

食用紅甘蔗核糖體基因內轉錄間隔區之選殖與分析¹

陳裕星、曾勝雄、沈 勳²

摘 要

本研究以引子5' -GTC CCT GCC CTT TGT ACA -3' ; 5' -CGC CGT TAC TAG GGG AAT CCT-3'可順利選殖出紅甘蔗部份核糖體基因及全長之內轉錄間隔區，長度共821鹼基，其中包括18S基因142鹼基，ITS1 206鹼基，5.8S基因164鹼基，ITS2 217鹼基以及26S基因92鹼基。依照ITS序列，高貴蔗與印度蔗、野生蔗及新幾內亞野生蔗親緣最為接近，跨屬比較時與芒屬序列最為接近。

關鍵字：紅甘蔗、核糖體基因、內轉錄間隔區。

前 言

核糖體為細胞中負責蛋白質合成的胞器，由於細胞需對外在環境的變化迅速調整其反應，並在短時間內進行細胞分裂，因此成熟之ribosomal RNA於真核細胞中可達RNA總量之80%⁽¹¹⁾。在真核生物的染色體組中，核糖體基因的套數有時可達2萬套⁽¹⁴⁾。真核生物的核糖體基因為一呈縱線排列頭尾相連的重複性基因，每個重複單元包含了小次單元(16-18 S)、大次單元(23-28 S)及5.8 S基因⁽¹⁴⁾ (如圖一)，這些解碼區(coding region)由間隔區隔開，稱為內轉錄間隔區(Internal transcribed spacer, ITS)。大、小次單元由外間隔區(External spacer)或稱基因間隔區區隔(Inter-genic spacer, IGS)，5.8S基因則位於內轉錄間隔區中。

核糖體基因由於其序列高度保守及無所不在的性質，使得其基因序列成為建構親緣關係的重要工具⁽²⁾。核糖體小次單元基因已被用來分析很深的親緣分枝關係，大次單元則包含許多結構區(domain)，有些如同小單元為相當保守，其他部份序列的演化則較為迅速⁽³⁾。由於不同的選拔壓力，核糖體基因在不同的區域演化速率不同而有不同的保守程度。因此核糖體基因可被用在跨越廣泛的分類作為建構親緣關係的歷史發展工具⁽¹⁵⁾。除了高度保守的結構區，18S和28S基因也包含了高度變異性區域，稱為擴張片段(expansion segment)。在不同種間，28S核糖體基因大小的變化乃因其具有不同數量的擴張片段⁽¹⁹⁾。至於核糖體基因中最小的序列 - 5.8S基因則因太短而無法提供足夠的親緣關係訊息，因此通常並不建議使用5.8S基因序列來建構親緣關係。

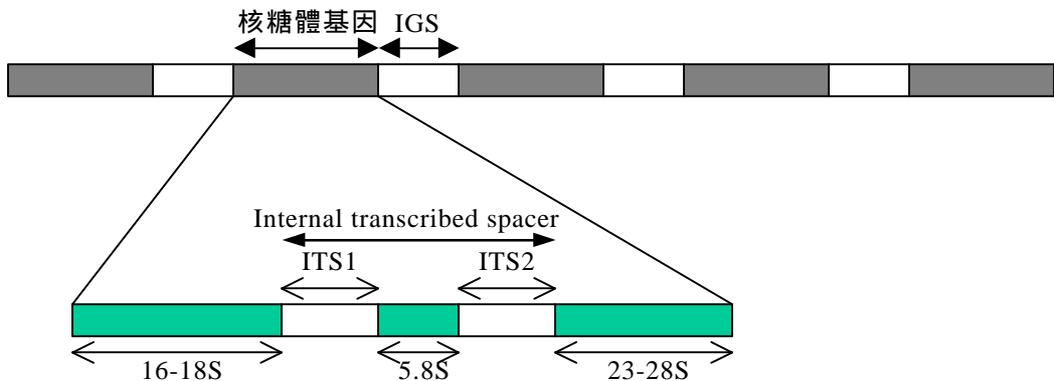
¹ 台中區農業改良場第 0527 號報告。

² 台中區農業改良場助理研究員、副研究員、技士。

核糖體基因間隔區由於其具有高度變異性，因此常用來建構親緣關係較為接近的種或族群⁽¹⁹⁾。在PCR技術問世之前，研究通常集中在基因間隔區，此間隔區包括小重複性單元(sub repeats)，具有不同套數及序列以及複製起始的密碼。不均等的基因互換及基因轉換(conversion)是導致IGS具高度變異的機制^(11,14)，IGS長度的差異性可以用南方雜交法分析。

自從PCR方法問世後，內轉錄間隔區(ITS)已成為愈來愈受歡迎的工具，可用在族群分化，及近緣種間親緣關係之建構之用⁽¹⁵⁾，他的受歡迎主要是因為在ITS區域兩旁的核糖體基因皆為高度保守序列，因而此密碼區可提供共用引子。而由於PCR方法的便利性及ITS並沒有重複序列的問題，單一個體內變異比IGS低，使得ITS的分析漸漸的較能為人所接受。在文獻中，直接定序或選殖分析皆曾被敘述使用，由定序而產生的標準序列訊息可作為親緣關係以及族群的分化分析之用。

