

以 ISSR 技術分析青蔥品種(系)之親源關係

劉兆烘¹⁾ 顏永福²⁾ 張武男³⁾ 曾夢蛟⁴⁾

關鍵字：青蔥、ISSR 分子標誌、親源關係

摘要：本研究自 100 個引子中篩選出 19 個引子，在供試的六個青蔥品種(系)間，總計擴增出 91 條多型性條帶，每個引子可產生 2 至 11 條的多型性條帶，平均每個引子可得到 4.8 條條帶，條帶大小介於 105~3265bp 之間。連鎖群分析的結果顯示六種青蔥品種(系)之相似性係數介於 0.95 與 0.87 之間。以 UPGMA 程式進行相似性的群體分析，顯示六個青蔥品種可概分為二大群組：'新莊'、'蘭陽 1 號'、'蘭陽 3 號'、'新竹 821'、'桃園 3 號'屬於第一群，'新竹'為第二群。在第一群中又可細分為三亞群：第一亞群為'新莊'與'蘭陽 1 號'，第二亞群為'蘭陽 3 號'與'新竹 821'，第三亞群為'桃園 3 號'。以 ISSR-PCR 技術分析'蘭陽 3 號'品種實生苗之 60 個種子的後裔苗株，顯示，在 60 個種子中有 60% (36/60)的種子相似性係數值在 1.00，72% (43/60)的種子相似性係數值在 0.97 以上。此結果顯示自然授粉之'蘭陽 3 號'種子，其種子遺傳型質是很純正。

前 言

青蔥(*Allium fistulosum* L.)在台灣經長期育種和農民選拔馴化的結果，品種非常混雜，僅由外觀實不易鑑別相互的親緣關係。為持續選育青蔥新品種和改良品質，品種的親緣關係確有必要先予瞭解。分子標誌能夠反映植物在遺傳物質 DNA 層次上的差異，近十年來技術的進步迅速，儼然成為植物遺傳育種的新顯學。它被廣泛應用於作物品種鑑定、親緣關係鑑定及遺傳變異分析上，且效果十分顯著，如以聚合酶連鎖反應為基礎(PCR-based)

-
- 1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
 - 2) 國立嘉義大學生物農業科技學系教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系兼任教授。
 - 4) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

的核酸隨機增殖多型性(RAPD)分析，及增殖片段長度多型性(AFLP)分析等技術，均已成功的應用於許多作物族群歧異度和遺傳分化的分析。

簡單重複序列間之 DNA 片段(Inter-simple sequence repeat,ISSR)，因係以簡單序列重複(Simple sequence repeat,SSR)原理為基礎所延伸的技術，因而可以分析微衛星基因座間之區域變異，且具有較高的靈敏度，在近緣物種分類的研究，比 RAPD 能提供更多資訊，使其很適合在種原之鑑定及親緣關係方面的應用，成為目前分子標誌技術的熱點(Zietkiewicz *et al.*, 1994；Lai *et al.*, 2001)。分子標誌在一定層級上能有效地達到鑑別之目的，理想的分標誌應具備費用低、具有高度變異性、分析簡便、快速、易於實現自動化等條件，ISSR 即具如是的特性，也適合用於探討作物種原之遺傳變異及親緣關係。青蔥(*A. fistulosum* L.)之外表型易受環境、病毒病及栽培管理所影響，品種間常有混雜的情形，致使青蔥之鑑別不易。本研究係利用 ISSR 分子標誌，分析四季蔥同種內與品種間的族群歧異度和親緣關係，俾供為四季蔥採種之依據，使四季蔥栽培能由現行的分株繁殖轉為種子繁殖，以解決無性繁殖速率低和病毒傳播等問題。本研究同時探討 ISSR-PCR 技術應用在鑑定青蔥種子純度的可行性。

材料及方法

一、青蔥品種材料

本研究供試的青蔥品種(系)，北蔥採用'新莊'(Hsin Chuang)及'蘭陽 3 號'(Lan Yang No.3)二品種(系)；四季蔥採用'蘭陽 1 號'(Lan Yang No.1)、'桃園 3 號'(Tao Yuan No.3)、'新竹 821'(Hsin Chu 821)及'新竹'(Hsin Chu)等四品種(系)。「蘭陽 1 號」及「蘭陽 3 號」為行政院農業委員會花蓮區農業改良場育成之品種。「新莊」、「桃園 3 號」、「新竹 821」及「新竹」則為行政院農業委員會桃園區農業改良場所選育或收集之地方品系。

