

利用 RAPD 與 ISSR 分子標誌評估印度棗品種間之遺傳歧異度

蘇慧珊¹⁾ 陳京城²⁾

關鍵字：印度棗、分子標誌

摘要：本研究以 28 個 RAPD 引子及 16 個 ISSR 引子增殖產生之標誌分析 15 個印度棗品種之遺傳歧異度。結果共獲得 286 個 RAPD 標誌片段及 150 個 ISSR DNA 片段。以 RAPD 全部增殖 DNA 片段分析所得相似度矩陣經 UPGMA 法建構之親緣樹狀圖顯示相似度介於 0.68~0.95。以 RAPD 多型性標誌分析所得相似度矩陣經 UPGMA 法建構之親緣樹狀圖顯示相似度介於 0.42~0.92。以 ISSR 全部增殖 DNA 片段分析所得相似度矩陣經 UPGMA 法建構之親緣樹狀圖顯示相似度介於 0.80~0.97。以 ISSR 多型性標誌分析所得相似度矩陣經 UPGMA 法建構之親緣樹狀圖顯示相似度介於 0.58~0.91。

前 言

印度棗(Indian jujube, *Zizyphus mauritiana* Lam.)俗稱棗子，為鼠李科(*Rhamnaceae*)棗屬(*Zizyphus* Mill.)之作物。大部分原產於印度、緬甸及中國雲南一帶。與溫帶果樹之中國棗(*Zizyphus vulgaris* Lam.)為同科同屬但不同種之作物。在亞洲南部、非洲、澳洲等地均有分佈(黃, 1995)。印度棗實生苗的幼年期很短，播種後當年或第二年即可結果，再加上實生苗變異大及芽條突變，使印度棗歷年來品種更替速度很快且品種多樣化。

印度棗栽培面積，依據農業年報統計，由民國 82 年的 1,406 公頃，增加至 93 年的 1,800 公頃。主要產地集中在屏東縣，其次是高雄縣及台南縣。此外在嘉義縣、嘉義市、台中縣、雲林縣及台東縣亦有零星栽培。在台灣印度棗雖然不是大宗果樹，但由於品種改良及栽培技術的改進，因此能生產品質相當良好，目前已成為高屏地區的重要經濟果樹之一。

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

印度棗不同品種間的外觀形態相似，早期分子生物及相關生物技術尚未成熟時，主要以外表形態為鑑別方法，故所得到的標誌有限。而進行鑑別工作時，若以外表形態來評估植物性狀，則容易受到環境因子及生長條件的影響，近代以DNA為基礎的技術能更靈敏的偵測物種的遺傳變異，便可以排除這些難題。因此以PCR為基礎的分析法如AFLP、RAPD、SSR等被廣泛應用。RAPD與ISSR在應用上有協助育種工作：Hormaza(1999)的報告提出，許多果樹和堅果作物由於幼年期較長，需要較長時間才能發育至一定的大小，因此會花費許多時間及成本。Shirkot等人(2001)發現PCR-based RAPD技術能在定植前即分辨奇異果(Kiwifruit)的雌雄基因型。分析族群歧異度與性狀：Archak(2002)等人以27個具有不同遺傳性狀的番茄栽培種利用RAPD makers作分析，相似度愈高，則暗示在研究的材料中，其遺傳變異是有限的。Blair(1999)等人，以32個ISSR引子分析59個水稻種源，共產生370條多型性條帶可區分出indica及japonica型。ISSR分子標誌可於遺傳歧異度與性狀表現差異中做相關性解釋，應用在蕁苔屬作物之形態特徵分群上，證明分子標誌與形態標誌分群上確有相關性。DNA指紋分析資料及品種鑑定：Ronning等人(1995)以RAPD進行番荔枝屬(*Annona*)的指紋分析。Prevost和Wilkinson(1998)以4個ISSR引子對34個馬鈴薯品系進行分析，其中有兩個引子單獨使用即可區分所有品種，而4個引子中的其中2個引子組合，亦能顯現出各品系間的特異性。分析地理位置之相關性：Pillay等人(2001)以RAPD分析東非29種高地香蕉和另外兩群不同集團的香蕉，分析其遺傳差異和關聯性。由樹狀圖分析顯示主要分4群，分別為AAA高地香蕉、Agbagba(ABA)群、Kisubi和Kamaramasenge(AB)群及Calcntta 4(AA)群。據實驗結果顯示PAPD的分析無法區分何者為釀酒用或是主食用香蕉，但對於親源相近的高地香蕉能加以區分，並可提供親本的選擇以改善種質的遺傳基礎。RAPD與ISSR一樣具有分析技術簡單、分析方法較為安全、靈敏度高、標誌數量豐富、在植物任何發育階段都可進行分析、僅需微量樣品即可分析、以及無基因上位現象等優點。因此本研究主要以RAPD及ISSR分子標誌來評估國內印度棗品種間之遺傳歧異度及品種鑑別，並比較RAPD及ISSR分析後的結果及差異。

