

以分子標記鑑定食用紅甘蔗品系初探¹

陳裕星、沈勳、曾勝雄²

摘 要

在不同地區栽培品系基因差異性之分析上,本研究選殖食用紅甘蔗核糖體基因內轉錄間隔區(Internal transcribed spacer, ITS),再以限制酶(restriction endonuclease)加以切割,在16個品系中,初步獲得57個條帶,其中有13個條帶為專屬條帶,分別屬於二水、油車、關山及池上。其中以Hpa II可直接鑑定出關山及池上品系。顯示東部地區之栽培品系與西部之栽培品系有明顯差異,而多形性片段顯示不同地區栽培品系確有不同。

關鍵字：食用紅甘蔗、內轉錄間隔區、限制酶、地方品系。

前 言

甘蔗為禾本科(Graminae)中之蔗屬(*Saccharum*)植物⁽⁵⁾。一般認為甘蔗的原產地有二,一為印度,一為新幾內亞(New Guinea)^(9,12)。甘蔗屬已知有六個種^(8,17),包括野生蔗(*S. spontaneum*),中國蔗(*S. sinense*),印度蔗(*S. barberi*),高貴蔗(*S. officinarum*),新幾內亞野生蔗(*S. robustum*)及食用蔗(*S. edule*)等。現行之栽培品種,不論為鮮食或製糖品種,均和高貴蔗有較高的親緣關係^(3,13),然而這些現代品種以及高貴蔗的基因歧異度都相當低,不同種間的基因歧異度則以野生蔗最高,新幾內亞野生蔗次之。因此目前世界各國在甘蔗之育種皆朝向擴大遺傳基礎,增加抗病力的方向著手。

甘蔗在台灣的栽培可追溯自17世紀⁽²⁾,由鄭成功帶領軍隊來台時亦引進了竹蔗的栽培。在日本佔領台灣後全力發展糖業並引進不同品系,曾於1938~1939年間創下了1,418,731公噸之最高糖年產量記錄。目前在台灣食用紅甘蔗屬於高貴蔗中之Badila種⁽¹⁾,栽培地區主要分布於中部、南部及東部,包括草屯、名間、竹山、埔里、田中、二水、荊桐、油車、朴子、鹽埔、池上、關山等鄉鎮⁽⁴⁾。

甘蔗栽培均採無性繁殖,以蔗莖為繁殖體,將蔗莖切成雙芽或多芽的莖段⁽¹⁾,稱為蔗苗,亦有採宿根栽培者。長期無性繁殖蔗苗的結果,常造成品系退化,易染病害,各地區產量亦不穩定。有鑒定於此,本場自1997年起自全台各甘蔗產區採取健康蔗株,定植於本場並調查其生育情形並期能選拔優良品系,供各地區甘蔗栽培之用⁽⁴⁾。由於甘蔗栽培採無性繁殖法,因此一般咸認為各地區品系之基因組成並無差異,但甘蔗在上述所列地區栽培已久,各集團栽培地區之風土氣候不同,因此可能造成基因之改變,本場亦進行食用紅甘蔗農藝性狀之調

¹ 台中區農業改良場第 0531 號研究報告。

² 台中區農業改良場助理研究員、技士、副研究員。

查，發現不論在每株莖數、株高、葉寬、糖度、第五節間長度與粗度等性狀，在由不同產區取回栽培之樣品皆有不同⁽⁴⁾。本研究乃以不同地區之食用紅甘蔗為材料，嘗試利用分子標誌區別或鑑定不同栽培集團之品系，找出基因組中之差異並作為將來命名之參考。

材料與方法

植株材料

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。採苗地點包括：草屯、名間、竹山、埔里、田中、二水、林內、荊桐、西螺、油車、朴子、善化、鹽埔、關山、池上等鄉鎮。所採蔗苗均為當地農民田間栽培之健康苗。

試驗方法

一、DNA萃取

於2000年10月於本場蔗園中，由各地區採回蔗種中，逢機自5株不同單株中各取下一片葉片用以抽取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，將粉末置於1.5ml的離心管，加入700 μ l的萃取液以及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，最後再加入乙醇置於-20 $^{\circ}$ C下過夜沉澱。沉澱之DNA經乾燥後再溶於以100 μ l的ddH₂O中。

二、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 Spectro-photometer)測定吸光值⁽¹⁶⁾，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。

