應用分子生物技術 PCR-RFLP 分析花椰菜雜交品種之親本自交不親和類型[1]

陳國憲、楊藹華、王仕賢[2]

摘　　要

陳國憲、楊藹華、王世賢。2007。應用分子生物技術 PCR-RFLP 分析花椰菜雜交品種之親本自交不親和類型。台南區農業改良場研究彙報 49：56-65。

本研究運用分子生物技術 PCR-RFLP 方法分析花椰菜 38 個生產雜交品種的親本自交不親和基因型類型的異同。選擇對花椰菜自交不親和具專一性高之引子組合 BS1 及 BS2，並以花椰菜雜交親本 DNA 模板，進行聚合酶連鎖反應，以獲得一分子量約 1154 bp 之自交不親和 DNA 片段。將此一 DNA 分別以六種不同限制酶反應後，再以電泳進行分析後，根據其在不同限制酶反應所產生圖譜差異，來區分親本間的自交不親和基因類型異同。在這一個實驗中受檢測的 38 個親本，可區分出至少有 13 個不同自交不親和基因型存在。

關鍵字：花椰菜、自交不親和、PCR-RFLP
接受日期：2007 年 7 月 23 日

前　　言

花椰菜也稱花菜，屬十字花科植物，爲甘藍菜的一個變種，含有豐富的胡蘿蔔素、維生素 B 群、C、蛋白質及硒、鈣等成分，維生素 C 含量特別的高。近年來科學家發現花椰菜中含有一種能抑制腫瘤生長的物質，因此，它不僅是一種營養豐富的蔬菜，且是保健蔬菜。台灣近年來種植面積約三千餘公頃，主要分布於：彰化縣、雲林縣、嘉義縣、高雄縣等地。在台灣對種苗業者而言花椰菜採種屬較具競爭力的產業。

植物自交不親合性(self- incompatibility)，指某一植物的雌雄兩性機能正常，但不能進行自花受精或同一品系內異株花粉受精的現象。這一種現象廣泛存在於 80 多個科的 3000 多種植物，其中以十字花科植物最爲廣泛研究。自交不親和性是植物在長期進化過程中形成的有利於異花授粉，從而保持高度雜合性的一種生殖機制。自交不親和是用來排除來自本身的花粉，避免產生自交的作用。其種類依型態差異一般可分爲：異型態及同型態自交不親合。異

1. 行政院農委會台南區農業改良場研究報告第 331 號。
2. 台南區農業改良場助理研究員、副研究員、研究員。台南縣新化鎮牧場 70 號。

型態自交不親合，通常指雌雄蕊生長高度差異特性造成自交上的障礙。同型態自交不親合性，則可依其花粉與柱頭間交互作用形式可區分爲兩類：(1) 配子體型自交不親和性：作用機制由雄配子體(花粉管)與雌蕊柱頭間交互作用所產生的抑制的結果；即花粉在柱頭上雖能順利萌發並穿透柱頭進入花柱組織中，但其生長延伸隨即受到抑制，而無法順利進入子房與胚囊中進行授精作用。此現象常見於豆科、茄科和禾本科的一些植物。(2) 孢子體型自交不親和性：此類作用決定於二倍體親本花粉粒外層包裹物質與柱頭乳突細胞（胞子體組織）間的交互作用結果；即花粉柱頭彼此被辨識到帶相同自交不親和基因時，不能正常發芽，無法侵入柱頭。常見於十字花科和菊科植物。