甘蔗為禾本科(Graminae)中之蔗屬(*Saccharum*)植物，與高粱、玉米等同屬於蜀黍族(Andropogoneae)⁽⁸⁾。甘蔗屬已知有六個種，包括野生蔗(*S. spontaneum*)、中國蔗(*S. sinense*)、印度蔗(*S. barberi*)、高貴蔗(*S. officinarum*)、新畿內亞野生蔗(*S. robustum*)及食用蔗(*S. edule*)等，一般認為甘蔗的原產地有二，一為印度，一為新畿內亞(New Guinea)⁽¹⁶⁾。現代的甘蔗栽培品種幾乎全是由高貴蔗與野生蔗雜交育種得來之後代，本省常見之食用紅甘蔗則屬於高貴蔗中之Badila種⁽¹⁾。自1990年以來，甘蔗之研究主要包括了其與近緣種之演化^(4,6,8)、親緣關係及遺傳歧異度分析^(10,19)，使用方法則包括RFLP探針⁽¹⁶⁾，RAPD⁽¹⁹⁾，螢光原位雜交⁽⁹⁾等，並希望能藉由細胞遺傳角度來擴大甘蔗現代品種的遺傳基礎^(18,23)。本研究首先以選殖全長之核糖體基因內轉錄間隔區為目標，與已發表序列相比較，以作為後續研究之參考。



圖一、核糖體基因結構簡圖。

Fig. 1. Generalized structure of ribosomal DNA

材料與方法

植物材料

於1997年10月至12月間，本場分次派員往全省食用紅甘蔗之主要產區逢機採取20株蔗苗回場種植，並調查其農藝性狀。本研究於2000年10月間自本場蔗圃採取甘蔗成熟葉片，使用採自草屯產區之品種為本研究之參試材料。

DNA萃取

於2000年10月於本場蔗圃中，由蔗種中逢機自5株不同單株中各取下一片成熟葉片用以抽取DNA。DNA之抽取使用吉恩馬克公司(Gene Mark)之萃取核酸試劑組。操作程序略為修正如下：取甘蔗成熟綠葉約0.5 g，剪成碎片，用液態氮在研鉢中研磨成粉，將粉末移至1.5 ml的離心管，加入700 μ l的萃取液，加入1 μ l 20 mg/ml的proteinase K，混合均勻後在55 $^{\circ}$ C下反應一小時。將此粗萃取液離心，取澄清液至另一新的分離管(spin column)，並放在收集管中(collection tube)離心，使DNA吸附在膜上，倒掉流出液，以清洗液清洗三次，再離心使膜乾燥，最後以100 μ l 60 $^{\circ}$ C的ddH₂O將DNA洗出。DNA洗出後以1 μ l 50 mg/ml的RNase除去殘存之RNA，最後再加入酒精置於-20 $^{\circ}$ C下過夜沉澱之。沉澱之DNA經乾燥後再溶於100 μ l的ddH₂O中。

DNA定量

取總DNA抽取液10 μ l稀釋50倍，經充分混合後以紫外光(260 nm, Hitachi U-2001 Spectrophotometer)測定吸光值，依不同樣品DNA抽取液的濃度將各DNA樣本稀釋成8 ng/ μ l，作為模板DNA之用。

引子

關於引子設計之原則，包括Rychlik⁽²⁷⁾，Dopazo and Sobrino⁽²⁸⁾等皆曾提出其見解，茲綜合要點敘述如下：(一)須避免引子雙體之形成(dimer formation)；(二)引子本身不形成互補(self complementary)；(三)引子GC比值與熔解溫度T_m：引子的GC值要等於或略高於目標序列，若擴大大段小於500 bp，引子的T_m值可較低，只需16-18 mer即足夠，若欲放大大段長達5 kb，則引子需要較高的T_m值(約24 mer)。(四)內部穩定性：一般而言，當引子的5'端與模板形成穩定煉合(自由能 Δ G高)而引子的3'端自由能低時，不論PCR或定序的效果最好，在引子3'端自由能高時，常會形成錯誤的延伸(false priming)；(五)專一性(specificity)：包括引子與模板須專一性高，同時，在模板DNA中，此相似於引子的序列不會重複出現。本試驗即依上述原則選擇引子。

由於核糖體基因高度保守的特性，在不同物種中甚至可以發現相當長的保守序列(如表一)，許多重要禾本科作物及其他生物的核糖體基因已被解出，因此參考發表在GeneBank的序列包括人類、果蠅、阿拉伯芥、稻米、*Basillaria*及*Letichinus*之序列設計引子，其序列如下：

18S-F1: 5' -GTC CCT GCC CTT TGT ACA -3' ; 26S-R1: 5' -CGC CGT TAC TAG GGG AAT CCT-3'(表一陰影部分), 此二引子之 T_m 值分別為59.9 與64.9 。由表一可知, 在ITS序列往上游約0~40 bp與160~190 bp的18S rDNA之3'端以及在ITS序列往下游約20~40 bp與60~90 bp的18S rDNA 5'端皆有相當保守之序列, 本研究採用水稻在保守區之序列(以陰影表示)作為選殖之引子, 此引子不僅可用於甘蔗, 亦可用於其他物種。