三、引子

RAPD反應所用引子採用Operon公司出產之產品，依產品說明將引子加入適量的ddH₂O稀釋至2 mM⁽¹⁹⁾。核糖體基因的內轉錄間隔區在(ITS)及基因間隔區(IGS)則參考發表在GeneBank的稻米與大麥核糖體基因序列設計，其序列如下：IT1 (forward primer, 18S): 5' -GTC CCT GCC CTT TGT ACA -3' and IT2 (reverse primer, 26S): 5' -CGC CGT TAC TAG GGG AAT CCT-3'。

四、PCR反應

PAPD反應及ITS之選殖皆使用吉恩馬克公司之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 (2 mM)的逢機引子(Operon F1-F20)或1 μ l 2 mM的IT1、2。反應的煉合溫度(annealing temperature)在RAPD為40 $^{\circ}$ C，在ITS之選殖皆為55 $^{\circ}$ C。反應的熱循環

溫度及時間如下，首先94 反應5分鐘，接下來94 反應1分鐘，40或55 30秒，72 1分30秒，等三步驟進行35個循環，最後72 反應5分鐘。此PCR反應皆使用Biometra Uno II型。

五、限制反應

本研究所使用之限制酶如表一所列。取7 μ l的PCR產品，加入3 μ l事先混合好含BSA，緩衝液及5單位限制酶的反應液，在37 下反應16小時，其中*Tag I*的反應條件為70 3小時。

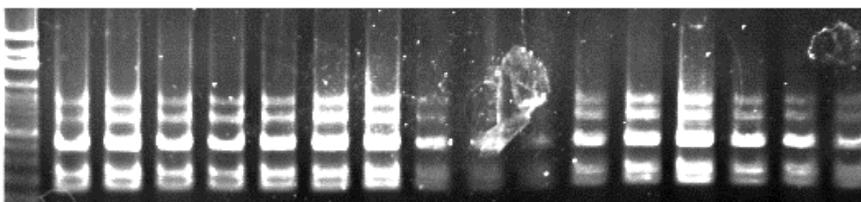
六、電泳及統計分析

RAPD反應產品以1%瓊脂膠電泳分離，PCR-RFLP反應產品則以1.5%瓊脂膠電泳分離，每一DNA條帶視為一特徵，以1、0代表DNA條帶的有無，依此製作DNA條帶圖譜⁽¹⁵⁾。並參考已知分子大小的核酸標誌，估算核酸片段的大小。DNA圖譜建立後，以套裝軟體NTSYS以不加權相對組法(unweighted pair-group method analysis, UPGMA)，進行群叢分析(cluster analysis)繪製出樹狀圖。

結果與討論

甘蔗汁的飲用在台灣已是一大特色，街頭巷尾處處可見。甘蔗之栽培歷年來皆以無性繁殖為主，育種方面僅有台糖進行製糖用綠甘蔗之育種工作，本場因而開始著手進行食用紅甘蔗之品系選育工作。本研究調查全台21地區食用紅甘蔗，並選出其中16地區作進一步DNA的指紋分析比對。在參試材料中，共使用20條隨機引子(OPF1-OPF20)。其中僅有4組可勉強將供試品種分為二群，其餘隨機引子皆產生長度一致的條帶(如圖一)，本研究使用RAPD結果發現品系間歧異度並未如想像中明顯。

M



圖一、由隨機引子 OPF-05 所產生之條帶形式，M: marker，地區品系依序由左至右為草屯、名間、竹山、埔里、田中、溪洲、二水、林內、油車、西螺、朴子、善化、田寮、鹽埔、關山、池上。

Fig. 1. The band pattern generated by random primers OPF-05 after PCR, the district lines tested are Tsao-twen, Ming-jian, Chu-shan, Pu-li, Tien-chung, Shi-chou, Earl-shui, Lin-nay, Jo-tse, Shi-luo, Pu-tze, Shan-hwa, Tien-liao, Yen-pu, Guan-shan, Chi-sang, from left to right.

