利用RAPD分子標誌進行菊花雜交後代遺傳性之研究[1]

黃勝忠、蔡奇助、許謙信[2]

摘　　要

利用45條隨機引子進行RAPD法分析三個菊花雜交組合，其中有22條引子可產生有效複製產物。本研究發現RAPD的所有分子標誌中可歸爲七類。第一類在父、母及子代皆出現的分子標誌；第二類僅出現在父及母代的分子標誌；第三類僅出現在父及子代的分子標誌；第四類僅出現在母及子代的分子標誌；第五類爲父代特有的分子標誌；第六類爲母代特有的分子標誌；第七類爲子代特有的分子標誌。上述七類分子標誌中，第三類的分子標誌適合從事鑑別真實的父代，第七類的標誌爲新雜交品種的特有標誌，適合作爲保護育種者品種專利的標誌。且僅第一、三及四類的標誌從親代到子代具加成性，在三個雜交組合中，加成性的標誌佔34.4到48.9%，子代消失之標誌佔38.0到52.6%，子代特有之標誌佔11.6到13.1%。此外，子代與父親或母親的相似性並無一定規則，甚至部分出現雙親的相似性較親代與子代相似性高的現象。由本試驗之結果可進一步闡明菊花遺傳機制的複雜性。

關鍵詞：菊花、分子標誌、雜交、隨機複製多型性DNA。

前　　言

菊花的栽培在中國及日本已有3,000年歷史，目前亦爲荷蘭主要的花卉作物之一(28)，菊花是一種六倍體(6x=54)的多倍數(polyploids)作物(6,13)，但其六倍體是如何起源的仍然未知(28)，這種植物如同菊科的其它成員一般，具有很明顯的自交不親和性(self-incompatibility)(2)。目前已知菊花之自交不親和與乾燥毛狀的柱頭(dry papillate stigmas)，三核花粉(trinuclate pollen)及柱頭表面不親和反應有關(19)，因此菊花不太可能行自花受粉，除非極少數被發現的假性自交不親和性植株，但目前爲止，菊花的遺傳仍未完全清礎(27, 31)。

育種上並非所有的特徵(或稱標誌)均可供應用，如形態特徵(morphological marker)和細胞學上特徵(cytological marker)並不適合於育種分析(21)，雖然同功酶(isozyme)已在遺傳歧異度(genetic diversity)(7)及雜交品種鑑定等方面應用(21)，然而仍受限於同功酶的種類太少，不適合在育種上應用(9)。過去幾年來，限制酵素片段長度多型性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)已被廣泛應用在育種選拔上，然而RFLP方法基本上被認爲是昂貴與耗費人力的(12)。因此另一項稱爲隨機複製多型性DNA (random amplified polymorphism DNA)分析技術於前幾年被發展出來(26)。這項技術是利用單一條隨機合成的引子(primer)，以聚合

[1] 台中區農業改良場研究報告第 0498 號。
[2] 台中區農業改良場研究員兼課長、助理研究員、助理研究員。

酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，隨機複製DNA片段，以產生許多可供鑑識的DNA標誌[26]，該項技術具有操作簡單快速，所得標誌數量多，且所需的樣本DNA量少等優點，因此爲一極具效能的遺傳分析工具。由於菊花品種間的遺傳變異相當高，RAPD在菊花的遺傳分析研究上，亦認爲菊花品種間的遺傳變異性相當高，甚致僅使用單一引子就可鑑識許多不同品種的菊花[27]。

本研究目的在利用RAPD標誌，探討菊花雜交後代與親子間之遺傳現象，並討論不同RAPD標誌在未來育種與品種鑑識的應用價值。

材料與方法

一、試驗材料

本研究參試材料四個菊花品種，分別爲金紅梅、紅貴妃、黃秀芳及白秀芳，與三個雜交品系，分別爲紅貴妃(♀)×金紅梅(♂)，黃秀芳(♀)×金紅梅(♂)，及黃秀芳(♀)×白秀芳(♂)等三品系。上述品種(系)種植於台中區農業改良場試驗農場，菊花的特徵見表一。

表一、本試驗菊花品種特性

Table 1. Flower characteristics of seven *Chrysanthemum* cultivars

Cultivars		Flower characteristics		
Parents & cross	Name	Size	Color	Petal shape
A	Gold Homae	Small	Purple	Flat, straight
B	Red Gafe	Small	Purple	Flat, twist
C	Yellow Shuho	Large	Yellow	Flat, twist
D	White Shuho	Large	White	Flat, twist
(BxA)	Red Gafe x Gold Homae	Small	Red	Flat, straight
(CxA)	Yellow Shuho x Gold Homae	Small	Yellow	Flat, straight
(CxD)	Yellow Shuho x White Shuho	Large	White	Flat, straight