二、DNA 之萃取與定量：

1. 總 DNA 之萃取

使用 Qiagen 公司生產之 MiNi Kit 植物 DNA 萃取套組(Dnease Plant MiNi Kit(250)Cat.No.69106)，依 Qiagen 公司所建議的方法進行總 DNA 萃取。

取 0.1 克新鮮葉片置於研鉢，加入液態氮，快速研磨成細粉。加入 AP1 buffer(萃取套組內附試劑) 400 μ l 到研鉢內，充分混合後置於 1.5 ml 離心管，再加入 Rnase A 2 μ l。於 65 $^{\circ}$ C 乾浴 10 分鐘後，加入 AP2 buffer(萃取套組內附試劑)130 μ l，充分混合後，冰浴 5 分鐘。倒入過濾管組(由 QIA shredder spin column 及 2 ml-collection tubes 組成)，以 8,000 rpm 離心(Beckman coulter TMAllegra TM21R centrifuge 離心機)2 分鐘。將濾液放入新的 1.5 ml 離心管，並測量其體積。加入 0.5 倍濾液體積之 AP3 buffer(萃取套組內附試劑)及 1 倍濾液體積之 95%酒精，充分混合。取 650 μ l 混合放入過濾管組(由 Dneasy mini spin column

及 2 ml collection tubes 組成)，以 8,000rpm 離心 1 分鐘。把 Dneasy mini spin column 移到新的 2 ml collection tubes 上，加 AW buffer(萃取套組內附試劑)500 μ l，充分混合後，以 8,000rpm 離心 2 分鐘。再將 Dneasy mini spin column 移到新的 1.5 ml 離心管上，加入 AE buffer(萃取套組內附試劑)100 μ l，於 58 $^{\circ}$ C 乾浴 5 分鐘，以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，即得總 DNA。

2. DNA 之定量

以核酸計算機(Pharmacia Biotech, Gene Quant II)測 DNA 濃度，再用殺菌過之超純水定量成 500ng/ μ l 備用。

3. DNA 之品質測試

測試每個樣本模板 DNA(Template)之品質，直接以 genomic DNA 進行電泳分析。

三、ISSR 分析

使用的核酸引子為 University of British Columbia 設計之 UBC SSR primer oligonucleotide Set #9，本組核酸引子共有 100 種，編號 UBC801-900，其序列結構主要為 2-5 個核苷酸的重複序列，重複 4-8 次，引子長度為 17-22 個核苷酸。

PCR 反應液參照前人研究 (陳等, 1994; Orad 與 Dronavalli, 1992; Yamagishi *et al.*, 2002) 再加以修改。將 PCR 反應液置於 0.2ml 的離心管中，並加入礦物油 (AMRESCO mineral oil)，於 4 $^{\circ}$ C 下以 7,500rpm 離心後，再置於 Gradient PCR 反應儀 (HYBAID PXII) 中進行 PCR 反應。

PCR 之反應液總體積為 12.5 μ l，內含 1X PCR buffer (protech technology)、0.1 mM dNTP (protech technology)、0.2 μ M primer、0.5 units Taq DNA polymerase (protech technology) 及 20ng/ μ l Template DNA。置於 PCR 反應儀(HYBAID)中進行反應，反應溫度條件設定為：94 $^{\circ}$ C，4 分鐘；94 $^{\circ}$ C，1 分鐘；48 $^{\circ}$ C，1 分鐘；72 $^{\circ}$ C，2 分鐘，循環 38 次；72 $^{\circ}$ C，7 分鐘。

電泳膠片製作：以 1.5 % agarose(AMRESCO 公司生產之 agarose SFRTM)溶解於 25ML 之 1X TBE buffer(89Mm Tris; 89Mm Boric acid; 2mM EDTA)後倒入模型中製成電泳膠片。

電泳分離不同大小之 DNA 分段後，以溴化乙錠(0.5 ug/ml ethidium bromide)染色 10 分鐘後，超純水退染 15 分鐘，置於 SYNGENE 公司的螢光、冷光照相儀中，並用 GenSnap 軟體讀取圖譜。

