

台灣甘藷品種之 ISSR DNA 標誌變異研究

簡靖華⁽¹⁾ 賴永昌⁽²⁾ 陳一心⁽³⁾ 林順福^{(4)*}

摘要

本研究以 DNA 分子標誌評估台灣甘藷品種之遺傳變異，共篩選 100 條 ISSR 引子，獲得 81 個具多型性之分子標誌，其中 23 個分子標誌具有訊號較強之穩定條帶，可利用於建立台灣地區甘藷品種之 DNA 指紋資料庫。甘藷品種之遺傳相似性分析結果顯示台灣主要甘藷品種間之遺傳距離介於 12.5% 到 94.4% 之間，各品種間之平均遺傳距離為 54.9%，利用多向雜交族群所選育之新品種分散在各個樹狀圖分群中，顯示台灣新育成甘藷品種已具有較大程度的遺傳歧異性。分群分析及主成份分析結果均發現台灣甘藷品種群與中國大陸品種群有較大之遺傳距離，顯示中國大陸甘藷種原未來可利用於雜交親本之潛力。而主成份分析結果亦推薦一套有效率之品種鑑定流程，此一流程以 6 條引子所增幅之 14 個分子標誌為工具。分別以兩個塊根用（台農 66 號及桃園 1 號）及兩個葉菜用甘藷品種（桃園 2 號及台農 71 號）為材料探討無性繁殖可能產生之遺傳變異，分析相同品種不同植株之 ISSR 分子標誌之差異，各個參試品種調查約 2,640 ~ 3,510 個分子標誌，發現品種內約有 0.94% ~ 1.86% 之 ISSR 分子標誌變異。本研究所建立甘藷品種之 DNA 分子指紋資料將可供甘藷品種鑑定、品種繁殖及品種改良之參考。

關鍵詞：甘藷、分子標誌、品種鑑定

前言

甘藷在十七世紀初（明末荷蘭佔領台灣時期）由福建傳入台灣栽培（李，1994），此後台灣甘藷品種改良工作可分為四個階段，第一階段為自 1895 ~ 1945 年期間（日據時期），此時甘藷主要用途為澱粉、釀造及溶劑原料，育種單位除了由國外各地進行引種及選種之外，並利

-
- (1) 國立台灣大學農藝系碩士班研究生。
 - (2) 農委會農業試驗所嘉義分所農藝系系主任。
 - (3) 農委會農業試驗所嘉義分所農藝系前系主任。
 - (4) 國立台灣大學農藝系助理教授。

*通訊作者。

（民國97年6月11日收件；民國97年7月30日修改；民國97年8月6日接受）

用本地種及引進之優良品種進行雜交育種；第二階段則為 1946 ~ 1960 年期間（光復初期至栽培盛期），育種目標分向紅肉及白肉兩方面進行，一則希望育成澱粉含量高的白肉品種，做為飼料及澱粉原料，二則希望育成營養豐富之紅肉品種，做為輔助食糧之用；第三階段在 1961 ~ 1970 年期間，此時育種方法主要採用多向雜交（polycross）以產生逢機交配族群供選種，育種目標以適應性廣、適於機械作業栽培及優良品質為主；第四階段為 1971 迄今，育種目標為食用及食品加工用為主，澱粉為副，同時注意葉菜用品種之選育（李，1994）。

甘藷具有異結合之六倍體基因型，大部分品種具有自交不親和性，不同品種間也有雜交不稔群的存在（Hernandez and Miller, 1964），但是經過長期的雜交育種，新育成品種已無法區別其所屬之雜交不親和群，因此增加雜交親本選擇的困難。為利於將來育種研究者進行甘藷雜交育種時親本的選擇及遺傳變異性之維持，對於品種間遺傳相似性與雜交不親和群之間在分子層次上的關係有必要進行探討。又由於甘藷利用無性繁殖也常產生體細胞變異，導致品種優良性狀逐漸喪失，品質變劣等，而因採苗及種諸繁殖時未掌握原有品種之優良特性，也使得優良品種之純度無法保持（李，1994）。

甘藷的生長習性、葉形、塊根肉色及表皮顏色等形態及外表性狀可方便且快速區分部分甘藷品種，但此方法受限於外表多型性仍不足以區別大量品種，且易受生育時期及栽培環境不同而影響其表現，及有些遺傳變異不易由外表察覺，故無法有效利用外觀性狀評估品種間的遺傳相似性或差異性（Andersen and Fairbanks, 1990）。許多研究曾經利用同功酵素有效區別栽培種與野生種甘藷（Kokubu and Hirai, 1978; Kokubu and Maeda, 1978; Kokubu and Nakakawaji, 1982; Xue *et al.*, 1988），Kennedy 及 Tompson（1991）利用 12 種同功酵素區分 9 個甘藷栽培種，但此種標誌可能受到發育時期與環境變化影響表現，或受限於具多型性的同功酵素數目之不足，因此仍無法達到大量品種鑑別之目的。

DNA 分子標誌是作物品種鑑別及分析個體間遺傳差異的優良工具（Andersen and Fairbanks, 1990; Smith and Smith, 1992; Gepts, 1993; Jarret and Austin, 1994），其以 DNA 多型性為基礎，直接偵測核苷酸序列之差異，以供遺傳變異之分析（Brown, 1992; Monckton and Jeffreys, 1993; Connolly *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2000）、連鎖圖譜之建立（Ukoskit and Thompson, 1997）及分析抗病等重要性狀之遺傳機制（Miano *et al.*, 2008）。Zietkiewicz 等人（1994）提出 inter-simple-sequence-repeat（ISSR）分子標誌的概念，ISSR 是在重複性短序列的 3' 或 5' 端加上 1 至 4 個核苷酸後做為引子，再進行聚合酵素連鎖反應（PCR），放大相鄰重複性短序列（SSRs）之間的 DNA 片段，此種分子標誌之重複性與穩定性皆高，於作物種間及種內均有良好的鑑別效果（Huang and Sun, 2000），又具有方便操作及分析之優點，為作物種原遺傳歧異性分析及品種檢定之優良工具（潘，2002）。

本研究利用 ISSR DNA 分子標誌探討甘藷品種間之遺傳相似性及品種內遺傳變異程度，以供甘藷品種鑑別及雜交育種之參考。

材料與方法

一、甘藷品種間 ISSR DNA 標誌變異分析

試驗材料：本研究所使用材料為由農委會農業試驗所嘉義分所提供之台灣早期引進及近年栽培之 39 個甘藷品種（系），另加收集自民間之台農 10 號及台農 64 號品種樣品進行分析，共 41 個參試樣品（表 1）。