二、試驗方法

1. DNA之抽取

修改Shure等人[22] 的方法抽取菊花幼葉之總DNA，其步驟如下：取菊花幼葉約0.5 g，用液態氮在研缽中研磨成粉，將粉末移至1.5 ml的離心管，加入700 µl 60℃預熱過的Urea buffer(8.0 M urea, 0.05 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.02 M EDTA, 1% sarcosyl)，混合均勻後，置於60℃水浴下10分鐘，並時常混合。然後加入700 µl 的phenol：chloroform=1：1 (v/v, phenol 經 Tris pH 8.0飽和過)，充分混勻後於4℃下10,000 rpm離心10分鐘，取上層液經過濾，移至另一新的離心管，並加入0.7倍體積的2-propanol與1/10體積4.4 M的NH_4OAc，置於-20℃ 2小時以沈降DNA，然後取出離心管於4℃下，以10,000 rpm離心10分鐘，倒掉上層液，以1 ml 70%酒精清洗之後再離心，倒掉酒精，簡單乾燥後，加入400 µl的TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)溶解DNA，並加入5 µg RNase，於65℃下反應10分鐘後，加入500 µl同上的phenol: chloroform =

1:1(v/v)，於 4℃下10,000 rpm 離心10分鐘，取上層液移至另一新的離心管，並加入45 µl 4.4 M NH_4OAc及3倍體積95%的酒精，均勻混合，置於-70℃下30分鐘以沈降DNA，然後取出並於4℃下10,000 rpm離心10分鐘，倒掉上層液，以1 ml 70%酒精清洗並離心DNA二次，最後倒掉上層液，抽氣乾燥，加入20 µl的 TE buffer及180 µl的殺菌水溶解DNA，存於-20℃中備用。

2. DNA定量

取Total DNA抽取液5 µl溶於495 µl的水中，注於石英比色管中，經充分混合後，將比色管置入光譜儀(Hitachi U-2001 Spectrophotometer)中，以波長260 nm紫外光測定吸光度，所得的吸光度值乘以50，再乘以稀釋的倍數，即原抽取液之DNA濃度(ng/µl)。依不同樣品DNA抽取液的濃度，將各DNA樣本稀釋成2 ng/µl，做為模板DNA之用。

3. PCR反應

RAPD的反應內容物及濃度如下，10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% (W/V) geltin, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dTTP與0.2 mM的隨機引子，1.25 µl的*Taq* DNA聚合酶，最後加入2 ng的模板DNA，加無菌水總體積補成25 µl，置於0.6 ml的微量離心管，再於溶液表面加入25 µl的礦物油(mineral oil)，以防止熱循環過程中蒸散。反應的熱循溫度及時間如下，首先94℃反應3分鐘，接下來94℃反應45秒，40℃反應45秒，72℃反應1分鐘30秒等三步驟進行45個循環，最後72℃反應3分鐘。

4. 電泳分析[1]

取1.5 g的瓊脂粉末(agarose)，加熱溶於100 ml TAE緩衝液中(40 mM Tris-Acetate, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)，配成2%瓊脂膠，倒入適量模板架，架上齒梳(Comb)，做成瓊脂膠平板電泳片，待凝固後，取出齒梳，將電泳片置入盛TAE緩衝液的電泳槽中，將擬分離的DNA樣品混以1/10倍體積的追蹤染劑(tracking dye) [0.25% bromophenol blue, 40% (W/V) sucrose in water]，於近齒孔端接負極通電後，DNA樣品會往正極跑。電壓視膠體大小(5 V/cm)而定，當Tracking dye到達估膠體長4/5時，關掉電源，取出膠體，經EtBr (ethidium bromide, 0.5 µg/ml)染色後，可在紫外燈下觀察、照相。

5. 統計分析

(1) DNA條帶圖譜的建立

依據Wilde等人[25]使用的方法，每一條帶(band)視為一個特徵(character)，以1、0代表DNA條帶的有或無，依此製作DNA條帶圖譜。並可參考已知分子大小的核酸標誌(DNA marker)，利用內插法換算出RAPD標誌的分子大小，此步驟可由AlphaImager 2000套裝軟體完成。