甘藍菜類自交不親和基因屬於孢子型自交不親和型，其自交不親合基因座之對位基因多達 50 種以上；其自交不親和之表現強度不但各有不同,而且也會受到環境影響 [6、14] 而且各基因兼有顯性或共顯性之交互作用 [13、14]。而在商業採種上，通常須選用高度自交不親和品系當做雜交親本，降低兄妹交的比率，以獲得高純度 F1 種子，才能確保商品的經濟價值，因此鑑定自交不親和性基因對十字花科育種、採種實屬非常重要的課題 [7]。傳統甘藍菜育種上爲鑑別引用品系之自交不親和基因型組合，必須利用已知的自交不親基因型之品系與欲檢定基因型的植株進行測交，以判定位之基因型的自交不親和基因型 [1、13]。甘藍菜中的自交不親和基因型數目至少高達 50 種以上 [10、13]，這一些自交不親和基測試品系（tester）目前由英國國際園藝研究所(HRI,INTERNATIONAL Horticulture Research, UK)維持保存；因此育種者欲鑑定自交不親和基因型，則可自該機關引入測試品系以進行測交 [2]。由於台灣因地處亞熱帶地區，要進行等植株開花進行雜交測試，只能在冬季植物開花的期間進行，因此一年只能進行一作，否則測試品系需要給予春化處理。此外，測交品系必須利用蕾期授粉保存；且由於自交不親和基因型種類眾多，且要繁殖並維持此一龐大親本實屬不易，因此國內一般的育苗業者對於生產 F1 商業品種，通常依平常觀察及經驗或隨機來選擇雜交組合之親本，較缺乏客觀的依據；又自交不親和表現強度受氣候環境的影響，因此增加不少作業上的成本。

隨著分子技術的發展；目前已漸了解十字花科作物自交不親和是透過一複數對偶基因座所控制(single multi-allelic locus)所控制，經由其不同基因的表現，來影響花粉及柱頭交互作用，當花粉所代之基因型與柱頭相同時，就會產生自交不親和現象。目前有一些十字花科作物中已被了解並建立的種類數目，如甘藍菜類(Brassica oleracea)有 50 種；油菜類(Brassica campestris)有 30 種 [10]。這一自交不親和基因目前已知至少與三種基因：S glycoprotein gene(SLG)及 S receptor kinase gene (SRK)及 SP11(SCAR)表現有關 [7、15、16]。SLG 表現於柱頭組織中表層細胞(papillar cell)，會在細胞壁內一種 glycoprotein，這一種蛋白質物質是最早被發現主要表現於柱頭組織中，具有多型性，常隨著甘藍這一類自交不親合所具有不同自交不親和基因型態而異；不同自交不親合相關之 glycoprotein，游離於柱頭表層乳突細胞壁間；常會隨著不同植株所帶之不同自交不親和基因型式而異，因此是最早被認爲與自交不親合有密切關係的物質；所以早期鑑定自交不親合基因形式，即有利用其差異作爲鑑定的依據。SP11(SCAR)表現於花粉外裏結構物中，爲一富含 cystenine 胺基酸之蛋白質，擔任自交不親和作用機制中花粉的辨認因子。SRK(S-locus receptor kinase)，表現於柱頭表層乳突狀細胞，其分子構造依其分布於細胞中的位置分爲三個部份：一端游離於細胞膜上，主要作爲辨認用之接受子功能，稱之爲 S-domain；一部分則鑲嵌於細胞膜中，稱之爲 transmembrane domain，另一端游離於細胞質中，

具有 serine/threonine protein kinase 功能[5、17、18、19]；對於此三種物質在自交不親和表現上所扮演的角色，目前部分學者認爲主要是透過柱頭組織中 SRK 與花藥中的 SP11 基因表現，來達到相互辨識自交不親和基因型式，當兩者具有相同自交不親和基因型時，即會透過此一辨識機制，產生一連串生理代謝機制而阻止花發粉管的萌發；而 SLG 在這一過程中，則被認爲可能與輔助穩定 SP11-SRK 結構的穩定,而非主要作用物質[16、12]。然而 SLG 與 SRK 之 S-domain 也被發現彼此之間具有相當高的相似度，結構上也具有相當高的相似度。Trick and Heizmann 在 1992 年成功選殖得到包含 SLG(S-locus glycoprotein genes)和 SPK(S-recepter kinase genes)基因的 DNA 片段,其核酸序列具多樣性，且經比對分析 SLG 及 SRK 之 S-domain 自交不親和基因序列也可發現這兩者間同源性也很高[12、20]。因此利用各自交不親和基因中 SRK S-domain 及 SLG特定序列高的保留性及多型性, 設計引子以擴增自交不親和基因序列之DNA片段, 再以限制脢分解成各種長度片段,便可根據現制脢圖譜(retriction pattern)分辨不同的自交不親和基因類型[9]。其中 PCR-RFLP(polymerase chain reactuion － retriction fragment length polymorphism)方法於甘藍苗期判定植株自交不親和基因型[3、4],不但可提供一個簡單而迅速方法，建立雜交親本間自交不親和類型, 以取代傳統繁雜而費時費力的測交方法，避免環境因子影響，提升育種效率。

