

臺灣黑山羊粒線體DNA D環區序列比較⁽¹⁾

莊璧華⁽²⁾ 陳佳萱⁽³⁾ 王勝德⁽⁴⁾ 楊深玄⁽⁴⁾ 黃政齊⁽⁴⁾ 蘇安國⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：100 年 11 月 29 日；接受日期：101 年 3 月 23 日

摘要

本試驗旨在分析臺灣黑山羊花蓮品系(Hua)及恆春品系(KT)粒線體DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 中D-loop (1,212 bp) 序列之比對結果。結果顯示此兩群山羊D-loop序列中，腺嘌呤(A)+胸腺嘧啶(T)之比例為 60.2 – 60.4%，其DNA鹼基中呈現腺嘌呤與胸腺嘧啶總合較多的現象。臺灣黑山羊花蓮及恆春品系D-loop各具有10種及3種單套型(haplotype)。序列共有15處變異點，分別位於447、451、468、470、483、490、500、520、548、610、632、802、1005、1055及1141 bp。其中A/G轉換有7處，T/C轉換有8處。兩族群之單倍體基因多樣性指數(hd)、核苷酸多樣性指數(nucleotide diversity, π)及Tajima's D值，分別呈現高的hd值，低的 π 值及D<0。推測族群可能過去曾遭遇數量大量減少後，再急遽的擴充族群數量。遺傳分化指數(Fst)為 0.37715，基因流傳值(Nm)為 0.41，顯示兩族群間交流程度低。推測可能是由於最初引種時，羊隻在台灣地理上之區隔與後續人為選育計畫上之差異。

關鍵詞：臺灣黑山羊、粒線體基因、D環區。

緒言

臺灣養羊歷史可遠溯於 17 世紀(張, 1984)，係由先民自廣東、福建等中國大陸沿海地區引進(黃等, 1993；施等, 1996；謝等, 1997；Gall, 1983)，早期的記錄中顯示，農民普遍飼養的是黑色的山羊(陳, 1972)，其特徵為全身披覆黑色或黑褐色毛皮、體型中等。經過百年來的演化及適應，黑山羊已儼然成為臺灣本地品種之一。由於肉質鮮美，廣為國人所喜愛。惟因體型較小，在經濟因素考量下，大部分業者引進大型國外羊種進行雜交，致使原臺灣黑山羊之生存空間和數量銳減。有鑑於臺灣黑山羊可能面臨滅絕之危機，行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所及花蓮種畜繁殖場於 1986~1987 年間，分別自臺灣西部及東部農家蒐購具臺灣黑山羊外表特徵之羊群，於兩地

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1755 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(5) 通訊作者，E-mail: aksu@mail.thri.gov.tw。

進行黑山羊保種及研究工作。兩羊群均呈封閉狀態已達 20 年以上，為瞭解此兩群臺灣黑山羊基因之多樣性及差異性，本試驗利用山羊粒線體基因 (mitochondrial DNA，以下簡稱 mtDNA) D 環區 (D-loop) 進行族群之分析與探討。

粒線體是真核細胞生物能量轉換之細胞器，大多數細胞中都有上百個以上的粒線體，但只有一組粒線體基因位於粒線體基質 (mitochondria matrix) 中。mtDNA 可自行複製，並可經由卵細胞遺傳給子代，故可視為母系遺傳物質之一。哺乳動物 mtDNA 結構為封閉的環狀雙股 DNA，序列具高度同源性且大小相近，約有 16.6 kb (Taanman, 1999)。部分物種如人類及牛隻之 mtDNA 序列已全部被定序出來，包含 13 個 protein-coding 基因、2 個 rRNA (12S 及 16S)、22 個 tRNA 基因和一段控制區 (Displacement loop, D-loop) (Anderson *et al.*, 1982)。資料顯示，由於 mtDNA 裸露於自由基中，容易受到氧化還原反應的影響而發生突變，再加上 mtDNA 在複製時，參與的聚合酵素並不具修補能力之特性，因此易有核苷酸誤植與缺損 (黃, 2008)。mtDNA 之長度比其他 DNA 相對較小，核苷酸變異速度比體染色體 DNA 快，長期複製下來，造成 mtDNA 具有演化快速、種間差異大、族群內穩定性高、具母系遺傳等特性 (洪等, 2001; Brown *et al.*, 1979; Taanman, 1999)，藉由 mtDNA 之基因變化資料，可以探討動物不同種或族群間之歧異度、親緣關係及物種演化上的關聯性。

mtDNA D 環區功能為 mtDNA 複製及轉錄時，主要的調控區域 (regulatory region) (Taanman, 1999)。D-loop 的變異較高，最容易發生插入及缺失。近年來，有許多物種對 D-loop 基因進行不同品系間基因多樣性、親緣關係、演化關係之探討，如牛 (Jia *et al.*, 2007)、綿羊 (Pedrosa *et al.*, 2005) 及大陸山羊 (Liu *et al.*, 2006)。因此本試驗擬利用粒線體基因 D 環區序列之差異，比較已兩地分隔近 20 年之台灣黑山羊族群親緣關係。

