

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

以園藝性狀與簡單重複性序列評估臺灣芥藍之  
遺傳歧異度

Genetic Diversity among Chinese Kale in Taiwan  
Assessed by Horticultural Traits and SSR Markers

蔣順惠

Shun-hui Chiang

指導教授：林彥蓉 博士

Advisor : Yann-rong Lin, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書


以園藝性狀與簡單重複性序列評估  
臺灣芥藍之遺傳歧異度

Genetic Diversity among Chinese Kale in Taiwan  
Assessed by Horticultural Traits and SSR Markers


本論文係蔣順惠君 (R97621110) 在國立臺灣大學農藝學系完成之碩士論文，於民國 103 年 7 月 30 日承下列考試委員審查及口試及格，特此證明

口試委員:(依姓氏筆畫排列)

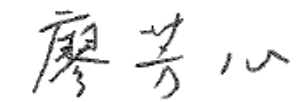
國立臺灣大學農藝學系副教授

  
林彥蓉 博士  
(指導教授)

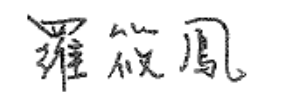
國立臺灣大學農藝學系副教授

  
胡凱康 博士

行政院農業委員會桃園區農業改良場研究員

  
廖芳心 博士

國立臺灣大學園藝暨景觀學系教授

  
羅筱鳳 博士

## 誌 謝



終於走到寫誌謝這一步了，儘管一切是多年前的自己始料未及的狀態，最後能拿到學位是靠著太多人的幫忙和鼓勵，自己才有勇氣完成碩士學位的研修。本試驗承蒙桃園區農業改良場之材料提供及科技計畫支持得以完成，感謝最後四位口試委員臺大園藝暨景觀學系羅筱鳳老師、桃園區農業改良場廖芳心研究員、本系胡凱康老師及我的指導老師林彥蓉老師等人熱心討論並給與論文許多指點。

生活上最感謝媽媽，總是耐心待我，包容我的所有的情緒，給予無盡的支持和鼓勵。其次是我的指導老師林彥蓉老師，謝謝她總是在我要對自己失去信心的時候，相信我、幫我加油打氣，給我無比的信心，不但是良師、也是益友，教導我許多不一樣的思維和開放的心胸。也很感謝胡凱康老師，總是耐心地與資質魯鈍的我討論育種和實驗上的問題。感謝我最好的朋友芳瑜、泰佑、紗紗、小濬、最棒的學姐雅淨及最重要的朝元，沒有你們常常在旁鼓勵，接受我的任性、給我正能量，我也無法有驚無險地走到今天。而漫長繁重的實驗過程中，幸好有 Energy 及小草學長及時的討論及建議新的實驗技術、幫忙建置設備，不然我真的無法完成這個學位，十分感謝他們。學校實驗室一直是充滿回憶和溫暖的地方，這些日子以來謝謝實驗室的大家，包括 NaNa、昇哥、勝偉、Hannah Pu、拉泡、孟穎、瀨予、浩涵、東東、歆雅、柔誼、及傑超等等大家的幫忙，我才能在最後來得及趕完實驗。工作上也感謝在桃改場各位長官對我修研學位的支持和鼓勵，以及臺北分場各位同仁及技工大哥們在這段時間的幫忙和包容。

花了很多時間和精神走到今天，歷經自己的心情上的困鈍、工作及學業上的困難，但也學到了很多，藉此經驗也更認識自己。希望完成這樣一個人生的里程碑，能發揮更多所學和提升自己各方面的能力，我想也不枉經歷這些。再次感謝大家，謝謝你們!!

蔣順惠 2014.7.30

## 中文摘要



十字花科蕓薹屬甘藍類蔬菜廣為世界各地不同民族栽培利用，而芥藍屬於其下之變種，分類上較接近於原始型的甘藍類植物，葉片不結球且分皺葉或非皺葉，花色有黃色和白花色兩種等植株形態多變，但一般以花色為主要區別特徵。主要栽培於東南亞、臺灣及中國大陸等地。在臺灣以採收小葉菜用之白花芥藍及採收花薹的黃花芥藍為栽培之主流，而品種以開放授粉之農民自留種或地方種為主，部分葉菜用品種採用一代雜交之商業品種，因此有利於遺傳變異之保存。一般認為芥藍與青花菜及花椰菜等其他主流甘藍類作物相比，具有早生及耐熱之特性，在極端天氣頻繁發生的現在，芥藍可能為甘藍類作物育種之重要資源。由了解其種原間遺傳歧異度及遺傳結構，將有助於制定育種策略，提升育種工作之效率。

本試驗採用 25 個芥藍蒐集自臺灣各地之種原，並以 1 個青花菜商業品種作為芥藍與近緣物種歧異度之參考。分別就外觀性狀及分子標誌多型性兩方面探討種原間的歧異度。外觀性狀以七個性狀調查資料對 25 個芥藍種原進行主成分分析，視覺化種原間以性狀資料建構的分類關係。另外利用 20 個簡單重覆序列（Simple sequence repeat；SSR）分子標誌對每個種原內 20 個個體進行對偶基因片段之擴增。總共使用 520 株單株擴增之對偶基因以計算種原內之對偶基因頻度進行種原間及種原內遺傳歧異度分析。

試驗結果在外觀性狀調查資料顯示芥藍種原之分類大致可按花色分為兩大類，與過去研究相同。而 SSR 分子標誌部分之結果顯示，一代雜交種及專業種苗商之商業品種種原間遺傳歧異度明顯低於其他農民自留種種原。而種原間包含青花菜在內，以 modified Roger's distance 表示之遺傳距離介於 0.31 - 2.79，而芥藍種原間之遺傳距離介於 0.31 - 2.36。而利用遺傳距離之主座標分析及 UPGMA 親緣樹圖則顯示可將種原粗略分為黃花及白花兩群，但其中仍少部分種原未按照花色分群。結合 UPGMA 親緣樹圖及族群分化指數之結果顯示，整體芥藍種原

間大部分呈現高度遺傳分化，且黃花芥藍種原間遺傳距離較白花芥藍種原間大，可能由於授粉及採種方式不同所致。此外，而黃花芥藍種原內具有兩個次群集，白花種原內有 1 個，都是次群集內種原相似度極高可能群內種原最初來源相同。在明確了解芥藍種原內及種原間之遺傳歧異度，能更妥善運用資源進行重要種原維護及提供更多種原間資訊給育種者以提升育種工作之效率。

中文關鍵字：芥藍、簡單重覆性序列分子標誌、遺傳歧異度、群集分析、主座標分析、

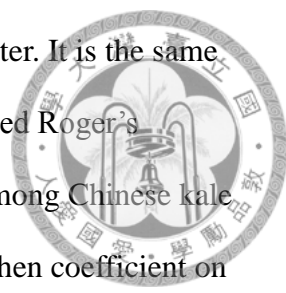
## 英文摘要



Many kinds of varieties of *Brassica oleracea* L. has been popularly grown in the world as vegetables. Chinese kale is one of these vegetables which closely relates to primitive type *Brassica oleracea* L on taxonomy. The appearance of Chinese kale is various including not heading leaves, leaves curly or not etc., but generally distinguished by flower color , white or yellow. Southern Asia, Taiwan and China are main production area. There are two main kinds of product types in Taiwan include harvesting young plant as leafy vegetable (white flower type), or cutting flowered stalk to sale (yellow flower type). The cultured varieties in Taiwan mostly come from seed propagated by farmers and commercial F1 hybrid seed for leafy vegetable used. Therefore, it is benefit to conserve genetic diversity. It has been believe that Chinese kale is grow faster and more heat tolerance than broccoli and cauliflower. Nowadays, extreme weather frequently happened in Taiwan, therefore Chinese kale may be important breeding resource for heating tolerance of *Brassica oleracea* L. vegetables. Through revealing the genetic diversity and structure between Chinese kale accessions, that would be benefit for us to decide efficient breeding procedure.

The purpose of this study was to investigate the genetic diversity and genetic structure of Chinese kale accessions in Taiwan. We used 25 Chinese kale accessions and one commercial broccoli variety as a reference of related species. 7 appearance characters of 25 Chinese kale accessions was use to classified them by Principle component analysis. Furthermor, we use 20 SSR markers to amplify total 80 alleles of total 520 individuals, which means 20 individuals per accession, for genetic diversity analysis among and within accessions.

In the result of our study, Chinese kale accessions could classified generally

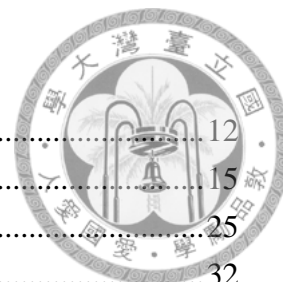


into two groups by colors through the analysis of appearance character. It is the same conclusion of the studies in the past. On DNA level analysis, modified Roger's distance among all accessions was 0.31 – 2.79 and was 0.31-2.36 among Chinese kale accessions. 25 Chinese kale accessions separated into two groups when coefficient on UPGMA phylogenic tree was 1.7 and similar result was on 3D plot of principle coordinate analysis. Furthermore, Fst value and genetic distance revealed that most accessions highly differentiated with each other, but several accessions were very close related. Close related accessions formed three sub-clusters respectively, which two were in yellow-flower cluster and one was in white-flower cluster. Furthermore, the diversity of yellow flower Chinese kale accession was larger the white flower accessions especially than commercial variety. We inferred that might be the result of open-pollination propagate habit of yellow Chinese kale accessions. After we realized the genetic similarity and structure among Chinese kale accessions, we could use resources and execute breeding procedure efficiently.

keywords : *Brassica oleracea* L. var. *alboglabra*, genetic structure, SSR marker, genetic diversity, clustering analysis, principle coordinate analysis

## 表目錄

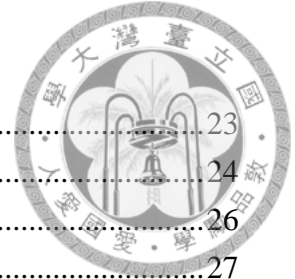
表一、25 個參試芥藍種原及 1 個青花菜種原之來源 .....	12
表二、20 個參試 SSR 分子標誌資料 .....	15
表三、7 個性狀之變方分析表 .....	25
表四、20 個分子標誌之歧異度參數 .....	32
表五、26 個種原內之遺傳歧異度參數 .....	34
表六、26 個種原間之遺傳距離 .....	36
表七、26 個芥藍種原間族群分化指數 ( <i>Fst</i> ) .....	41



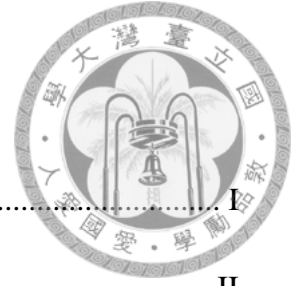


## 圖目錄

圖一、26 個芥藍種原之 7 個性狀資料分布 .....	23
圖二、7 個性狀調查項目間之相關係數及散布圖 .....	24
圖三、25 個芥藍種原之 2D 主成分分析圖.....	26
圖四、25 個芥藍種原之 3D 主成分分析圖.....	27
圖五、SSR 分子標誌 BnEMS1119，應用於六個種原之 PCR 產物於 2.0% 洋菜膠片 之電泳結果 .....	29
圖六、依多型性對偶基因擴增數目統計之 SSR 分子標誌數量分布 .....	31
圖七、以 20 個分子標誌對偶基因分析 26 個種原之主座標分析三維圖 .....	37
圖八、26 個芥藍種原不加權平均重法 (UPGMA) 演算親緣樹圖.....	40

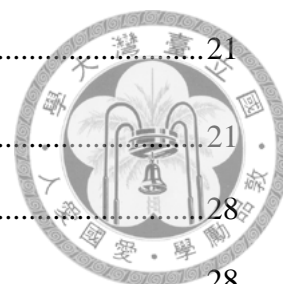


## 內容目錄



誌謝.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
表目錄.....	VI
圖目錄.....	VII
內容目錄.....	1
壹、前言.....	3
一、芥藍簡介及起源.....	3
二、芥藍分類地位及歧異度之相關研究.....	4
(一)、非以 PCR 產物差異為基礎之分類研究.....	4
(二)、以 PCR 產物為基礎之分類研究.....	5
(三)、芥藍變種內之遺傳歧異度.....	6
三、臺灣芥藍栽培及品種現況.....	7
貳、材料與方法.....	11
一、試驗材料.....	11
二、芥藍葉片 DNA 萃取.....	11
三、植株性狀調查.....	13
四、SSR 基因型分析.....	14
五、資料分析.....	16
(一)、性狀之統計分析.....	16
(二)、遺傳歧異度分析.....	17

參、 結果.....	21
一、 芥藍外觀性狀資料分析.....	21
二、 遺傳歧異度分析.....	28
(一)、 SSR 分子標誌之歧異度 .....	28
(二)、 種原內之遺傳歧異度.....	33
(三)、 種原間的遺傳歧異度分析.....	35
肆、 討論.....	42
芥藍種原內遺傳變異性.....	44
芥藍種原間遺傳歧異度分析.....	46
伍、 參考文獻.....	49
陸、 附錄.....	55





## 壹、前言

### 一、芥藍簡介及起源

芥藍又名芥蘭，學名為 *Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* (L. H. Bailey) Musil，一般英文俗名稱為 Chinese kale。屬於十字花科(Brassicaceae)一至二年生草本作物(劉與關，1997。)，與其他甘藍類作物同屬 CC genome，具 9 對染色體 ( $2n = 18$ )。一般利用方式為採摘全株或側芽食用其嫩葉、嫩莖，亦可採收其幼嫩花薹食用作蔬菜使用 (蕭，2005；Okuda and Fujime, 1996.)。葉片、莖部等所有營養生長組織呈現無毛光滑的外觀，顏色由淺黃綠至藍綠色，葉片有不同的皺葉程度。主根具強烈分枝性，營養生長期植株高度可達 40 公分，開花後到生育末期時，含花序高度可達 1 至 2 公尺，葉片不會如甘藍形成葉球。花序為頂生或腋生的總狀花序，長度達 30 至 40 公分，低溫需求不高，且容易開花及留種。花色為白色或黃色，小花梗為 1 至 2 公分長，(蕭與陳，2011；Dixon, 2007, Okuda *et al.*, 1996.)。

十字花科甘藍類植物起源於地中海沿岸、希臘及英國西南方威爾斯(Wales)等地區(Song *et al.* 1990；Babula *et al.* 2007)。但現今的甘藍類作物隨著數千年人類栽培馴化或常與地理位置鄰近的其他十字花科作物相互雜交，部分作物彼此之間的分類地位或親源關係仍存在許多疑點(Dixon, 2007)。芥藍目前雖無明確的野生型祖先型態為何，但芥藍的葉片型態除了顯示野生型之 *Brassica oleracea* L. 為其先祖外，其抽薹開花快速之特性相似於 *Brassica cretica* subsp. *nivea*，此為一個栽培於希臘南方及土耳其西南方之作物 (Prakash *et al.*, 2011)，芥藍也可能與其有親源關係 (Dixon, 2007)。在中國的記載從西元 11 世紀的北宋到 13、14 世紀的金、元時期皆有記載，如宋代文學家蘇東坡於西元 1094—1098 撰寫之《雨後行菜園》詩中曾寫下「芥藍如菌蕈，脆美牙頰響」(張，2009)。另外，曾有記錄於義大利發現芥藍 (梁，2007)，以及義大利已稀少存在之地方種 'Mugnoli' (*Brassica olearace* L.) (Laghetti *et al.*, 2005) 之花薹外型與芥藍相似。推測芥藍可

能因中世紀栽培或貿易等人為活動，經由希臘傳至東地中海地區，進而傳入中國，或是傳入後經馴化原產於中國南方(張，2009；Dixon, 2007；Zhang and Zhang, 2014)，現已廣泛栽培於中國、日本、臺灣及東南亞(Okuda and Fujime, 1996)。




## 二、芥藍分類地位及歧異度之相關研究

芥藍相對於其他甘藍類植物之分類地位一直存在兩種觀點，一種認為芥藍屬甘藍類植物之一個變種，另一種則認為芥藍為獨立於甘藍類之另一個種，應定名為 *Brassica alboglabra*。長久以來許多研究者分別從外觀形態 (Bailey, 1922, 劉海濤 and 關佩聰, 1998)、雜交親和性 (周等, 2010；劉與關, 1998)、染色體結構 (王與羅, 1987)、同功異構酶 (劉等, 1998；Simonsen and Heneen, 1995) 及以聚合酶鏈式反應 (polymerase chain reaction；PCR) 產物為基礎之 DNA 分子標誌 (Izzah *et al.*, 2013；Lazaro and Aguinagalde, 1996；Mei *et al.*, 2010；Song *et al.*, 1990) 等各方面之差異，進行芥藍與其他甘藍類植物之親源性及歧異度研究，進而更深入探討芥藍種內之遺傳歧異度 (劉與關, 1997；Okuda *et al.*, 1996；Zhang *et al.*, 2014)。

### (一)、非以 PCR (polymerase chain reaction) 產物差異為基礎之分類研究

Bailey (1922) 最早對芥藍進行分類之研究，其材料為廣東的白花芥藍，以其外觀上花色為白色，及一年生特性與一般甘藍類作物多屬黃花且二年生之特性不同，認為芥藍應為一個獨立物種。Snogerup (1980) 也曾發表芥藍可能源自於 *Brassica cretica* ssp. *nivea*，認為其應為不同於甘藍類之物種 (Babula *et al.*, 2007)。在後續研究中，芥藍與其他甘藍類作物之正反交均表現出雜交親合性 (周等, 2010；劉等, 1998)，且雜交組合後代可順利產生 F<sub>2</sub> 種子，以及 F<sub>2</sub> 種子可順利萌芽成長，由此判斷芥藍為甘藍類之變種 (周等, 2010)。


王與羅 (1987) 以 C-banding 技術比較芥藍及結球甘藍之染色體組型態，兩者表現一致而支持芥藍為甘藍變種。而 Simonsen 與 Heneen (1995) 以十種同功異構酶之水平澱粉膠體電泳 (starch gel electrophoresis) 條帶結果對 48 個不結球



白菜種原及 6 甘藍類栽培種其間之遺傳變異進行分析，來自中國之芥藍與其他 5 個瑞典的甘藍類作物，包括結球甘藍(White cabbage)、孢子甘藍(Brussels sprouts)、皺葉甘藍(Savoy cabbage)、花椰菜(Cauliflower)及青花菜(Broccoli)之親源分析結果顯示，芥藍與甘藍類現代之栽培種親源並不接近。劉和關(1998)針對芥藍與其他來自中國、荷蘭及日本之甘藍類栽培種之幼苗形態及種子及幼苗的過氧化物同功異構酶進行聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)之結果進行探討。芥藍幼苗形態與其他甘藍類作物大部份特徵相同，而過氧化物同功酶之條帶除孢子甘藍外，其他皆相同，但芥藍部份條帶深淺與其他不同，雖顯示具有密切之親源關係，但考慮結球甘藍及花椰菜傳入中國僅 300 多年歷史，以及花色上芥藍有白色及黃色兩種，其他甘藍類作物花色僅黃色，認為芥藍更適合定為一獨立種，而非甘藍類之變種。