材料與方法

試驗用之花椰菜品系是由欣樺種苗公司生產商業用 F1 雜交種 38 個親本，包括 18 個早生種及 2 個中生種，取 0.2-0.3g 幼葉組織，以 Qugen kit 抽取 DNA；取２μl 混合 1μl 6× loading dye ，以１.５％ SeaKem LE Agarose 膠片於０.５×TBE 緩衝液進行電泳（100V,25 min），確定 DNA 品質損毀狀況。另取 2μl genomic DNA 加入 98μl H_2O 稀釋後，用分光光度比色計測定 260 nm 與 280 nm 兩波長的 O.D 值，260/280 值 介於 1.8～2.0 爲佳，得到 DNA 濃度爲μg/ml；再將 genomic DNA 取適量以 H_2O 稀釋成 20 ng/μl 的工作液，置於－20℃冰箱保存，以做爲聚合酵素連鎖反應（PCR）之模板 DNA 使用。

PCR 反應總體積 25μl，反應液組成爲： H_2O，1×PCR buffer， 5mM $MgCl_2$，0.032μM BS1 primer （5'－AGAACACTTGTATCTCCCGGT－3'），0.032 μM BS2 primer（5'－CAATCTGACATAAAGATCTTG－3'），0.2mM dNTP，0.04U Taq DNA polymerase。PCR 反應以 Perkin Elmer 公司生產之 Gene Amp TM PCR System 9700 型熱循環反應器進行，反應條件分兩步驟，第一步驟爲 94℃，3 分。第二步驟爲 94℃，1.5 分；58℃ ，2 分；72℃，2 分；共循環 30 次。第三步驟爲 72℃，5 分；最後降溫至 4℃保存至取出。取 4μl 混合 1μl 6× loading dye ，以 1.5% SeaKem LE Agarose 膠片於 0.5×TBE 緩衝液進行電泳（100 V, 25 min），再以確定 PCR 產物是否符合預期條帶大小（分子量應在 1154bp 左右)。

分別取不同親本 PCR 產物 17μl，分別加入 1μl的 6 種不同限制酶及 2μl buffer 及 1μl H_2O；混合均勻置於 37℃恆溫水浴槽中過夜反應（約 12-13 小時)，經限制酶作用反應後，取 10μl 反應液取混合 2μl 6× loading dye ，以 2.0% SeaKem LE Agarose 膠片於 0.5×TBE 緩衝液進行電泳（50 V, 120 min)，再取出膠片置於 BIO-RAD Gel Doc 2000 影像處理系統照像分

析比對其 RFLP 圖譜之異同。6 種不同限制酶及其 buffer（Promage）分別為：Pst I / buffer H、Xho I / buffer D、NciI / buffer B、Sal I / buffer D、Sty I / buffer F 及 HaeⅢ / buffer C。

結果與討論

由目前針對探討甘藍菜類自交不親和性基因類型之相關研究得知，以 PCR-RFLP 檢測方法所設計的引子至少有： A(5'-AGAACACTTGTATCTCCCGGT-3')、B（5'-CAATCTGACATAAAGATCTTG-3'）、C（5'-GATTCTATTTC(AG/C)TCCTGCC-3'）、D（5'-AAGGTCAGCAG(G/C)AGCCAATC-3'）、E（5'-CAGCATCTACTCAGATTGAC-3'）、F（5'-AAA(A/C/G)CCATCTCCACTGCAGCT-3'）[4]、PS3（5'-ATGAAAGGGGTACAGAACAT-3'）、PS5（5'-ATGAAAGGCGTAAGAAAAACCTA-3'）、PS21 （5'-CTCAAGTCCCACTGCTGCGG-3'）、PK1（5'-CTGTCCCAAAATCCGAGATCT-3'）、PK4（5'-CAATCCCAAAATCCGAGATCT-3'）、PK5（5'-AGACAAAAGCAAGCAAAAGCA-3'）、NM1（5'- ACAGAACACTTGTATCTCCAGG -3'）、NM2（5'- AGCCAATCTGACATAAAGATC -3'）14 個[10]；依其選用不同引子對組合及搭配不同限制制酶反應，可鑑別不同型態的自交不親合基因；其中以 Brace et. al.在 1994 所建立方法較為完善，至少可辨識出 48 自交不親合基因型態（同質型）。因此本試驗依據此方法，進行 38 個品系自交不親合基因類型分析。