(2) 樣本間兩兩相似度(similarity)的分析

按照Chapco等人[4]及Wilde等人[25]的方法，換算出樣本間兩兩相似度，算法如下：相似度$S=2N_{AB}/(N_A+N_B)$，而N_A與N_B分別代表A及B二樣本的DNA條帶數，N_{AB}為兩樣本共有的條帶數，依此法將所有樣本的兩兩相似度算出。

(3)樹狀圖的完成

將樣本兩兩相似度排成一個三角距陣，以不加權平均重方式(unweighted pair-group method analysis, UPGMA)進行群叢分析(cluster analysis)繪製出樹狀關係圖 (dendrogram)。此步驟可由 NTSYS套裝軟體完成[20]。

結果與討論

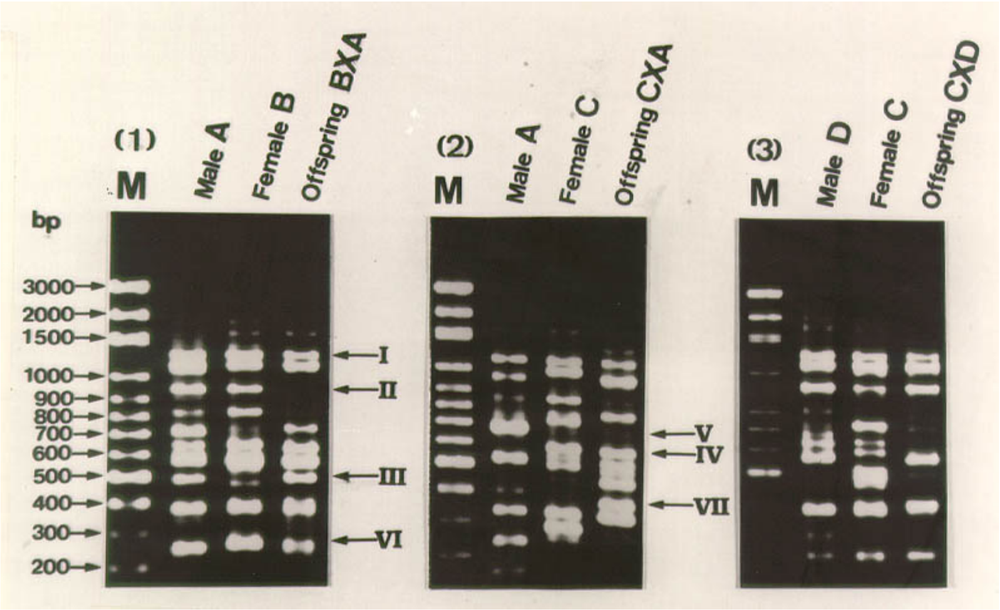
篩選45條隨機引子，從中選取22條複製效果較好的引子(表二)，進行分子標誌遺傳分析，三個菊花雜交組合(B×A, C×A, C×D)之分析樣本中，共分別產生313, 311及308個RAPD標誌(RAPD markers)。本研究分析所得的RAPD標誌，根據條帶的有無共可歸納爲七類型(圖一)，其中第I、III及IV型爲加成性的指標條帶。所有的RAPD標誌在雜交後代中並無加成性。類似的現象亦出現於Cyrtandra之種間雜交的RAPD分析[23]及甘蔗的品種雜交中[10]。在菊花B×A雜交組合分析，子代的條帶中僅48.9%得自於親代。而雜交組合C×A與C×D則顯示分別有39.2及34.4%得自於親代。

表二、菊花分子標誌遺傳分析採用之引子
Table 2. Primers used for the genetic analysis of *Chrysanthemum* cultivars

Primers used	Sequence (5' → 3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-16	AGCCAGCGAA
OPB-01	GTTTCGCTCC
OPB-02	TGATCCCTGG
OPB-04	GGACTGGAGT
OPB-05	TGCGCCCTTC
OPB-06	TGCTCTGCCC
OPB-07	GGTGACGCAG
OPB-08	GTCCACACGG
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPC-01	TTCGAGCCAG
OPC-05	GATGACCGCC
OPC-06	GAACGGACTC

RAPD分析DNA片段多型性的產生，源自引子煉合位置序列不同，引子間煉合的位置具缺失(deletion)或插入(insertion)，或因發生插入而影響PCR的複製反應[26]，因爲RAPD標誌