## (二)、以 PCR 產物為基礎之分類研究

早期較完整之分析為 Song *et al.* (1988b) 以 13 個細胞核基因組探針與 4 種限制酶共形成 21 種組合，利用 RFLP (restriction fragment length polymorphism; 限制酶片段長度多型性) 分子標誌對蕓薹屬內六種主要栽培物種(*B. rapa*, *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. napus*, *B. juncea* 及 *B. carinata*)、其他 3 種蕓薹屬物種 (*B. adpressa*、*B. fruticulosa* 及 *B. tournefortii*)、蘿蔔(*Raphanus sativus*)及野芥(*Sinapis arvensis*) 進行分類，其結果為油菜類 (*B. rapa*) 及甘藍類作物 (*B. oleracea*) 可能演化自共同的祖先，並屬於野生的甘藍類植物或其他具 9 對染色體之蕓薹屬物種。之後利用 39 個探針與限制酶之組合，進一步探討 10 個油菜類 (*B. rapa*) 及 9 個甘藍類作物 (*B. oleracea*) 與 13 個具有九條染色體之野生蕓薹屬植物，以及 6 個其他近緣植物之分類關係。結果顯示現有栽培種之甘藍類作物源自於共同祖先且可能類似於野生甘藍或野生芥藍，就親源樹圖來看，芥藍之栽培種及 Portugese tree kale 兩種，較結球甘藍、花椰菜、青花菜等其他栽培種之親源而言是較獨立其外但仍被群聚在一起 (Song *et al.*, 1990)。



而不同的分子標誌亦有相似之分類結果，芥藍未與其他甘藍類作物緊密群集。從 6 個條帶再現性佳的 RAPD (random amplified polymorphism DNA；隨機增殖多型性 DNA) 分子標誌對具 9 對染色體之 22 個蕓薹屬植物進行親源分析，其中包含 1 個來自中國的芥藍商業品種。分析結果將 22 個蕓薹屬植物分成三個群類：西歐地區群、西西里島群及愛琴海地區群。芥藍非與取自英國及法國之甘藍類植物群集在一起，而是首先與 *B. hilarionis* Post. 群集，之後便與多個 *B. cretica* 之亞種作物同分於愛琴海地區群之中 (Lazaro *et al.*, 1996)。但在 Mei *et al.* (2010) 利用 AFLP (amplified fragment length polymorphism；增殖片段長度多型性) 分子標誌及簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR) 分子標誌之研究下，芥藍雖未與 *B. hilarionis* 分入同群，但相較其他野生蕓薹屬植物而言，與 *B. cretica* 有較接近之親源，在 Nei's 遺傳距離僅小於 0.4，其次為 *B. hilarionis*。這個結果也呼應其他研究者對芥藍與 *B. cretica* 可能具親源性之看法 (Dixon, 2007)。

再參考近年 SSR 分子標誌應用於分析甘藍類作物之起源、分類及遺傳歧異度研究結果，芥藍與花椰菜或青花菜有較近之親源關係 (Izzah *et al.* 2013；Song *et al.*, 1988a)，甚至經 Structure 軟體分析 148 個 SSR 分子標誌在 91 個甘藍類商業品種上產生的條帶後，族群結構分析結果將芥藍與花椰菜分入相同群 (Izzah *et al.*, 2013)。而芥藍較不易和結球甘藍分入同一群集，與先前 RFLP 及 RAPD 分子標誌之分析結果相似 (Lazaro *et al.*, 1996；Song *et al.*, 1990)。由此等證據可知，芥藍確實與甘藍類作物具有相近的親源關係，又並非如結球甘藍、青花菜及花椰菜等直接由較早期的栽培種甘藍衍生分化而來。更可能接近於原始的甘藍或芥藍，且與 *B. cretica* ssp. *nivea* 具親源關係，但仍屬於甘藍類植物之範疇下，因此仍屬甘藍類之變種。

### (三)、芥藍變種內之遺傳歧異度

在芥藍族群內相關之研究，外觀型態方面，Okuda 與 Fujime (1996) 將 18 個蒐集自日本、臺灣、中國及泰國之芥藍栽培種，按照花瓣顏色、葉色及葉形分

類成五群，先由花色分為黃色或白色為兩群，而這也是多數人觀念中的分類方式。其中白花群葉色皆為深綠，並按是否具蠟質之灰白色分為兩群，第一群葉色具蠟質灰白且葉形圓形，而第二群葉色無蠟質灰白色且葉形為卵形和橢圓形。第三群植株型態與第二群相似，唯第三群植株花瓣顏色為白或黃。第四及第五群則皆為黃花，第四群葉色淡綠且葉形圓形。第五群葉色較深，葉形為卵形(Okuda and Fujime, 1996)。


在花序、花粉及同功酶方面之觀察，黃花及白花皆為總狀花序，花粉外觀同樣多為長球形且具三條細溝槽，也與其他十字花科花粉特徵相似。兩者比較其幼苗過氧化物同功酶之結果有相同條帶表現，但有條帶寬窄和顏色深淺之差別。而黃花與白花芥藍正反交之結果率皆達 100%，且雜交第一代皆呈白花而顯示兩者在分類上為同種 (species) 的兩個栽培種 (cultivars)，白花基因相對於黃花基因為顯性 (周等，2010；劉與關，1997)。

其他研究中，結合 RAPD 與 SRAP (sequence related amplified polymorphism) 分子標誌核酸條帶擴增之結果，也利用 Jarccard's similarity coefficients 配合不加權平均重法 (UPGMA) 進行叢集分析，分析 21 個由亞洲蔬菜研究發展中心 (Asian vegetable research and development center, AVRDC) 所提供之芥藍種原 (accession)，部份種原無法按花色分群 (Zhang et al., 2014)，而種原間之相似度在 0.42-0.72。而 Celucia *et al.* 等人 (2009) 曾利用 SSR 分子標誌對 28 個芥藍種原 (accession) 及不結球白菜種原進行遺傳特徵之分析，雖然分子標誌之多型性達 71.08%，顯示種原間的高遺傳歧異度，但可能受白菜類及與甘藍類同時分析之影響。就芥藍種原間的遺傳歧異性與種原來源地區相關連，即被歸為同群者，多屬相同物種及來自相同的地區。

### 三、臺灣芥藍栽培及品種現況

臺灣的芥藍早期是由中國大陸或東南亞傳入，黃花芥藍於明末及清初時期引自中國大陸，而白花芥藍於光復後才由香港引入 (蕭，2005；蕭與陳，2011)。






在臺灣於 1996 年以前以家庭栽培為主（蕭與陳，2011），之後漸成為專業生產蔬菜品項之一。全臺栽培面積曾在 2003 年達 1981 公頃。隨就業型態的轉變、農業人口的減少，栽培面積為下滑減少的趨勢，自至 2013 年全年作面積約為 1066 公頃，（農業部農糧署，2014）。由於甘藍類為性喜冷涼之植物，仍以秋冬栽培居多，因此一期作栽培面積較少約 309 公頃、二期作為 360 公頃，裡作則為 397 公頃。其中雲林縣為全年栽培面積最大、其次在裡作及一期作新北市栽培面積位居第二，只有在二期作高雄市地區才是第二大栽培面積地區（農委會農糧署，2014）。由於芥藍有多種消售型態，但主要是以作為收穫全株作小葉菜，或多次採收其花薹販賣為主力商品。而雲林等中南部等地芥藍多以一年四季可栽培之白花芥藍作葉菜用栽培為主，到秋冬才有薹用芥藍栽培，且仍以白花居多。而北部地區因氣候及消費習慣，主要為裡作及初春栽培黃花芥藍採作為薹用商品，也有部份為溫網室葉菜生產者栽培白花芥藍。

歷經長久的栽培，因臺灣不同地區的氣候條件、不同人為選拔、留種的操作，以及更多的種子來源，如引種、外國商業品種等，使得在臺灣的芥藍品種及地方種種類及名稱十分多樣。一般芥藍品種之命名多以其型態特徵為主，以花色、薹形、葉色、葉形、葉面、花期等加上生產栽培區之地名做為品種名稱。由 1994 年的臺灣地區現有作物栽培名錄十字花科篇刊載之品種便可了解，其中包含‘金鐘黃花白芥’、‘圓葉白花’、‘綠光皺葉白花’、‘二號大心黑芥藍’、‘新豐圓葉黃花’等 16 個商業品種。另外，在 2014 年的國家作物種原中心現存材料種類及數量統計，中期庫芥藍共 218 項，長期庫芥藍共有 119 項，其命名亦有此趨勢。

族群的定義可以從既有的常識或概念建構，如地理區隔、文化、語言及外在特徵定義，但我們無法確定在這樣的分類下，是否一個族群內的個體在遺傳組成層面也符合一致的特徵。梁（2007）進一步對 44 個來自臺灣、大陸、日本、泰國、印度等地的芥藍種原外觀增加多項描述，包含種子百粒重、葉長寬比、葉長與葉柄比值、平均節間長度、莖粗等項，並將大部份芥藍種原分為黑格藍、白格



林及黃花芥藍群。黑格藍群葉色深綠及中段莖徑較粗，白格林群則明顯葉綠素讀值最低，葉色較為黃綠，而黃花芥藍群植株較高大、葉柄長、節間長及抽薹性晚。更深入以 29 個 RAPD 分子標誌及 33 個 ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子標誌分別針對這 44 個芥藍種原 (accession) 進行政異度分析。每個種原以 12 株個體 DNA 混合為一個樣品進行擴增並分析其產生之條帶，並利用。RAPD 分子標誌之 Jaccard 相似係數介於 0.51-0.96，平均為 0.74，而 ISSR 分子標誌之 Jaccard 相似係數介於 0.57-0.96，平均為 0.72，兩種分子標誌結果類似。觀察親源樹圖，兩種分子標誌分析之分群結果大致與型態分群及栽培地區之差異相符合。另外，黃花芥藍群內之差異較白格林群及黑格林群為大，推測因黃花芥藍栽培具地域性且未大量生產商業化種子，而保留較多之遺傳變異。

芥藍在全球雖不是主流蔬菜生產類別，但就臺灣、東南亞一帶及擁有眾多人口之中國大陸而言，已是蔬菜生產或一般飲食中不可獲缺的作物種類之一。且過往的研究也曾提出芥藍較一般甘藍類之結球甘藍、青花菜及花椰菜而言，可能具有較為早生、耐熱、耐候之特性 (Dixon, 2007, Okuda *et al.*, 1996)，甘藍類作物在世界蔬菜生產佔極重要之地位，全世界生產量也逐年持續增加 (FAO, 2011)，而國外也有應用芥藍進行其他十字花科品種改良之策略 (Rahman *et al.*, 2011)。在氣候變化劇烈、極端天氣出現頻繁的今天，對於甘藍類作物之育種改良上，其基因體之資源能發揮什麼樣的角色及作用，更值得深入研究。

對栽培生產者而言，栽培品種生育之一致性，有利於生產規劃及管理。目前市面上除了專業種子、種苗業者生產之商業品種外，也有流通於各栽培生產地區週邊，為農民自留之固定品種。然而其中大多非一代雜交品種，偶有品種特性難以穩定維持之問題發生。少部份一代雜交品種來自日本和國內專業種苗業者之商業品種，如‘翠寶芥藍’和‘翠津’等，栽培時相對有較穩定之表現。

目前商業品種及地方種間之親緣關係未明，且地方種內可能蘊涵，可協助未來耐候及抗病蟲害育種之未知遺傳育種資源 (Christensen *et al.*, 2011)。對育種者

而言，不論是為了改善其他蕓苔屬作物或是培育更優良穩定之芥藍品種，解構其種原之遺傳變異及遺傳結構，為最基本的第一步。然而了解的方式多半僅從實際栽培觀查著手，相對需要許多人力和時間的投入。芥藍變種內之歧異度目前雖已有諸多方面之探討，但多半為外觀觀察資料及利用分子標誌之條帶分析後所得之親源樹狀圖或主成分分析圖加以人工判讀其分群情形，而且只能看到種原分類，而無法看初種原內的變異情形，無法估算族群結構相關之資料以呼應分群結果實為可惜。

因此本研究之目的為針對 26 個蒐集自台灣各地之芥藍種原，進行園藝性狀之調查及 SSR 分子標誌對偶基因之擴增，探討種原間之遺傳歧異度、親緣關係，以及種原間分化之程度，以利了解種原間及種原內之變異情形。可協助有限資源投入種原維護之分配，以及提高未來育種工作之前期效率。種原間之親緣關係在未來亦可進一步作為雜交育種材料選擇之參考，有助於獲得選拔所需之遺傳變異，提高篩選得到優良品種之可能性。

## 貳、材料與方法

### 一、試驗材料

本試驗材料由桃園區農業改良場提供蒐集自新北市樹林區、新莊區、蘆洲區、板橋區、三重區，以及臺中市大甲區，臺南市，宜蘭縣、高雄市、日本、泰國等地之芥藍種子共 25 份，另以農友種苗股份有限公司之青花菜品種‘清華’作為歧異度分析時之外群(表一)。其中芥藍種原部分包含農友種苗股份有限公司、豐田種子行、明豐種子行等種子種苗業者之商業品種共 18 份，以及農民自留種 7 份。參試材料於桃園區農業改良場臺北分場進行育苗及栽培，25 份芥藍種原及外群青花菜‘清華’分別逢機選取 20 株進行 DNA 萃取及後續遺傳歧異度之分析。

種子經浸種 4 小時後，種子以清水潤洗一次，分別置於 ADVANTEC<sup>®</sup> 定性濾紙 NO.1 (90 mm) 上放入培養皿中，加入 2 至 3 mL 蒸餾水後蓋上培養皿蓋。將培養皿置於設定 23°C 且黑暗之生長箱中進行催芽，待約 36 小時後胚根吐露時進行於民國 103 年 4 月 30 日播種。播種時採用 BVB Substrate<sup>®</sup> 7A 介質填裝於 128 格穴盤中，人工播種後每穴格再覆蓋介質，厚度約 3 到 5 mm。完成播種後澆水至穴格內介質充分吸水，並於簡易溫室下進行育苗。播種後約 5 天植片子葉完全展開，至播種後第 7 天使用 Peters<sup>®</sup> 花多多肥 (20—20—20) 稀釋 1000 倍作為液肥施用，之後每四天澆施一次液肥。幼苗於播種後 21 天具本葉 3 至 4 片，達可定植的狀態。

### 二、芥藍葉片 DNA 萃取

DNA 萃取方法以 Li *et al.* (1995) 之方法加以修改使用。芥藍幼苗達本葉 2 至 3 片時，每一單株分別剪取葉片面積約 1.5 cm<sup>2</sup>，剪細置入 1.5 mL 之微量離心管內及放入 1 粒鋼珠，再加入 700 μL DNA 萃取液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 1.25% SDS)，以 TissueLyser<sup>™</sup> (Qiagen, German) 設定為單次震盪頻率每秒 30 次、震盪 1 分鐘，快速打碎葉片組織，共




表一、25 個參試芥藍種原及 1 個青花菜種原之來源

accession No.	accession name <sup>a</sup>	sources	location of sources	population structure <sup>b</sup>
1	黃花芥藍 A	農友種苗股份有限公司	高雄市	OP
2	珍巧黑格林	豐田種子行	高雄市	F <sub>1</sub>
3	黃花芥藍 B	農民自留種	臺中市大甲區	OP
4	黃花芥藍 C	農民自留種	新北市樹林區	OP
5	黃花芥藍 D	桃改場臺北分場	新北市樹林區	OP
6	黃花芥藍 E	農民自留種	新北市樹林區	OP
7	黃花芥藍 F	農民自留種	新北市樹林區	OP
8	黃花芥藍 G	瑞蓋種子農藥行	宜蘭縣	OP
9	白花大心芥藍	新農友種子行	宜蘭縣	OP
10	黃花芥藍 H	新農友種子行	宜蘭縣	OP
11	黃花芥藍 I	榮華種子行	新北市新莊區	OP
12	青格藍	農民自留種	新北市新莊區	OP
13	黃花芥藍 J	富國種子行	新北市蘆州區	OP
14	白花大心格藍	榮和種子農藥行	新北市板橋區	OP
15	黃花芥藍 K	榮和種子農藥行	新北市板橋區	OP
16	黃花芥藍 L	萬成種子農藥行	新北市新莊區	OP
17	黃花芥藍 M	興農種苗股份有限公司	新北市三重區	OP
18	吃心芥藍	興農種苗股份有限公司	新北市三重區	-
19	明豐 2 號黑芥藍	明豐種子行	臺中市豐原區	OP
20	黃花白芥藍 N	自留種	臺南市	OP
21	‘翠津’	農友種苗股份有限公司	高雄市	F <sub>1</sub>
22	黃花芥藍 O	今日種子農藥行	雲林縣西螺鎮	OP
23	‘蕙津’	農友種苗股份有限公司	高雄市	OP
24	‘翁山’ (Oros)	Lion Seeds Co., Ltd.	泰國	-
25	‘翠寶’	日本武藏野種苗園	日本	F <sub>1</sub>
26	‘清華’ (青花菜)	農友種苗股份有限公司	高雄市	F <sub>1</sub>

<sup>a</sup> 花色為黃色之種原其名稱皆以黃花為開頭及一個英文大寫字母為結尾代表，其它則分別為白花芥藍種原及青花菜種原。

<sup>b</sup> 族群結構：OP 為開放授粉混合採種族群、F<sub>1</sub> 為一代雜交品種、- 為未知族群結構。



執行兩次。組織破碎後將微量離心管置於 65°C 水浴 30 分鐘，每 10 分鐘將微量離心管內之萃取液搖晃均勻。水浴後再將 270  $\mu$ L 5M 醋酸鉀 (potassium acetate, KOAc) 加入離心管內，並輕輕混合均勻後置於冰上 20 分鐘之後再以 4°C、15000 rpm 離心 15 分鐘；取出上清液至滅菌完成之新的 1.5 mL 微量離心管中，加入 700  $\mu$ L 異丙醇(isopropanol)，將離心管上下輕翻轉至均勻混合。再次以 15000 rpm 離心 10 分鐘以沉澱 DNA 後，去除含異丙醇之上清液，加入 1 mL 已冰鎮之 70% 酒精洗鹽。最後以 12000 rpm 離心 10 分鐘，去除含酒精之上清液並將樣品進行風乾，待完全去除酒精後，加入 100  $\mu$ L TE 緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH8.0; 1 mM EDTA, pH8.0) 回溶 DNA，儲放於-20°C 冰箱備用。

### 三、植株性狀調查

育苗達 21 天後，於民國 103 年 5 月 21 日將 25 個芥藍種原幼苗定植於桃園區農業改良場臺北分場田區 (約 121 m<sup>2</sup>)，種植前 7 天 (5 月 14 日) 田區施用基肥包含福壽牌大自然生技基肥 (2.5-2.5-1.5) 150 公斤、福壽牌特級有夠肥 7 號 (5-3-2) 10 公斤及臺肥複合肥 5 號 (16-8-12) 2 公斤。田間試驗採完全逢機設計，每種原進行三重複、每重複三株的調查。定植後共追肥三次，第一次追肥於 5 月 26 日施用臺肥複合肥 5 號 2.8 公斤及氯化鉀 (0-0-60) 0.35 公斤。第二次追肥於 6 月 3 日施用臺肥複合肥 1 號 (20-5-5) 1 公斤及氯化鉀 0.35 公斤。第三次追肥於 6 月 16 日，僅施用尿素 (46-0-0) 0.6 公斤。

