

# 狼尾草品系之 ISSR 親緣分析<sup>(1)</sup>

吳東鴻<sup>(2)(4)</sup> 成游貴<sup>(3)</sup>

收件日期：98年2月25日；接受日期：98年9月24日

## 摘要

本研究利用 ISSR (inter simple sequence repeat) 標記方法以探討狼尾草品種 (系) 間之遺傳親緣關係、分子指紋圖譜與品種鑑別，所用品系包含了狼尾草台畜草二號 (cv.TLG2)、紫色狼尾草 (NBM) 及其雜交後裔、以及未知親本之狼尾草等 29 個品系材料。結果顯示受測品系平均遺傳相似性達 0.45 (45%)，其中 NG11、NG16、NG18、TLG2 彼此間具高度親緣關係 ( $GS > 0.8$ )，然品系 NG01 與 NG04 對於另一群品系 NP03、NP04、NP05、NP07 具較低程度的親緣關係 ( $GS < 0.2$ )，而未知譜系之狼尾草經群集分析後，顯示其與 cv.TLG2 及 NBM 具有相當程度上之親緣關係。由參試品系之株高等外表性狀分群與 ISSR 親緣分群結果比對，亦能反應其實際遺傳親緣關係。於品種鑑別方面，以 3 組 ISSR 引子即可將目前之栽培品種狼尾草台畜草二號與其他品系區隔，將可作為品種鑑別之用。

關鍵詞：狼尾草、ISSR 標記、親緣關係。

## 緒言

近幾年來國內對於狼尾草育種改良之結果，於產量與性狀方面，所選育之高莖狼尾草台畜草二號，具高產及高碳水化合物之特性，葉鞘茸毛少，開花期晚，適應性廣，飼養泌乳牛、羊，其泌乳量及品質皆有改善且成本降低，然牧草品質有待改善。於品質選育中，狼尾草台畜草一號 (cv.TLG1) 為矮性品種，葉莖比高，具高蛋白質、低酸洗及中洗纖維特性，然牧草產量與碳水化合物較低，青貯品質較差為其缺點 (成等，1992，1995，1997)。因此，有必要引進新的種原以供進一步改良，然過去雜交組合親本之選定與品種鑑定指標，主要建立於植株之外表性狀上，花費時間長，且影響評估效率之因素多。有鑒於此，需要尋求具經濟、高再現性、簡便的評估指標，作為狼尾草親本與後裔品系選拔輔助工具，以提升育種效率。一些學者利用同功異構酶與蛋白質標記做為狼尾草種原評估的分子工具，但蛋白質標記具有多型性低等缺陷，不易建立多型性標記 (Augustin

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1530 號。

(2) 行政院農業委員會農業試驗所作物組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所飼料作物組。

(4) 通訊作者，E-mail: d95621105@ntu.edu.tw。

and Tcacenco, 1993; Bhandari and Sukanya, 2006; Bhandari *et al.*, 2006)。Pereira *et al.* (2008) 以 20 組 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 引子針對 30 個狼尾草品系進行遺傳歧異度分析，產生 64 個 RAPD 多型性片段，藉此用以評估各品系間分子親緣關係。但各核酸標記方法，各具優缺點，如 RAPD 再現性低、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 操作繁瑣及 SSR (simple sequence repeats) 必須事先知道兩側序列才能設計使用，而 ISSR (inter simple sequence repeat) 克服了大部分的限制，反應中只放入單一引子且不需事先知曉序列訊息，操作簡便，因引子序列長 (16 -25 mer) 所需黏合溫度高，試驗再現性高 (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1993)。以 ISSR 標記進行遺傳歧異度分析，在百喜草 (Cidade *et al.*, 2008)、濱草 (Rodriguez-Echeverria *et al.*, 2008)、短芒大麥 (Li *et al.*, 2007)、黑麥草 (Dinelli *et al.*, 2004; Ghariani *et al.*, 2003) 等草類已被廣為應用。因此，本研究將以 ISSR 分子標記評估各狼尾草品系親緣關係，供未來輔助選擇親本組合與鑑別品種之用。

## 材料與方法

### I. 狼尾草品系與性狀調查

由畜產試驗所牧草種原區選出 29 個品系 (種)，包含栽培品種狼尾草台畜草二號 (cv. TLG2)、自生種紫色狼尾草等各具不同農藝性狀之品系，其中 20 個品系已知譜系親本，其餘 9 個品系未知親本譜系者，用於測試其與 20 個品系之親緣關係 (表 1)。參試品系種植於田間，行株距 1 m x 0.8 m，行長 5 m，於割後再生 8 週時，取樣調查項目為葉領株高 (由莖基部至最上葉領高度，PH1)、葉尖株高 (由莖基部至葉尖高度，PH2)、莖徑 (莖基部可見第二節間中間直徑，SD) 與節間長 (可見節間平均長度，NL) 等性狀，每品系樣品三重複，調查資料供分群與統計分析。