四、ISSR 標誌群叢分析

群叢分析(cluster analysis)則依據未加權平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA. Sneath and Sokal, 1973)，並以 NT-SYS(Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System)軟體計算其相似性。先分別計算兩品種的 ISSR 分析所得的條帶數及兩品種間所共有的條帶數，再將數值帶入 ISSR 遺傳相似性公式計算 (Nei and Li, 1979)：

$$\text{ISSR 遺傳相似性計算公式：} S = \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y}$$

S : 兩品種間的相似性係數(similarity)

N_{xy} : x 與 y 兩品種的共有條帶數

N_x : x 品種的條帶數

N_y : y 品種的條帶數

DNA 條帶圖譜的建立：依據 Wilde 等人 (1992) 使用之方法，以每一條帶的出現為一個特徵(character)，有條帶出現以「1」代表，無條帶出現以「0」代表，以此建立 DNA 條帶圖譜。以求得兩品種間的遺傳相似性係數，並以此類推求得本試驗的 4 個品種兩兩間的遺傳相似性係數半矩陣，再以 NT-SYS 軟體進行 UPGMA 群叢分析，求得各品種間的 ISSR 標誌之親緣關係樹狀圖。

結 果

一、逢機引子之篩選

試驗使用 ISSR Prime Set #9(UBC)共 100 個逢機核酸引子先以'蘭陽 1 號'四季葱為樣本進行有效引子之初步篩選，重複 2 次且均出現條帶者才列入紀錄，以確定其穩定性，結果其中共有 30 個 Prime 可對'蘭陽 1 號'四季葱增幅出數條條帶，比率數為 30%；其餘 70 個引子只產生單一條帶。利用此 30 個具有引子進行六個參試品種(系)之 ISSR-PCR 反應。

二、ISSR 分析

1. ISSR 分析 6 個青蔥品種(系)

初部篩選可獲得清晰條帶的 30 個引子中，有 19 個引子的條帶再現性的穩定性較高(UBC-807、UBC-808、UBC-809、UBC-810、UBC-814、UBC-828、UBC-829、UBC-834、UBC-836、UBC-844、UBC-845、UBC-848、UBC-855、UBC-857、UBC-859、UBC-864、UBC-867、UBC-873、UBC-881)，比例為 19.0%。以此 19 個引子進行 ISSR-PCR 分析 6 個青蔥品種(系)，總計擴增出 91 個多型性條帶，平均每個引子可產生 4.8 個多型性條帶，以 UBC-809、UBC-814 及 UBC-844 引子所得 2 條條帶最少，及 UBC-845 引子所得 13 條條帶最多，條帶大小範圍介於 105bp(UBC-807)~3265bp(UBC-881)之間(表 1)。

六個青蔥品種(系)以 19 組引子經 ISSR-PCR 反應後，將所得的多型性片段分別計算兩樣品種間的相似性係數，所得的相似性矩陣(similarity matrix)之結果顯示，在六個青蔥品種(系)之相似性係數值介於 0.95 與 0.87 之間；相似性係數值最高者，存在於'新莊'與'蘭陽 1 號'兩個品種間；相似性係數值最低者，存在於'新竹'與'新莊'兩個品種之間。將四個樣品經兩兩分析後的遺傳相似性係數，以 NTSYS 電腦軟體所提供的 UPGMA 程式進行群體分析，繪製成六個青蔥品種(系)的群體樹狀圖樣(圖 1)。由樹狀圖的結果顯示，六個青蔥品種(系)具有高遺傳相似性，可概分為二大群：'新莊'、'蘭陽 1 號'、'蘭陽 3 號'、'新竹 821'、'桃園 3 號'屬於第一群，連鎖距離為 0.913；'新竹'為第二群，與第一群之連鎖距離為 0.87。在第一群中又可細分為三亞群：第一亞群為'新莊'與'蘭陽 1 號'，連鎖距離為 0.95；第二亞

表1. 六個青蔥品種(系)間具有多型性條帶的19組ISSR引子及產生的總DNA數目

Table 1. Numbers of total DNA bands detected upon 19 ISSR markers analysis of six cultivars (lines) of green onion.

