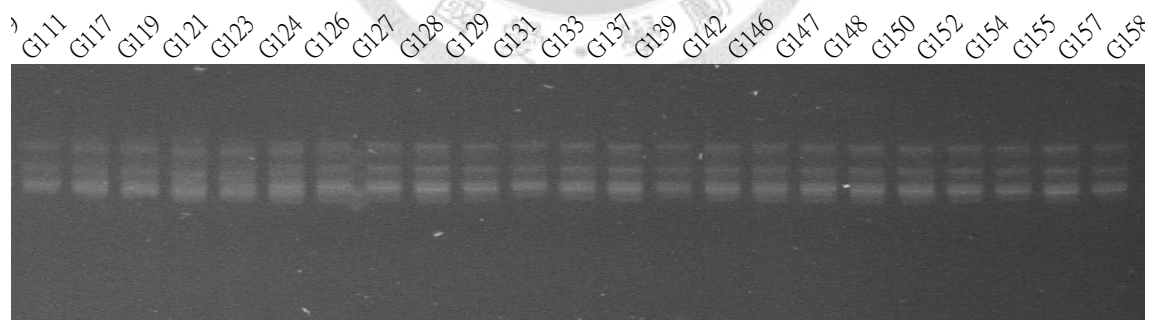
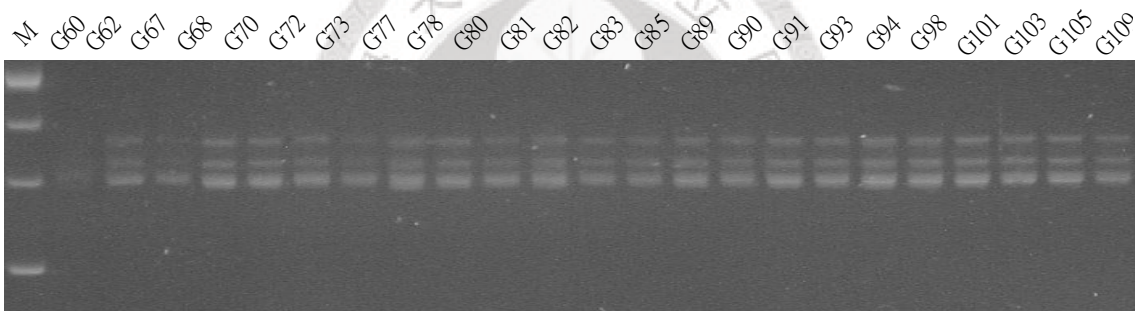
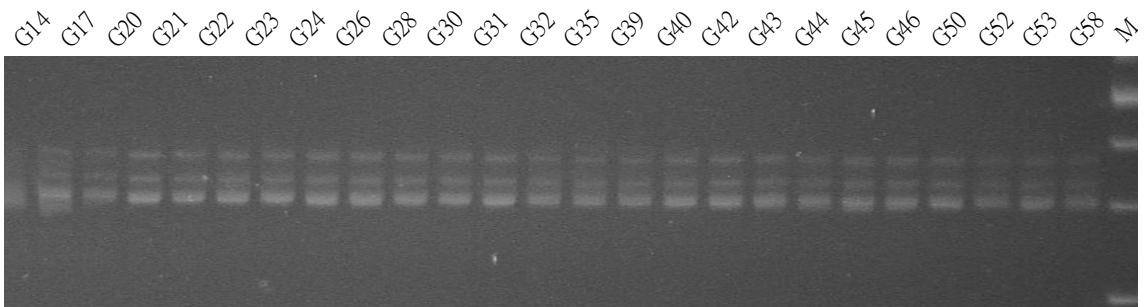
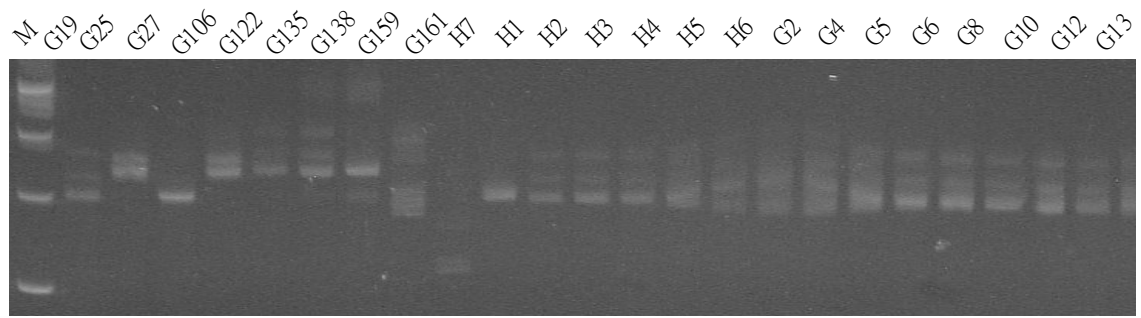


附圖 2、9 個外表性狀差異較大之非 *C. arabica* 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品以 CofEST - SSR10 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現  
 App. Fig 2. DNA polyacrylamide gel analysis of CofEST-SSR10



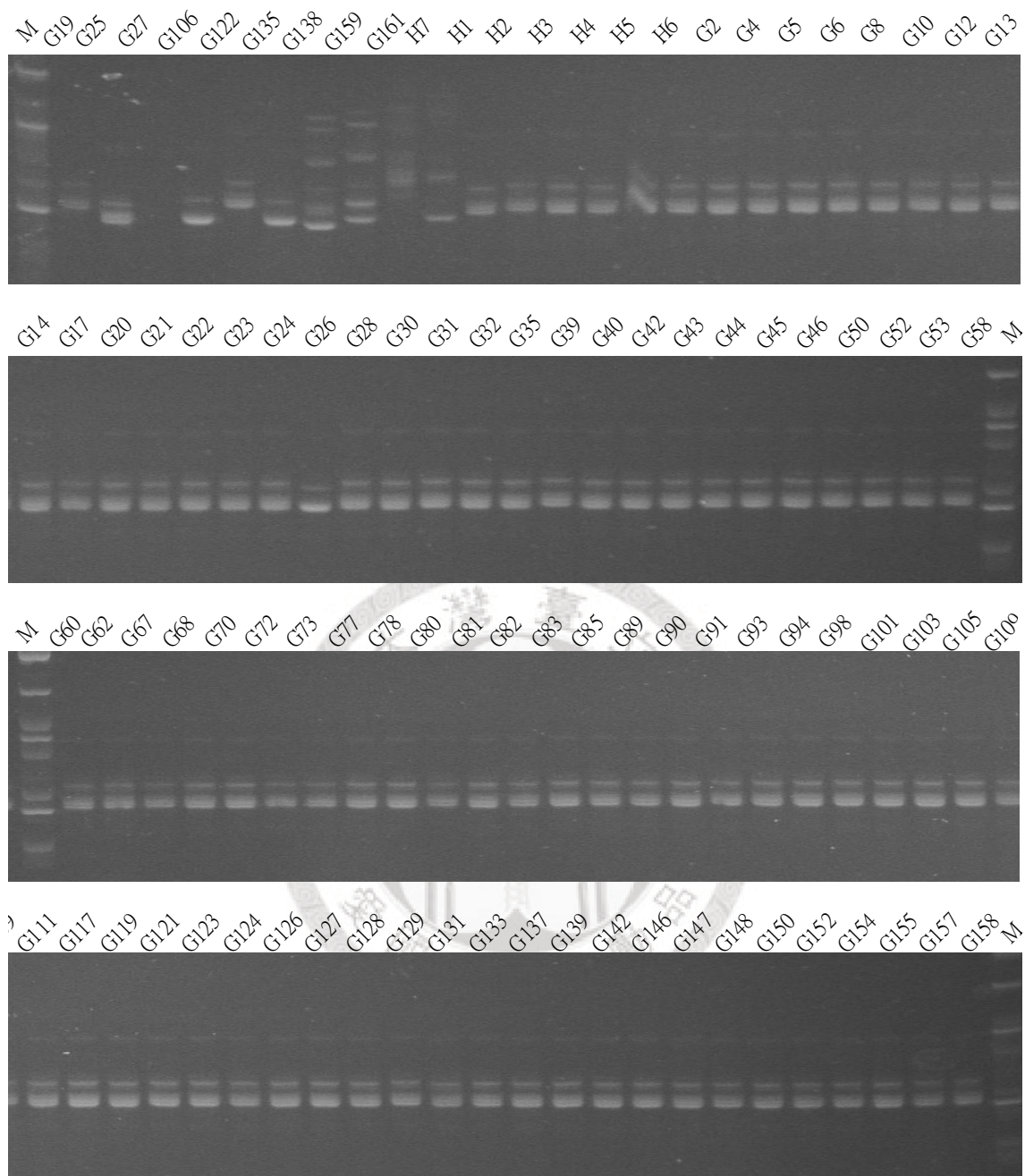
附圖 3、9 個外表性狀差異較大之非 *C. arabica* 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品以 CAM0018 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現

App. Fig 3. DNA polyacrylamide gel analysis of CAM0018



附圖 4、9 個外表性狀差異較大之非 *C. arabica* 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品以 CM5 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現