表一、不同生物其核糖體基因對正後之部分序列(a)18S rDNA 3'端緊鄰內轉錄間隔區部分序列 ; (b)26S rDNA 5'端緊鄰內轉錄間隔區部分序列

Table 1. Partial sequences of rDNA of various organisms after alignment.(a) 3' region to the 18S rDNA; (b) 5' region to the 26S rDNA flanking internal transcribed spacers

(a) 3' of the 18S rDNA

	190	180	170	160	150	140
Homo sapiens	GTCCCTGCC	TTTGTACACA	CCGCCCGTCG	CTACTACCGA	TTGGATGGTT	TAGTGAGGCC
Drosophila	-----	-----	-----	-----	---A--TA--	-----T-
Arabidopsis	-----	-----	-----	--C-----	---A---A-C	CG----A-TG
Oryza sativa	-----	-----	-----	--C-----	---A----C	CG----A-TG
Basillaria	-----	-----	-----	-AC-----	---A----C	CG----A---
	130	120	110	100	90	80
Homo sapiens	CTCGGATCGG	CCCCGCCGGG	GTCGGCCAC	.GGCCCTGGC	GGAGCGC.TG	AGAAGACGGT
Drosophila	TC-----T	GAT-A-T-T-	A.--C-TTG-	GT-TTAC--T	T-TTT.-GCA	.A---TT-AC
Arabidopsis	T-----	-GG--A--T-	-GT--TT-G-	.C-----	-AC-T.-GC-	-----T-CAC
Oryza sativa	T-----	-GG--A--T-	-G--TT-G-	.C-----	-AC-T.-GC-	-----T-CA-
Basillaria	TCG----T-	TGG--A...-	T--CCTTT-T	.T-.GGA..G	TTT-T.-GC-	----CTT-TC
	70	60	50	40	30	20
Homo sapiens	CGAACTTGAC	TATCTAGAGG	AAGTAAAGT	CGTAACAAGG	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG
Drosophila	-----T	---T-----	-----	-----	-----	-----
Arabidopsis	TA---C-T-T	C--T-----	---G-G----	-----	-----	-----
Oryza sativa	T---C-T-T	C--T-----	---G-G----	-----	-----	-----
Basillaria	TA---C-T-T	C--T-----	---GTG----	-----	-----	-----A
	10					
Homo sapiens	GAAGGATCAT	T				
Drosophila	-----	-				
Arabidopsis	-----	-				
Oryza sativa	-----	-				
Basillaria	-----	A G				

(b) 5' of the 26S rDNA.

	10	20	30	40	50	60
Homo sapiens	GACCTCAGAT	CAGACGTGGC	GACCCGCTGA	ATTTAAGCAT	ATTAGTCAGC	GGAGGAAAAG
Drosophila	A-----AC-	--T-T-G-A-	T-----	-----	---A-TG-	-----
Arabidopsis	---C---G-	---G--G-AT	T-----	G-----	--C-A-A---	-----
Oryza sativa	---C---G-	---G--G-A-	T-----	G-----	--A-A-A---	-----G---
Letchinus	---G---G-	-G---A-A-	C-----	-----	--C-C-A---	-----
	70	80	90	100	110	
Homo sapiens	AAACTAACCA	GGATTCCCTC	AGTAACGGCG	AGTGAACAGG	GAAGAGCC	
Drosophila	-----A-	-----TT--T	---G-----	--C--A--A	A--C--TT	
Arabidopsis	-----A-	-----T	-----	--C--C--	-----	
Oryza sativa	-----T--G-	-----CT	-----	--C--C--	---GAT--	
Letchinus	-----	-----C-	---G-----	-----GC--	-----	

PCR反應

核糖體基因內轉錄間隔區之選殖使用波仕特公司之Tag Master Mix (其內含物詳產品說明)。取2.5 μ l之Master Mix, 加入1 μ l 10 pmol的引子F1及R1, 1 μ l 8 ng/ μ l的模板DNA, 並以ddH₂O補注至最終體積25 μ l。反應的熱循環溫度及時間如下, 首先94 反應5分鐘, 接下來三步驟進行35個循環, 依序為94 反應1分鐘, 53 30秒, 72 1分鐘, 最後72 反應5分鐘。此PCR反應皆使用Biometra Uno II型。

核酸之純化、擴增與定序

PCR反應結束後, 取10 μ l反應液以1.0%瓊脂膠(agarose)於TBE緩衝液中電泳分離, 經EtBr (ethidium bromide, 0.5 μ g/ml)染色後, 在紫外燈下觀察、照相, 之後用解剖刀將目標條帶切下, 以NucleoTrap試劑組(Clontech Co.)將此DNA回收供接合反應, 以便後續之定序工作。