材料與方法

I. 試驗材料：

花蓮種畜繁殖場在養之臺灣黑山羊保種族群，依母羊系譜資料將羊群分為 10 個家族，選擇不同家族共 23 頭山羊，由頸靜脈抽取血液 3 – 4 mL。恆春分所臺灣黑山羊逢機採血 15 頭。

II. 試驗方法：

- (i) DNA 純化：利用 QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen) 萃取試劑組，參照其使用手冊之操作流程抽取 genomic DNA，並冷凍保存於 -20°C 備用。
- (ii) D-loop 引子設計：參考 NCBI GenBank 所列之山羊 D-loop 區段序列 (Accession no. AF533441)，該區段序列長約 1,212 bp。利用 Dnastar 軟體 Primer Select 程式，設計不同基因片段所使用的引子 (primer) 分別為 D-loop (1) 及 D-loop (2)，引子序列、反應溫度及時間如表 1。反應時加入 0.5 µL 的 genomic DNA 及 10 pmol primers，兩組各添加 0.5 µL、0.25 µL 的 10 mM dNTP、2.5 µL 的 10x buffer、0.125 µL 的 5 U/µL *Taq* polymerase 及滅菌水，使總體積達 25 µL。將目標基因片段如表 1 所述，於 PCR 反應槽中進行大量複製。再將 PCR 最終產物 5 µL 置於 1.2% 瓊脂膠體、以 100 V 進行電泳後，將瓊脂膠體以溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 染色，置於紫外光照相系統下觀察，該等基因片段之預期產物可在不同鹼基處被發現。將此 PCR 產物寄送至商業公司處進行純化定序。

III. 統計方法：

將定序完成之序列，採用 Lasergene 套裝軟體 (Dnastar, Segman 6.1) 進行分析比對，利用 MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) 軟體進行遺傳距離、親緣關係樹及 Tajima's D 值等分析，並以 DnaSP v.5.0 (Librado and Rozas, 2009) 軟體進行單套型 (haplotype)、多態位點 (polymorphic

sites)、鹼基對替換 (transitional pairs)、單倍體基因多樣性指數 (haplotype diversity)、核苷酸多樣性指數 (nucleotide diversity, π)、遺傳分化指數 (fixation index, F_{st}) 及基因流傳值 (gene flow index, N_m) 等分析。

表 1. 引子序列及 PCR 反應條件

Table 1. Primer sequences and PCR reaction conditions

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
D-loop (1)	F	5'-GCCATAGCCTCACTATCAGCACCCAAA-3'
	R	5'-TCACGCGGCATGGTCAACAAGC-3'
		94°C, 5'→ (94°C, 45"/58°C, 45"/72°C, 50") x 35 cycles → 72°C, 8'→4°C, ∞
D-loop (2)	F	5'-ATACCCACACAAACGCCAACACC-3'
	R	5'-AACAGGAAGGCTGGGACCAA-3'
		94°C, 5'→ (94°C, 45"/54°C, 45"/72°C, 1') x 35 cycles → 72°C, 8'→4°C, ∞

R: reverse; F: forward

結果與討論

I. PCR 電泳圖

利用合成之兩組引子 D-loop (1) 與 D-loop (2)，進行 PCR 複製，所預期之反應物長度分別約 723 bp 及 1,141 bp。將 5 μ L 反應物置於瓊脂膠體電泳後，以溴化乙錠染色，再以紫外光進行激發照射，可於 700 bp 及 1000 bp markers 附近處觀察到所需之片段。