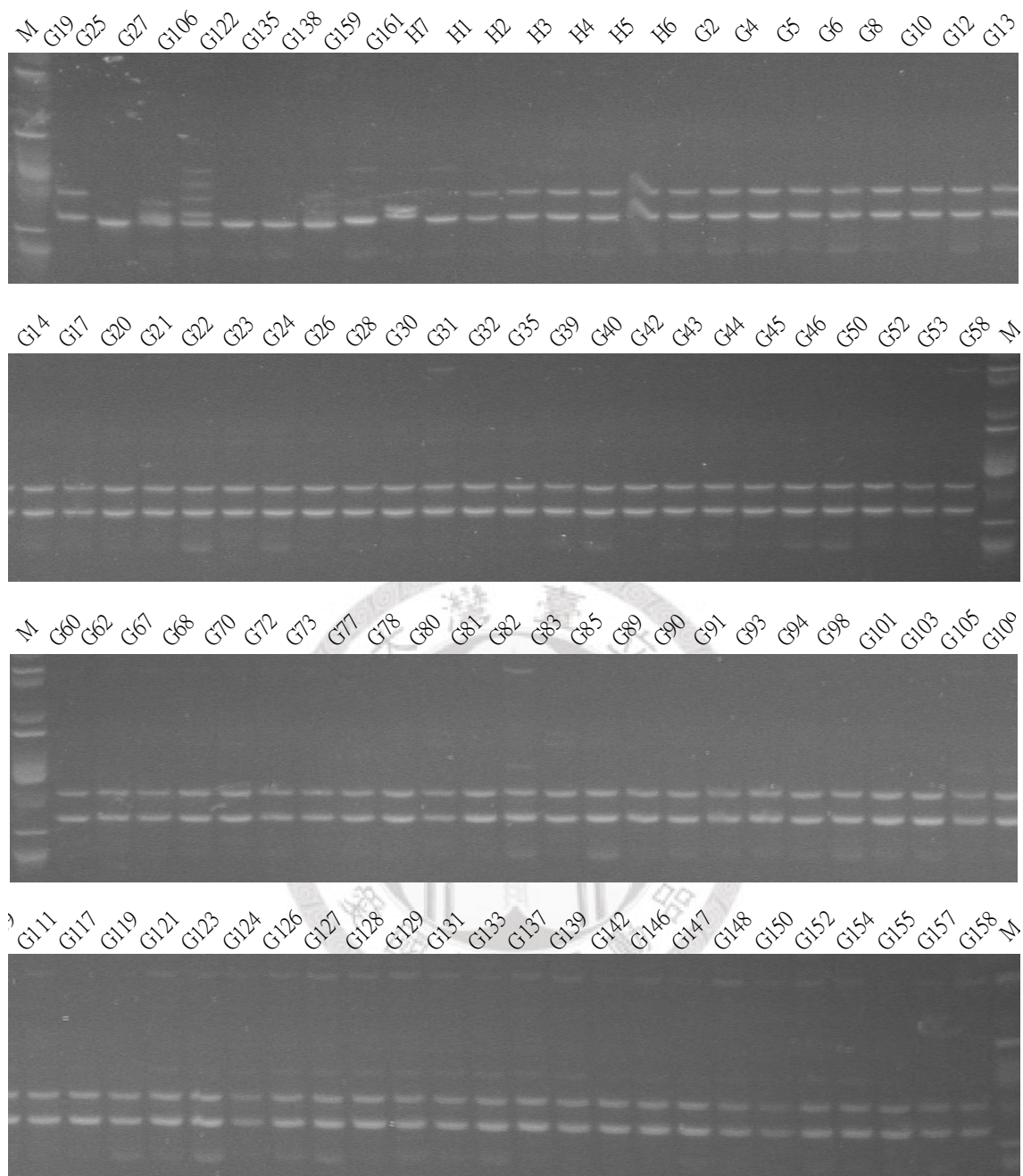
App. Fig 4. DNA polyacrylamide gel analysis of CM5



附圖 5、9 個外表性狀差異較大之非 *C. arabica* 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品以 CofEST-SSR01 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現

App. Fig 5. DNA polyacrylamide gel analysis of CofEST-SSR01

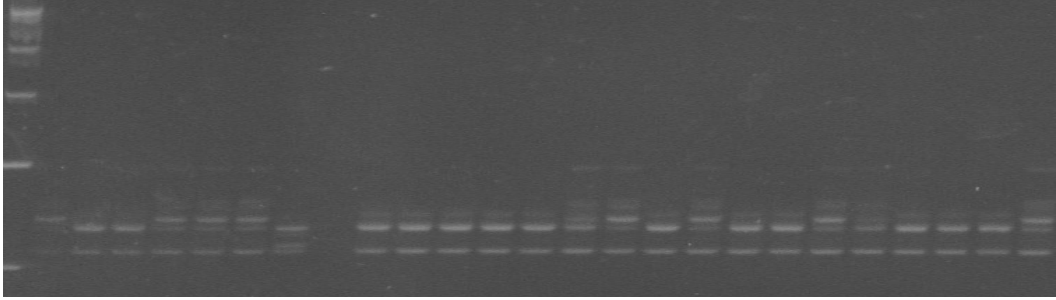




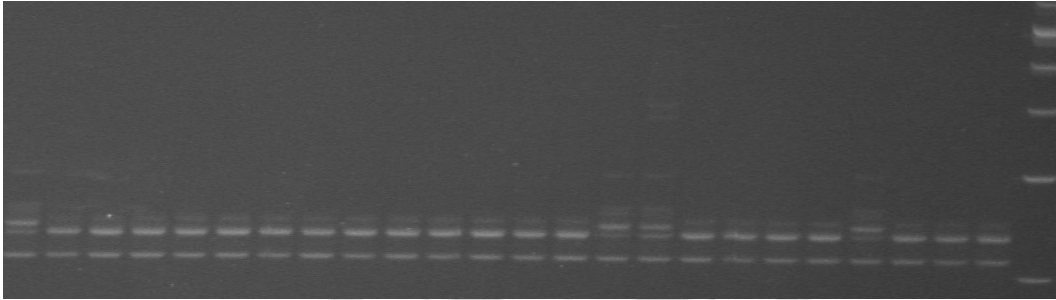
附圖 6、9 個外表性狀差異較大之非 *C. arabica* 種源、已知品種及逢機取 80 個樣品以 CofEST-SSR01 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現

App. Fig 6. DNA polyacrylamide gel analysis of CofEST-SSR11

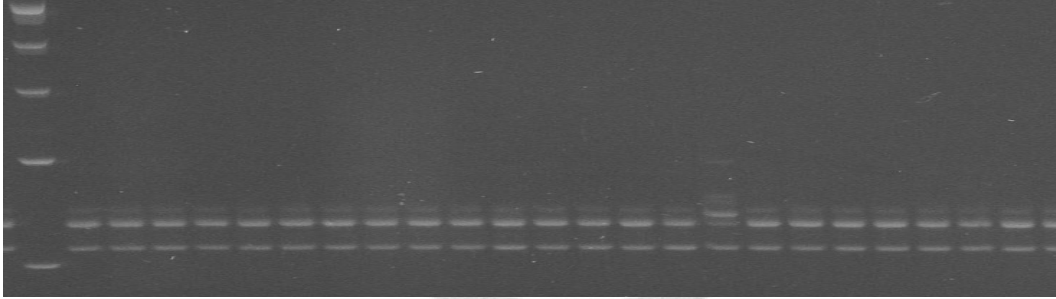
M H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11 G12 G13 G14 G15 G16 G17 G18 G19



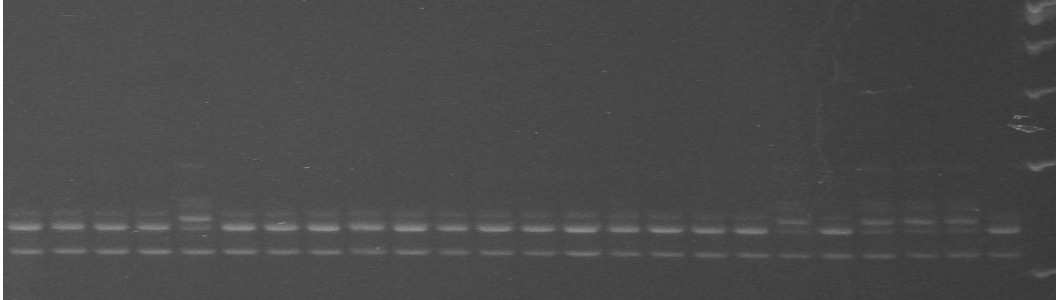
G20 G21 G22 G23 G24 G26 G28 G29 G30 G31 G32 G33 G34 G35 G36 G37 G38 G39 G40 G41 G42 G43 G44 G45 N1