試驗性狀調查統一於定植後 57 天進行，調查項目為葉綠素讀值 (Chlorophyll Meter SPAD-502, Minolta, Japan)、株高、展幅、莖徑、葉長、葉柄長及葉寬等 7 項，另外記錄自過去陸續觀查之 3 項性狀資料，包括種子百粒重、幼苗下胚軸花青素顏色深淺及花色等。

#### 四、SSR 基因型分析

首先挑選黃花芥藍 A、珍巧黑格林、黃花芥藍 B、黃花芥藍 C、明豐 2 號黑芥藍和黃花白芥藍 N 等 6 個外觀類型及來源較為分散的種原，每個種原隨機挑選 4 個個體，共 24 個個體之 DNA 進行分子標誌之篩選。採用 PCR 反應總體積 10  $\mu$ L，反應溶液包含 40 ng 之 DNA、0.2  $\mu$ M 之引子、5  $\mu$ L 之 Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampliqon, Denmark) 及 1.4  $\mu$ L 之二次蒸餾水(ddH<sub>2</sub>O)。使用核酸增殖儀 (Sensoquest, German) 進行反應，PCR 程式設定 94°C 為 3 分鐘，一個循環；94°C 為 30 秒，55°C 為 30 秒，72°C 為 40 秒，共進行 35 個循環；72°C 為 3 分鐘，一個循環，反應最後溫度降至 20°C 並終止。完成 DNA 片段增殖之產物以 2.0% 洋菜膠片 (Agarose gel) 電壓 220 伏特、進行 17 分鐘水平式電泳。挑選 29 個可順利擴增 DNA 片段且具多型性之 SSR 分子標誌。但部分分子標誌在後續 Multiplex-Ready PCR (Hayden *et al.*, 2008) 的結果不易判斷基因型者而不採用，最後本試驗使用 20 個 SSR 分子標誌參與遺傳歧異度之分析。其中 14 個分子標誌為前人研究所開發，如表一，其餘 6 個 (CHT 開頭) 為本研究室自行探勘之分子標誌 (余等人, 2013。)

入選之 SSR 分子標誌則應用於遺傳歧異度分析，SSR 分子標誌基因型分析採用修改自 Hayden *et al.* (2008) Multiplex-Ready PCR 之設定，先後進行兩階段之 PCR 循環，第一階段 PCR 反應之目的為先使具樣品序列專一性之引子 (locus specific primer) 黏合於樣品 DNA 並增殖產物，之後執行第二階段 PCR 反應，再讓螢光標記之通用性引子 (dye-labelled *taqF* + *taqR*) 黏合於第一階段已增殖之產物進行擴增，並使其帶有螢光，有助於提升之後基因型鑑定之效率。而本試驗採用之螢光標記為藍、綠、黃及紅共四種顏色。總 Multiplex-ready PCR 反應總體積為 10  $\mu$ L，反應溶液包含 40 ng 之 DNA、1  $\mu$ L 10X ImmoBuffer (Bioline, UK) (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, 0.01% Tween-20, 100 mM Tris-HCl, pH8.3)、0.2 mM dNTP、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.04  $\mu$ M 之具樣品序列專一引子、0.08  $\mu$ M 螢光標記之通用性引子、



表二、20 個參試 SSR 分子標誌資料

Marker	Chromosome	Motif of tandem repeats	Forward primer	Reverse primer	Reference size
BnGMS160	4	(GAAA)7	TTTCCGAAACTTGTCGTTAT	CGCTGTAAGCATTGTTGTAA	386 <sup>a</sup>
BnGMS543	7	(AG)9	TCGAAATCTACGGTTTGACT	ATTATGCTTGTCGTCGACTT	263 <sup>a</sup>
BoGMS486	2	(ATT)16	AAGGAGGAACCAAATGCC	TGATAATGCCACTGATAGGAC	197 <sup>b</sup>
fito316	5	(TGATG)3	ACGGATAAAGGAGGAGAAGA	CTGGTTAGTTAGCGTTGAGAA	216 <sup>c</sup>
BnGMS539	5	(AT)9	CATCACTCAATCCAAGACCT	AGAACCTGAAACAAACGATG	177 <sup>a</sup>
BnEMS1119	2	(TGA)6	ACTGGAGTTTCAATTGGATG	CATCATCTTCAGCACTAGCA	209 <sup>b</sup>
BnGMS634	5	(AG)9	CAATTTGGGACTGAAGAAAT	CGCATTCTTCAAACAAACTC	317 <sup>a</sup>
BnGMS98	9	(AT)8	CCACTAGTTTACATCCTGGC	ATGACCTAAGCATGTGGTCT	193 <sup>a</sup>
BoGMS1166	8	(GAA)9	TAATGGAAACGCACCAAG	AAACAATCTTAGCAGAGGAGG	199 <sup>b</sup>
BoGMS561	1	(CAT)14	CAAAGACTAAACCAGACCAAG	ATAGGCAAGGTGAGAAGAAAG	153 <sup>b</sup>
O113-E08	- <sup>f</sup>	di GA/CT	TTCGCAACTCCTCCTAGAATC	AAGGTCTCACCACCGGAGTC	171 <sup>d</sup>
BoGMS1382	9	(AAG)9	CTTCCTGCGTCACTTTACC	AGGCTGTCTCCTCACCCA	133 <sup>b</sup>
BnEMS954	3	(GAA)6	CCTGATCGTGCTCTACTACC	AAGGACAAGAGACCAAACAA	233 <sup>b</sup>
fito472	7	(AAAAT)2	CGTCTTTGACCTTTCTATCTG	TGCCCTTGTTTCTTTCTTT	362 <sup>c</sup>
CHT_11	-	(ATT)n	TGTAAACACTTTCTCTTTGCC	TTAGGAGAAGTGTGTGACCC	241 <sup>e</sup>
CHT_20	3	(CTC)n	ACAAATCTTGTTTTGAAGC	CAAGACATGAGAAACACGC	186 <sup>e</sup>
CHT_22	-	(CTT)n	CTGTCTCAAATAAACTCCGC	AGATGTGGTTTTTCAGTGAGG	219 <sup>e</sup>
CHT_46	-	(TTC)n	ACTTATTTACTATCCGCGCC	TCTTCTTCACCATGAACTCG	257 <sup>e</sup>
CHT_50	-	(GA)n	GTTGTTGGTAGCGTAAAACC	AAGCTCTCATTGAATCATGG	190 <sup>e</sup>
CHT_28	-	(TC)n	ACATCCACTGTTTTCTTTGC	TTCGATTTGTTAATCAGGG	169 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Cheng *et al.*, 2009.

<sup>b</sup> Fan *et al.*, 2010.

<sup>c</sup> Iniguez-Luy *et al.* 2008.

<sup>d</sup> Lowe *et al.*, 2004.

<sup>e</sup> 余等人，2013。

<sup>f</sup> 未確定該分子標誌染色體位置。



0.025 U 之 IMMOLASE™ DNA Polymerase (Bioline, UK) 及 2  $\mu$ L 之二次蒸餾水 (ddH<sub>2</sub>O)。使用核酸增殖儀 (Dual Flat Block GeneAmp® PCR System 9700, USA) 進行反應，PCR 程式設定 95°C 為 10 分鐘，一個循環，第一階段 92°C 為 30 秒，63°C 為 90 秒，72°C 為 60 秒，共進行 20 個循環；第二階段 92°C 為 15 秒，54°C 為 30 秒，72°C 為 60 秒，共進行 40 個循環；最後 72°C 為 30 分鐘，一個循環後溫度降至 18°C 並終止。

由於毛細管電泳之解析力可達 1-2 bp，可更正確評估對偶基因型 (Wang *et al.*, 2009)，因此入選之 29 個 SSR 分子標誌採用毛細管電泳系統進行分析。在 Multiplex-ready PCR 後，擴增之產物可按使用的通用性引子螢光之不同，以固定比例混合產物。本試驗以通用性引子不同之產物按藍：綠：黃：紅為 3：3：4：6 之比例混合。完成後樣品則委託昕穎公司 (臺灣) 以 ABI3730 DNA analyzer 毛細管電泳系統，搭配 ABI GeneScan™ -600 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems®, USA) 讀取產物螢光訊號。由昕穎公司送回之資料自行以軟體 GeneMapper® 分析，主要利用一組已知 DNA 片段大小之螢光標準品 (GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard; 20 – 600 bp) 與樣品同時進行毛細管電泳，以標準品之不同螢光片段訊號出現之時間資料建構樣品 DNA 片段基因型判讀標準，將樣品 DNA 片段與其比對後，以此鑑定樣品 DNA 之基因型。

## 五、資料分析

### (一)、性狀之統計分析

25 個芥藍種原之 7 項性狀調查資料以每種原三重複各別之均值，利用統計套裝軟體 [R] ver 3.1.1 (R Development Core Team, 2008) 進行變方分析 (ANOVA)，確認種原間存在顯著差異後 ( $p < 0.05$ )，再進行 Fisher's least significant difference test (LSD test)。另外，在套裝軟體 [R] 中，將 7 項田間性狀間兩兩繪製散佈圖，以及計算其相互之皮爾森相關係數 (Pearson's correlation coefficient) 與顯著性檢定，

並利用共變方矩陣進行主成分分析 (principle component analysis, PCA)。主成分分析之原則為利用資料點原實際偵測到的多個變數，將其變方或共變方關係綜合轉變為少數線性組合，在盡量不失真的狀況下，將資料點以少數維度呈現，並在二維或三維空間將資料點繪製散布圖。其中可解釋樣品間最大變異的兩個軸為第一及第二軸，解釋變異量第三大者為第三軸。

## (二)、遺傳歧異度分析

在遺傳變異的討論中有兩個分析方向，即豐富度 (richness) 與均勻度 (evenness) 的描述。所謂豐富度指族群內具差異的個體或基因型種類之多寡。而均勻度與豐富度有關係，但指的是這些差異類型 (例如不同對偶基因) 的頻度是否類似，或者說差異的頻度間變異的大小，若頻度間變異低則均勻度較高 (Brown, 2008)。

針對這兩個方向有許多遺傳參數因應而生，本試驗利用 PowerMarker ver. 3.25 軟體 (Liu, 2005) 將各種原 SSR 分子標誌之基因型資料進行分析，分子標誌歧異度之分析參數包括平均對偶基因數目 (mean allele per locus)、主要對偶基因頻度 (major allele frequency)、多型性訊息含量 (polymorphic information content, PIC)。另藉由各種原擴增之對偶基因類別總數、基因歧異度及種原間族群分化指數  $F_{st}$  進行各種原豐富度及均勻度之探討，而各種原基因型頻度資料可應用於種原間遺傳距離之估算，先以軟體 PowerMarker ver. 3.25 計算歐氏距離 ( $d_E$

$$= \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (p_{ij} - q_{ij})^2} )，再轉換為 modified Roger's distance,  $d_W = \frac{1}{\sqrt{2m}} \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (p_{ij} - q_{ij})^2} )$  (Wrights, 1978) 後，得到遺傳距離。並利用 modified$$

Roger's distance 在統計套裝軟體 [R] ver 3.1.1 (R Development Core Team, 2008) 進行主座標分析 (principle coordinate analysis, PCoA)，將圖像化呈現種原間之歧異度。公式內代號所指為  $m$  個基因座中，第  $i$  個基因座具有  $n_i$  個對偶基因，其中第  $j$  個對偶基因在兩樣品之頻度分別為  $p_{ij}$  及  $q_{ij}$ 。



### 多型性訊息含量 (polymorphic information content, PIC )

以分子標誌所偵測到的對偶基因數目及對偶基因頻度為基礎，用於評估分子標誌多型性程度。當所偵測之對偶基因數越多及對偶基因頻度越平均時，多型性訊息含量值越高。PIC > 0.5 時，分子標誌具有高度多型性；0.5 > PIC > 0.25 為中度多型性分子標誌；PIC < 0.25 為低度多型性分子標誌 (Botstein *et al.*, 1980)。

其公式為：

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

其中 n 為第 n 對對偶基因， $p_i$  為第 i 種對偶基因頻度， $p_j$  為第 j 種對偶基因頻度。

### 基因歧異度 (genetic diversity)

以實驗測得對偶基因之頻度估算族群內異結合之比例 (expected heterozygosity)，即隨機從族群中抽取兩個對偶基因，兩者非同源之機率，可直接描述族群豐富度和均勻度。由於芥藍為異交作物，且種原多為開放授粉之雜交族群，因此直接以  $D = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$  (Weir, 1996) 計算，其中 n 為單一基因座之對偶基因數， $p_i$  為該基因座上第 i 種對偶基因頻率。

### 主座標分析 (principle coordinate analysis, PCoA)

主要概念為在維持兩兩樣品間相對距離關係的前提下，在低維度的空間中盡可能不失真地呈現樣品的關係。數個樣品可在多個空間座標軸下被描述，但主座標分析只取其中最重要的少數維度來呈現樣品間的關係。一般以二維或三維圖展現，並以可解釋樣品間最大變異的兩個軸為第一及第二軸，解釋變異量第三大者為第三軸 (Gower, 1966)。由於兩樣本在多維度空間裡距離之建構概念以歐氏幾何為基礎，本試驗採用 Modified Roger's distance 以進行主座標分析運算並以統計套裝軟體[R] ver. 3.1.1 (R Development Core Team, 2008) 繪製各種原三維空間之散布情形。

## 群集分析 (clustering analysis)

以 Modified Roger's distance,  $d_w = \frac{1}{\sqrt{2m}} \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (p_{ij} - q_{ij})^2}$  (Wright, 1978) 估算種原間遺傳距離並匯入 NTSYS 2.0 套裝軟體 (Rohlf, 1998) 後, 選取 Clustering/SHAN 選項, 進行不加權平均重法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) 演算及繪製親緣樹圖。不加權平均重法 (UPGMA) 基本為視每一樣品與 root 之距離相同之概念下, 利用樣品間相似度矩陣或遺傳距離矩陣, 將矩陣中關係最近的兩樣品成對組合後, 重新計算組合與其他樣品間之關係遠近形成新矩陣, 再一次將矩陣中關係最近的兩者組合, 反覆操作將所有樣品完全群集, 並繪製成有根親緣樹圖 (rooted tree)。

## 族群分化指數 (Fst)

主要反應不同族群之間對偶基因頻率差異, 為量化族群遺傳分化之指標。以族群整體中有  $n$  個次族群,  $p_i$  及  $q_i$  分別為第  $i$  個次族群中同一基因座之非同源對偶基因之頻度。而該基因座平均各次族群之非同源對偶基因異結合頻度為  $H_l$ , 在假設次族群內符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 下, 各次族群一對非同源對偶基因異結合頻度期望值之平均為  $H_s$ , 而族群整體之一對非同源對偶基因異結合之頻度期望值為  $H_T$ , 其公式分別為 (Hamilton, 2009):

$$H_l = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \widehat{H}_l \quad ; \quad H_s = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 2p_i q_i \quad ; \quad H_T = 2\bar{p}\bar{q}$$

其中  $\widehat{H}_l$  為第  $i$  個族群中實際觀測之異結合率 (observed heterozygosity), 而  $\bar{p}$  及  $\bar{q}$  分別為該基因座上, 整體族群中各次族群之非同源對偶基因頻度之平均。可衍生之遺傳參數為:

$F_{IS} = \frac{H_s - H_l}{H_s}$  為次族群非同源對偶基因異結合率期望值之平均 ( $H_s$ ) 與實際觀測值 ( $H_l$ ) 之差異程度, 可表示族群內平均自交係數, 主要分析次族群內近交或自交情形。

$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$  為次族群非同源對偶基因異結合率期望值之平均 ( $H_S$ ) 與族群整體  
之非同源對偶基因異結合之頻度期望值 ( $H_T$ ) 之差異程度，可表示  
因族群分化而導致異結合率減少之比例，可作為次族群間的平均自  
交係數，分析族群差異。

$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$  為任一次族群中任意個體帶有一對對偶基因為同源之機率，可視  
為整個族群內之平均自交係數。



