

# 利用 ISSR 技術探討台灣地區狼尾草種原遺傳歧異度<sup>(1)</sup>

林正斌<sup>(2)</sup> 李姿蓉<sup>(2)</sup> 林明村<sup>(2)</sup> 蘇建安<sup>(3)</sup> 侯金日<sup>(3)(4)</sup>

收件日期：100 年 6 月 29 日；接受日期：100 年 12 月 12 日

## 摘要

狼尾草 (*Pennisetum purpureum*) 為台灣主要牧草之一，大部分為自交不稔之常異交植物。因此，偶而會有雜交種子產生及後裔分離情形，為探討其遺傳變異，本試驗利用搜集自台灣地區 14 個縣市之 105 個的野生狼尾草種原，取幼嫩葉尖 DNA 後利用簡單重複序列區間 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 技術，獲得 14 個具有多型性及再現性良好的引子，利用分子變異分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 分析樣品間之變方分析及遺傳距離矩陣。結果顯示，族群內變方佔總變方之 96.95% ( $P < 0.1391$ )，遺傳分化指數 ( $G_{st}$ ) 為 0.2065，基因流 ( $N_m$ ) 為 1.9217。計算遺傳距離與樹狀圖得到二者間之協表相關係數 (cophenetic correlation coefficient)  $r = 0.777$ 。各縣市之遺傳距離介於 0.0488 至 0.1833 間，以遺傳相似度 0.09 為截點，可將 14 個縣市分為 6 群，分別為第 1 群：彰化；第 2 群：台東；第 3 群：南投、花蓮；第 4 群：台中、嘉義、雲林、台南、屏東、高雄；第 5 群：桃園、苗栗、新竹；第 6 群：台北。主座標分析 (principal coordinate analysis) 顯示，將 14 個縣市分成 6 群之三度空間解釋能力可達 75.74%。因此，以 ISSR 技術可將臺灣野生狼尾草樣本分成 6 群，藉以探討其遺傳歧異度。

關鍵詞：狼尾草、簡單重複序列間、遺傳歧異度、群叢分析。

## 緒言

狼尾草為國內主要栽培牧草之一 (成等, 1992)，如狼尾草台畜草二號為目前栽培面積最多的品種，以 2009 年為例，台灣栽培面積約達 2332 公頃 (農業統計年報, 2009)，鮮草年產量每公頃可達 250 公噸，乾物量約 40 公噸，其酸洗纖維 (acid detergent fiber, ADF) 約 40%，中洗纖維 (neutral detergent fiber, NDF) 約 60%，是一產量高及品質佳之牧草，其莖稈無性繁殖容易。民國 85 年育成之狼尾草台畜草二號為四元體 ( $2n = 28$ )，其是由狼尾草品系間選出之優良親本進行種內雜交，而選出之優良品種 (成等，

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1710 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所飼料作物組。

(3) 國立嘉義大學農藝學系。

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

1992)，因其為異質多元體，其後代若雜交結為種子，則後裔將分離成許多不同型態的植株，故使得台灣野外地區到處散佈不同特性之狼尾草品系。隨著分子生物學的發展，以DNA為基礎的技術能更有效的偵測物種遺傳變異，其中Simple Sequence Repeat (SSR)、Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 和Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 等分子標誌方法，已成為作物遺傳歧異度分析及品種鑑定之良好工具（陳等，2007; 2009; 2010, Anderson and Fairbanks, 1990; Smith and Smith, 1992; Wolfe and Liston, 1998）。但各種核酸標記的方法都具有優缺點，如AFLP操作較麻煩，RAPD再現性較低，SSR則須事先知道DNA序列才能使用，而ISSR則可解決上述問題，不需事先知道DNA序列（Gupta *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 1997），反應中只放入單一引子，操作簡單，且引子序列長16-25mer，粘合溫度高且電泳圖譜具較高比例之多型性出現（Zietkiewics *et al.*, 1994）。吳和成（2010）即曾利用ISSR技術探討狼尾草與紫色狼尾草雜交後裔與親本之關係。顯示ISSR應用於親源鑑定及遺傳歧異度探討。因此，本試驗藉由野生狼尾草DNA萃取並以ISSR技術，探討野生狼尾草種原之遺傳歧異度並予以歸群，以做為後裔評估之參考。