試驗方法：

- (一) **葉片 DNA 抽取方法：**首先將由田間剪取之甘藷葉片經真空乾燥後，同一品種（系）取 5 片來自不同單株之新鮮葉片（約 0.05 g）為 DNA 抽取材料，葉片 DNA 抽取步驟參考 Doyle 及 Doyle（1990）的 CTAB 法。
- (二) **ISSR (Inter-simple sequence repeat) 分子標誌分析：**本試驗所使用引子是由加拿大的哥倫比亞大學 (University of British Columbia, UBC) 所合成的第 9 組引子，共有 100 種不同的核酸引子序列，引子序列長度為 17 ~ 22 mer，由簡單的重複鹽基序列組成。先由 41 個甘藷參試 DNA 樣品中逢機選 5 個樣品進行 100 個核酸引子之初步篩選。選出可在樣品間擴增多型性 DNA 片段之逢機引子進行進一步分析。聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 及電泳分析步驟參照潘（2002）之方法。
- (三) **甘藷品種 ISSR DNA 指紋鑑定資料之建立：**將各品種所得之 ISSR 分子標誌依使用之引子、多型性條帶之分子量及條帶之有無（1 或 0）等分別登錄及建檔，以供特定品種指紋鑑定之依據。
- (四) **甘藷品種 ISSR DNA 遺傳相似性分析：**根據電泳結果紀錄由產生之多型性條帶中篩選出具有品種間差異性的分子標誌，將所得資料根據條帶之有無，分別以 1 和 0 表示。利用 Jaccard's coefficient of community 進行樣品間遺傳距離的估算，利用 NT-SYS（版本為 2.0）軟體計算遺傳距離矩陣 (genetic distance matrix)，再利用 TFPGA (Tools for population genetic analyses) 程式 (Miller, 1997) 以 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) 法進行分群分析 (cluster analysis)，以探討台灣甘藷品種間之遺傳變異。
- (五) **甘藷品種 ISSR 分子標誌之主成份向量分析：**利用 NT-SYS 程式對篩選出的 ISSR 分子標誌所得之資料進行主成份向量分析 (Principal Component Coordinate Analysis, PCA)，計算各個主成份之特徵根 (Eigenvalue) 及特徵向量 (Eigenvector) 以探討不同引子對甘藷品種之鑑別效果，並以 NT-SYS 軟體利用前兩個主成份繪製各個品種的遺傳距離分佈圖。
- (六) **甘藷品種 ISSR 分子標誌鑑定流程之建立：**利用 NT-SYS 軟體所計算出之各個主成份之特徵向量中，依據各分子標誌之不同鑑別效果，篩選品種間差異性較大且條帶訊號較強之分子標誌，利用貢獻度較大之分子標誌，建立不同引子之分析流程。

二、甘藷品種內 ISSR DNA 標誌變異分析

試驗材料：所使用材料為台灣目前栽培面積較廣之品種，包括兩個塊根用甘藷品種（台農

表 1 本研究所評估之 41 個甘藷品種 (系) 之來源及主要用途

Table 1. Sources and main utilizations of the 41 sweet potato lines evaluated in this study.

編號	品系名稱	來源	主要用途	親本	
				母本	父本
1	C82-S59	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
2	CYY86-09	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
3	C82-S12	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
4	CY86-S29	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
5	台農 10 號	台灣	飼料用	美國黃皮	紅皮
6	台農 10 號 *	台灣	飼料用	美國黃皮	紅皮
7	台農新 31 號	台灣	澱粉及飼料用	白和蘭	元地
8	台農 57 號	台灣	食用及澱粉用	台農 27 號	Nancy Hall
9	台農 62 號	台灣	食用及飼料用	台農 17 號	Nancy Hall
10	台農 64 號	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
11	台農 64 號 *	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
12	台農 66 號	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
13	台農 67 號	台灣	食用及澱粉用	農林 17 號	Centennial
14	台農 68 號	台灣	加工用	多向雜交族群	
15	台農 69 號	台灣	食用	多向雜交族群	
16	台農 70 號	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
17	台農 71 號	台灣	葉菜用	多向雜交族群	
18	CYY86-01	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
19	桃園 1 號	台灣	食用及加工用	多向雜交族群	
20	桃園 2 號	台灣	葉菜用	多向雜交族群	
21	台南 17 號	台灣	澱粉及飼料用	彰化種	台農 17 號
22	台南 18 號	台灣	澱粉及飼料用	台南 15 號	台農新 31 號
23	桃園紅皮紫心	台灣		地方品種	
24	白皮紫心	台灣		地方品種	
25	紅皮紫心	台灣		地方品種	
26	黃皮紫心	台灣		地方品種	
27	彰化種	台灣		地方品種	
28	廈門種	中國大陸			
29	慶仔種	中國大陸			
30	栗子香	中國大陸		沖繩 100 號	Nancy Hall
31	小燈種	中國大陸			
32	紅仁種	中國大陸			
33	徐藷 18 號	中國大陸	澱粉用	Nancy Hall	沖繩 100 號
34	高系 14 號	日本	食用及加工用		
35	紅肉	日本			
36	九州 100 號	日本			
37	日本金時	日本			
38	沖繩 100 號	日本	澱粉、食用及飼料用	七福	潮州
39	Sasahikari	日本			
40	農林 40 號	日本			
41	Beniazuma	日本	食用及加工用		

註：“*” 表示為民間保存之品種。

66 號及桃園 1 號) 及兩個葉菜用甘藷品種 (桃園 2 號及台農 71 號)。

試驗方法：每一品種取來自 30 株不同單株之新鮮葉片，葉片 DNA 抽取方法及 PCR 分析如前所述。利用 100 個 ISSR 核酸引子調查是否有品種內變異產生，若發現具有變異之分子標誌，則再重新測定以確認新變異之產生，根據分析結果探討品種內變異程度。

試驗結果

一、甘藷品種間 ISSR DNA 標誌變異分析

(一) 甘藷品種 ISSR DNA 指紋資料庫之建立：本試驗先利用隨機選取的 5 個甘藷品種 (系) 包括台農 10 號、台農 64 號、小燈種、台農 57 號及紅肉等，以 100 個 ISSR 引子進行有效引子之初步篩選，得到可擴增 DNA 片段之核酸引子共 49 個，再分析 41 個甘藷品種 (系)，獲得具有多型性且訊號較強之 14 個核酸引子 (表 2)，所佔比例為 28.6%，共得

表 2 本試驗篩選得到可供甘藷品種鑑定之 14 條 ISSR 引子及其產生之分子標誌

Table 2. The 14 selected primers and the amplified molecular markers.