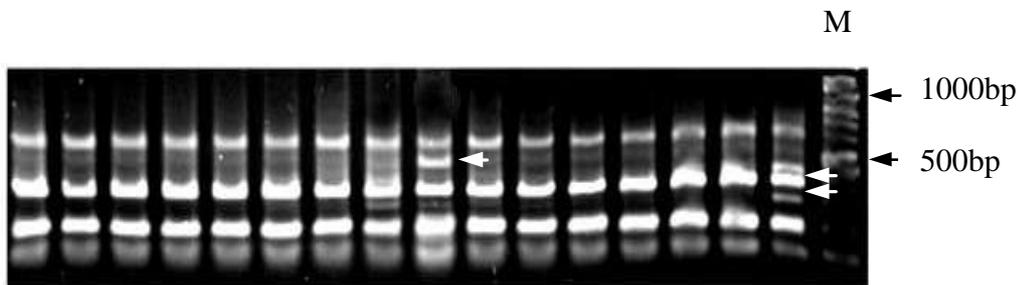
由於無法產生具高度多型性條帶，因此乃改採用另一策略，選殖rDNA之ITS並以限制酶進行切割分析(表一)。將草屯地區品系以引子IT1、2進行選殖，結果各得到相當清楚且專一的條帶，長度約在800~900 bp。經定序後確定為rDNA之ITS區域，詳細序列已發表於本場0527

號報告中³。由不同地區品系選殖出來的ITS方面，經限制酶切割後(如圖二)，初步判定共獲得57條帶，其中有13個條帶為專一性條帶，分別屬於田中、二水、油車及池上品系，剩餘條帶雖然並非專一，但在不同品系中仍具有多形性，應足以區分不同品系。在16個品系中，二水、油車及池上品系屢次顯現出不同於其他品系的條帶，顯示其在ITS的變化相當不同於其餘品系。經過群叢分析後可以得到基於ITS限制片段的相似性矩陣(表二)及樹狀關係圖(圖三)。

表一、本研究所使用之限制酶，基本資料與分析結果

Table 1. Endonucleases, recognition site and results of PCR-RFLP

No.	Name	Polymorphism	No. of bands	Recognition site
1	<i>Hin</i> 6 I	√	4	G'CGC
2	<i>Rsa</i> I	√	7	GT'AC
3	<i>Hpa</i> II	√	5	C'CGG
4	<i>Hinf</i> I	√	6	G'ANT C
5	<i>Hae</i> III	√	6	GG'CC
6	<i>Taq</i> I	√	8	T'CGA
7	<i>Nci</i> I	√	4	CC'(C/G)GG
8	<i>Dde</i> I	√	5	C'TNAG
9	<i>Bst</i> o I	√	5	CC'(A/T)GG
10	<i>Eco</i> R I		2	G'AATT C
11	<i>Cfo</i> I	√	5	GCG'C
Total bands			57	
Average bands/enzyme			5.2	



圖二、紅甘蔗核糖體基因內轉錄間隔區(ITS)之限制片段多型性(*Hinf*I)，M: marker, bio100 ladder，白色箭頭處為多型性片段。品系順序如圖一所示。

Fig. 2. The PCR-RFLP (*Hinf*I) of ITS of ribosomal DNA. M: bio 100 ladder marker. White arrows indicate polymorphic fragments. The local lines are the same with those shown in Figure 1.

一般而言，逢機引子可以相當有效率地顯示出基因多型性，然而本研究則僅得有4組引子(8%)可產生多形性條帶，低於Operon公司產品介紹所提的平均80%⁽¹⁹⁾。這可能是因為目前

所栽培之甘蔗皆由無性繁殖而來之故，不同栽培集團之紅甘蔗基因差異有限，或是此研究所用之引子並未擴大複製到基因高度變化之區域。此外，若基因之變異為點突變，則以RAPD亦不易由長度上得知其變化，除非變異產生點導致隨機引子所煉合區域改變，使擴大複製的片段長度改變。相對的，由於鹼基之置換可造成限制酶切位不同⁽¹⁴⁾，使RFLP圖譜變化而產生片段多形性。這可以由圖二中看出，在ITS，有10個限制酶可產生多形性(表二)。

表二、以核糖體基因內轉錄間隔區為基礎所建立之甘蔗地區品系相似性矩陣

Table 2. Similarity matrix of different sugarcane local lines based on the RFLP of internal transcribed spacer of rDNA.