目標DNA之擴增依 Sambrook 等人(1989)⁽²⁰⁾之法, 利用大腸桿菌JM109製備勝任細胞(competent cell)。另外, 將經所回收之DNA與pGEM T-vector (Promega Co.)於室溫下行接合反應(ligation)。將此接合後之質體與勝任細胞行轉型作用(transformation), 經大腸桿菌培養、複製及質體抽取後, 交由明欣生物科技公司行定序反應, 以讀取定序之DNA的序列。

資料之分析

獲得甘蔗ITS序列資訊之後, 首先利用NCBI所提供之應用工具Blast搜尋比較與此序列相似度高的序列, 之後由其中選取較具有代表性之蔗屬植物及外源植物進行比較, 利用軟體GeneDoc進行序列之對正(alignment), 之後利用軟體Dambe分析其親源演化關係。

結果與討論

在進行核糖體基因序列分析的第一步驟為序列的對正(亦即尋找同質性特徵)。攜帶蛋白質密碼的基因序列較容易對正, 因為這些序列遵循廣為人知的原則, 例如三個鹼基構成一個胺基酸。但是這些原則對核糖體基因並不適用, 因為核糖體基因序列的密碼並非解成蛋白質。因此可能有插入或刪除一個到數個鹼基, 因此基於一級序列排定同質序列的位置有其困難度。但因許多重要禾本科作物其核糖體基因及ITS序列已被解出, 因此有助於序列之判斷及對正。

由本研究所用之引子經選殖電泳後可見一條帶長約800鹼基, 經由雙向定序後, 讀出之長度為821個鹼基(圖二), 其中包含了小次單元基因(18S)的3'端142個鹼基, 大次單元基因(26S)之5'端92個鹼基, 以及5.8S基因164個鹼基, 內轉錄間隔區的長度分別為206個鹼基(ITS1)及217個鹼基(ITS2)。

與發表於Genebank中之高貴蔗(*Saccharum officinarum*) R1品系(AF345229)相較, 可發現在ITS1及ITS2區域各有3個及1個鹼基的差異(圖二), 而5.8S基因則完全相同。由基因庫中所登錄所有之高貴蔗資料亦顯示, 相同種不同品系間在ITS1及ITS2區域有1~5個不等的鹼基差異。

本研究除針對草屯地區品種定序外，對關山地區品種之定序結果也顯示類似的情況。不同鹼基置換的結果可能造成限制酶切位的改變，可由PCR-RFLP的結果看出，由相同引子所選殖出之ITS片段大小相同，但經限制酶切後其產物片段大小不一(資料未顯示)。在ITS1區域中亦可發現GGCRY- (4 to 7n)-GYGYCAAGGAA (Y 表 C 或 T, R表 G或 A, IUB code)的典型保留序列(如圖二陰影區 ggcgc - cttag - gcgtaaggaa)，一般推測在高等植物中，此保留區在rDNA經轉錄形成成熟rRNA (mature RNA)的過程中扮演重要角色。

將本研究所解出之序列送入基因庫中比對，其序列相似度高於90%之近緣種包括甘蔗屬(*Saccharum*)、蔗茅屬(*Erianthus*)、蜀黍屬(*Sorghum*)、薏苡屬(*Coix*)、玉蜀黍屬(*Zea*)、香茅屬(*Cymbopogon*)、白茅屬(*Imperata*)、芒屬(*Miscanthus*)、菅屬(*Themeda*)等蜀黍族之成員。蔗屬中相似度最高者為蔗屬之高貴蔗(*S. officinarum*)，其次為印度蔗(*S. barberi*)、新幾內亞野生蔗(*S. robustum*)、野生蔗(*S. spontaneum*)、雜交蔗(*S. hybrid*)及竹蔗(*S. sinense*)等，皆高於98%。

針對ITS序列長度對蜀黍族不同成員做比較時，整體言之，不論是ITS1，ITS2序列的長度或GC值，蔗茅屬植物與甘蔗屬植物的相似度較高(表二)，蜀黍屬植物的ITS2片段長度比甘蔗屬植物長22~24鹼基，玉蜀黍屬植物的ITS1比甘蔗屬植物長4~14 mer，GC值也比其餘三屬植物高。比對ITS序列時，表二內除玉蜀黍屬植物外，不論是插入鹼基或突變，不同種屬間序列的差異呈現隨機的分布，然而玉蜀黍屬植物在第66~200 b.p.區域的序列則截然不同，相似度低於50%。

在蜀黍族之成員中，*Sorghum* 與 *Erianthus* 為常被用來研究甘蔗遺傳演化^(16,18)及雜交育種^(4,18)之材料，除此之外，*Imperata*及*Miscanthus*亦曾有跨屬雜交成功的經驗，顯示甘蔗對於外來的遺傳物質有極高的容受力^(16,18)，但這些雜交多以甘蔗作為母本，這是因為甘蔗的基因組大小遠大於這些近源屬的植物，以甘蔗為父本的雜交成功率並不高⁽¹⁸⁾。

