

# 以 ISSR 分子標誌探討大蒜品種之遺傳相關性<sup>1</sup>

## A Study on Genetic Relationship among Garlic Clones with ISSR Markers

許涵鈞<sup>2</sup> 胡凱康<sup>3</sup> 鄧汀欽<sup>4</sup> 顏永福<sup>5</sup> 曹幸之<sup>3</sup>

by

Han-Chun Hsu, Kae-Kang Hwu, Ting-Chin Deng, Yun-Fu Yen and Shing-Jy Tsao

關鍵字：遺傳歧異、大片黑系統、宜蘭白蒜、多型性分析、大蒜種原

Key words: genetic diversity, Large Black Leaf type, 'Yi-Lan White' garlic, polymorphism analysis, garlic germplasm

**摘要：**本研究利用 ISSR(Inter simple sequence repeat)分子標誌探討收集到的 46 大蒜品種種原的遺傳相關性。經 PCR(Polymerase chain reaction)條件測試及引子黏合溫度篩選，由九條 UBC 引子擴增出 37 個多型性標誌，計算供試大蒜材料間的遺傳相似度。由群叢分析結果將大蒜品種(系)在平均相似度 0.12 時分為三大群。大多數的臺灣品種(系)及來自印度、印尼、菲律賓等地的品種(系)都在第一、二兩群。第一群以大片黑系統為主，第二群則包含和美種(硬骨小葉)、花蒜類及南亞品種。所有來自中國的地方品種群聚在第三群。第三群又分為兩小群。第一小群包含‘鳳山選二號’、‘花蒜選’、‘宜蘭白 1’、‘北蒜’與中國大陸南方品種(系)。第二小群則為大陸北方山東、河南地區品種(系)。由此，臺灣栽培之大蒜品種(系)可分成(1)大片黑系統、(2)和美種與花蒜類及(3)宜蘭白蒜等三群；其中和美種及花蒜間有較高相關性。

## 前 言

大蒜(*Allium sativum* L.)由於具香、辛、辣的味道，被譽為“flavor of the ages”，一直是廣受喜愛的必備調味料，可以刺激食慾。蒜頭耐儲放，在國際貿易上，1981 年世界進、出口總量達 10 萬公噸以上。以後更逐漸增加，到 2005 年各國出口總量已達 149 萬公噸，其中中國大陸出口即佔 77% (鄧, 2007)。中國也是世界大蒜的最大產地，其生產量占世界總量的 75%。臺灣地區大蒜栽培約有 300 年歷史，品

<sup>1</sup> 本文係第一作者碩士論文之一部分，研究期間承蒙農委會農糧署補助研究經費，謹此致謝。The paper is part of the MS thesis of the first author. This research was funded by the Agriculture and Food Agency of COA, project [94 AS-1.3.2-F-Z2 (4)].

<sup>2</sup> 行政院農業委員會臺南區農業改良場助理研究員。Assistant Researcher, Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Tainan, Taiwan, R.O.C.

<sup>3</sup> 國立臺灣大學農藝系副教授、園藝系副教授(通訊作者)Associate professor, Department of Agronomy, and associate professor (corresponding author), Department of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

<sup>4</sup> 行政院農業委員會農業試驗所植病組研究員。Researcher, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, WuFeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.

<sup>5</sup> 國立嘉義大學生物農業科技學系教授兼系主任。Professor and Head, Department of BioAgricultural Science, National ChiaYi University, ChiaYi, Taiwan, R.O.C.

<sup>6</sup> 本文於民國九十六年十二月二十八日收到。民國九十七年十一月十八日接受刊登。Received for publication: 28 Dec., 2007. Accepted for publication: 18 Nov., 2008.

種(系)大約有 40 種之多，而以蒜球用品種為主。產地以彰化、雲林及台南為主，每年生產大蒜 5-7 萬公噸。

栽培種大蒜因不具稔性，以蒜瓣及珠芽無性繁殖為主要繁殖方式。其型態特徵之變異不像有性繁殖作物那麼多，大致依鱗莖外皮顏色、蒜苔的有無、蒜瓣大小、葉形及質地等型態特徵進行分類；近年傾向分成不同的品種分群(Lallemand, 1997; Maaß and Klaas, 1995)。依據採收目的可分成蒜球或青蒜用品種。臺灣依葉質柔軟度為青蒜品質指標，分軟骨(青蒜適用)、硬骨二大類。主要的地方品種有‘宜蘭白蒜’、‘大片黑’、‘和美’(生產蒜球)及‘花蒜’等，但各地還有依產地、葉片大小、顏色而命名的大蒜，如‘學甲大片黑’、‘和美尖葉’等。這些栽培品種是否具有相近的親緣，或是不同生態型，需要進一步探討。