引子 類別	引子 代號	引子序列	GC 含量 (%)	產生 條帶數	多型性條帶		分子量 (bp)
					數目	(%)	
di-nt	807	(AG)₈T	47.1	19	11	57.9	500-2000
	811	(GA)₈C	52.9	11	4	36.4	600-2100
	812	(GA)₈A	47.1	10	5	50.0	600-2000
	814	(CT)₈A	47.1	13	9	69.2	400-1500
	818	(CA)₈G	52.9	11	6	54.5	400-1500
	822	(TC)₈A	47.1	7	3	42.8	500-2000
	827	(AC)₈C	52.9	11	7	63.6	400-1700
	834	(AG)₈YT	50.0/44.4	8	3	37.5	400-1700
	841	(GA)₈YC	50.0/55.6	18	9	50.0	300-1500
	857	(AC)₈YG	50.0/55.6	11	8	72.7	450-2000
tri-nt	864	(ATG)₆	33.3	13	7	53.8	500-2000
	868	(GAA)₅	33.3	21	7	33.3	400-1600
other	873	(GACA)₃	50.0	10	4	40.0	750-1500
	880	(GGAGA)₃	60.0	11	3	27.3	650-1500
合計				174	81		
平均						49.2	

註：簡單重複序列 (simple sequence repeats) 以粗體字表示；Y = (C,T)

到 174 個條帶，平均每一引子可得到 12.4 個條帶。由此 14 條引子共可增幅 81 個具多型性條帶；平均一個引子有 5.8 個多型性條帶，所得條帶分子量範圍為 300 bp ~ 2100 bp。

再由 81 個多型性條帶中選出訊號較強且穩定之 23 個多型性條帶做為分子標誌，可建立各參試品種（系）之指紋分析資料，其中兩個葉菜用甘藷品種台農 71 號及桃園 2 號具有相同的 23 個 ISSR DNA 指紋標誌，顯示其在 ISSR DNA 分子標誌層次不具有差異，而 CYY86-01 為嘉義農試分所新育成品種「台農 72 號」，其指紋資料也已建立完成。利用此指紋圖譜對待測未知品種之 ISSR 分子標誌分析資料結果進行比對，錯誤機率僅為 $1/2^{23}$ ，因此可望得到優良的品種鑑別效果。

(二) 甘藷品種 ISSR DNA 遺傳相似性分析：ISSR 分子標誌所得到之指紋分析資料經由 NT-SYS 利用 Jaccard's coefficient 運算，得到各個品種之間的遺傳距離矩陣（未列出），各樣品間的遺傳距離介於 0% ~ 94.4% 之間，若不包括台農 71 號及桃園 2 號兩個葉菜用品種間之遺傳距離，則各樣品間遺傳距離範圍為 12.5% ~ 94.4%，而台農 67 號與由中國大陸引進慶仔種之距離高達 94.4%。

依據品系間遺傳距離利用 UPGMA 進行群聚分析，繪出樹狀分枝圖（圖 1），在遺傳距離為 88%（即相似性為 12%）左右可將參試品種（系）分為兩大群。其中第 I 群主要為早期自中國大陸引進種原，包括慶仔種、小燈種及廈門種等；及由中國大陸引進種

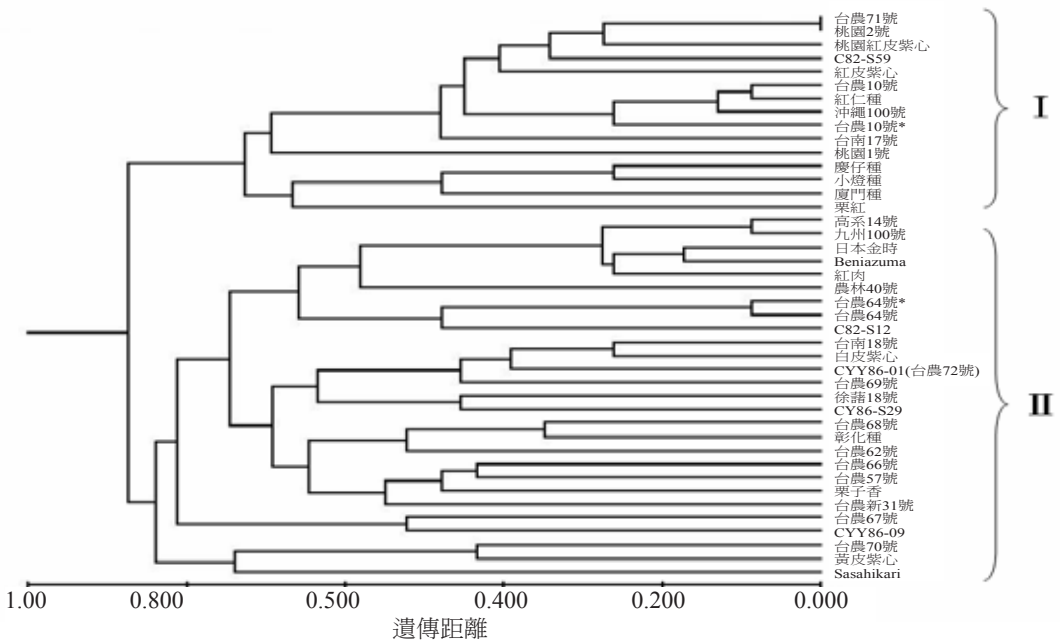


圖 1 利用 23 個 ISSR 分子標誌分析甘藷品種（系）之遺傳歧異性群聚樹狀圖

Fig. 1 Dendrogram of the genetic distance identified with ISSR DNA markers among sweet potato varieties

註：* 表示為民間保持之品種。

原經純化或做為雜交親本所選育之品種，包括台農 71 號及桃園 2 號兩個葉菜用甘藷品種、桃園紅皮紫心、紅皮紫心、紅仁種、台農 10 號、台南 17 號及桃園 1 號等，其中慶仔種、小燈種及廈門種等中國大陸品種群聚為一小群；第 II 群主要包括自日本引進之甘藷品種，及由日本引進種原經純化或以其為雜交親本所選育之品種，其中高系 14 號、九州 100 號、日本金時、紅肉、Beniazuma 以及農林 40 號等日本品種群聚為一小群，其他品種包括台南 18 號、白皮紫心、台農 72 號、台農 69 號、徐薯 18 號及試驗品系 CY-86-S29 等則成另一小群，另外台農 70 號、黃皮紫心及 Sasahikari 等 3 個品種自成另一小群。由圖 1 發現包括台農 64 號、台農 66 號、台農 68 號、台農 69 號、台農 70 號、台農 71 號、台農 72 號、桃園 1 號及桃園 2 號等 9 個經由多向雜交育種而來之甘藷品種分散在樹狀圖之各分群中，顯示由多向雜交而來之甘藷品種之間遺傳變異範圍已經包含不同國家種原之遺傳背景。另外比較種原庫及民間種植之甘藷品種之分群結果，發現兩個不同來源之台農 64 號品種歸屬於同一小群，具有極高之 ISSR 指紋相似性，但亦顯示保存種原與民間保存之台農 64 號品種間存在變異性，而不同來源之台農 10 號也有類似結果。