以ITS序列進一步進行本屬內不同種之親緣演化關係，並以蔗茅屬(*Erianthus fulvus*)、芒屬(*Miscanthus sinense*)植物作為外源(outgroup)，可發現蔗屬植物之演化分歧歷史並不久遠，僅約1.3萬年(圖三)，與蔗茅屬及芒屬植物則在約三萬年前開始分歧，與若干裸子植物動輒數千萬年的存在歷史相較之下，其演化為相當晚近的事件。目前有關於蔗屬植物起源的研究並不十分豐富，Daniels 及Roach (1987)⁽⁸⁾認為*S. spontaneum*，*Erianthus arundinaceus*與*Miscanthus*共同演化形成了目前的高貴蔗，但是以RFLP標誌研究顯示*Erianthus arundinaceus*與高貴蔗並沒有特別顯著的關聯性^(4,16)，但可確定野生蔗(*S. spontaneum*)與高貴蔗有相當緊密的親緣關係。

Lu^(16,17)等研究報告指出，新幾內亞野生蔗的染色體數目主要為 $2n=60$ 及 80 ，並有異倍數體之情形，介於63-200條之間，並推論高貴蔗為其中之一系($2n=80$)，之後高貴蔗與廣泛分布於歐亞大陸的野生蔗($2n=40-128$)自然雜交，其中野生蔗東方族群與高貴蔗共同演化行程分布於中國及東南亞的竹蔗(*S. sinense*， $2n=110-120$)，中部族群則與高貴蔗共同演化形成印度蔗(*S.*

barberi, 2n=81-124)。以RAPD分子標誌的研究則顯示，野生蔗的基因歧異度最高⁽¹⁹⁾，最低者為高貴蔗。

(A) Partial sequence of 18S (3' end) rDNA of *Saccharum officinarum* Tsao-Tweng isolate.

```
1  gtccctgccc ttgtacaca cgcgccgtcg ctccaccga ttgaatggc cggatgaag 60
61  ttcgatcgc ggcgacggag gcggttcgcc gccccgacg tcgcgagaag tccattgaac 120
121 cttatcattt agaggaagga ga 142
```

(B) Full length ITS of rDNA

```
T1 1  tcgtgaccct taacaaacc agaccgcgaa cgcgtccctc gtgccgccgg gcttcggccc 60
R1  -----a-----

T1 61  ggcacgaggt ccccgagctc cgtcccggag cggaggggcc acaacagaac ccacggcgcc 120
R1  -----t-----

T1 121 ttaggcgtca aggaacacct aaattgcctt gcgcggtgga gcgatcggcc cgcttttgct 180
R1  -----t-----

T1 181 cccgcgcgag cgatgatatc ttaattgaca cgactctcgg caacggatat ctcggtcttc 240
R1  -----

T1 241 gcatcgatga agaactgagc aaaatgcgat acctggtgtg aattgcagaa tcccgcgaac 300
R1  -----

T1 301 catcgagttt ttgaacgcaa gttgcgcccg aggccttctg gccgagggca cgtctgcctg 360
R1  -----

T1 361 ggcgtcacgc caaaagacac tccaaccca cccgagggga gggacgtggt gtttggctcc 420
R1  -----

T1 421 ccgtgccgca gggcgcggtg ggccgaagt ggggtgccg gcgaatcgtg tcgggcacag 480
R1  -----

T1 481 cacgtggtgg gcgacaatca gttgttctcg gtcagcggcc ccggcacgcg gccggcgcat 540
R1  -----t-----

T1 541 cggccctaag gaccaagga gcaccgcagc gcatagccgc tcggacc 587
R1  -----
```

(C) Partial sequence of 26S (5' end) rDNA.

```
1  gacaccaggc cagtcgagac taccactga gtttaggcat ataaataagc ggaggagaag 60
61  aaacttacga ggaattcccc tagtaacggc ga 92
```