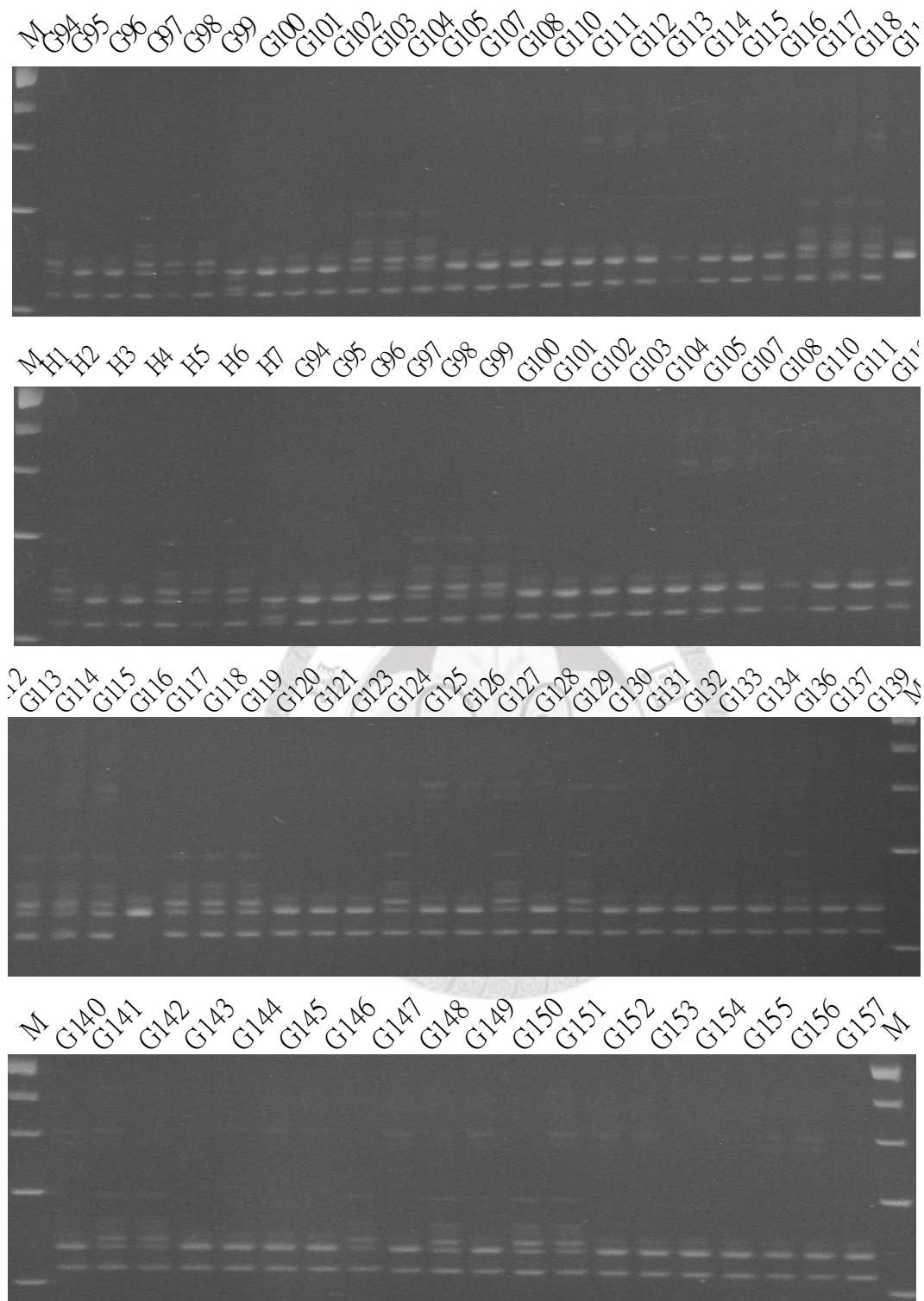
M G46 G47 G48 G49 G50 G51 G52 G53 G54 G55 G56 G57 G58 G59 G60 G61 G62 G63 G64 G65 G66 G67 G68 G69



G70 G71 G72 G73 G74 G75 G76 G77 G78 G79 G80 G81 G82 G83 G84 G85 G86 G87 G88 G89 G90 G91 G92 G93 M



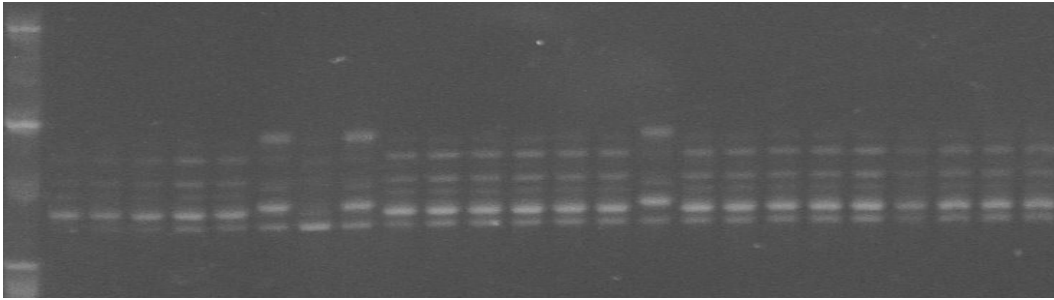




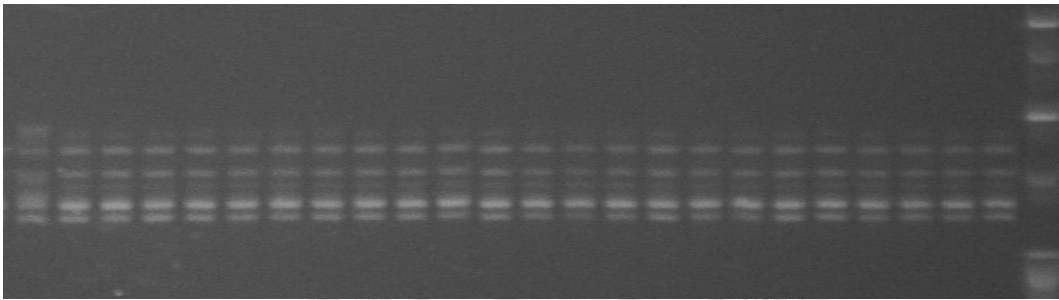
附圖 7、6 個已知 *C. arabica* 品種和 152 個台灣種源以 CM16 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現

App.Fig 7. DNA polyacrylamide gel analysis of CM16.

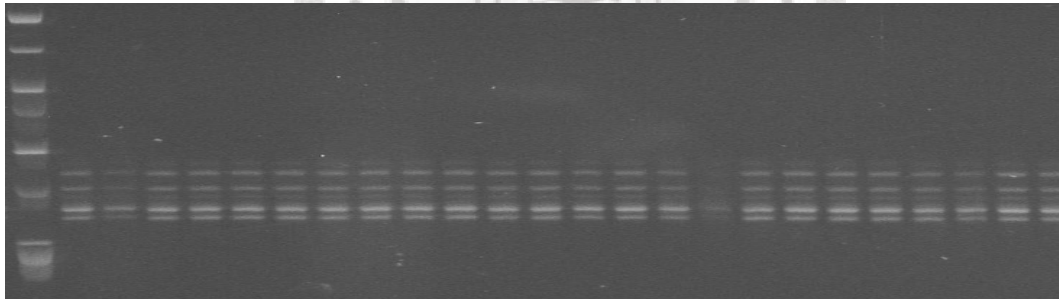
M H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11 G12 G13 G14 G15 G16 G17 G18



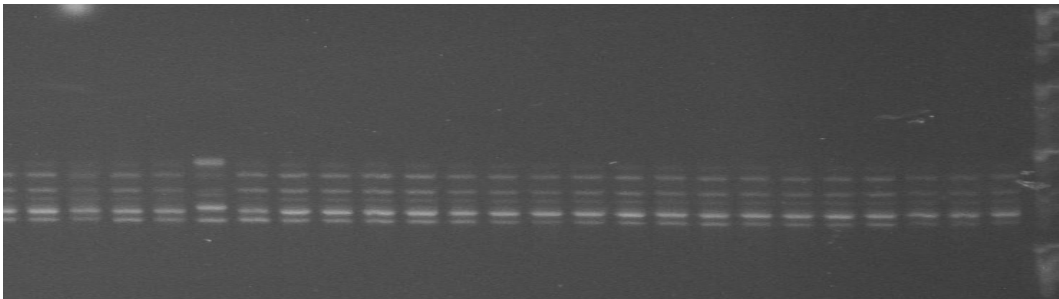
G20 G21 G22 G23 G24 G26 G28 G29 G30 G31 G32 G33 G34 G35 G36 G37 G38 G39 G40 G41 G42 G43 G44 G45 N1