(三) 甘藷品種 ISSR 分子標誌之主成份向量分析：將所篩選之 23 個 ISSR 分子標誌所得之指紋資料利用 SAS 程式進行主成份向量分析，探討各個分子標誌對甘藷品種之鑑別效果（未列出），同時以 NT-SYS 軟體利用前兩個主成份分析結果繪出各品種之遺傳距離分佈

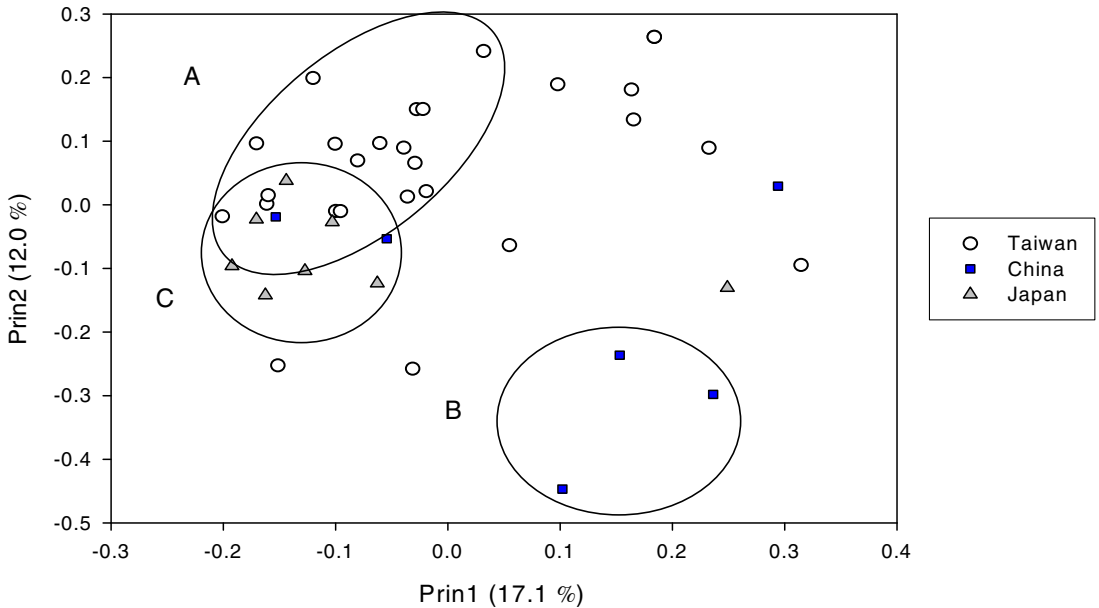


圖 2 依 ISSR 分子標誌之第一及第二主成份所繪之 41 個甘藷品種 (系) 遺傳距離分佈圖

Fig.2 Plot of two principal components from the covariance matrix of the ISSR DNA marker frequencies in 41 sweet potato varieties.

圖，由圖 2 可發現品種分佈大致分為 3 群，其中大部分台灣地區品種分佈於 A 群，由中國大陸引進之品種集中於 B 群，C 群則為日本引進之品種。由主成份特徵向量可知主成份 1 主要依據引子 827 所產生 710 bp 條帶，引子 868 所產生 490 bp 條帶及引子 880 所產生 670 bp 條帶等 3 個分子標誌，主要區分中國大陸品種與非中國大陸品種；而主成份 2 則主要依據引子 841 所產生 1100 bp、引子 834 所產生 1050 bp 條帶及引子 814 所產生 400 bp 條帶等 3 個分子標誌，主要區分台灣品種與引進品種（日本品種及中國大陸品種）。由主成份 1 及主成份 2（共可解釋 29.1% 之變異值）可將參試品種（系）分為兩群，第 1 群位於第一象限及第四象限，即樹狀分枝圖之第 I 群，第 2 群則分佈於第二及第三象限，為樹狀分枝圖之第 II 群，比較樹狀分枝圖發現兩者之分群結果大致相符。

(四) 甘藷品種 ISSR 分子標誌鑑定流程之建立：因此根據主成份分析前兩個主成份中每一成份之分子標誌鑑別的效果，挑選出效果佳且訊號強之分子標誌來建立品種鑑定流程圖（圖 3），依序將所有參試樣品進行區分。此品種鑑定流程圖共使用 14 個分子標誌（由 880、827、868、841、822 及 864 等 6 條引子所產生），可將台灣現有主要甘藷品種（系）有效率地區分。

二、甘藷品種內遺傳變異分析

由先前所篩選出可產生多型性條帶之 ISSR 引子進行 4 個參試品種內遺傳變異的偵測，結果如表 3 所示，塊根用甘藷品種台農 66 號所篩選的 3180 個分子標誌中，有 30 個分子標誌具有變異（圖 4），佔 0.94%；而桃園 1 號則篩選了 3150 個分子標誌，其中有 41 個具變異的分子標誌，所佔比例為 1.30%；在葉菜用甘藷台農 71 號共篩選 2640 個分子標誌，得到具有變異之分子標誌 49 個，分子標誌變異佔 1.86%；桃園 2 號篩選 3510 個分子標誌，得到 53 個具變異之分子標誌，佔 1.51%，顯示甘藷在進行無性繁殖時容易發生遺傳變異，其 ISSR DNA 分子標誌之變異率介於 0.94% ~ 1.86% 之間。

表 3 四個甘藷品種內利用 ISSR 分子標誌所測得之遺傳變異

Table 3. ISSR DNA marker variation within four sweet potato varieties.

	葉菜用品種		塊根用品種	
	台農 71 號	桃園 2 號	台農 66 號	桃園 1 號
篩選分子標誌個數	2640	3510	3180	3150
具有變異個數	49	53	30	41
分子標誌變異 (%)	1.86	1.51	0.94	1.30

Variety code

ISSR Marker

Primer (band size)

1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,
23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41