Primer	Size distribution of ISSR band (bp)	Total no. of ISSR band	Fragment recorded
807	100~6022	3	105bp, 950bp, 1045bp
808	100~4921	5	690bp, 850bp, 1010bp, 1535bp, 1650bp
809	837~5640	2	950bp, 1800bp
810	74~5657	4	775bp, 980bp, 1350bp, 2300bp
814	131~2577	2	1040bp, 1650bp
828	300~2500	3	1100bp, 1650bp, 2150, bp
829	331~7709	4	336bp, 690bp, 940bp, 1450bp
834	472~5393	8	480bp, 820bp, 870bp, 940bp, 1050bp, 1250bp, 1430bp, 1650bp
836	715~2256	7	730bp, 925bp, 1050bp, 1250bp, 1350bp, 1500bp, 2200bp
844	102~5258	2	580bp, 470bp
845	447~1520	13	447bp, 455bp, 552bp, 595bp, 684bp, 900bp, 925bp, 982bp, 1065bp, 1180bp, 1310bp, 1350bp, 1450bp
848	417~2840	3	1050bp, 1350bp, 1750bp
855	171~5443	3	1145bp, 1650bp, 2150bp
857	101~3765	4	1065bp, 1121bp, 14bp, 1500bp
859	437~4139	7	437bp, 550 bp, 630bp, 700bp, 925bp, 1100bp, 1430bp
864	375~1013	2	874bp, 950bp
867	474~3186	7	490bp, 960bp, 1350bp, 1650bp, 1950bp, 2190bp, 2214bp
873	800~4500	4	1550bp, 1850bp, 2200bp, 3150bp,
881	66~3280	8	520bp, 890bp, 1045bp, 1540bp, 1650bp, 2480bp, 2950bp, 3265bp
Total	—	91	—
Averag	—	4.8	—

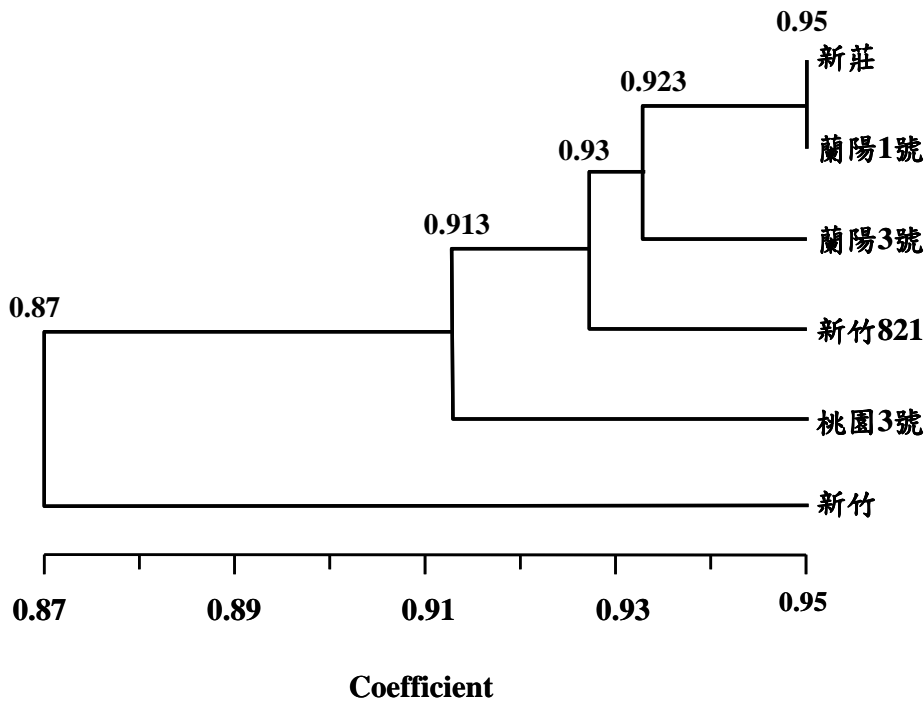


圖 1. 六種青蔥品種(系)間 ISSR 親源性樹狀圖

Fig. 1. Dendrogram of ISSR analysis six cultivars of green onion, constructed by UPGMA analysis based on Dice's similarity coefficients.