## 參、結果

### 一、芥藍外觀性狀資料分析

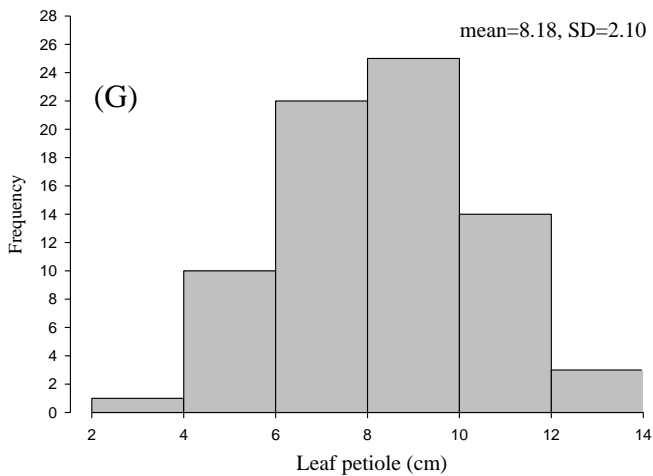
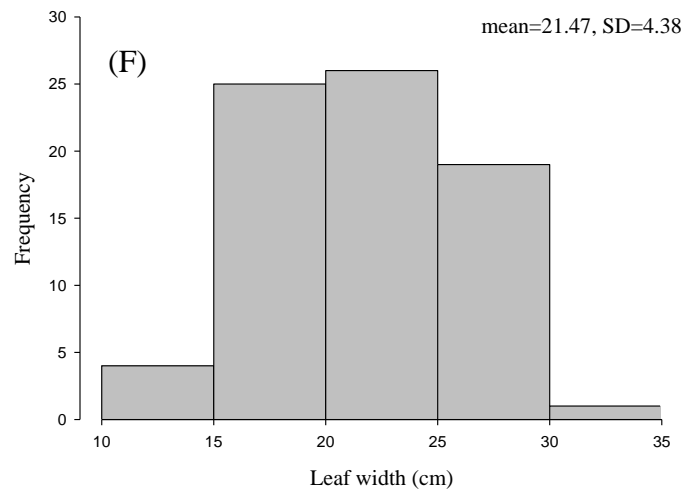
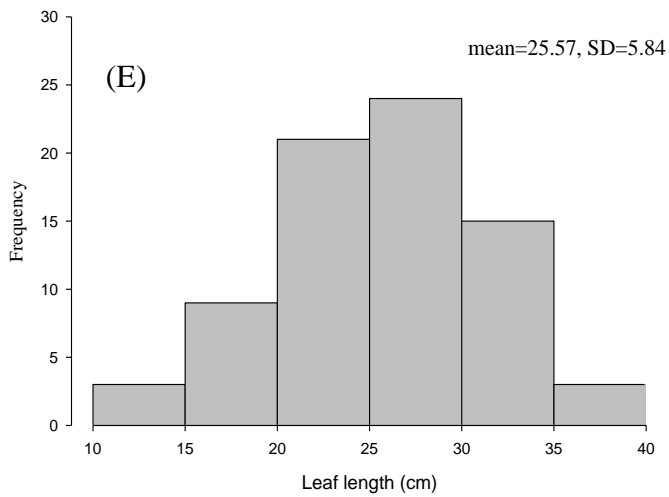
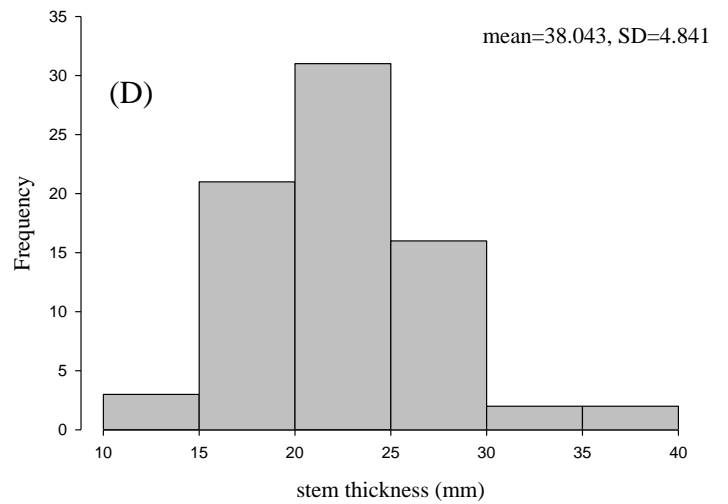
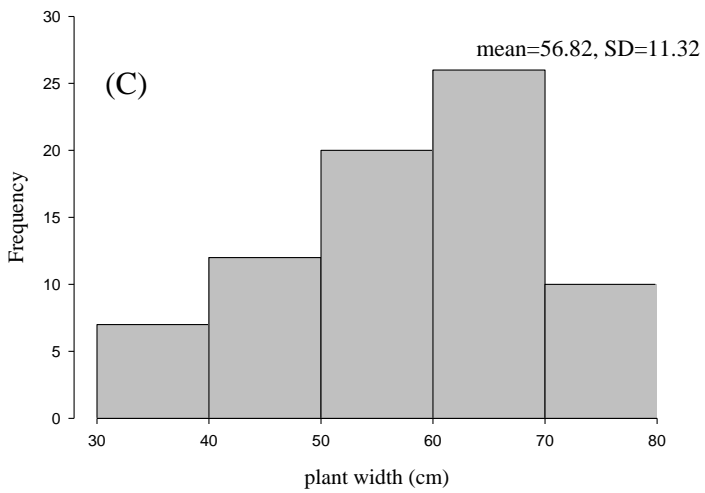
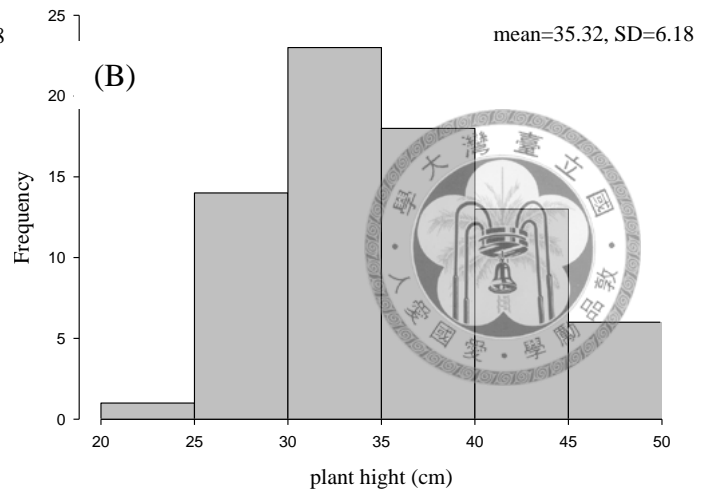
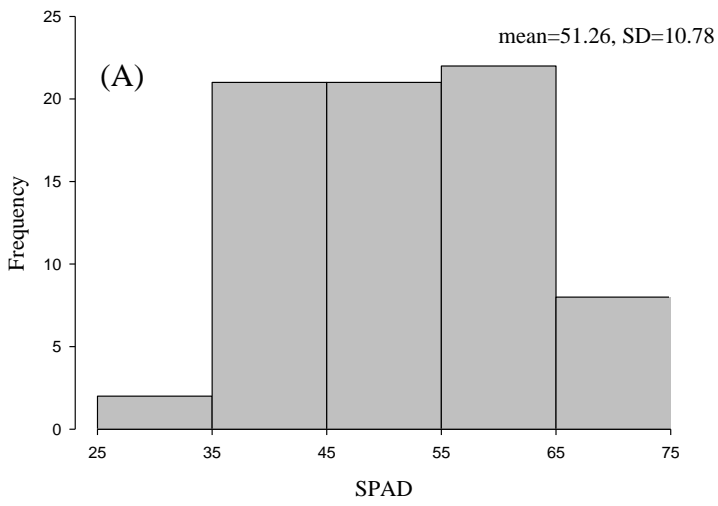
在田間試驗中，各種原對葉綠素讀值、株高、展幅、莖徑、葉長、葉寬及葉柄長等七項之性狀調查結果平均值如附表一所示。各調查資料之分布情形如圖一所示。葉綠素讀值最大值為 70.63，最小值為 24.00，平均為 51.26。株高之最大值及最小值分別為 49.50 cm 及 24.5 cm，平均值為 35.32 cm。展幅以 79.33 cm 為最大值，33.50 cm 為最小值，平均為 56.82。莖徑 13.647 mm 為最大值，38.043 為最小值，平均為 22.560 mm。7 個性狀在展幅之標準差最大為 11.32，其次為 SPAD 值，顯示資料分布較為離散。另外，在展幅及莖徑之分布分別略向右及向左偏歪。不同性狀調查項目間進行兩兩相關係數之計算如圖二所示。兩兩性狀間之相關性方面，除了 SPAD 分別與株高及莖徑兩項之相關性未達顯著大於 0 之外，其他兩兩性狀關係間之相關性皆顯著大於 0。而相關係數之絕對值表現，展幅與葉長間最大為 0.88，其次為葉長與葉寬間為 0.80，皆為高度相關，而葉綠素讀值與株高之相關係數絕對值 0.075 最小為低度相關。另外，葉綠素讀值與展幅、葉長及葉寬呈中度負相關。

7 個性狀資料經變方分析（表三），在 25 個芥藍種原間皆達極顯著差異（ $p < 0.001$ ），其中各種原在 7 項不同調查項目平均值之最小顯著性測驗（least significant difference test, LSD test）之結果於附表二。大部分黃花芥藍種原在株高及展幅之均值較白花芥藍種原大，而葉長、葉寬及葉柄長也較白花芥藍種原長，而白花種原則是在 SPAD 之均值較黃花種原大。而以往所記錄之其他性狀調查(附表一)，種子百粒重的部分以蕙津最重，平均達 0.674g，青格藍次之，種子百粒重平均為 0.658 g。而黃花芥藍 E 為最輕，僅 0.274g。而幼苗下胚軸花青素累積的深淺表現上，顏色極淺在幼苗中達 65% 以上者為種原 4.黃花芥藍 C、種原 7.黃花芥藍 F、種原 10.黃花芥藍 H、種原 11.黃花芥藍 I、種原 15.黃花芥藍 K、種原 16.黃花芥藍 L 及種原 22.黃花食心芥藍 O 等 7 個種原且花色表現皆相同。而

顏色深紫之現象在幼苗中達 60% 以上者為種原 12.青格藍、種原 14.白花大心芥藍、種原 18.吃心芥藍、種原 19.明豐 2 號黑芥藍、種原 23.蕙津及種原 25.翠寶等 6 個皆為白花之種原。



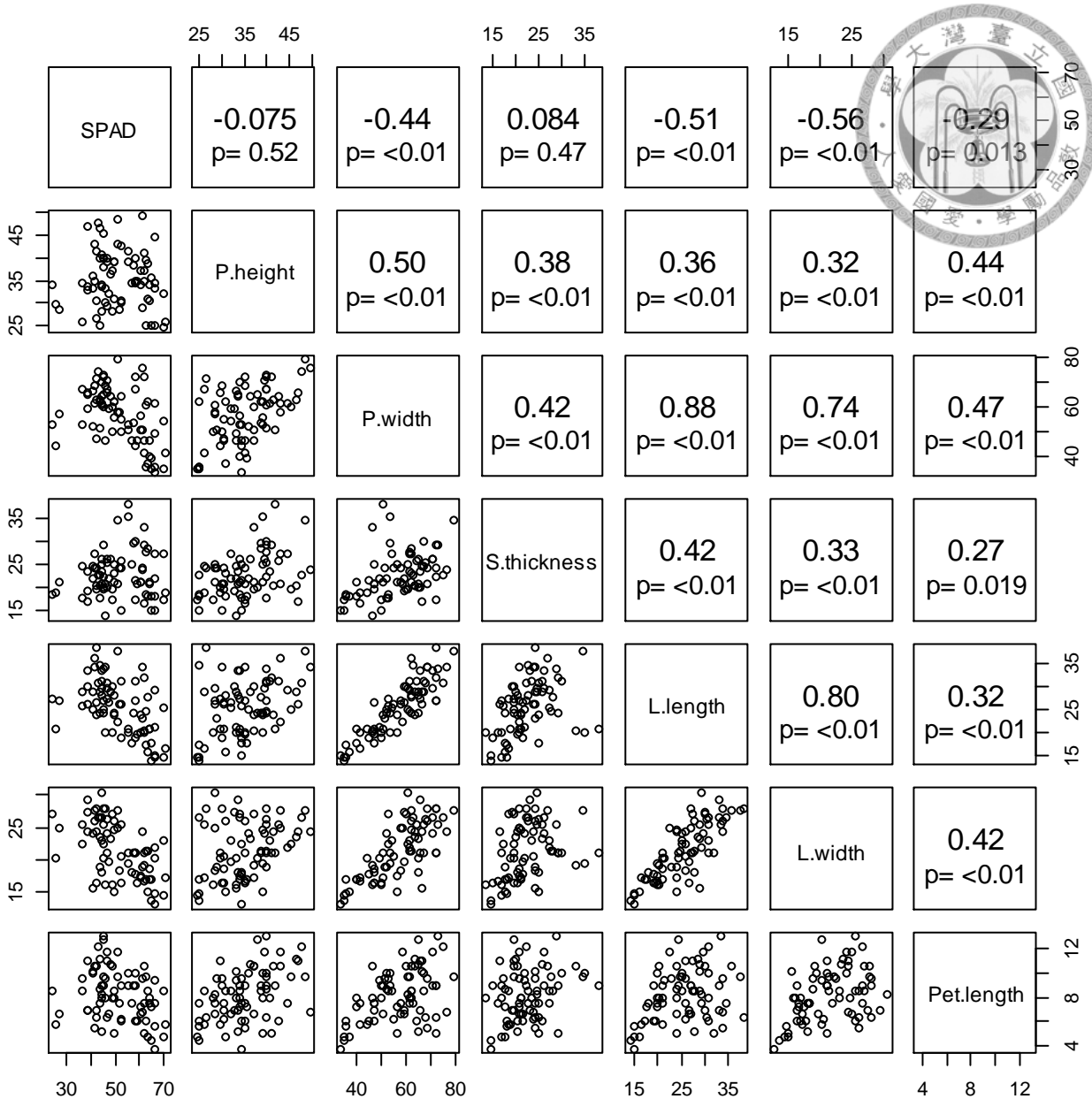
最後利用七個量的性狀在個種原之資料，以試驗小區之平均值為單位，每個種原都有三個資料點以進行主成分分析，二維繪圖結果如圖三所示。第一主成分（PC1）對整體變異之解釋力達 54.95%，第二主成分（PC2）對整體變異解釋力達 16.63%，累積之解釋力為 71.58%。而三維主成分分析圖（圖四）之第三軸（PC3）變異之解釋力達 13.60%，累積之解釋力為 85.18%。第一主成分與展幅、葉長及葉柄長等三個性狀之相關係數分別高達 0.92、0.90 及 0.88。第二主成分與 SPAD 之相關係數達 0.75 為該軸最高，而與第三主成分相關係數最高之性狀為葉寬，兩者相關程度為 0.63。在二維主成分分析中，同花色之芥藍種原分布較為接近，在第一主成分之方向，吃心芥藍與翠寶較明顯與其他種原分布不同，而第二主成分之方向白花芥藍種原分布較黃花種原集中，另外，種原 20 黃花白芥藍 N 可明顯與其他種原區分。在三維主成分分析中，種原在第三主成分之分布除了種原 23 ‘蕙津’ 與其他種原有較明顯差異，其他種原間並無較獨特之分布情形。



圖一、26 個芥藍種原之 7 個性狀資料分布

(A) SPAD、(B) 株高、(C) 展幅、(D) 莖徑、(E) 葉長、(F) 葉寬、(G) 葉柄長。其中 Frequency 為 75 個小區各別平均值位於特定數值範圍之次數。





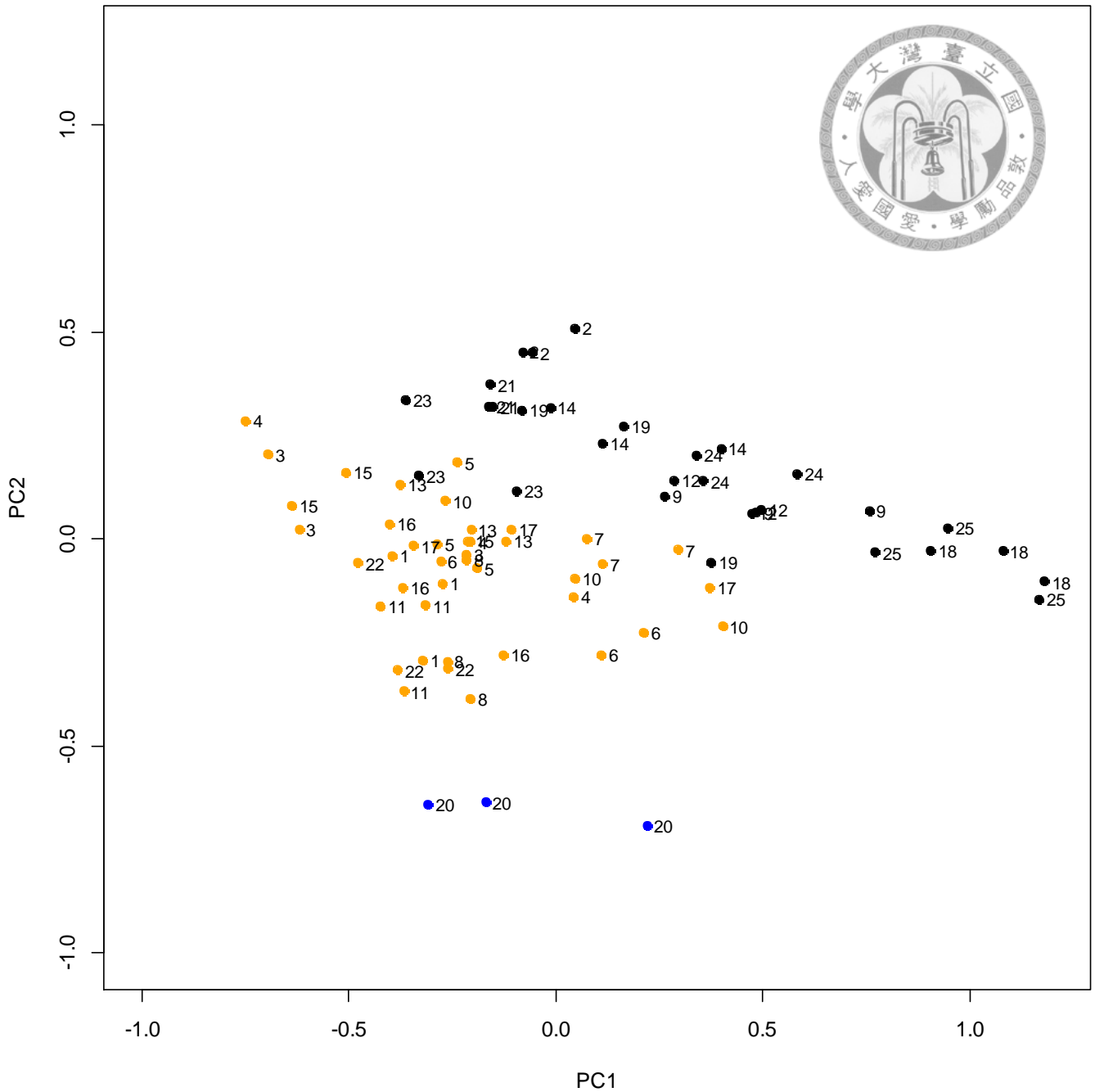
圖二、7 個性狀調查項目間之相關係數及散布圖

其中對角線位置為對應之性狀，SPAD 為葉綠素讀值，P. height 為株高，P. width 為展幅，S.thickness 為莖徑，L. length 為葉長，L. width 為葉寬以及 Pet. length 為葉柄長。圖中右上為不同性狀間調查資料相關係數顯著性檢定結果 ( $p < 0.05$  表示兩變數間相關係數不為 0) 及相關係數值，右下為性狀間資料點之散布情形。相關係數 0：無相關；相關係數 0.01–0.35：低度相關；相關係數 0.36–0.67：中度相關；相關係數 0.68–0.99：高度相關；相關係數 1：完全相關 (Taylor, 1990)。

表三、7 個性狀之變方分析表

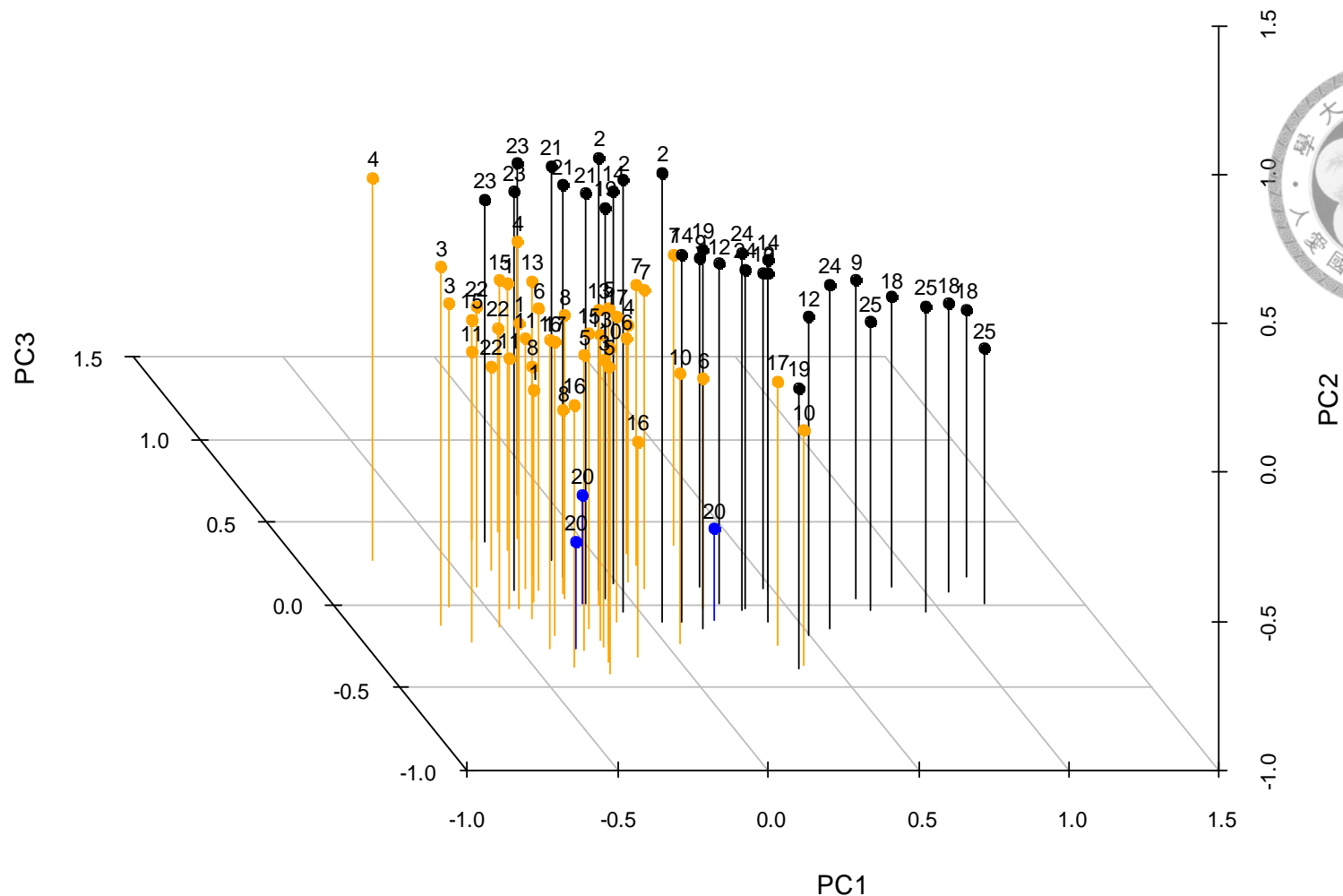
source of variation	degree of freedom	SPAD	plant height (cm)	plant width (cm)	stem thickness (mm)	leaf length (cm)	leaf width (cm)	petiole length (cm)
accession	24	329.90***	69.42***	324.24***	53.640***	89.41***	45.765***	10.06***
residual	50	13.86	23.21	33.99	8.935	7.57	6.46	1.69

