

# 以RAPD及SSR分子標誌進行樹薯種原遺傳歧異分析及種原鑑定<sup>1</sup>

陳述<sup>2,4</sup> 范宗宸<sup>3</sup> 林俊義<sup>2</sup>

## 摘 要

陳述、范宗宸、林俊義。2007。以 RAPD 及 SSR 分子標誌進行樹薯種原遺傳歧異分析及種原鑑定。台灣農業研究 56:327-337。

本研究之植物材料為台灣目前所保存的 21 個樹薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 種原品種 (系)，首先利用逢機增殖多型性 (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) 分子標誌，進行樹薯種原遺傳歧異分析，以探討各種原間之親緣關係。之後再進一步加以簡單序列重複 (Simple Sequence Repeat; SSR) 分子標誌進行種原鑑定，主要目的在於期望能將 21 個樹薯品種 (系) 進行完全地區分鑑別。RAPD 試驗結果所獲得的 156 條多型性片段，經群集分析，21 個樹薯種原可區分成為 4 群，以提供育種參考。而以 11 組 intra-SSR 引子進行試驗，獲得 32 條多型性片段，經由這些多型性片段的組合，可成功地將 21 個樹薯品種 (系) 進行完全的區分，顯示 SSR 分子標誌在樹薯種原鑑定，為一強而有力之工具。

**關鍵詞：**樹薯、遺傳歧異、種原、鑑定、逢機增殖多型性、簡單序列重複。

## 前 言

樹薯為大戟科 (Euphorbiaceae) 一年或多年生之熱帶作物，起源於墨西哥南部、瓜地馬拉及巴西的亞馬遜河流域，為非洲近撒哈拉等土壤貧瘠地區，約 5 億以上人口百分之 60 的熱量來源 (FAO and IFAD 2000)。此外，樹薯亦為重要能源作物，面對目前全球能源危機日漸嚴重，急需開發生質能源，樹薯與玉米、甘藷等皆屬於澱粉類作物，這些作物透過發酵過程，可生產生質乙醇 (酒精)，供作燃料或與汽油混合後，提供汽車使用 (Lin 2007)。

學者曾就蛋白質層次的同功異構酵素 (isozyme) 針對樹薯進行鑑定 (Hussain *et al.* 1987; Ramirez *et al.* 1987; Lefevre & Charrier 1993)，但受限於可供鑑定的遺傳標誌基因座有限，所以產生的多型性不夠而無法進行有效的鑑定區分。由於 DNA 層次可提供大量的分子標誌數目，因此無論進行樹薯鑑定或遺傳歧異分析，都是很好的工具 (Beeching *et al.* 1993)。曾經利用於樹薯的分子標誌有：RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Fregene *et al.* 1994)、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Marmey *et al.* 1994; Wong *et al.* 1997)、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 等 (Roa *et al.* 1997; Wong *et al.* 1998; Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1999; Elias *et*

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2306 號。接受日期：96 年 12 月 15 日。
2. 行政院農業委員會農業試驗所作物種原組助理研究員、農業試驗所所長。
3. 亞洲大學生物科技系副教授。
4. 通訊作者，電子郵件：cshu@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23331673。

al. 2000)。在這些 DNA 分子標誌中，SSR 為較特殊的分子標誌，其遺傳機制主要是根據高等生物具有很高比例的 DNA 重複序列，不但在不同物種間重複序列的數目有很大遺傳變異，在不同品種間亦有很大的差異。SSR 分子標誌又可分為兩種類型，根據聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction; PCR) 反應之產物不同，若屬於重複序列內產物之擴增，稱為 intra-SSR；至於重複序列之間的產物擴增，稱為 inter-SSR 或 ISSR。學者們發現樹薯種原具有 GA 簡單重複序列 (GA)<sub>14</sub> (Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1998)。因此國際熱帶農業中心 (International Center for Tropical Agriculture; CIAT) 便針對樹薯應用 SSR 進行遺傳歧異分析與種原鑑定 (Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1998, 1999; Roa *et al.* 2000)。

