

# 葉用蘿蔔種原遺傳歧異度及耐熱性評估<sup>1</sup>

陳葦玲<sup>2</sup>、楊雯如<sup>3</sup>

## 摘 要

本研究為探討葉用蘿蔔種原之遺傳歧異度，並利用細胞膜熱穩定性(cell membrane thermostability, CMT)評估種原耐熱性。21個葉用蘿蔔品種(系)在營養性狀及春化需求皆具顯著差異性，以21條區間簡單序列重複(inter simple sequence repeats, ISSR)引子可擴增出292個條帶，平均每個引子可產生13.9個條帶，其中76.7%為穩定具再現性之多型性條帶，顯示葉用蘿蔔族群變異性極高，群集分析結果和植株營養、開花性狀及種原來源具相關性。另子葉以50℃水浴處理30分鐘之熱相對傷害值(relative injury, RI)能區別種原間之耐熱性差異，且與高溫下產量減少比例具高度相關性，RI值低於50%可作為耐熱性篩選指標，進行苗期早期選拔，以加速耐熱葉用蘿蔔選育。

**關鍵字：**葉用蘿蔔、種原、區間簡單序列重複、相對傷害值、耐熱性

## 前 言

近年來氣候暖化日趨嚴重，聯合國政府間氣候變遷小組(Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)指出，百年來地球平均溫度增加0.74℃，預測未來20年的暖化率將加速為每10年約0.2℃<sup>(4)</sup>，高溫成為影響作物生長之限制因子，其導致植株形態發育異常、營養元素吸收受阻、呼吸作用提高、淨光合作用能力降低等變化，作物產量與品質減少<sup>(19)</sup>，嚴重影響適合作物生產的地理分佈及栽培季節<sup>(36)</sup>。

葉用蘿蔔(*Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers.)為十字花科蘿蔔五個變種之一<sup>(24)</sup>，生長適溫度約在15.6~18.3℃<sup>(28)</sup>，在歐洲為重要之綠肥及飼料作物，在印尼則當作食用蔬菜栽培，其生長週期短、營養成分豐富，內含胡蘿蔔素、維生素及鈣<sup>(35)</sup>，近年來成為日本及臺灣地區新興葉用蔬菜<sup>(2)</sup>。由於目前臺灣葉用蘿蔔品種多來自日本，因環境適應性及種子價格昂貴等因素，致使臺灣葉用蘿蔔發展受限。因此，為了面對氣候變遷及提供夏季蔬菜多樣化選擇，需藉由育種提升作物的耐熱性。

於熱帶、亞熱帶地區進行十字花科蔬菜耐熱育種工作之成敗取決於種原的蒐集、評估和耐熱性篩選<sup>(11)</sup>。蘿蔔為自交不親合(self-incompatibility)常異交作物，族群間遺傳歧異度高<sup>(34)</sup>，前人研究中，利用形態、園藝特性、生理及分子標誌對於蘿蔔種質(germplasm)資源特性及遺

<sup>1</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0867 號。

<sup>2</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場副研究員。

<sup>3</sup> 國立臺灣大學園藝暨景觀學系副教授。

傳歧異度(genetic diversity)分析已有相關報告<sup>(3,16,22,30,38,48)</sup>，有助於品種改良及作為栽培利用的參考，但其多針對根用蘿蔔(*R. sativus* L. var. *logipinnatus* Bailey)，對於葉用蘿蔔變種仍無相關研究。

此外，十字花科蔬菜耐熱性為多基因控制之數量遺傳，遺傳規律複雜，目前耐熱性鑑定多針對高溫下結球率<sup>(8,25)</sup>、葉片蠟質<sup>(46)</sup>、葉片厚度<sup>(12)</sup>等外觀指標性狀進行，但其篩選效率低且易受其他環境因子影響，需有更簡便及精準的篩選指標，始能有效鑑定真正的耐熱性。細胞膜熱穩定性(cell membrane thermostability, CMT)為可遺傳且馴化的生理反應<sup>(21)</sup>，藉由測量植株組織於不同溫度下之電解質滲漏(electrolyte leakage)程度以評估耐熱性，為一敏感且快速之生理指標<sup>(47)</sup>。

為了配合葉用蘿蔔品種選育工作，本試驗蒐集選育自中國、日本、馬來西亞及臺灣之品種(系)做為材料，調查其外觀及春化等基本性狀，並利用區間簡單序列重複(inter simple sequence repeat, ISSR)分子標誌分析種原間遺傳歧異度，利用細胞膜熱穩定性檢測方法，評估種原耐熱性，分析兩者之相關性，訂定耐熱篩選指標，以應用於日後育種過程中耐熱親本選擇及後代選拔，冀希望能提升葉用蘿蔔育種效率。

## 材料與方法

### 試驗一、葉用蘿蔔種原性狀調查

蒐集自臺灣、日本、大陸及馬來西亞之21個葉用蘿蔔品種(系)(表一)播種於直徑16.8 cm內含泥炭苔、珍珠石及蛭石混合介質(v:v:v = 6:1:1)之塑膠硬盆中，每盆播三粒，栽培於臺中區農業改良場(彰化，臺灣) 25/20℃溫室內，栽培期間日長為13.5小時，介質表面乾燥時給水，每週施以稀釋1,000倍之Peter's 20.0N-8.7P-16.6K (The Scotts Co., Marysville, OH)一次。調查種子發芽後1週齡植株之子葉及4週齡植株第4片完全展開葉性狀如表二，共調查20棵植株。

另以4週齡植株之第4片完全展開葉為材料，調查葉片氣孔密度，於8~10 am取3 mm × 3 mm之葉片，固定於2.5% glutaraldehyde溶液2小時，再以0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)清洗3次後，經30%、50%、70%、80%、95%、100% EtOH及100%丙酮20分鐘系列濃度脫水，以臨界點乾燥機HCP-2 (Hitachi Ltd., Japan)乾燥後以鍍金機E1010 (Hitachi Ltd., Japan)覆膜90 secs，再以掃描式電子顯微鏡Hitachi S-3000N觀察葉背，共調查10棵植株，一棵植株共取樣8個視野計算之。

另為調查種原春化需求及春化後開花特性，參試品種(系)種子播於內含濕潤濾紙之9 cm塑膠培養皿中，加入15 mL去離子水，每一個培養皿播10粒，每一品種(系)播五個培養皿，每一個培養皿為一重複。種子培養在25℃、黑暗生長箱中兩天，待種子胚根突出後即移至4℃、黑暗生長箱中，分別春化1、2、3及4週後種植於35格黑色穴盤中，每穴種植一株，置於20℃生長箱中，以螢光植物燈管FL15BR (東亞照明，臺灣)提供400  $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF光照，每日照光13小時，調查春化處理後2個月內之植株開花率以及到可見花苞與第一朵花開所需天數，不同春化時間處理各播五盤，一盤為一重覆。

表一、葉用蘿蔔參試品種(系)來源、用途、蒐集年份及種類

Table 1. The origin, usage type, collected year, and type of leafy radish cultivars/lines evaluated in the experiment

| No. | Cultivar/Line | Origin   | Usage      | Collected Year | Type <sup>1</sup> |
|-----|---------------|----------|------------|----------------|-------------------|
| 1   | YongXiang     | Taiwan   | Root       | 2004           | F <sub>1</sub>    |
| 2   | 05-01         | Japan    | Leaf       | 2005           | F <sub>1</sub>    |
| 3   | 05-02         | Japan    | Leaf       | 2005           | F <sub>1</sub>    |
| 4   | 05-03         | China    | Leaf, Root | 2005           | F <sub>1</sub>    |
| 5   | 05-04         | China    | Leaf, Root | 2005           | F <sub>1</sub>    |
| 6   | 06-01         | China    | Leaf       | 2006           | F <sub>1</sub>    |
| 7   | 06-02         | China    | Leaf       | 2006           | F <sub>1</sub>    |
| 8   | 06-03         | China    | Leaf       | 2006           | F <sub>1</sub>    |
| 9   | 06-04         | China    | Leaf       | 2006           | F <sub>1</sub>    |
| 10  | 06-05         | China    | Leaf       | 2006           | F <sub>1</sub>    |
| 11  | S-07-01       | Taiwan   | Leaf, Root | 2007           | Inbreed line      |
| 12  | F-07-01       | Taiwan   | Leaf, Root | 2007           | F <sub>1</sub>    |
| 13  | 07-02         | Malaysia | Leaf       | 2007           | OP                |
| 14  | 07-03         | Malaysia | Leaf       | 2007           | OP                |
| 15  | 08-01         | Taiwan   | Leaf       | 2008           | F <sub>1</sub>    |
| 16  | 08-02         | Taiwan   | Leaf       | 2008           | OP                |
| 17  | Taichung No.1 | Taiwan   | Leaf       | 2004           | OP                |
| 18  | LuiGin        | Taiwan   | Leaf, Root | 2002           | F <sub>1</sub>    |
| 19  | MeiLui        | Japan    | Leaf       | 1996           | F <sub>1</sub>    |
| 20  | YehBo         | Japan    | Leaf       | 1996           | F <sub>1</sub>    |
| 21  | TsaiTsai      | Japan    | Leaf       | 2002           | F <sub>1</sub>    |

<sup>1</sup>F<sub>1</sub> and OP were represented as first hybrid generation and open-pollination.