表 1. 狼尾草各參試品系之遺傳背景與植株顏色

Table 1. The genetic background and plant color of the evaluated napiergrass germplasms

Germplasm code	Plant color	Maternal parent	Paternal parent
NBM	Purple		Wild
NG01	Green	Tift23DB	Mott
NG02	Green	Tift23DB	A146
NG03	Green	Mott	Mott
NG04	Green	Mott	Mott
NG05	Green	Pearl millet	cv.TLG2
NG07	Green	NBM	cv.TLG2
NG08	Green	NBM	cv.TLG2
NG09	Green	NBM	cv.TLG2
NG10	Green	NBM	cv.TLG2
NG11	Green	Pearl millet	A146
NG12	Green		unknown
NG13	Green		unknown
NG14	Green		unknown
NG15	Green		unknown
NG16	Green		unknown
NG17	Green		unknown
NG18	Green		unknown
NG19	Green		unknown
NG20	Green		unknown
NP02	Purple	NBM	cv.TLG2
NP03	Purple	NBM	cv.TLG2
NP04	Purple	NBM	cv.TLG2
NP05	Purple	NBM	cv.TLG2
NP06	Purple	NBM	cv.TLG2
NP07	Purple	NBM	cv.TLG2
NP08	Purple	NBM	cv.TLG2
NP09	Purple	NBM	cv.TLG2
cv.TLG2	Green	A149	A148

## II. ISSR分析

由加拿大哥倫比亞大學所發表之 100 組 ISSR 引子 (University of British Columbia, Set No 9, No. 801-900) 作為本次核酸標記來源引子。各樣品取 0.05 g 碎葉片，真空乾燥 (Freeze dry / shell freeze system Lyph lock 18) 後，以直徑 2.5 mm 的玻璃珠，於震盪機上震盪磨成粉末，再以修改過之 Doyle and Doyle (1990) CTAB 法萃取葉片 DNA。多型性測定之 PCR 反應使用熱循環反應器 (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) 採 3 種黏合 (annealing) 溫度進行，反應條件修改自 Touch Down program (Don *et al.*, 1991; Roux, 1994; Hecker and Roux, 1996) 為：94℃ 2 分鐘；94℃ 1 分鐘、(60℃、65℃ 或 70℃) 30 秒、72℃ 1 分 30 秒，循環 10 次，每循環黏合溫度下降 1 度；94℃ 3 秒、(50℃、55℃ 或 60℃) 20 秒、72℃ 30 秒，循環 36 次；72℃ 4 分鐘，反應結束後產物以 4℃ 保存。每一反應的總體積為 10  $\mu$ L，其中包含 20 ng 狼尾草 DNA，2.0 mM MgCl<sub>2</sub>，ISSR 引子 0.4  $\mu$ M，dNTPs 各 0.2 mM，0.6 U *Taq* DNA 聚合酶 (Yeastern Biotech Co., Ltd)。PCR 產物以 2% Agarose I (AMRESCO) 膠片，0.5×TBE 緩衝液，電壓 200V，2 小時進行電泳分析。

## III. 資料分析

品種 (系) 之間的遺傳相似性，採 Jaccard's index 作為估算公式 (Jaccard, 1908)。群集分析 (cluster analysis) 利用 NTSYSpc2.2 (Exeter Software) 軟體進行計算，以其中 Cluster 模組中的 SAHN 進行群集分析。而所有性狀資料以 Fisher's LSD test 進行分析，即所有性狀數據均先進行變方分析，若品系間差異顯著者再以 LSD 法進行比較，而若品系差異不顯著則不再進行多重比較。