由於樹薯可作為能源作物，重要性將日益提升。本研究之目的係針對台灣目前所保存的 21 個珍貴的樹薯種原品種 (系)，先利用可產生大量條帶的 RAPD 分子標誌，進行樹薯種原之遺傳歧異度分析，以探討各種原間之親緣關係；之後再進一步以 intra-SSR 分子標誌，進行種原鑑定，主要目的在於期望能將所有的 21 個種原都可以進行完全的區分鑑別，以做為種原保育之依據。

## 材料與方法

### 供試植物材料

本試驗所採用之樹薯種原係保存於台東區農業改良場，包括：台南育 1-7 號、埔里選 1 號、烏枝仔、甜木薯、Hicran、Roti、Lunclnan、Bitter、Chirgwi、Veipueen、Green twig、Black twig、Turai、Matnenot、Medan 等，共計 21 個品種 (系)。

### 種原性狀調查

調查項目包括：葉色、葉脈色、葉柄色、葉片長／寬比值、莖圍、分支數、株高等。

### 植物體基因組 DNA 之萃取

主要參考 Doyle & Doyle (1990) 所提之方法進行部份修改以萃取植物體基因組 DNA。取約 0.25 g 植株嫩葉，以液態氮研磨後迅速加入 500  $\mu$ L 已預熱至 60°C 的 DNA 萃取緩衝液，置於 60°C 水浴 1 小時，並間歇搖動。取出離心管靜置冷卻至室溫後，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液倒至另一新的 1.5 mL 小離心管中，並加入 500  $\mu$ L chloroform / isoamylalcohol (24:1) 溶液混勻，再以 14,000 rpm 離心 20 分鐘使兩液相分離，取上清液加入 300  $\mu$ L -20°C 的 isopropanol 以沉澱 DNA。以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 1 mL wash buffer (75% ethanol, 10 mM ammonium acetate) 混勻，於 14,000 rpm 離心 10 分鐘後倒掉上清液，將 DNA 沉澱進行乾燥後加入 50  $\mu$ L 無菌水溶解，並加入 RNase (10  $\mu$ g/mL) 於 37°C 下反應 30 分鐘。所抽得的 DNA 均經 OD 值測定與電泳，以判別 DNA 的濃度與品質檢測。

### RAPD 試驗

本研究共採用 14 個隨機引子，即 OPERON kit 之 OPC 1, OPC 5, OPG 2, OPG 8, OPG 13, OPG 18, OPO 10, OPO 13, OPO 20, OPW 2, OPW 4, OPW 6, OPW 13, OPY 1 等。PCR 反應係參考 Oard & Dronavalli (1992) 略作修改，本試驗反應總體積為 30  $\mu$ L，內含 1.2 unit *Taq* polymerase (Promega)、1X PCR buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.1% Triton 100)、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ M dNTP、0.2  $\mu$ M primer 及 50 ng template DNA。PCR 反應係於 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600 進行，反應溫度條件設定為前 2 循環：94°C，3 min；40°C，1 min 20 sec；72°C，1 min 30 sec。之後續以 94°C，1 min；40°C，1 min；72°C，2 min 的反應溫度條件進行 43 個循環。最後置於 72°C，

5 min。反應完成後自動降溫保存於 4°C 下。增殖產物之偵測以 2% agarose 在 1X TAE buffer (40 mM Tris acetate, pH 8.0; 1 mM EDTA) 進行 DNA 電泳, 並以 DNA molecular weight marker XVI (250 bp ladder) (Roche, 德國) 做為分子量標誌, 電泳槽係採用 Mupid-2 (Cosmo, 日本), 電壓設定 100 伏特, 經電泳 20-30 分鐘結束後置於 0.5 mg/mL 的 ethidium bromide 染色 10-20 分鐘, 以 UV 光檢視 agarose 膠體上的 DNA 多型性片段, 並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, 美國), 以進行後續的資料分析。

集群分析係將上述貯存於 IS 2000 Digital Imaging System 中的 RAPD 產物電泳影像 TIF 檔, 以 GelCompar 軟體 (Applied Maths BVBA) 將電泳條帶結果轉換為 +/— 型態之資料型式, 再加以文書處理轉成 1/0 之資料型式。於 SAS 軟體中撰寫程式, 將此 1/0 的資料檔, 以 Jaccard's coefficient (Jaccard, 1908) 為基礎, 再以 SAS 軟體之 CLUSTER procedure UPGMA 進行集群分析。