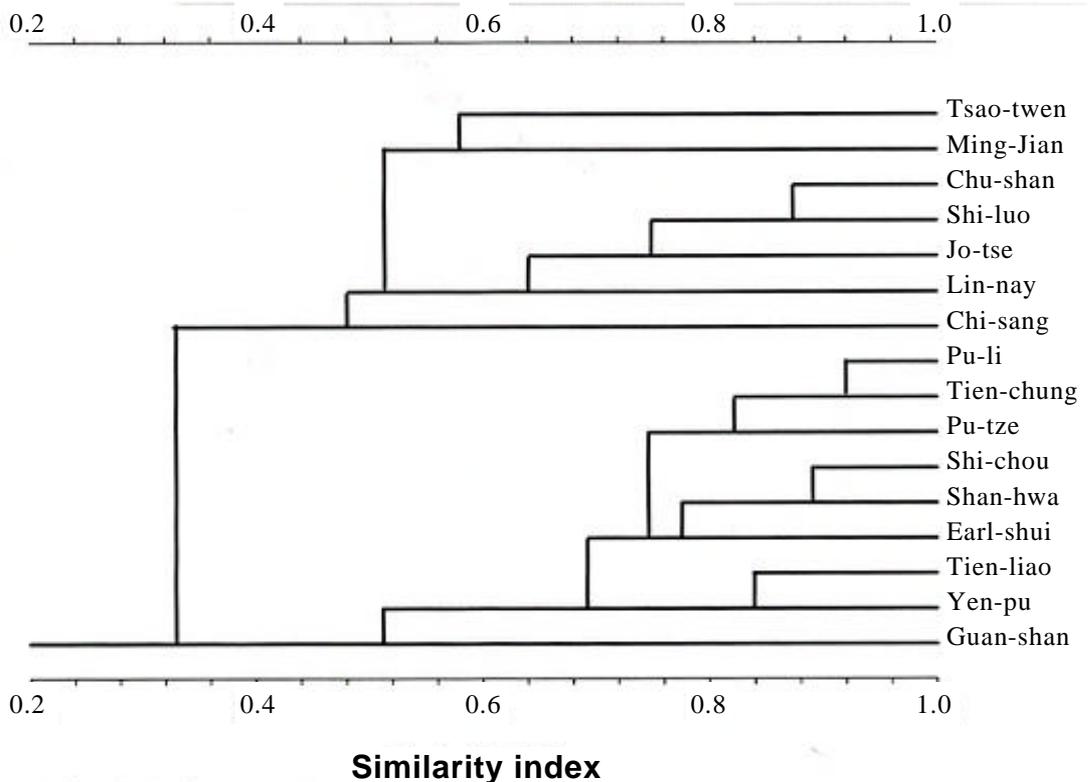
	Tsao- twen	Ming- jian	Chu- shan	Pu-li	Tien- chung	Shi- chou	Earl- shui	Lin- nay	Jo-tse	Shi- luo	Pu-tze	Shan- hwa	Tien- liao	Yen- pu	Guan- shan	Chi- sang
Tsao-twew	1															
Ming-jian	0.588	1														
Chu-shan	0.545	0.560	1													
Pu-li	0.095	0.083	0.621	1												
Tien-chung	0.190	0.167	0.621	0.929	1											
Shi-chou	0.000	0.100	0.400	0.833	0.833	1										
Earl-shui	0.286	0.333	0.621	0.786	0.786	0.833	1									
Lin-nay	0.500	0.522	0.714	0.444	0.444	0.174	0.444	1								
Jo-tse	0.600	0.609	0.857	0.444	0.519	0.261	0.519	0.769	1							
Shi-luo	0.526	0.364	0.889	0.615	0.538	0.364	0.538	0.560	0.720	1						
Pu-tze	0.286	0.167	0.690	0.857	0.786	0.667	0.643	0.370	0.519	0.769	1					
Shan-hwa	0.118	0.100	0.400	0.750	0.750	0.900	0.750	0.174	0.261	0.455	0.750	1				
Tien-liao	0.000	0.200	0.320	0.667	0.667	0.800	0.750	0.348	0.174	0.182	0.500	0.700	1			
Yen-pu	0.095	0.167	0.552	0.857	0.786	0.667	0.714	0.593	0.370	0.462	0.714	0.583	0.833	1		
Guan-shan	0.240	0.357	0.364	0.438	0.438	0.500	0.625	0.516	0.387	0.267	0.375	0.500	0.643	0.563	1	
Chi-sang	0.462	0.414	0.529	0.242	0.242	0.069	0.303	0.563	0.563	0.452	0.303	0.069	0.207	0.364	0.324	1

Nei及Miller⁽¹⁵⁾曾將限制酶切位的變化轉換為不同的鹼基置換型式，並據以計算不同植物種間(species)之差異，其限制圖譜資料之處理可用相似度係數分析。在此研究中，以ITS之限制酶圖譜可計算出16個甘蔗地區品系間之相似度矩陣與親緣關係(表二)，並可發現東部的關山及池上品系與西部栽培集團相當不同(圖三)，可能為此二品系之鹼基置換情形高於其他西部集團品系。雖然由ITS的RFLP圖譜可以計算出品系之相似性，但這些資料乃奠基於rDNA的ITS區域，因此並不建議就此資料作任何擴張運用或詮釋，僅能用於品系之區別或鑑定參考，若要進一步探討不同地區品系或栽培集團的分化，仍需以更全面性的方法加以分析。

