

利用 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) 探討台灣天竺草之遺傳變異⁽¹⁾

陳美如⁽²⁾ 侯金日⁽²⁾ 林正斌^{(3)*} 侯新龍⁽²⁾

摘要

天竺草(*Panicum maximum*)原產於熱帶及亞熱帶的非洲及印度，為多年生牧草，台灣於1908年由菲律賓引進試種且生育良好，經過近百年的演化，天竺草已有許多變種產生。本研究收集台灣21縣市之天竺草樣本41個及綠天竺草樣本74個共115個收集系，以ISSR分子標誌探討此二草種之遺傳變異及地理分佈情形。由ISSR之結果獲得10個具有多型性及再現性良好的引子，在綠天竺草方面可擴增出54條條帶，其中有46條具有多型性DNA條帶，多型性比例佔83.7%，遺傳分化指數(Gst)為0.5517，基因流(Nm)為0.4063，遺傳距離矩陣介於0.0535-0.3574間。以遺傳相似度0.15為截點可分為5群，第一群包含台北和桃園地區；第二群包含新竹、苗栗、台中及彰化地區；第三群包含台南、屏東、台東、花蓮及宜蘭地區；第四群包含雲林和嘉義地區；第五群為高雄地區。在天竺草的ISSR分析中，共可擴增出49條條帶，其中36條具有多型性DNA條帶，多型性比例佔68.5%，遺傳分化指數為0.5779，基因流為0.3652，遺傳距離矩陣介於0.0188-0.3055間；以遺傳相似度0.11為截點可分為4群，第一群包含台中、南投及雲林地區；第二群包含嘉義、台南及高雄地區；第三群為屏東地區；第四群包含台東和花蓮地區。遺傳距離與地理距離之平均係數在綠天竺草和天竺草族群之相關係數分別為 $r=0.2228$ ($p=0.0209$)和 $r=0.3825$ ($p=0.0118$)，呈顯著的相關性，顯示二草種之分化均符合距離隔離模式。

關鍵詞：天竺草、簡單重複序列間之DNA片段、群叢分析。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1532號。

(2) 國立嘉義大學農學研究所前研究生、副教授兼系主任及助理教授。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所飼料作物組副研究員。

*通訊作者。

前言

天竺草英文名 guineagrass 為禾本科(Gramineae)多年生之牧草，原產於熱帶及亞熱帶的印度及非洲一帶(Duke, 1983)；分佈於美國南部、中南美洲、澳洲、印尼、菲律賓、印度及越南等地。台灣於 1908 年始由菲律賓引進，在各地進行試種，生育良好，可作為馬匹的糧草，故又將天竺草稱為馬草。由於天竺草自播性強，目前在國內各地山區、高速公路之路肩、分隔島上及曠野地均可見其蹤跡，成為台灣地區的馴化雜草之一，綠天竺草其為天竺草針對牧草用途而改良命名之品種，惟獨二者株高差異明顯 (陳等，2001；陳等，2007)。

親源關係之鑑定除可用傳統農藝性狀予以分群外(陳等，2007)，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，且各種方法都有其優缺點(陳等，2009; Anderson and Fairbanks, 1990；Smith and Smith, 1992；Wolfe and Liston, 1998)。

天竺草引進台灣已超過百年，為瞭解台灣地區之綠天竺草和天竺草之分佈情形，除廣泛於台灣收集外，本試驗亦利用 ISSR 分子標誌鑑定技術來探討台灣各地天竺草的親緣關係。

材料與方法

一、試驗材料

本試驗所使用的材料於 2004-2005 年，儘可能在台灣本島北、中、南和東部廣泛收集之 115 個樣本，其中 74 個為綠天竺草(GNG 1-74)，41 個為天竺草(GNG 75-115)。每一個地點儘可能取一株，利用衛星定位系統(Global Positioning System, GPS)定位及記錄每個採集地點的經度和緯度。

二、試驗方法

ISSR引子採購自UBC (University of British Columbia)合成之第九組引子，共有 100 種不同的核酸引子(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 μ L之反應混

合物中進行，內容物包括 50 ng/ μ L之template DNA、1.5 μ M之primer、10 mM之dNTP、5 U/ μ L之Taq DNA Polymerase、2.5 μ L PCR Buffer和 20.3 μ L ddH₂O。由 100 個引子中選出UBC810、UBC811、UBC835、UBC842、UBC846、UBC848、UBC881、UBC888、UBC891 及UBC895 等 10 個具有多型性且再現性良好之引子，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，進行 115 個樣本之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、47.5°C 1 min、72°C 1 min 30sec的循環，及 72°C 5 min，最後降溫至 4°C 備用，以供電泳分析。