的多型性僅依據複製產物的長度而表現，而不考慮其中之序列。因此上述表現多型性可能來自於細胞減數分裂過程中DNA重組(recombination)、突變(mutation)及染色體的自由分離(random segregation)[10,5]。本研究中，第II、V及VI類型的標誌是屬於子代中，而親代所沒有的標誌，在三個雜交組合B×A、C×A、C×D中，這種類型的標誌分別有38、49.2及52.6%。菊花是屬絕對異交作物，此可能是其具有高度異質性(heterozygous)的原因，其中發生異質性的染色體(heterozygous chromosome)的自由分離，或另外染色體的重組也可能造成引子煉合位置遺失，所以此標誌僅表現於親代而不出現於子代中[23]。這種非孟德爾遺傳模式，亦可能由於RAPD分析中的競爭(competition)現象[14,8]。此種非遺傳模式現象在單倍體(hyploid)或完全同質性植物，較不易發生，但在異質性高的植物出現較頻繁[8]。



圖一、菊花品種的七類 RAPD 標誌。

Fig. 1. RAPD molecular marker patterns generated (1) with A16 primer in the cross combination of the [Chrysanthemum morifolium Ramat "Gold Homae" (A), "Red Gafe" (B) and "Red Gafe (♀)x Gold Homae (♂)" (BxA)]; (2) with B1 primer in the cross combination of ["Cold Homae" (A), "Yellow Shuho" (C) and "Yellow Shuho (♀) x Cold Homae (♂)" (CxA)]; (3) with A16 primer in the cross combination of ["White Shuho" (D), C, and "Yellow Shuho (♀) x White Shuho (♂)" (CxD)]. Type I, II, III, IV, V, VI, and VII markers represented [male-present band (+), female-present band (+), and offspring-present band (+)], [male-present band (+), female-present band (+), and offspring-absent band (-)], [male-present band (+), female-absent band (-), and offspring-present band (+)], [male-absent band (-), female-present band (+), and offspring-absent band (-)] and [male-present band (+), female-absent band (-), and offspring-absent band (-)], [male-absent band (-), female-present band (+), and offspring-absent band (-)] and [male-absent band (-), female-absent band(-), and offspring-present band (+)], respectively.

此外，第VII類(非親代的條帶)的RAPD之DNA條帶出現在雜交組合BxA，CxA，CxD子代的數目分別為41條(佔13.1%)，36條(佔11.6%)及40條(佔13.0%)(表三)。這些非親代型(non-parental)條帶的產生可能源自於雜交時，減數分裂(meiosis)的過程中產生重組(recombination)或突變(mutation)的結果[5,10]，或PCR過程中形成異股雜合(heteroduplex

formation)現象[3,11,17]。由前人之研究亦發現有上述的非親代型的條帶表現，但出現的頻率低於本研究之分析結果。

表三、菊花品種 RAPD 標誌分類及其出現頻率
Table 3. Seven types of RAPD markers identified from three hybrid populations of *Chrysanthemum* cultivars

Type of markers	Property of markers			RAPD markers of hybrid combinations					
				A B (BxA)		A C (CxA)		D C (CxD)	
	Male	Female	Offspring	(no.)	(%)	(no.)	(%)	(no.)	(%)
Type I	+	+	+	70	22.4	71	22.8	63	20.5
Type II	+	+	-	13	4.2	37	11.9	32	10.4
Type III	+	-	+	53	16.9	38	12.2	15	4.9
Type IV	-	+	+	30	9.6	13	4.2	28	9.1
Type V	+	-	-	51	16.3	42	13.5	60	19.5
Type VI	-	+	-	55	17.6	74	23.8	70	22.7
Type VII	-	-	+	41	13.1	36	11.6	40	13.0
Total				313		311		308	

又由於RAPD的反應條件，不若兩條引子的PCR反應嚴格，通常採低反應策略(lower stringency condition)，因此，反應時常有引子錯置(mismatch)，導致出現非特異(non specific)的條帶[15]。事實上，不同的熱循環機器，溫度條件，DNA聚合酶的廠牌及鎂離子(Mg^{++})，模板DNA或引子的濃度等等，皆會影響RAPD分析的再現性[15,16]。因此，進行RAPD分析時應有標準化的操作程序與方法，方能獲得再現性高的DNA複製產物。