# 結果與討論

## I. 狼尾草性狀調查

參試品系之性狀調查結果如表 2，將每一性狀大略分為三等級，各以 0、1、2 等表示，葉領高度方面，參試品系介於 38.4 ~ 137.7 cm 之間，平均高度為 111.7 cm，可分為矮性 50 cm 以下 (0)，半矮 50~100 cm (1) 與高莖 100 cm 以上 (2) 等三群；葉尖高度介於 108.1 ~ 257.9 cm 之間，平均高度為 225.6 cm，可分為矮性 150 cm 以下 (0)，半矮 150~200 cm (1) 與高莖 200 cm 以上 (2) 等三群；莖徑分佈於 9.0 ~ 20.1 mm 之間，平均為 17.1 mm，其粗細可分為 10 mm 以下 (0) 為細莖，10~20 mm (1) 為中莖，20 mm 以上 (2) 為粗莖等三群；節間長度分佈於 8.0 ~ 24.8 cm 間，平均長度為 19.9 cm，可分為 10 cm 以下 (0) 為短節間，10~20 cm (1) 為中節間，20 cm 以上 (2) 為長節間等三群。所有調查性狀經變方分析後，顯示參試品系之葉領高度、葉尖高度與莖徑均達極顯著差異 ( $P < 0.01$ )，但節間長度未達顯著差異 ( $P = 0.99$ )，進一步，進行各性狀之最小顯著差異性測驗，其葉領高度之  $LSD_{0.05}$  門檻值為 26 cm，葉尖高度門檻值則為 27.8 cm，莖徑之門檻值係 4.2 mm (表 2)。依分群結果顯示，以高株、中莖與長節間這群頻度最多。

表 2. 狼尾草各參試品系之株高、莖徑與節間長度

Table 2. The plant height, stem diameter and internode length of the napiergrass germplasms

Germplasm code	PH1 *	PH2	SD	IL	Class
	----- cm -----		mm	cm	
NBM	127.0	243.7	17.0	18.6	2211
NG01	65.4	127.5	9.0	10.6	1001
NG02	89.7	153.6	10.9	14.6	1111
NG03	38.4	108.1	14.9	8.0	0010
NG04	60.6	165.3	15.3	10.7	1111
NG05	94.7	205.9	15.8	20.1	1212
NG07	118.5	244.4	18.6	19.6	2211
NG08	117.4	239.1	16.4	20.4	2212
NG09	123.4	246.4	18.5	20.8	2212
NG10	130.5	252.6	18.3	20.0	2212
NG11	128.6	248.6	18.0	19.6	2211
NG12	124.9	234.3	15.8	23.1	2212
NG13	132.4	250.1	16.8	21.4	2212
NG14	122.7	251.3	19.0	24.4	2212
NG15	115.4	240.6	17.0	17.4	2211
NG16	128.3	247.5	16.1	20.8	2212
NG17	129.4	256.1	18.7	22.9	2212
NG18	126.5	238.7	16.0	21.0	2212
NG19	137.7	257.9	16.2	20.0	2212
NG20	112.7	238.1	17.7	20.7	2212
NP02	124.0	245.0	17.4	22.3	2212
NP03	111.2	232.7	19.0	21.5	2212
NP04	111.4	233.8	19.1	22.4	2212
NP05	111.0	227.2	20.1	22.0	2222
NP06	124.0	245.0	17.4	22.3	2212
NP07	100.1	220.4	18.6	22.3	2212
NP08	88.9	193.9	18.5	24.8	1112
NP09	121.7	247.1	19.7	22.1	2212
cv.TLG2	122.8	248.8	20.1	22.3	2222
LSD <sub>0.05</sub>	26.0	27.8	4.2	18.5	

\*PH1, plant height (leaf collar) ; PH2, plant height (leaf tip) ; SD, stem diameter ; IL, internode length.

## II. 狼尾草 ISSR 多型性篩選

所有 ISSR 引子分別就 50℃、55℃、60℃ 等黏合溫度進行最適黏合溫度測試，並隨機取出 4 個待測品系作為分析樣品，依各組引子測試結果決定其最適溫度後，再針對 29 個狼尾草品系進行分子親緣分析。多型性篩選測試結果顯示共 43 組引子無法產生明確條帶，27 組具單型性條帶，僅 30 組 ISSR 引子具多型性條帶。再從中挑選出具電泳條帶表現明確者，由 UBC807、UBC808、UBC811、UBC812、UBC817、UBC820、UBC821、UBC826、UBC842、UBC847、UBC848、UBC849、UBC850、UBC851、UBC859、UBC861、UBC866、UBC868、UBC869、UBC881、UBC888、UBC890 等 22 組 ISSR 引子供資料分析，其部份電泳結果如圖 1，共採計 65 個 ISSR 標記（如表 3），平均每個 ISSR 引子產生 2.95 個 ISSR 標記。

表 3. 參試狼尾草種原之 ISSR 多型性標記與其 PCR 反應條件

Table 3. The polymorphic information of the ISSR markers from the evaluated napiergrass germplasms