## 試驗二、以ISSR分子標誌分析葉用蘿蔔種原遺傳歧異度

取21個參試葉用蘿蔔品種(系)單株之子葉0.25 g置於研鉢中，以液態氮磨成粉末後刮入1.5 mL離心管中，加入65℃之700 µL CTAB buffer (3% CTAB、1.4 M NaCl、0.2% β-mercaptoethanol、20 mM EDTA、100 mM Tris-HCl, pH 8.0、1% PVP)，混合均勻後置於65℃乾浴槽中30分鐘，並時常倒置混合，之後加700 µL的1 phenol : 1 chloroform (體積；phenol經Tris-HCl pH 8.0飽和過)，充分混合均勻後於4℃以10,000 rpm離心10分鐘，取上清液至新的微量離心管，並加入0.7倍體積量的2-propanol與1/10體積量之4.4 M NH<sub>4</sub>OAc，迅速混合後於-20℃靜置10分鐘以沉降DNA，然後以4℃、10,000 rpm離心10分鐘，倒掉上層液，以1 mL 70% EtOH清洗後再以4℃、10,000 rpm離心2分鐘，倒掉酒精後置於抽氣櫃中乾燥，沉澱物溶於400 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA、100 mM NaCl)，再加入2 µL之10 µg · µL<sup>-1</sup> RNase，於65℃乾浴槽中反應10分鐘後加入500 µL之1 phenol : 1 chloroform (體積)，以4℃、

10,000 rpm離心10分鐘，取上清液置於另一新微量離心管，加入45  $\mu\text{L}$  4.4 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ 及3倍體積量之95% EtOH，混合均勻，於-80℃靜置30分鐘以沉降DNA，取出後以4℃、10,000 rpm離心10分鐘，倒掉上層液，以1 mL 70% EtOH清洗後再離心2回，最後除去上層液，抽氣乾燥，加入20  $\mu\text{L}$  TE buffer和180  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，儲存於-20℃中備用，PCR反應時再將各樣品DNA稀釋成10 ng  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ 使用。

表二、葉用蘿蔔試驗調查之營養及開花性狀

Table 2. Vegetative and flowering traits of leafy radish surveyed in the experiment

|                              |                                   |
|------------------------------|-----------------------------------|
| 一、營養性狀                       |                                   |
| 1. 數量性狀                      |                                   |
| 一週齡植片子葉長度(cm)                | 四週齡植株葉片氣孔密度(No./mm <sup>2</sup> ) |
| 一週齡植片子葉寬度(cm)                | 四週齡植株葉片葉綠素計 SPAD-502 讀值           |
| 一週齡植片子葉長寬比                   |                                   |
| 一週齡植片子葉厚度                    |                                   |
| 四週齡植株葉片長度(cm)                | 2. 質量性狀                           |
| 四週齡植株葉片寬度(cm)                | 葉型(1.板葉 2.淺裂葉 3.中裂葉 4.深裂葉)        |
| 四週齡植株葉片長寬比                   | 絨毛數目(1.無絨毛 2.絨毛數少 3.絨毛數中等 4.絨毛數多) |
| 四週齡植株葉片厚度(mm)                | 葉柄有無花青素累積(1.有 2.無)                |
| 四週齡植株根長(cm)                  | 葉緣反捲(1.無或非常輕微 2.輕微 3.明顯)          |
| 四週齡植株根寬(mm)                  | 葉尖形狀(1.平坦 2.微尖 3.尖)               |
| 四週齡植株株高(cm)                  | 葉緣缺刻(1.波浪狀 2.鋸齒狀)                 |
| 四週齡植株葉片數                     |                                   |
| 二、開花性狀                       |                                   |
| 種子春化 1 週後之植株開花率 <sup>1</sup> |                                   |
| 種子春化 2 週後之植株開花率              |                                   |
| 種子春化 3 週後之植株開花率              |                                   |
| 種子春化 4 週後之植株開花率              |                                   |
| 種子春化 4 週後植株到可見花苞時間           |                                   |
| 種子春化 4 週後植株到第一朵花開時間          |                                   |

<sup>1</sup>種子春化處理為將胚根剛露出之種子置於4℃、黑暗環境中不同時間，而後置於20℃、400  $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF生長箱中開花。

以21個ISSR引子(表三)進行分析，PCR總反應物體積為25  $\mu\text{L}$ ，包含3  $\mu\text{L}$  10 ng  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  DNA、2  $\mu\text{L}$  1 $\mu\text{M}$ 引子、5  $\mu\text{L}$  PCR Master Mix Kit (Protech Technology Enterprise Co., Taipei, Taiwan)及15  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR反應器為GeneAmp PCR9700 (Applied Biosystems, CA, USA.)，反應條件為94℃、3分鐘；94℃、30秒，55℃、60秒，72℃、90秒，循環35次；72℃、10分鐘完成反應，反應產物暫存於4℃。五倍體積量之PCR反應產物DNA加上1倍體積量之EZ-VISION<sup>TM</sup> DNA Dye (AMRESCO<sup>R</sup>, Canada)，以2%瓊脂膠片在0.5X TBE buffer中，利用100V電壓進行電泳分離，置於UV顯像儀上觀察。

表三、21 個葉用蘿蔔品種(系)之子葉及葉片性狀

Table 3. Cotyledon and leaf characteristics of 21 leafy radish cultivars/lines

| Cultivar/Line | Cotyledon at 1 week |               |                  |                   | Leaf at 4 weeks |               |                  |                   |
|---------------|---------------------|---------------|------------------|-------------------|-----------------|---------------|------------------|-------------------|
|               | Length<br>(cm)      | Width<br>(cm) | Width/<br>length | Thickness<br>(mm) | Length<br>(cm)  | Width<br>(cm) | Width/<br>length | Thickness<br>(mm) |
| YongXiang     | 1.52 <sup>1</sup>   | 2.44          | 0.62             | 46.6              | 20.14           | 8.24          | 2.44             | 24.2              |
| 05-01         | 1.51                | 2.58          | 0.59             | 44.6              | 19.04           | 7.02          | 2.72             | 21.2              |
| 05-02         | 1.33                | 2.61          | 0.51             | 46.8              | 19.58           | 8.02          | 2.44             | 22.1              |
| 05-03         | 1.41                | 2.37          | 0.60             | 57.8              | 17.02           | 6.98          | 2.45             | 32.4              |
| 05-04         | 1.28                | 2.17          | 0.59             | 53.0              | 16.62           | 6.26          | 2.69             | 30.8              |
| 06-01         | 1.46                | 2.46          | 0.60             | 50.6              | 19.08           | 7.24          | 2.64             | 26.5              |
| 06-02         | 1.41                | 2.28          | 0.62             | 40.0              | 20.96           | 7.14          | 2.94             | 26.4              |
| 06-03         | 1.34                | 2.05          | 0.66             | 54.6              | 20.86           | 7.76          | 2.76             | 24.8              |
| 06-04         | 1.45                | 2.32          | 0.63             | 54.0              | 15.16           | 6.38          | 2.37             | 28.6              |
| 06-05         | 0.76                | 1.42          | 0.60             | 41.0              | 17.58           | 7.28          | 2.41             | 22.1              |
| S-07-01       | 1.61                | 2.62          | 0.62             | 51.2              | 22.12           | 8.46          | 2.68             | 27.4              |
| F-07-01       | 1.34                | 2.21          | 0.61             | 44.2              | 17.96           | 6.44          | 2.79             | 25.2              |
| 07-02         | 1.35                | 2.38          | 0.57             | 48.6              | 17.80           | 8.36          | 2.15             | 28.6              |
| 07-03         | 1.28                | 2.26          | 0.59             | 47.2              | 20.26           | 9.52          | 2.14             | 29.0              |
| 08-01         | 1.47                | 2.48          | 0.61             | 42.2              | 18.52           | 6.72          | 2.77             | 26.2              |
| 08-02         | 1.24                | 1.59          | 0.76             | 44.0              | 21.86           | 9.82          | 2.23             | 25.6              |
| Taichung No.1 | 1.29                | 2.24          | 0.58             | 52.8              | 26.11           | 7.54          | 4.30             | 24.4              |
| LuiGin        | 1.17                | 1.87          | 0.63             | 52.0              | 23.04           | 13.36         | 1.73             | 27.4              |
| MeiLui        | 1.34                | 2.42          | 0.56             | 46.8              | 21.73           | 8.58          | 2.54             | 22.8              |
| YehBo         | 1.48                | 2.67          | 0.55             | 44.6              | 20.92           | 8.82          | 2.35             | 22.4              |
| TsaiTsai      | 1.73                | 2.76          | 0.63             | 46.0              | 16.98           | 7.18          | 2.37             | 18.2              |

<sup>1</sup> Data were presented as the mean of 20 replicated plants.