\*\*\*F test 在種原間達極顯著差異， $p < 0.001$ 。



圖三、25 個芥藍種原之 2D 主成分分析圖

以 7 個性狀資料進行主成分分析，每個種原以小區為單位，點左方之數字為種原代號，詳如表一。第一軸（X 軸）對整體變異之解釋力達 54.95%，第二軸（Y 軸）對整體變異解釋力達 16.63%。黃色及藍色標示為黃花芥藍種原，按編號對照為 1：黃花芥藍 A，3：黃花芥藍 B，4：黃花芥藍 C，5：黃花芥藍 D，6：黃花芥藍 E，7：黃花芥藍 F，8：黃花芥藍 G，10：黃花芥藍 H，11：黃花芥藍 I，13：黃花芥藍 J，15：黃花芥藍 K，16：黃花芥藍 L，17：黃花芥藍 M，20：黃花白芥藍 N，22：黃花芥藍 O。黑色標示為白花芥藍種原，按編號對照為 2：‘珍巧黑格林’，9：白花大心芥藍，12：青格藍，14：白花大心格藍，18：‘吃心芥藍’，19：明豐 2 號黑芥藍，21：‘翠津’，23：‘蕙津’，24：‘翁山’，25：‘翠寶’。




圖四、25 個芥藍種原之 3D 主成分分析圖

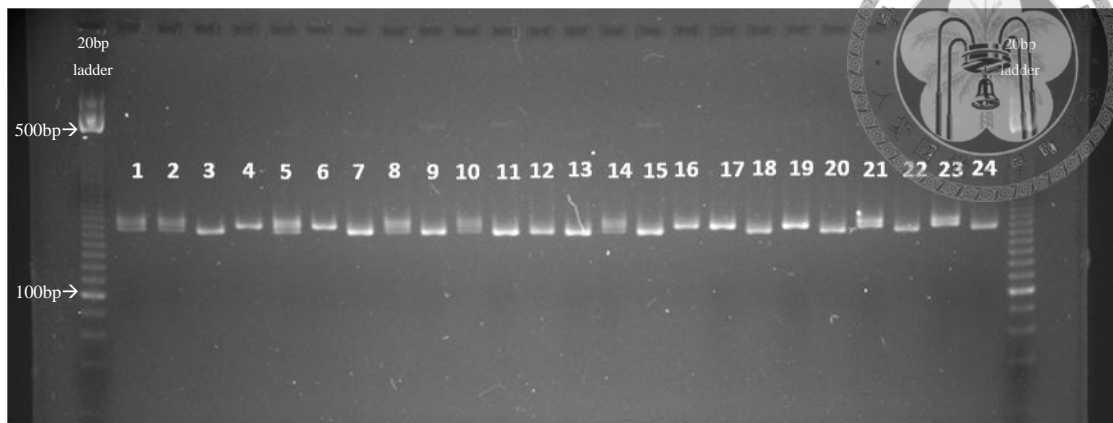
以 7 個性狀資料進行主成分分析，每個種原以小區為單位。點左方之數字為種原代號，詳如表一。第一軸 (PC1) 對整體變異之解釋力達 54.95%，第二軸 (PC2) 對整體變異解釋力達 16.63%，第三軸 (PC3) 變異之解釋力達 13.60%。黃色及藍色標示為黃花芥藍種原，按編號對照為 1：黃花芥藍 A，3：黃花芥藍 B，4：黃花芥藍 C，5：黃花芥藍 D，6：黃花芥藍 E，7：黃花芥藍 F，8：黃花芥藍 G，10：黃花芥藍 H，11：黃花芥藍 I，13：黃花芥藍 J，15：黃花芥藍 K，16：黃花芥藍 L，17：黃花芥藍 M，20：黃花白芥藍 N，22：黃花芥藍 O。黑色標示為白花芥藍種原，按編號對照為 2：‘珍巧黑格林’，9：白花大心芥藍，12：青格藍，14：白花大心格藍，18：‘吃心芥藍’，19：明豐 2 號黑芥藍，21：‘翠津’，23：‘蕙津’，24：‘翁山’，25：‘翠寶’。

## 二、遺傳歧異度分析

### (一)、SSR 分子標誌之歧異度




首先以 6 個芥藍種原各隨機挑選 4 個個體進行 PCR 擴增及洋菜膠片水平電泳，篩選具多型性之分子標誌。如圖五，分子標誌 BnEMS1119 可粗估於 24 個個體中約有 3 個不同的對偶基因，即此分子標誌於種原間具有多型性。再觀察黃花芥藍 A 之 4 個個體（樣品 1-4），其中至少擴增 2 個不同對偶基因，樣品 1 與樣品 2 為異結合 (heterozygote)，樣品 3 及樣品 4 為同型結合 (homozygote)，表示此分子標誌在黃花芥藍 A 種原內亦具有多型性。由於分子標誌 BnEMS1119 可有效偵測種原間及種原內異結合個體，故為適合應用於遺傳歧異度分析之分子標誌。以此原則進行快速的多型性分子標誌之篩選，64 個分子標誌經篩選後入選 29 個具多型性之分子標誌。為求精確鑑定對偶基因片段大小，以 Multiplex-ready PCR 對 29 個多型性分子標誌進行擴增，經毛細管電泳辨識對偶基因片段大小後，選用 20 個基因型擴增穩定之多型性分子標誌（表二），應用於在 26 個種原，共 520 個個體之遺傳歧異度分析。

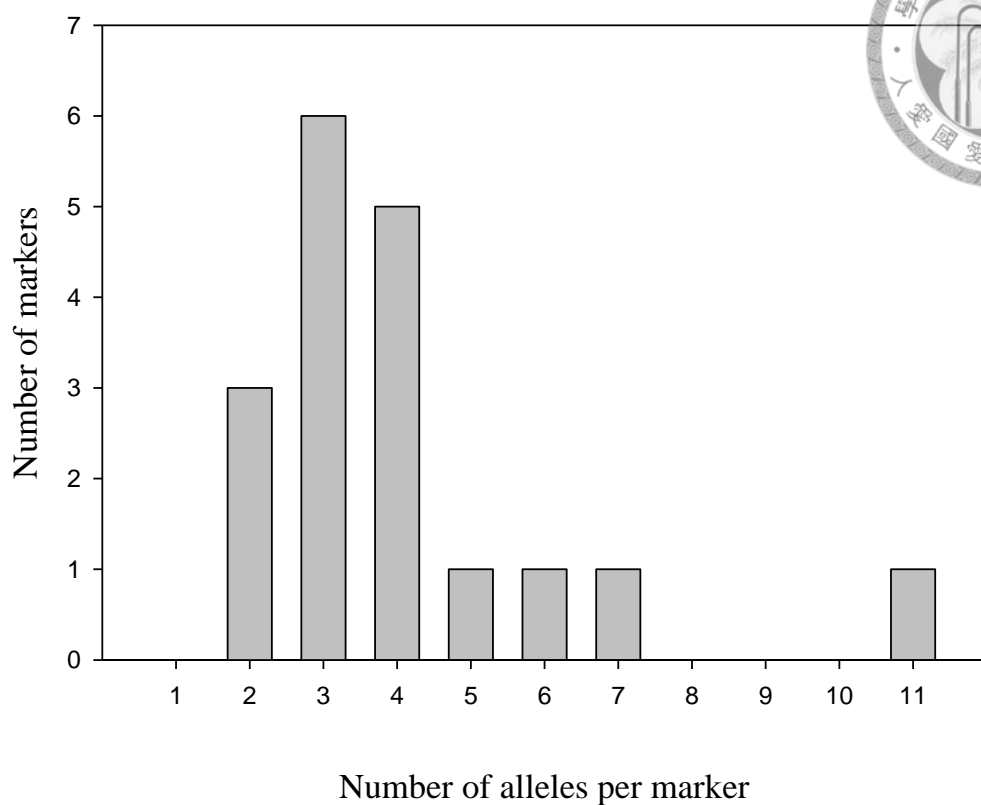
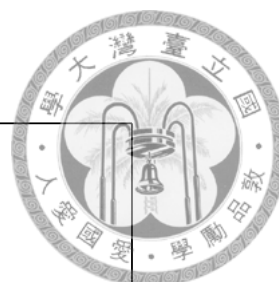


**圖五、SSR 分子標誌 BnEMS1119，應用於六個種原之 PCR 產物於 2.0% 洋菜膠片之電泳結果**

編號 1-4：黃花芥藍 A。編號 5-8：珍巧黑格林。編號 9-12：黃花芥藍 B。編號 13-16：黃花芥藍 C。編號 17-20：明豐 2 號黑芥藍。編號 21-24：黃花白芥藍 N。圖中最左及最右為 20 bp DNA Ladder (20-500 bp)。



20 個分子標誌對參試個體擴增之完成率最低為 95.6%、最高為 100%，平均為 99.0%。20 個分子標誌共擴增 80 個對偶基因。圖六及表四中，單一分子標誌偵測出不同對偶基因數介於 2—11 個，多數分子標誌偵測出的對偶基因數為 2 至 4 個，而偵測對偶基因數目 3 個者最多，為 fito316 等六個分子標誌。偵測最多對偶基因數目為 CHT\_11，可偵測 11 個，平均每個分子標誌偵測之對偶基因數為 4 個（圖六及表四）。各分子標誌主要對偶基因出現之頻度介於 0.37—0.89，其中 15 個分子標誌超過 0.5。基因歧異度（expected heterozyosity）介於 0.19—0.72 之間，多型性訊息含量（PIC）則介於 0.18—0.68，PIC 值小於 0.25：只具有少量資訊；PIC 值介於 0.25 到 0.5 之間，具有中等資訊量；PIC 值大於 0.5，具有高度資訊量（Bostein, 1980）。其中  $PIC < 0.25$ ，具有少量資訊之分子標誌為 4 個，佔 20 個分子標誌之 20%，PIC 在 0.25—0.5，具有中等資訊量者有 10 個分子標誌，佔 50%， $PIC > 0.5$ ，具有高度資訊量有 6 個分子標誌，佔 30%（表四）。

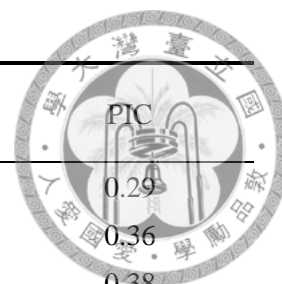


圖六、依多型性對偶基因擴增數目統計之 SSR 分子標誌數量分布




表四、20 個分子標誌之歧異度參數

Marker	No. of Alleles	Major Allele Frquency	Gene Diversity	PIC
BnGMS160	2	0.77	0.36	0.29
BnGMS543	4	0.76	0.39	0.36
BoGMS486	5	0.62	0.48	0.38
fito316	3	0.84	0.27	0.25
BnGMS539	2	0.86	0.25	0.22
BnEMS1119	4	0.51	0.60	0.53
BnGMS634	4	0.73	0.41	0.35
BnGMS98	3	0.37	0.66	0.59
BoGMS1166	4	0.58	0.56	0.49
BoGMS561	3	0.59	0.54	0.45
O113-E08	6	0.42	0.72	0.68
BoGMS1382	2	0.88	0.21	0.18
BnEMS954	3	0.87	0.24	0.22
fito472	2	0.50	0.50	0.37
CHT_11	11	0.63	0.57	0.54
CHT_20	5	0.59	0.49	0.38
CHT_22	7	0.55	0.65	0.62
CHT_46	3	0.46	0.64	0.57
CHT_50	3	0.47	0.56	0.46
CHT_28	4	0.89	0.19	0.18
mean	4	0.64	0.46	0.41



## (二)、種原內之遺傳歧異度

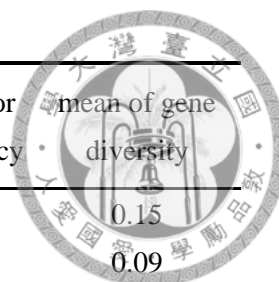


26 個種原之種原內遺傳豐富度可由種原內擴增之對偶基因數、平均單一分子標誌偵測之對偶基因數、平均主要對偶基因頻度及平均基因歧異度等四項觀測表示 (表五)。首先，種原內對偶基因擴增數及平均單一分子標誌擴增之對偶基因數觀察。在對偶基因擴增的類別總數方面所示，30 個以下者有 4 個種原，佔所全體之 15.4%，皆為來自大型種苗商之商業品種，其中‘蕙津’及‘清華’ (青花菜) 確知為一代雜交品種。18 個種原佔全體之 69.2% 則種原內擴增不同對偶基因數在 30 至 50 個，而有 4 個來源為種苗商或種苗零售業者之種原，其擴增之對偶基因數大於 50 個，佔全體 15.4%。各種原內平均單一基因座之對偶基因數介於 1.35—2.95 之間，黃花芥藍 H 達 2.95 為最高，‘吃心芥藍’為最低僅 1.35。黃花白芥藍 N、‘翠津’、‘蕙津’、‘翠寶’及‘清華’ (青花菜) 等 5 個種原平均單一基因座之對偶基因數低於 2。

進一步可由種原內各分子標誌平均主要對偶基因頻度及平均基因歧異度，觀測種原內之遺傳均勻度及豐富度。表五中各種原之平均主要對偶基因頻度介於 0.48—0.88，平均主要對偶基因頻度值越高則種原內均勻度越低。其中頻度 0.6 以下的種原有 5 個黃花芥藍種原，1 個來自農友自留種，其他 4 個皆來自於種苗商或零售商業者，最低者為黃花芥藍 M 僅 0.48。而頻度大於 0.80 者為‘蕙津’及‘清華’ (青花菜) 兩個來自專業育種種苗商之品種，以‘清華’為最高，達 0.88。在基因歧異度方面則介於 0.09—0.43，數值越大則異結合個體存在機率之期望值越高。其中小於 0.20 者有 5 個種原，除了‘蕙津’及‘吃心芥藍’不確定是否為一代雜交品種外，其他種原為一代雜交品種。而在 26 個種原中歧異度偏高在 0.34 以上者為 5 個黃花芥藍種原。而種原 20 黃花白芥藍 N 為黃花芥藍種原中，基因歧異度為最低之種原，歧異度值為 0.22。由上述四項觀測總結，種原內遺傳歧異度最大者為種原黃花芥藍 H，而歧異度最小為種原‘吃心芥藍’。


表五、26 個種原內之遺傳歧異度參數

accession	No. of alleles	No. of alleles/marker	mean of major allele frequency	mean of gene diversity
‘吃心芥藍’	27	1.35	0.79	0.15
‘清華’ (青花菜)	27	1.35	0.88	0.09
‘蕙津’	29	1.45	0.81	0.14
‘翠寶’	29	1.45	0.71	0.20
‘翠津’	38	1.90	0.73	0.20
黃花白芥藍 N	39	1.95	0.74	0.22
‘珍巧黑格林’	40	2.00	0.74	0.23
白花大心格藍	40	2.00	0.7	0.25
黃花芥藍 B	41	2.05	0.65	0.28
黃花芥藍 D	41	2.05	0.63	0.31
黃花芥藍 F	42	2.10	0.65	0.30
黃花芥藍 A	43	2.15	0.71	0.25
黃花芥藍 I	43	2.15	0.71	0.24
黃花芥藍 L	43	2.15	0.71	0.24
黃花芥藍 C	44	2.20	0.67	0.25
黃花芥藍 E	44	2.20	0.58	0.34
黃花芥藍 O	44	2.20	0.65	0.29
白花大心芥藍	45	2.25	0.61	0.32
‘翁山’	45	2.25	0.64	0.31
黃花芥藍 G	46	2.30	0.66	0.28
青格藍	46	2.30	0.62	0.33
明豐 2 號黑芥藍	46	2.30	0.66	0.29
黃花芥藍 M	53	2.65	0.48	0.43
黃花芥藍 K	54	2.70	0.49	0.43
黃花芥藍 J	55	2.75	0.52	0.41
黃花芥藍 H	59	2.95	0.49	0.42



### (三)、種原間的遺傳歧異度分析

#### 種原間遺傳距離



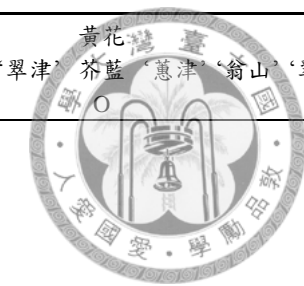
利用各種原 20 個分子標誌對偶基因頻度資料進行遺傳距離計算，採用 modified Roger's distance (Wright, 1987) 作為遺傳距離 (表六)。其中數值越大表示遺傳距離越遠。26 個種原間遺傳距離介於 0.31—2.79 之間，以種原 25 '翠寶' 與青花菜 '清華' 間的遺傳距離最遠為 2.79，而種原 12 青格藍與種原 19 明豐 2 號黑芥藍則距離最近為 0.31。所有芥藍種原除了種原 4 黃花芥藍 C 與青花菜之遺傳距離為 1.80 較近，其他種原與青花菜之距離皆大於 2.00。總計在芥藍種原間共 21 組兩兩種原間遺傳距離大於 2.00，存在於黃花芥藍分別與白花芥藍種原及黃花白芥藍 N 之兩兩組合。其中與黃花芥藍種原間佔 1 組，'翠寶' 與黃花芥藍間有 5 組，與黃花芥藍間有 5 組，白花大心格藍與黃花芥藍間有 3 組，而黃花白芥藍與黃花芥藍間之組合佔 7 組。白花芥藍種原內遺傳距離介於 0.31—1.93，最小值為明豐 2 號黑芥藍與青格藍之組合，最大值為 '珍巧黑格林' 與 '吃心芥藍' 之組合。而黃花芥藍種原間則介於 0.35—1.98，最小值為黃花芥藍 I 與 O 之組合，最大值為黃花芥藍 L 與 O 之組合。