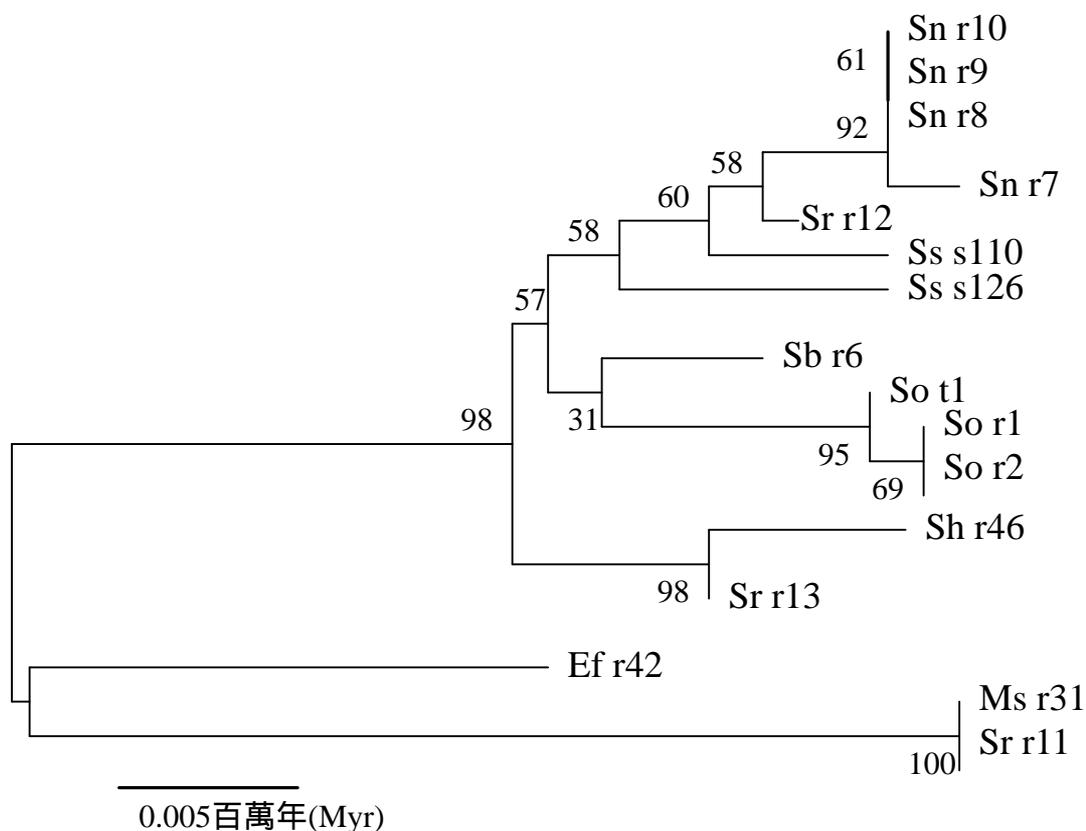
圖二、紅甘蔗核糖體基因部分序列及全長之內轉錄間隔區(ITS)序列。(A)核糖體 18S 3'端基因部份序列；(B)全長之 ITS 序列，包括 5.8S 基因(框線內之序列)；ITS 中之保守序列以陰影表示，對照序列(以 R1 表示)為發表於 Genebank (AF345229) 中之高貴蔗(*Saccharum officinarum*) R1 品系，T1 為本研究所用之草屯(Tsao-tweng)地區品種；及(C)核糖體 26S 5'端部份基因序列。

Fig. 2. Partial Sequence of rDNA and full length ITS of rDNA of *Saccharum officinarum*. (A) Partial sequence of 18S (3' end) subunit. (B) Full length ITS including 5.8S DNA, marked in square. The conserved region in ITS1 is shaded. The sequence indicated by R1 is an isolated line published in Genebank (AF345229); and (C) Partial sequence of 26S (5' end) subunit.

表二、蜀黍族中與蔗屬近緣之四個重要屬其核糖體基因內轉錄間隔區資料

Table 2. Profiles of ITS region of rDNA in 4 genus of *Andropogoneae* that are closely related to *Saccharum*.

Latin name	ITS1	5.8S rRNA	ITS2	Full length bp	GC content (%)	Accession. No.	Source
<i>Saccharum</i>				ITS			
<i>Saccharum barberi</i>	207	164	217	588	64.1	AF345200	7
<i>Saccharum hybrid</i>	207	164	218	589	64.0	AF345225	7
<i>Saccharum officinarum</i>	206	164	217	587	63.7	AF345229	7
<i>Saccharum robustum</i>	207	164	218	589	65.2	AF345239	7
<i>Saccharum robustum</i>	207	164	218	589	63.5	AF345237	7
<i>Saccharum sinense</i>	207	164	219	590	63.9	AF345243	7
<i>Saccharum spontaneum</i>	207	164	219	590	63.9	AF345245	7
<i>Erianthus</i>							
<i>Erianthus arundinaceus</i>	206	164	216	586	65.4	AF345211	7
<i>Erianthus arundinaceus</i>	206	164	216	586	65.9	AF345210	7
<i>Erianthus fulvus</i>	208	164	218	590	64.1	AF345220	7
<i>Erianthus ravennae</i>	206	164	216	586	66.9	AF019824	13
<i>Erianthus rockii</i>	207	164	218	589	64.3	AF345217	7
<i>Sorghum</i>							
<i>Sorghum australiense</i>	207	164	241	612	64.1	SAU04788	24
<i>Sorghum bicolor</i>	207	164	240	611	61.0	SBU04789	24
<i>Sorghum laxiflorum</i>	207	164	240	611	63.7	SLU04791	24
<i>Sorghum macrospermum</i>	207	164	240	611	63.0	SMU04798	24
<i>Sorghum matarankense</i>	207	164	241	612	64.1	SMU04792	24
<i>Sorghum nitidum</i>	207	164	240	611	59.7	SNU04797	24
<i>Sorghum purpureo-sericeum</i>	207	164	241	612	63.7	SPU04793	24
<i>Sorghum stipoides</i>	207	164	241	612	63.9	SSU04794	24
<i>Zea</i>							
<i>Zea diploperennis</i>	221	164	211	596	68.3	ZDU46591	5
<i>Zea luxurians</i>	215	164	221	600	68.0	ZLU46594	5
<i>Zea mays ssp. huehuetenange</i>	214	164	220	598	67.7	ZMU46648	5
<i>Zea mays ssp. mexicana</i>	214	164	220	598	68.2	ZMU46643	5
<i>Zea mays ssp. parviglumis</i>	214	164	223	601	68.1	ZMU46625	5
<i>Zea perennis</i>	211	164	221	596	68.0	ZLU46584	5
<i>Zea perennis</i>	211	164	217	592	67.7	AF019818	13