材料與方法

一、試驗材料

試驗材料為15個印度棗(*Zizyphus mauritiana* Lam.)品種來源分別為：1.鳳山熱帶園藝試驗所的品種有：'台農1號'、'高朗1號'、'碧雲'、'天蜜'、'翠蜜'、'黃冠'、'蜜棗'、'泰國'、'玉冠'、'新世紀'、'特龍'、'金鈴'。2.高雄區農業改良場的品種有：'高雄2號'、'高雄3號'。3.嘉義大學的品種有：'新蜜棗'。

二、試驗方法

(一) 萃取基因組DNA

採取新鮮印度棗嫩梢，以液態氮冷凍並以研鉢研磨成細粉末狀，使用 QIAGEN 公司之 DNeasy® Plant Mini Kit 進行萃取，萃取方法如下：取 0.05 g 磨好之印度棗嫩梢樣品，加入 400 μ l AP1 buffer 及 4 μ l RNase A stock solution(100 mg/ml)，並充分混合及震盪。混合後置於 65°C 水浴 10 分鐘。(期間震盪 2-3 次)。加 130 μ l AP2 buffer 充分混合後，置於冰中 5 分鐘，最後震盪混合，以最高轉速(13000 rpm)離心 5 分鐘。用去尖頭 tip 吸取上層液，加入 QIA shredder 過濾管，以最高轉速(約 13000 rpm)離心 2 分鐘。取過濾液，倒入 1.5 ml tube 中，再加入 1.5 倍 AP3 buffer 用 pipet 輕輕混合，先取 650 μ l 加入 DNeasy 過濾管，以 8000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液，再取剩餘混合液加入過濾管，同法離心。去除離心後之濾液，加入 500 μ l AW buffer，以最大轉速(約 13000 rpm)離心 2 分鐘，倒掉濾液。再使用 96-100%酒精清洗一次，離心 2 分鐘，倒掉濾液之後，再離心 1 分鐘，避免酒精殘留。使用 1.5 ml 離心管，將濾心置入，加入預熱 65°C 之 AE buffer 100 μ l，置於室溫下 5 分鐘後，以 8000 rpm 離心 1 分鐘。使用分光光度計測量 220-320 nm 波長間之吸光值變化，並單獨測量波長 230、260、280 nm 處之吸光值，理想之純 DNA 的 A_{260}/A_{280} 數值比例約為 1.7-1.9。DNA 將濃度調整為 $A_{260} = 1 = 50 \text{ ug/ml}$ ，儲存於 -40 °C 下備用。