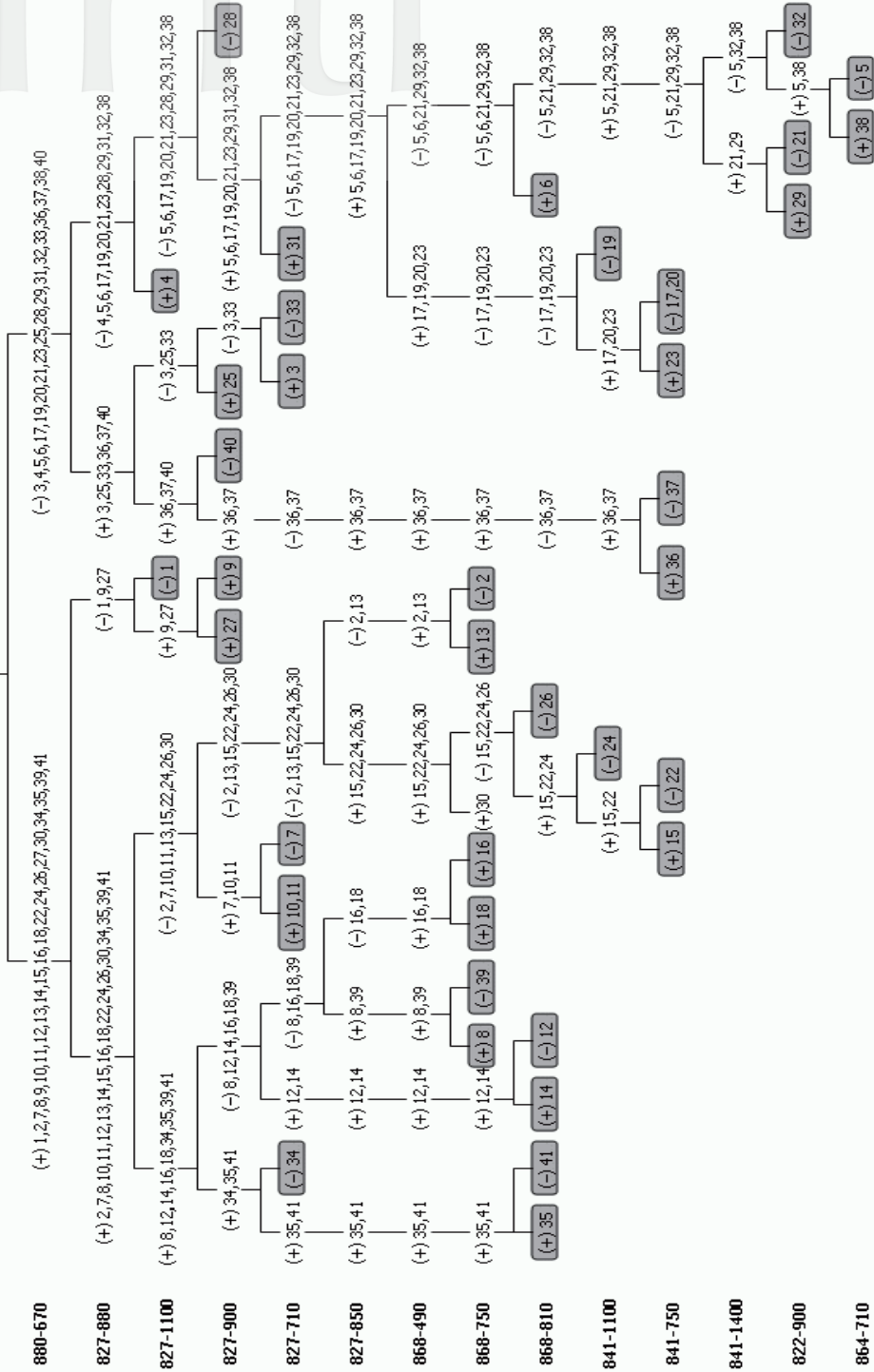


圖 3 依據主成份所建立之甘藷品種 ISSR 分子標誌鑑定流程。

Fig. 3 The differentiate process for identifying sweet potato varieties.

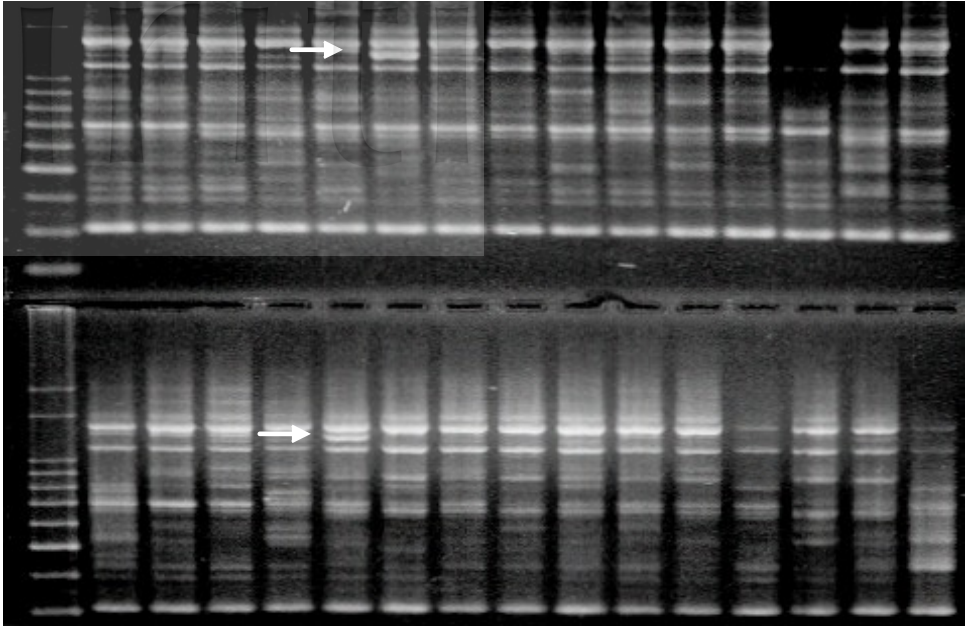


圖 4 利用 ISSR DNA 分子標誌 UBC841 偵測甘藷品種台農 66 號之體細胞變異
Fig. 4 Somatic variation of sweet potato variety TNG66 detected with
ISSR DNA primer UBC 841.

討 論

一、甘藷品種間 ISSR DNA 標誌變異分析

(一) 甘藷品種 ISSR DNA 指紋資料庫之建立

本試驗由 100 個 ISSR 核酸引子中篩選得到 14 個訊號較強且具多型性條帶之核酸引子，結果共得到 174 個條帶，其中有 81 個條帶具多型性，平均一個引子可得 5.8 個多型性條帶，多型性條帶佔全部條帶比例為 46.6%。Hu 等人 (2003) 利用與本試驗相同引子進行種原間 DNA 多型性分析，得到 8 個訊號較強且可產多型性條帶之引子，平均每個引子可得 10 個多型性條帶 (多型性比例為 62.2%)，較本試驗所得之多型性高。造成多型性比例上的差異原因可能是由於 Hu 等人所使用的材料除了包括日本及菲律賓之甘藷品種外，還包括 *I. lacunosa*、*I. tiliacea*、*I. trifida* 及 *I. triloba* 等 4 個野生種。Huang 及 Sun 等人 (2000) 亦利用相同引子對甘藷及其 9 個野生種進行分析。雖然本研究之單一引子所產生之多型性分子標誌數目相對較少，此結果應與本研究進行初步篩選之引子數目較多有關。

(二) 甘藷品種之遺傳相似性分析

Huang 及 Sun (2000) 利用 ISSR 分子標誌區分出甘藷及其 9 個野生種，依據栽培種甘藷與另 9 個野生種之間的遺傳相似性支持栽培種甘藷係由 *Ipomoea trifida* 演化而來之假設。He 等人 (1995) 利用 DAF (DNA amplification fingerprinting) 區別 73 個來自各個國家蒐集之種