Primer	Anneal Temp.	Polymorphism band No.	ISSR markers (bp)
ISSR 807	50℃	2	800, 700
ISSR 808	60℃	1	1000
ISSR 811	50℃	2	1400, 960
ISSR 812	50℃	6	1900, 1500, 1400, 900, 700, 600
ISSR 817	60℃	5	1400, 1300, 1000, 900, 110
ISSR 820	50℃	2	800, 500
ISSR 821	50℃	2	1000, 800
ISSR 826	60℃	6	2000, 1900, 1700, 1100, 1000, 900
ISSR 842	55℃	1	1000
ISSR 847	55℃	2	1500, 750
ISSR 848	60℃	7	1000, 900, 700, 510, 480, 410, 380
ISSR 849	55℃	4	1300, 1100, 950, 500
ISSR 850	50℃	1	480
ISSR 851	60℃	4	1600, 1400, 950, 500
ISSR 859	55℃	3	1900, 1400, 950
ISSR 861	50℃	3	1800, 700, 500
ISSR 866	50℃	3	800, 750, 600
ISSR 868	50℃	2	1300, 1200
ISSR 869	50℃	1	1100
ISSR 881	50℃	1	800
ISSR 888	60℃	4	1500, 780, 600, 590
ISSR 890	50℃	3	600, 550, 500

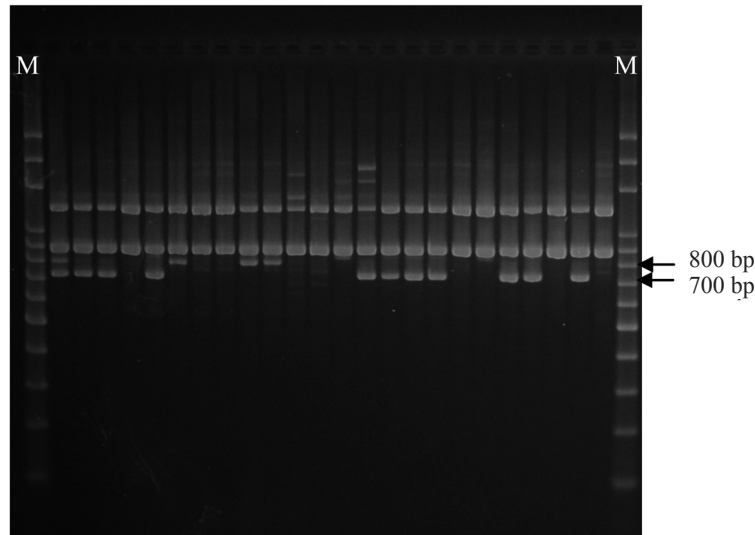


圖 1. 以 UBC807 引子分析 24 個狼尾草品系之電泳圖，700 bp 與 800 bp 為本試驗所採記之 ISSR 多型性（M 為每 100 bp 分子量標記，由左至右為 1: NG7, 2: NG8, 3: NG9, 4: NG10, 5: cv.TLG2, 6: NBM, 7: NP2, 8: NP3, 9: NP4, 10: NP5, 11: NG1, 12: NG2, 13: NG3, 14: NG4, 15: NG5, 16: NG6, 17: NG11, 18: NG12, 19: NG13, 20: NG14, 21: NG15, 22: NG20, 23: NG9, 24: NP6）

Fig. 1. The electrophoresis result of the primer UBC807 for 24 napiergrass lines, the labels 700bp and 800bp were ISSR marker in this study (M is the 100 bp, molecular weight marker. Sample from left to right was 1: NG7, 2: NG8, 3: NG9, 4: NG10, 5: cv.TLG2, 6: NBM, 7: NP2, 8: NP3, 9: NP4, 10: NP5, 11: NG1, 12: NG2, 13: NG3, 14: NG4, 15: NG5, 16: NG6, 17: NG11, 18: NG12, 19: NG13, 20: NG14, 21: NG15, 22: NG20, 23: NG9, 24: NP6).