群為'蘭陽3號'與'新竹821'，與第一亞群之連鎖距離為0.93，第三亞群為'桃園3號'，與第二亞群之連鎖距離為0.913。

2. ISSR 分析'蘭陽3號'品種之種子

以初部篩選可獲得清晰條帶的30個引子進行ISSR-PCR分析'蘭陽3號'品種實生苗之60個種子的後裔苗株，總計可擴增出38個條帶，每個引子平均產生1.27個條帶，條帶大小範圍介於240bp(UBC-886)~2180bp(UBC-828)之間，以UBC-808、UBC-809、UBC-810、UBC-815、UBC-828、UBC-834、UBC-836、UBC-841、UBC-848、UBC-856、UBC-864、UBC-873、UBC-876、UBC-886等14個引子所產生之多型性條帶訊號較強，比例佔46.7%，並以UBC-841及UBC-864引子所得1條條帶最少，及UBC-886引子所得7條條帶最多，14個引子每一引子平均可得2.7條多型性條帶(表2)。

'蘭陽3號'品種實生苗之60個種子的苗株DNA以14組引子經ISSR-PCR反應後，將

所得的多型性片段分別計算兩樣品種間的相似性係數，所得的相似性矩陣(similarity matrix)之結果顯示，在 60 個種子的苗株之相似性係數值介於 1.00 與 0.87 之間(圖 2)。有 60% (36/60) 的種子相似性係數值在 1.00，72% (43/60)的種子相似性係數值在 0.97 以上。此結果顯示自然授粉之'蘭陽 3 號'種子，其種子遺傳型質是很接近的。

表2. '蘭陽3號'品種實生苗之60個種子的苗株間具有多型性條帶的14組ISSR引子及產生的總DNA數目

Table 2. Numbers of total DNA bands detected upon 14 ISSR markers analysis of 60 progeny of 'Lan Yang No.3' green onion.

Primer	Size distribution of ISSR band (bp)	Total no. of ISSR band	Fragment recorded
808	640~4547	3	650bp, 1040bp, 1580bp
809	739~3064	2	1010bp, 1620bp
810	399~4930	2	985bp, 1320bp
815	541~5145	2	1410bp, 1720bp
828	974~9119	3	1000bp, 1435bp, 2180bp
834	477~4731	3	1050bp, 1440bp, 1630bp
836	475~4054	4	740bp, 1110bp, 1380bp, 1650bp
841	755~5189	1	758bp
848	458~3825	4	475bp, 855bp, 990bp, 2140bp
856	548~4746	2	720bp, 1420bp
864	138~3622	1	1170bp
873	268~4919	2	560bp, 1095bp
876	375~3826	2	380bp, 800bp
886	85~3865	7	240bp, 290bp, 480bp, 570bp, 670bp, 870bp, 1100bp
Total	—	38	—
Average	—	2.7	—