### SSR 試驗

本研究共採用 13 個 SSR 引子, 即 SSRY9, SSRY11, SSRY12, SSRY14, SSRY25, SSRY49, SSRY63, SSRY68, SSRY75, SSRY76, SSRY91, SSRY93, SSRY106 (Chavarriga-Aguirre *et al.* 1998)。PCR 反應係參考 Litt & Luty (1989) 略作修改, 本試驗反應溶液總體積為 30  $\mu$ L, 內含 1.2 unit Fast Start Taq DNA polymerase (Roche)、1  $\times$  PCR buffer (Roche)、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ M dNTP、2.5  $\mu$ M primer 及 50 ng template DNA。PCR 反應係於 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600 進行, 反應溫度條件設定為第 1 循環: 94°C, 3 min; 之後續以 94°C, 1 min; 53°C, 2 min; 72°C, 2 min 的反應溫度條件進行 30 個循環。最後置於 72°C, 5 min。反應完成後自動降溫保存於 4°C 下。經 PCR 反應增殖之 DNA 產物, 以 3.25% 的 agarose 在 1X TBE buffer 中進行電泳 (Mupid-2 Cosmo), 而後將電泳膠片置於 ethidium bromide 中染色 20-30 min, 再以 UV 光檢視膠體上的 DNA 擴增片段, 並將影像貯存於 IS2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation)。

## 結 果

### 樹薯種原性狀調查

本研究針對樹薯種原性狀調查的結果詳如表 1。21 個樹薯品種 (系) 之葉色皆為綠色; 葉脈及葉柄的顏色則有紅色及綠色之分, 就葉脈與葉柄色之組合, 可將樹薯種原區分為四種型態, 葉脈與葉柄皆為紅色的種原占最多數, 共有 9 個, 包括: 台南育 1、5、6、7 號, 以及埔里選 1 號、甜木薯、Bitter、Chirgwi 與 Medan。其次為葉脈與葉柄皆為綠色的種原共有 8 個, 即台南育 2、3、4 號, 以及 Hicran、Roti、Veipueen、Green twig 與 Turai。葉脈綠色而葉柄紅色的種原有烏枝仔、Lunclnan 與 Matnenot。葉脈紅色而葉柄綠色的種原只有 Black twig。

此外, 表 1 結果亦顯示樹薯各品種 (系) 之間在葉片的長/寬比、莖圍、分支數並無較明顯可辨別的差異。21 個樹薯品種 (系) 的株高分布範圍, 平均在 131 $\pm$ 23.84 cm 至 236 $\pm$ 27.50 cm 之間, 高達 200 cm 以上的樹薯品種 (系) 有台南育 4 號、Bitter、Turai、Matnenot 及 Medan 等。

### 應用 RAPD 分子標誌進行樹薯種原遺傳歧異分析

本研究首先經由篩選獲得了 14 個隨機引子, 這些引子主要特色為可在 21 個樹薯種原間產生具有多型性且再現性穩定的條帶。RAPD 試驗共計產生 187 條 DNA 擴增片段, 分子量介於 297-2951 bp 之間, 其中有 156 條為具多型性的片段。這些多型性片段經群集分析, 當兩群之間最小距離大於 0.93 時, 可明顯將 21 個樹薯種原區分為 4 群 (圖 1), 提供瞭解各品種 (系) 之間的親緣關係, 以作為後續育種之參考。