圖三、由核糖體基因之內轉錄間隔區所推估蔗屬植物之親緣演化關係，英文代號縮寫表示學名，分別為 Sn: *Saccharum sinense*; Ss: *S. spontaneum*; Sb: *S. barberi*; So: *S. officinarum*; Sh: *S. hybrida*; Sr: *S. robustum*; Ef: *Erianthus fulvus*; Ms: *Miscanthus sinense*。學名縮寫之後為地區品系代碼，如 r7、s126 等，其中 So t1 為草屯地區品種。

Fig. 3. Phylogenetic relationship of plants in the genus *Saccharum* inferred from ITS sequences. The abbreviations used represent different species viz: Sn: *Saccharum sinense*; Ss: *S. spontaneum*; Sb: *S. barberi*; So: *S. officinarum*; Sh: *S. hybrida*; Sr: *S. robustum*; Ef: *Erianthus fulvus*; Ms: *Miscanthus sinense*. The codes after abbreviations are selected lines of different districts in which So t1 represents Tsao-tseng district cultivars employed in this study.

由圖三之演化樹可發現，竹蔗與新幾內亞野生蔗、野生蔗、印度蔗及高貴蔗等共同形成一演化群，其中每個節點上的數字為其信賴區間百分比(bootstraps)的數值，而90以上為一般認為證據顯著支持的區間⁽²⁶⁾，本研究以ITS此變化較為迅速的序列資訊進行分析，在蔗屬獲得極高的支持度，顯示蔗屬此一獨立分類群確實有別於蔗茅屬及芒屬，其下竹蔗(Sn: *S. sinense*)與高貴蔗(So: *S. officinarum*)各自形成一明確之分類群，包括本研究所用之草屯地區品種(So t1)，值得一提的是，新幾內亞野生蔗(*S. robustum*)的不同品系(Sr r11, r12, r13)廣泛落於此演化

樹的不同地位，包括與芒屬(*Miscanthus sinense*)植物有極緊密的關聯，這似乎暗示了新幾內亞野生蔗(*S. robustum*)可能為近代蔗屬植物的源起，同時具有最高的遺傳歧異度。至目前為止，利用DNA序列資訊進行演化分析是公認最為客觀且廣被接受的方法，雖然蔗屬各種之間的關係僅有部分結果獲得強而有力的佐證，這可能是蔗屬各個種(species)的演化歷程較短所致，以序列資訊並無法得到較高的解析度，若要獲得更進一步的訊息，可能須利用其他方法如RFLP、PCR-RFLP或甚至RAPD等條帶分析方式來獲得更多的標誌來鑑別。

核糖體基因是多基因族，叢集通常分布在數條染色體中，有趣的是，所有的基因僅和單一品種密切相關⁽²⁵⁾，並且在一個個體內，不同單一核糖體基因在序列差異性(divergence)極為有限，相較之下，不同種間核糖體基因序列差異性則呈現常態的分布⁽²¹⁾。這種現象被稱為協同演化(concert evolution)。協同演化可能的機制為不均等的染色體互換及基因轉換⁽²²⁾，不論主導協同演化的機制為何，同化作用(homogenization)、基因突變與基因同質化(homogeneity)等因素相互作用下使單一個體的基因密碼區鮮少呈現多型性^(22,25)。因此，核糖體基因的多基因特性對於建構親緣關係的有用性上並不影響。間隔區則因比密碼區演化率更快，因而可能呈現多型性，這樣的性質若以不同酶切可產生片段長度不等的條帶，可作為品種識別的標誌。

ITS近來愈來愈受歡迎作為族群分化及近緣種間親緣關係的研究工具，不需事先對序列的訊息有所認知即可使用保守區域作為引子⁽¹²⁾，利用PCR來擴大複製。雖然此法廣受歡迎，但缺點是自然族群常受內生或外生寄生生物污染，而大多數較原始的寄生生物其ITS序列皆較短，因此在PCR反應中較有效率地被複製，這種情形在寄生生物多，或目標物的ITS序列較長或GC含量高時特別顯著，本研究在試驗過程中亦曾遭細菌污染，因此在選殖ITS後須進一步確認此序列是否正確。

誌 謝

本研究承農委會科技計畫經費補助，賴月櫻、曹淑娟小姐協助試驗選殖工作，特此誌謝。

參考文獻

1. 湯文通 1967 甘蔗育種 作物育種之原理與實施 p.436-447. 科學農業社 台北。
2. Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed sequences of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae. *Mol. Phylogenetic Evol.* 1: 3-16.
3. Beech, R. N. and C. Strobeck. 1993. Structure of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene family of white spruce (*Picea glauca*). *Plant Mol. Biol.* 22: 887-892.
4. Besse, P., C. L. McIntyre and N. Berding. 1997. Characterisation of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (Andropogoneae - Saccharinae) using RFLP markers. *Euphytica* 93:283-292.