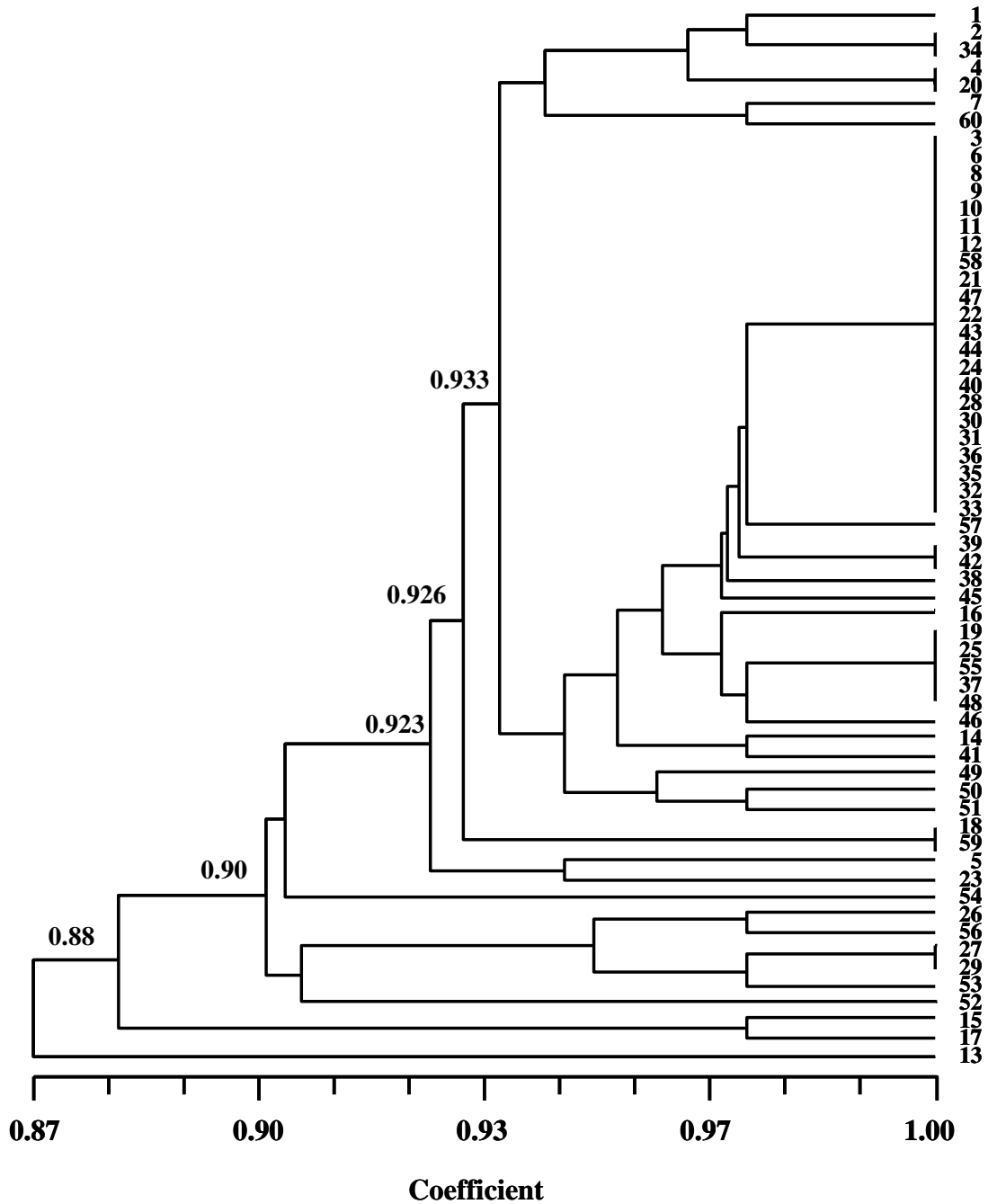


圖 2. 六十個自然授粉之'蘭陽 3 號'品種實生苗種子的苗株葉片 DNA，經過 ISSR 分析之親源性樹狀圖

Fig. 2. Dendrogram of ISSR analysis 60 progeny of 'Lan Yang No.3' green onion, constructed by UPGMA analysis based on Dice's similarity coefficients.

討 論

本研究初步自 100 個引子中篩選出 30 個引子，並採用其中顯像較好的 19 個引子，總計擴增出 91 條多型性條帶，每個引子可產生 2 至 11 條的多型性條帶，平均每個引子可得到 4.8 條條帶，條帶大小介於 105~3265 bp 之間。顯示 ISSR 有很高的分析效率，此與學者指出微衛星廣泛分佈在真核生物的染色體組中，且由相同單元組成的 SSR 能出現在親緣較遠之群族間，因此 ISSR 引子能有較高之多型性比例(Fang and Roose, 1997; Esselman *et al.*, 1999)之結果相一致。

在 ISSR-PCR 之親緣性關係分析之結果顯示除了'新竹'四季葱(相似性係數 0.87)外，其他五個青蔥品種(系)之相似性係數值介於 0.95 與 0.92 之間，顯示供試的六個青蔥品種(系)的遺傳背景極為相似。楊 (2004) 以 RAPD 技術分析'宜蘭 2 號'、'蘭陽 1 號'、'新莊'與'福葱'等四個青蔥品種(系)的親緣性，顯示四個青蔥品種(系)之相似性係數介於 0.78 與 0.65 之間。本研究之青蔥品種(系)之親緣性相似性係數，顯然高於楊(2004)之研究。此可能是因為 ISSR 的靈敏度遠高於 RAPD，主因 ISSR 引子序列較長，煉合時使用較高的溫度，致使條帶再現性、靈敏度及專一性都較佳 (Tsumura *et al.*, 1996; Nagaoka and Ogihara, 1997; Qian *et al.*, 2001)。Lai 等(2001)利用 RAPD 與 ISSR 技術分析台灣地區引進的品種、雜交育成的品種和台灣的野生茶樹共 37 個樣本，比較兩種技術之相似度矩陣，也顯示 ISSR 技術具有較高之靈敏度，且較適用於近緣分類群之研究。本研究無法將屬於北蔥的'新莊'、'蘭陽 1 號'與屬於四季蔥的'蘭陽 1 號'、'新竹 821'、'新竹'、'桃園 3 號'給與分群區別。此可能所用的 ISSR-PCR 技術的靈敏度尚無法將北蔥及四季蔥的遺傳差異加以區分。但也反應出北蔥及四季蔥的遺傳差異是很小的，即使其在植株外表形態及生長習性有明顯的不同。此有待更進一步採用更靈敏的技術，來求證北蔥及四季蔥的遺傳形質的差異。