品種或品系的鑑定在保護植物育種者的權利甚爲重要[30]。以菊花而言，一般品種鑑定主要以開花時的外表特徵(phenotypes)爲主，而在菊花品種專利之保護是藉由花、葉及生長形態(growth morphology)的特徵之登錄爲依據[30]。後來應用同功酶(isozyme)技術，得以大大改善菊花品種鑑定的效力[7,21]。然而，同功酶多型性具有共顯性(co-dominant)，且其質與量會因不同生長的時期而改變[30]。由於菊花的繁殖是利用插穗扦插的營養繁殖技術，所以繁衍出來的族群經栽培後仍能保有原先的DNA條帶型[30]。本研究利用RAPD技術可產生許多DNA分子標誌，其中第VII類標誌應僅出現在子代的條帶，故在鑑別新品種上是一有應用價值之標誌。

相似性(similarity)分析被應於推測樣本相互間的關係(relatedness)[18,24]。本研究利用三個菊花雜交組合的兩兩相似性距陣(similarity matrix) 分析中發現，BxA雜交組合的父代與子代相似度(0.68)較母代與子代的相似度(0.55)及雙親本間的相似度(0.50)爲高(表四)。類似的結果在CxA雜交組合亦可發現。然而，CxD雜交組合的父代與子代相似度(0.49)較母代與子代的相似度(0.54)及雙親本間的相似度(0.52)爲低(表四)。上述由DNA的相似度分析結果，發現分子標誌與菊花品種的花部特徵(flower characteristics)並不完全符合(表一)。

與其他野生種(wild species)植物或農作物品種比較的研究結果，得知菊花品種呈現極高的遺傳歧異度(genetic diversity)，此現象可能由於菊花在有性繁殖系統中，本身具有極高之自交不親和(self incompatibility)[2,27]。此外，在CxA雜交組合中，無意的發現母代與子代的

相似性(0.41)比雙親間的相似性(0.56)爲低。另外，於CxD雜交組合中也發現父代與子代的相似性(0.49)比雙親間的相似度(0.52)爲低。此種現象目前仍無法綜理出合理的解釋，但可能與菊花本身基因型(genotypes)具有複雜且歧異的特性有關。

表四、菊花品種 RAPD 標誌相似性分析
Table 4. Similarity matrix of three hybrid combinations of *Chrysanthemum* cultivars

	A	B	(BxA)	A	C	(CxA)	D	C	(CxD)
A (♂)	1.00								
B (♀)	0.50	1.00							
(BxA)	0.68	0.55	1.00						
A (♂)				1.00					
C (♀)				0.56	1.00				
(CxA)				0.63	0.41	1.00			
D (♂)							1.00		
C (♀)							0.52	1.00	
(CxD)							0.49	0.54	1.00

參考文獻

1. 陳瑞英、周德源 1987 膠體電泳分析DNA片段 電泳分離技術研討會論文集 9: 87-91。
2. Anderson, N. O., P. D. Ascher and R. E. Widmer. 1992. Inbreeding depression in garden and glasshouse *Chrysanthemums*: germination and survivorship. Euphytica 62:155-169.
3. Ayliffe, M. A., G. J. Lawrence, J. G. Ellis and A. J. Pryor. 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. Nucleic Acids Res. 22:1632-1636.
4. Chapco, W., N. W. Ashton, R. K. B. Martel and N. Antonishyn. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. Genomes 35:569-574.
5. Darnell, J. E., D. Baltimore and H. F. Lodish. 1990. Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc. pp.156-159.
6. Dowrick, G. J. 1953. The chromosomes of *Chrysanthemum*, II: garden varieties. Hered. 7:59-72.
7. Fiebich, D. and F. Henning. 1992. Use of isozyme analysis in breeding of *Chrysanthemum*. Gartenbauwissenschaft 57:212-218.
8. Hallden, C., M. Hansen, N. O. Nilsson and A. Hjerdin. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 93:1188-1192.
9. Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Schaeffer and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. Theor. Appl. Genet. 72:761-769.