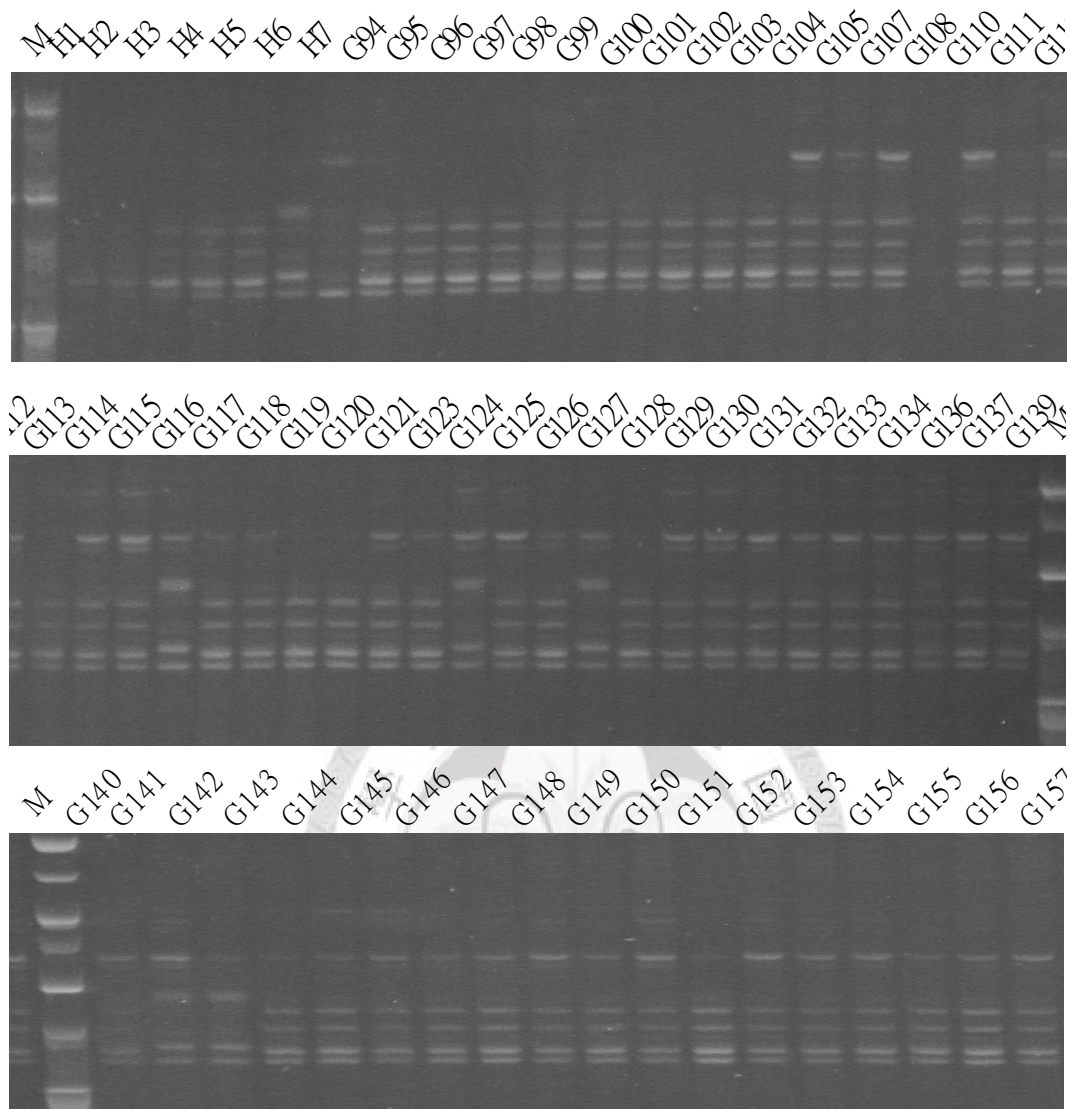


M G46 G47 G48 G49 G50 G51 G52 G53 G54 G55 G56 G57 G58 G59 G60 G61 G62 G63 G64 G65 G66 G67 G68 G69



G70 G71 G72 G73 G74 G75 G76 G77 G78 G79 G80 G81 G82 G83 G84 G85 G86 G87 G88 G89 G90 G91 G92 G93 N1





附圖 8、將 6 個已知 *C. arabica* 品種和 152 個台灣種源以 CAM0011 引子所增殖之 DNA 片段以聚丙烯醯胺凝膠電泳呈現

App.Fig 8. DNA polyacrylamide gel analysis of CAM0011.

附表 1、160 個台灣咖啡參試種源之編號及採集來源

App. Table 1. List of 160 coffee germplasms in Taiwan.

日期	GPS 代號	地點	GPS (N)	GPS (E)	海拔 高度 (m)	姓名
2月2日	2	花蓮縣瑞穗鄉	23°30.882'	121°24.240'	193	康振福
2月2日	3	花蓮縣瑞穗鄉	23°30.879'	121°24.244'	196	康振福
2月2日	4	花蓮縣瑞穗鄉	23°30.795'	121°24.192'	196	康振福
2月2日	5	花蓮縣瑞穗鄉	23°29.904'	121°21.669'	133	陳先生
2月2日	6	花蓮縣瑞穗鄉	23°29.906'	121°21.670'	133	陳先生
2月2日	7	花蓮縣瑞穗鄉	23°29.909'	121°21.671'	136	陳先生
2月2日	8	花蓮縣瑞穗鄉	23°28.917'	121°21.559'	140	黃銘福
2月2日	9	花蓮縣瑞穗鄉	23°28.931'	121°21.560'	140	黃銘福
2月2日	10	花蓮縣瑞穗鄉	23°28.930'	121°21.560'	141	黃銘福
2月2日	11	花蓮縣瑞穗鄉	23°28.920'	121°21.590'	141	黃正德
2月2日	12	花蓮縣瑞穗鄉	23°28.910'	121°21.491'	141	黃正德
2月2日	13	花蓮縣瑞穗鄉	23°27.514'	121°20.496'	258	阿義
2月2日	14	花蓮縣瑞穗鄉	23°26.030'	121°21.157'	90	吳新文
2月2日	15	花蓮縣瑞穗鄉	23°26.031'	121°21.154'	99	吳新文
2月2日	16	花蓮縣瑞穗鄉	23°26.029'	121°21.158'	80	吳新文
2月2日	17	花蓮縣瑞穗鄉	23°26.625'	121°21.201'	181	黏阿瑞
2月2日	18	花蓮縣瑞穗鄉	23°26.629'	121°21.189'	181	黏阿瑞
2月2日	19	花蓮縣瑞穗鄉	23°26.643'	121°21.149'	184	黏阿瑞
2月2日	20	花蓮縣瑞穗鄉	23°26.628'	121°21.149'	343	洪建志
2月2日	21	花蓮縣富里鄉	23°10.777'	121°13.432'	343	洪建志
2月2日	22	花蓮縣富里鄉	23°10.772'	121°13.432'	343	洪建志
2月2日	23	花蓮縣富里鄉	23°10.796'	121°13.422'	340	洪建志
2月3日	24	台東市	22°47.130'	121°08.179'	81	天香
2月3日	25	台東市	22°47.130'	121°08.179'	81	天香
2月3日	26	台東市	22°47.123'	121°08.166'	40	天香
2月3日	27	台東市	22°47.118'	121°08.166'	41	天香
2月3日	28	台東市	22°47.122'	121°08.159'	36	黃義雄
2月3日	29	台東縣延平鄉	22°51.128'	121°06.833'	288	黃義雄
2月3日	30	台東縣延平鄉	22°51.243'	121°06.761'	264	黃義雄
2月3日	31	台東縣延平鄉	22°51.186'	121°06.743'	284	秋山
2月3日	32	台東縣延平鄉	22°51.186'	121°06.743'	284	秋山



附表 1、續上表

App. Table 1. (continued)

日期	GPS		GPS (N)	GPS (E)	海拔	姓名
	代號	地點			高度	
					(m)	
2月3日	33	台東縣延平鄉	22°51.186'	121°06.743'	284	日據加工廠
2月3日	34	台東縣延平鄉	22°51.186'	121°06.743'	284	林淑慧
2月3日	35	台東縣延平鄉	22°52.388'	121°04.944'	265	林淑慧
2月3日	36	台東縣延平鄉	22°52.363'	121°04.932'	246	王進福
2月3日	37	台東縣延平鄉	22°51.097'	121°05.470'	227	王進福
2月3日	37	台東縣延平鄉	22°51.097'	121°05.470'	227	王進福
2月3日	38	台東縣延平鄉	22°50.687'	121°05.583'	211	林添貴
2月3日	39	台東縣卑南鄉	22°40.928'	121°00.701'	437	詹明崇
2月3日	40	台東縣卑南鄉	22°40.928'	121°00.701'	437	詹明崇
2月3日	41	台東縣卑南鄉	22°40.937'	121°00.691'	442	詹明崇
2月3日	42	台東縣卑南鄉	22°40.937'	121°00.691'	443	廖天成
2月3日	43	台東縣卑南鄉	22°40.123'	121°00.658'	376	廖天成
2月4日	44	屏東縣三地門鄉	22°45.831'	120°42.221'	852	德文公園
2月4日	45	屏東縣三地門鄉	22°45.835'	120°42.224'	854	德文公園
2月4日	46	屏東縣三地門鄉	22°45.834'	120°42.223'	853	德文公園
2月4日	47	屏東縣三地門鄉	22°45.833'	120°42.227'	849	德文公園
2月4日	48	屏東縣三地門鄉	22°46.834'	120°40.228'	849	馮生財
2月4日	49	屏東縣三地門鄉	22°45.514'	120°41.727'	831	鐘景維
2月4日	50	屏東縣三地門鄉	22°45.514'	120°41.728'	834	謝議員
2月4日	51	屏東縣三地門鄉	22°47.840'	120°42.484'	815	張友吉
2月4日	52	屏東縣瑪家鄉	22°40.575'	120°41.309'	760	張友吉
2月4日	53	屏東縣瑪家鄉	22°40.356'	120°41.225'	736	陳孝勁
2月4日	54	屏東縣瑪家鄉	22°40.179'	120°41.255'	732	陳孝勁
2月4日	55	屏東縣瑪家鄉	22°40.709'	120°41.162'	761	林忠義
2月4日	56	屏東縣內埔鄉	22°37.929'	120°37.127'	48	賴先生
2月4日	57	屏東縣內埔鄉	22°37.926'	120°37.144'	45	賴先生
2月4日	58	屏東縣內埔鄉	22°37.940'	120°37.143'	44	賴先生
2月4日	59	屏東縣內埔鄉	22°37.933'	120°37.110'	42	賴先生
2月4日	60	屏東縣內埔鄉	22°37.768'	120°36.823'	37	賴先生
2月5日	61	屏東縣萬巒鄉	22°35.965'	120°38.297'	410	潘先生

附表 1、續上表

App. Table 1. (continued)