表 1. 樹薯種原之性狀調查

Table 1. The characteristics of cassava germplasm

Label	Varieties/lines	Color <sup>z</sup>			Leaf ratio of length/width	Stalk Diameter (cm)	No. of branch	Plant height (cm)
		Leaf	Vein	Petole				
1	Tainanyu No.1	G	R	R	0.7	7.80±1.9	3.3	155±13.2
2	Tainanyu No.2	G	G	G	0.6	7.20±0.4	3.3	133±7.4
3	Tainanyu No.3	G	G	G	0.7	6.93±1.3	3.3	166±3.5
4	Tainanyu No.4	G	G	G	0.7	6.80±1.2	2.7	227±40.4
5	Tainanyu No.5	G	R	R	0.7	7.93±1.5	2.3	183±12.6
6	Tainanyu No.6	G	R	R	0.6	6.28±1.2	2.6	151±10.6
7	Tainanyu No.7	G	R	R	0.6	7.45±1.5	3.0	146±14.9
8	Puli SEL.1	G	R	R	0.7	7.45±1.9	3.5	141±28.8
9	Wu Chih Tsai	G	G	R	0.6	5.93±0.9	2.7	132±11.7
10	Sweet	G	R	R	0.6	6.53±0.5	3.3	147±12.3
11	Hicran	G	G	G	0.6	6.62±1.8	3.2	131±23.8
12	Roti	G	G	G	0.7	5.80±1.6	4.0	139±8.9
13	Lunclnan	G	G	R	0.6	7.93±2.8	4.0	182±31.8
14	Bitter	G	R	R	0.7	7.50±2.4	3.0	236±27.5
15	Chirgwi	G	R	R	0.7	6.15±1.6	2.5	171±5.0
16	Veipueen	G	G	G	0.8	7.27±0.2	2.3	157±3.6
17	Green twig	G	G	G	0.6	7.93±1.1	1.7	183±15.3
18	Black twig	G	R	G	0.6	8.20±2.7	3.7	151±18.3
19	Turai	G	G	G	0.6	9.50±0.7	2.0	225±35.4
20	Matnenot	G	G	R	0.6	8.20±0.4	3.3	178±0.3
21	Medan	G	R	R	0.7	7.25±2.5	2.3	206±31.5

<sup>z</sup> G=Green; R=Red.

### 應用 SSR 分子標誌進行樹薯種原品種（系）鑑定

本研究係直接使用 Agarose 將距離相近的多型性 intra-SSR 片段進行區分，為試驗技術之一大突破（圖 2），且所得之多型性片段均經定序結果確認其 intra-SSR 之序列。本試驗初始共計使用了 19 組 SSR 引子，但可在 21 個樹薯種原間產生多型性的引子僅 11 組（表 2），產物分子量介於 255-1314 bp 之間，共可產生 32 條多型性片段，其中甚至可獲得 6 條品種（系）特有的專一片段。而綜合 11 組 intra-SSR 引子所產生之多型性片段的組合，可逐步地將 21 個樹薯品種（系）進行完全的區分。

以下便針對表 2 的研究結果，逐步進行種原鑑別的討論。首先，其中有四個品種（系）各具有品種自己的特殊專一條帶，因此可與其餘的 20 個品種（系）進行區別（本研究共計 21 個品種（系））。這四個品種（系）為：Hicran（代號 11）、Lunclnan（代號 13）、Matnenot（代號 20），以及 Medan（代號 21）。