電泳分析後，紀錄條帶有無進行資料分析，在相同條帶位置上，有條帶者紀錄為‘1’，無條帶紀錄為‘0’，不易分辨的條帶則不列入計算。以Jaccard coefficient進行兩兩樣本OTUs相似度運算，求得相關矩陣，再以未加權算術平均對群法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)進行群集分析，繪製樹狀分析圖。並進行特徵相似性計算，經Dcenter 轉換後，求出特徵值與特徵向量，再利用投射完成品種(系)於三度空間分佈圖。Jaccard相關係數公式為 $S_{ab} = N_{ab} / (N_{ab} + N_a + N_b)$ ；其中 $S_{ab}$ 表示a、b兩個體間的相似性； $N_{ab}$ 表示a、b兩個體皆具有的條帶數目； $N_a$ 表示個體a有而個體b無的條帶數； $N_b$ 表示個體b有而個體a無的條帶數。

### 試驗三、葉用蘿蔔種原耐熱性評估

以21個葉用蘿蔔品種(系)為試驗材料，栽培管理方法如試驗一。取發芽後7天植株之子葉及28天植株之第四片完全展開葉，依據陳等人<sup>(9)</sup>之結果，量測其在水浴溫度50℃、30分鐘處

理下之相對傷害(relative injury, RI)值。子葉與葉片先以去離子水擦拭過，再以直徑6 mm之打孔器均勻取樣打下6片葉圓片，放入含有1 ml去離子水之試管，置於50℃循環水浴槽中30分鐘後加入14 mL去離子水，於25℃下震盪24小時後以電導度計SC-120 (SUNTEX Co. Taiwan)測量液體第一次EC值( $T_1$ )，之後各試管再置於100℃循環水浴槽中2小時，使細胞完全破壞，試管取出後待溫度降到25℃時，再以電導度計測量液體第二次EC值( $T_2$ )，以25℃處理為對照組，其細胞完全破壞前後所測量之電導度分別為 $C_1$ 及 $C_2$ 。RI計算公式為： $RI = \{1 - [1 - (T_1/T_2) / [1 - (C_1/C_2)]] \times 100$ 。

此外，為確定CMT和實際田間耐熱性間之相關性，參試品種(系)播種於含泥6炭苔：1珍珠石：1蛭石(體積)混合介質的直徑7 cm、高7 cm之35格黑色穴盤中，每穴播2粒，每一品種(系)播12盤，植株栽培於25/20℃溫室，栽培期間日長為13.5小時，發芽後7天，一半植株移入35/30℃溫室，其餘則持續栽培於25/20℃溫室，栽培管理方法如試驗一，21天後測量每一穴盤之地上部鮮、乾重，計算產量降低率= $\{1 - [35/30^\circ\text{C} \text{ 鮮(乾)重} - 25/20^\circ\text{C} \text{ 鮮(乾)重}] / 25/20^\circ\text{C} \text{ 鮮(乾)重}\} \times 100\%$ ，並分析產量降低率與以50℃、30分鐘水浴處理下RI值間之相關性。

#### 試驗設計與統計分析

試驗設計採用完全隨機設計(Completely randomized design, CRD)，每一處理共四重複，試驗數據以CoStat 6.2統計軟體(CoHort Software, USA)進行最小顯著差異(least significant difference, LSD)分析，分析各處理間有無顯著差異，並以Sigmaplot 10.0 (SPSS Inc., USA)作相關性及迴歸分析。

## 結 果

#### 試驗一、葉用蘿蔔種原性狀調查

於1996~2008年蒐集21個來自日本、大陸、馬來西亞及臺灣葉用、根葉兩用之葉用蘿蔔品種(系)，其中‘YongXiang’為根用耐熱 $F_1$ 品種，S-07-01為YongXiang’第4代自交系( $S_4$ )，F-07-01為以S-07-01為母本開放授粉雜交者，‘Taichung No. 1’、‘MeiLui’、‘YehBo’或‘TsaiTsai’則係經一次母系選拔之後代(表一)。

各種原在株高、葉長、葉寬、葉片數、葉型、葉色、葉柄顏色、絨毛數等主要外觀性狀具差異性。所蒐集品種(系)之株高介於24.84 cm~33.52 cm、葉長介於15.16 cm~26.86 cm、葉寬介於6.38 cm~13.36 cm、葉片數介於6.2~12.8、葉色葉綠素SPAD-502讀值介於22.08~49.12；葉型包括板葉和裂葉，且裂葉程度有所不同，絨毛數從無到多，葉緣缺刻呈現波浪狀和鋸齒狀之分，葉緣捲曲的程度與葉尖形狀亦有差別、葉柄顏色則分為有無花青素累積(表三、四、五)。以電子顯微鏡觀察葉背之氣孔密度，品種(系)間差異亦大，氣孔密度介於24.3/mm<sup>2</sup>~53.4/mm<sup>2</sup>，以日本品種05-01最低，大陸品種05-04最高(表四)，顯示其族群在外觀形態之遺傳歧異度大。

在春化需求和開花表現方面亦呈現種原間差異性，21品種(系)在種子經4℃、1週春化處理均未能開花；大陸品種05-03、05-04和臺灣品種08-01春化需求較低，4℃、2週春化處理後之開花率分別為62.9%、85.6%和39.9%，其他品種原開花率低或不開花；4℃、3週春化處理後，除06-03、06-05、08-02和‘TsaiTsai’未開花外，其餘品種(系)均能開花，顯示該四品種春化需求量較多；而4℃、4週處理均能滿足所有品種(系)春化需求，但08-03和08-02開花率低於10%，且到可見花苞和開花時間較長(表六)。

表四、21 個葉用蘿蔔品種(系)之 4 周齡植株其株高、葉片及根性狀

Table 4. Plant height, leaf and root characteristics of 4 week-old plant of 21 leafy radish cultivars/lines

|                | Plant height (cm) | Leaf SPAD-502 value | Leaf number | Stomatal density (No./mm <sup>2</sup> ) | Root length (cm) | Root width (mm) |
|----------------|-------------------|---------------------|-------------|-----------------------------------------|------------------|-----------------|
| YongXiang      | 30.8 <sup>1</sup> | 29.6                | 8.6         | 43.1                                    | 13.6             | 3.8             |
| 05-01          | 29.9              | 24.0                | 12.0        | 24.3                                    | 12.6             | 3.9             |
| 05-02          | 29.8              | 25.6                | 9.4         | 31.9                                    | 15.2             | 4.4             |
| 05-03          | 25.7              | 33.6                | 9.6         | 52.6                                    | 12.6             | 3.3             |
| 05-04          | 24.8              | 30.4                | 11.4        | 53.4                                    | 12.9             | 3.3             |
| 06-01          | 28.4              | 27.4                | 10.6        | 47.0                                    | 12.7             | 3.4             |
| 06-02          | 29.7              | 25.3                | 9.0         | 42.2                                    | 13.4             | 3.7             |
| 06-03          | 29.5              | 22.0                | 6.2         | 38.6                                    | 13.1             | 2.6             |
| 06-04          | 23.2              | 32.4                | 12.8        | 50.8                                    | 11.4             | 3.9             |
| 06-05          | 29.3              | 49.1                | 8.6         | 39.4                                    | 12.4             | 3.4             |
| S-07-01        | 27.8              | 26.6                | 6.6         | 45.9                                    | 12.6             | 5.2             |
| F-07-01        | 24.8              | 29.4                | 6.2         | 48.4                                    | 13.8             | 2.4             |
| 07-02          | 26.2              | 30.6                | 9.8         | 38.1                                    | 11.4             | 5.5             |
| 07-03          | 28.5              | 27.4                | 9.4         | 38.9                                    | 12.5             | 7.3             |
| 08-01          | 29.2              | 23.3                | 9.6         | 49.5                                    | 13.4             | 3.7             |
| 08-02          | 28.1              | 24.6                | 8.6         | 36.1                                    | 12.1             | 4.6             |
| Taichung No. 1 | 29.7              | 24.0                | 9.6         | 35.4                                    | 13.4             | 3.4             |
| LuiGin         | 33.5              | 28.4                | 10.6        | 27.4                                    | 15.0             | 3.4             |
| MeiLui         | 32.2              | 25.4                | 9.8         | 35.4                                    | 16.8             | 4.5             |
| YehBo          | 33.4              | 23.8                | 8.2         | 37.5                                    | 15.3             | 3.1             |
| TsaiTsai       | 28.0              | 26.0                | 9.6         | 37.2                                    | 14.8             | 2.5             |

<sup>1</sup> Data were presented as the mean of 20 replicated plants.

表五、21 個葉用蘿蔔品種(系)之 4 周齡植株葉片性狀

Table 5. Leaf characteristics of 4 week-old plant of 21 leafy radish cultivars/lines

|               | Leaf shape     | Trichome | Petiole color | Leaf curve | Leaf edge incision | Leaf tip type |
|---------------|----------------|----------|---------------|------------|--------------------|---------------|
| YongXiang     | 2 <sup>1</sup> | 2        | 1             | 1          | 2                  | 2             |
| 05-01         | 4              | 2        | 1             | 1          | 2                  | 3             |
| 05-02         | 2              | 1        | 1             | 1          | 2                  | 3             |
| 05-03         | 1              | 1        | 1             | 3          | 1                  | 1             |
| 05-04         | 1              | 1        | 1             | 3          | 1                  | 1             |
| 06-01         | 2              | 1        | 1             | 2          | 1                  | 1             |
| 06-02         | 2              | 2        | 1             | 2          | 2                  | 1             |
| 06-03         | 4              | 3        | 1             | 1          | 1                  | 2             |
| 06-04         | 1              | 1        | 1             | 2          | 1                  | 1             |
| 06-05         | 4              | 4        | 2             | 1          | 1                  | 3             |
| S-07-01       | 2              | 1        | 1             | 1          | 1                  | 2             |
| F-07-01       | 2              | 1        | 1             | 1          | 1                  | 2             |
| 07-02         | 3              | 4        | 2             | 1          | 2                  | 2             |
| 07-03         | 3              | 4        | 2             | 1          | 2                  | 2             |
| 08-01         | 2              | 1        | 1             | 1          | 2                  | 3             |
| 08-02         | 4              | 4        | 1             | 1          | 2                  | 3             |
| Taichung No.1 | 2              | 1        | 1             | 1          | 2                  | 1             |
| LuiGin        | 2              | 2        | 1             | 1          | 1                  | 2             |
| MeiLui        | 3              | 1        | 1             | 1          | 1                  | 2             |
| YehBo         | 3              | 1        | 1             | 1          | 2                  | 2             |
| TsaiTsai      | 3              | 1        | 1             | 1          | 1                  | 3             |

<sup>1</sup> Data were presented as the mean of 20 replicated plants.