日期	GPS		GPS (N)	GPS (E)	海拔	姓名
	代號	地點			高度 (m)	
2月5日	62	屏東縣泰武鄉	22°34.574'	120°38.818'	429	湖武平
2月5日	63	屏東縣泰武鄉	22°34.565'	120°38.829'	419	湖武平
2月5日	64	屏東縣泰武鄉	22°34.393'	120°39.182'	488	顧英哲
2月5日	65	屏東縣泰武鄉	22°34.392'	120°39.179'	479	顧英哲
2月5日	66	屏東縣泰武鄉	22°34.412'	120°39.199'	496	顧英哲
2月5日	67	屏東縣泰武鄉	22°34.414'	120°39.139'	510	顧英哲
2月5日	68	屏東縣泰武鄉	22°35.388'	120°39.888'	786	江秋妹
2月5日	69	屏東縣泰武鄉	22°35.387'	120°39.863'	788	江秋妹
2月5日	70	屏東縣泰武鄉	22°35.398'	120°39.206'	788	華安義
2月5日	71	屏東縣萬巒鄉	22°33.997'	120°33.818'	26	鐘進謀
2月5日	72	屏東縣萬巒鄉	22°33.997'	120°33.819'	14	鐘進謀
2月5日	73	屏東縣萬巒鄉	22°33.998'	120°33.820'	20	鐘進謀
2月6日	74	台南縣東山鄉	23°17.150'	120°31.044'	662	陳建源
2月6日	75	台南縣東山鄉	23°17.036'	120°31.027'	644	陳建源
2月6日	76	台南縣東山鄉	23°17.061'	120°31.023'	677	陳建源
2月6日	77	台南縣東山鄉	23°17.028'	120°31.075'	670	陳得
2月6日	78	台南縣東山鄉	23°17.040'	120°31.088'	667	陳得
2月6日	79	台南縣東山鄉	23°15.360'	120°27.771'	620	曾福生
2月6日	80	台南縣東山鄉	23°15.788'	120°30.457'	665	曾福生
2月7日	81	嘉義縣阿里山鄉	23°18.530'	120°41.862'	1210	許先生
2月7日	82	嘉義縣阿里山鄉	23°18.531'	120°41.866'	1201	許先生
2月7日	83	嘉義縣阿里山鄉	23°18.586'	120°41.828'	1220	許先生
2月7日	84	嘉義縣阿里山鄉	23°18.585'	120°41.835'	1218	許先生
2月7日	85	嘉義縣阿里山鄉	23°16.929'	120°41.264'	816	陳先生
2月7日	86	嘉義縣阿里山鄉	23°16.404'	120°41.822'	808	三民老欉
2月7日	87	嘉義縣阿里山鄉	23°28.086'	120°42.806'	1233	方龍夫
2月7日	88	嘉義縣阿里山鄉	23°28.091'	120°42.804'	1194	方龍夫
2月7日	89	嘉義縣阿里山鄉	23°28.033'	120°42.733'	1211	方龍夫
2月8日	90	嘉義縣梅山鄉	23°32.678'	120°42.348'	1178	葉春成



附表 1、續上表

App. Table 1. (continued)

日期	GPS		GPS (N)	GPS (E)	海拔	姓名
	代號	地點			高度 (m)	
2月8日	91	嘉義縣梅山鄉	23°32.677'	120°42.346'	1178	葉春成
2月8日	92	嘉義縣梅山鄉	23°32.687'	120°42.343'	1196	葉春成
2月8日	93	嘉義縣梅山鄉	23°32.762'	120°43.186'	979	葉春成
2月8日	94	嘉義縣梅山鄉	23°32.755'	120°43.183'	979	葉景明
2月8日	95	嘉義縣梅山鄉	23°32.737'	120°43.174'	997	葉景明
2月8日	96	嘉義縣梅山鄉	23°32.716'	120°41.637'	1116	葉景明
2月8日	97	嘉義縣梅山鄉	23°32.720'	120°41.635'	1088	王秋忠
2月8日	98	嘉義縣梅山鄉	23°33.175'	120°40.370	1106	王秋忠
2月8日	99	嘉義縣梅山鄉	23°33.147	120°40.374'	1096	賴燕翔
2月8日	100	嘉義縣梅山鄉	23°33.627'	120°39.365'	918	賴燕翔
2月8日	101	嘉義縣梅山鄉	23°33.626'	120°39.364'	887	黃先生
2月8日	102	嘉義縣梅山鄉	23°32.430'	120°39.931'	1053	王秋忠
2月8日	103	嘉義縣梅山鄉	23°32.303'	120°40.696'	1026	葉純喜
4月25日	104	雲林縣古坑鄉	23°39.473'	120°35.503'	110	劉易騰
4月25日	105	雲林縣古坑鄉	23°39.473'	120°35.505'	114	劉易騰
4月25日	106	雲林縣古坑鄉	23°39.452'	120°35.519'	168	劉易騰
4月25日	107	雲林縣古坑鄉	23°39.622'	120°35.368'	160	黃勝謀
4月25日	108	雲林縣古坑鄉	23°39.621'	120°35.373'	157	黃勝謀
4月25日	109	雲林縣古坑鄉	23°39.589'	120°35.347'	162	黃勝謀
4月25日	110	雲林縣古坑鄉	23°37.824'	120°36.856'	321	張清江
4月25日	111	雲林縣古坑鄉	23°36.158'	120°42.495'	1145	郭章盛
4月25日	112	雲林縣古坑鄉	23°36.166'	120°42.476'	1139	郭章盛
4月25日	113	雲林縣古坑鄉	23°36.133'	120°42.411'	1148	郭章盛
4月25日	114	雲林縣古坑鄉	23°35.865'	120°36.688'	663	劉慶松
4月25日	115	雲林縣古坑鄉	23°35.867'	120°36.689'	666	劉慶松
4月25日	116	雲林縣古坑鄉	23°35.871'	120°36.691'	666	劉慶松
4月25日	117	雲林縣古坑鄉	23°35.875'	120°36.694'	664	劉慶松
4月25日	118	雲林縣古坑鄉	23°35.876'	120°36.698'	664	劉慶松
4月25日	119	雲林縣古坑鄉	23°35.870'	120°36.697'	664	劉慶松
4月25日	120	雲林縣古坑鄉	23°33.738'	120°35.044'	493	林亮宏

附表 1、續上表

App. Table 1. (continued)

日期	GPS		GPS (N)	GPS (E)	海拔	姓名
	代號	地點			高度	
					(m)	
4 月 25 日	121	雲林縣古坑鄉	23°33.759'	120°35.031'	483	林亮宏
4 月 25 日	122	雲林縣古坑鄉	23°33.772'	120°35.049'	489	林亮宏
4 月 26 日	123	南投縣水里鄉	23°47.480'	120°54.656'	486	陳蒼輝
4 月 26 日	124	南投縣水里鄉	23°46'15	120°50'45	522	陳佳滢
4 月 26 日	125	南投縣水里鄉	23°46'18	120°50'44	522	陳佳滢
4 月 26 日	126	南投縣水里鄉	23°47.522'	120°55.656'	385	李玉煌
4 月 26 日	127	南投縣水里鄉	23°47.517'	120°55.661'	379	李玉煌
4 月 26 日	128	南投縣水里鄉	23°49.513'	120°55.549'	516	劉佳館
4 月 26 日	129	南投縣水里鄉	23°43.460'	120°51.916'	838	詹森木
4 月 26 日	130	南投縣水里鄉	23°43.453'	120°51.915'	839	詹森木
4 月 26 日	131	南投縣信義鄉	23°39.778'	120°51.197'	835	陳建宏
4 月 26 日	132	南投縣信義鄉	23°39.853'	120°51.247'	1001	陳建宏
4 月 26 日	133	南投縣竹山鄉	23°40.117'	120°51.433'	895	林國隆
4 月 26 日	134	南投縣竹山鄉	23°46.990'	120°47.569'	419	林國隆
4 月 26 日	135	南投縣竹山鄉	23°46.991'	120°47.571'	418	林國隆
4 月 26 日	136	南投縣鹿谷鄉	23°43.951'	120°46.206'	570	許佑存
4 月 26 日	137	南投縣鹿谷鄉	23°43.956'	120°46.206'	574	許佑存
4 月 26 日	138	南投縣鹿谷鄉	23°43.958'	120°46.179'	578	許佑存
4 月 26 日	139	南投縣鹿谷鄉	23°45.188'	120°45.310'	569	張順利
4 月 26 日	140	南投縣鹿谷鄉	23°45.131'	120°45.305'	523	張順利
4 月 26 日	141	南投縣鹿谷鄉	23°45.131'	120°45.306'	525	張順利
4 月 26 日	142	南投縣鹿谷鄉	23°45.158'	120°45.299'	527	張順利
4 月 26 日	143	南投縣鹿谷鄉	23°43.904'	120°46.050'	617	張民雄
4 月 26 日	144	南投縣名間鄉	23°50.112'	120°38.603'	415	李錦禎
4 月 26 日	145	南投縣名間鄉	23°52.145'	120°37.764'	303	陳文崑
4 月 26 日	146	南投縣名間鄉	23°52.181'	120°37.776'	304	陳文崑
4 月 27 日	147	南投縣國姓鄉	24°00.364'	120°49.126'	290	陳啟彰
4 月 27 日	148	南投縣國姓鄉	24°00.364'	120°49.127'	290	陳啟彰
4 月 27 日	149	南投縣國姓鄉	23°58.517'	120°47.560'	290	陳啟彰
4 月 27 日	150	南投縣中寮鄉	23°53.782'	120°50.752'	923	陳富源
4 月 27 日	151	南投縣中寮鄉	23°53.791'	120°50.732'	928	陳富源

附表 1、續上表

App. Table 1. (continued)

日期	GPS		GPS (N)	GPS (E)	海拔	姓名
	代號	地點			高度	
4 月 27 日	152	南投縣中寮鄉	23°53.786'	120°50.737'	918	陳富源
4 月 27 日	153	南投縣中寮鄉	23°53.777'	120°50.755'	880	陳富源
4 月 27 日	154	南投縣中寮鄉	23°55.303'	120°48.770'	637	林憲堂
4 月 27 日	155	南投縣中寮鄉	23°55.314'	120°48.824'	636	林憲堂
4 月 27 日	156	南投縣中寮鄉	23°55.304'	120°48.776'	633	林憲堂
4 月 27 日	157	南投縣國姓鄉	23°55.306'	120°48.783'	649	張順嬌
4 月 27 日	158	南投縣國姓鄉	24°00.376'	120°49.135'	246	張順嬌
4 月 27 日	159	南投縣國姓鄉	24°04.863'	120°52.796'	347	林秀吉
4 月 27 日	160	南投縣國姓鄉	24°04.824'	120°52.790'	346	林秀吉
4 月 27 日	161	南投縣國姓鄉	24°04.824'	120°52.655'	346	林秀吉



附表 2、本試驗所調查咖啡種源外觀性狀及調查標準

App. Table 2. List of descriptors and descriptor-states for characterizing coffee germplasm.