利用 DNA 分子標誌探討遺傳相關性具有快速、準確等優點，於大蒜種原鑑定上亦能區分變種及品種(系)間之差異(周等, 2004; 陳等, 2005; 趙與楊, 2005; Al-Zahim *et al.*, 1997; Bradely *et al.*, 1996; Etoh *et al.*, 2001; Ipek and Simon, 2003; Lampasona *et al.*, 2003; Maaß and Klaas, 1995; Volk *et al.*, 2004)。SSR (simple sequence repeat, SSR)在真核生物的基因體中普遍存在。由於基因體上 SSR 的形式、分布及數目都不同，現在也應用將 SSR 直接作為 PCR(Polymerase Chain Reaction)反應的核苷酸引子，以此擴增得到的 PCR 產物為 SSR 之間的序列區域，是為 inter-SSR，即 ISSR。個體間 ISSR 標誌在數量及長度上的多型性表現可用以分析遺傳變異(Gupta *et al.*, 1994; Reddy and Siddiq, 2002)。

許等(2006)為探討青蒜、花蒜及大蒜品種(系)間遺傳相關性及種原的遺傳差異，利用 RAPD(Randomly amplified polymorphic DNAs)分子標誌所獲得群叢分析結果與地理來源有關。本研究利用 ISSR 分子標誌進行同批大蒜種原及栽培品種(系)的遺傳歧異度分析，並與 RAPD 分析結果比較。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

供試材料包括由台南區農業改良場義竹工作站、農試所、臺灣大學農藝系以及海關扣檢之 2 批疑為大陸樣品，一共 46 種。除海關樣品外，涵蓋臺灣(26 個)、南亞及東南亞(7 個)、韓國(1 個)、中國大陸(10 個)大蒜；另外以青蔥(*A. fistulosum*)及採自市民農園的韭蔥(*A. ampeloprasum*)各一種作為外群(outgroup)。大蒜各品種(系)的來源及名稱列於表 1。

### 二、試驗方法

#### (一)植物 genomic DNA 萃取

每一大蒜品種隨機取四株新葉秤取 0.2 g，以冷凍真空乾燥機(-50°C、100 mmHg)乾燥 24 小時，將乾燥葉片磨成粉後，依照詹(2002)參考 Doyle and Doyle(1990)並略作修改之方法，於使用前在 CTAB 溶液(含 2% hexadecyltrimethylammonium bromide)中加入 1% PVP(polyvinylpolypyrrolidone)及 2%  $\beta$ -ME(2-Mercaptoethanol)，抽取 DNA 後，儲藏於-20°C 冰箱備用。

#### (二)ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat)

分析與電泳試驗所用核酸引子是由 UBC(University of British Columbia)所合成的第九組 primer，有 100 種不同核酸引子序列。先以玉米、大蒜、油菜及大豆四種植物 DNA 進行引子篩選及黏合溫度測試。共進行三種溫度測試(50、55、60°C)，48 個大蒜及蔥屬參試 DNA 樣品中隨機選 12 個樣品進行核酸引子之初步篩選。若能擴增多型性 DNA 片段，則選出供進行 PCR 反應。



表 1. 參試 46 個大蒜材料之品種或收集名稱、提供來源、栽種地及 RAPD、ISSR 分群結果。

Table 1. The cultivar names, donors, sources and RAPD, ISSR grouping of 46 garlic (*Allium sativum* L.) accessions.

	品種或收集名稱 Variety/accession	提供來源 <sup>z</sup> Donor	栽種地 Source	RAPD <sup>y</sup> group	ISSR group
1	鳳山選一號	A	臺灣	1	1
2	鳳山選二號	A	臺灣	1	2
3	新品種黑葉	A	臺灣	2	2
4	學甲大片黑	A	臺灣	1	1
5	大片黑	A	臺灣	1	1
6	二片黑	A	臺灣	1	1
7	西螺二片黑	A	臺灣	1	1
8	和美白葉種	A	臺灣	1	2
9	西港蒲蒜	A	臺灣	1	2
10	和美尖葉	A	臺灣	1	2
11	和美多瓣	A	臺灣	1	2
12	和美黑葉	A	臺灣	1	2
13	花蒜	A	臺灣	1	2
14	花蒜早熟種	A	臺灣	1	2
15	安南花蒜	A	臺灣	2	2
16	花蒜選	A	臺灣	2	2
17	壯園公館紅葉	A	臺灣	2	2
18	壯園新南產	A	臺灣	1	1
19	CITC-10	A	印尼	1	1
20	CITC-12	A	印尼	1	2
21	Local landrace	A	亞蔬-印度	3	2
22	Sweta	A	亞蔬-印度	3	2
23	北蒜	A	中國大陸	2	2
24	PHL6153	A	亞蔬-菲律賓	3	2
25	PHL6168	A	亞蔬-菲律賓	3	2
26	Ja 92-383	A	亞蔬	2	2
27	和美 1	B	臺灣	1	2
28	大片黑 B	B	臺灣	1	1
29	大片黑白葉	B	臺灣	1	1
30	鳳山選 1 號	B	臺灣	2	1
31	鳳山 98	B	臺灣	1	1
32	宜蘭白 1	B	臺灣	1	2
33	韓國 1	B	韓國	1	1
34	湖南茶陵 2	C	中國大陸	2	3
35	湖南 3	C	中國大陸	2	3
36	湖南 2	C	中國大陸	2	3
37	雲南 1	C	中國大陸	2	3
38	山東 4	C	中國大陸	3	3
39	河南 2	C	中國大陸	3	3
40	河南 1	C	中國大陸	3	3
41	山東 1	C	中國大陸	3	3
42	山東 3	C	中國大陸	3	4
43	910048	D	疑為中國大陸	3	3
44	910025	D	疑為中國大陸	3	3
45	宜蘭白蒜珠芽	E	臺灣	1	2
46	宜蘭白蒜	E	臺灣	1	2
47	韭蔥	外群	臺灣		
48	蔥	外群	臺灣		