(二) RAPD 與 ISSR 之 PCR 分析與電泳

1. 多型性 DNA 標誌引子之篩選：第一次共使用 OPERON 逢機引子組 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L 及 X 等共 13 組 10mer 之引子進行篩選。共使用 UBC Kit9 共 100 個 ISSR 引子及進行試驗。
2. 聚合酶鏈鎖反應：聚合酶鏈鎖反應的反應溶液總量為 25 μ l，包含 2.5 mM MgCl_2 、1 X Mg free buffer(含 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % glycerol, 0.5 % Tween 20, 0.5 % Nonidet®-P40)、160 μ M 之 dNTP、1 unit Taq DNA polymerase (Promega 出品)、25 pmol primer 及 25 ng Template DNA，混合均勻後，放入 DNA 聚合酶反應器 Gene Amp PCR system 2700 中進行加熱與降溫循環。反應條件設定為：94°C 6 分鐘，接著再以 94 °C 45 秒、40 °C 下 45 秒(ISSR 的為 50 °C 下 45 秒)、72 °C 下 1 分鐘進行 40 次循環反應，最後 72 °C 下 7 分鐘結束。
3. DNA 瓊膠電泳：將 0.5 X TBE buffer 及 1.5 % 瓊膠(agarose)倒入 250 ml 之三角瓶中，以微波爐加熱溶解，溶解後靜置冷卻至約 60 °C 左右加入 0.5 μ g/ml ethidium bromide 再倒入模型槽中製作膠片，凝固後置於含有 0.5 X TBE buffer 之電泳槽中。將經過 PCR 反應後之 25 μ l 樣品混合 5 μ l 6X dye (Fermentas 出品)，注入溝槽，樣品兩側注入混合 6 X dye 之 2.0 μ l Bio 100 bp DNA Ladder(PROTECH 出品)，作為判斷電泳條帶片段大小之依據。
4. 相似度(similarity)分析、群叢分析及相似度樹狀圖(dendrogram)製作：相似度之計算依照 Nei 和 Li(1979)不同樣品間的遺傳相似性(similarity)算法，再利用 NT-SYS 電腦套裝軟體進行 UPGMA 進行群體分析後，得到品種間遺傳相似度樹狀圖。公式為 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ， S_{xy} 代表 x 品種及 y 品種之間的相似度， N_{xy} 代品種表 x 品種及 y 品種共有之條帶數， N_x 及 N_y 分別代表 x 品種及 y 品種各自之條帶總數(Wang *et al.*, 1999)。

結 果

一、RAPD總條帶分析

15個印度棗品種經使用13組共260支RAPD引子進行篩選後，篩選出28個能產生多型性條帶之引子，總計共212個多型性電泳條帶及74個單型性條帶。

由樹狀圖中(圖1)發現15個印度棗品種區分成4群，I群包含12個品種，'金鈴'及'泰國'及'新蜜棗'這三個品種則各自一群。遺傳相似係數為0.68~0.95之間，兩品種間之相似度方面，以'台農1號'與'高朗1號'變異株之相似度最高，高達0.92，其次分別為'高雄2號'與'高雄3號'這組與'玉冠'與'特龍'這兩組之相似度同樣為0.897。另外'黃冠'與'新世紀'之相似度為0.886，'碧雲'與'天蜜'之相似度為0.806。所求得之平均相似度係數為0.776，平均變異度係數為0.224。其分析結果與多形性條帶分析相類似，在相似度方面則提高許多。

表1. RAPD分析選用之28個具多型性條帶引子

Table 1. 28 polymorphic primers used for RAPD analysis.

引子 Primers	序列 Sequence 5' to 3'	總條帶數 Total fragments	多型性條帶 polymorphic fragments	多型性條帶比率 Percentage of polymorphic
OPA-03	AGTCAGCCAC	7	5	71.43
OPB-11	GTAGACCCGT	10	10	100.00
OPB-18	CCACAGCAGT	12	11	91.67
OPC-13	AAGCCTCGTC	9	6	66.67
OPD-01	ACCGCGAAGG	9	7	77.78
OPD-04	TTGGCACGGG	11	7	63.64
OPD-07	TCTGGTGAGG	9	6	66.67
OPE-06	AAGACCCCTC	10	8	80.00
OPE-08	TCACCACGGT	7	6	85.71
OPE-14	TGCGGCTGAG	9	5	55.56
OPE-17	CTACTGCCGT	17	14	82.35
OPE-20	AACGGTGACC	10	6	60.00
OPF-01	ACGGATCCTG	9	6	66.67
OPF-04	GGTGATCAGG	9	7	77.78
OPG-08	TCACGTCCAC	11	7	63.64
OPH-05	AGTCGTCCCC	11	7	63.64
OPH-08	GAAACACCCC	10	7	70.00
OPH-12	ACGCGCATGT	13	10	76.92

OPI-16	TCTCCGCCCT	10	6	60.00
OPJ-05	CTCCATGGGG	10	6	60.00
OPK-01	CATTCGAGCC	11	8	76.92
OPL-02	TGGGCGCTAA	9	8	88.89
OPL-19	GAGTGGTGAC	12	7	58.33
OPX-02	TTCCGCCACC	10	6	60.00
OPX-07	GAGCGAGGCT	9	7	77.78
OPX-08	CAGGGGTGGA	8	8	100.00
OPX-13	ACGGGAGCAA	14	10	71.43
OPX-18	GACTAGGTGG	9	9	100.00
Total		286	212	
Average		10.21	7.57	74.13