## 材料與方法

### I. 材料

植物材料盡可能搜集來自台灣地區各縣市的狼尾草族群，每個縣市平均取樣 4 點，共收集 104 個樣品（第 105 個樣品為狼尾草台畜草 2 號，為對照）（圖 1）。參試材料分別於行政院農業委員會畜產試驗所（台南市新化）及國立嘉義大學農藝系(嘉義市) 栽培，田間設計採用完全逢機（completely randomized design, CRD）設計，重複三次。肥料用量與田間栽培管理同狼尾草一般栽培管理法。

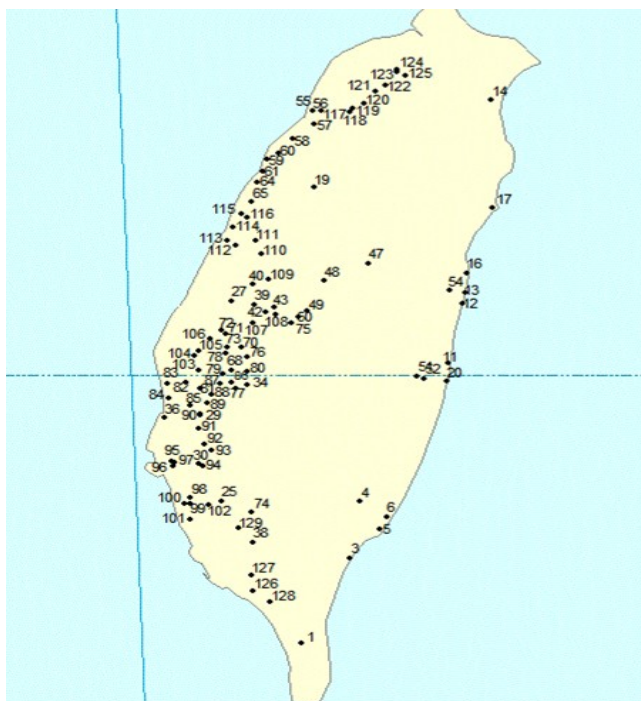


圖 1. 狼尾草種原樣本搜集取樣分佈圖。

Fig. 1. Collection sites of napiergrass germplasm samples in Taiwan.

## II.方法

試驗所用之ISSR引子使用UBC (University of British Columbia) 合成之第九組引子，共有 100 組不同的核酸引子 (UBC 801 - 900 之系列簡稱為# 9 系列)，引子序列長度為 17-22 mer，由簡單的重複鹼基序列組成。PCR分析於總體積為 25  $\mu$ L之反應混合物中進行，內容物包括 50 ng/ $\mu$ L之template DNA、1.5  $\mu$ M之primer、10 mM之dNTP、0.5  $\mu$ L之 *Taq* DNA Polymerase、2.5  $\mu$ L PCR Buffer和 20.3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。由 100 個引子中選出UBC807、UBC808、UBC809、UBC810、UBC816、UBC817、UBC834、UBC840、UBC842、UBC847、UBC888、UBC889、UBC890 及UBC891 等 14 個具有多型性且再現性良好之引子 (表 1)，聚合酵素連鎖反應儀器採用Bio-Rad公司出產之梯度基因擴增儀器 (型號: Mycycler)，進行 105 個樣本 (第 105 號樣品為狼尾草台畜草 2 號，做為對照) 之PCR反應。反應溫度條件設定如下：94°C 5 min，再進行 35 次 94°C 30 sec、51°C 1 min、72°C 1 min 30 sec共 35 個循環，及 72°C 5 min，最後降溫至 4°C 備用，以供電泳分析。

表 1. 狼尾草種原分析之 ISSR 引子序列

Table 1. DNA sequences of ISSR primers for napiergrass germplasm study

Primers	Sequence (5' to 3' )	Product Size (bp)
UBC807	AgAgAgAgAgAgAgT	500-2000
UBC808	AgAgAgAgAgAgAgC	500-1500
UBC809	AgAgAgAgAgAgAgg	400-1500
UBC810	gAgAgAgAgAgAgAT	300-1000
UBC816	CACACACACACACAT	700-2000
UBC817	CACACACACACACAA	600-2000
UBC834	AgAgAgAgAgAgAgYT	400-1000
UBC840	gAgAgAgAgAgAgAYT	400-800
UBC842	gAgAgAgAgAgAgAYg	300-2000
UBC847	CACACACACACACARC	400-2000
UBC888	BDBCACACACACACA	600-2000
UBC889	DBDACACACACACAC	500-1500
UBC890	VHVgTgTgTgTgTgT	300-2000
UBC891	HVHTgTgTgTgTgTg	300-1500