<sup>z</sup>材料來源代號。A：台南區農業改良場義竹工作站種原、B：農業試驗所、C：臺灣大學農藝學系曾美會名譽教授、D：關稅總局樣品、E：零星收集<sup>y</sup>RAPD 分析結果採用許等(2006)分群結果

PCR 反應總體積為 10  $\mu$ L，內含 2.0 mM  $MgCl_2$ ，0.2 mM dNTP，0.4 mM primer，20 ng genomic DNA 及 0.6 units Taq polymerase(Biotoools, B&M Labs, S.A.)。以 Perkin Elmer 生產之 Gene Amp TM PCR System 9700 熱循環反應器進行 PCR 反應。反應條件為 94 $^{\circ}C$ ，10 分鐘；94 $^{\circ}C$ ，30 秒、\*50/55/60 $^{\circ}C$ ，30 秒、72 $^{\circ}C$ ，30 秒，循環 35 次(\*依核酸引子序列而定)；72 $^{\circ}C$ ，5 分鐘。

反應完成之 PCR 產物加入 2  $\mu$ L stop dye，以 2% NuSiver 3:1 agarose (溶於 0.5 $\times$  TBE buffer)膠片進行電泳分析。膠片以 0.5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> ethidium bromide (EtBr)進行染色 15 分鐘，退染後置於 UV 燈下觀察並照相紀錄。

### (三)資料分析

多型性 DNA 片段之有無以二元資料格式紀錄，採用 Jaccard(1908)相似度，以 NTSYSpc Ver. 2.2 (Rohlf, 2007) 計算遺傳相似度矩陣(genetic similarity matrix)，並以 UPGMA(Un-weighted Pair-Group Method using Arithmetic averages) (Sneath and Sokal, 1973)演算法進行群叢分析(cluster analysis)及建構相似性樹狀圖。

本研究所獲得的遺傳相似度矩陣，與許等(2006)利用 RAPD(Randomly amplified polymorphic DNAs)在相同 48 參試材料所獲得遺傳相似度矩陣，以 NTSYSpc Ver. 2.2 的 MxComp 模組進行 Mantel test (Mantel, 1967)，計算相關係數。

## 結果

### 一、ISSR 分析及多型性條帶

各引子先經過不同溫度與不同 PCR 循環次數的測試，找出可在大蒜樣品間擴增清晰易判讀條帶(圖 1 為引子 UBC812 擴增條帶的電泳圖)的條件。依引子不同，選擇 55 $^{\circ}C$ 或 60 $^{\circ}C$ 黏合溫度(表 2)，及 35 次 PCR cycle 進行 PCR 反應，進行多型性條帶紀錄及遺傳相似度分析。

由 67 個可在大蒜擴增出條帶的引子，進行品種間多型性條帶篩選，以染色強度大於 DNA marker 500 bp 的條帶記錄多型性，選出九個具兩次再現性之引子進行試驗。結果共擴增 37 個具多型性條帶，其中 25 個為大蒜間多型性條帶，12 個為外群材料所特有，條帶大小介於 1800-350 bp 之間，平均每引子可擴增出 4.11 組多型性條帶(表 2)。供試材料中，‘山東 3’只擴增出一個條帶，其次為‘大片黑’(義竹種原)擴增出 3 個條帶，擴增出 5 個條帶的有‘山東 4’、‘壯圍新南產’、‘二片黑’三品種；‘花蒜’及‘西港蒲蒜’擴增出的條帶最多有 15 條。