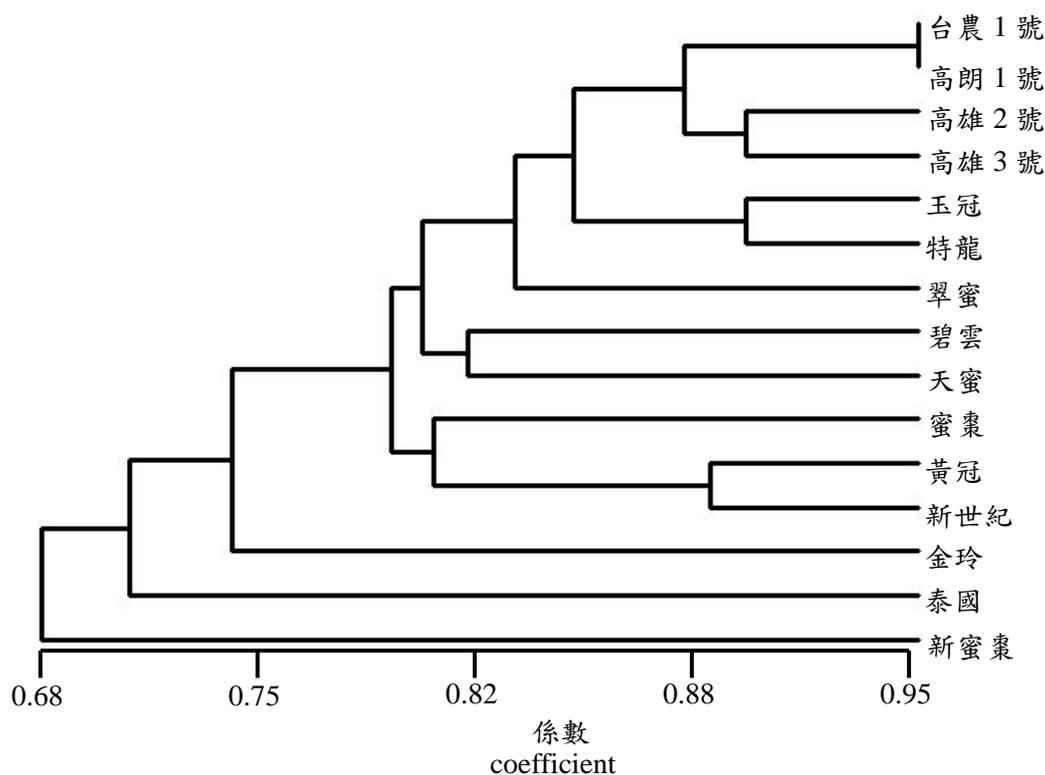


圖1. 15個印度棗品種之RAPD全部增殖DNA片段分析所得相似度矩陣經UPGMA群叢分析後建立之相似度樹狀圖

Fig. 1. Dendrogram of 15 Indian jujube cultivars generated by UPGMA cluster analysis based on the similarity matrix of RAPD total amplified DNA fragments.

二、RAPD多形性條帶分析

由樹狀圖中(圖2)發現15個印度棗品種可區分成4群，I群包含12個品種，'金鈴'及'泰國'及'新蜜棗'這三個品種仍各自為獨立成三群。此結果與RAPD總條帶分析相同。經分析後，遺傳相似係數介於0.42- 0.92之間，兩品種間之相似度方面，以'台農1號'與'高朗1號'變異株之相似度高達0.92為最高，其次分別為'高雄2號'與'高雄3號'之相似度為0.843、'玉冠'與'特龍'之相似度為0.839及'黃冠'與'新世紀'之相似度為0.793，其餘組合皆小於0.75。所求得之平均相似度係數為0.620。