表六、21 個葉用蘿蔔品種(系)之開花性狀

Table 6. Flowering characteristics of 21 leafy radish cultivars/lines

| Cultivar/Line | Flowering rate (%)            |                                |                                |                               | Time to visible bud after 4 wks-seed vernalization (days) | Time to first flowering after 4 wks-seed vernalization (days) |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|               | After 1 wk-seed vernalization | After 2 wks-seed vernalization | After 3 wks-seed vernalization | After 4wks-seed vernalization |                                                           |                                                               |
| YongXiang     | 0.0 <sup>1</sup>              | 0.0                            | 100.0                          | 100.0                         | 17.2                                                      | 26.5                                                          |
| 05-01         | 0.0                           | 0.0                            | 5.7                            | 100.0                         | 14.7                                                      | 27.3                                                          |
| 05-02         | 0.0                           | 0.0                            | 8.6                            | 72.6                          | 18.9                                                      | 28.8                                                          |
| 05-03         | 0.0                           | 62.9                           | 100.0                          | 100.0                         | 13.2                                                      | 21.5                                                          |
| 05-04         | 0.0                           | 85.6                           | 100.0                          | 100.0                         | 12.6                                                      | 21.2                                                          |
| 06-01         | 0.0                           | 5.7                            | 100.0                          | 100.0                         | 13.8                                                      | 22.1                                                          |
| 06-02         | 0.0                           | 8.6                            | 100.0                          | 100.0                         | 12.1                                                      | 21.9                                                          |
| 06-03         | 0.0                           | 0.0                            | 0.0                            | 8.6                           | 30.0                                                      | 39.7                                                          |
| 06-04         | 0.0                           | 14.3                           | 100.0                          | 100.0                         | 12.4                                                      | 21.0                                                          |
| 06-05         | 0.0                           | 0.0                            | 0.0                            | 11.4                          | 22.4                                                      | 37.2                                                          |
| S-07-01       | 0.0                           | 11.4                           | 25.7                           | 100.0                         | 16.3                                                      | 26.6                                                          |
| F-07-01       | 0.0                           | 14.3                           | 39.8                           | 100.0                         | 13.4                                                      | 22.0                                                          |
| 07-02         | 0.0                           | 0.0                            | 2.9                            | 14.3                          | 25.4                                                      | 34.8                                                          |
| 07-03         | 0.0                           | 0.0                            | 2.9                            | 14.3                          | 25.3                                                      | 33.3                                                          |
| 08-01         | 0.0                           | 39.9                           | 100.0                          | 100.0                         | 11.7                                                      | 20.4                                                          |
| 08-02         | 0.0                           | 0.0                            | 0.0                            | 2.9                           | 29.8                                                      | 40.5                                                          |
| Taichung No.1 | 0.0                           | 0.0                            | 25.7                           | 100.0                         | 13.3                                                      | 24.9                                                          |
| LuiGin        | 0.0                           | 0.0                            | 8.6                            | 22.9                          | 15.9                                                      | 27.6                                                          |
| MeiLui        | 0.0                           | 0.0                            | 4.3                            | 28.6                          | 17.9                                                      | 27.8                                                          |
| YehBo         | 0.0                           | 0.0                            | 11.4                           | 100.0                         | 16.1                                                      | 29.2                                                          |
| TsaiTsai      | 0.0                           | 0.0                            | 0.0                            | 11.4                          | 14.4                                                      | 26.9                                                          |

<sup>1</sup> Data were presented as the mean of 5 replicates (n=10).

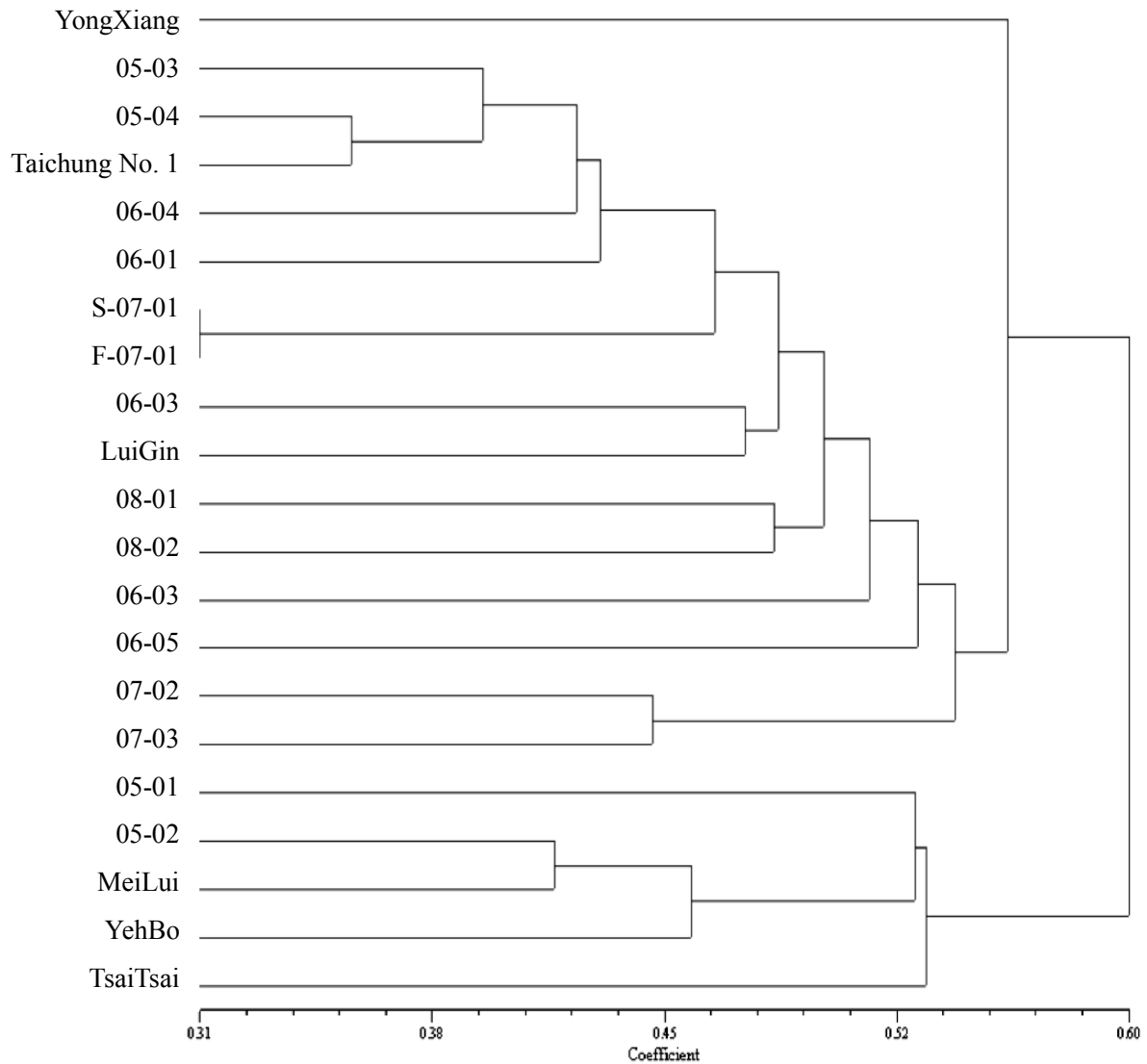
## 試驗二、以ISSR分子標誌分析葉用蘿蔔種原遺傳歧異度

以21個引子進行ISSR分析，共產生292個條帶，其中有224個條帶具多型性，佔總條帶之76.71%，平均每個ISSR引子可產生13.9個條帶，其中多型性條帶為10.7個(表七)。將224個多型性條帶以UPGMA群集分析之結果，在距離係數0.60時可分為兩大群，第一大群全為蒐集自日本，葉形裂葉、葉柄無花青素累積、絨毛數少或無絨毛、需4℃春化3週以上開花之品種，包括05-01、05-02、‘MeiLui’、‘YehBo’和‘TsaiTsai’。第二大群可分為三小群，臺灣根用品種‘YongXiang’在距離係數0.56時單獨被分成一群；馬來西亞品種07-02及07-03可分為一小群，其葉形為中裂葉、葉柄有花青素累積、絨毛數多、4℃春化需3週以上開花之品種；另一小群為大陸及臺灣品種(系)，除06-03外，葉形主為板葉或淺裂葉、葉柄無花青素累積、部分品種(系)在4℃春化2週以上即可開花(圖一)。