II. D-loop 基因序列分析

含有所需片段之PCR反應物，經商業公司純化定序後，將D-loop (1) 與D-loop (2) 片段序列結果，利用Lasergene套裝軟體 (Dnastar, Segman 6.1) 進行序列合併，該基因序列長度為1,212 bp，所得結果與NCBI GenBank 資料庫比對，確定其為D-loop片段。Hua及KT兩族群山羊之D-loop序列鹼基對比例、單套型、多態位點、鹼基對替換、單倍體基因多樣性指數及核苷酸多樣性指數等分析資料分列於表2。結果顯示，黑山羊之D-loop A+T比例為60.2 – 60.4%，呈現A-T rich的現象，與大部份哺乳動物如鯨魚 (Hoelze *et al.*, 1991)、水牛 (Hassan *et al.*, 2009) 相同。

表 2. 花蓮及恆春山羊 D-loop 區段序列分析結果

Table 2. Analyzed results of the D-loop region between the goat from Hua and KT

Item	Hua*	KT**
Length (bp)	1,212	1,212
T%	28.9	29.1
A%	31.3	31.3
C%	25.8	25.6
G%	14.0	14.2
Haplotype	10	3
Polymorphic sites	13	6
Transitional pairs	3	1
Haplotype diversity (hd)	0.909	0.590
Nucleotide diversity (π)	0.00301	0.00124
Tajima's D	-0.641479 #	-1.260323 #
Total Haplotype diversity (hd)		0.90469
Total Nucleotide diversity (π)		0.00294
Total Tajima's D		-0.684294
Fst		0.37715
Nm		0.41

*Hua : Taiwan native black goat in Hualien

**KT : Taiwan native black goat in Kenting

: Not significant, $P > 0.10$

兩族群之單倍體基因多樣性指數及核苷酸多樣性指數分別呈現高的hd值(0.909, 0.505)和低的 π 值(0.003, 0.001)，族群中的 π 值是衡量族群多態性及遺傳分化的重要指標之一， π 值越大表示多態性越高(Nei and Li, 1979)。本試驗結果 π 值顯示兩山羊群體的遺傳多樣性低，可能因人為及環境因素，導致族群數量減少，基因多樣性降低。而小數量族群又因採取封閉式之近親交配方式進行繁殖，更加劇遺傳多樣性的減少(李等, 2008)。Tajima's D皆呈現負值(-0.64, -1.26)，亦可佐證此兩群臺灣黑山羊族群可能過去曾經歷過(1)淨化選擇(purifying selection)(2)瓶頸效應(bottleneck)(3)族群分化(population subdivision)等變化(Tajima, 1993)。推測兩者之族群曾大量減少後，再急遽的擴充族群。

基因流動(gene flow)是促使族群內遺傳基因均勻化之力量，避免族群因遷移或天擇，而造成基因分散(genetic divergence)，透過雜交等方式，將群體間的遺傳特性相互交換(Pogson *et al.*, 1995)。為了解族群間之分化情形，利用族群間遺傳分化指數Fst，判斷族群間遺傳分化的情形，Fst值>0.25，表示族群間有高度分化；基因流傳值Nm用以表示族群間遷徙個體數，Nm值>1時，表示族群間有較強之基因交流。Nm值若大，Fst值相對變小(蕭, 2007; Slatkin, 1987)。花蓮及恆春黑山羊間之遺傳分化指數(Fst)為0.37715，表示兩族群間分化程度非常高(Fst>0.25)。Nm值為0.41(<1)，表示族群間交流程度低。推測可能是由於最初引種時，羊隻分別來自東部及西部，除了地理上之區隔外，再加上後續人為不同的選育種計畫所致。

花蓮(Hua)及恆春黑山羊(KT)兩族群之序列變異點集中於447-1141 bp間(等同於mtDNA 15876-16570 bp)，共有15處變異點，分別位於447、451、468、470、483、490、500、520、548、610、632、802、1005、1055及1141 bp。A/G轉換有7處，T/C轉換有8處(圖1)。

另將花蓮及恆春山羊族群與 NCBI 資料庫中不同品種山羊 D-loop 序列進行比對，選擇比對 8 種不同品種羊分別為 Angora goat (AGR1, China, accession no. GQ141232, 毛用)、China goat (NMC 7, accession no. DQ188877)、Hongtong milking goat (HTM1, China, accession no. GQ141242, 乳用)、Nubia goat (N1/N10, Italy, accession no. FJ571542、FJ571551, 乳肉兼用)、Sanan goat (Sanan 1/10, Italy, accession no. FJ571552、FJ571561, 乳用)、Yangcheng White goat (YCW1, China, accession no. GQ141255)。結果顯示如圖 1。與其它羊種序列比對，於 717 bp (C) 處，兩族群山羊呈現與其它品種山羊不同之單一鹼基變異點 SNP (single nucleotide polymorphism) 特徵。於 632 bp 處，僅恆春黑山羊具有 C/T (6/9 頭) 多態型。另 Angora goat、Yangcheng White goat 及 Hongtong milking goat 則於 1075 bp 處多一個鹼基 C。