三、資料分析

(一) ISSR 分子標誌分析

將條帶之出現與否記錄為 1 (出現) 和 0 (未出現)，並將 ISSR 分子標誌，所得之條帶依其 Dice 係數 (Dice, 1945) 之定義計算其相似性係數。

(二) AMOVA 分析

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 AMOVA 分析。

(三) POPGENE 分析

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)。

(四)遺傳距離矩陣(Φ_{st})、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(Φ_{st})矩陣，以NTSYS-pc ver 2.0 的SAHN程式、UPGMA(unweighted 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，可得到各地區二維空間的平面圖及三維空間的立體圖。以NTSYS-pc BIOM軟體的Mantel test(Mantel, 1967)檢測遺傳距離矩陣(Φ_{st})與相對地理矩陣間的相關性(r)。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

一、ISSR 分子標誌分析

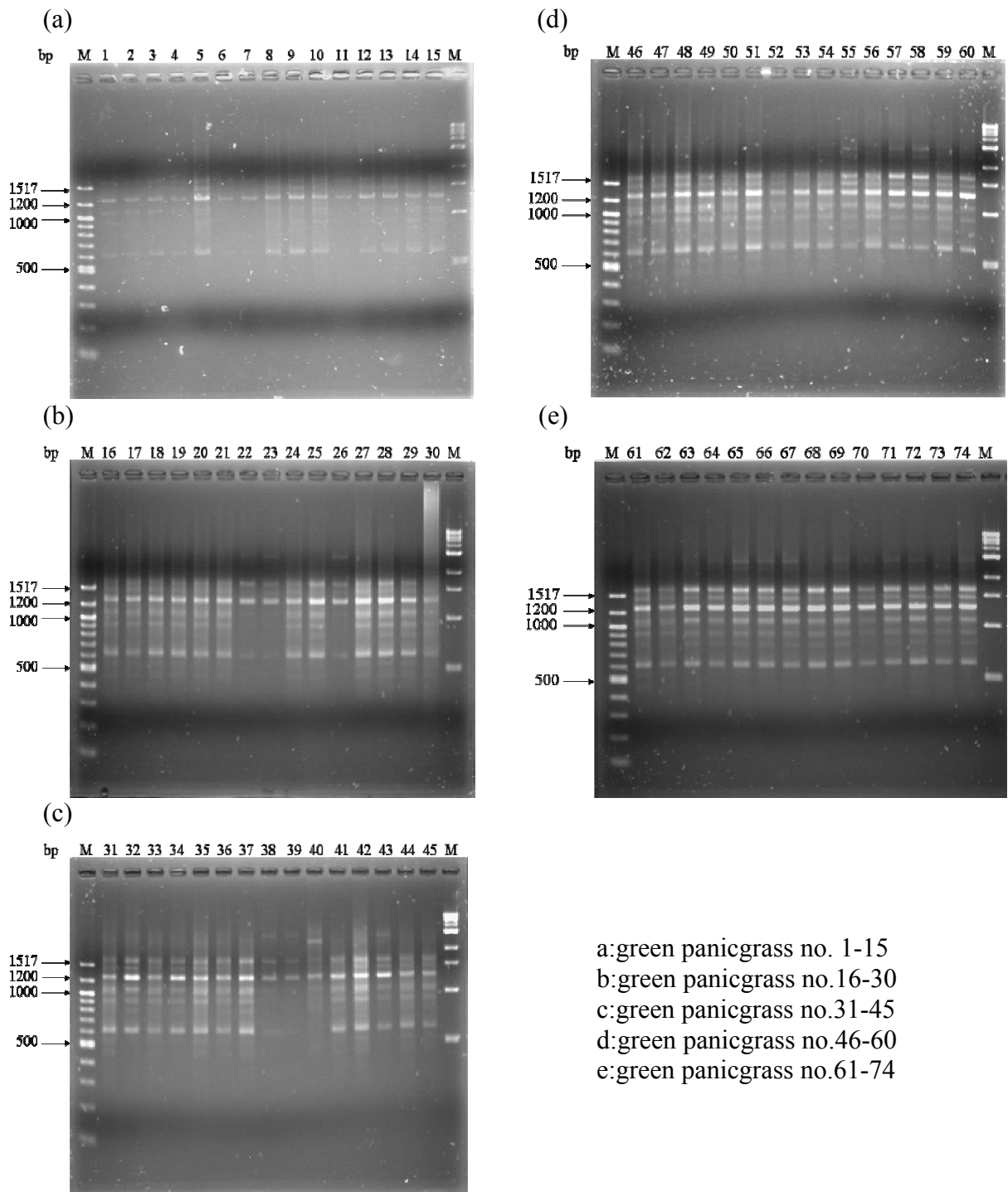


圖 1A. 74 個綠天竺草利用 ISSR UBC 842 引子分析所得之電泳圖譜(a-e).
M: 100 bp DNA Ladder.