性狀調查	調查標準	調查方法
主幹與一次分支的夾角	測量第十個節間附近主幹與一次分支的角度	量角器
節間長度	測量第十個節間上一、二年生支條，取五個平均。	游標尺
成熟葉長	測量一、二年生支條上，葉片尖端到葉柄之長度，取五片平均。	(1)
成熟葉寬	測量一、二年生支條上，葉片最大寬幅之寬度，取五片平均。	(1)
成熟葉長寬比	葉片長寬比	(1)
成熟葉面積	測量一、二年生支條上之葉片面積，取五片平均。	(1)
帶殼種子長	取成熟漿果，將果肉完全移除後進行測量腹面朝上之兩端長度，取 5 粒平均。	(1)
帶殼種子寬	取成熟漿果，將果肉完全移除後進行測量腹面朝上之最大寬幅寬度，取 5 粒平均。	(1)
帶殼種子厚度	取成熟漿果，將果肉完全移除後進行測量種子中心與其垂直對應之厚度，取 5 粒平均。	游標尺
帶殼種子長寬比	帶殼種子長寬比	(1)

註 (1)：調查方法以數位相機照相進行建檔，照片再以 SigmaScan Pro 5 軟體進行影像分析量測，葉面積之測量方式有兩種，一為長乘寬再乘係數 0.66 而得 (Montagnon and Bouharmont, 1996)；二為以 SigmaScan Pro 5 軟體影像分析量測而得，分別標示為 LA1 與 LA2。

附表 3、5 個參試台灣咖啡老欖隨機取其各 20 個子代族群

App. Table 3. List of 20 progenys sampled from 5 old coffee populations in Taiwan.

日期	GPS 代號	地點	GPS (N)	GPS (E)	海拔 高度 (m)	姓名
2 月 4 日	55	屏東縣瑪家鄉	22°40.709'	120°41.162'	761	林忠義
2 月 5 日	69	屏東縣泰武鄉	22°35.387'	120°39.863'	788	江秋妹
2 月 5 日	70	屏東縣泰武鄉	22°35.398'	120°39.206'	788	華安義
2 月 6 日	80	台南縣東山鄉	23°15.788'	120°30.457'	665	曾福生
4 月 25 日	109	雲林縣古坑鄉	23°39.589'	120°35.347'	162	黃勝謀



附表 4、本研究所使用 100 條 ISSR 核酸引子序列

App. Table 4. The primers used for ISSR analysis..

引子 編號	引子 重複 數	引子序列 (5' → 3')	引子 編號	引子 重複 數	引子序列 (5' → 3')
801	2	ATA TAT ATA TAT ATA TT	851	2	GTG TGT GTG TGT GTG TYG
802	2	ATA TAT ATA TAT ATA TG	852	2	TCT CTC TCT CTC TCT CRA
803	2	ATA TAT ATA TAT ATA TC	853	2	TCT CTC TCT CTC TCT CRT
804	2	TAT ATA TAT ATA TAT AA	854	2	TCT CTC TCT CTC TCT CRG
805	2	TAT ATA TAT ATA TAT AC	855	2	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
806	2	TAT ATA TAT ATA TAT AG	856	2	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
807	2	AGA GAG AGA GAG AGA GT	857	2	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
808	2	AGA GAG AGA GAG AGA GC	858	2	TGT GTG TGT GTG TGT GRT
809	2	AGA GAG AGA GAG AGA GG	859	2	TGT GTG TGT GTG TGT GRC
810	2	GAG AGA GAG AGA GAG AT	860	2	TGT GTG TGT GTG TGT GRA
811	2	GAG AGA GAG AGA GAG AC	861	3	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
812	2	GAG AGA GAG AGA GAG AA	862	3	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
813	2	CTC TCT CTC TCT CTC TT	863	3	AGT AGT AGT AGT AGT AGT
814	2	CTC TCT CTC TCT CTC TA	864	3	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
815	2	CTC TCT CTC TCT CTC TG	865	3	CCG CCG CCG CCG CCG CCG
816	2	CAC ACA CAC ACA CAC AT	866	3	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
817	2	CAC ACA CAC ACA CAC AA	867	3	GGC GGC GGC GGC GGC GGC
818	2	CAC ACA CAC ACA CAC AG	868	3	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
819	2	GTG TGT GTG TGT GTG TA	869	3	GTT GTT GTT GTT GTT GTT
820	2	GTG TGT GTG TGT GTG TC	870	3	TGC TGC TGC TGC TGC TGC
821	2	GTG TGT GTG TGT GTG TT	871	2	TAT TAT TAT TAT TAT TAT
822	2	TCT CTC TCT CTC TCT CA	872	4	GAT AGA TAG ATA GAT A
823	2	TCT CTC TCT CTC TCT CC	873	4	GAC AGA CAG ACA GAC A
824	2	TCT CTC TCT CTC TCT CG	874	4	CCC TCC CTC CCT CCC T
825	2	ACA CAC ACA CAC ACA CT	875	4	CTA GCT AGC TAG CTA G
826	2	ACA CAC ACA CAC ACA CC	876	4	GAT AGA TAG ACA GAC A
827	2	ACA CAC ACA CAC ACA CG	877	4	TGC ATG CAT GCA TGC A
828	2	TGT GTG TGT GTG TGT GA	878	4	GGA TGG ATG GAT GGA T
829	2	TGT GTG TGT GTG TGT GC	879	5	CTT CAC TTC ACT TCA
830	2	TGT GTG TGT GTG TGT GG	880	5	GGA GAG GAG AGG AGA
831	2	ATA TAT ATA TAT ATA TYA	881	5	GGG TGG GGT GGG GTG
832	2	ATA TAT ATA TAT ATA TYC	882	2	VBV ATA TAT ATA TAT AT



附表 4、續上表

App. Table 4. (continued)

引子		引子	
引子編號	重複數	引子編號	重複數
重		重	
引子序列 (5' → 3')		引子序列 (5' → 3')	
833	2	883	2
ATA TAT ATA TAT ATA TYG		BVB TAT ATA TAT ATA TA	
834	2	884	2
AGA GAG AGA GAG AGA GYT		HBH AGA GAG AGA GAG AG	
835	2	885	2
AGA GAG AGA GAG AGA GYC		BHB GAG AGA GAG AGA GA	
836	2	886	2
AGA GAG AGA GAG AGA GYA		VDV CTC TCT CTC TCT CT	
837	2	887	2
TAT ATA TAT ATA TAT ART		DVD TCT CTC TCT CTC TC	
838	2	888	2
TAT ATA TAT ATA TAT ARC		BDB CAC ACA CAC ACA CA	
839	2	889	2
TAT ATA TAT ATA TAT ARG		DBD ACA CAC ACA CAC AC	
840	2	890	2
GAG AGA GAG AGA GAG AYT		VHV GTG TGT GTG TGT GT	
841	2	891	2
GAG AGA GAG AGA GAG AYC		HVH TGT GTG TGT GTG TG	
842	2	892	
GAG AGA GAG AGA GAG AYG		TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C	
843	2	893	
CTC TCT CTC TCT CTC TRA		NNN NNN NNN NNN NNN	
844	2	894	
CTC TCT CTC TCT CTC TRC		TGG TAG CTC TTG ATC ANN NNN	
845	2	895	
CTC TCT CTC TCT CTC TRG		AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	
846	2	896	
CAC ACA CAC ACA CAC ART		AGG TCG CGG CCG CNN NNN NAT G	
847	2	897	
CAC ACA CAC ACA CAC ARC		CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G	
848	2	898	
CAC ACA CAC ACA CAC ARG		GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G	
849	2	899	
GTG TGT GTG TGT GTG TYA		CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A	
850	2	900	
GTG TGT GTG TGT GTG TYC		ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	

附表 5、本研究使用 53 對 SSR 引子

App. Table 5. The primers used for SSR analysis.