#### 主座標分析 (principle coordinate analysis, PCoA)

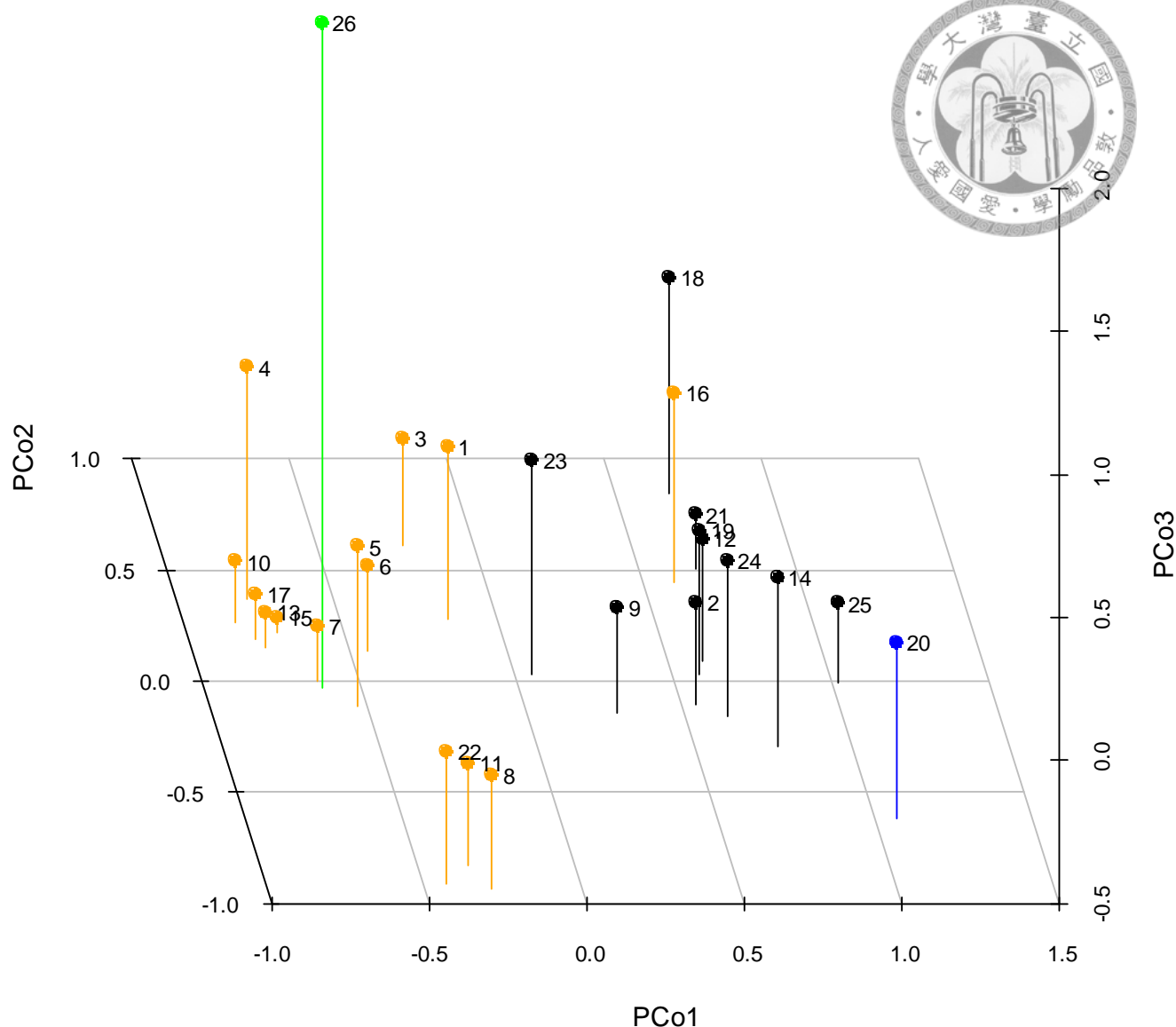
如上所述計算遺傳距離，並利用其進行主座標分析。在三維作圖 (圖七) 中，三軸累積解釋力為 19.63%。種原之分布上，青花菜 '清華' 明顯與其他芥藍種原距離較遠，而芥藍種原間則有數個較集中之分布，首先可觀查到大部分種原按花色群聚之趨勢，其中黃花芥藍 G、I 及 O 自成一群，黃花芥藍 H、J、K 及 M 相互群聚，其他黃花種原各自分散。白花種原之 '蕙津'、'吃心芥藍'、'翠津'、'翠寶' 及 '白花大心芥藍' 五個種原在白花芥藍種原中為分布較離散的種原。另外，黃花白芥藍 N 未與任何種原群聚。

表六、26 個種原間之遺傳距離<sup>a</sup>

accession name	黃花芥藍 A	‘珍巧黑格林’ B	黃花芥藍 C	黃花芥藍 D	黃花芥藍 E	黃花芥藍 F	黃花芥藍 G	白花大心芥藍 H	黃花芥藍 I	青格藍 J	黃花芥藍 K	白花大心格藍 L	黃花芥藍 M	黃花芥藍 N	‘吃心芥藍’ O	明豐 2 號黑芥藍	黃花白芥藍	‘翠津’	黃花芥藍	‘蕙津’	‘翁山’	‘翠寶’	黃花芥藍 A			
黃花芥藍 A	0.00																									
‘珍巧黑格林’	1.43	0.00																								
黃花芥藍 B	1.24	1.96	0.00																							
黃花芥藍 C	0.99	1.99	1.15	0.00																						
黃花芥藍 D	1.40	2.06	1.46	1.28	0.00																					
黃花芥藍 E	1.12	1.61	1.10	0.96	1.24	0.00																				
黃花芥藍 F	1.05	1.79	1.45	1.06	1.08	0.93	0.00																			
黃花芥藍 G	1.63	1.78	1.75	1.65	1.50	1.40	1.50	0.00																		
白花大心芥藍	1.54	1.47	1.44	1.51	1.38	1.32	1.42	1.46	0.00																	
黃花芥藍 H	1.46	1.72	1.32	1.20	1.63	1.12	1.34	1.45	1.58	0.00																
黃花芥藍 I	1.55	1.78	1.63	1.57	1.32	1.27	1.40	0.47	1.40	1.56	0.00															
青格藍	1.46	1.45	1.16	1.66	1.66	1.35	1.64	1.45	1.08	1.70	1.49	0.00														
黃花芥藍 J	1.39	1.76	1.17	1.25	1.36	1.06	1.19	1.33	1.50	0.69	1.23	1.50	0.00													
白花大心格藍	1.56	1.47	1.81	1.91	2.02	1.70	1.93	1.71	1.23	2.04	1.72	1.13	1.91	0.00												
黃花芥藍 K	1.47	1.80	1.29	1.25	1.40	1.19	1.18	1.37	1.50	0.70	1.40	1.53	0.41	1.99	0.00											
黃花芥藍 L	1.55	1.21	1.49	1.84	1.95	1.74	1.94	1.79	1.39	1.63	1.94	1.03	1.74	1.67	1.66	0.00										
黃花芥藍 M	1.42	1.85	1.20	1.20	1.39	1.17	1.25	1.33	1.56	0.70	1.33	1.58	0.36	2.02	0.43	1.77	0.00									
‘吃心芥藍’	1.63	1.93	1.45	1.84	1.93	1.63	2.01	2.21	1.68	2.01	2.05	1.25	1.91	1.83	1.89	1.43	1.90	0.00								
明豐 2 號黑芥藍	1.42	1.36	1.25	1.71	1.64	1.38	1.70	1.39	1.04	1.69	1.43	0.31	1.46	1.11	1.50	0.99	1.56	1.30	0.00							
黃花白芥藍 N	1.90	1.63	1.99	2.36	1.96	2.05	2.10	1.62	1.40	2.36	1.75	1.18	2.27	1.56	2.23	1.51	2.24	1.77	1.27	0.00						
‘翠津’	1.76	1.88	1.55	1.92	1.93	1.84	1.89	1.91	1.42	2.00	1.83	1.07	1.79	1.78	1.70	1.24	1.73	1.28	1.04	1.81	0.00					
黃花芥藍 O	1.64	1.85	1.73	1.52	1.50	1.37	1.41	0.43	1.50	1.48	0.35	1.55	1.34	1.79	1.38	1.98	1.35	2.20	1.49	1.77	1.96	0.00				
‘蕙津’	1.09	1.54	1.42	1.17	1.38	1.12	1.29	1.38	1.31	1.64	1.42	1.18	1.53	1.32	1.53	1.42	1.58	1.65	1.12	1.88	1.49	1.45	0.00			
‘翁山’	1.49	1.47	1.29	1.76	1.67	1.43	1.68	1.30	0.95	1.81	1.33	0.40	1.59	1.10	1.65	1.11	1.62	1.39	0.44	1.12	1.05	1.39	1.19	0.00		
‘翠寶’	1.45	1.14	1.90	2.02	1.91	1.71	1.97	1.80	1.49	2.16	1.78	1.25	2.06	1.07	2.01	1.69	2.05	1.10	1.21	1.42	1.41	1.86	1.39	1.27	0.00	
‘清華’ (青花菜)	2.13	2.52	2.30	1.80	2.14	2.26	2.39	2.20	2.34	2.22	2.22	2.34	2.22	2.47	2.31	2.26	2.20	2.33	2.24	2.62	2.70	2.12	2.01	2.24	2.79	0.00



<sup>a</sup> 遺傳距離以 modified Roger's distance 表示。



圖七、以 20 個分子標誌對偶基因分析 26 個種原之主座標分析三維圖

黃色及藍色標示為黃花芥藍種原，按編號對照為 1：黃花芥藍 A，3：黃花芥藍 B，4：黃花芥藍 C，5：黃花芥藍 D，6：黃花芥藍 E，7：黃花芥藍 F，8：黃花芥藍 G，10：黃花芥藍 H，11：黃花芥藍 I，13：黃花芥藍 J，15：黃花芥藍 K，16：黃花芥藍 L，17：黃花芥藍 M，20：黃花白芥藍 N，22：黃花芥藍 O。黑色標示為白花芥藍種原，按編號對照為 2：‘珍巧黑格林’，9：白花大心芥藍，12：青格藍，14：白花大心格藍，18：‘吃心芥藍’，19：明豐 2 號黑芥藍，21：‘翠津’，23：‘蕙津’，24：‘翁山’，25：‘翠寶’。綠色標示為近緣物種青花菜種原‘清華’。

## 群集分析

以 NTSYS 2.0 套裝軟體 (Rohlf, 1998) 中不加權平均重法(UPGMA)對 26 個種原之遺傳距離進行演算，並繪製親緣樹圖 (圖八)。26 個種原中，青花菜‘清華’為芥藍之近緣物種，與各種原親緣關係較遠，首先被區分出來作為 root。而 25 個芥藍可分為 2 個群集 (cluster)。群集 I 由 13 個黃花芥藍種原及 1 個白花種原‘蕙津’組成，群集 II 則為除了‘蕙津’外的 9 個白花芥藍種原與黃花芥藍 I 及黃花白芥藍 N 組成。芥藍種原整體趨勢大致為按花色白色或黃色分群，除了黃花芥藍 L、黃花白芥藍 N 及‘蕙津’等 3 個種原未按花色分群。

以圖中親緣係數 1.00 為界，黃花芥藍為主的群集 I 內可再細分親緣較近之三群 I-A、I-B 及 I-C。群集 I-A 包括黃花芥藍 E 及黃花芥藍 F，群集 I-B 包含黃花芥藍 H、J、K 及 L 等 4 種原，群集 I-C 包含黃花芥藍 G、I 及 O 等 3 種原。而白花種原為主之群集 II，其 11 個種原間親緣較接近明顯在係數 1.00 下被分為一群者為青格藍、明豐 2 號黑芥藍及‘翁山’等 3 個種原，標示為群集 II-A。其他種原群集之位置介於親緣係數 1.00—1.80 間。

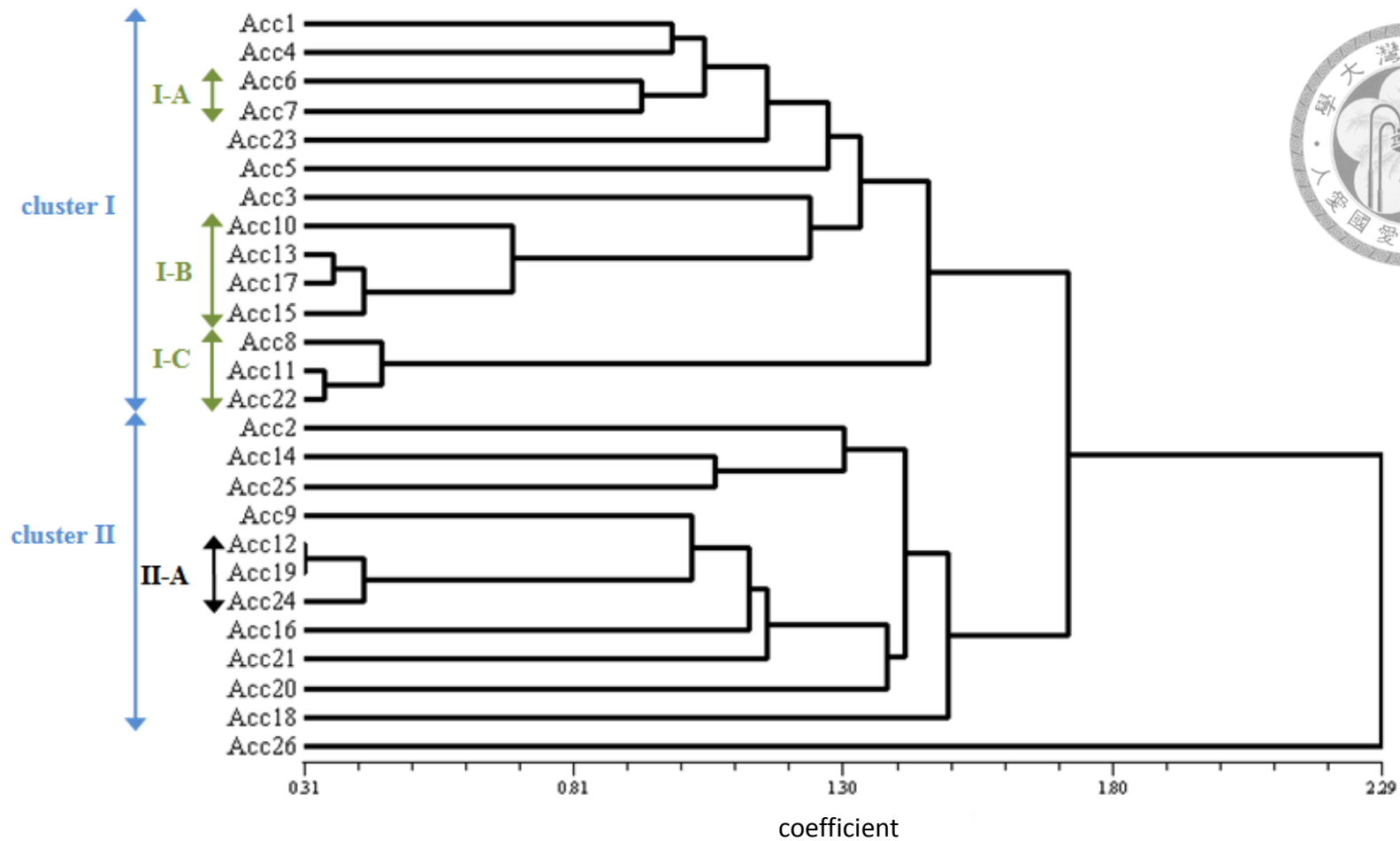
## 種原間族群分化指數 (Fst)

最後為種原間族群分化指數之觀察 (表七)。 $F_{st}$  數值小於 0.05，族群無明顯差異； $F_{st}$  數值介於 0.05 至 0.15，族群間僅少量變異； $F_{st}$  數值介於 0.15 至 0.25，族群間具中等適量之遺傳分化； $F_{st}$  數值大於 0.25，高度遺傳分化 (Wright, 1951)。26 個種原間族群分化指數介於 0.00—0.79 之間，最大值為‘吃心芥藍’與青花菜‘清華’之間，最小值為黃花芥藍 J 及 M 之間。兩兩種原間所有組合共有 325 組， $F_{st}$  值小於 0.05 共 9 組，佔所有組合 2.77%； $F_{st}$  值介於 0.05 至 0.15 共 3 組，佔 0.92%， $F_{st}$  值介於 0.15 至 0.25 共 31 組，佔 9.54%，約 86.77% 種原間為高度遺傳分化。其中‘珍巧黑格林’、‘吃心芥藍’、黃花白芥藍 N、‘蕙津’及‘翠寶’等 5 個種原與任何種原間皆呈高度分化。 $F_{st}$  值小於 0.05 之組合中，黃花芥

藍 G、I 及 O 之間族群無明顯差異，黃花芥藍 J、K 及 M 之間亦無明顯差異，並皆與黃花芥藍 H 間呈少量變異，其間 *Fst* 值為 0.05—0.15 間。另外，白花芥藍種原之青格藍、明豐 2 號黑芥藍及‘翁山’ 3 種原間亦無明顯差異，







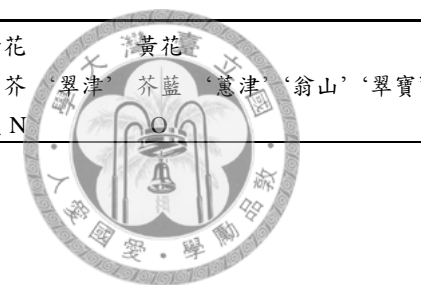
圖八、26 個芥藍種原不加權平均重法 (UPGMA) 演算親緣樹圖

26 個芥藍種原以 modified Roger's distance 為演算基礎之群集情形，圖中 Acc 後方數字為種原名稱代號 (詳表一)，可分為 Cluster I 及 Cluster II 共 2 群。遺傳距離 1.00 以下 cluster I 內可明確再分出 3 小群 I-A, I-B 及 I-C，cluster II 內有明確的 II-A 一群。Acc26 為芥藍近緣物種青花菜品種 '清華'。