Fig 1A. Gel electrophoresis of amplification products obtained from ISSR primer UBC 842 among 74 samples of green panicgrass.

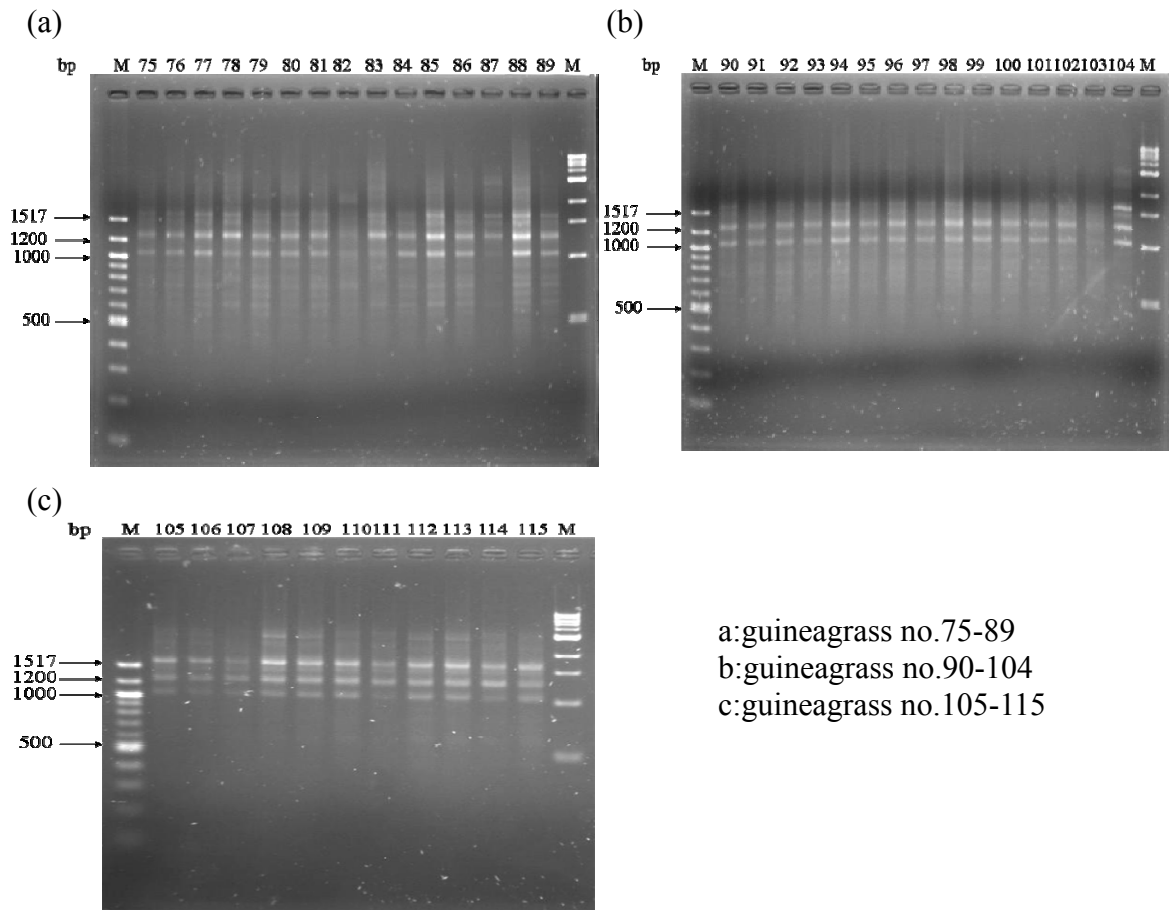


圖 1B. 41 個天竺草利用 ISSR UBC 842 引子分析所得之電泳圖譜(a-c).

M: 100 bp DNA Ladder

Fig 1B. Gel electrophoresis of amplification products obtained from ISSR primer UBC 842 among 41 samples of guineagrass.