原，由分群結果發現來自台灣及韓國之甘藷種原遺傳相似性較高，而日本與菲律賓甘藷種原之遺傳相似性較高；而 Dhillonr 及 Ishiki (1999) 利用 RAPD 進行 25 個甘藷栽培種及 4 個野生種之區分，同樣發現來自日本及菲律賓之甘藷栽培種具有較小的遺傳距離；Hu 等人 (2003) 利用 ISSR 分子標誌在遺傳距離約 35% 處將來自日本的甘藷品種與來自東南亞地區包括菲律賓、印尼及馬來西亞的甘藷品種分為兩大群，並且能將群內的品種進行區分。本研究利用 23 個 ISSR 分子標誌對 41 個甘藷品種 (系) 進行遺傳相似性分析發現各品種 (系) 平均遺傳距離為 54.9%，此與 Hwang 等人 (2002) 利用 SSR 分子標誌分析 22 個包括日本、中國大陸及台灣地區之甘藷品種，所得到各個品種間之平均遺傳距離為 35.3% 有明顯差異，造成差異的原因可能是由於其分析所使用之品種以台灣地區地方種及栽培種為主，來自中國大陸及日本之品種較少，而本試驗所蒐集之種原較多，遺傳背景較廣，且本試驗所使用之引子及分子標誌係經過初步篩選而來。由 ISSR 分子標誌之第一及第二主成份所繪製之參試甘藷品種 (系) 之遺傳距離分佈圖及 UPGMA 所得分群圖可看出各品種除了由日本引進之品種間及部分台灣地區品種間之遺傳距離較小外，其餘台灣地區品種間與中國大陸地區品種間分佈範圍較大。多數台灣地區品種與由日本引進品種有較小之遺傳距離，而與中國大陸品種有較大之距離，可知若欲擴大台灣甘藷新品種之遺傳歧異性，可選擇中國大陸之優良種原做為雜交育種之親本。

本試驗之 ISSR 分子標誌分析結果可在遺傳距離約 88% 處將參試品種 (系) 分為兩大群，由分群圖中可發現中國大陸地區引進之大部分品種及自日本引進之大部分品種分別自成一小群，顯示由相同國家引進品種之間遺傳距離較小。台灣地區之甘藷品種則因為利用許多由國外引進之品種進行雜交育種且有不同之育種目標，品種間遺傳變異較大，例如，本試驗顯示自中國大陸引進之慶仔種與台灣育種之台農 67 號有最大之遺傳距離 (94.4%)，而其中台農 67 號之母本 (農林 17 號) 及父本 (Centennial) 分別來自日本及美國，推測台農 67 號因來自日本及美國之遺傳組成，而使其與中國大陸品種慶仔種有較大之遺傳距離。本試驗參試品種中，栗子香及徐藷 18 號為由美國引進之優良品種 Nancy Hall (南瑞筓) 與沖繩 100 號正反雜交而來，故分群上歸於第 II 群，與中國大陸地區之品種距離較遠，但其共同親本沖繩 100 號歸類於第 I 群，原因可能是因為沖繩 100 號為日本早期育成之優良品種，在台灣及中國大陸長期做為育種材料。Tseng 等人 (2002) 利用微衛星多型性基因座選擇性擴增分子標誌 (Signal Analysis and Machine Perception Laboratory, SAMPL) 分析台灣地區之甘藷優良品種的研究中所得之各個品種遺傳距離分佈圖中，沖繩 100 號之分群結果亦與本試驗一致。本試驗參試之 41 個甘藷品種 (系) 中，栗子香、台農 57 號及台農 62 號具有一共同父本 Nancy Hall，3 個品種在樹狀分枝圖上之遺傳距離接近，而徐藷 18 號與栗子香之間的遺傳距離則較其他 2 個甘藷品種遠，推測是由於父母本遺傳物質貢獻程度的不同所致；另外台農 17 號分別為台農 62 號及台南 17 號之父、母本，台南 17 號被歸於 I 群，而台農 62 號則歸於 II 群，除了育種目標不同之外，另一親本之遺傳物質貢獻程度差異也可能為原因之一。參試品種 (系) 中，台農新 31 號為台農 18 號之父本，彰化種為台南 17 號之母本，由樹狀分枝圖中觀察發現親本與其雜交後代所選出之品種之分群關係並不一定接近，推測同樣是由於選拔及育種目標不同造成。另外台農 68 號及彰化種歸於遺傳距離接近的同一小群，此結果與黃等 (1999) 之結果相同，顯示在多向雜交品

種台農 68 號中，彰化種之遺傳物質貢獻程度大。而兩個台灣最近育成之葉菜用甘藷品種台農 71 號及桃園 2 號具有相同的 23 個 ISSR 分子標誌，經查命名資料，台農 71 號為 1992 年自甘藷多向雜交種子中選出之品系 CYY82-L17，而桃園 2 號係 1983 年由多向雜交族群第五世代後裔中選出（雜糧作物試驗研究年報，1998），由此分子標誌分析結果可知此兩品種很有可能來自相同營養系。

台灣自 1966 年起開始利用多向雜交進行甘藷品種育成，採用親緣關係較遠且開花期一致之優良品種在隔離地區進行重複多向雜交（王等，1966），至今已育出許多優良品種。黃等（1999）曾利用 RAPD 分子標誌分析台農 65 號、台農 66 號、台農 68 號、台農 70 號、台農 71 號及桃園 2 號等 6 個利用多向雜交育成之甘藷品種，發現經由多向雜交育成之品種大部份分布於同一群，多向雜交之甘藷品種與台灣地區在來種之遺傳相似性較大，而與日本及中國大陸品種距離較遠。Tseng 等人（2002）利用 SAMPL 分子標誌分析相同之 6 個多向雜交甘藷品種，由其樹狀分枝圖以及各品種之遺傳距離分佈圖可發現此 6 個甘藷品種相較於日本品種、中國大陸品種、台灣在來種以及由雜交育成之品種，具有較大的遺傳歧異性。本試驗材料中台農 64 號、台農 66 號、台農 68 號、台農 69 號、台農 70 號、台農 71 號、桃園 1 號、桃園 2 號與新育成之台農 72 號係選自多向雜交族群，發現除新育成品種台農 72 號與台農 69 號 2 個紅肉品種分群關係稍接近之外，其餘品種分別散佈在各小群中，由多向雜交品種間之平均遺傳距離為 51.3%，顯示利用多向雜交進行甘藷育種已有良好成效。