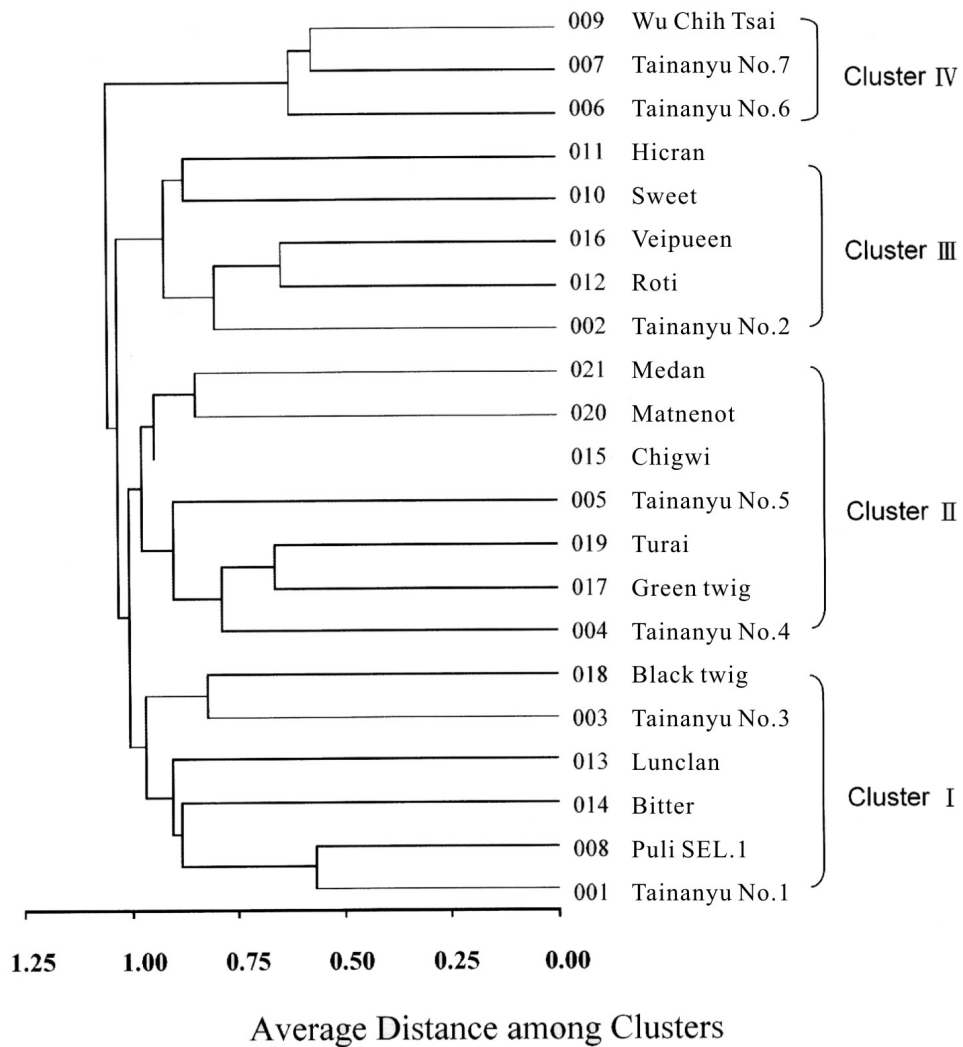


圖 1. 樹薯種原 RAPD 以 UPGMA 方法進行之群集分析樹狀圖。

Fig. 1. Dendrogram of cluster analysis of cassava germplasm using UPGMA method based on RAPD.

Hicran 品種 (系) (代號 11) 應用 SSR12 為引子組時，於 255 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶，而其餘 20 個品種 (系) 於該位置皆無條帶，故可輕易將 Hicran 與其它樹薯品種 (系) 區分。Lunclan 品種 (系) (代號 13) 應用 SSR76 為引子組時，於 259 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶；Matnenot 品種 (系) (代號 20) 應用 SSR49 為引子組時，於 290 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶；Medan 品種 (系) (代號 21) 應用 SSR12 為引子組時，於 400 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶。

然而，要針對每一個品種 (系) 都找到獨特專一的條帶是非常困難的，因此從事較大規模地種原品種 (系) 鑑定時，常需要用到多個以上的引子組合。

表 2. 樹薯種原之 intra-SSR 多型性片段

Table 2. The intra-SSR polymorphic bands of 21 cassava germplasm accessions

Primer	Product size (bp)	Variety/line <sup>z</sup>																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
SSRY 9	286	- <sup>y</sup>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
	271	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	
SSRY11	1314	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	1201	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	298	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	276	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
SSRY12	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	302	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	255	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SSRY25	303	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
	284	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	
SSRY49	341	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	
	309	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
	290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
	272	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	259	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
SSRY68	325	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	
	302	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	291	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	
	272	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	259	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
SSRY75	289	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
	271	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	
SSRY76	305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	285	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	272	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	259	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	340	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
SSRY93	326	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	306	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	290	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
	272	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
SSRY106	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

<sup>y</sup> +:band is present ; -:band is absent.

<sup>z</sup> Label of variety/line see as Table 1.