Locus name	Repeat type	Alleles no.	Size range	PIC	Forward primer	Reverse primer	Reference
CofEST-SSR01	(TC) <sub>13</sub>	3	150-154	0.31	TCGCGGTTTTTGGTTGCTTCCCAG	GCAGCATGGCAGAAAAACCTCAACTT	A
CofEST-SSR02	(AAG) <sub>4</sub> N(GAA) <sub>6</sub>	2	138-150	0.38	CTGCGAGGAGGAGTTAAAGATAACCAC	GCCGGGAGTCTAGGGTTCTGTG	A
CofEST-SSR03	(TC) <sub>13</sub>	6	138-157	0.63	GGACAAAAACACCGCCCAAAATA	AGCGAGACAGAGGAAAGGGAATATT	A
CofEST-SSR04	(AC) <sub>10</sub>	8	137-151	0.7	GGTCGCTCACTCATATCTCCAG	GCCTGGAAAAGCAAAACGCTCA	A
CofEST-SSR05	(GA) <sub>4</sub> CA(GA) <sub>4</sub>	1	104	0	AAGGGGCATTGAACAAGTTTGAC	TTTCCGATTTCTGCCCTTGCTTCTT	A
CofEST-SSR06	(AAAGG) <sub>4</sub>	2	129-133	0.16	CAGGCACAGAAAGAAATGAAGAGC	TGGTGGTATGGAACACAGGAAGG	A
CofEST-SSR07	(GGT) <sub>6</sub>	3	193-199	0.49	GGCCGCTCGTATCTGCTATGG	GGTAAACAGAGCCCCGTGAAC	A
CofEST-SSR08	(AAG) <sub>5</sub>	2	142-145	0.12	TCCATAACACAGAAATTCACAGAGAGA	ACCGTAACTCCCGTCTTCGAACTG	A
CofEST-SSR09	(GT) <sub>10</sub>	5	102-128	0.72	TTGGCTTTTGTCCTCCTTCCCTCTG	AGCCCATTTCCCTCTCATCAATTTCAAG	A
CofEST-SSR10	(CT) <sub>10</sub>	n.a.	n.a.	n.a	GGGGTTTTGATCGCGCA	AAGCGTATCAATTAATAAAAAAGAAAAAAA	A
CofEST-SSR11	(CA) <sub>5</sub> (TA) <sub>4</sub>	3	96-100	0.35	GGCCGAGGGGAAAAAAGAAGC	GGAAAACCTCACGAGAAAGATTACACAA	A
CofEST-SSR12	(TTC) <sub>12</sub>	2	114-120	0.37	CGCTGCTACTCCCTCTCCTCTCACT	GAGGCTGAGGCTTGAAGGAAAAATTAAT	A
CofEST-SSR13	(CT) <sub>12</sub>	6	115-139	0.77	TCGGGAGGCTAGGGTCTCTTTTGGT	AATCACTCTTCCCTCTTTTCTTAAACA	A
CofEST-SSR14	(AT) <sub>11</sub>	n.a.	n.a.	n.a	GCAGAGTACGCGGGGAG	TCCTTATGTTTGTGTGATTGAATGAT	A
DCM01	(AG) <sub>15</sub>	3	260-266	0.42	TTTTTTGGGAAATGAAGGTGC	TGCACTTCAAGATCCCCCTT	A
DCM02	(GAG) <sub>6</sub>	n.a.	n.a.	n.a	GCGGGGAGAGCAGTGAA	TCTTCAGCCTTCTCCTTGA	A
DCM03	(ACG) <sub>4</sub> N(ATG) <sub>6</sub>	n.a.	n.a.	n.a	TATGTGACGACGTGGGG	GTCATCTCTCGTCGATCATCC	A
DCM04	(ATA) <sub>6</sub>	5	117-129	0.62	TCAAAAAACACATGGAAAGCCA	CAACAGATCAGCTTTTGCCA	A
DCM05	(CGG) <sub>6</sub>	3	161-170	0.42	GGCATTGAGAATAAACCCCA	CGCCACCTCAGTCAACTTTT	A
DCM06	(T) <sub>10</sub> (TTC) <sub>5</sub> *	4	210-214	0.65	GTAGTCGGTGGGCTTGTGTT	AACGGGACTAATTGAGGAA	A

附表 5、(續上表)

App. Table 5. (continued)

Locus name	Repeat type	Alleles no.	Size range	PIC	Forward primer	Reverse primer	Reference
DCM09	(TGA) <sub>5</sub>	n.a.	n.a.	n.a.	TTGCGATGATGATTGAGA	TCGTATAATCGTCACATCG	A
DCM10	(TG) <sub>4</sub> N(GTT) <sub>5</sub> N(GGT) <sub>4</sub>	n.a.	n.a.	n.a.	TTGGTGTGTTGTGTTGGTGT	GACCACCACCATCACCATC	A
CM2	(AC) <sub>10</sub> (AT) <sub>9</sub>	3	177-229	0.3	TGTGATGCCATTAGCCTAGC	TCCAACAATGTGCTGGTGATT	B
CM5	(CCT) <sub>7</sub>	2	167-230	0.4	GTAACCACCACCCTCCTCTGC	TGGAGGTAACGGGAAGCTCTG	B
CM8	(GA) <sub>7</sub> (GT) <sub>12</sub>	3	159-183	0.6	GCCAAATTGTGCAAAAGTGCT	ATTCAATGGGGCCTTTGTCTT	B
CM16	(GA) <sub>14</sub>	3	95-129	0.42	TGGGAAAAGAAGGATATAGACAAGAG	GAGGGGGCTAAGGGAATAACATA	B
CFG75	(AG) <sub>16</sub>	3	107-127	0.36	AAGTAGATTGGTGAAAAGGGAAGC	TCCTTCATTTTCTCCTCTTGGTT	C
CFG92	(AG) <sub>5</sub> N <sub>8</sub> (AG) <sub>5</sub>	2	299-310	0.5	TGAGGGCAAAAGGAGTAAGAAAAG	TCAAACTTCAACAATCAAATACCC	C
CFG100	(AG) <sub>15</sub>	2	177-185	0.35	TTGACTCTTTTCTCTCCCAA	ATTTAGCAGGCTTGGCATTTTT	C
CFG189	(AG) <sub>10</sub>	4	254-284	0.46	CATCCATCCGAAAACTTGTAAAG	CAGCACTGGCAAAATAGCAACTCTT	C
CFG202	(AG) <sub>11</sub>	2	310-336	0.47	AGCGGAACGTGCATTTACCTACA	TGTGTAGCTTTTCTTTTGTCAATT	C
CFG207	(AG) <sub>15</sub>	3	113-135	0.6	TTGCTTCGTTTTAAATGTGAGG	AATTGTCTATAAAAAAGAGAGAGA	C
CFG222	(AG) <sub>5</sub>	2	419-432	0.41	GGGACCCACTAGTGGGAAAAG	CCTTACCCTTCCAAACAATTCACA	C
CFG249	(AG) <sub>13</sub>	1	333-364	0.44	TAAGAAGCCACGTGACAAAGTAAGG	TATGGCCCTTCTCGCTTTAGTT	C
CFG281	(AG) <sub>12</sub>	3	194-213	0.49	TCCTTCCTAACAGACTCCTACCC	CATTGCAAACTGGACTACCTCAT	C
CFG465	(AG) <sub>18</sub>	3	147-173	0.54	ACCTTTACTACTTATTACTCTC	ACATCCCTTGGCCATTTCTTC	C
CFG502	(AG) <sub>27</sub>	5	140-196	0.72	AAGCCACCAGAAAACAGCACATC	ATTTGCTTCTCATGTTCCCTTTCA	C
CMA0001	(GT) <sub>10</sub> (GT) <sub>8</sub>	2	n.a.	n.a.	AAAAAGCTGGTCCATGTCAA	GGGGCGTTCAGTTATAAACA	D
CMA0004	(CA) <sub>7</sub>	3	n.a.	n.a.	TTTTCTTGCTAACTTTTGAGGA	ACTCTAATGGGGTTCATGTGG	D
CMA0007	(CT) <sub>12</sub> (CA) <sub>11</sub> (CA) <sub>7</sub>	3	n.a.	n.a.	AGGCCTTCATCTCAAAAACC	AGCGTTACTTGAGGCAAAAGA	D

附表 5、(續上表)

App. Table 5. (continued)

Locus name	Repeat type and length	Alleles no.	Size range	PIC	Forward primer	Reverse primer	Reference
CMA0017	(CA) <sub>10</sub>	4	n.a.	n.a	TGACATAGGGGGCTAAATTG	TTAATGGTGACGCTTTTGATG	D
CMA0018	(CA) <sub>14</sub>	2	n.a.	n.a	CACTGGCATTAGAAAGCACCC	GGCAAAAGTCAATGATGACTC	D
CMA0019	(CA) <sub>7</sub>	2	n.a.	n.a	ATGCCAAGTCGGAAAAGAA	GGCAAGCTCTAGCCCTTTGA	D
CMA0020	(CA) <sub>8</sub>	2	n.a.	n.a	AGTGATCTTCGCAGCCATT	TCTTTTGTGACTGGGCTTC	D
CMA0024	(TG) <sub>14</sub>	2	n.a.	n.a	TGTTGCTGAACTGTGTGCT	TCCAGAGAAAATGTCGGAAAGT	D
CMA0267	(TC) <sub>13</sub> (TA) <sub>6</sub>	n.a.	n.a.	n.a	CAAGAGCAGACGATTCTCAATCT	TTGGGGTTAGGAAAATCACAAAT	D
DCM07	(TC) <sub>8</sub>	3	147-151	0.39	TTGGCTCCATGGATTTTGAT	TGATTAGCGCAGGTTCCACAG	A
DCM08	(AG) <sub>7</sub>	1	181	0	AAAGGCCATGTTAGGGAACC	AGGACGTGTCCAGACTCCAG	A
CMA0011	(CA) <sub>12</sub>	4	n.a.	n.a	AAGGGAGTGGATAAGAAGG	GGCTGGATTTGTGCTTTAAG	D
CMA0016	imperfect TG	5	n.a.	n.a	CTGGGTTGGTTCIGATTTTG	GGTCCCAGAGATTCTCTCC	D

Note: A- Aggarwal, R., P. Hendre, R. Varshney, P. Bhat, V. Krishnakumar, and L. Singh. 2007. Identification, characterization and utilization of EST-derived genetic

microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. TAG Theoretical and Applied Genetics 114:359-372

B- Baruah, A., V. Naik, P. Hendre, R. Rajkumar, P. Rajendrakumar, and R. Aggarwal. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from

*Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. Mol. Ecol. Notes 3:647-650.