選擇該育苗場中早生品系 18 個及晚生品系 20 個，總計 38 個不同花椰菜品系親本之植株幼葉(2-3 葉幼苗期)抽取其 DNA 當作 PCR 反應的模板，並以 BS1(A)及 BS2(B)為引子，其反應後經電泳分離出現分子量約 1154bp 單一條帶產物（圖１）；經由 NCBI 網上資料庫查詢比對此組引子進行 PCR 反應，可預測得到 DNA 片段約在 1134-1157 bp 間，且也確實可能包含 SRK 及 SLG 的部份基因片段，此與 Brace et. al.（1994） 所敘述結果相符。

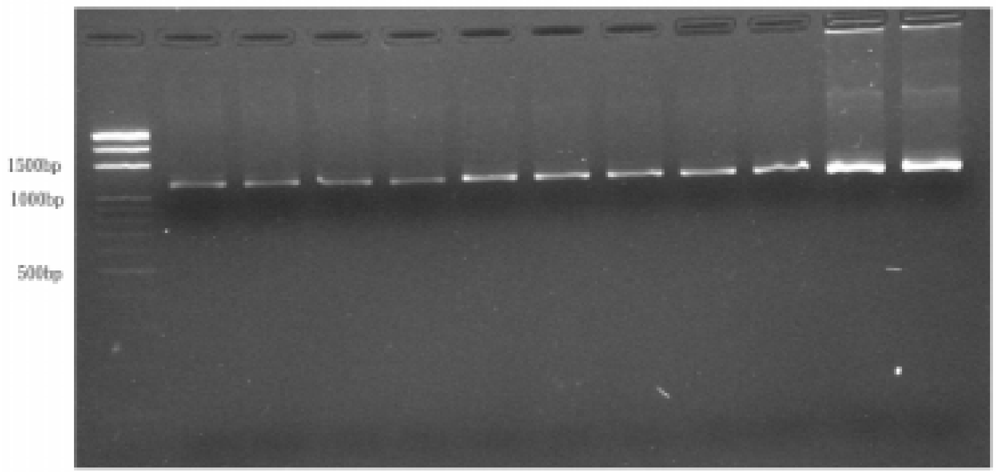

圖 1.以 BS1、BS2 引子及花椰菜品系 DNA 為模板進行 PCR 反應所得到分子量大小約為 1154bp 之自交不親和基因條帶。

儘管目前學者傾向於認爲自交不親和作用中 SLG 因子在母本柱頭組織上並非扮演必要之功能，而應該是 SRK 因子，但其 PCR-RFLP 仍不失爲 S-alleles 區分依據,此原因可能由於在甘藍菜類的自交不親和基因中 SLG 與 SRK S-domain 基因具有部份相似度相當高的基因序列[2]。在本試驗中 PCR 產物經 6 個限制酶反應後，部分仍出現 1154 bp 條帶現象；此結果可能是由於含有限制酶不能分解 SLG2 片段,因此 PCR 反應產物已限制酶反應分解後仍會留下 1154 bp 條帶，或 SLG、SRK 未完全分解所留所致，因此 1154bp 條帶不列入比對（顏等 2001、Brace et al. 1994 ）。

在這一個實驗中，我們並未能順利取得英國國際園藝研究所保存之所有自交不親和基因品系，以供比對分析；故本實驗並不直接判定其基因型；而是參照 Brace et. al.（1994）方法，直接經由由 PCR 得到產物，分別以不同限制酶反應，再分別於同一限制酶反應後顯現圖譜直接判讀歸類，由圖譜判讀顯示 PCR 產物以限制酶 HaeⅢ可得 3 種不同圖譜、Nci I 可得 2 種不同圖譜、Pst I 可得 3 種不同圖譜、Sal I 可得 3 種不同圖譜、Sty I 可得 4 種不同圖譜、Xho I 可得 3 種不同圖譜（圖 2、3、4、5）。將其所顯現相同圖譜予以編相同代碼（如圖 2、3 、4、5 底部英文數字編碼）；最後可得六個代碼組成之序列，再比較其代碼序列相同者即表示爲相同基因型。利用此方法受分析的 38 個品系中至少可分成 13 種自交不親合類型（表 1 ）。