表七、26 個芥藍種原間族群分化指數 ( $F_{st}$ )<sup>a</sup>


accession name	黃花芥藍 A	‘珍巧黑格林’ B	黃花芥藍 C	黃花芥藍 D	黃花芥藍 E	黃花芥藍 F	黃花芥藍 G	白花大心芥藍	黃花芥藍 H	黃花芥藍 I	青格藍	黃花芥藍 J	白花大心格藍	黃花芥藍 K	黃花芥藍 L	黃花芥藍 M	‘吃心芥藍’	明豐 2 號黑芥藍	黃花白芥藍 N	‘翠津’	黃花芥藍 O	‘蕙津’	‘翁山’	‘翠寶’	‘清華’(青花菜)	
‘珍巧黑格林’	0.43																									
黃花芥藍 B	0.32	0.49																								
黃花芥藍 C	0.28	0.53	0.31																							
黃花芥藍 D	0.35	0.51	0.37	0.30																						
黃花芥藍 E	0.23	0.38	0.25	0.22	0.25																					
黃花芥藍 F	0.21	0.46	0.34	0.21	0.21	0.17																				
黃花芥藍 G	0.45	0.46	0.44	0.44	0.36	0.29	0.36																			
白花大心芥藍	0.38	0.35	0.33	0.39	0.30	0.26	0.31	0.32																		
黃花芥藍 H	0.32	0.37	0.25	0.24	0.33	0.19	0.26	0.31	0.29																	
黃花芥藍 I	0.46	0.49	0.44	0.45	0.34	0.28	0.36	0.04	0.34	0.35																
青格藍	0.36	0.36	0.25	0.40	0.37	0.26	0.39	0.32	0.19	0.31	0.35															
黃花芥藍 J	0.31	0.40	0.21	0.23	0.27	0.18	0.22	0.26	0.29	0.06	0.28	0.29														
白花大心格藍	0.45	0.41	0.46	0.52	0.51	0.39	0.48	0.44	0.27	0.42	0.48	0.25	0.41													
黃花芥藍 K	0.30	0.38	0.23	0.22	0.26	0.18	0.20	0.27	0.26	0.05	0.29	0.27	0.01	0.39												
黃花芥藍 L	0.43	0.37	0.39	0.50	0.47	0.41	0.49	0.47	0.33	0.34	0.51	0.21	0.38	0.45	0.35											
黃花芥藍 M	0.29	0.39	0.21	0.20	0.26	0.16	0.21	0.26	0.28	0.06	0.28	0.28	0.00	0.41	0.01	0.36										
‘吃心芥藍’	0.55	0.60	0.43	0.59	0.56	0.44	0.58	0.61	0.49	0.47	0.61	0.33	0.47	0.61	0.44	0.49	0.43									
明豐 2 號黑芥藍	0.38	0.37	0.30	0.43	0.39	0.28	0.41	0.33	0.20	0.33	0.35	0.01	0.31	0.27	0.28	0.23	0.29	0.39								
黃花白芥藍 N	0.53	0.48	0.53	0.60	0.50	0.48	0.53	0.46	0.35	0.49	0.50	0.31	0.49	0.43	0.46	0.46	0.46	0.58	0.35							
‘翠津’	0.52	0.56	0.41	0.54	0.52	0.45	0.51	0.51	0.36	0.45	0.52	0.24	0.43	0.52	0.39	0.38	0.38	0.48	0.26	0.54						
黃花芥藍 O	0.43	0.46	0.43	0.41	0.35	0.27	0.34	0.02	0.33	0.31	0.01	0.33	0.27	0.45	0.27	0.49	0.26	0.59	0.34	0.46	0.51					
‘蕙津’	0.36	0.53	0.44	0.39	0.44	0.27	0.38	0.46	0.37	0.41	0.47	0.34	0.37	0.43	0.37	0.49	0.36	0.64	0.34	0.61	0.57	0.44				
‘翁山’	0.39	0.39	0.31	0.43	0.38	0.28	0.40	0.30	0.18	0.34	0.33	0.02	0.32	0.28	0.30	0.26	0.29	0.40	0.03	0.27	0.26	0.31	0.35			
‘翠寶’	0.46	0.34	0.50	0.56	0.53	0.40	0.51	0.48	0.39	0.48	0.51	0.27	0.47	0.34	0.44	0.48	0.44	0.49	0.30	0.42	0.50	0.47	0.53	0.31		
‘清華’(青花菜)	0.67	0.73	0.67	0.60	0.62	0.62	0.67	0.65	0.65	0.55	0.68	0.64	0.56	0.72	0.55	0.69	0.53	0.79	0.65	0.74	0.77	0.63	0.75	0.63	0.77	

<sup>a</sup> 表中  $F_{st}$  數值為運算後四捨五入至小數點後第二位之結果。



## 肆、討論

### 芥藍性狀資料分析



園藝性狀上，常以花色、葉色等作為芥藍種原間分群之依據 (Okuda and Fujime, 1996)。而本研究中就 SPAD 等 7 個植株外觀性狀、花色及幼苗之性狀而言 (附表一)，首先在種子百粒重方面，在種原間無一定表現趨勢，且採種技術優劣亦影響種子重量之表現。而各種原幼苗下胚軸花青素深淺之表現，在種原內個體分布比例雖傾向黃花芥藍種原下胚軸帶淺紫色個體比例較多，而白花芥藍種原下胚軸帶深紫色個體比例較多，但顏色深淺受部分主觀判斷之影響，因此僅能作出粗略之分類。另外，在 7 個植株外觀性狀經田間完全逢機設計之試驗後，由資料之分布情形可初步觀查 25 個芥藍種原在各性狀之變異範圍，而利用各性狀資料之標準差可觀查歧異度強弱，了解種原間之主要歧異度之來源。SPAD 等 7 個性狀資料經變方分析後，在種原間皆呈現顯著性差異，進一步進行最小顯著性測驗 (least significant difference test ; LSD test)，亦可看出種原間在各性狀之群集情形及差異，大致趨勢為 SPAD 值較高即外觀葉色較深者為多為白花芥藍，而株高偏高、展幅較大、葉長、葉寬及葉柄長較長者則有多為黃花芥藍種原之趨勢 (附表二)，但在莖徑上並無明顯易判斷之趨勢，顯示 SPAD 等 6 項外觀性狀在不同花色種原間具有歧異度。綜合圖二中在 SPAD 及展幅 2 項各種原資料較為離散，其標準差值達 10 以上為其他調查項目之 1.5—2 倍，在 25 個芥藍種原間具有較大之變異，為主要種原間歧異度之來源。再分別觀查各種原性狀資料之標準差，可看出種原內個體一致性之程度，在附表一中種原 3 黃花芥藍 B、種原 4 黃花芥藍 C、種原 10 黃花芥藍 H、種原 14 白花大心格藍及種原 17 黃花芥藍 M 等 5 個種原內分別在 3 以上之性狀調查資料為標準差較大之種原，因此種原內歧異度可能較高。

然而，透過外觀性狀調查資料統計分析雖可分別反應目標性狀在種原間或種原內之變異情形，但難以整合性地呈現種原內或種原間之歧異度。在性狀資料經

過主成份分析似後，可知種原間主要變異來源之性狀為何，由各種原小區平均值在二維及三維圖之散布情形，可輔助判斷種原間相似程度及種原內個體之一致性。以本試驗 7 項性狀資料之主成分分析結果（圖三及圖四），第一主成分與展幅、葉長及葉柄長 3 項具高度相關，其中以展幅相關性最高，為 91.7%，且此三項性狀間相互具有中等至高度正相關性（圖二），因此第一主成分對本次試性狀調查變異之解釋力達 54.95%。第二主成分與 SPAD 呈中度相關，且 SPAD 與其他性狀間僅具中度以下之相關性，因此對整體變異解釋力仍有 16.63%。第三主成分與葉寬具 62.54% 之相關性，且葉寬與展幅、葉長及 SPAD 呈中等至高度相關性。此結果與種原間性狀資料標準差之結果相符，26 個芥藍種原間之本次調查主要變異來自 SPAD 及展幅等 2 性狀，及其高度相關之性狀如葉長、葉寬及葉柄長亦有貢獻。

二維及三維空間分布情形（圖三及圖四）可清楚看到，種原間仍有按花色不同大致分為白花芥藍群與黃花芥藍群之趨勢。在白花芥藍群主要歧異度為第一主成分之相關性狀，即展幅等性狀之大小，而第二主成分變異較小，符合多數白花芥藍葉片外觀呈現深綠色，而這可能是長久以來之為對白花芥藍固定之人為篩選喜好而造成之結果。另外，種原 25 為日本品種‘翠寶’，與多數台灣蒐集之種原距離較遠，顯示不同國家之品種亦為擴大芥藍基因庫之重要資源。而黃花芥藍群間變異除了第一主成分有分布上之差異外，在第二主成分反應 SPAD 分布範圍較廣，即葉色深淺變化較白花芥藍群多，甚至因此種原 20 黃花白芥藍 N 較其他種原而言有較自成一群之分布。整體而言，SPAD 性狀、植株展幅及葉片性狀大小對本次試驗 25 個芥藍種原為主要變異來源，分群之情形僅能大約區別為黃花白芥藍 N、黃花芥藍群及白花芥藍群共三群，可能是因為黃花及白花種原引進台灣時間之差異（蕭與陳，2011）及長期人為選種之操作造成，但難以再深入探討是否種原間存在更多次族群之分化。另外，在圖三可看出種原 3 黃花芥藍 B、種原 4 黃花芥藍 C、種原 10 黃花芥藍 H 及種原 17 黃花芥藍 M 等 4 個種原內之資

料點較分散，種原內具有較高的歧異度。

### 芥藍種原內遺傳變異性



分子標誌應用於芥藍歧異度的研究中，多半採用 RAPD 及 ISSR 分子標誌兩種系統建構成本相對於 SSR 分子標誌較低且快速，具有資訊量大的優點，但相對地可能冒著條帶不易判斷或再現性不高的風險 (Marette *et al.*, 2002)。本試驗中使用 SSR 分子標誌，具有條帶再現性穩定之優點，且在 Celucia *et al.* (2009) 的研究中，在芥藍種原上使用 SSR 分子標誌也獲得高擴增條帶數，獲得多型性對偶基因擴增率介於 30-100% 間，而本實驗中 20 個 SSR 分子標誌共擴增 80 個對偶基因，且多型性達 100%。單一分子標誌偵測出不同對偶基因介於 2—11 種，多數分子標誌偵測出的種類為 2 至 4 種，平均為 4 種，80% 之分子標誌多型性訊息含量 (PIC) 屬中度以上(表四)。雖與過去在 RAPD 及 ISSR 分子標誌平均擴增條帶數為 6.4—17.0 相比較少，但多型性條帶出現的比率本試驗較高為 100%，RAPD 及 ISSR 分子標誌平均為 63.5% 至 88.7% (梁, 2007; Zhang *et al.*, 2014)。且 SSR 分子標誌在單一基因座之對偶基因為共顯性表現，因此可估算族群中對偶基因頻度，較接近於族群真實之遺傳組成，以避免顯性分子標誌分析時，對對偶基因之頻度資訊較為忽略，在種原個體取樣數少之情況下，使得部分對偶基因頻度可能被高估，產生權重過重影響種原間歧異度分析之精確度。

在 26 個種原各別種原內歧異度表現(表五)，對偶基因豐富度在 4 個專業種苗商之商業品種上，擴增之對偶基因種類皆低於 30 種，其中對偶基因擴增數最少者種原 18 吃心芥藍及一代雜交青花菜品種‘清華’，僅擴增 27 種對偶基因，次少者為‘蕙津’及一代雜交種‘翠寶’，對偶基因數為 29 種。同時觀查各別之平均主要對偶基因頻度值偏高為 0.70—0.88，且基因歧異度值為 0.09—0.20 較其他種原 0.20—0.43 低，顯示對偶基因豐富度低之種原內對偶基因頻度均勻度低，基因座上多具有高頻度存在之對偶基因，且種原異結合率低，具有遺傳豐富度越高

高、均勻度高則遺傳歧異度越高之趨勢。

此結果可能之原因是由於專業種苗公司之商業品種或一代雜交品種之親本經過較精良的育種操作，在固定的篩選標準下對育種材料之遺傳背景產生瓶頸效應 (bottleneck effect)，多數一般認知中不良之性狀相關之對偶基因被去除，因此在此育種材料中產生對偶基因表現單一之遺傳背景，降低了對偶基因之豐富度及均勻度。只有育種人員欲留存之特殊性狀相關對偶基因，才有較高的機率在族群中被保留，有機會在種原內形成異結合。反觀對偶基因豐富度最高之 4 個黃花芥藍種原 M、K、J 及 H，其對偶基因種類數大於 50 種，種原分別來自 1 家大型種苗商及 3 家零售之種子農藥行，且 4 者之平均主要對偶基因頻度較低，介於 0.48—0.52 間，且有較其他種原高的基因歧異度，介於 0.41—0.43。4 個種原之採種方式可能為傳統篩選優良植株並開放授粉的模式，以致於種原之對偶基因豐富度高且不同對偶基因頻度均勻，種原內歧異度高。而其他的種原對偶基因種類介於 30—50 種，其中來源為專業種苗公司之商業品種種原仍具有較低之對偶基因豐富度及歧異度，如種原‘翠津’。但其他 11 個種原，豐富度及歧異度表現居中，大部分為農民自留種或部分種苗行自行培育之品種，其留種模式可能為經篩選外觀相似之數個優良單株分別套袋授粉，但混合採收種子，因此較開放授粉模式多了一些人為篩選，而少了部分遺傳豐富度。由此可知，在農民留種或地方品種中，可保留較多之遺傳變異，這也呼應了 Christensen *et al.* (2011) 在甘藍地方種的研究中，所提及地方種為重要的遺傳育種資源。另外，較特別者為種原黃花白芥藍 N，其遺傳豐富度及均勻度亦偏低，對偶基因種類為 39 種，基因歧異度為 0.22，種原內遺傳歧異度低，與前人研究結果相同(梁，2007)，但該種原非經專業育種操作之商業品種，可能於引進台灣時，種原之對偶基因多型性已不高，此為較特殊之種原。




## 芥藍種原間遺傳歧異度分析



對於某個種原的了解，最單純的方式是直接栽培並觀察計錄，但若種原數量多時，所要花的人力及物力投入也很多。由本實驗結果可知若單憑性狀資料，也只能有限地解析種原間的差異，而且也冒著人工調查誤差之風險，粗略地將各種種原只分為白花芥藍群或黃花芥藍群不足以解釋我們所看到的植株變異，以及提供我們對各種種原應用之規劃。快速但成本較為提高的方式則可選擇將在相同種原內混合數個個體 DNA、利用分子標誌及 PCR 擴增條帶之差異，對種原進行群集或主坐標分析之分群。然而這仍冒著分子標誌可能未均等被擴增（Lazaro and Aguinagalde, 1996）的風險，且應用於群集分析之條帶資料忽略了對偶基因頻度之資訊，都可能導致無法正確地區分出種原間的差異。透過對各種種原內對偶之個體分開觀察其分子標誌對偶基因擴增之情形，忠實保留其原始對偶基因頻度及以此計算遺傳距離，進行親緣分析及次族群劃分之檢測，較合併資訊更能確切呈現種原間的分群情形以及可能的變異程度。

本試驗親緣分析採用以種原間對偶基因頻度為基礎之 modified Roger's distance 建構遺傳距離矩陣進行主座標分析及繪製種原間之親緣樹圖。在主座標分析部分，前三軸累積對變異之解釋力為 19.63%，圖八中，大致仍以花色為分群趨勢，且黃花白芥藍 N 此特殊種原亦獨立劃分於白花芥藍與一般黃花芥藍之外，此兩點與前人研究中使用 RAPD 及 ISSR 分子標誌分析之結果相同(梁, 2007)。但本試驗中獲得更多資訊為黃花芥藍種原間至少存在 2 個相互距離較遠之種原群聚位置，其中黃花芥藍 G、I 及 O 等 3 個種原明顯群聚，而黃花芥藍 H、J、K 及 M 則為另一群聚點，對照種原來源列表，發現群內種原雖來自台灣不同地方之種子行，但卻分布於相似之位點，因此群內之種原可能源於相同的大型種苗商，採種後批發給各替零售種子行，因而得到圖八之結果，表示眾多零售通路之種原很可能僅歸屬於少數幾個大型種苗商之種原。另外觀察農民自留種原，包括黃花



芥藍 B、C、E 及 F 種原之分布可發現，彼此較為分散，且先前表五中 4 個種原相較於其他種原而言，種原內具中等以上之基因歧異度，因此農民留種或地方種為擴大基因庫變異之良好材料。而白花芥藍種原中，主要種原間距離較遠，較大的變異則來自於國外種原如‘翠寶’，或是專業種苗商之品種如農友公司之‘翠津’及‘蕙津’，與農種苗公司之吃心芥藍等，已經過精良的育種操作，各有其特色對偶基因，種原內歧異度低，但與其他種原間在主座標分析中未群聚，可能具有較高之種原間歧異度。

在不加權平均重法 (UPGMA) 之親緣樹圖中 (圖八)，與主座標分析同樣使用 modified Roger's distance 為演算基礎，大致上種原群集之趨勢仍以花色為主，圖中可分為兩群，但黃花白芥藍 N 與白花芥藍群關係較近，與先前之研究相同 (梁，2007)。稍微不同為黃花芥藍種原 L 與白花芥藍種原群集，與其他黃花芥藍種原親緣較遠。另外白花芥藍‘蕙津’則與黃花芥藍種原群集，與前人研究中‘蕙津’與白花芥藍種原群集之結果不同 (梁，2007)。此兩個特例推測原因為，本研究分子標誌使用之數量有限，可能造成對某些種原間關係解釋有限。另一原因則是雖然該種原為黃花芥藍，但花色表現也僅是一項園藝性狀表現，亦有可能其基因體組成確實與白花芥藍群較為相近。而對照主座標分析之結果，黃花芥藍群中存在部分親緣特別接近之種原群集，如黃花芥藍 H、J、K 及 M 主座標分析三維圖中彼此分布接近，在親緣樹圖同樣歸屬於群集 I-B。而親緣樹圖上之群集 I-C 內黃花芥藍 G、I 及 O 之間的主座標分析分布與白花芥藍群群集 II-A 內青格藍、明豐 2 號黑芥藍及‘翁山’之主座標分析分布十分類似，這三個群集可視為較穩定之分群關係。因此，黃花芥藍內可能存在至少 2 個歧異度較小的群集，而白花芥藍內則至少存在 1 個歧異度較小的群。

族群間之分化指數則顯示，高達 85% 以上兩兩種原間呈現高度遺傳分化，顯示大部分種原間具高遺傳歧異度，但從少部分種原間具有族群無顯著差異或少量變異之結果，與親緣樹圖結果一致，如群集 I-B、群集 I-C 及群集 II-A，且這些群



集內在主座標分析空間分布關係亦相似。顯示芥藍種原蒐集之過程中確實可能發生購買來源不同，但種子實際可能來自同一個生產來源的情況。亦可從這些種原在各自種原間歧異度之表現上相類似得到佐證，如群集I-B中黃花芥藍H、J、K及M皆屬種原內歧異度較高者，且對偶基因豐富度結果亦相似。



綜合本研究對於26個芥藍種原之觀察，不同兩種花色對大部分種原仍是主要分群之依據，但利用SSR分子標誌多型性對偶基因擴增之結果，能較外觀園藝性狀，深入探討種原間遺傳變異。大致上黃花芥藍種原間變異較大，彼此間遺傳距離範圍較大，且內部存在2個群集分別內部之種原親緣極接近。黃花芥藍種原主要其變異之來源一為農民自留種，可能多來自於新北市一帶。二為大型或中南部種苗業者之種原。而種原來自小型種子農藥行者，其來源可能也是主要一至兩個大型種苗業者，大量生產後再批發至全臺各地。因此在種原蒐集及觀察人力投入之策略上，應鎖定農民自留種、地方種及大型種苗業者之種質，方能有效收集育種所需之遺傳變異資源。而由主座標分析之分布及族群分化指數結果顯示，白花芥藍其重要之遺傳變異來源可能為國外引進之品種或不同家種苗公司之商業品種。在明確了解種原遺傳結構及變異來源後，更能協助育種家辨識核心育種材料，提升在有限資源下對種原維護及蒐集遺傳變異之效率，加速育種工作前期之速度，並作為未來自交系雜交選育品種之參考。

## 伍、參考文獻



- 農業委員會農糧署。(2014) 農情報告資源網。農委會農糧屬企劃組，  
[http://agr.afa.gov.tw/afa/afa\\_frame.jsp](http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp)
- 臺灣地區現有作物栽培品種名錄-十字花科篇。1994。臺灣省農業試驗所特刊 43 號。臺灣省農業試驗所編印。
- 王曉蕙、羅鵬。(1987) 芥藍和結球甘藍染色體組型及 C-帶帶型的研究。植物學報。2，頁 5。
- 余曜全、項藍萱、李玠螢、宋承融、王群山、胡凱康、林彥蓉。(2013) 青花菜早晚生數量性狀基因座之研究。臺灣農藝學會一〇二年度年會作物科學講座暨研究成果發表會。第 56 頁。中華民國一〇二年四月二十五日 臺中。國立中興大學。
- 周禹、李燕、孫勃、石瑜、汪俏梅、汪炳良。(2010) 芥藍與甘藍其他變種分類關係的研究。園藝學報。37:1161-1168.
- 張平真。(2009) 關於芥藍起源的研究。中國蔬菜。14，頁 62-65。
- 梁婷雅。(2007) 利用 RAPD 與 ISSR 標誌分析芥藍的遺傳歧異度。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 劉海濤、關佩聰。(1997) 黃花芥藍與白花芥藍的分類學關係。華南農業大學學報，18 (2)，頁 13-16。
- 劉海濤、關佩聰。(1998) 芥藍的分類學研究。華南農業大學學報。19 (4)，頁 82-86。
- 蕭政弘 (2005) 芥藍。臺灣農家要覽-農作篇(二)。豐年社。臺北市。
- 蕭政弘、陳葦玲。(2011) 臺用芥藍新品種'臺中 1 號'育成。臺中區農業改良場研究彙報，113，頁 11-22。
- Babula D., Kaczmarek M., Ziółkowski P., Sadowski J. (2007) *Brassica oleracea*. In: Kole C, editor. *Vegetables*: Springer Berlin Heidelberg. pp 227-285.