III. 親緣樹關係

(i) 花蓮及恆春黑山羊之親緣關係

將花蓮 (Hua) 及恆春 (KT) 黑山羊 D-loop 基因定序資料合併，並以軟體 MEGA 4 進行基因親緣樹關係圖 (phylogenetic tree) 分析，其結果如圖 2。以 neighbor-joining 法進行的親緣關係樹建構，基因序列具有 12 個 haplotype，大致上分為 2 分枝 (clade I 及 II)，此與應用血型遺傳變異性調查，兩地區之臺灣黑山羊是不同兩群結果相符 (王等, 1995)。

(ii) 与其它山羊品種之親緣關係

本試驗之臺灣黑山羊大致上分為 2 族群，此為該兩場羊隻係於二十年前由民間收購，為了解其与其它羊種具關聯性，將臺灣黑山羊 D-loop 基因序列片段與努比亞及撒能等其它品種進行外群比對，外群基因則是由 GeneBank 所公佈之不同品種山羊中選取而得，以了解不同品種間之差異。其親緣關係結果如圖 3。結果顯示，屬肉羊品種之臺灣黑山羊與乳用及毛用品種山羊是可明顯的區分為不同之兩群。另發現花蓮場黑山羊 (3 頭) 與 NCBI 上所得大陸山羊 NMC 7 (accession no. DQ188877) 親緣關係座落於同樣的分支群中，其基因型亦完全相同。依據文獻記載台灣黑山羊係先民自廣東、福建等中國大陸沿海地區引進，惟花蓮場黑山羊是否與大陸山羊 NMC7 系屬同一來源，有待進一步追本溯源。

結論

本試驗研究結果得知，由花蓮及恆春兩個研究單位所飼養之臺灣黑山羊族群，經長期的保種繁殖後，其遺傳多樣性不論在單一族群或全體黑山羊，都呈現多樣性較低的結果。可能原因為 DNA 單套型因地型阻隔，具地區獨特性，故兩族群之分化程度高，但是族群間大多數之單套型的差異度並不大，造成多樣性較低。另由親緣關係圖可明確的分辨肉羊及乳羊品種，有助於辨識母系來源之山羊品種。未來的研究中，若能增加臺灣地區其他本地黑山羊之族群數目，及蒐集大陸地區更多羊種之樣本，將有助於了解台灣與大陸兩地山羊族群演化及分化的歷程。另亦建議擁有此兩群台灣黑山羊之研究單位，需進一步改進該兩族群之繁殖配種方式，避免因過度近親造成兩族群山羊基因多樣性之流失。