甘藷為自交不親和作物，品種間亦有雜交不親和群存在，為甘藷育種上一大阻礙，甘藷的雜交不親和性除了不利雜交育種工作進行外，同時限制多向雜交之親本族群的選擇。王（1964）分析 76 個台灣品種（種原）相互雜交結果，區分出 5 個雜交不親和群以及 1 個雜交親和群，其中 A 群主要包括中國大陸引進之品種、台灣當地品種以及菲律賓引進品種，而大部分美國引進之品種屬於 B 群，台農系列品種大部份分布於 D 群，少數屬於 E 群，而 C 群則包括沖繩 100 號、農林 40 號、台農 23 號以及台農 29 號等品種；而 F 群為雜交可稔群，包括有 2 品種及 1 品系，Violet Beauty、Albuog 及 C-461，雜交可稔群中的品種（系）與其他 5 群之品種進行雜交皆可稔。經過多年的雜交育種，現在已難區分各品種所屬之不親和群。在王（1964）所使用之 76 個品種（系）中，本研究僅包含沖繩 100 號（C 群）、農林 40 號（C 群）、台農 10 號（D 群）等 3 個品種，而台農新 31 號（D 群）為台農 31 號發生體細胞變異產生，因此亦可參照台農 31 號之不親和群分類；對照此 4 個品種在雜交不親和性上之分群及本試驗之 ISSR 分群結果，並無明顯相關性。由於王（1964）所使用之品種（系）至今日仍持續栽培之品種並不多，但部分為本試驗所使用之材料之親本來源，分析親本所屬之雜交不親和群與其雜交後代之分群關係，由 B 群之 Nancy Hall 雜交後代徐藷 18 號、栗子香、台農 57 號及台農 62 號 4 個品種，雖遺傳距離接近，但無法確定其雜交不親和群是否與 Nancy Hall 有相關性；由王（1964）所得之分群結果與品種引進地區具有相關性，屬於同一雜交不親和群之甘藷品種大部分來自同一地區，品種之間遺傳相似性較高，由此趨勢看來，則本研究所得之甘藷品種 ISSR 分子標誌之遺傳相似性分析結果可供甘藷進行雜交育種及多向雜交時親本選擇之參考，但各品種確切所屬之雜交不親和群仍有待進一步探討。

(三) 甘藷品種 ISSR 分子標誌之分析流程建立

Hu 等人 (2003) 使用 ISSR 引子進行甘藷栽培種及其野生種之分子標誌分析, 所得可產生多型性條帶之引子與本研究不完全相同, 可知部分引子為品種專一性引子, 因此當參試樣品包含特定品種時, 專一性引子才具有多型性表現。黃等人 (1999) 利用 RAPD 對 22 個甘藷栽培品種及 1 個野生種 *Ipomoea triloba* 進行分析, 發現由 8 條 RAPD 引子產生 11 個對 *Ipomoea triloba* 具有專一性之分子標誌, 由此可將其與甘藷栽培品種進行區分, 而其他參試品種也有部份具有專一性條帶產生, 但此專一性條帶僅供鑑別特定物種 (species) 使用, 並無法針對特定性狀或品種來源進行區分。本試驗僅發現由日本引進之甘藷品種 Sasahikari 在 834 引子 1050 bp 的位置出現一專一性條帶, 而其餘分子標誌對於各參試品種 (系) 之區分尚未發現與性狀或種原等特定條件之相關性。由於甘藷為六倍體之異結合個體 (allopolyploidy), 為異交作物, 基因組較大且由於其自交不親和的特性, 故遺傳歧異性較大, 分子標誌分析流程的建立可提供一快速且有效率之甘藷品種鑑定工具。

二、甘藷品種內 ISSR DNA 標誌變異分析

Sihachakr 等人 (1997) 發現甘藷利用組織培養進行無性繁殖時, 常會引起生長及塊根產量上的差異; 本研究利用 ISSR DNA 分子標誌偵測 2 個塊根用甘藷品種台農 66 號、桃園 1 號及 2 個葉菜用甘藷品種台農 71 號及桃園 2 號之品種內的遺傳變異, 發現甘藷品種內的 ISSR DNA 分子標誌變異程度介於 0.94% ~ 1.86% 之間。而邱 (1999) 利用 RAPD 分子標誌偵測甘藷品種台農 57 號及台農 66 號在各個不同生育時期品種內之變異程度, 發現變異各為 5.7% 及 1.3%, 其中台農 66 號品種內之 RAPD 分子標誌變異與本試驗之 ISSR 分子標誌分析結果相近; 而台農 57 號品種內變異偏高, 但本研究未採用相同品種故無法進一步比較。邱 (1999) 亦指出隨著甘藷扦插苗繁殖世代的增加, 其塊根及地上部產量會發生減少的情形。由以上研究結果可知甘藷在進行無性繁殖過程, 常會發生 DNA 層次之遺傳變異, 此遺傳變異可能會影響甘藷在田間生長及產量上的差異, 因此在連續採用同系之甘藷扦插苗繁殖數代後必須以種藷重新育苗以維持品質 (邱, 1999)。雖然由體細胞變異亦可供育種家選種時使用, 從中挑選表現良好之植株進行評估, 或可為新品種之來源, 例如台農新 31 號即農民自田間栽培之台農 31 號之芽條突變株所選出之新品種, 然而維持品種之遺傳及外表之均一性為優良品種所需具備之重要條件, 而本研究採用之 ISSR 分子標誌將可提供評估或監控品種內遺傳變異之有效工具。

結 論

本研究以 ISSR DNA 分子標誌分析甘藷之遺傳變異, 發現台灣所收集甘藷種原已具有較大之遺傳變異 (種原間之遺傳距離介於 12.5% ~ 94.4%), 其中新育成品種及地方品種間之遺傳距離為 51.9%, 尤其利用多向雜交族群所選育之新品種分散在各個樹狀圖分群中。各別分析兩個塊根用甘藷品種及兩個葉菜用甘藷品種內之分子標誌變異, 分別介於 0.94% ~ 1.30% 及 1.51% ~ 1.86%, 顯示品種在無性繁殖過程容易產生遺傳變異。本研究亦建立新品種台農 72 號及其他台灣重要栽培品種之 DNA 指紋, 並且推薦一套品種鑑別流程, 供未來應用。