### III. ISSR 遺傳相似性評估

於 29 個狼尾草品系上所採計之 65 組 ISSR 多型性，以 Jaccard's 遺傳相似度係數 GS (Genetic similarity coefficient) (Jaccard, 1908) 估算各品系兩兩間之遺傳相似性（資料未顯示），顯示整體受測品系平均遺傳相似性達 0.45 (45%)，其中遺傳相似性較低者依序為 NG01 對 NP07 (0.06)、NG01 對 NP04 (0.12)、NG01 對 NP03 (0.13)、NG04 對 NP07 (0.16)、NG01 對 NP05 (0.17)，而遺傳相似性最高者依序為 NG11 對 NG16 (0.88)、NG16 對 NG18 (0.86)、NG11 對 TLG2 (0.85)、NG17 對 NG19 (0.85)、NG11 對 NG18 (0.84)，由此可知 NG01 與 NG04 品系對於另一群 NP03、NP04、NP05、NP07 品系具較低程度的親緣關係 (GS < 0.2)，而 NG11、NG16、NG18、TLG2 彼此間具高度親緣關係 (GS > 0.8)。

由 29 個狼尾草品系所構成之相似性矩陣，以 UPGMA (unweighed pair group method with arithmetic mean) 進行群集分析 (cluster analysis)，並繪出樹狀圖 (如圖 2)。各品系依其遺傳相似程度歸類分群後，顯示 NG07、NG10、NP04、NP05 小群均為狼尾草台畜草二號 (cv.TLG2) 與紫色狼尾草 (NBM) 雜交後裔，而 NG09、NP09 小群以及 NP02、NP03、NP06 小群也顯示同一分群內共有相同雜交親本。而另一雜交組合則自成一群，其父母本均為 Mott 矮性狼尾草品系之 NG03、NG04 被歸為同一小群，甚至具有共通雜交父本之 NG01 品系也與 NG03、NG04 歸為

同一大群，此顯示該群集分析能正確對應其譜系關係。在該分群圖中也顯示由種原區混雜品系中所挑選出之 NG11、NG16、NG18 品系，雖不知其譜系親本，藉由各品系 ISSR 分群結果，顯示其與 cv.TLG2 具有高度親緣關係。並於已知 NP08、NG08 譜系 (NBM/cv.TLG2) 下，發現 NG14 與 NP08 組合 ( $GS=0.53$ ) 以及 NG13 與 NG08 組合 ( $GS=0.60$ ) 各歸為同一小群，顯示 NG14 與 NG13 同為 NBM/cv.TLG2 雜交後裔。NG17、NG19 小群在樹狀圖也顯示與 cv.TLG2 品種歸為同一大群，暗示具有與其相近親緣關係。圖中也顯示所有無譜系來源之品系 NG12~NG20 均散落於狼尾草台畜草 2 號與紫色狼尾草雜交後裔之間，表示所有未知譜系品系均與 cv.TLG2 或 NBM 具有相當程度上之親緣關係。由此 29 個狼尾草品系上開發出 65 組 ISSR 標記，其中就條帶明確、最少分析引子數原則下，歸納出狼尾草台畜草二號快速最小鑑別組合，只要以 UBC807、UBC821、UBC826 等 3 組引子進行分析，可以產生 UBC807\_800bp、UBC807\_700bp、UBC821\_1000bp、UBC821\_800bp、UBC826\_2000bp、UBC826\_1900bp 等 6 組 ISSR 標記，可將所有參試品系區分成 18 群如表 3，而其中 cv.TLG2 可與其他 28 個品系完全區分開，因此只需分析 3 組 ISSR primer，即可達到快速鑑別狼尾草台畜草二號品種。

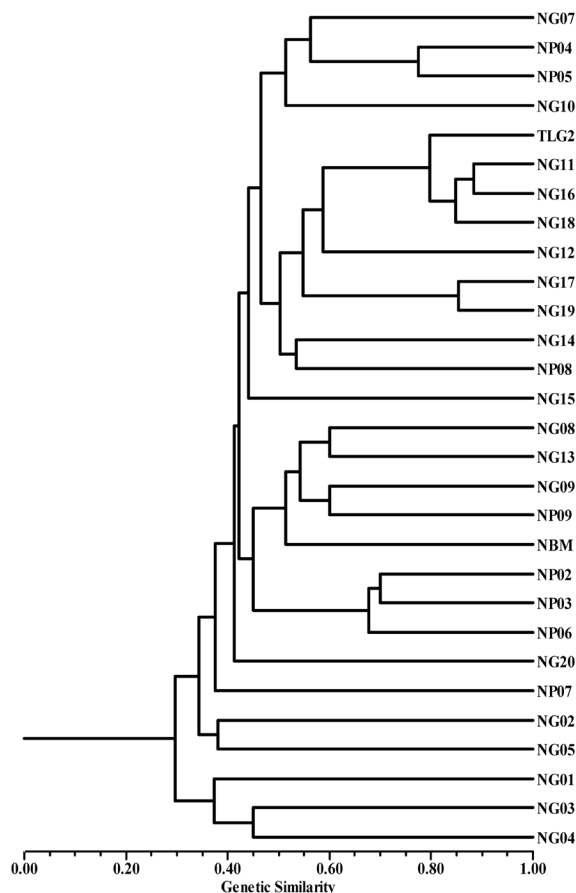


圖 2. 以 Jaccard 遺傳相似性估算參試之 29 個狼尾草遺傳關係之樹狀圖

Fig. 2. Dendrogram among 29 evaluated napiergrass lines based on Jaccard genetic similarity and UPGMA cluster analysis.