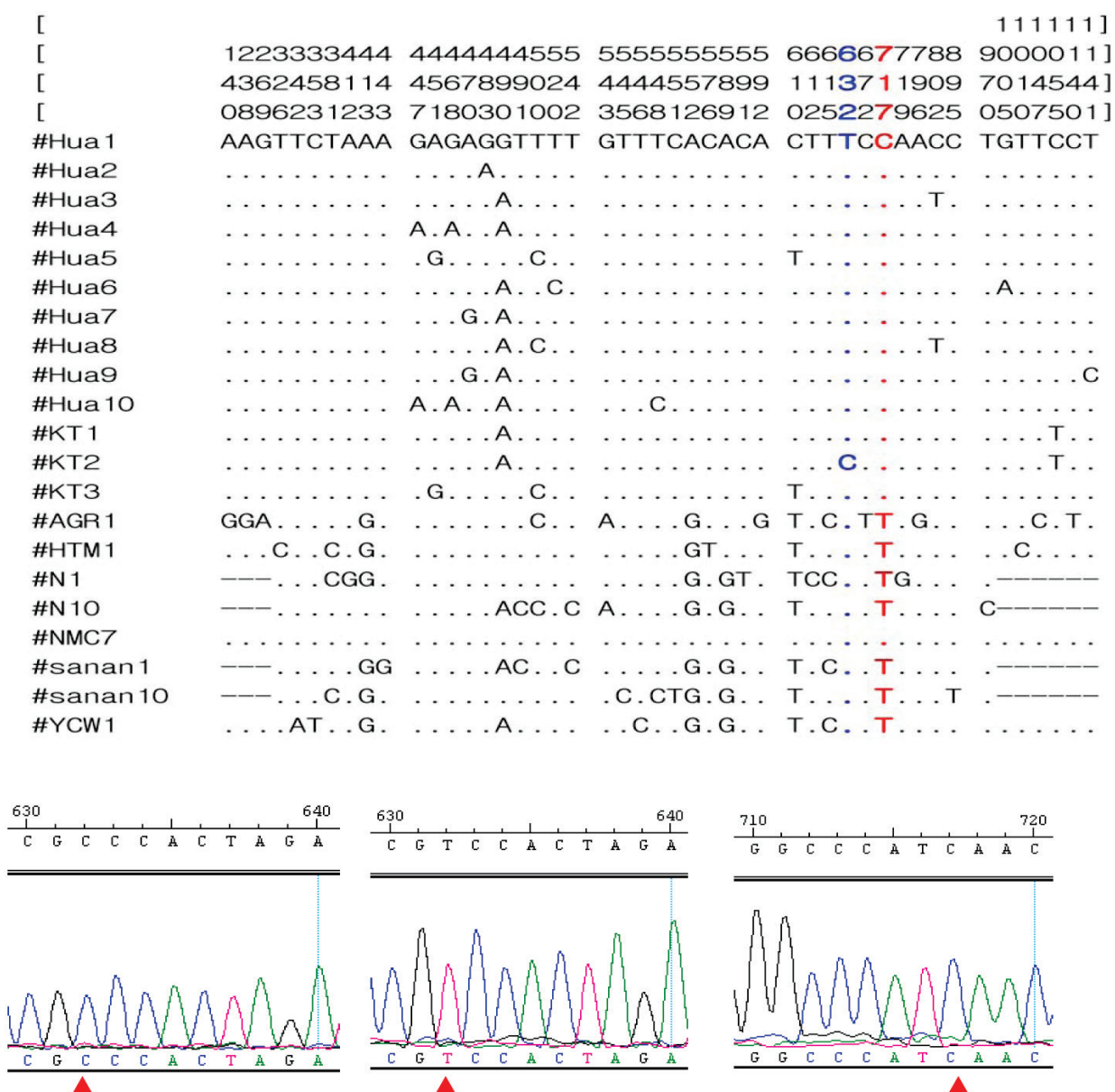


圖 1. 不同品種山羊 D-loop 之變異點。

Fig. 1. The polymorphic sites of mtDNA D-loop region among the different species goats.

Hua: Taiwan native black goat in Hualien ; KT: Taiwan native black goat in Kenting.

N1/N10: Nubia goat (Italy, accession no. FJ571542, FJ571551); Sanan 1/10: Sanan goat (Italy, accession no.

FJ571552, FJ571561) ; YCW1: Yangcheng White goat (China, accession no. GQ141255) ; AGR1: Angora

goat (China, accession no. GQ141232) ; HTM1: Hongtong milking goat(China, accession no.

GQ141242) ; NMC7:China goat (accession no, DQ188877)