誌 謝

本研究承蒙行政院農委會農糧署補助計畫經費（計畫編號 92 農科 -1.1.1 糧 Z2（4）及 93 農科 -1.1.1 糧 Z2（4）），特此致謝。

參考文獻

- 王俠。1964。甘藷自交與雜交不親和性及其他因子影響結實率之研究。中華農學會報 48: 1-12。
- 王俠、李良、簡金寬、沈水源、林金繳、蔡富。1966。甘藷雜交育種及品系比較試驗。雜糧作物試驗研究簡報 8: 14-16。
- 李良。1994。第 17 章，甘藷。出自“雜糧作物各論”，pp.1327-1478。台北：台灣區雜糧發展基金會。
- 邱仕華。1999。利用逢基擴增多型性 DNA（RAPD）標記偵測甘藷扦插繁殖世代基因組 DNA 之變異性。碩士論文。台北：中國文化大學生命科學研究所。
- 黃士穎、周業統、曾俞楨、羅筱鳳、李良、陳榮芳。1999。以逢基擴增多型性 DNA 片段分析甘藷多向雜交品種之遺傳關係。中華農藝 9: 185-194。
- 潘慶芝。2002。台灣落花生品種分子鑑定之研究。碩士論文。台北：國立台灣大學農藝學研究所。
- 雜糧作物試驗研究年報。1998。葉菜甘藷新品種「桃園 2 號」。87: 405-407。
- 雜糧作物試驗研究年報。1998。葉菜甘藷新品種「台農 71 號」。87: 408-411。
- Andersen, W. R. and D. J. Fairbanks. 1990. Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization. Diversity 6: 51-53.
- Brown, P. T. H. 1992. DNA Fingerprinting in Plant Breeding. Agro-Food-Industry Hi-Tech November/December.
- Connolly, A. G., I. D. Godwin, M. Cooper and I. H. DeLacy. 1994. Interpretation of randomly amplified polymorphic DNA marker data for fingerprinting sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. Theor. Appl. Genet. 88: 332-336.
- Dhillon, N. P. S. and K. Ishiki. 1999. Genomic variation and genetic relationships in *Ipomoea* spp. Plant Breeding 118: 161-165.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Gepts, P. 1993. The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. Evol. Biol. 27: 51-94.
- He, G., C. S. Prakash and R. L. Jarret. 1995. Analysis of genetic diversity in a sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. Genome 38: 938-945.
- Hernandez, T. P. and J. C. Miller. 1964. Further studies on incompatibility in the sweet potato. Proc.

- Amer. Soc. Hort. Sci. 85: 426-429.
- Hu, J., M. Nakatani, A. G. Lalusin and T. Kuranouchi. 2003. Genetic analysis of sweet potato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breeding Science* 53: 297-304.
- Huang, J. C. and M. Sun. 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potato 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.
- Hwang, S. Y., Y. T. Tseng and H. F. Lo. 2002. Application of simple sequence repeats in determining the genetic relationships of cultivars used in sweet potato polycross breeding in Taiwan. *Scientia Horticulturae* 93: 215-224.
- Jarret, R.L. and D.F. Austin. 1994. Genetic diversity and systematic relationships in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 41: 165-173.
- Kennedy, L. S. and P. G. Thompson. 1991. Identification of sweet potato cultivars using isozyme analysis. *HortScience* 26: 300-302.
- Kokubu, T. and M. Hirai. 1978a. Variation of esterase isozymes in sweet potato varieties. *Memoirs Faculty Agr. Kagoshima Univ.* 14: 85-92.
- Kokubu, T. and K. Maeda. 1978b. Variation of peroxidase isozymes in sweet potato varieties. *Memoirs Faculty Agr. Kagoshima Univ.* 14: 77-84.
- Kokubu, T. and T. Nakakawaji. 1982. Variation of peroxidase isozymes in the wild related species of sweet potato. *Memoirs Faculty Agr. Kagoshima Univ.* 18: 69-74.
- Miano D. W., D. R. LaBonte and C. A. Clark. 2008. Identification of molecular markers associated with sweet potato resistance to sweet potato virus disease in Kenya. *Euphytica* 160: 15-24.
- Miller. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA). <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/tfpga.asp>.
- Monckton, D. G. and A. J. Jeffreys. 1993. DNA profiling. *Curr. Opin. Biotech.* 4: 660-664.
- Sihachakr, D., R. Haïcour, J. M. Cavalcante Alves, I. Umboh, D. Nzohgé, A. Servaes and G. Ducreux. 1997. Plant regeneration in sweet potato (*Ipomoea batatas* L., Convolvulaceae). *Euphytica* 96: 143-152.
- Smith, J. S. C. and O. S. Smith. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Adv. in Agron.* 47: 85-140.
- Tseng, Y., H. F. Lo and S. Y. Hwang. 2002. Genotype and assessment of genetic relationships in elite polycross breeding cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphisms. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 99-105.
- Ukoskit, K. and P. G. Thompson. 1997. Autopolyploidy versus allopolyploidy and low-density randomly amplified polymorphic DNA linkage maps of sweet potato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 822-828.
- Xue, Q. H., S. Y. Shi, A. M. Liu and Q. H. Yi. 1988. Analysis of peroxidase isozymes of *Ipomoea*

species. Chinese J. Genet. 15: 41-48.

Zhang, D., J. Cervantes, Z. Huaman, E. Carey and M. Ghislain. 2000. Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP. Genetic Resources and Crop Evolution 47: 659- 665.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

Variation in ISSR DNA markers among varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Taiwan

Ching-Hua Chien⁽¹⁾ Yung-Chang Lai⁽²⁾ Yi-Sin Chen⁽³⁾ Shun-Fu Lin^{(4)*}

Abstract

To evaluate the genetic diversity of sweet potato varieties collected in Taiwan, ISSR DNA markers were applied in this study. Eighty-one informative markers detecting differences among varieties were proposed after the screen of 100 primers. And 23 out of these markers with strong and stable bands were used to establish DNA fingerprints of each variety and to evaluate the genetic diversity among germplasm. Results of genetic similarity analysis revealed the genetic distance among varieties ranged from 12.5 % to 94.4 %, and the average distance was 54.9 %. The new varieties selected from polycross populations were distributed in different groups of cluster analysis indicating the wide diversity among the varieties. However, large genetic distance between varieties developed in Taiwan and germplasm introduced from China was observed both in cluster analysis and principal component coordinate analysis suggesting the potential uses of China germplasm as breeding parents in the future. In addition, an effective scheme, employing 6 primers to amplify 14 polymorphic markers, for variety identification was proposed. To detect somatic variation that resulted from vegetative propagation, individual plants from 2 varieties (TNG 66 and TAY 1) for tube production and 2 (TNG 71 and TAY 2) for leaf production were tested with ISSR markers. About 0.94 % ~ 1.86 % of ISSR DNA variation for each variety was detected from 2640~3510 surveyed markers. The DNA fingerprints developed in this study would provide information for variety identification, clonal propagation, and genetic improvement of sweet potato.

Keyword: Sweet potato, Molecular marker, Variety identification

(1)Master Student, Department of Agronomy, National Taiwan University.

(2)Head, Department of Agronomy, Chia-Yi Branch Station of Taiwan Agriculture Research Institute.

(3)Former Head, Department of Agronomy, Chia-Yi Branch Station of Taiwan Agriculture Research Institute.

(4)Assistant Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University.

*Corresponding author

(Received June 11, 2008; Revised July 30, 2008; Accepted August 6, 2008)