Bailey L.H. (1922) The cultivated Brassica. Gentes Herb.

Botstein D., White R.L., Skolnick M. and Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet **32**: 314-331 .



Brown A.H.D. (2008) Indicators of Genetic Diversity, Genetic Erosion and Genetic Vulnerability for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Thematic Background Studies. FAO.

Celucia S.U., de la Peña R.C., Villa N.O. (2009) Genetic Characterization of *Brassica rapa chinensis* L., *B. rapa parachinensis* (LH Bailey) Hanelt, and *B. oleracea alboglabra* (LH Bailey) Hanelt Using Simple Sequence Repeat Markers. Philippine Journal of Science **138**:141-152.

Cheng X., Xu J., Xia S., Gu J., Yang Y., Fu J., Qian X., et al. (2009) Development and genetic mapping of microsatellite markers from genome survey sequences in *Brassica napus*. Theor Appl Genet **118**:1121-1131.

Christensen S., von Bothmer R., Poulsen G., Maggioni L., Phillip M., Andersen B.A., Jørgensen R.B. (2011) AFLP analysis of genetic diversity in leafy kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* (DC.) Alef.) landraces, cultivars and wild populations in Europe. Genet Resour Crop Ev **58**:657-666.

Dixon G.R. (2007) Origins and Diversity of Brassica and Its Relatives. Cambridge, MA: CABI Pub.

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Mol Ecol **14**:2611-2620.

Fan C., Cai G., Qin J., Li Q., Yang M., Wu J., Fu T., et al. (2010) Mapping of quantitative trait loci and development of allele-specific markers for seed weight in *Brassica napus*. Theor Appl Genet **121**:1289-1301.

- FAO. (2011) Production (FAOSTAT) Dataset, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>.
- Fenster C.B., Galloway L.F. (2000) Population differentiation in an annual legume: genetic architecture. *Evolution* **54**:1157-1172.
- Gower J.C. (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**:325-338.
- Hagidimitriou M., Katsiotis A., Menexes G., Pontikis C., Loukas M. (2005) Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFLPs and RAPDs) markers and morphological traits. *J Am Soc Hortic Sci* **130**:211-217.
- Hamilton M.B. (2009) *Population Genetics*. Wiley-Blackwell, Hoboken. pp.118-124.
- Hasan M., Friedt W., Pons-Kühnemann J., Freitag N., Link K., Snowdon R. (2008) Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theor Appl Genet* **116**:1035-1049.
- Hayden M.J., Nguyen T.M., Waterman A., Chalmers K.J. (2008) Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC genomics* **9**:80-91.
- Iniguez-Luy F.L., Voort A.V., Osborn T.C. (2008) Development of a set of public SSR markers derived from genomic sequence of a rapid cycling *Brassica oleracea* L. genotype. *Theor Appl Genet* **117**:977-985.
- Izzah N., Lee J., Perumal S., Park J., Ahn K., Fu D., Kim G.-B., et al. (2013) Microsatellite-based analysis of genetic diversity in 91 commercial *Brassica oleracea* L. cultivars belonging to six varietal groups. *Genet Resour Crop Ev* **60**:1967-1986.
- Laghetti G., Martignano F., Falco V., Cifarelli S., Gladis T., Hammer K. (2005) “Mugnoli” : a Neglected Race of *Brassica oleracea* L. from Salento (Italy). *Genet Resour Crop Ev* **52**:635-639.



Lazaro A., Aguinagalde I. (1996) Phylogenetic relationships between the wild taxa of the *Brassica oleracea* L. group (2n = 18) using random amplified polymorphic DNA assay. *Sci Hortic-Amsterdam* **65**:219-227.

Li Z., Pinson S.R.M., Stansel J.W., Park W.D. (1995) Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **91**:374-381.

Liu K. and Muse S.V. (2005) PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* **21**:2128-2129.

Lowe A., Moule C., Trick M., Edwards K. (2004) Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in Brassica crop species. *Theor Appl Genet* **108**:1103-1112.

McGrath J.M., Quiros C.F., Harada J.J., Landry B.S. (1990) Identification of *Brassica oleracea* monosomic alien chromosome addition lines with molecular markers reveals extensive gene duplication. *Mol Gen Genet* **223**:198-204.

Mei J., Li Q., Yang X., Qian L., Liu L., Yin J., Frauen M., et al. (2010) Genomic relationships between wild and cultivated *Brassica oleracea* L. with emphasis on the origination of cultivated crops. *Genet Resour Crop Ev* **57**:687-692.

Okuda N., Fujime Y. (1996) Plant growth characters of Chinese kale (*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra*). *ISHS Brassica Symposium-IX Crucifer Genetics Workshop 407*. p. 55-60.

Prakash S., Wu X.-M., Bhat S.R. (2011) History, Evolution, and Domestication of Brassica Crops. In John Wiley & Sons, Inc, eds, *Plant Breeding Reviews* pp. 19-84.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>.

Rahman M.H., Bennett R.A., Yang R.-C., Kebede B., Thiagarajah M.R. (2011)

Exploitation of the late flowering species *Brassica oleracea* L. for the improvement of earliness in *B. napus* L.: an untraditional approach. *Euphytica* **177**:365-374.



Reif J.C., Melchinger A.E., Frisch M. (2005) Genetical and Mathematical Properties of Similarity and Dissimilarity Coefficients Applied in Plant Breeding and Seed Bank Management. *Crop Sci* **45**:1-7.

Rohlf, F. J. (1998) NTSYS-pc version 2.0 Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter software. Setauket. New York.

Simonsen V., Heneen W.K. (1995) Genetic variation within and among different cultivars and landraces of *Brassica campestris* L. and *B. oleracea* L. based on isozymes. *Theor Appl Genet.* **91**:346-352.

Sneath P. H. A. and Sokal R. R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman. San Fransisco. CA.

Snogerup S. (1980) The wild forms of the *Brassica oleracea* group (2n= 18) and their possible relations to the cultivated ones. *Brassica crops and wild allies vol 1.* pp 121-132.

Song K., Osborn T.C., Williams P.H. (1990) Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theor Appl Genet* **79**:497-506.

Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. (1988a) Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theor Appl Genet* **76**:593-600.

Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. (1988b) Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theor Appl Genet* **75**:784-794.

Taylor R. (1990) Interpretation of the correlation coefficient : a basic review. *J Diagn*

Med Sonog. **1**:35-39.

Wang X., Rinehart T.A., Wadl P.A., Spiers J.M., Hadziabdic D., Windham M.T.,

Trigiano R.N. (2009) A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *Afr J Biotechnol* **8**:2432-2436.

Weir B.S. (1996) *Genetic data analysis II*, Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* **15**:323-354.

Wright, S. (1978) *Evolution and genetics of populations*. Vol. IV. The Univ. of Chicago Press. pp 91.

Zhang J., Zhang L. (2014) Evaluation of genetic diversity in Chinese kale (*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* Bailey) by using rapid amplified polymorphic DNA and sequence-related amplified polymorphism markers. *Genet Mol Res* **13**:3567-3576.



陸、附錄

附表一、25 個芥藍種原性狀調查表

Acc. Name <sup>a</sup>	petal color	SPAD	plant height (cm)	plant width (cm)	stem thickness (mm)	leaf length (cm)	leaf width (cm)	petiole length (cm)	weight per 100 seeds (g)	Anthocyanin on hypocotyl <sup>b</sup>		
										light purple (%)	medium purple (%)	deep purple (%)
黃花芥藍 A	Y	42.59±5.23	35.33±8.08	68.78±2.80	24.02±1.525	28.89±1.84	7.94±1.42	26.56±1.29	0.412±0.015	22	44	33
珍巧黑格林	W	57.58±3.92	39.22±2.34	49.89±3.56	35.40±2.543	20.44±0.51	9.83±0.76	19.89±0.98	0.429±0.019	25	44	31
黃花芥藍 B	Y	44.41±2.86	37.50±7.09	66.72±5.76	25.36±4.837	32.31±4.53	11.50±1.32	24.72±3.40	0.428±0.004	44	44	11
黃花芥藍 C	Y	50.38±2.66	41.06±8.43	67.56±10.46	27.29±6.574	31.78±5.54	7.44±1.95	24.33±4.04	0.464±0.007	69	25	6
黃花芥藍 D	Y	44.60±5.26	40.17±3.69	57.67±5.51	21.03±0.807	23.83±1.26	10.75±0.90	24.50±0.50	0.414±0.012	33	47	19
黃花芥藍 E	Y	43.82±1.10	34.89±5.22	57.61±9.32	21.21±2.028	28.50±2.29	6.75±1.39	19.17±3.40	0.274±0.004	33	56	11
黃花芥藍 F	Y	51.38±1.40	32.67±5.58	56.17±1.26	24.41±0.538	25.33±1.15	6.25±1.25	17.92±2.77	0.394±0.004	78	19	3
黃花芥藍 G	Y	43.92±5.60	29.67±4.16	61.17±1.89	21.61±2.068	30.83±3.33	7.67±0.76	26.67±0.76	0.421±0.002	89	11	0
白花大心芥藍	W	63.22±6.46	32.67±5.86	46.11±4.86	20.17±1.232	20.00±3.77	6.17±0.44	16.94±0.54	0.546±0.024	46	31	23
黃花芥藍 H	Y	44.96±0.99	37.11±3.42	54.33±9.61	17.07±3.172	22.89±2.36	9.78±2.52	18.44±2.11	0.382±0.005	89	11	0
黃花芥藍 I	Y	44.13±1.94	28.28±1.75	66.89±5.76	23.31±2.159	33.94±4.42	8.03±1.59	28.78±1.49	0.429±0.001	94	6	0
青格藍	W	60.20±1.83	34.50±0.50	47.33±8.13	19.69±2.836	19.67±0.58	6.92±0.80	17.33±0.52	0.617±0.009	11	25	64
黃花芥藍 J	Y	47.79±2.33	40.22±4.62	62.33±2.19	22.22±3.302	26.06±2.58	9.44±1.35	23.44±1.17	0.362±0.005	53	33	14
白花大心格藍	W	65.10±4.26	31.67±2.52	48.44±7.50	24.27±3.028	23.11±2.17	8.67±0.76	19.67±3.06	0.392±0.003	11	25	64
黃花芥藍 K	Y	43.23±3.18	40.11±7.20	70.56±4.17	24.37±1.843	29.83±0.93	11.33±1.04	22.06±5.67	0.377±0.006	69	31	0
黃花芥藍 L	Y	39.48±3.57	42.72±7.12	60.50±7.09	18.20±1.721	26.81±1.62	10.56±0.92	23.50±1.00	0.405±0.004	72	22	6
黃花芥藍 M	Y	51.78±5.30	33.33±4.73	60.67±11.02	17.95±1.432	25.67±5.13	9.17±1.26	21.33±5.51	0.351±0.006	31	39	31
吃心芥藍	W	66.28±3.31	30.00±5.07	35.00±1.80	16.72±1.595	15.25±0.66	4.42±0.58	14.17±1.04	0.571±0.023	11	15	74
明豐 2 號黑芥藍	W	58.65±6.87	33.94±4.28	50.83±2.36	22.05±7.144	21.53±2.63	9.11±0.19	19.28±2.43	0.464±0.007	0	19	81
黃花白芥藍 N	Y	25.23±1.31	30.78±2.83	51.28±6.75	19.41±1.363	25.17±3.62	7.00±1.36	24.06±3.40	0.404±0.025	42	31	28
‘翠津’	W	64.21±2.02	40.94±3.12	61.50±0.50	27.72±0.492	27.31±2.26	8.56±1.08	21.56±0.38	0.410±0.005	7	44	49
黃花芥藍 O	Y	41.44±2.70	34.22±0.69	68.06±2.53	24.50±1.465	33.56±0.38	7.17±1.76	27.33±1.76	0.503±0.007	83	14	3
‘蕙津’	W	60.50±2.27	43.50±5.22	71.67±4.51	27.67±3.368	32.33±1.53	7.25±2.54	22.17±2.02	0.658±0.003	5	34	60
‘翁山’ (Oros)	W	62.04±4.73	33.56±2.71	44.11±4.14	21.24±3.561	18.81±1.90	7.39±0.19	17.78±0.86	0.500±0.004	14	51	34
‘翠寶’	W	64.64±1.84	25.00±0.00	35.22±0.63	17.11±2.015	15.36±1.69	5.39±0.79	15.17±1.66	0.486±0.003	0	7	93

<sup>a</sup> Acc.Name 為 Accession Name

<sup>b</sup> Anthocyanin on hypocotyl 為按照下胚軸花青素累積之深淺程度分為 light purple：淺紫；medium purple：中等紫色；deep purple：深紫色。%為種原中不同深淺程度之個體比例。



附表二、各種原之 7 個性狀均值最小顯著性測驗 (LSD) 結果

Acc. Name <sup>a</sup>	SPAD	Plant height (cm)	plant width (cm)	stem thickness (mm)	leaf length (cm)	leaf width (cm)	petiole length (cm)
黃花芥藍 A	42.59 gh	35.33 bcdefg	68.78 abc	24.023 bcde	28.89 bcdef	26.56 ab	7.94 defghij
珍巧黑格林	57.58 cd	39.22 abcde	49.89 ghij	35.399 a	20.44 ij	19.89 defghijk	9.83 abcd
黃花芥藍 B	44.41 fgh	37.50 abcdef	66.72 abcd	25.362 bc	32.31 ab	24.72 abc	11.50 a
黃花芥藍 C	50.38 ef	41.06 abc	67.56 abc	27.288 b	31.78 abc	24.33 bc	7.44 fghijk
黃花芥藍 D	44.60 fgh	40.17 abcd	57.67 defg	21.030 cdefg	23.83 ghi	24.5 bc	10.75 ab
黃花芥藍 E	43.82 gh	34.89 bcdefg	57.61 defg	21.211 cdefg	28.5 bcdef	19.17 ghijkl	6.75 ijk
黃花芥藍 F	51.38 e	32.67 defgh	56.17 efgh	24.405 bcd	25.33 efgh	17.92 hijklm	6.25 jkl
黃花芥藍 G	43.92 gh	29.67 fgh	61.17 bcde	21.612 cdefg	30.83 abcd	26.67 ab	7.67 efghij
白花大心芥藍	63.22 abc	32.67 defgh	46.11 ij	20.166 defg	20.00 ij	16.94 klm	6.17 jkl
黃花芥藍 H	44.96 fgh	37.11 abcdef	54.33 efghi	17.067 g	22.89 ghij	18.44 ghijkl	9.78 abcde
黃花芥藍 I	44.13 gh	28.28 gh	66.89 abcd	23.309 bcde	33.94 a	28.78 a	8.03 defghij
青格藍	60.2 abc	34.50 cdefg	47.33 hij	19.690 defg	19.67 ijk	17.33 jklm	6.92 ijk
黃花芥藍 J	47.79 efg	40.22 abcd	62.33 abcde	22.22 cdef	26.06 efg	23.44 bcdef	9.44 abcdef
白花大心格藍	65.10 a	31.67 efgh	48.44 ghij	24.268 bcde	23.11 ghij	19.67 efghijk	8.67 bcdefghi
黃花芥藍 K	43.23 gh	40.11 abcd	70.56 ab	24.371 bcd	29.83 abcde	22.06 cdefgh	11.33 a
黃花芥藍 L	39.48 h	42.72 ab	60.50 cdef	18.203 fg	26.81 defg	23.5 bcde	10.56 abc
黃花芥藍 M	51.78 de	33.33 cdefg	60.67 cdef	17.952 fg	25.67 efgh	21.33 cdefghij	9.17 bcdefg
吃心芥藍	66.28 a	30.00 fgh	35.00 k	16.722 g	15.25 k	14.17 m	4.42 l
明豐 2 號黑芥藍	58.65 bc	33.94 cdefg	50.83 ghij	22.049 cdef	21.53 hij	19.28 fghijkl	9.11 bcdefgh
黃花白芥藍 N	25.23 i	30.78 fgh	51.28 fghij	19.407 efg	25.17 fgh	24.06 bcd	7.00 hijk
‘翠津’	64.21 ab	40.94 abc	61.5 bcde	27.723 b	27.31 cdefg	21.56 cdefghi	8.56 cdefghi
黃花芥藍 O	41.44 h	34.22 cdefg	68.06 abc	24.504 bcd	33.56 a	27.33 ab	7.17 ghijk
‘蕙津’	60.5 abc	43.50 a	71.67 a	27.670 b	32.33 ab	22.17 cdefg	7.25 ghijk
‘翁山’ (Oros)	62.04 abc	33.56 cdefg	44.11 jk	21.237 cdefg	18.81 jk	17.78 ijklm	7.39 fghijk
‘翠寶’	64.64 ab	25.00 h	35.22 k	17.108 g	15.36 k	15.17 lm	5.39 kl
LSD (5%)	6.11	7.9	9.56	4.902	4.51	4.17	2.13

同行英文字母相同者表示最小顯著差異測驗 (LSD) 在 5% 水準差異不顯著。