即使在如此狹窄的遺傳背景差異，本研究將六個青蔥品種(系)概分為二大群：'新莊'、'蘭陽 1 號'、'蘭陽 3 號'、'新竹 821'、'桃園 3 號'屬於第一群；'新竹'為第二群。在第一群中又可細分為三亞群：第一亞群為'新莊'與'蘭陽 1 號'；第二亞群為'蘭陽 3 號'與'新竹 821'，第三亞群為'桃園 3 號'。此資訊將可供作鑑別、育種及改進台灣青蔥產業的重要遺傳資料的依據。

本研究同時以 ISSR-PCR 技術分析'蘭陽 3 號'品種實生苗之 60 個種子的後裔苗株，分析結果顯示，在 60 個種子中有 60% (36/60)的種子相似性係數值在 1.00，72% (43/60)的種子相似性係數值在 0.97 以上。此結果顯示自然授粉之'蘭陽 3 號'種子，其種子遺傳型質是很純正。也顯示 ISSR-PCR 技術分析種源的遺傳歧異度是很值的信賴的。有少數種子的遺傳相似度較小，此是自然授粉所造成的基因污染或是 PCR 分析時的誤判所造成的，有待進一步測試更多的多型性標誌，或許可揭露其原因。

參 考 文 獻

- 楊宏瑛、曾夢蛟、張武男。2004。利用逢機增幅多型性核酸技術分析青蔥品種(系)耐熱與親源關係。植物種苗 6 (4): 79-94。
- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D. J. Crawford, J. L. Winduss, and A. D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecol.* 8: 443-451.
- Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408-417.
- Lai, J. A., W. C. Yang and J.Y. Hsiao. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR makers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42: 93-100.
- Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 597-602.
- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269-5273.
- Qian, W., S. Ge and D. Y. Hong. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 102: 440-449.
- Tsumura, Y., K. Ohba and S. H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92: 40-45.
- Wilde, I., R. Waugh and W. Powell. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 871-877.
- Zietkiewicz, E. A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Analysis of Genetic Relationship among Green Onion (*Allium fistulosum* L.) Cultivars (Lines) Discriminated by ISSR Markers

Chao-Hong Liu¹⁾ Yung-Fu Yen¹⁾ Woo-Nang Chang²⁾ Menq-Jiau Tseng³⁾

Key words: Green onion, ISSR molecular markers, Genetic relationship

Summary

The purposes of this study were to use ISSR-PCR to analyze the genetic relationships among six Green Onion cultivars (lines) ('Hsin Chuang' and 'Lan Yang No.3' Pei Tsung, and 'Lan Yang No.1', 'Tao Yuan No.3', 'Hsin Chu 821', and 'Hsin Chu' Szu Chi Tsung), and to investigate the feasibility of applying ISSR-PCR on evaluating seed purity of Green Onions. In this study, 19 primers were selected from 100 primers. Among the six Green Onion cultivars (lines), a total of 91 polymorphic bands were amplified. Each primer can produce 2 to 11 polymorphic bands. On average, 4.8 polymorphic bands were amplified from each band. The size of the bands ranges between 105 and 3,265 bp. ISSR-PCR was used to analyze genetic relationships among six Green Onion cultivar (lines). The results show that the coefficients of similarity were between 0.95 and 0.87. These six cultivars (lines) can be separated into two groups according to their genetic relationships — 'Hsin Chuang', 'Lan Yang No.1', 'Lan Yang No.3', 'Hsin Chu 821', and 'Tao Yuan No.3' in one group, and 'Hsin Chu' in the second group. The first group can then be further separated into three sub-groups: 1) 'Hsin Chuang' and 'Lan Yang No.1'; 2) 'Lan Yang No.3' and 'Hsin Chu 821'; 3) 'Tao Yuan No.3'. Using ISSR-PCR to analyze 60 progenies of 'Lan Yang No.3' generating from seeds, we found that among the 60 seeds, 60% had a coefficient of similarity of 1.00, and 72% of the seeds had a coefficient of similarity higher than 0.97. This indicates that the open pollination seeds of 'Lan Yang No.3' have a high genetic purity.

1) Graduate student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University .

2) Professor, Department of Bioagricultural Science, National Chiayi University.

3) Adjunct Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