10. Huchett, B. I. and F. C. Botha. 1995. Stability and potential use of RAPD markers in a sugarcane genealogy. Euphytica 86:117-125.
11. Hunt, G. J. and R. E. Jr. Page. 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. Theor. Appl. Genet. 85:15-20.
12. Kiss, G. B., G. Csanadi, K. Kalman, P. Kalo and L. Okresz. 1993. Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme, and morphological markers. Mol. Gen. Genet. 238:129-137.
13. Langton, F. A. 1989. Inheritance in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Hered. 62:419-423.
14. Lu, M. Z., A. E. Szmidt and X. R. Wang. 1995. Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). Hered. 74:582-589.
15. MacPherson, J. M., P. E. Eckstein, G. J. Scoles and A. A. Gajaghar. 1993. Variability of the random ampified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. Mol. Cellular Prob. 7:293-299.
16. Meunier, J. R. and P. A. D. Grimont. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Res. Microbiol. 144:373-379.
17. Novy, R. G. and N. Vorsa. 1996. Evidence for RAPD heteroduplex formation in cranberry: implications for pedigree and genetic relatedness studies and a source of co-dominant RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 92:840-849.
18. Nybom, H. and H. K. Hall. 1991. Mini-satellite DNA ‘fingerprints’ can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. Euphytica 53:107-114.
19. Richards, A. J. 1986. Plant Breeding Systems. George Allen and Unwin, London.
20. Rohlf, F. J., J. Kishpaugh and D. Kirk. 1982. Numerical taxonomy system of multivariate statistical programs. State Univ. New York, Stony Brook, New York.
21. Roxas, N. J. L, Y. Tashiro, S. Miyazaki, A. Takeshita and T. Oshima. 1993. Isozyme analysis in higo *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 61:919-924.
22. Shure, M., S. Wesster and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. Cell 35:225-233.
23. Smith, J. F., C. C. Burke and W. L. Wagner. 1996. Interspecific hybridization in natural populations of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: evidence from RAPD markers. Pl. Syst. Evol. 200:61-77.
24. Welsh, J., R. J. Honeycutt, M. Mcclelland and B. W. S. Sobral. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Theor. Appl. Genet. 82:473-476.
25. Wilde, J., R. Waugh and W. Powell. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet. 83: 871-877.

26. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
27. Wolff, K. and J. Peters-Van Rijn. 1993. Rapid detection of genetic variability in *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. Hered. 71:335-341.
28. Wolff, K., J. Peters-Van Rijn and H. Hofstra. 1994. RFLP analysis in *chrysanthemum*. I. Probe and primer development. Theor. Appl. Genet. 88:472-478.
29. Wolff, K. 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in *Chrysanthemum*. Euphytica 89:159-164.
30. Wolff, K., E. Zietiewicz and H. Hofstra. 1995. Identification of *Chrysanthemum* cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet. 91:439-447.
31. Zagorski, J. S., P. D. Ascher and R. E. Widmer. 1983. Multigenic self-incompatibility in hexaploid *Chrysanthemum*. Euphytica 32:1-7.

Using RAPD Molecular Markers for the Genetic Analysis of *Chrysanthemum* hybrids[1]

Sheng-Chung Huang, Chi-Chu Tsai and Chian-Shinn Sheu[2]

ABSTRACT

Forty-five random primers were screened of which twenty-two primers were selected to detect the molecular marker in three hybrid combinations of *Chrysanthemum* by using random amplified polymorphic DNA (RAPD). From this study, the patterns of molecular markers could be classified into seven types. Type I markers shared bands in male and female parents, and offspring. Type II markers shared bands in male and female parents. Type III markers shared bands in male parent and offspring. Type IV markers shared bands in female parent and offspring. Type V markers were presented in male only. Type VI markers were present in female only. Type VII markers were present in offspring only. In all seven types of RAPD markers, Type I, III, and IV belong to additive markers between parents and offspring. Of them, Type III markers were suitable to be used for identifying true male. Different unique markers of Type VII in offspring are quite suitable to be used for identifying the markers in new hybrid to protect the right of plant breeders. In this study, 34.4% to 48.9% of the RAPD markers were found to reveal additivity among parents and offspring in three populations of *Chrysanthemum.* However, 38% to 52.6% of markers (Type II, V, and VI) were absent in offspring, but 11.6% to 13.1% of unique markers (Type VII) present in offspring. Moreover, there were no definite rules as to whether markers in offspring were more similar to female or to male parents by similarity analysis, even though that within parents were more similar than between parent and offspring among two hybrid combinations. From above results, it showed that the genetics of *Chrysanthemum* were very complex. In conclusion, the technique of RAPD would be a powerful tool to detect the different molecular markers in the hybrid populations of *Chrysanthemum* cultivars.

Keywords: *Chrysanthemum*, Molecular marker, Hybridization, RAPD.

---

[1] Contribution No. 0498 of Taichung DAIS.

[2] Head of Crops Improvement Division and Assistant Horticulturist of Taichung DAIS.