### (i) 分子性狀統計分析

將 ISSR 分子標誌所得之條帶出現記錄為 1 (出現) 和 0 (未出現)，依其 Dice 係數 (Dice, 1945) 之定義計算其相似性度 (similarity)。

### (ii) 分子變方分析 (AMOVA)

以 Excoffer *et al.*(1992)所發表兩族群間的距離公式，求得距離矩陣 D，並進行分子變方分析 (analysis of molecular variance, AMOVA)。

### (iii) 遺傳多樣性分析 (POPGENE)

採用 POPGENE 3.2 套裝軟體 (Yeh *et al.*, 1999) 計算各種源間的族群分化 (Gst) 遺傳分化係數 (coefficient of gene differentiation) (Nei, 1973)，再利用 Gst 估算基因流 (gene flow, Nm)。

### (iv) UPGMA 歸群及主座標分析

應用 NTSYS-pc ver 2.0 套裝軟體 (Rohlf, 1993)，所計算出之各樣本間Dice相似度矩陣及AMOVA

計算出地區間之距離 ( $\Phi_{st}$ ) 矩陣，以 NTSYS-pc ver 2.0 的 SAHN 程式、UPGMA (unweighed pair-group method using arithmetic averages) 方法進行各地區的歸群分析繪出樹狀圖 (dendrogram)，並做主座標分析 (principal coordinate analysis)，可得到各地區三維空間的立體圖。以 NTSYS-pc BIOM 軟體的 Mantel test (Mantel, 1967) 檢測遺傳距離矩陣 ( $\Phi_{st}$ )。由 UPGMA 歸群分析和原距離矩陣間的協表相關係數 ( $r$ ) 也是透過 Mantel Z 統計完成。

## 結果與討論

環境的差異使植物產生不同的淘汰壓力，植物因此而分化產生不同的生態型 (Singh *et al.*, 1998)。有關品種的鑑定也常礙於外表型資料有限，且外表型特徵易受環境影響而改變，導致難以單純用外表型鑑定親緣較近的品種 (Sanz-Cortes *et al.*, 2001)。隨著分子生物學的發展，以 DNA 為基礎的技術則可更靈敏的偵測物種遺傳變異。

本試驗所用之 100 組引子，利用不同溫度進行最適合之粘合溫度測試，篩選出粘合溫度 51°C 及 UBC807、UBC808、UBC809、UBC810、UBC816、UBC817、UBC834、UBC840、UBC842、UBC847、UBC888、UBC889、UBC890 及 UBC891 等 14 個具有多型性且再現性良好之引子 (表 1)，予以分析 14 個縣市。其中以引子 UBC807、UBC847 及 UBC890 所產生的條帶數較多，分別為 9、10 及 10 條，UBC840 所產生條帶數最少為 5 條，多型性條帶僅 3 條。105 個樣品，以 ISSR 技術所得電泳圖所顯示，以 UBC807 進行 105 個狼尾草樣品分析，在介於 500 至 2000bp 之間具 DNA 多型性條帶出現 (圖 2)。

經由 AMOVA 結果顯示，族群間的變方成分佔總變方的 3.05% ( $P < 0.1656$ ) (表 2)，結果顯示有 96.95% ( $P < 0.1391$ ) 的變方成分存在於族群內，族群間變方僅佔 3.05% ( $P < 0.1656$ )，陳等 (2010) 在評估台灣地區的天竺草報告中，指出當族群內變方大於族群間變方，顯示其主要之變異存在於族群內，族群內的基因庫豐富度較高，有助於對環境的適應力。進一步分析狼尾草樣本間的遺傳多樣性關係，以 POPGENE 3.2 版軟體分析遺傳差異，狼尾草分析結果如表 3 所示，總 Nei's 遺傳歧異度 ( $H$ ) 值為 0.3591，族群分化係數 ( $G_{st}$ ) 值為 0.2065，再由分化係數換算得基因流 ( $N_m$ ) 為 1.9217，在各地區間之遺傳歧異度從 0.2173-0.3381，其中以南投地區之遺傳歧異度最高，台北地區之遺傳歧異度最低。根據 Hamrick and Godt (1990) 分析 121 種演替後期的植物之平均變異 ( $G_{st} = 0.101$ )，134 種風媒花異交植物 ( $G_{st} = 0.099$ )，78 種自交植物 ( $G_{st} = 0.510$ )，124 種蟲媒花異交植物 ( $G_{st} = 0.197$ )，有性無性繁殖並行的植物 ( $G_{st} = 0.213$ )。陳等 (2010) 亦曾以台灣地區之自交作物天竺草 (*Panicum maximum*) 測得之  $G_{ST}$  為 0.5779。本試驗以 ISSR 分析狼尾草族群遺傳分化指數分別為  $G_s = 0.2065$ ，顯示狼尾草較偏向有性及無性並行的植物，此結果與成等 (1992) 指出之狼尾草之繁殖方式相似。