綜合以上 ISSR 分群結果，顯示受測品系可區分成三類，一則主要代表 Mott 矮性狼尾草親緣背景之後裔品系，如：NG01、NG03、NG04，另一則是帶有 NBM/cv.TLG2 親緣背景之雜交後裔，其中包含確為 NBM/cv.TLG2 雜交後裔 NG07~NG10 與 NP02~NP09 等 12 品系外，以及所有未知譜系等 9 個品系，最後一類則由 NG02 與 NG05 品系構成，總結顯示本次近 80% 的受測品系（23/29 品系）主要為 NBM/cv.TLG2 雜交後裔。本次群集分析將 NG07 ~ NG20、NP02 ~ NP09、cv.TLG2 與 NBM 等 24 個品系分為第一群，NG01 與 NG05 分為第二群，NG01、NG03 及 NG04 則為第三群。比較各分群之外觀性狀，顯示第一群幾乎全係高株高品系（23/24 品系），葉領高度超過 100 cm，且葉尖高度超過 200 cm，而莖徑則普遍為 10 ~ 20 cm 中徑等級以上（22/24 品系），節間長係偏向 20 cm 以上之長節間性狀（21/24 品系），主要表現為高株、長節間、粗徑等高生物量特性，另兩群則趨向低株高、細徑等矮性品系特性，此結果合理反應在同一分群中因具相近遺傳背景，而具有相似外觀性狀，由此可知本試驗 ISSR 親緣分析能正確反應其實際遺傳親緣。再就 ISSR 標記評估各品系間之分子親緣關係，其結果顯示以 NG01 與 NG04 品系對於另一群 NP03、NP04、NP05、NP07 品系親緣較遠，其中又以 NG01 與 NG07 組合親緣最遠，遺傳相似性僅達 0.06。此訊息將提供未來挑選雜交組合時，有較高期望能產生較多的遺傳變異可供選拔，並避免挑選 NG11、NG16、NG18、cv.TLG2 彼此間具高遺傳相似（GS > 0.8）之品系作為雜交組合。

ISSR 分子標記結合了 RAPD 技術的優點，克服了 RAPD 及其 SSR 標記的某些缺點，可在沒有任何分子生物學研究的基礎上進行基因組指紋構建，為物種演化和分類研究提供 DNA 層次上的證據，並可同時檢測基因組多個 SSR 位點，ISSR 標記也可依循 RAPD 定位基因的方法，建立其相連鎖的 DNA 標記，快速完成基因定位，可在生長週期的任何時段進行檢測，且 DNA 用量少，而 ISSR 標記的遺傳模式為顯性標記，實驗操作簡單、快速、高效，不需要繁瑣的構建基因庫、雜交和同位素標定顯影等步驟（Souframanien and Gopalakrishna, 2004; Liu and Cordes, 2004）。因此 ISSR 是一種能非常有效顯示材料間遺傳差異的分子標記，因而非常適合應用在遺傳多樣性研究上。Wolfe *et al.* (1998) 以群間取樣的方法，在玄參科吊鐘柳屬 *Penstemon* 雜交種中得到了 10~24 個種間專一的 ISSR 標記，能明確反應物種 *P. clevelandii* 的二倍體雜交親本起源，顯示 ISSR 標記具鑑別雜交後裔之能力。Joshi *et al.* (2000) 認為 ISSR 標記在研究稻屬植物進化關係中非常有用，Huang and Sun (2000) 也認為 ISSR 標記可偵測到高比例的多型性，在物種分類內可獲得更貼切的遺傳親緣關係。目前分子標記技術應用於狼尾草上，不論於分析遺傳歧異度（解及盧，2005；Pereira *et al.*, 2008）或確認雜交後裔（陳等，2007），主要以 RAPD 技術為主，但 RAPD 標記普遍存在低再現性的疑慮，而以 ISSR 技術可克服該缺陷，本研究以 ISSR 標記分析狼尾草遺傳歧異度與品種鑑別，如同可可亞種原資料庫（Luan *et al.*, 2006）與苜蓿（魏，2004）建立分子指紋，後續可供建立狼尾草品系 ISSR 分子指紋資料庫之應用，為日後狼尾草品系引種、親本選擇、種原評估和品種鑑別提供基礎依據。本研究亦針對未知譜系品系之遺傳背景進行探討，已獲得初步結果，顯示此 9 個品系主要為 NBM/cv.TLG2 雜交後裔，並建立起各參試品系間之 ISSR 親緣關係，供育種家未來挑選雜交組合之依據。因狼尾草為一高異交作物，種子容易在田間飄散且萌芽率高，但種苗繁殖是以莖節進行營養繁殖，若僅以外觀性狀作為良種維持之評估工具，其評估效力常受氣候等環境因素干擾而降低，因此於品種維持上，本研究提供一穩定、快速、簡便之檢測工具，同時亦為保護品種權之客觀依據。