### 二、品種(系)間的相似度與群叢分析

由九條引子在供試材料共擴增的 37 個具多型性 ISSR 標誌，計算各供試材料間之相似度，由 0 到 1.00(資料未示)。依 UPGMA 群叢分析結果及樹狀圖(圖 2)顯示，外群之韭蔥與大蒜間遺傳相似度(0.068)較蔥與大蒜(0.02)間高。由中國大陸取得之材料‘山東 3’與其他大蒜材料在相似度 0.092 區分，並獨立為一支(圖 2)。在平均相似度 0.17 時可將參試大蒜材料分成三群。第一、二群間遺傳相似度為 0.2，以臺灣地區品種(系)為主，並包含少數印尼、菲律賓及印度地方品種。第一群在平均相似度 0.24 處聚成一類，類型上它們具葉色深綠、葉片較寬、葉片形態直立等特徵，屬於採收蒜頭為主的大黑葉系統。其中‘大片黑 B’、‘韓國 1’與‘鳳山選 1 號’三者間以及‘壯圍新南產’與‘二片黑’兩者間相似度為 1.00，無法區分。第二群則在平均相似度 0.38 處聚成一類，以彰化和美地方品種為主，也包含宜蘭地區品種及花蒜類品種(系)；在形態分類上具有葉色較淡、葉片形態下垂、能完全抽苔且可採收作為青蒜用。其中‘花蒜’與‘西港蒲蒜’間、‘和美多瓣’與‘Ja 92-383’間以及‘和美白葉種’與‘Nacltoveros’間的相似度各為 1.00，無法區分。第三群在相似度 0.16 時群聚，以中國地方品種為主，且在相似度 0.39 處分成兩小群，第一小群以中國南方湖南、雲南地區品種為主，還包含‘北蒜’、‘花蒜選’、‘鳳山選二號’、‘宜蘭白’等

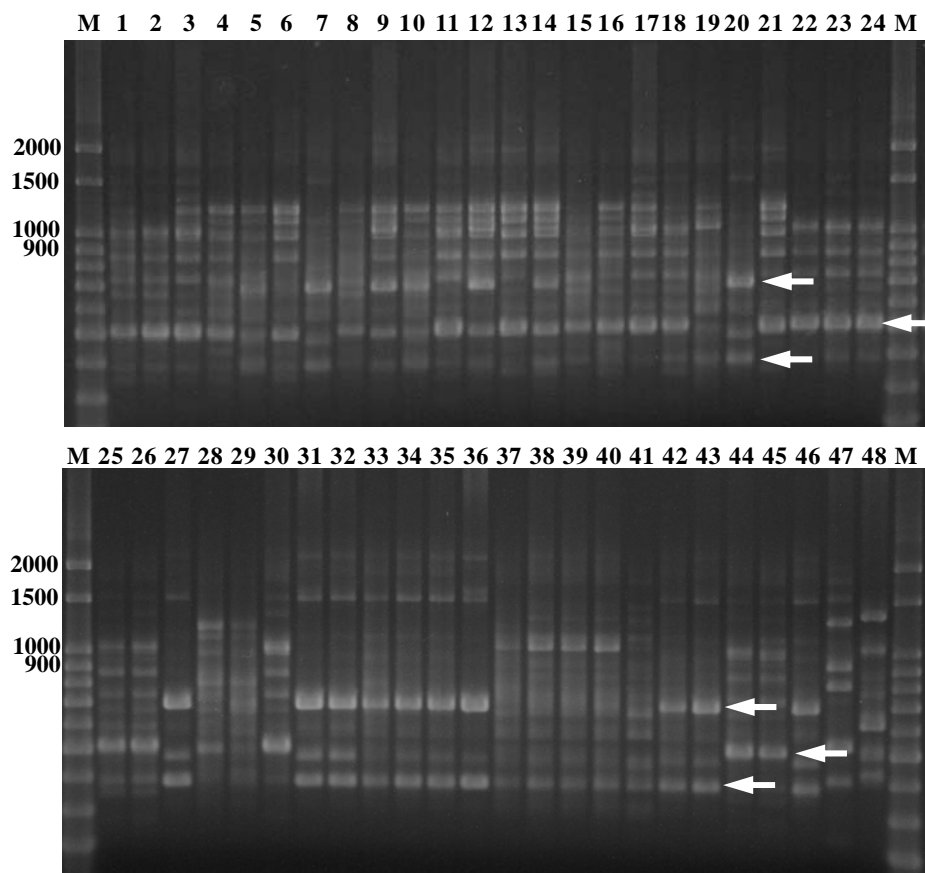


圖 1. ISSR(Inter-simple sequence repeat)引子 UBC812 在大蒜所擴增之條帶。(從左向右) No.1~24 (上)，No.25~48(下) 同表 1。箭頭所指為多型性條帶處

Fig. 1. ISSR banding profiles generated by primer UBC812 on garlic accessions. (from left) No.1~24 (above), No.25~48 (below) as listed in Table 1. Arrows indicate the polymorphic fragments.