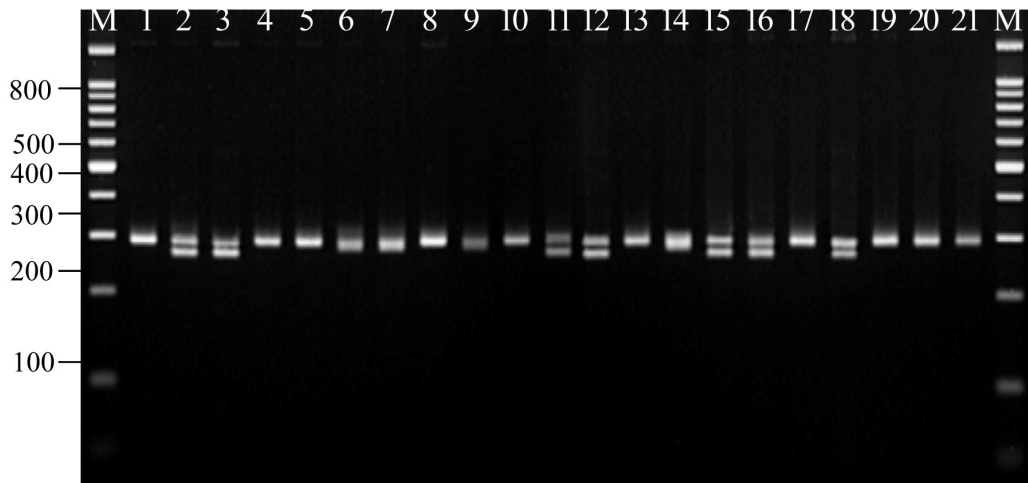


圖 2. 21 個樹薯種原之 intra-SSR 瓊膠電泳圖。

Fig. 2. The intra-SSR electrophoretic profiles on agarose for 21 cassava germplasm accessions. (M:100 bp marker; 1-21: Label of variety/line was described in Table 1.)

就本研究樹薯品種(系)的鑑定而言,首先以最簡單的兩個引子組合為例:台南育 1 號(代號 1)應用 SSRY68 為引子組,藉由 302 bp 位置的專一性條帶,已經可與其它 20 個樹薯品種(系)中的 19 個品種(系)進行區別,僅無法與 Hicran(代號 11)區別。但由上述討論,我們已經瞭解 Hicran 品種(系)應用 SSRY12 為引子組時,於 255 bp 位置處具有其專屬的特殊專一性條帶。因此綜合 SSRY68 及 SSRY12 兩個引子組,台南育 1 號與其它 20 個樹薯品種(系)便可以完全地區分。

以上同樣的品種(系)鑑定原理可運用在台南育 7 號。台南育 7 號(代號 7)應用 SSRY93 為引子組,藉由 306 bp 位置的專一性條帶,已經可與其它 20 個樹薯品種(系)中的 19 個品種(系)進行區別,僅無法與 Lunclnan(代號 13)區別。但由上述討論,我們已經瞭解 Lunclnan 品種(系)應用 SSRY76 為引子組時,於 259 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶。因此綜合 SSRY93 及 SSRY76 兩個引子組,台南育 7 號與其它 20 個樹薯品種(系)便可以完全地區分。

至於台南育 6 號(代號 6),雖然也只用到了兩個引子組合,但鑑定判別的情形則較為複雜:台南育 6 號應用 SSRY11 為引子組時,藉由 298 bp 位置的專一性條帶,已經可與其它 18 個品種(系)進行區別,但無法與 Lunclnan(代號 13)、Bitter(代號 14)區別。由於 Lunclnan 品種(系)應用 SSRY76 為引子組時,於 259 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶。因此目前只剩 Bitter(代號 14)無法與台南育 6 號作區別,當我們回頭再次檢視表 2 的研究結果,發現在應用 SSRY11 為引子組的同時,Bitter(代號 14)於 1,314 bp 與 276 bp 處亦具有條帶,而台南育 6 號則無條帶。綜合上述,台南育 6 號樹薯品種(系)能夠與其它 20 個樹薯品種(系)達到完全地區分,雖然也只用到了兩個引子組合(SSRY11 及 SSRY76),但鑑定的判別區域卻跨越了四個條帶位置,即 SSRY11 引子組的 1,314 bp、298 bp、276 bp 與 SSRY76 引子組的 259 bp 位置,所以鑑定判別情形較為複雜。

本研究中發現 SSRY11 是一個很有效率的引子組。就上述之鑑定過程,換個角度以 Bitter(代號 14)為主角來看,其實也是判別 Bitter(代號 14)可與其它 20 個樹薯品種(系)達到完全地區