表 4. 狼尾草台畜草二號與其餘參試品系之最小鑑別組合及其分子指紋圖譜

Table 4. The minimum set of markers for distinguishing cv.TLG2 from the rest of the evaluated lines was derived from the polymorphic markers

Germplasm code	ISSR807		ISSR821		ISSR826		Cluster
	800 bp	700 bp	1000 bp	800 bp	2000 bp	1900 bp	
NBM	1*	0	0	0	1	0	01
NG01	0	0	0	1	0	1	02
NG02	0	0	1	0	0	0	03
NG03	0	0	1	0	1	0	04
NG04	0	1	0	0	0	0	05
NG05	0	1	0	1	0	1	06
NG07	1	1	1	0	1	0	07
NG08	0	1	0	0	0	1	08
NG09	0	1	0	1	1	0	09
NG10	0	0	1	0	1	1	10
NG11	0	1	1	0	1	1	11
NG12	0	0	1	0	1	0	04
NG13	0	0	0	1	0	0	12
NG14	0	1	0	1	1	1	13
NG15	0	1	0	0	0	1	08
NG16	0	1	1	0	1	1	11
NG17	0	0	1	0	1	0	04
NG18	0	1	1	0	1	1	11
NG19	0	0	1	0	1	0	04
NG20	0	0	1	0	1	1	10
NP02	0	0	0	1	1	0	14
NP03	0	0	0	1	1	0	14
NP04	1	0	0	0	1	1	15
NP05	1	0	0	0	1	1	15
NP06	0	0	0	1	1	1	16
NP07	0	1	0	0	0	0	05
NP08	1	1	0	1	1	0	17
NP09	0	1	0	1	1	1	13
cv.TLG2	0	1	1	0	0	0	18

\*. “1” 表示有標示條帶，“0” 表示無條帶

\* “1” is the presence of the marker and “0” is for the absence.

## 誌謝

感謝國立台灣大學農藝系蘇家玄君以及畜產試驗所飼料作物組李姿蓉小姐協助試驗進行。

## 參考文獻

- 成游貴、吳建福、羅國棟、唐清苓、張溪泉、陳文、黃耀興、卜瑞雄。1992。狼尾草育種。畜產研究 25 : 151 - 170。
- 成游貴、陳嘉昇、吳建福。1995。矮性狼尾草產量與品質改良。畜產研究 28 : 285 - 294。
- 成游貴、黃耀興、陳嘉昇、李美珠。1997。地區性狼尾草品系選拔及飼養模式之研究。畜產研究 30 : 171 - 181。
- 陳平、朱鈞、劉萍、石秀蘭。2007。雜交狼尾草新品系遺傳關係的RAPD分析。中國草地學報 29(3) :34-38。
- 解新明、盧小良。2005。利用RAPD 標記分析狼尾草屬牧草品種間的遺傳關係。草業學報 14(2):52-56。
- 魏臻武。2004。利用SSR、ISSR和RAPD技術構建苜蓿基因組DNA指紋圖譜。草業學報 14(3) :62-67。
- Augustin, E. and F.A. Tcacenco. 1993. Isoenzymatic characterization of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) germplasm. Revista Brasileira De Genetica 16:685-696.
- Bhandari, A. P. and D.H. Sukanya. 2006. Fingerprinting napier grass (*Pennisetum purpureum*) germplasm with biochemical markers. Annals of Biology (Hissar) 22:101-106.
- Bhandari, A. P., D.H. Sukanya and C.R. Ramesh. 2006. Application of isozyme data in fingerprinting Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) for germplasm management. Genetic Resources and Crop Evolution 53:253-264.
- Cidade, F.W., M. Dall'Agnol, F. Bered and T.T. de Souza-Chies. 2008. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flugge (Paniceae : Panicoideae). Genetic Resources and Crop Evolution 55:235-246.
- Dinelli, G., A. Bonetti, I. Marotti, M. Minelli and P. Catizone. 2004. Characterization of Italian populations of *Lolium* spp. resistant and susceptible to diclofop by inter simple sequence repeat. Weed Sci. 52:554-563.
- Don, R., Cox P., Wainwright B., Baker K. and Mattick J. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 19 (14): 4008.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Ghariani, S., N. Trifi-Farah, M. Chakroun, S. Marghali and M. Marrakchi. 2003. Genetic diversity in Tunisian perennial ryegrass revealed by ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 50:809-815.
- Gupta, M., Y.S. Chyi, J. Romero-Severson and J. L. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Thero. Appl. Genet. 89: 998-1006.
- Hecker, K. and K. Roux. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. Biotechniques 20 (3): 478-485.
- Huang, J. C. and M. Sun. 2000. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA Theor. Appl. Genet. 100:1050-1060.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44:223-270.