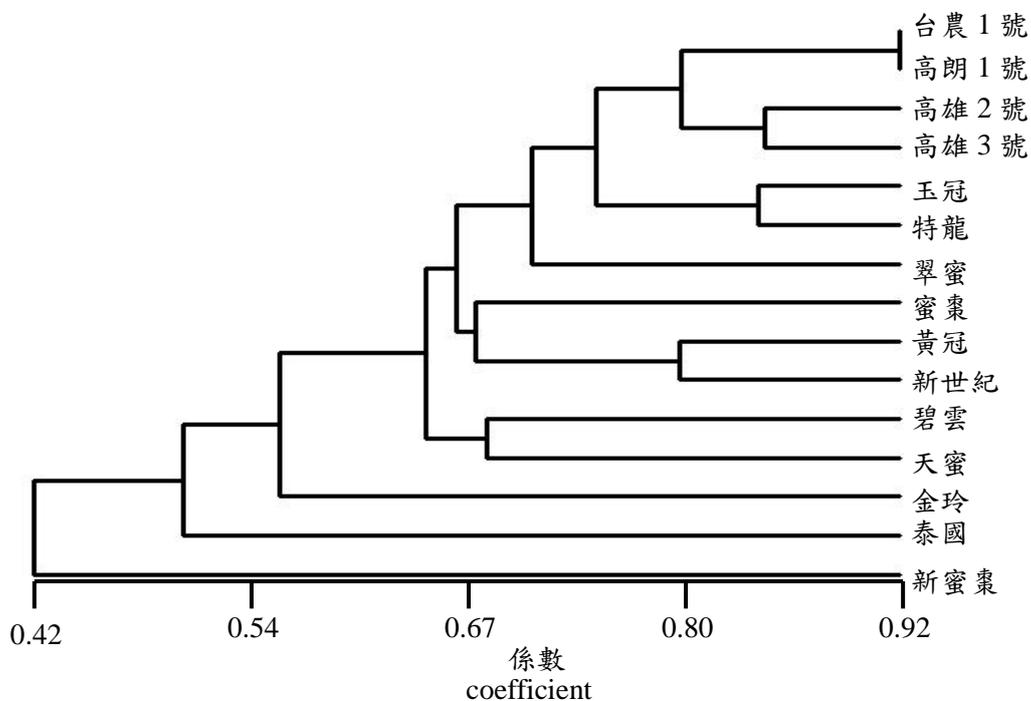


圖2. 15個印度棗品種之RAPD多形性標誌分析相似度矩陣經UPGMA群叢分析後建立之相似度樹狀圖

Fig. 2. Dendrogram of 15 Indian jujube cultivars generated by UPGMA cluster analysis based on the similarity matrix of RAPD polymorphic markers similarity matrix.

三、ISSR總條帶分析

印度棗品種經使用104支ISSR引子進行篩選後，選取16個能產生多型性電泳條帶之引子(表2)，總計共95個多型性條帶及55個單型性條帶。這16個引子所顯示的結果如(表2)。

群叢分析製成相似度樹狀圖(圖3)中可發現15個印度棗品種區分成I、II兩群，第I群包含12個品種，第II群則為'泰國'、'蜜棗'和'新蜜棗'三品種。兩品種間之相似度方面，以'台農

1號'與'天蜜'之相似度高達0.97為最高，其次分別為'黃冠'與'新世紀'之相似度為0.948，'高朗1號'與'翠蜜'之相似度為0.939。

'蜜棗'與'新蜜棗'之相似度為0.911，'高雄2號'與'高雄3號'之相似度為0.905，以及'玉冠'與'特龍'之相似度為0.903。所求得之平均相似度係數為0.834。

表2. ISSR分析選用之16個具多型性條帶引子

Table 2. 16 polymorphic primers used for ISSR analysis.

引子 Primers	序列 Sequence 5' to 3'	總條帶數 Total fragments	多型性條帶 Polymorphic fragments	多型性條帶比率 Percentage of polymorphic
UBC-823	TCTCTCTCTCTCTCC	8	4	50.00
UBC-824	TCTCTCTCTCTCTCG	6	4	66.67
UBC-825	ACACACACACACACT	10	6	60.00
UBC-845	CTCTCTCTCTCTCTRG	8	7	87.50
UBC-847	CACACACACACACARC	9	8	89.89
UBC-849	GTGTGTGTGTGTGTGYA	10	5	50.00
UBC-853	TCTCTCTCTCTCTCRT	8	3	37.50
UBC-854	TCTCTCTCTCTCTCRG	9	5	55.56
UBC-856	ACACACACACACACYA	11	5	45.45
UBC-857	ACACACACACACACYG	11	7	63.64
UBC-864	ATGATGATGATGATG	9	4	44.44
UBC-876	GATAGATAGACAGACA	9	6	66.67
UBC-891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	10	8	80.00
UBC-898	GATCAAGCTTNNNNNATGTG	8	5	62.50
(gATA) ₅	GATA GATA GATA GATA GATA	7	4	57.14
(CAA) ₅	CAA CAA CAA CAA CAA	8	5	62.50
Total		150	95	
Average		9.38	5.96	63.33