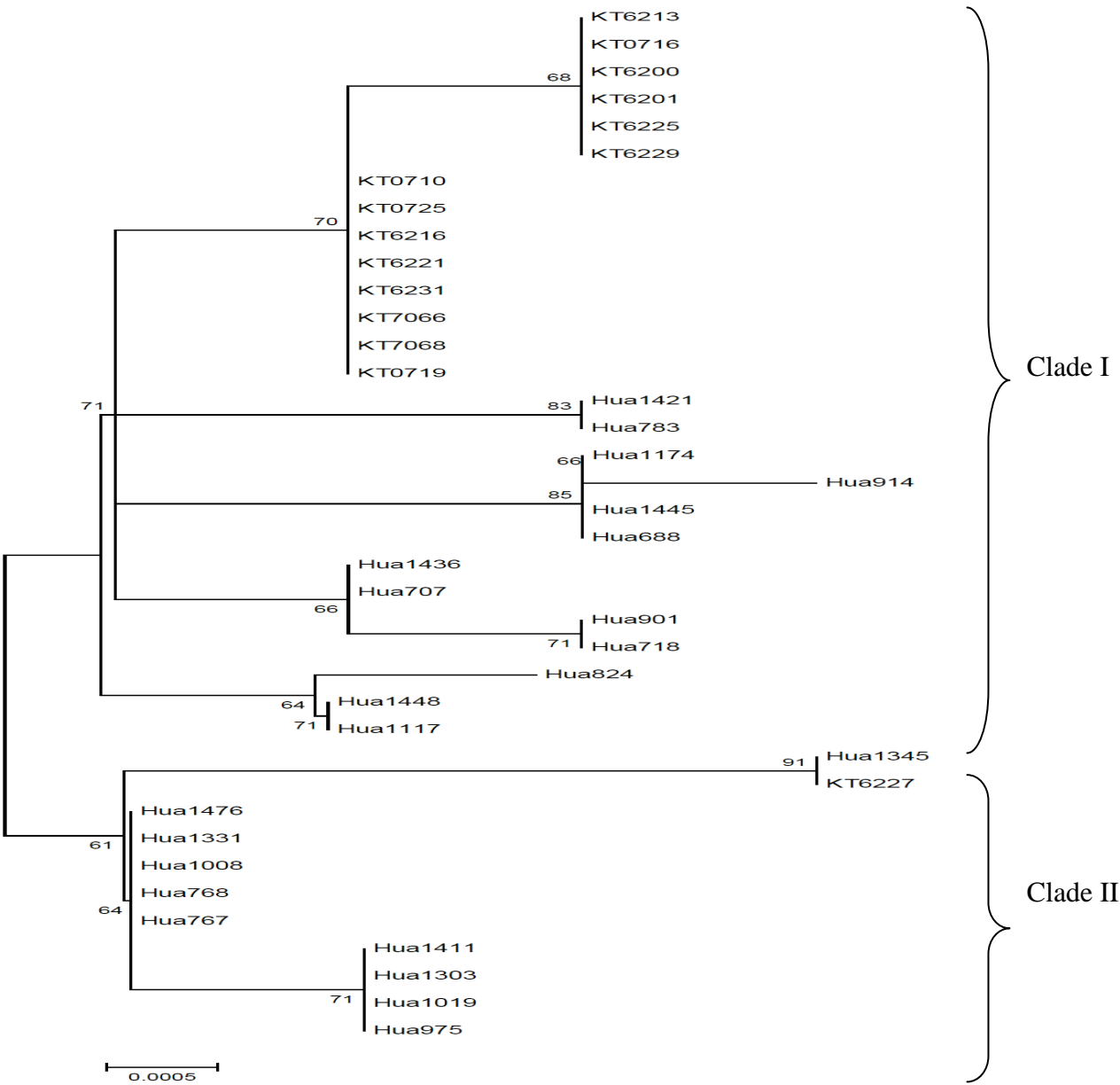


圖 2. Neighbor-Joining 模式建構之臺灣黑山羊 mt DNA D-loop 親緣樹關係圖。
Fig. 2. The phenogenetic tree of mtDNA D-loop region in Taiwan native goats constructed by Neighbor-Joining method.
Hua: Taiwan native black goat in Hualien ; KT: Taiwan native black goat in Kenting