C- Moncada, P., and S. McCouch. 2004. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. Genome 47:501-509.

D- Rovelli, P., Mettullo, R., Anthony, F., Anzueto, F., Lashermes, P., and Graziosi, G 2000. Microsatellites in *Coffea arabica* L. in Sera, T., Soccol, C. R.,

Pandey, A., and Roussos, S., eds. Coffee Biotechnology and Quality. Kluwer Academic Publishers. PP. 123-133.

附表 6、152 個台灣 *C. arabica* 咖啡以海拔高度區分進行 6 個植株外觀性狀之變方分析表

App. Table 6. the anova table based on 6 morphological traits of 152 *C. arabica* coffee germplasm in Taiwan.

Dependent Variable: 葉面積 II

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	3342.00789	477.42970	1.77	0.1039
altitude	1	1016.36268	1016.36268	3.78	0.0554
site*altitude	1	97.87836	97.87836	0.36	0.5481
estate (site)	60	25809.04993	430.15083	1.60	0.0250

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	3342.007890	477.429699	1.11	0.3688

----- altitude=0 -----

The MEANS Procedure

Analysis Variable : a2

N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
132	54.6166667	18.1535074	10.4000000	125.9300000

----- altitude=1 -----

Analysis Variable : a2

N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
20	62.6875000	21.0940173	31.1100000	104.8700000

Dependent Variable : 葉長

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	99.4511216	14.2073031	3.86	0.0011
altitude	1	14.7281488	14.7281488	4.00	0.0488
estate (site)	62	352.6164192	5.6873616	1.54	0.0331

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	99.45112159	14.20730308	2.50	0.0251

Dependent Variable : 葉寬

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	28.80752085	4.11536012	3.96	0.0009
altitude	1	10.05024024	10.05024024	9.68	0.0026
estate (site)	62	98.97762209	1.59641326	1.54	0.0347

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	28.80752085	4.11536012	2.58	0.0213

The MEANS Procedure

----- altitude=0 -----

N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
132	5.3907576	1.1736526	2.5600000	8.2600000

----- altitude=1 -----

N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
20	5.6785000	1.2964862	3.5300000	8.2500000

Dependent Variable : 葉長寬比

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	2.52225545	0.36032221	1.65	0.1340
altitude	1	0.74172024	0.74172024	3.39	0.0692
estate (site)	62	9.83353141	0.15860535	0.73	0.9064

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	2.52225545	0.36032221	2.27	0.0399

Dependent Variable : 節間長度

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	4354.847650	622.121093	4.73	0.0002
altitude	1	271.382172	271.382172	2.06	0.1548
estate (site)	62	9117.419717	147.055157	1.12	0.3171

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	4354.847650	622.121093	4.23	0.0007

Dependent Variable : 主幹與一次分支夾角

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	1306.852685	186.693241	2.66	0.0156
altitude	1	5.485714	5.485714	0.08	0.7803
estate (site)	62	6706.503690	108.169414	1.54	0.0333

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	1306.852685	186.693241	1.73	0.1193



附表 7、152 個台灣 *C. arabica* 咖啡以老樣與新苗區分進行 6 個植株外觀性狀之變方分析表

App. Table 7. the anova table based on 6 morphological traits of 152 *C. arabica* coffee germplasm in Taiwan.

Dependent Variable: 葉面積二

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	4514.93534	644.99076	2.22	0.0410
old	1	664.65375	664.65375	2.29	0.1344
estate (site)	62	24993.98372	403.12877	1.39	0.0834

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	4514.935342	644.990763	1.60	0.1522

Dependent Variable : 葉長

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	101.0771271	14.4395896	3.89	0.0011
old	1	12.5281500	12.5281500	3.38	0.0697
estate (site)	62	347.6875533	5.6078638	1.51	0.0403

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	101.0771271	14.4395896	2.57	0.0214

Dependent Variable : 葉寬

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	21.36699789	3.05242827	2.68	0.0151
old	1	1.96081667	1.96081667	1.72	0.1931
estate (site)	62	91.20805171	1.47109761	1.29	0.1388

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	21.36699789	3.05242827	2.07	0.0596

Dependent Variable : 葉長寬比

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	1.94444100	0.27777729	1.22	0.3019
old	1	0.00166667	0.00166667	0.01	0.9321
estate (site)	62	8.90481361	0.14362603	0.63	0.9705

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	1.94444100	0.27777729	1.93	0.0791

Dependent Variable : 節間長度

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-------------	-------------	---------	--------

site	7	5101.109931	728.729990	5.40	<.0001
old	1	0.166667	0.166667	0.00	0.9721
estate (site)	62	8598.857978	138.691258	1.03	0.4501

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

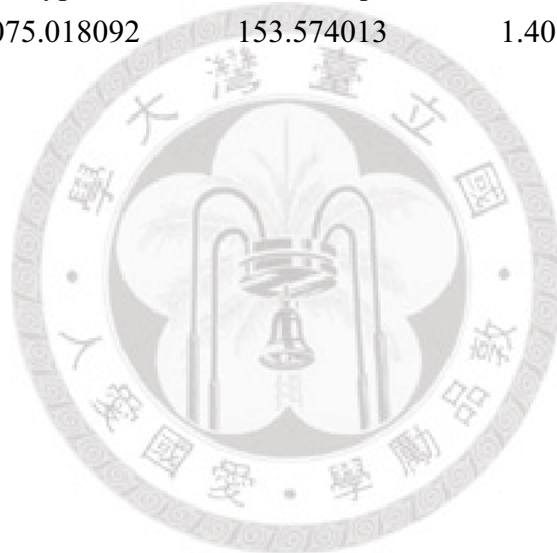
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	5101.109931	728.729990	5.25	<.0001

Dependent Variable : 主幹與一次分支夾角

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	1075.018092	153.574013	2.20	0.0428
old	1	20.166667	20.166667	0.29	0.5926
estate (site)	62	6823.967167	110.063987	1.58	0.0275

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	1075.018092	153.574013	1.40	0.2234



附表 8、56 個台灣 *C. arabica* 咖啡以海拔高度區分進行 4 個種子外觀性狀之變方分析表

App. Table 8. the anova table based on 4 seed morphological traits of 56 *C. arabica* coffee germplasm in Taiwan.

Dependent Variable : 帶殼種子長寬比

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.02250613	0.00321516	0.18	0.9859
altitude	1	0.00250000	0.00250000	0.14	0.7135
estate (site)	31	0.26830231	0.00865491	0.48	0.9595

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.02250613	0.00321516	0.37	0.9119

Dependent Variable : 帶殼種子長

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.08602690	0.01228956	0.96	0.4905
altitude	1	0.00062500	0.00062500	0.05	0.8279
estate (site)	31	0.52817499	0.01703790	1.33	0.2763

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.08602690	0.01228956	0.72	0.6549

Dependent Variable : 帶殼種子寬

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.08127845	0.01161121	4.10	0.0092
altitude	1	0.00202500	0.00202500	0.71	0.4103
estate (site)	31	0.18617752	0.00600573	2.12	0.0570

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.08127845	0.01161121	1.93	0.0977

Dependent Variable : 帶殼種子長寬厚

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	89.49656899	12.78522414	165.83	<.0001
altitude	1	0.14062500	0.14062500	1.82	0.1956
estate (site)	31	1.09426667	0.03529892	0.46	0.9696

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for estate (site) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	89.49656899	12.78522414	362.20	<.0001

附表 9、56 個台灣 *C. arabica* 咖啡以老欖與新苗區分進行 4 個種子外觀性狀之變方分析表

App. Table 9. the anova table based on 4 seed morphological traits of 56 *C. arabica* coffee germplasm in Taiwan.

Dependent Variable : 帶殼種子長寬比

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.03771143	0.00538735	0.32	0.9360
old	1	0.00391016	0.00391016	0.23	0.6376
estate (site)	30	0.29204984	0.00973499	0.57	0.9113

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.01300603	0.00185800	0.19	0.9852

Dependent Variable : 帶殼種子長

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.16471643	0.02353092	1.95	0.1237
old	1	0.00854204	0.00854204	0.71	0.4120
estate (site)	30	0.53412546	0.01780418	1.47	0.2015

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.16308149	0.02329736	1.31	0.2804

Dependent Variable : 帶殼種子寬

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.14940702	0.02134386	7.66	0.0003
old	1	0.00001315	0.00001315	0.00	0.9460
estate (site)	30	0.19068518	0.00635617	2.28	0.0383

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	0.14496893	0.02070985	3.26	0.0108

Dependent Variable : 帶殼種子長寬厚

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	106.3040629	15.1862947	187.86	<.0001
old	1	0.0131131	0.0131131	0.16	0.6921
estate (site)	30	1.0486627	0.0349554	0.43	0.9783

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
site	7	86.60429869	12.37204267	353.94	<.0001