表七、葉用蘿蔔 21 個 ISSR 引子、引子序列與其經聚合酶連鎖反應增幅後產生之條帶數

Table 7. 21 ISSR primers, sequences and number of amplification band by PCR of leafy radish

| Primer No.           | Sequence 5'→3'        | Number of amplification band |       |       |
|----------------------|-----------------------|------------------------------|-------|-------|
|                      |                       | Total                        | Poly- | Mono- |
| ISR01                | (AC) <sub>9</sub> T   | 11                           | 8     | 3     |
| ISR02                | (AC) <sub>8</sub> AT  | 13                           | 8     | 5     |
| ISR03                | (AC) <sub>8</sub> TT  | 10                           | 8     | 2     |
| ISR04                | (AC) <sub>8</sub> AG  | 14                           | 12    | 2     |
| ISR05                | (AC) <sub>8</sub> TG  | 12                           | 5     | 7     |
| ISR10                | (GAA) <sub>6</sub>    | 20                           | 16    | 4     |
| ISR17                | (GACA) <sub>4</sub>   | 15                           | 13    | 2     |
| ISR22                | (AC) <sub>8</sub> AA  | 14                           | 9     | 5     |
| ISR23                | (AC) <sub>8</sub> TA  | 16                           | 15    | 1     |
| ISR24                | (AC) <sub>8</sub> TC  | 13                           | 11    | 2     |
| ISR28                | (TG) <sub>8</sub> CC  | 2                            | 1     | 1     |
| ISR35                | (AG) <sub>8</sub> TA  | 12                           | 12    | 0     |
| ISR42                | (AC) <sub>8</sub> CG  | 6                            | 3     | 3     |
| ISR43                | (AC) <sub>8</sub> CT  | 16                           | 12    | 4     |
| ISR44                | (AC) <sub>8</sub> GA  | 17                           | 15    | 2     |
| ISR49                | (TG) <sub>8</sub> AC  | 14                           | 12    | 2     |
| ISR51                | (TG) <sub>8</sub> GAT | 11                           | 7     | 4     |
| ISR59                | (AG) <sub>8</sub> GC  | 15                           | 11    | 4     |
| ISR61                | (AG) <sub>8</sub> GT  | 20                           | 16    | 4     |
| ISR63                | (AG) <sub>8</sub> CT  | 18                           | 13    | 5     |
| ISR76                | (AGTG) <sub>4</sub>   | 12                           | 9     | 3     |
| Number of total band |                       | 292                          | 224   | 68    |
| Percentage (%)       |                       |                              | 76.7  | 23.3  |

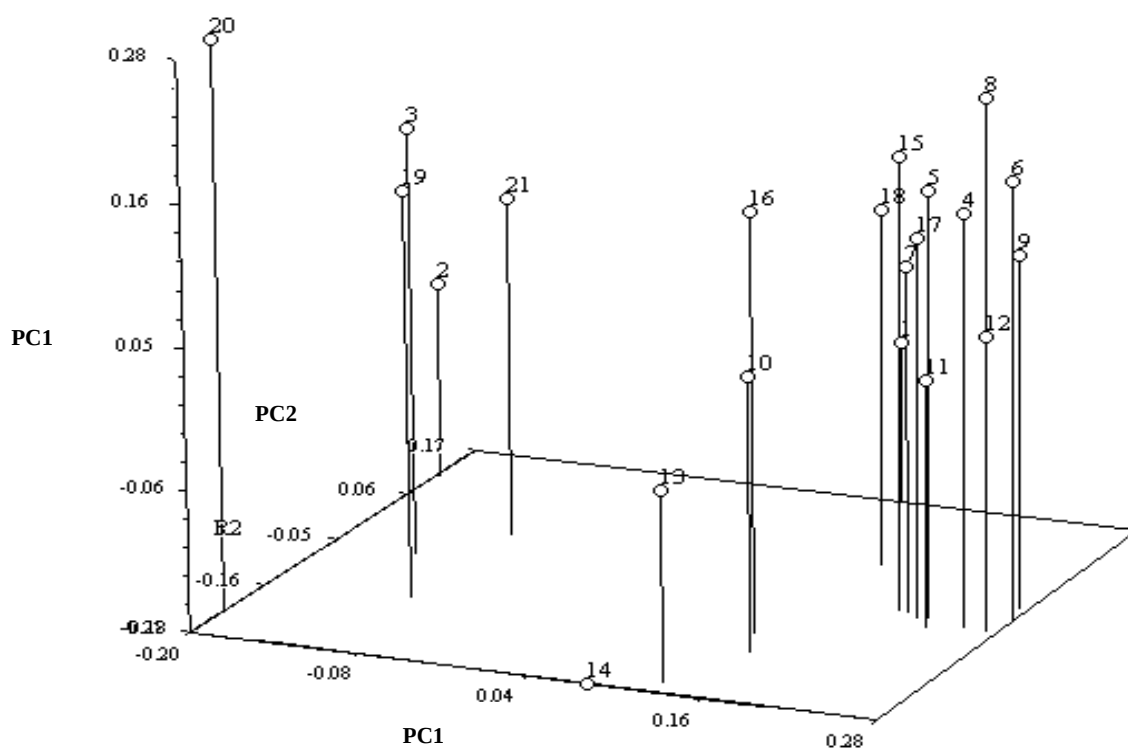


圖一、21個葉用蘿蔔品種(系)以224個多型性條帶經群集分析之聚類樹狀圖

Fig. 1. Dendrogram of 21 leafy radish cultivars/lines revealed by unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) by cluster analysis on the basis of 224 polymorphic bands. Dissimilarity calculated by Euclidean distance coefficient

利用主成份分析之分群結果和群集分析相似，主要可分為三群，第一群為日本品種系，包括05-01、05-02、‘MeiLui’、‘YehBo’和‘TsaiTsai’；第二群為馬來西亞品種07-02、07-03、葉脈有花青素累積之大陸品種06-05以及無花青素累積之臺灣品種08-02，其中06-05和08-02較靠近第三群。第三群則為臺灣或大陸品種(系)，除06-03外，其餘品種(系)葉形為板葉或淺裂葉，葉面絨毛數少或無絨毛(圖二)。

- |              |             |                   |
|--------------|-------------|-------------------|
| 1. YongXiang | 8. 06-03    | 15. 08-01         |
| 2. 05-01     | 9. 06-04    | 16. 08-02         |
| 3. 05-02     | 10. 06-05   | 17. Taichung No.1 |
| 4. 05-03     | 11. S-07-01 | 18. LuiGin        |
| 5. 05-04     | 12. F-07-01 | 19. MeiLui        |
| 6. 06-01     | 13. 07-02   | 20. YehBo         |
| 7. 06-02     | 14. 07-03   | 21. TsaiTsai      |



圖二、21 個葉用蘿蔔品種(系)以 224 個多型性條帶經主成份分析之立體圖

Fig. 2. Ordination of 21 leafy radish cultivars/lines revealed by the first three principal component axes on the basis of 224 polymorphic bands

### 試驗三、葉用蘿蔔種原耐熱性評估

將21個葉用蘿蔔種原以50℃水浴、30分鐘進行細胞膜熱穩定性評估，參試品種(系)間子葉和葉片之RI值分別介於48.9%~76.3%和47.7%~77.6%，顯示種原間耐熱程度具顯著差異性；其中子葉RI以08-01最低，‘Taichung No. 1’最高，而葉片RI則以06-01最低，05-04最高(表八)。

調查21品種(系)在35/30℃和25/20℃栽培下之地上部鮮、乾重產量，並計算在高溫下產量降低的比例。35/30℃高溫處理分別造成所蒐集葉用蘿蔔種原鮮重18%~60%降低和乾重6%~50%降低，品(系)種間差異性大；鮮重方面以F-07-01降低率較小、‘YehBo’較大，乾重方面則以05-04降低率較少、‘LuiGin’較多(表九)。就21個葉用蘿蔔品種(系)鮮、乾重量減少比例和其子葉或葉片於50℃、30 mins水浴處理下之RI值做相關性分析，結果皆呈一次正相關， $R^2$ 值介於0.72~0.85 (圖三)。

表八、21 品種(系)葉用蘿蔔之子葉及葉片經 50℃、水浴處理 30 分鐘後之相對傷害值  
Table 8. The relative injury (RI) values of cotyledons and leaves in 21 leafy radish cultivars/lines after waterbath at 50℃ for 30 mins

| Cultivar/Line | RI of Cotyledon (%) | RI of leaf (%) |
|---------------|---------------------|----------------|
| YongXiang     | 49.5 g <sup>1</sup> | 50.2 fg        |
| 05-01         | 63.1 cde            | 67.3 abc       |
| 05-02         | 64.7 bcd            | 68.3 abc       |
| 05-03         | 50.5 g              | 52.4 fg        |
| 05-04         | 50.4 g              | 47.7 g         |
| 06-01         | 71.2 abc            | 77.6 a         |
| 06-02         | 64.9 bcd            | 75.8 a         |
| 06-03         | 69.1 abc            | 73.2 ab        |
| 06-04         | 65.5 bcd            | 64.2 bcde      |
| 06-05         | 50.7 g              | 59.4 cdef      |
| S-07-01       | 60.3 def            | 60.2 cdef      |
| F-07-01       | 51.8 fg             | 51.7 fg        |
| 07-02         | 52.5 fg             | 55.8 defg      |
| 07-03         | 59.5 def            | 69.0 abc       |
| 08-01         | 48.9 g              | 55.5 efg       |
| 08-02         | 60.1 def            | 66.6 abcd      |
| Taichung No.1 | 76.3 a              | 75.3 a         |
| LuiGin        | 73.8 ab             | 75.3 a         |
| MeiLui        | 72.8 ab             | 71.7 ab        |
| YehBo         | 75.3 a              | 70.7 ab        |
| TsaiTsai      | 70.2 abc            | 67.8 abc       |