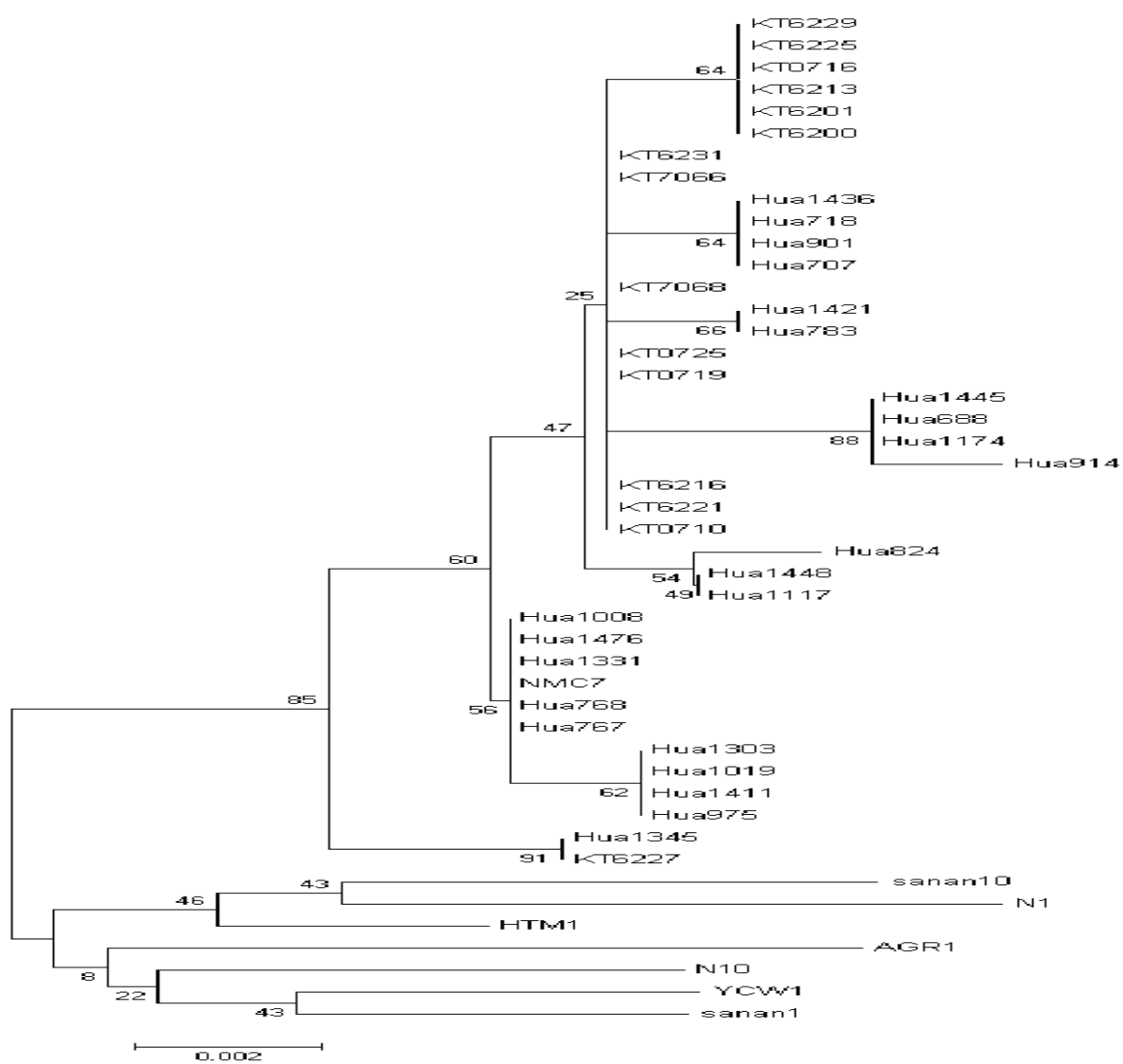


圖 3. Neighbor-Joining 模式建構之臺灣黑山羊 mt DNA D-loop 與其它品種山羊親緣樹關係圖。

Fig. 3. The phenogenetic tree of mtDNA D-loop region in Taiwan native goats and other species goats constructed by Neighbor-Joining method.

Hua: Taiwan native black goat in Hualien ; KT: Taiwan native black goat in Kenting

N1/N10: Nubia goat (Italy, accession no. FJ571542, FJ571551); Sanan 1/10: Sanan goat (Italy, accession no. FJ571552, FJ571561) ; YCW1: Yangcheng White goat (China, accession no. GQ141255) ; AGR1: Angora goat (China, accession no. GQ141232) ; HTM1: Hongtong milking goat (China, accession no. GQ141242) ; NMC7: China goat (accession no. DQ188877)