表 2. 篩選得到的 ISSR 引子序列、黏合溫度及擴增出多型性條帶數。

Table 2. The selected primer sequences, annealing temperature and number of polymorphic bands amplified in ISSR analysis.

引子 Primer	序列 Sequence	黏合溫度 Annealing temperature °C	擴增條帶數 No. of amplified fragments	多型性條帶數 No. of polymorphic fragments	外群特有 Outgroup specific fragments
801	(AT) <sub>8</sub> T	55	4	2	2
807	(AG) <sub>8</sub> T	55	3	2	1
808	(AG) <sub>8</sub> C	55	5	2	3
809	(AG) <sub>8</sub> G	55	4	3	1
810	(GA) <sub>8</sub> T	55	4	3	1
811	(GA) <sub>8</sub> C	55	5	3	2
812	(GA) <sub>8</sub> A	60	3	3	0
818	(CA) <sub>8</sub> G	60	6	4	2
823	(TC) <sub>8</sub> C	55	3	3	0

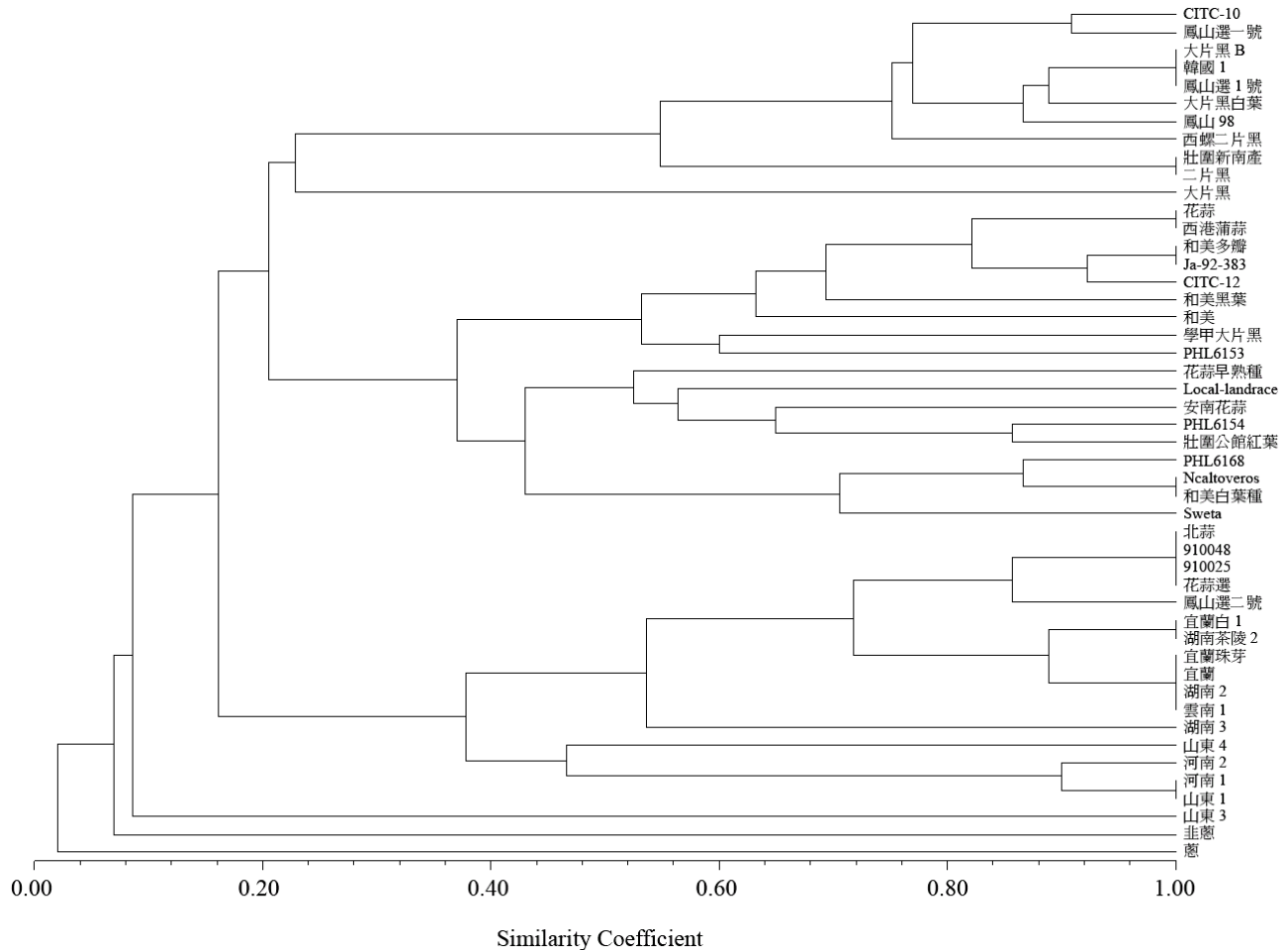


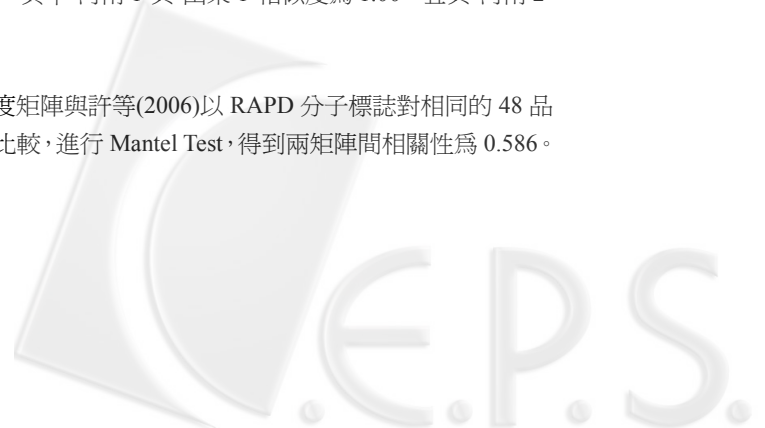
圖 2. 以 37 個 ISSR 多型性條帶分析 46 個參試大蒜材料

Fig. 2. The UPGMA dendrogram of 46 garlic accessions based on 37 polymorphic ISSR markers.