本實驗中所使用 38 個親本若要以傳統方式測交判定其親本間自交不親和類型異同，至少需進行 703 個組合；若要進一步明確定出其基因型（與英國國際原藝研究所測交品系比對）則至少必須進行 1406 個組合鑑定。如此龐大工作無疑的增加育種者的不少人力及成本上的負擔。

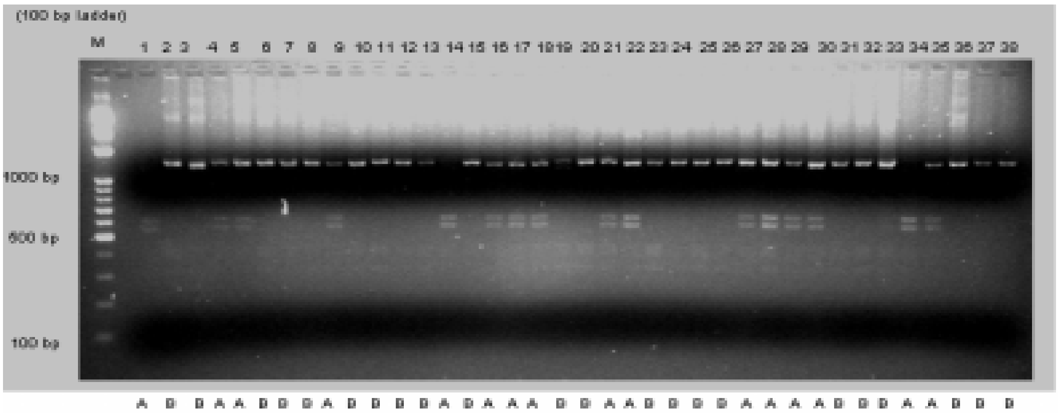

圖 2.以不同花椰菜品系 DNA 爲模板與 BS1、BSB 引子進行 PCR 擴增反應產物與 Nci I 限制酶裂解產生之圖譜。圖片上方數字代號 1-19 分別爲早生種 E1、E2、E3、E6、E7、E8、E9、E10、E11、E12、E13、E14、E15、E17、E19、E20、E22、E24；數字 20-38 分別爲中生種 M2、M4、M5、M7、M9、M10、M11、M12、M13、M14、M15、M16、M17、M18、M19、M21、M22、M23、M24。

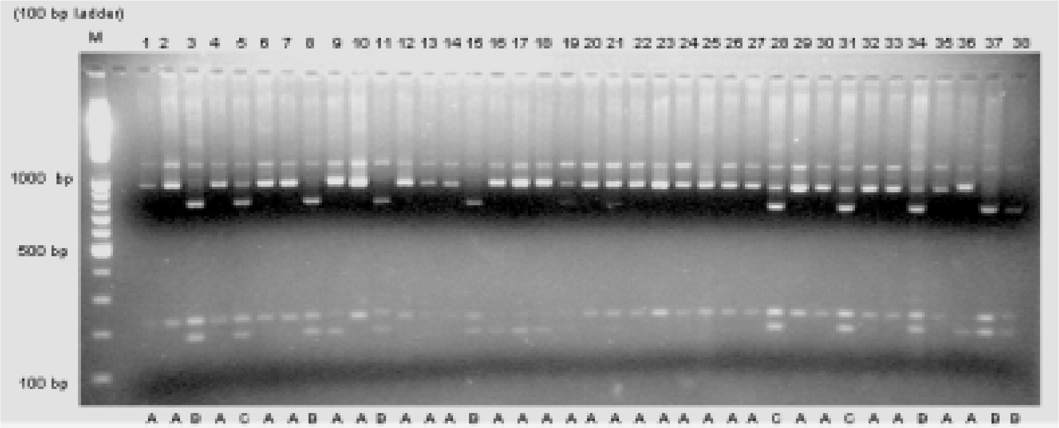

圖 3.以不同花椰菜品系 DNA 為模板與 BS1、BSB 引子進行 PCR 擴增反應產物與 Sal I 限制酶裂解產生之圖譜。圖片上方數字代號 1-19 分別為早生種 E1、E2、E3、E6、E7、E8、E9、E10、E11、E12、E13、E14、E15、E17、E19、E20、E22、E24；數字 20-38 分別為中生種 M2、M4、M5、M7、M9、M10、M11、M12、M13、M14、M15、M16、M17、M18、M19、M21、M22、M23、M24。