本研究最主要之目的為以分子標誌鑑定不同栽培集團之食用紅甘蔗品系，然而不論是使用RAPD或PCR-RFLP皆沒有得到具高度多型性之條帶，顯示不同栽培集團之品系間差異極為有限，僅有東部之關山及池上品系可以一次以HpaII將之與西部栽培集團區別。將來若要利用

分子標誌作為品系鑑定之依據則需更進一步作廣泛之研究，參考其他作物染色體組中歧異度較高之區域，或同時使用多個限制酶加以區分，以提高品系鑑定的效率。

核糖體基因由於無所不在，高度保守且套數多的特性，使得其基因序列成為建構跨越廣泛分類種屬間親緣關係的重要工具^(6,11)，核糖體基因內轉錄間隔區(ITS)則因其具有高度變異性，因此常用來建構親緣關係接近的種或族群，尤其常作為族群分化分析之工具⁽¹⁸⁾。對於ITS而言，由於不需對rDNA 序列的資訊完全清楚即可使用保守區域作為引子，利用聚合酶連鎖反應加以放大複製，因此是十分便利的分析工具。在本試驗中，全省各地區栽培集團之紅甘蔗品系不僅形態不同⁽⁴⁾經由內轉錄間隔區分析後亦可看出DNA之差異⁽³⁾，將來可用以區別各地區品系，並作為新選育品系之鑑定依據。



圖三、不同栽培地區食用紅甘蔗之親緣關係樹狀圖。

Fig. 3. The phylogenetic relationship of fresh edible sugarcanes of different local lines.

誌 謝

本研究承農委會科技計畫(020101CSD4)補助，由賴月櫻，曹淑娟小姐協助試驗選殖工作，特此誌謝。

參考文獻

1. 王傳釗 1995 特用作物：甘蔗 p.139-146 農家要覽 豐年社 台北。
2. 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。
3. 陳裕星、曾勝雄、沈勳 2001 食用紅甘蔗核糖體基因內轉錄間隔區之選殖與分析 台中區農業改良場研究彙報 73:65-77。
4. 曾勝雄、沈勳 2000 食用紅甘蔗品種之鑑定 89年農委會科技計畫期末報告。
5. Artschwager, E. and E. W. Brandes. 1958. Sugarcane. Agricultural Handbook No.122, USDA.
6. 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.
7. 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.
8. 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 Hered. Breed. (in press).
9. Daniels, J. and B. T. Roach. 1987. Taxonomy and evolution. p.7-84. In: Heinz, D. J. (ed.) Sugarcane improvement through breeding. Elsevier press, Amsterdam.
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. Liu, J. S. and C. L. Schardl. 1994. A conserved sequence in internal transcribed spacer of plant nuclear r RNA genes. Plant Mol. Biol. 26: 775-778.
12. 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.
13. Nair, N. V., S. Nair, T. V. Screenivasan and M. Mohan. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. Genet. Res. Crop Evol. 46: 73-79.
14. Nei, M. and F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. Genetics 97:145-163.
15. Nei, M. and J. C. Miller. 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restricted data. Genetics 4:873-879.
16. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. p.1.84-1.87.
17. 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). Mol. Breed. 1:355-363.
18. 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
19. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Ralfaski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

An Attempt to Identify Edible Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) of Different Local Lines with Molecular Markers¹

Yu-Hsin Chen, Sheen Shen and Sheng-Hsiung Tseng²

ABSTRACT

On the analysis of genetic difference of different local lines of edible sugarcane, the internal transcribed spacer (ITS) of ribosome DNA (rDNA) was cloned and cleavage with restriction endonucleases. Among the 16 lines tested, total 89 bands were obtained and in which 13 bands are unique to Guan-Shan (5) and Chi-Sang (8). With *Hpa*II, local lines of Guan-Shan and Chi-Sang could be distinguished from the lines cultivated in western Taiwan, indicating that there are considerable differences exist between eastern and western populations. The polymorphic band patterns indicate that there are some differences among lines cultivated in different districts.

Keywords: fresh edible sugarcane (*Saccharum officinarum*), internal transcribed spacer (ITS), restriction endonuclease, local lines.

¹. Contribution No. 0531 of Taichung DAIS.

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