臺灣品種(系)。其中‘北蒜’、‘花蒜選’、海關樣品‘910048’及‘910025’彼此間無法區分。‘宜蘭白 1’與‘湖南茶陵 2’間，‘宜蘭白蒜’與‘宜蘭白蒜珠芽’間，及‘湖南 2’與‘雲南 1’間相似度各為 1.00，不能區分。第二小群則包含五個中國北方山東、河南地區品種，其中‘河南 1’與‘山東 1’相似度為 1.00，且與‘河南 2’之平均遺傳相似度為 0.89 (圖 2)。

### 三、兩種標誌之相關性

本研究以 ISSR 分子標誌所估算的遺傳相似度矩陣與許等(2006)以 RAPD 分子標誌對相同的 48 品種(系)大蒜及外群所估算的遺傳相似度矩陣之間比較，進行 Mantel Test，得到兩矩陣間相關性為 0.586。



## 討論

本研究延續許等(2006)以 RAPD 分析青蒜、花蒜及大蒜品種(系)間遺傳相關性及種原遺傳差異,利用 ISSR 分子標誌進行同批材料的分析,希望對大蒜種原及品種(系)的遺傳歧異提供更多資訊。本研究挑選 46 個材料;引子篩選時,除選用適宜黏合溫度,也選擇 PCR 循環數,使產生條帶數較少、更清楚。在受試品種中平均每引子擴增 4.11 個多型性條帶,與前人研究擴增數量類似(陳, 2002; Katzir, 1998);但遠少於陳(2004)之結果。除 PCR 條件不同外,可能因陳(2004)使用 5.25% 聚丙烯醯胺膠體 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)進行電泳分析,也是造成不同結果之原因。Gupta (1994)曾以 agarose gel 與 PAGE gel 分析相同引子得到的標誌,結果用 PAGE gel 得到條帶數較多。Katzir(1998)提出利用 PAGE gel 分析所得條帶數為 agarose gel 數目的三倍。

所選用 ISSR 引子產生多型性比率由引子 808 的 0.4 到引子 823 的 1.0 (表 2);引子以序列為(AG)、(GA)最多,序列為(TC)、(CA)及(AT)的引子各一個。此結果與其他植物相同,基因組中以兩個核酸鹼基的重複序列最為豐富,以其為引子所獲多型性最高 (Reddy and Siddiq, 2002)。且引子在 3' 端多加鹼基所得條帶 pattern 更清楚。