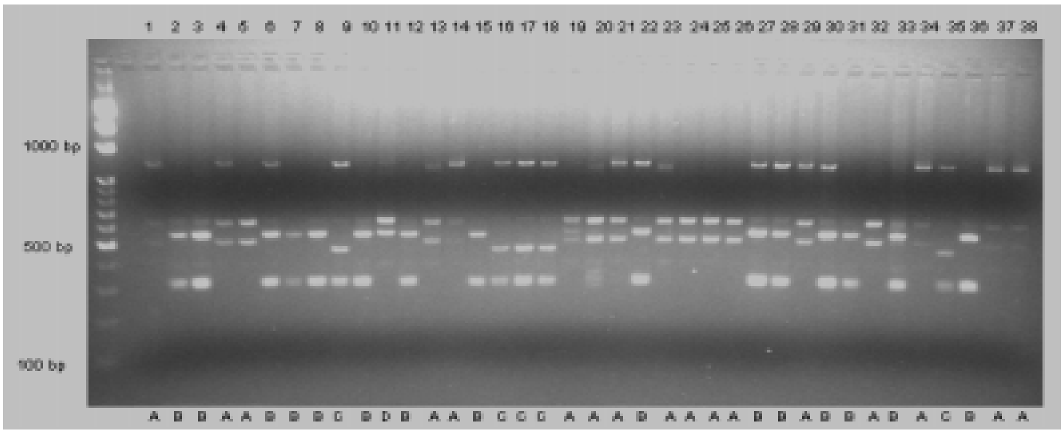

圖 4.以不同花椰菜品系 DNA 為模板與 BS1、BSB 引子進行 PCR 擴增反應產物與 Sty I 限制酶裂解產生之圖譜。圖片上方數字代號 1-19 分別為早生種 E1、E2、E3、E6、E7、E8、E9、E10、E11、E12、E13、E14、E15、E17、E19、E20、E22、E24；數字 20-38 分別為中生種 M2、M4、M5、M7、M9、M10、M11、M12、M13、M14、M15、M16、M17、M18、M19、M21、M22、M23、M24。

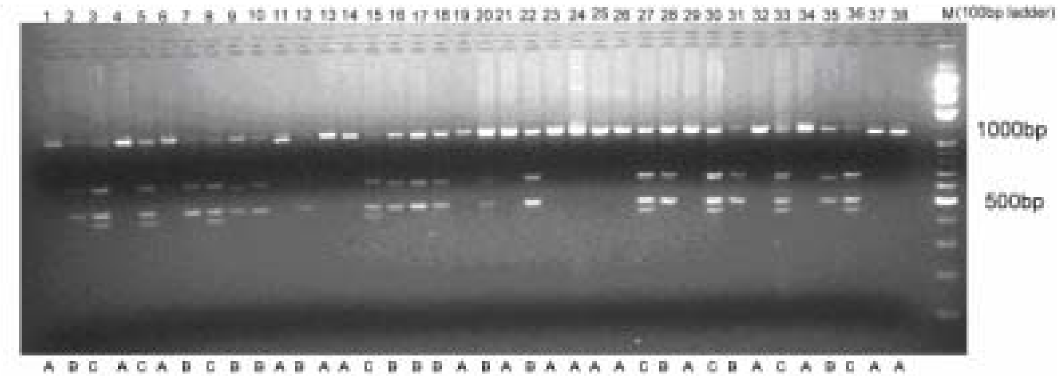

圖 5.以不同花椰菜品系 DNA 爲模板與 BS1、BSB 引子進行 PCR 擴增反應產物與 Xho I 限制酶裂解產生之圖譜。圖片上方數字代號 1-19 分別爲早生種 E1、E2、E3、E6、E7、E8、E9、E10、E11、E12、E13、E14、E15、E17、E19、E20、E22、E24；數字 20-38 分別爲中生種 M2、M4、M5、M7、M9、M10、M11、M12、M13、M14、M15、M16、M17、M18、M19、M21、M22、M23、M24。