誌謝

本試驗承蒙行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所方瑞豐先生協助採血等事宜，特此致謝。

參考文獻

- 王佩華、宋永義、張直、姜延年、吳東益。1995。臺灣本地山羊血型之研究。臺大農學院研究報告 35(3)：326-338。
- 李娜、陳少波、謝起浪、呂建新、管敏鑫。2008。閩浙地區香魚線粒體 Cyt b 基因和 D-loop 區序列多態性分析。遺傳 30(7)：919-925。
- 洪東奇、賴淑雅、黃獻文、梁佑全、歐柏榮。2001。臺灣長鬃山羊個體間粒線體 DNA 之 12S rRNA 及 cytochrome b 序列分析比較。特有生物研究 3：37-48。
- 陳德卿。1972。中國畜牧年鑑。中國畜牧雜誌社，台北市，P. 386。
- 張定偉。1984。羊品種及育種經過。臺灣省畜牧獸醫事業養牛篇。臺灣省政府農林廳，pp. 210-232。
- 黃政齊、謝瑞春、張宏仁、蘇安國、溫上湘。1993。努比亞與本地山羊生產性能之研究。畜產研究 26(2)：175-184。
- 黃玉文。2008。粒線體與老化。生物醫學 1(1)：24-42。
- 施義章、黃耀興、劉立乾。1996。本土性家畜品種特性之調查-臺灣山羊。畜產研究 29(4)：347-351。
- 蕭程友。2007。臺灣絨螯蟹 (*Eriocheir formosa*) 遺傳多樣性之研究。碩士論文。國立清華大學。
- 謝瑞春、黃政齊、蘇安國、吳錦賢。1997。臺灣本地黑山羊種原保存與其經濟性狀之調查。畜產研究 30(2)：205 - 213。
- Anderson, S., M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, I. C. Eperon, F. Sanger and I. G. Young. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. Journal of Molecular Biology 156: 683-717.
- Brown, W. M., M. George, Jr. and A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(4): 1967-1971.
- Gall, C. 1983. Goat production. Academic Press. London. pp. 80-126.
- Hassan, A. A., S. M. El Nahas, S. Kumar, P. S. Godithala and K. H. Roushdy. 2009. Mitochondrial D-loop nucleotide sequences of Egyptian river buffalo. Livest. Sci. 125: 37-42.
- Hoelze, A. R., J. A. Hancock and G. A. Dover. 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-Loop Region. Mol. Biol. Evol. 8(3): 475-493.
- Jia, S., H. Chen, G. Zhang, Z. Wang, C. Lei, R. Yao and X. Han. 2007. Genetic variation of mitochondrial d-loop region and evolution analysis in some Chinese cattle breeds. J. Genet, Genomics 34(6): 510-518.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.
- Liu, R. Y., G. S. Yang and C. Z. Lei. 2006. The genetic diversity of mtDNA D-loop and the origin of Chinese goats. Acta Genetica Sinica 33 (5): 420-428.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(10): 5269-5273.

- Pedrosa, S., M. Uzun, J. J. Arranz, B. G., F. S. Primitivo and Y. Bayo'n. 2005. Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc. R. Soc. B.* 272: 2211-2217.
- Pogson, G. H., K. A. Mesa and R. G. Boutilier. 1995. Genetic population structure and gene flow in the Atlantic Cod *Gadus morhua*: A comparison of auozyme and nuclear RFLP. *Loci. Genetics* 139: 375-385.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236 (4803): 787-792.
- Taanman, J. W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1410: 103-123.
- Tajima, F. 1993. Statistical analysis of DNA polymorphism. *Jpn. J. Genet.* 68: 567-595.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

The comparisons of the mtDNA D-loop region between Taiwan native black goats ⁽¹⁾

Pi-Hua Chuang⁽²⁾ Chia-Hsuan Chen⁽³⁾ Sheng-Der Wang⁽⁴⁾
Shen-Shyuan Yan⁽⁴⁾ Jan-Chi Huang⁽⁴⁾ and An-Kuo Su⁽²⁾⁽⁵⁾

Received: Nov. 29, 2011; Accepted: Mar. 23, 2012

Abstract

Taiwan native black goats, which were raised at Hualien and Hengchung station, had a relative relationship at twenty years ago. The purpose of this study was to compare the differences of the D-loop gene (1,212 bp) in mitochondrial DNA between these two herds, which were named as Hua and KT breeds. The result showed the D-loop sequence of experimental goat was A-T rich. A+T content occupied 60.2 – 60.4% of total content. There are ten and three haplotypes of D-loop in Hua and KT breeds, respectively. Fifteen polymorphic sites in the D-loop sequence were located at 447, 451, 468, 470, 483, 490, 500, 520, 548, 610, 632, 802, 1005, 1055 and 1141 bp respectively. Seven A/G and eight T/C transition pairs were founded. The value of the haplotype diversity (h_d) was high. Meanwhile, the nucleotide diversity (π) was low and the Tajima's D was smaller than 0. The evidence verified that these two herds had a relative relationship in the past time. Furthermore, the data also inferred the possibilities of goat population change in the past two decades. It seems that these two herds might have incurred the huge population decline in the past and then rapidly increased herd population size recently. The estimates of F_{st} and N_m were 0.37715 and 0.41, respectively. Evidence showed that there was a low gene flow between these two groups. The low relative relationship between these two herds might come from the geography division of Taiwan and the man-made of breeding or selection programs.

Key words: Taiwan native black goat, Mitochondrial DNA, D-loop.

(1) Contribution No. 1755 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. R. O. C.

(2) Hualien Animal Propagation Station, COA-LRI, Hualien 97326, Taiwan, R. O. C.

(3) Breeding and Genetic Division, COA-LRI, Hsinhua Tainan 71246, Taiwan, R. O. C

(4) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C

(5) Corresponding author, E-mail: aksu@mail.tlri.gov.tw