依據 Wright (1931) 認為族群間的基因流  $N_m$  值若大於 1，則顯示遺傳構造均值化，反之，若  $N_m$  值若小於 1，則表示基因流受到部份地理阻礙。基因流使兩個地方性族群的基因庫 (gene pool) 產生交流，則族群分化程度便會降低 (Slatkin, 1987)。另有二位學者 Ellstrand and Elam (1993) 則認為基因流值只要大於 0.5 則被認為足以克服隨機漂變所造成的分化。本試驗以 ISSR 探討野生狼尾草之遺傳歧異度，顯示族群基因歧異度 ( $H$ ) 為 0.359，各地區介於 0.2173-0.3381，以南投地區最高，台北最小。遺傳分化 ( $G_{st}$ ) 為 0.2065、基因流 ( $N_m$ ) 為 1.9217。上述顯示野生狼尾草族群具有偏高的基因歧異度，基因流呈現均值化現象，並未有隨機漂變所造成的分化，而狼尾草基因流 (gene flow) 高達 1.9217，則可能原因是如 Slatkin (1987) 認為是不同地方性族群的基因庫產生交流所致。

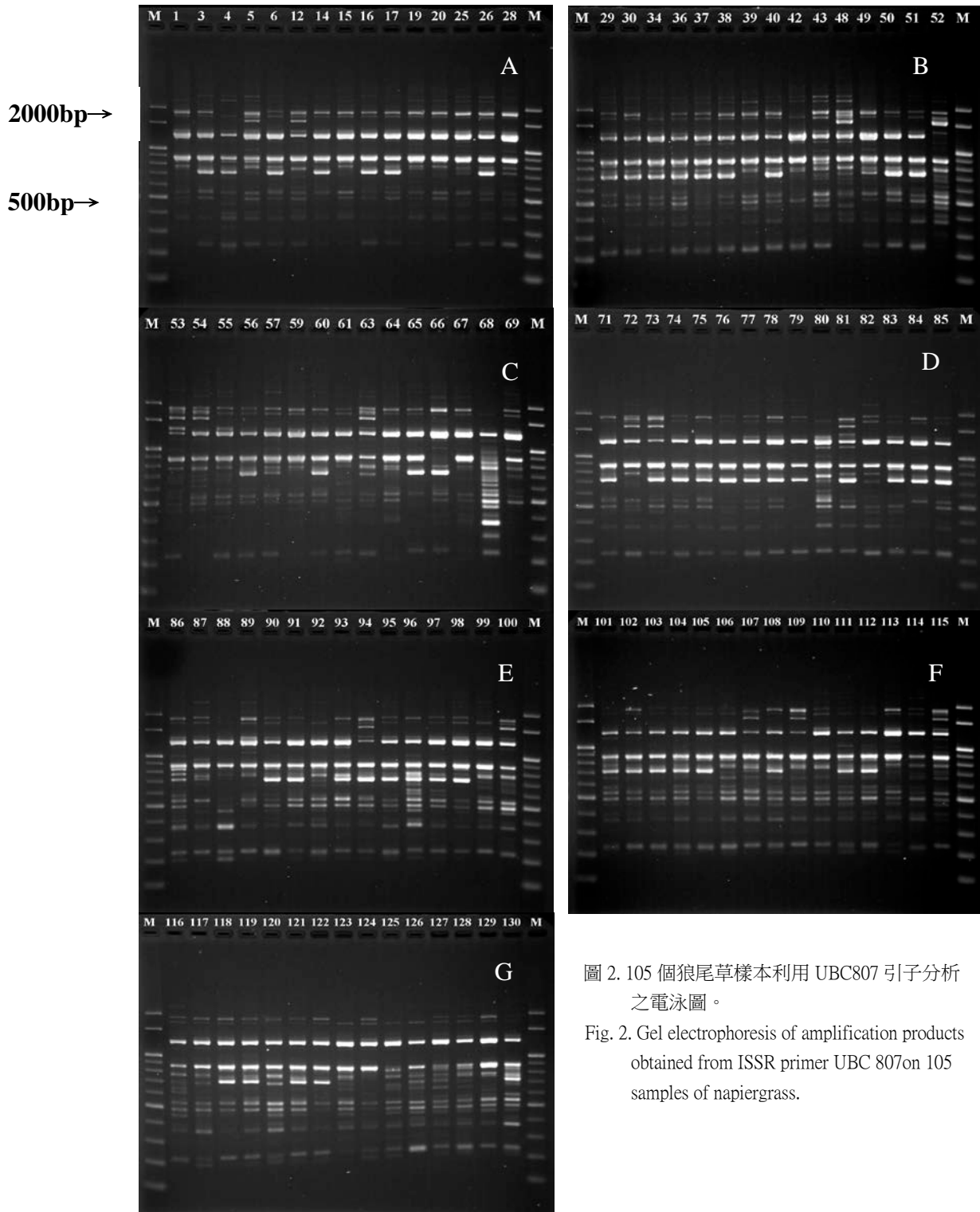


圖 2. 105 個狼尾草樣本利用 UBC807 引子分析之電泳圖。

Fig. 2. Gel electrophoresis of amplification products obtained from ISSR primer UBC 807 on 105 samples of napiergrass.

表 2. 105 個狼尾草樣本 ISSR DNA 分子標誌 AMOVA 變方分析

Table 2. Variation analysis by AMOVA program for 105 napiergrass germplasm samples based on ISSR DNA markers

Source of variation	df*	SSD	MSD	Variation component	Total variance (%)	P-value
Variance among populations	13	145.78	11.21	0.29	3.05	0.1656
Variance within populations	91	829.38	9.11	9.11	96.95	0.1391

df: degrees of freedom; SSD: Sum of Square; MSD: Mean Square.

表 3. 狼尾草種原 ISSR 分析之遺傳變異分析 (POPGENE) 結果