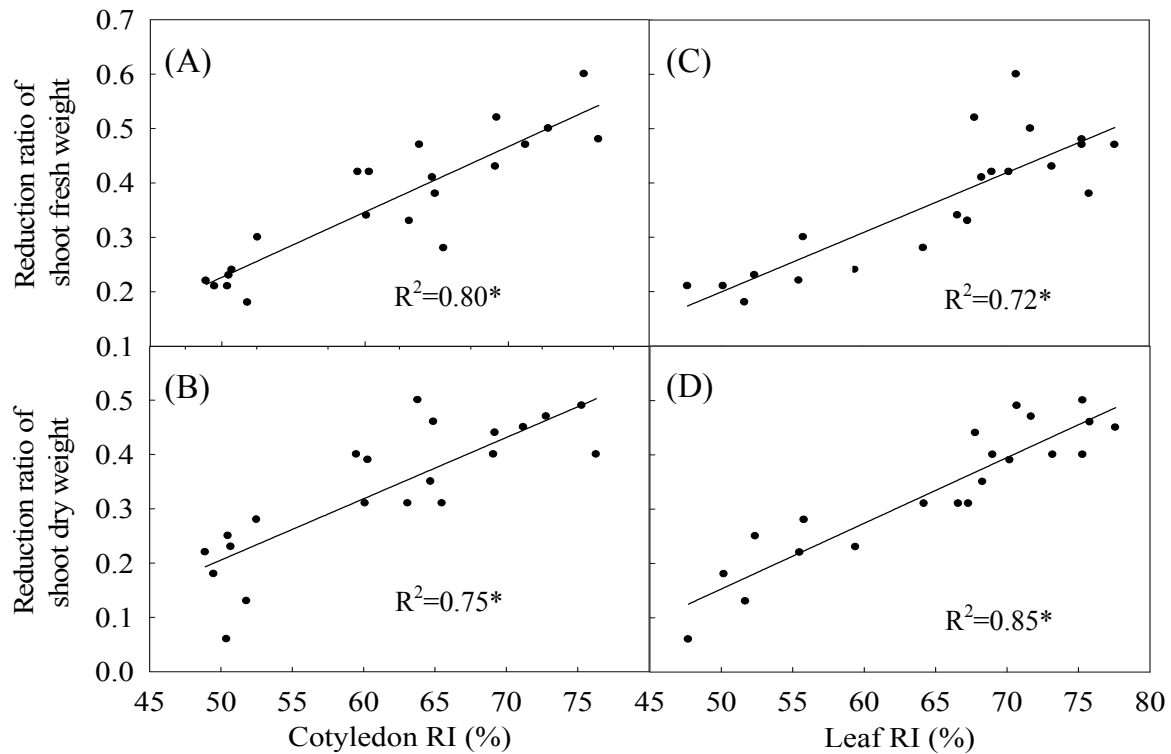
<sup>1</sup> Means separation within columns by Fisher's least significant difference test at  $P<0.05$ .

表九、葉用蘿蔔 21 品種(系)栽培於 25/20°C 及 35/30°C 之地上部生長量之表現

Table 9. Shoot yield of 21 leafy radish cultivars/lines cultivated under 25/20°C and 35/30°C conditions

| Cultivar/Line    | Shoot fresh weight<br>per plug tray (g) |         | t-test         | Decreased<br>ratio | Shoot dry weight<br>per plug tray (g) |         | t-test | Decreased<br>ratio |
|------------------|-----------------------------------------|---------|----------------|--------------------|---------------------------------------|---------|--------|--------------------|
|                  | 25/20°C                                 | 35/30°C |                |                    | 25/20°C                               | 35/30°C |        |                    |
| YongXiang        | 568.8                                   | 450.3   | * <sup>1</sup> | 0.21               | 34.4                                  | 28.1    | *      | 0.18               |
| 05-01            | 358.1                                   | 239.3   | *              | 0.33               | 21.6                                  | 15.0    | **     | 0.31               |
| 05-02            | 470.7                                   | 278.5   | **             | 0.41               | 28.2                                  | 18.2    | **     | 0.35               |
| 05-03            | 365.4                                   | 281.9   | **             | 0.23               | 23.6                                  | 17.6    | **     | 0.25               |
| 05-04            | 387.4                                   | 304.3   | *              | 0.21               | 23.4                                  | 21.9    | NS     | 0.06               |
| 06-01            | 400.9                                   | 212.4   | **             | 0.47               | 24.2                                  | 13.3    | ***    | 0.45               |
| 06-02            | 500.8                                   | 309.0   | **             | 0.38               | 30.1                                  | 16.4    | ***    | 0.46               |
| 06-03            | 407.2                                   | 231.4   | **             | 0.43               | 24.4                                  | 14.6    | **     | 0.40               |
| 06-04            | 368.9                                   | 266.7   | *              | 0.28               | 22.4                                  | 15.4    | **     | 0.31               |
| 06-05            | 316.3                                   | 241.3   | *              | 0.24               | 19.2                                  | 14.8    | *      | 0.23               |
| S-07-01          | 434.0                                   | 253.8   | **             | 0.42               | 26.1                                  | 14.9    | **     | 0.39               |
| F-07-01          | 419.4                                   | 345.6   | *              | 0.18               | 25.1                                  | 21.9    | *      | 0.13               |
| 07-02            | 343.5                                   | 239.4   | *              | 0.30               | 20.8                                  | 14.7    | **     | 0.28               |
| 07-03            | 440.4                                   | 255.5   | **             | 0.42               | 26.7                                  | 16.0    | **     | 0.40               |
| 08-01            | 443.6                                   | 344.2   | *              | 0.22               | 27.3                                  | 21.4    | *      | 0.22               |
| 08-02            | 447.5                                   | 296.5   | **             | 0.34               | 26.8                                  | 18.6    | **     | 0.31               |
| Taichung No.1    | 392.5                                   | 204.2   | **             | 0.48               | 24.3                                  | 14.7    | ***    | 0.40               |
| LuiGin           | 401.7                                   | 214.1   | **             | 0.47               | 24.2                                  | 13.4    | ***    | 0.50               |
| MeiLui           | 431.7                                   | 217.6   | **             | 0.50               | 30.9                                  | 16.5    | ***    | 0.47               |
| YehBo            | 608.8                                   | 245.2   | ***            | 0.60               | 36.2                                  | 18.3    | ***    | 0.49               |
| TsaiTsai         | 465.3                                   | 223.6   | **             | 0.52               | 28.0                                  | 15.6    | ***    | 0.44               |
| LSD ( $P<0.05$ ) | 30.1                                    | 18.8    |                |                    | 3.9                                   | 2.3     |        |                    |

<sup>1</sup> NS, \*, \*\*, \*\*\* Nonsignificant or significant at  $P<0.05$ , 0.01, and 0.001 by *t*-test.



圖三、葉用蘿蔔 21 品種(系)經 50℃、水浴處理 30 分鐘後之子葉(A, B)及葉片(C, D)相對傷害值與其栽培於 35/30℃ 下地上部產量降低率之相關性

Fig. 3. The correlation between relative injury and shoot reduction ratio of fresh and dry weight among 21 leafy radish cultivars/lines. RI values of the cotyledon (A, B) and leaves (C, D) were obtained after water bath at 50℃ for 30 min. The shoot reduction ratio represented the ratio of yield loss due to high temperature stress of 35/30℃ for three weeks. The control plants were grown at 28/25℃

## 討 論

種原的蒐集、評估和耐熱性篩選為十字花科蔬菜耐熱育種工作的成敗關鍵<sup>(11)</sup>，合理進行親本選配以達到品種遺傳改良目的為當前育種工作的重點。蘿蔔種原豐富，親緣關係的評估對於提高蘿蔔育種效率具有重要意義。傳統以外表型及特性來鑑定作物品種仍是一種廣為接受及應用的方法，對於歧異性小、較難累積足夠的多型性分子標的遺傳材料，也適合用形態特徵配合數量分類來分析。

本試驗所蒐集或選育之葉用蘿蔔種原，在外觀如株高、葉片數、葉形、葉色、葉柄顏色、絨毛數等主要外觀性狀差異性大(表三、四、五)，因此利用外表形進行親緣分析應屬適合；然而採用外表形或植株表現進行親緣或品種鑑定會受到環境因素、調查性狀影響，又或因外表形差異因育種目標性狀的選拔逐漸變小所限制<sup>(5)</sup>。

隨著分子生物技術研發，分子標誌為作物遺傳歧異度分析及品種鑑定之良好工具，在十字花科蔬菜如芥菜<sup>(42)</sup>、青花菜<sup>(29)</sup>、甘藍<sup>(14)</sup>和芥藍<sup>(33)</sup>等皆有研究報告。其中，Zietkiewics等提出ISSR分子標誌，其為利用2~5個核苷酸的simple sequence repeats)SSR序列，於其5'或3'端再加上1~4個退化性鹼基(degenerated bases)，以此作為引子進行polymerase chain reaction (PCR)反應，已廣泛應用於遺傳圖譜建構、物種族群遺傳變異分析，品系與品種區分鑑定等<sup>(49)</sup>，主要因ISSR具有再現性高、多型性比例高、穩定性佳、操作簡便、不需要基因序列資訊、且為顯性標記等優點，常用於品種間的相似性及親緣關係之研究<sup>(15,17,39,43)</sup>，且ISSR用少數的引子就可獲得大量遺傳訊息，對研究較少、缺乏基因序列資訊的孤兒作物(orphan crop)，是遺傳研究工具的選擇之一<sup>(41)</sup>。