群叢分析結果顯示花蒜類品種除‘花蒜選’在第三群,其它皆聚於第二群中。第二群中‘花蒜’與其他兩個花蒜品種之平均遺傳相似度不高。所用的九個引子在‘花蒜’中均有擴增產物,而其他包括‘花蒜選’的三種花蒜各只有 4 或 6 個引子的擴增產物。此結果顯示在外型及用途分類上相似的品種(系),在其遺傳組成上仍具有差異。周等(2004)以 RAPD 分析臺灣地區五種軟骨花蒜,也有相似結果。參試材料大片黑系統與和美種分別於一、二兩群中,而北蒜及青蒜用品種(系)皆於第三群中。由於和美蒜較大片黑系統早熟,北蒜系統又更晚熟(蕭政弘, 個人諮詢),分群結果將成熟期特性不同的品種及青蒜用品種(系)與蒜球用品種(系)分於不同群中。大蒜鱗莖分化是受到苗期低溫刺激開始分化,但鱗莖膨大需要長日、高溫的環境。臺灣蒜頭用品種(系)為因應在農曆年節的市場需求,選擇之品種(系)需具有結球所需日長較短及較早結球的早生特性。因此彰化沿海地區栽種一月採收的和美蒜與雲、嘉地區種植三、四月採收的大片黑分開。青蒜用品種(系)因採收其地上部,需具結球較晚的晚生特性。蒜頭、青蒜兩種不同採收目的的品種大致又與假莖及葉質軟硬(分成軟骨、硬骨)有關。另外許多研究結果顯示同一環境下的品種因生長條件相似,外表型相似,也有相似基因型(陳等, 2005; Al-Zahim *et al.*, 1997; Ipek *et al.*, 2003; Maaß and Klaas, 1995; Volk *et al.*, 2004)。

農民栽培大蒜多自行選拔留種。二十年前還有專案進口大陸種蒜以生產青蒜,統稱為北蒜。大片黑類、和美種及花蒜系列品種亦為採收青蒜之品種(系)。後來‘宜蘭白蒜’因品質優良,為夏季高冷地主要青蒜品種(系),但它早期由何處引進已不可考。目前宜蘭地區栽種的大蒜可能有不同系統,但被統稱為宜蘭白蒜。參試材料‘宜蘭白 1’及‘宜蘭白蒜’原始來源可能相同,相似性高,群叢分析結果都在第三群中,且與‘北蒜’同群。‘宜蘭白 1’及‘宜蘭白蒜’與‘北蒜’相似度分別為 0.67 及 0.75,可能由相同來源經過長期選拔及馴化栽培,而成為現在的‘宜蘭白蒜’。但同是宜蘭地區品種的‘壯圍新南產’與大片黑系列同群,且與‘二片黑’的遺傳相似度為 1.00,無法區分。‘壯圍公館紅葉’與和美地區品種及花蒜系列同群;推測兩個壯圍種原大蒜可能分別由硬骨與軟骨種選出。

比較本研究與許等(2006)分析結果,兩種標誌在同樣 48 品種(系)所得遺傳相似度矩陣間相關性為 0.586。相關性不高的原因可能是 RAPD 所選用引子係參考前人研究,並非針對試驗材料所選出最佳隨機引子,引子所產生的條帶具多型性的比率較低(<20%) (許等, 2006)。兩種分子標誌分別表示基因組不同部分的多型性。所篩選的 ISSR 隨機引子,引子長度為 17 個核苷酸,因此所得到的標誌再現性比 RAPD 佳,且在每次 PCR 反應中獲得較多多型性條帶,可以節省實驗花費與時間(Reddy and Siddiq, 2002)。兩種分析標誌仍有部分結果相同,如兩個海關扣檢的樣品相同、宜蘭白蒜及其珠芽相同、‘山

東 3'與其他供試材料距離最遠(遺傳相似度 0.092)而不同來源大片黑與'鳳山選一號'之遺傳組成十分相近。'山東 3'在外觀型態上，地上部成簇生狀而無法結球(許等，2006)。推測除了本地的相對短日因素外，'山東 3'可能屬於大蒜內不同之種群(group)。

兩個海關扣檢的大蒜樣品'910025'與'910048'雖標明來自不同國家，但兩種標誌分析結果均顯示彼此間無法區分，遺傳組成完全相同，且與北蒜不能區分，到底由何處生產也許進口商也不確知。依據林(1993)，'鳳山選一號'及'鳳山選二號'分別由'西螺白葉種'(硬骨種)與'學甲大片黑'(硬骨種)選出；但因為以 RAPD 及 ISSR 兩種分子標誌結果均顯示，'鳳山選一號'與大片黑系統有很高的相似性，'鳳山選二號'與'北蒜'、'宜蘭白蒜'、'花蒜'同群而與大片黑系統遺傳差異大；而可能'鳳山選一號'的來源品種係硬骨種大片黑，'鳳山選二號'係由軟骨種大蒜選出。由於大蒜在植株與鱗莖外觀上不容易看出個體差異，而蒜球容易攜帶運送各地，當品種的來源沒有可靠的原始紀錄時，很難由形態表現去考證。有時因環境因素造成的外表差異可能將原來相同的品種被賦予不同名稱，形成重複種原或名稱混淆(Bradely *et al.*, 1996; Volk, 2004)。