Table 3. POPGENE analysis of napiergrass germplasms based on ISSR DNA markers

Location	N*	H	I	Gst	Nm
Taipei	4	0.2173	0.3189		
Kaohsiung	6	0.3367	0.4867		
Yunlin	7	0.3304	0.4821		
Changhua	5	0.2720	0.3983		
Taichung	7	0.2873	0.4171		
Pingtung	8	0.2974	0.4377		
Taoyuan	4	0.2274	0.3326		
Hualien	8	0.3363	0.4882		
Chiayi	20	0.3138	0.4677		
Nantou	8	0.3381	0.4952		
Tainan	11	0.2963	0.4344		
Taitung	5	0.2892	0.4228		
Miaoli	6	0.2183	0.3212		
Hsinchu	6	0.2197	0.3235		
Total	105	0.3591	0.5358	0.2065	1.9217

\*: N = the number of samples

H = Nei's (1973) gene diversity

I = Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

Gst = proportion of the total diversity among populations

Nm = gene flow

14 個地區 104 樣品之狼尾草，經由 ISSR 分析結果，再利用 NTSYS-pc ver 2.0 套裝軟體進行 UPGMA 歸群分析，由表 4 得知 14 個地區間之遺傳距離介於 0.0488 至 0.1833 間，其中以嘉義地區與雲林地區之遺傳距離最近，為 0.0488；而彰化地區與台東地區之遺傳距離最遠，為 0.1833，其次為彰化地區與台北地區，遺傳距離為 0.1831。

在遺傳相似度 0.09 處為截點，則可將台灣地區之野外搜集 104 個狼尾草樣品分為 6 群（圖 3），第 1 群由彰化獨立為一群；第 2 群台東在 0.11 處獨立為一群；第 3 群：南投地區與花蓮地區在 0.076 處歸成為一小群；第 4 群：台中地區、嘉義地區、雲林地區、台南地區、屏東地區及高雄地區於 0.088 處歸為一群；第 5 群：桃園地區、苗栗地區及新竹地區於 0.084 處歸為一群；第 6 群：台北獨立為一群，此