5. Buckler, E. S. IV and T. P. Holtsford. 1996. *Zea* ribosomal repeat evolution and substitution patterns. *Mol. Biol. Evol.* 13 (4), 623-632
6. Burner, D. M. 1991. Cytogenetic analyses of sugarcane relatives (Andropogoneae: Saccharinae). *Euphytica* 54:125-133.
7. Chen, H., Y. Fan, Q. Cai and Y. P. Zhang. 2001. Phylogeny in *Saccharum* and related species inferred from sequence analysis of the nrDNA ITS region. *Sugarcane Heredity and Breeding*, in press.
8. Daniels, J. and B. T. Roach. 1987. Taxonomy and evolution. In: D. J. Heinz (Ed.) *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier press, Amsterdam, pp.7-84.
9. Ha, Sen., P. H. Moore, D. Heinz, S. Kato, N. Ohmido and K. Fukui. 1999. Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence in situ hybridization and imaging methods. *Plant Molecular Biology* 39: 1165-1173.
10. Harvey, M. and F. C. Botha. 1996. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. *Euphytica* 89:257-265.
11. Hillis, D. M. and M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-446.
12. Hsiao, C., N. J. Chatterton, K. H. Asay and K. B. Jensen. 1995. Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, Triticeae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences. *Genome*: 38(2):211-223.
13. Hsiao, C., S. W. L. Jacobs, N. J. Chatterton, and K. H. Asay. 1997. A molecular phylogeny of the grass family (Poaceae) based on the sequences of nuclear ribosomal DNA (ITS). Cited from Genebank (<http://www.ncbi.nih.nlm.gov/>), not published.
14. Jorgensen R. A., and P. D. Cluster. 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1238-1247.
15. Liu, J. S. and C. L. Schardl. 1994. A conserved sequence in internal transcribed spacer of plant nuclear rRNA genes. *Plant Mol. Biol.* 26: 775-778.
16. Lu, Y. H., A. D'Hont, D. I. T. Walker, P. S. Rao, P. Feldmann and J. C. Glaszmann. 1994. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize probes. *Euphytica* 78:7-18.
17. Lu, Y. H., A. D'Hont, F. Paulet, L. Grivet, M. Arnaud and J. C. Glaszmann. 1994. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. *Euphytica*: 78, 217-226.

18. Nair, N. V. 1999. Production and cyto-morphological analysis of intergeneric hybrids of *Sorghum x Saccharum*. *Euphytica* 108:187-191.
19. Nair, N. V., S. Nair, Screenivasan T. V. and M. Mohan. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 46: 73-79.
20. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
21. Schaal, B. A. and G. H. Learn. 1988. Ribosomal DNA variation within and among plant populations. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 75: 1207-1216.
22. Schlotterer C., and D. Tautz. 1994. Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchange drive concerted evolution. *Current Biology* 4:777-783.
23. Sills, G. R., W. Bridges, S. M. Al-Janabi and B. W. S. Sorbral. 1995. Genetic analysis of agronomic traits in a cross between sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and its presumed progenitor (*S. robustum* Brandes & Jesw. Ex Grassl). *Molecular Breeding*. 1:355-363.
24. Sun, Y., D. Skinner, G. Liang, and S. H. Hulbert. 1994. Phylogenetic analysis of sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 89, 26-32
25. Wendal, J. F., A. Schnabel and T. Seelanan. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 280-284.
26. Felsenstein J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet.* 22:521-65.
27. Rychlik, W. 1993. Selection of primers for polymerase chain reaction. In: *PCR protocols*. ed. B. A. White, Humana Press, Totowa. pp.31-41.
28. Dopatz, J. and F. Sobrino 1993. A computer program for the design of highly variable genomes. *J. Virol. Methods.* 41: 157-166.

The Cloning and Analysis of Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA of *Saccharum officinarum* L.¹

Yu-Hsin Chen, Sheng-Hsiung Tseng, Sheen Schen²

ABSTRACT

The internal transcribed spacer (ITS) was cloned with a primer pairs: 5' –GTC CCT GCC CTT TGT ACA –3' and 5' –CGC CGT TAC TAG GGG AAT CCT–3'. A total 821 bp were cloned including partial sequence of 18S ribosomal DNA flanking ITS region (5' end, 142 bp), full length ITS (587 bp), and partial sequence of 26S ribosomal DNA flanking ITS region (3' end, 92 bp). The ITS sequence of *Saccharum officinarum* is most closely related to *S. spontaneum* and *S. robustum* in the genus *Sacharum*, while most closely related to *Erianthus* spp. when it was compared across genus.

Keywords: *Saccharum officinarum*, ribosomal DNA, ITS.

¹ Contribution No. 0527 from Taichung District Agricultural Improvement Station (TDAIS).

² Assistant researcher, associate researcher and assistant researcher of TDAIS, respectively.