parent line	E1	E2	E3	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E17	E18	E19	E20	E22	E24
HaeⅢ	A	B	A	A	A	A	B	A	A	B	C	B	A	A	A	A	A	A	A
Nci I	A	B	B	A	A	B	B	B	A	B	B	B	B	A	B	A	A	A	B
Pst I	A	B	A	A	A	B	B	A	A	B	A	B	C	A	A	A	A	A	B
Sal I	A	A	B	A	C	A	A	B	A	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A
Sty I	A	B	B	A	A	A	B	B	C	B	D	B	A	A	B	C	C	C	A
Xho I	A	B	C	A	C	A	B	C	B	B	A	B	A	A	C	B	B	B	A
S-alles Type	S_A	S_k	S_F	S_A	S_D	S_G	S_k	S_F	S_C	S_k	S_M	S_k	S_H	S_A	S_F	S_C	S_C	S_C	S_G

parent line	M2	M4	M5	M7	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24
HaeⅢ	A	A	B	A	A	A	A	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A	C	C
Nci I	B	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	B	B	B	A	A	B	B	B
Pst I	A	A	A	C	B	B	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A
Sal I	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B
Sty I	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	B	B	A	B	A	C	B	A	A
Xho I	B	A	B	A	A	A	A	C	B	A	C	B	A	C	A	B	C	A	A
S-alles Type	S_E	S_A	S_I	S_H	S_G	S_G	S_G	S_B	S_J	S_A	S_B	S_k	S_G	S_F	S_A	S_C	S_F	S_L	S_L

表 1.花椰菜雜交親本自交不親和性基因之 PCR-RFLP 圖譜編碼及類型區分，每一限制酶圖譜中文字相同者代表具相同之圖譜；S-alleles type 數字相同者代表擄相同之自交不親和基因型。

在我們實驗中運用 Brace 等人所使用 PCR-RFLP 方法，作爲檢定生產 F1 商業品種之親本類型，因考慮業者實際需要而設計，故並不直接鑑定其學術上真正的自交不親和類型，而只將具有相同自交不親和基因類型簡單分類，以供業者在生產 F1 商業品種組合時參考依據，以直接去除具相同基因型之組合，而不需再行一一比對測試，且此一方法可在親本幼苗時期即可進行分析，也可避免受環境因子干擾影響測交結果；因此希望透過這一技術的建立對業者在花椰菜育種上能有所助益。

引用文獻

1. 沈再發、杜金池、廖公益。1995。同型結合葉深甘藍自交不親和性傳統的遺傳分析。P. 37-82。蔬菜育種研討會專刊。
2. 顏永福、王仕賢、楊藹華、林怡廷、楊雅玲。2001。利用 PCR-RFLP 鑑定甘藍自交不親和基因。中華農藝。11：59-67。
3. Brace, J., G.J. King, and D.J. Ockendon. 1994. A molecular approach to the identification of S-alleles in *Brassica oleracea*. Plant Reprod. 7：203-208.
4. Brace, J., D.J. Ockendon, and G.J. King. 1993. Development of a method for the identification of S alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. Plant Reprod. 6：133-138.
5. Delorme, V., J.L. Giranton, Y. Hatzfeld, A. Friry, and P. Heizmann. 1995. Characterization of the S locus genes, SLG and SRK, of the *Brassica* S_3 haplotype :identification of a membrance localized protein encoded by the S locus receptor kinase gene. Plant J. 7:429-440.
6. Fitzgerald, D. M., D. Barry, P. K. R. Dawson, and A. C. Casseles. 1997. The application of image analysis in determining sib proportion and aberrant characterization in F1 hybrid Brassica populations. Seed Sci. & Technol. 25：503-509.
7. Hinata, K., M. Watanabe, S. Yamakawa, Y. Satta and A. Isogai. 1995. Evolutionary Aspects of the S-Related Genes of the Brassica Self-Incompatibility System: Synonymous and Nonsynonymous Base Substitutions. Genetics. 140, 1099-1104.
8. Kusaba, M. and T. Nishio. 1999. Comparative analysis of S haplotypes with very similar SLG alleles in Brassica rapa and *Brassica oleracea*. The Plant Journal. 17:83-91.
9.Mohring, S., V. Horstmann, and E. Esch. 2005. Development of a molecular CAPS marker for the self-incompatibility locus in *Brassica napus* and identification of different S alleles. Plant Breeding. 124：105-110.
10.Nasrallah, J. B. 1997. Evolution of the Brassica self-incompatibility locus：A look into S-locus genepolymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA. 94：8516-9519.
11.Nasrsllah, J.B., T. H. Kao. M. L. Goldberg, and M. E. Nasrallah. 1985. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea.* Nature. 318:263-269.