結果顯示台灣地區野生狼尾草樣品大致可分為北、中、南、東等四大群，而台北及台東各獨立為一群，可能為地理因素區隔所致，南投與花蓮為一群可能為交通連接因素影響，陳等（2010）進行天竺草（*Panicum maximum*）分析，亦有相似之結果，而彰化獨立為一群則有待更深入的探討。經 ISSR 分析結果之 DNA 片段，進行頻度分析（Nei, 1973），計算出狼尾草之遺傳距離，再進行歸群分析，經比對遺傳距離矩陣與樹狀圖關係矩陣，得到協表相關係數  $r$  值為 0.777。一般而言，計算兩樣本之遺傳相似度，建立一個遺傳距離矩陣，再以 UPGMA 進行歸群分析繪出樹狀圖，樹狀圖與原遺傳距離矩陣的協表相關係數（ $r$ ）， $r \geq 0.90$  表示樹狀圖與原距離矩陣有很高的吻合度，表示歸群圖尚未扭曲嚴重，可表現出真實之群團狀態。若介於  $0.7 \leq r \leq 0.8$  之間，顯示樹狀圖有某種程度的扭曲（Lalrhuaitluanga and Prasad, 2009）。

表 4. 狼尾草種原樣本 ISSR 分析之遺傳距離矩陣

Table 4. Genetic distance matrix ( $\Phi_{st}$ ) based on the ISSR results of napiergrass germplasm samples

	Taipei	Kaohsiung	Yunlin	Changhua	Taichung	Pingtung	Taoyuan	Hualien	Chiayi	Nantou	Tainan	Taitung	Miaoli	Hsinchu
Taipei	0													
Kaohsiung	0.155	0												
Yunlin	0.136	0.0965	0											
Changhua	0.1831	0.1417	0.1174	0										
Taichung	0.1435	0.1015	0.0886	0.1562	0									
Pingtung	0.1537	0.0936	0.0694	0.1535	0.0797	0								
Taoyuan	0.1046	0.1395	0.0962	0.148	0.1165	0.1025	0							
Hualien	0.1425	0.1066	0.113	0.1453	0.1069	0.1255	0.1383	0						
Chiayi	0.1372	0.0861	0.0488	0.1348	0.0599	0.0603	0.087	0.1005	0					
Nantou	0.1737	0.1017	0.0661	0.1217	0.1047	0.0894	0.1168	0.0763	0.0727	0				
Tainan	0.1702	0.0803	0.0801	0.1337	0.1076	0.0596	0.1076	0.1247	0.0522	0.0784	0			
Taitung	0.133	0.1505	0.1115	0.1833	0.1168	0.1236	0.1164	0.1033	0.0796	0.0927	0.1356	0		
Miaoli	0.1209	0.1733	0.1455	0.1254	0.1667	0.1686	0.0905	0.1289	0.1462	0.1372	0.1694	0.1329	0	
Hsinchu	0.131	0.1214	0.1247	0.0996	0.1145	0.1308	0.0711	0.1381	0.1066	0.1258	0.1141	0.1401	0.084	0

經 AMOVA 計算出地區間之遺傳距離（ $\Phi_{st}$ ）矩陣，以 NTSYS 進行主座標分析（PCA）的結果（圖 4），在狼尾草種原方面，第 1 群由彰化獨立為一群；第 2 群台東處獨立為一群；第 3 群：南投地區與花蓮地區在歸成為一小群；第 4 群：台中地區、嘉義地區、雲林地區、台南地區、屏東地區及高雄地區歸為一群；第 5 群：台北地區、桃園地區及新竹地區歸為一群；第 6 群：苗栗獨立為一群，合計可解釋空間的變化關係達 75.74% 之總變異，即三維空間解釋分成 6 群之能力可達 75.74%。由主座標分析與樹狀圖之結果相近，顯示 ISSR 分子標誌解析能力相近，整體結果與歸群樹狀圖相似。