分之鑑定過程。除此之外，繼續將上述 SSRY11 為引子組之鑑定研究結果延伸，其 276 bp 位置只有 Hicran (代號 11)、Bitter (代號 14) 及 Chirgwi (代號 15)。由於 Hicran 品種 (系) 應用 SSRY12 為引子組時，於 255 bp 位置處具有其專屬的特殊專一性條帶。而且 SSRY11 引子組的 298 bp 位置，Chirgwi (代號 15) 無條帶，而 Bitter (代號 14) 有條帶，於是又可多區分出一個品種 (系) Chirgwi (代號 15)。

在進行種原鑑定時，我們期望可以最少的引子數目，達成最大的鑑定效率。因此，截至目前為止，已可將九個品種 (系) 單獨由全部 21 個品種 (系) 中鑑別出來，所利用到引子組合只有 6 個：SSRY11、SSRY12、SSRY49、SSRY68、SSRY76、SSRY93。

餘此類推，經由 11 組引子對所產生的 32 條 DNA 逢機增幅片段可將 21 個樹薯品種 (系) 一一區分出來。

## 討 論

鑑別種原最簡單、直接的方式是由外觀性狀來判別，本研究首先嘗試以樹薯的葉、葉脈、葉柄的顏色，以及葉片的長/寬比、莖圍、分支數與株高等性狀，進行初步的品種 (系) 鑑定。結果顯示各品種 (系) 間在葉脈色、葉柄色這兩個項目雖具有較明顯可辨別的差異，但仍無法用以區分 21 個樹薯種原。此外，部份數量性狀，如莖圍、分支數、株高等，除了受基因影響之外，栽培環境也可能引起性狀表現差異，故數量性狀調查，必須在同一栽培環境下所獲資料，才能進行品種鑑定。

DNA 層次的分子標誌由於不受環境影響，且可使用的標誌位置數目多，因此一般被認為是進行種原鑑定的良好工具。在本研究中，我們使用了 RAPD 與 intra-SSR 兩種分子標誌，結果發現 RAPD 雖然可以產生較多的多型性條帶，但要作到將 21 個樹薯種原進行完全的區別卻很困難；相對的，以 11 組 intra-SSR 引子進行試驗，雖僅可獲得 32 條多型性片段，但經由這些多型性片段的組合，卻可成功地將 21 個樹薯品種 (系) 進行完全的區分。探究其原因，造成此結果的主要原因為 RAPD 所使用的引子是逢機的序列，分散在植物體基因組中。但是 intra-SSR 的序列基礎是相同的，只是遺傳機制上這些 DNA 重複序列的數目，在不同品種 (系) 間有差異。因此本研究的經驗，充分顯示 intra-SSR 分子標誌在樹薯種原鑑定，為一強而有力之工具。

但就探討種原遺傳歧異的觀點而言，本研究採取 RAPD 結果進行群集分析，因為 RAPD 可產生的多型性高，對於廣泛探討基因組之間的遺傳變異與親緣關係，會較為適切。本試驗之 RAPD 結果，呈現出各樹薯品種 (系) 間的遺傳距離，有助於育種親本之選擇，與雜交工作之進行，可加速優良雜交後裔之獲得，對於提昇樹薯之育種效率，具有實用之價值。

經由以上述結果可知，SSR 分析所偵測的目標序列之保守性較高，且通常非功能性基因，所以不僅序列的重複性高，此序列也不易受環境影響而改變，因此分析結果較穩定，所以利用 SSR 之引子組，進行 PCR 反應，其所增幅之條帶通常比 RAPD 單純，且再現性高，可以彌補 RAPD 再現性差之缺點，因此 SSR 是重要的品種鑑別工具之一。