² R = (A, G), Y = (C, T), D = (A, G, T), H=(A,C,T), V=(A,C,G), N=(A,G,C,T)

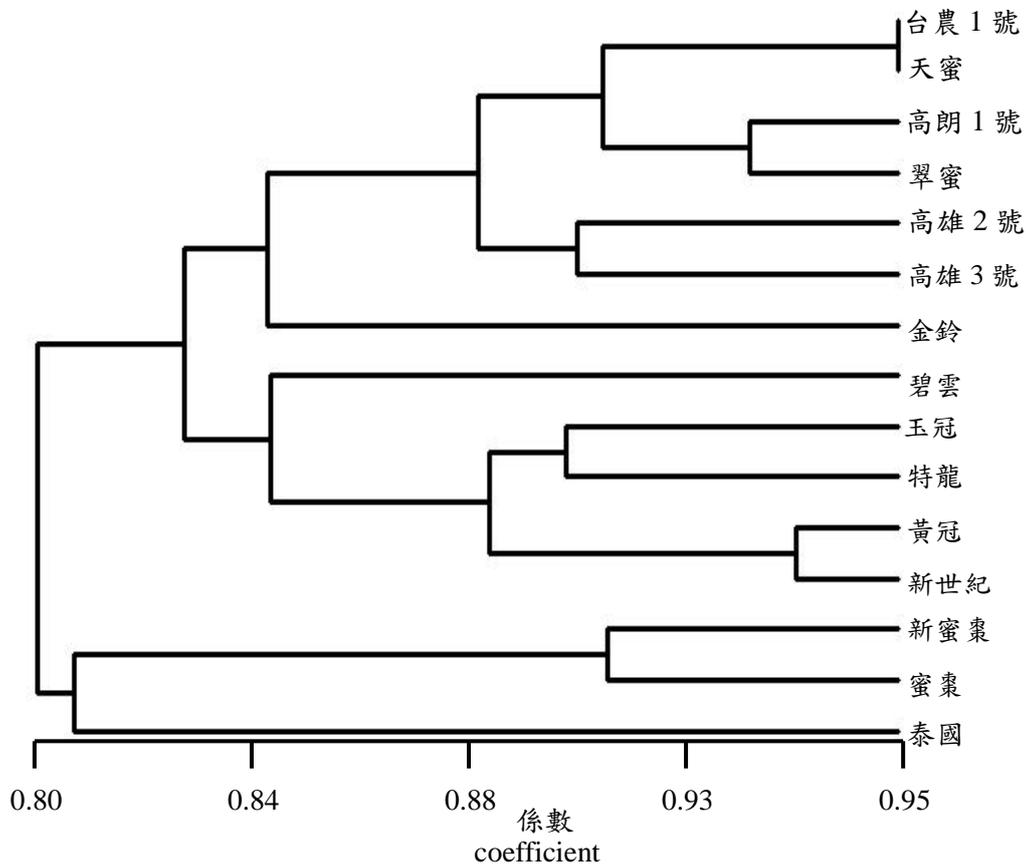


圖3. 15個印度棗品種之ISSR全部增殖DNA片段分析所得相似度矩陣經UPGMA群叢分析後建立之相似度樹狀圖

Fig. 3. Dendrogram of 15 Indian jujube cultivars generated by UPGMA cluster analysis based on the similarity matrix of ISSR total amplified DNA fragments.

四、ISSR多形性條帶分析

經群叢分析製成相似度樹狀圖如圖48所示。由樹狀圖中(圖4)發現15個印度棗品種可區分成I、II兩群，第I群包含13個品種，第II群則為'蜜棗'和'新蜜棗'兩品種。

兩品種間之相似度方面，以'黃冠'與'新世紀'之相似度高達0.91為最高，其次分別為'台農1號'與'高朗1號'之相似度為0.843，'高雄3號'與'特龍'之相似度為0.812，'蜜棗'與'新蜜棗'之相似度為0.788，其餘組合皆小於0.75。所求得之平均相似度係數為0.656。其分析結果與總條帶分析差距甚大。