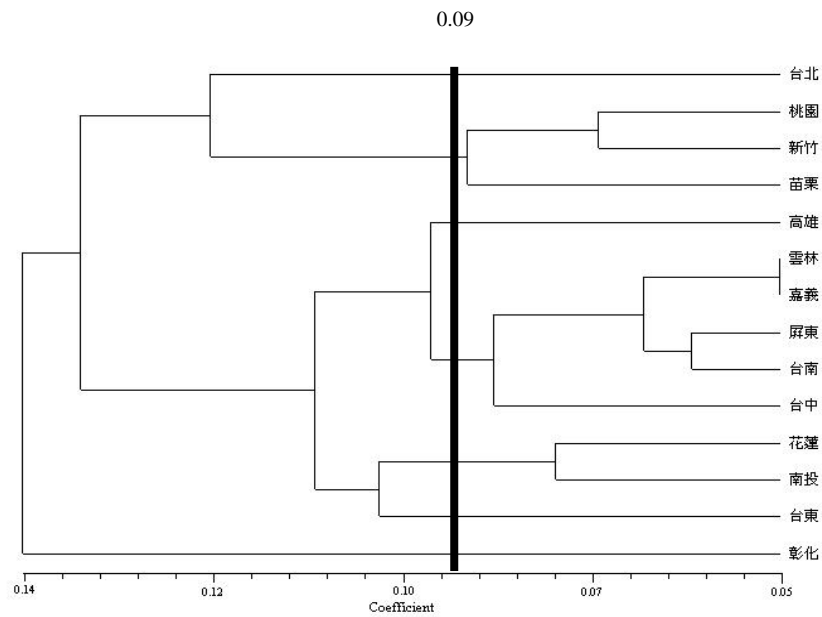


圖 3. 狼尾草種原以 ISSR 分子標誌利用 UPGMA 製作之歸群樹狀圖。

Fig. 3. UPGMA dendrogram based on the results of ISSR DNA markers of napiergrass germplasms.

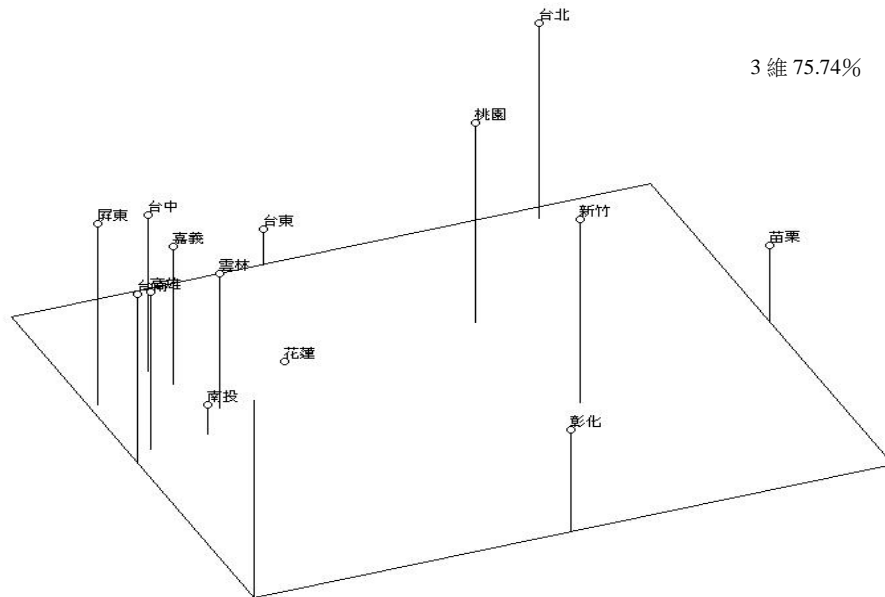


圖 4. 狼尾草種原樣本 ISSR 分析結果之 3 維之主座標分析圖。

Fig. 4. Results of 3-dimensional principal coordinate analysis based on the ISSR DNA fragments of napiergrass germplasm samples.