12.Nishio, T., and M. Kusaba. 2000. Sequence diverse of SLG and SRK in *Brassica oleracea L.* Annals of Botany. 85：141-146.

13.Ockendon, D.J. 1992. An S-alleles survey of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) Euphytica. 31：325-331.

14.Sakamoto, K., M. Kusaba, and T. Nichio. 2000. Single-seed PCR-RFLP analysis for the identification of S haplotypes in commercial F1 hybrid cultivars of broccoli and cabbage. Plant Cell Reports. 19：400-406.

15.Sato, K., T. Nishio. R. Kimura. M. Kusaba. T. Suzuki, K. Hatakeyama. D. J. Ockendon. A and Y. Satta. 2002. Coevolution of the S-locus genes SRK, SLG and SP11/SCR in *Brassica olerace* and *B. rapa*. Genetics. 162:931-940.

16.Shiba, H., S. Takayama. M. Iwano. H. Simosato. M Funato. T. NaKagawa. F. S. Che. G. Suzuki. M. Watanabe. K. Hinata, and A. Isogai. 2001. Apollen coat protein, SP11/SCAR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of Brassica species. Plant physiol. 125：2095-2103.

17.Stein, J.C., B. Howlett, D.C. Boyes, M.E. Nasrallah, and J.B. Nasrallah. 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. Proc. Acad. Sci. USA. 88:8816-8820.

18.Stein, J.C., R. Dixit, M.E. Nasrallah, and J.B. Nasrallah. 1996. SRK, the stigma-specific S locus receptor kinase of Brassica, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. Plant Cell. 8:429-445.

19.Suzuki, G., N. Kai. T. Hirose. S. Takayama. A. Isogai. M. Wataabe, and K. Hinata. 1999. Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S^9 haplotype of *Brassica campestris* (*syn. rapa*). Genetics. 153：391-400.

20.Trick, M. and P. Heizmann. 1992. Sporophytics self-incompatibility system : Brassica S-gene family. Int. Rev. Cytol. 140：485-524.

Establish the S-alleles of Parent line of Commercial F1 Hybrid in *Brassica oleracea* var.*botrytis linn*. by PCR-RFLP Molecular Technique [1]

Chen K. H., A. H. Yang and S. S. Wang [2]

Abstract

In this study, PCR-RFLP, a molecular method for the identification of *S*-alleles involved in self-incompatibility was used to analyse the **S**-alleles of 38 commercial parent line of *Brassica oleracea var. botrytis Linn*. The method consists of amplifitying by polymerase chain reaction sequences belonging to the S multigenes sequence family using a single pair of conserved primers （BS1、BS2）. A single PCR product of predicted size of 1154 bp was obtained using genomic DNA for each of the 38 commercial parent line **.** PCR products are then analyed further by digestion with six restriction enzymes followed by gel electrophoresis. With any one restriction enzyme, several alleles showed the same restriction pattern. Alleles could therefore be grouped together. In Accordance with this method ,it showed 13 different *S*-allele type in the 38 commercial parent lines.

Key words : *Brassica oleracea var. botrytis Linn*., self-incompatibility, PCR-RFLP.
Accepted for publication：23, July ,2007

1.Contribution No.331 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station.

2.Assistant researcher, Associate researcher , Researcher, Tainan District Agricultural Research and Extension Station. 70, Muchang , Sinhua , Tainan 712, Taiwan , R. O. C.