分子標誌在品種鑑別力上，引子產生的多型性條帶越多其鑑定力越好<sup>(7)</sup>。本試驗中每條ISSR引子平均即獲得13.9個條帶，多型性條帶有10.7個，比例為76.71%，又ISR04、ISR10、ISR17、ISR23、ISR35、ISR44、ISR49、ISR61及ISR63等9個引子可產生較多的條帶，這9個引子經PCR共擴增了124個條帶，且這124個條帶多為多型性條帶，多型性比率高達85%，其中ISR35引子所擴增之多型性條帶比例為100% (表七)，可知葉用蘿蔔遺傳變異仍大，而ISSR為鑑定葉用蘿蔔種原之有效方法。

利用ISSR以UPGMA群集分析，第一大群全為蒐集自日本、裂葉、葉柄無花青素累積、絨毛數少或無絨毛、4℃春化需3週以上開花之品種，第二大群可分為三小群，臺灣根用品種‘YongXiang’單獨成一群；蒐集自馬來西亞，葉形為中裂葉、葉柄有花青素累積、絨毛數多、4℃春化需3週以上開花之品系分為一小群；另一小群全為大陸及臺灣品種(系)，葉形主為板葉或淺裂葉、葉柄無花青素累積、部分品種(系)在4℃春化2週以上即可開花(圖一)。分群結果和種原的來源地有高度相關性，日本品種和其他地區種原距離較遠，獨自為一群，而臺灣與大陸種原距離較近；其中根用品種‘YongXiang’遺傳距離較遠，且亦未和其自交4代之S-07-01相鄰，可能因為S-07-01組群尚未完全純化，而試驗中DNA萃取只以單株取樣所導致；但S-07-01和以S-07-01為母本開放授粉雜交‘Taichung No. 1’、‘MeiLui’、‘YehBo’或‘TsaiTsai’，經母系選拔之雜交後代F-07-01，因遺傳背景較近，在外觀形態調查及ISSR分析結果相似度高，而S-07-01-F分群位置亦界於母本S-07-01和可能之父本‘MeiLui’、‘YehBo’或‘TsaiTsai’，且與母本較近。

ISSR分群結果除了和種原來源具相關性外，和其主要性狀如葉形、葉片絨毛、葉柄有無花青素及春化需求間之關係性亦高，推論葉用蘿蔔可能以該四性狀為主要品種篩選目標，此結果和Lui等人(2008)利用RAPD、ISSR和SRAP引子分析日本、韓國及中國晚抽苔之根用蘿蔔優良品種，分群結果和種原來源和主要的性狀如根形、根表皮顏色、板葉或裂葉及抽苔早晚等有高度相關性之結果相似<sup>(30)</sup>；而Jatoi等人(2011)則認為根用蘿蔔種原中以植株生物量、根直徑、根長和根重等性狀為品種篩選的主要依據<sup>(23)</sup>。

在種原耐熱性篩選方面，電解質滲漏已應用於許多作物膜熱穩定性檢定，利用植體組織於暫時高溫處理下之電解質滲漏率具有快速、敏感、所需空間小且客觀之優點<sup>(47)</sup>。Wang等



(2008)將葉片以50℃水浴處理檢測膜熱穩定性，計算各品種葉片之RI值與其開花熱延遲天數呈直線正相關，表示葉片RI值愈高的品種其開花熱延遲愈嚴重<sup>(45)</sup>。在小麥<sup>(40)</sup>、番椒<sup>(13)</sup>及大豆<sup>(21)</sup>研究中，亦以50℃水浴處理成功篩選耐熱品種；而甘藍則以48℃、處理30分鐘之電導度評估品系間耐熱性<sup>(10)</sup>。

本試驗中21個葉用蘿蔔品種(系)以50℃、水浴處理30分鐘之子葉及葉片RI值具差異性，其RI值範圍分別介於48.9%~76.3%和47.7%~77.6% (表八)，可顯著區別品種(系)間耐熱性；又於35/30℃高溫栽培下植株鮮乾重顯著降低，減少比例分別介於18%~60%和6%~50%，品(系)種間差異性大(表九)，可說明所蒐集之葉用蘿蔔種原間耐熱性歧異度大。此外，高溫下產量減少比例和子葉或葉片於50℃、30分鐘水浴處理下之RI值之間皆呈一次正相關(圖三)，顯示50℃、30分鐘水浴處理為一合適之葉用蘿蔔耐熱篩選方法。

除葉片外，細胞、根及花瓣也可供作為檢測CMT之材料<sup>(20,27,47)</sup>。又CMT會因取樣組織年齡而有所差異。不同節位之大豆葉片檢測其細胞膜熱穩定性，結果顯示自頂端往下1~2節位葉片之RI值高於3~8節位葉片，且1~2節位葉片之RI值較能區別大豆品種間之耐熱性<sup>(32)</sup>；菊花因第1~2節之葉片多捲曲且面積小，而以第3~4節葉片進行膜熱穩定性檢測較佳<sup>(1)</sup>；甜瓜則以剛展開幼嫩葉片RI值差異較大，且對熱反應較敏感<sup>(26)</sup>。其可能原因為年輕葉片之光合作用、呼吸作用及代謝作用活性高，且葉綠素含量比老葉多<sup>(37)</sup>，高溫逆境下葉綠素降解、葉綠體內膜系統破壞明顯<sup>(44)</sup>，而葉齡大之葉片所含低分子量熱休克蛋白質累積較多，因此在高溫逆境下有較佳耐受性，較不易受溫度影響<sup>(31)</sup>。

本研究中，以7天齡植株之子葉為材料，其RI值可分辨出葉用蘿蔔品種(系)間CMT之差異，且和28天齡植株之葉片RI值無顯著差異，亦與實際產量間之相關性高(圖三)。春小麥於幼苗期及開花階段進行葉片膜熱穩定檢測，結果顯示幼苗期與開花階段所測得RI值並無顯著差異，且二個階段RI值與田間總產量間均呈直線正相關<sup>(18)</sup>。故依據本試驗結果，建議子葉可作為葉用蘿蔔CMT之檢測材料，以縮短篩選時間，提高育種效率。

而依耐熱性篩選結果，本試驗蒐集自目前市面上日本之F<sub>1</sub>商業品種‘MeiLui’、‘YehBo’、‘TsaiTsai’及臺灣品種‘Taichung No. 1’、‘LuiGin’多不耐熱，經50℃水浴後，子葉RI值均大於70%，高溫下鮮乾重降低比例分別高於0.47和0.44，而相對耐熱品種(系)‘YongXiang’、05-03、05-04、06-05、S-07-01-F與08-01經50℃水浴後，子葉RI值約落在50%，鮮乾重降低比例均小於0.25 (表八、九)，由此可建議50℃水浴下之子葉RI值低於50%，以及35/30℃下鮮乾重降低比例低於0.25可作為葉用蘿蔔耐熱性篩選的指標，而這些耐熱種原可作為日後葉用蘿蔔耐熱育種的親本選擇。

對照外觀性狀及春化需求調查結果，耐熱性和外觀性狀之間無絕對相關，相對耐熱之品系其葉形板葉和裂葉都有，葉片絨毛數從無到多，葉綠素SPAD-502讀值介於23.35~49.12，葉片數6.2~11.4，葉片厚度22.1 mm~32.4 mm (表三、四、五)，此結果和韓等人(1997)指出蘿蔔品種耐熱性重要指標為葉形多為板葉、葉面積大、葉厚、葉色深綠之結論不相同<sup>(12)</sup>，顯示以

外觀形態作為葉用蘿蔔耐熱性篩選指標並不合適。但在春化需求方面，除06-05外，其餘品種(系)種子經4℃春化2週後即可開花(表六)，顯示耐熱種原可能春化需求亦較低。

綜合本試驗結果，葉用蘿蔔種原在外觀性狀、春化需求、DNA遺傳物質及耐熱性上均具有歧異度，利用ISSR分子標誌分析葉用蘿蔔種原，分群結果和種原來源具高度相關性，和葉形、葉片絨毛、葉柄有無花青素及春化需求等性狀之相關性亦高；而細胞膜穩定性可作為葉用蘿蔔耐熱篩選方法，經50℃水浴處理30分鐘之子葉RI值低於50%為耐熱性篩選指標，所選拔出之耐熱種原‘YongXiang’、05-03、05-04、06-05、S-07-01-F和08-01將可提供於耐熱育種之親本選擇。