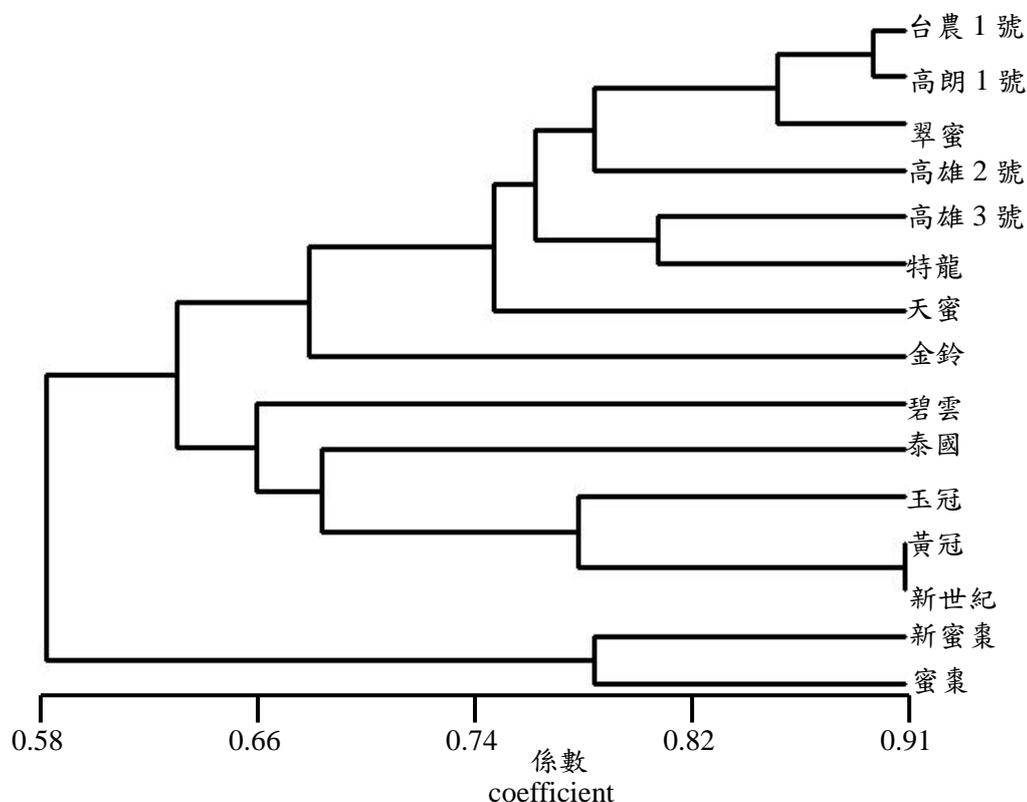


圖4. 15個印度棗品種之ISSR多型性標誌相似度矩陣UPGMA群叢分析後建立之相似度樹狀圖

Fig. 4. Dendrogram of 15 Indian jujube cultivars generated by UPGMA cluster analysis based on the similarity matrix of ISSR polymorphic markers similarity matrix.

討 論

一、RAPD 條帶分析

在 RAPD 總條帶分析方面，第 I 群的 12 個品種中，'台農 1 號'、'高雄 3 號'、'翠蜜'這 3 個品種為'高朗 1 號'的芽條突變。而'高雄 2 號'、'蜜棗'、'碧雲'及'天蜜'這 4 個品種則是從'高朗 1 號'的實生苗中選育而來。另外'玉冠'及'新世紀'雖不知道其父母本，但其性狀與'高朗 1 號'相類似。'黃冠'為 1989 年由阿蓮鄉果農所選育之晚熟品種，但並不知道其親本來源。而'特龍'則是由'泰國蜜棗'的實生苗選拔而來。在第 I 群的 12 個品種中，'高朗 1 號'、'天蜜'、'翠蜜'、'碧雲'、'玉冠'、'特龍'以及'新世紀'這七個品種果實皆是屬於橢圓形。其他分別為'台農 1 號'果實屬於扁長四方形、'高雄 2 號'果實屬於長扁圓形、'高雄 3 號'果實屬於圓錐形、