- Joshi, S. P., V. S. Gupta, R. K. Aggarwal, P. K. Ranjekar and D. S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1311-1320.
- Li, M., W.L. Guo, L. J. Hu, X. M. Liu, Y. F. Zhang, R. Wu, L. Gong, Z. H. Zhang and B. Liu. 2007. Genetic variation in natural populations of *Hordeum brevisubulatum* native to the Songnen Prairie in northeastern China: Comparison of four nuclear DNA markers. *Canadian Journal of Plant Science* 87:773-780.
- Liu, Z. J. and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Luan, S. S., T. Y. Chiang and X. Gong. 2006. High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, Revealed by ISSR Fingerprinting. *Annals of Botany* 98:583-598.
- Meyer, W., T. G. Mitchell, E. Z. Freedman and R. Vilgalys. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2274-2280.
- Pereira, A.V., M. A. Machado, A. L. S. Azevedo, C. S. do Nascimento, A. L. Campos and F. J. D. Ledo. 2008. Genetic diversity among elephantgrass accessions estimated by molecular markers. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian J. Anim. Sci.* 37:1216-1221.
- Rodriguez-Echeverria, S., H. Freitas and W. H. van der Putten. 2008. Genetic diversity and differentiation of *Ammophila arenaria* (L.) link as revealed by ISSR markers. *Journal of Coastal Research* 24:122-126.
- Roux, K. 1994. Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR. *Biotechniques* 16 (5): 812-814.
- Souframanien, J. and T. Gopalakrishna. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1687-1693.
- Wolfe, A. D., Q. Y. Xiang and S. R. Kephart. 1998. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (*Scrophulariaceae*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5112-5115.
- Wu, K., R. Jones, L. Dannaeburger and P. A. Scolnik. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.* 22: 3257-3258.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20(2): 176-183.

# Genetic relationship of napiergrass determined by ISSR marker <sup>(1)</sup>

Dong-Hong Wu<sup>(2)(4)</sup> and Yu-Kuei Cheng<sup>(3)</sup>

Received : Feb. 25, 2009 ; Accepted : Sep. 24, 2009

## Abstract

Twenty-nine napiergrass lines including cv.TLG2, strain brown mid-rib napiergrass (NBM), their hybrids and the unknown parent lines were used to determine the genetic relationship, molecular fingerprint and variety identification by ISSR (inter simple sequence repeat) marker in this study. The results showed that the average genetic similarity (GS) was 0.45 for the evaluated napiergrass germplasms by 65 ISSR markers. There was a higher GS ( $GS > 0.8$ ) within the group of hybrids, i.e., NG11, NG16, NG18 and cv.TLG2, but lines of NG01 and NG04 possessed the lowest GS along with a group of hybrids, i.e., NP03, NP04, NP05 and NP07 ( $GS < 0.2$ ). The genetic backgrounds of unknown parent lines were derived from the combination of cv.TLG2/ NBM after cluster analysis. The genetic relationship from morphological trait analysis showed that it was similar to the result determined by ISSR markers. Further, the results also showed that 3 sets of ISSR markers could help distinguishing cv.TLG2 from the rest of the evaluated napiergrass germplasms.

Key words : Napiergrass, ISSR marker, Genetic relationship.

---

(1) Contribution No. 1530 from Livestock Research Institute, council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Crop Science Division, Agricultural Research Institute, COA, Taichung 413, Taiwan R.O.C.

(3) Forage Crop Division, Livestock Research Institute, COA, Tainan 712, Taiwan R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: d95621105@ntu.edu.tw