本研究為針對臺灣收集品種(系)所篩選的 ISSR 逢機引子進行遺傳相關性分析，將許等(2006)以 RAPD 分群結果中第一群中的大蒜品種分屬兩群；亦即將和美種、花蒜類與印尼、印度、菲律賓品種群聚成第二群(圖 2)。所有中國大陸品種與北蒜、宜蘭白則分在第三群，這種結果比較符合 *subtropical group* 與 *pekinensis group* 具有不同 isozyme 與 RAPD pattern (Maaß and Klaas, 1995)的分群，且能釐清一些由外型看不到的遺傳資訊。

### 參考文獻

1. 林昭雄. 1993. 四十年來之台灣大蒜產業. 台灣蔬菜產業演近四十年專輯. p.107-133. 台灣省農業試驗所專刊 30 號.
2. 周微茂、吳游源、朱明宏. 2004. RAPD 分子標誌應用於台灣軟骨花蒜種原歧異度分析. 作物、環境與生物資訊 1:163-170.
3. 陳析、周涵韜、楊志偉、潘文、林鵬. 2005. 大蒜種質資源遺傳多樣性的分子標記研究. 廈門大學學報 44(增刊):144-149.
4. 陳怡婷. 2004. 以簡單重複序列分子標誌探討花椰菜品種及白菜類的遺傳變異. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
5. 陳源俊. 2002. 利用 ISSR 分子標誌及農藝性狀分析糯稻種原之遺傳歧異性. 國立臺灣大學農藝研究所論文.
6. 許涵鈞、胡凱康、鄧汀欽、曹幸之. 2006. 以 RAPD 分子標誌探討台灣大蒜品種及種原之遺傳相關性. 臺灣園藝 52:27-36.
7. 趙秀滂、楊藹華. 2005. 大蒜遺傳歧異性之研究. 台南農業改良場研究彙報 45:26-38.
8. 詹芳華. 2002. 芹菜品種特性與 RAPD 標誌. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
9. 鄧汀欽. 2007. 蒜頭結球異常現象及其預防. 農業試驗所技術服務 70:19-22.
10. Al-Zahim, M., H.J. Newbury, and B.V. Ford-Lloyd. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. HortScience 32:1102-1104.
11. Bradley, K.F., M.A. Rieger, and G.G. Collins. 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. Aust. J. Expt. Agric. 36:613-618.
12. Etoh, T., H. Watanabe, and S. Iwai. 2001. RAPD variation of garlic clones in the center of origin and the Westernmost area of distribution. Mem. Fac. Kagoshima Univ. 37:21-27.



13. Gupta, M., Y.S. Chyi, J. Romero-Severson, and J.L. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998-1006.
14. Ipek, M., A. Ipek., and P. Simon. 2003. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:246-252.
15. Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270.
16. Katzir, N., E. Leshzeshen, G. Tzuri, N. Reis, Y. Danin-Poleng, and H.S. Paris. 1998. Relationship among accessions of *Cucurbita pepo* based on ISSR analysis. p. 331-335. In: J.D. McCreight (ed). *Proc. Cucurbitaceae '98'* ASHS, Alexandria, Virginia, US.
17. Lallemand, J., C.M. Messian, F. Briand, and T. Etoh. 1997. Delimitation of varietal groups in garlic (*Allium sativum* L.) by morphological, physiological biochemical characters. *Acta Hort.* 433:123-132.
18. Lampasona, S.G., L. Martinez, and J.L. Burba. 2003. Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). *Euphytica* 132:115-119.
19. Maaß, H.I. and M. Klaas. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum*) by isozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 91:89-97.
20. Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220.
21. Pooler, M.R. and P.W. Simon. 1993. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. *Euphytica* 68:121-130.
22. Rohlf, F.J. 2007. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.20. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.
23. Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, USA.

### Abstract

ISSR (Inter-Simple sequence repeat) markers were used to analyze the genetic relationships of 46 garlic accessions from various sources of collections. Appropriate annealing temperatures of the primers and the PCR cycles were tested first. Thirty seven polymorphic markers were generated by 9 UBC primers and were used to assess the genetic similarity among garlic clones. The cluster analysis grouped these garlics at the average similarity of 0.12 into three groups. Group 1 and 2 covered most of the Taiwan growing clones and a few clones from Indonesia, India, and the Philippines. The Large Black Leaf type formed Group 1. He-Mei (Small Black Leaf type), bolting type and subtropical type constituted Group 2, the largest group. All Chinese cultivars of garlics were included in Group 3 which could be further divided into 2 sub-groups. 'Yi-Lan White' and clones from southern China made one sub-group; and accessions from northern China another sub-group. For garlic varieties grown in Taiwan, there were three distinguishable types: (1) Large Black Leaf type, (2) He-Mei type and Bolting (Flowering) type, and (3) Yi-Lan White type. He-Mei type and Bolting type had higher genetic similarity.