## 誌謝

本研究承蒙國立嘉義大學何坤益教授分析之協助、行政院農業委員會畜產試驗所許福星組長及成游貴博士提供技術及試驗分析上之建議，特此致謝。

## 參考文獻

- 成游貴、吳建福、羅國棟、唐清芩、張溪泉、陳文、黃耀興、卜瑞雄。1992。狼尾草育種。畜產研究 25: 151 - 170。
- 吳東鴻、成游貴。2010。狼尾草品系之ISSR親源分析。畜產研究 43(1)：59-71。
- 陳美如、侯金日、林正斌、侯新龍。2007。台灣地區天竺草 (*Panicum maximum*) 農藝性狀分群之研究。中華民國雜草學會會刊 28(1): 38-58。
- 陳美如、侯金日、侯新龍、林正斌。2009。以 RAPD 技術探討台灣地區天竺草之遺傳歧異度。中華民國雜草學會會刊 30(1): 37-58。
- 陳美如、侯金日、林正斌、侯新龍。2010。利用 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) 探討台灣天竺草之遺傳變異。台灣農學會報 11(4): 356-373。
- 農業統計年報。2009。行政院農業委員會出版。台北。
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302.
- Ellstrand, N. C. and D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size : implications for plant conservation. Ann. Rev. Ecol. System. 24: 217-242.
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.
- Goodwin, I. D., E. A. B. Aitken and L. W. Simith. 1997. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18: 1524-1528.
- 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 repeat. Theor. Appl. Genet. 89: 998-1006.
- Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. 1990. Allozyme diversity in plant species. In A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir [eds.], Plant population genetics, breeding, and genetic resources, 43-63. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Lalhrualtuanga, H. and M. N. V. Prasad. 2009. Comparative results of RAPD and ISSR markers for genetic diversity assessment in *Melocanna baccifera* Roxb. Growing in Mizoram State of India. Afr. J. Biotechnol. 8: 6053-6062.
- Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.

- Rohlf, F. J. 1993. NYSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Applied Biostatistics.
- Sanz-Cortes, F., M. L. Badenes, S. Paz, A. Iniguez and G. Llacer. 2001. Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126(1): 7-12.
- Singh, A. K., J. Smart, C. E. Simpson and S. N. Raina. 1998. Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut, *Arachis hypogaea* L. Genet Resour Crop Evol. 45: 119-126.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236: 787-792.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics 16 : 97-159.
- Yeh, F. C., R. C. Yang, T. B. J Boyle, Z. H. Ye and J. X. Mao. 1999. POPGENE 3.2, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

# The genetic diversity of *Pennisetum purpureum* germplasms by ISSR technique in Taiwan<sup>(1)</sup>

Jeng-Bin Lin<sup>(2)</sup> Tzu-Rung Li<sup>(2)</sup> Ming-Tsun Lin<sup>(2)</sup>

Cheng -Zan Su<sup>(3)</sup> and Chin-Jin Hou<sup>(3) (4)</sup>

Received : Jun. 29, 2011 ; Accepted : Dec. 12, 2011

## Abstract

Napiergrass (*Pennisetum purpureum*) is one of the important perennial forage grasses in Taiwan. It is mostly self-sterile, sometimes it will get hybrid seeds and grow in the field. In this study, we collected 105 samples from 14 counties in Taiwan for determining the genetic diversity with DNA extracted from the leaves by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers. According to ISSR analysis, 14 UBC primers were polymorphic. Analysis molecular of variance analysis (AMOVA) was used to determine for the variance and genetic matrix of samples. Results showed that the variance was 96.95% ( $P < 0.1391$ ) within population. The value of genetic differentiation ( $G_{ST}$ ) was 0.2056, and the gene flow ( $N_m$ ) was 1.9217. The value of genetic distance and geographic distance for napiergrass samples was  $r = 0.777$ . The genetic distance matrix ranged from 0.0488 to 0.1833. These could be divided into 6 groups based on the genetic similarity with 0.09 as the critical point. It included the 1<sup>st</sup> group with Changhua, the 2<sup>nd</sup> with Taitung, the 3<sup>rd</sup> with Nantou and Hualien, the 4<sup>th</sup> with Taichung, Chiayi, Yunlin, Tainan, Pingtung and Kaohsiung, the 5<sup>th</sup> with Taoyuan, Miaoli and Hsinchu, and the 6<sup>th</sup> with Taipei, respectively. Therefore the napiergrass germplasms can be collected from 6 locations for in Taiwan determining genetic diversity and breeding projects by ISSR technique Taiwan.

Key words : *Pennisetum purpureum*, ISSR, Genetic diversity, Cluster analysis.

---

(1) Contribution No.1710 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Division of Forage Crops, Livestock Research Institute, Council of Agricultural Executive Yuan, Hsinhua, Tainan, 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Department of Agronomy, National Chiayi University, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail : houcj@mail.ncyu.edu.tw