## 參考文獻

1. 王進學、葉德銘 2013 菊花之細胞膜熱穩定性檢測及其應用於篩選耐熱實生苗 臺灣園藝 59: 153-166。
2. 李文汕 2006 蘿蔔 p.247-252 刊於：黃美華主編 臺灣農家要覽：農作篇(二) 豐年社 臺北。
3. 李鴻漸、汪隆植、張毅雄 1983 以春化特性為基礎的蘿蔔品種分類的探討 南京農學院學報 3: 31-35。
4. 周佳、劉紹臣 2011 全球氣候變遷觀測 p. 59-90 臺灣氣候變遷科學報告2011 行政院國家科學委員會 臺北。
5. 胡凱康 1995 作物品種鑑定技術之進展 p.77-84 蔬菜育種研討會專刊 行政院農業委員會桃園區農業改良場編印。
6. 翁儷倩 2001 柑橘遺傳歧異性之分析 國立臺灣大學園藝所碩士論文 90p. 臺北。
7. 黃佳興、王啟正、全中和 2010 以ISSR DNA標誌用於苦瓜遺傳變異及品種鑑定之研究 花蓮區農業改良場研究彙報 28: 21-34。
8. 陳美蘭 2010 青花菜AV531耐熱特性之探討 國立臺灣大學園藝學系碩士論文 臺北。
9. 陳葦玲、郭孚耀、陳榮五 2009 利用細胞膜熱穩定性技術篩選高耐熱性葉用蘿蔔 臺中區農業改良場研究彙報 102: 15-29。
10. 康俊根、翟依仁、張京社、秦海明、卜曉東 2002 甘藍耐熱性鑑定方法 中國蔬菜 2002: 4-7。
11. 謝明憲、劉依昌、許涵鈞、林棟樑、王仕賢 2008 十字花科蔬菜耐熱育種及採種 p.67-76 2008農業生技產業應用研討會專刊。
12. 韓笑冰、利容千、王建波 1997 熱脅迫下蘿蔔不同耐熱品種細胞組織結構比較 武漢植物學研究 15: 173-178。
13. Anderson, J. A., G. McCollum and W. Roberts. 1990. High temperature acclimation in pepper leaves. HortScience 25: 1272-1274.

14. Cansian, R. L. and S. Echeverrigaray. 2000. Discrimination among cultivars of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) using randomly amplified polymorphic DNA Markers. HortScience 35: 1155-1158.
15. Charterers, Y. M., A. Robertson, M. J. Wilkinson and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theor. Appl. Genet. 92: 442-447.
16. Chen, H. M. and C. J. Zhou. 1999. A study on genetic relationship among radish varieties by esterase isoenzymes. J. Hunan. Agric. Univ. 25: 191-193.
17. Godwin, I. D., E. A. B. Aitken and L. W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to genetics. Electrophoresis 18: 1524-1528.
18. Fokar, M., A. Blum and H.T. Nguyen. 1998. Heat tolerance in spring wheat. II. Grain filling. Euphytica 104: 9-15.
19. Hall, A. E. 2001. Crop response to environment. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
20. Ingram, D. L. and D. W. Buchanan. 1984. Lethal high temperatures for roots in three citrus root stocks. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 189-193.
21. Ismail, A. M. and A. E. Hall. 1999. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. Crop Sci. 39: 1762-1768.
22. Ivy, N. A., M. S. Biswas, G. Rasul, T. Hossain and M. A. K. Mian. 2010. Variations of genotypes of radish at molecular level using isozyme analysis for the identification of self-incompatible lines. Global J. Biotech. Biochem. 5: 19-26.
23. Jatoi, S. A., A. Javaid, M. Iqbal, O. U. Sayal, M. S. Masood and S.U. Siddiqui. 2011. Genetic diversity in radish germplasm formorphological traits and seed storage proteins. Pak. J. Bot. 43: 2507-2512.
24. Kaneko, Y., C. K. Takagi, S. W. Bang and Y. Matsuzawa. 2007. Radish, p.141-160. In: C. Kole (ed). Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Springer Ind. N.Y.
25. Kuo, C. G. 1999. Vegetable improvement for heat-tolerance under tropical conditions. JIRCAS Working Rpt. 14: 3.
26. Lester, G. E. 1985. Leaf cell membrane thermostabilities of *Cucumis melo*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110: 506-509.
27. Liu, X. and B. Huang. 2000. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. Crop Sci. 40: 503-510.
28. Lornez, O. A. and D. A. Maynard. 1980. Knott's handbook for vegetable growers. 2nd ed. Wiley-Interscience. NJ, USA.

29. Lu, X., L. Liu, Y. Ging, L. Zhao, X. Somg and X. Zhu. 2009. Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR marker. *Sci. Hort.* 122: 645-648.
30. Lui, L. W., L. P. Zhao, Y. Q. Gong, M. X. Wang, L. M. Chen, J. L. Yang, Y. Wang, F. M. Yu and L. Z. Wang. 2008. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Sci. Hort.* 116: 240-247.
31. Mansfield, M. A. and T. L. Key. 1987. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plant. *Plant Physiol.* 84: 1007-1017.
32. Martineau, J. R., J. E. Specht, J. H. Williams and C. Y. Sullivan. 1979. Temperature tolerance in soybeans I. Evaluation of a technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Sci.* 19: 75-78.
33. Matsui, T., N. Okuda and Y. Kosugi. 2002. Classification of Chinese kale cultivars by RAPD analysis. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 71: 499-503.
34. Muminovi, J., A. Merz and A. E. Melchinger. 2005. Genetic structure and diversity among radish varieties as inferred from AFLP and ISSR analyses. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 79-87.
35. O'Hare, T. J., L. S. Wong and L. E. Force. 2007. Radish leaves and radish roots: are we eating the right part for cancer prevention. *Acta Hort.* 841: 571-574.
36. Porter, J. R. 2005. Rising temperatures are likely to reduce crop yields. *Nature* 436: 174.
37. Pospisilova J., J. Catsky and Z. Sestak. 1997. Photosynthesis in plants cultivated in vitro, p. 525-540. In: M. Pessarakli (eds). *Handbook of photosynthesis*. Marcel Dekker, New York.
38. Rabbani, M. A., Y. Murakami, Y. Kuginuki and K. Takayanagi. 1998. Genetic variation in radish (*Raphanus sativus* L.) germplasm from Pakistan using morphological traits and RAPDs. *Genet. Resour. Crop Evol.* 45: 307-316.
39. Raina, S. N., V. Rani, T. Kojima, Y. Ogihara, K. P. Singh and R. M. Devarumath. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivates and wild species. *Genome* 44: 763-772.
40. Saadalla, M. M., J. F. Shanahan and J. S. Quick. 1990. Heat tolerance in winter wheat: I. Hardening and genetic effects on membrane thermostability. *Crop Sci.* 30: 1243-1247.
41. Semagn, K., Å. Bjørnstad and M. N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 2540-2568.
42. Srivastava, A., V. Gupta, D. Pental and A. K. Pradhan. 2001. ADLP-based genetic diversity assessment amongst agronomically important natural and some newly synthesized lines of *Brassica juncea*. *Theor. Appl. Genet.* 102: 193-199.

43. Svetleva, D., C. Pereira, J. Carlier, L. Cabrita, J. Leitaó and D. Genchev. 2006. Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP analyses. *Sci. Hort.* 109: 198-206.
44. Suzuki, Y. and Y. Shioi. 1999. Detection of chlorophyll breakdown products in the senescent leaves of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 40: 909-915.
45. Wang, C. H., D. M. Yeh and C. S. Sheu. 2008. Heat tolerance and flowering-heat-delay sensitivity interrelation to cell membrane thermostability in chrysanthemum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 754-759.
46. Welker, O. A. and S. Furuya. 1994. Surface structure of leaves in heat tolerant plants. *J. Agron. Crop. Sci.* 173: 279-288.
47. Wu, M. T. and S. J. Waller. 1983. Heat stress responses in cultured plant cells: Development and comparison of viability test. *Plant Physiol.* 72: 817-820.
48. Yamagishi, H., M. Tateishi, T. Terachi and S. Murayama. 1998. Genetic relationship among Japanese wild radish (*Raphanus sativus* f. *raphanistroides* Makino), cultivated radishes and *R. raphanistrum* revealed by RAPD analysis. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 67: 526-531.
49. Zietkiewics, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

# Evaluation of Genetic Diversity and Heat Tolerance in Leafy Radish (*Raphanus sativus* var. *oleiformis*)<sup>1</sup>

We-Ling Chen<sup>2</sup> and Wen-Ju Yang<sup>3</sup>

## ABSTRACT

The study aimed to investigate the genetic diversity of leafy radish (*Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers.) germplasm and evaluate their heat tolerance by cell membrane thermostability (CMT). The significant variance of vegetative and vernalizative characteristics was found among 21 collected leafy radish cultivars (lines). Based on the inter simple sequence repeats (ISSR) analysis, 292 bands were generated from 21 primers with an average of 13.9 bands per primer. There were 76.7% polymerase chain reaction (PCR) products being reproducible, polymorphic and revealed high genetic diversity in leafy radish accessions. The results of cluster analysis showed that the relationship between plant vegetative, reproductive traits and their origins were close. Besides, relative injury (RI) of cotyledon tissues after 50°C water bath, for 30 mins had high correlation with yield reduction caused by high temperature. This result was suggested RI value lower than 50% as a heat tolerant selecting index for leafy radish genotypes during seedling stage. It can be useful to facilitate heat tolerant breeding efficiency of leafy radish in the future.

**Key words:** *Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers., germplasm, inter simple sequence repeat, relative injury value, heat tolerance

---

<sup>1</sup> Contribution No. 0867 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup> Associate Horticulturists of Taichung DARES, COA.

<sup>3</sup> Associate Professor of Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University.