'黃冠'果實屬於扁圓形、'蜜棗'果實屬於桃子形。其他三個品種則個別獨立，分別為'泰國'和'金鈴'為引進品種，'新蜜棗'則尚無任何參考文獻可供參考。以 RAPD 分析並無法區分印度棗果實屬於早生、中生、中晚生或是晚生品種；果實屬於大果、中果或是小果；葉形是屬於橢圓形、長橢圓形、卵狀披針形；以及刺的多寡及軟硬。如同 Transue(1994)等人無法以形態特性區分莧屬(*Amaranthus*)中的 *A. caudatus* L.、*A. cruentus* L.和 *A. hypochondriacus* L.三種中的 29 個品系。在第 I 群的 12 個品種中，'台農 1 號'、'高雄 3 號'、'翠蜜'這三個品種為'高朗 1 號'的芽條突變。'高雄 2 號'、'蜜棗'、'黃冠'、'碧雲'、'天蜜'這五個品種為'高朗 1 號'實生苗選拔而來。'玉冠'、'特龍'、'新世紀'這三個品種的特性與'高朗 1 號'相類似。以 RAPD 技術分析確實能鑑定果樹品種的親緣關係。

二、ISSR 條帶分析

ISSR 總條帶分析與 ISSR 多型性條帶分析結果明顯不同。這是由於 ISSR 分析結果其單型性條帶較多，因此加入單型性條帶分析，造成分群結果差異很大。以 ISSR 總條帶分析能清楚分群。

三、RAPD 條帶分析與 ISSR 條帶分析

RAPD 多型性條帶與總條帶數的比值為 0.741，ISSR 多型性條帶與總條帶數的比值為 0.63。以多型性與總條帶數的比值來判斷，比值愈高，其分辨品種間差異之效率愈高。以 RAPD 與 ISSR 來分析印度棗品種間之遺傳歧異度的結果來看，ISSR 所產生的多型性條帶較少，而 RAPD 的分析果較符合已知之印度棗品種間親緣關係。

綜合以上分析結果以及已知之親緣資料，可確定'台農 1 號'、'高朗 1 號'、'碧雲'、'天蜜'、'翠蜜'、'黃冠'、'蜜棗'、'玉冠'、'新世紀'、'特龍'、'高雄 2 號'、'高雄 3 號'等 11 個栽培品種是屬於相似度較接近的一群。'泰國'及'金鈴'由國外引進，而'新蜜棗'為新品種。

參 考 文 獻

- 張麗華。1994。印度棗品種之輪替。農業世界。211:35-36。
- Archak, A., J. L. Karihall, and A. Jain. 2002. RAPD markers reveal narrowing genetic base of Indian tomato cultivars. *Curr. Sci.* 82(9,10):1139-1147.
- Blair, M. W., O. Panaud, and S. R. Mocouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98:780-792.
- Hormaza, J. I. 1999. Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. *Sci. Hort.* 79:121-126.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* 76:5269-5273.

- Pillay, M., E. Ogundiwin, D. C. Nwakanma, G. Ude and A. Tenkouano. 2001. Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 102:965-970.
- Prevost, A. and M. J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
- Transue, D. K., D. J. Fairbanks, L. R. Robison and W. R. Andersen. 1994. Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. *Crop Sci.* 34(5):1385-1389.
- Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH* 10:186-191.
- Rafalski, J. A. and S. V. Tingey. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding : RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9(8):275-280.
- Ronning, C. M., R. J. Schnell and S. Gazit. 1995. Using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify *Annona* cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(5):726-729.
- Shirkot, P., D. R. Sharma and T. Mohapatra. 2002. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* by RAPD markers. *Sci. Hort.* 94:33-39.

Assessment of Genetic Diversity among Indian Jujube (*Zizyphus mauritiana* Lam.) Cultivars by RAPD and ISSR Markers.

Hui-Shan Su ¹⁾ Ching-Cheng Chen ²⁾

Key words: Indian jujube, molecular makers.

Summary

The genetic diversity among 15 Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lam.) cultivars were analyzed by RAPD and ISSR makers, generated by 28 RAPD primers and 16 ISSR primers. A total of 286 markers were scored by using the 28 RAPD primers and a total of 150 ISSR markers were scored by using the 16 ISSR primers. UPGMA analysis was performed and dendrograms were constructed. The similarity coefficients based on RAPD total amplified DNA fragments were between 0.68 and 0.95. The similarity coefficients based on RAPD total amplified DNA fragments were between 0.42 and 0.92. The similarity coefficients based on RAPD polymorphic markers were between 0.80 and 0.97. The similarity coefficients based on ISSR total amplified DNA fragments were between 0.58 and 0.91.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.