## 誌 謝

本試驗樹薯種原材料承蒙前台東區農業改良場作物改良課前研究員兼課長李興進(已退休)提供，特此感謝。本研究承農委會計畫經費支持，特申謝忱。

## 引用文獻 (Literature Cited)

- Beeching, J. R., P. Marmey, M. C. Gavalda, M. Noirot, H. R. Haysom, M. A. Hughes, and A. Charrier. 1993. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. *Ann. Bot.* 72:515-520.
- Chavarriga-Aguirre, P., M. M. Maya, M. W. Bonierbale, S. Kresovich, M. A. Fregene, J. Tohme, and G. Kochert. 1998. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. *Theor. Appl. Genet.* 97:493-501.
- Chavarriga-Aguirre, P., M. M. Maya, J. Tohme, M. C. Duque, C. Iglesias, M. W. Bonierbale, S. Kresovich, and G. Kochert. 1999. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. *Mol. Breed.* 5:263-273.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Elias, M., O. Panaud, and T. Robert. 2000. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. *Heredity* 85:219-230.
- FAO and IFAD. 2000. Cassava medium-term outlook. *in: The World Cassava Economy: Facts, Trends and Outlook*. FAO and IFAD press, Rome.
- Fregene, M. A., J. Vargas, F. Angel, J. Thome, R. A. Asiedu, M. O. Akorada, and W. M. Roca. 1994. Chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA variability in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. *Theor. Appl. Genet.* 89:719-727.
- Hussain, A., W. Bushuk, H. Ramirez, and W. M. Roca. 1987. Identification of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozyme. *Seed Sci. Tech.* 15:19-22.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sa. Not.* 44:223-270.
- Lefevre, F., and A. Charrier. 1993. Heredity of seventeen isozyme oci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 66:171-178.
- Lin, C. Y. 2007. Prospects of the international promotion for bio-energy crop. *Forestry Research Newsletter* 14(3):35-40.
- Litt, M., and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:397-401.
- Marmey, P., J. R. Beeching, S. Hamon, and A. Charrier. 1994. Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections using RAPD makers. *Euphytica* 74:203-209.
- Oard, J. H., and S. Dronavalli. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random primer PCR. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:236-241.
- Ramirez, H., A. Hussain, W. M. Roca, and W. Bushiuk. 1987. Isozyme electro-phenograms of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. *Euphytica* 36:39-48.

- Roa, A. C., M. M. Maya, M. C. Duque, J. Tohme, A. C. Allem, and M. W. Bonierbale. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theor. Appl. Genet.* 95:741-750.
- Roa, A. C., P. Chavarriaga-Aguirre, M. C. Duque, M. M. Maya, M. W. Bonierbale, C. Iglesias, and J. Tohme. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) Microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *Am. J. Bot.* 87:1647-1655.
- Wong, H. L., H. H. Yeoh, S. H. Lim, and K. C. L. Looi. 1997. Design of primers for RAPD analyses of cassava, *Manihot esculenta*. *Phytochemistry* 46:805-810.
- Wong, H. L., H. H. Yeoh, and S. H. Lim. 1998. Customisation of AFLP analysis for cassava varietal identification. *Phytochemistry* 50:919-924.

# Genetic Diversity and Identification of Cassava Germplasm with RAPD and SSR<sup>1</sup>

Shu Chen<sup>2,4</sup>, Chung-Chen Fan<sup>3</sup> and Chien-Yih Lin<sup>2</sup>

## Abstract

Chen, S., C. C. Fan, and C. Y. Lin. 2007. Genetic diversity and identification of cassava germplasm with RAPD and SSR. *J. Taiwan Agric. Res.* 56:327-337.

The research aimed to identify 21 cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm accessions collected from Taiwan. The objectives were to understand genetic diversity among cassava germplasm accessions using RAPD and to identify each of them by intra-SSR. 21 accessions of cassava germplasm were clustered to 4 groups based on 156 polymorphic bands of RAPD. From the analysis of RAPD, it could provide as references for breeders, 32 polymorphic bands from 11 SSR primers were found and the 21 cassava varieties / lines could be differentiated completely using these intra-SSR polymorphic bands. This research revealed that the intra-SSR is a powerful molecular tool for the identification of cassava germplasm.

**Key words:** Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Genetic diversity, Germplasm, Identification, RAPD, SSR.

---

1. Contribution No.2306 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 15, 2007.  
2. Assistance Researcher, Plant Germplasm Division, ARI; Director-general, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.  
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Asia University, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.  
4. Corresponding author, e-mail:cshu@wufeng.tari.gov.tw; Fax:(04)23331673.