本試驗共計篩選出 10 個引子進行綠天竺草及天竺草的 ISSR 分析。如圖 1A 和圖 1B 所示，以 UBC 842 進行 74 個綠天竺草及 41 個天竺草的 ISSR 分析，綠天竺草大約在 600 bp(圖 1A)及天竺草大約在 1000 bp(圖 1B)處有多型性 DNA 條帶出現。

在綠天竺草方面，總計共擴增出 54 個條帶，平均每個引子產生 5.4 個條帶，條帶大小範圍 500-3000 bp，其中以引子 UBC 810 能產生條帶數目最多，可達 9 條；多型性條帶比例以 UBC 811、UBC 846、UBC 848 及 UBC 881 最高，具 100% 多型性差異，其中 UBC 895 所產生之條帶數目最少，僅有 2 條，且多型性所佔的比例亦最低，僅有 50%。在天竺草方面，總計共擴增出 49 個條帶，平均每個引子產生 4.9 個條帶，條帶大小範圍 500-3500 bp，其中以引子 UBC 835 產生條帶數目最多，可達 10 條；多型性條帶比例以 UBC 891 最高，具 100% 多型性

差異，而 UBC 888 所產生之條帶數目最少，僅有 2 條，但以 UBC 895 多型性所佔的比例為最低，僅有 33%。

二、 AMOVA 分析

經由 AMOVA 分析結果，並將所得之各變方成分再經 9999 次隨機重排列，結果顯示：在綠天竺草方面，族群間的變方成分佔總變方成分的 42.69 % ($p=0.27$)，而有 57.31 % ($p < 0.0001$)的變方成分存在於族群內，其主要之變異存在於族群內（表 1）。

在天竺草方面，族群間的變方成分佔總變方成分的 39.62 % ($p < 0.0001$)，而有 60.38 % ($p < 0.0001$)的變方成分存在於族群內，其族群內之變異較族群間為多（表 2）。

表 1. 74 個綠天竺草的 ISSR DNA 分子標誌之 AMOVA 分析結果

Table 1. Variation analysis by AMOVA program for 74 green panicgrass based on ISSR DNA markers

Source of variation	df ^{&}	SSD	MS	Variation	% of variance	p-value
Variance among populations	13	210.68	16.21	2.46	42.69	0.2682
Variance within populations	60	198.36	3.31	3.31	57.31	<0.0001

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

表 2. 41 個天竺草的 ISSR DNA 分子標誌之 AMOVA 分析結果

Table 2. Variation analysis by AMOVA program for 41 guineagrass based on ISSR

DNA markers

Source of variation	df ^{&}	SSD	MS	Variation	% of variance	p-value
Variance among populations	8	82.37	10.30	1.72	39.62	<0.0001
Variance within populations	32	84.12	2.63	2.63	60.38	<0.0001

&: As shown in Table 1.

三、POPGENE 分析

進一步分析天竺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，綠天竺草分析結果如表 3 所示，總 Nei's 遺傳歧異度 (H) 值為 0.2499，族群分化係數(Gst)值為 0.5517，再由分化係數換算得基因流(Nm)為 0.4063，在各地區間之遺傳歧異度從 0.0472-0.2047，以嘉義地區之遺傳歧異度最高，苗栗地區之遺傳歧異度最低。

天竺草的 POPGENE 分析結果如表 4，總 Nei's 遺傳歧異度值為 0.2068，族群分化係數為 0.5779，由分化係數換算得基因流為 0.3652，在各地區間之遺傳歧異度從 0.0493-0.1488，以嘉義地區之遺傳歧異度最高，南投地區之遺傳歧異度最低。

表 3. 綠天竺草的 ISSR DNA 分子標誌之 POPGENE 分析表

Table 3. POPGENE analysis of green panicgrass based on ISSR DNA markers

Location	N ^{&}	H	I	Gst	Nm
Taipei	7	0.0966	0.1385		
Taoyuan	6	0.1603	0.2292		
Hsinchu	5	0.1163	0.1729		
Miaoli	3	0.0472	0.0681		
Taichung	5	0.0940	0.1385		
Changhua	4	0.1229	0.1800		
Yunlin	3	0.0660	0.0996		
Chiayi	7	0.2047	0.3038		
Tainan	10	0.1198	0.1856		
Kaohsiung	4	0.0583	0.0827		
Pingtung	6	0.1259	0.1760		
Taitung	5	0.1332	0.1944		
Hualien	5	0.1371	0.2004		
Yilan	4	0.0779	0.1124		
Total	74	0.2499	0.3855	0.5517	0.4063

&: N = the number of samples

H = Nei's (1973) gene diversity

I = Shannon's Information index

Gst = proportion of the total diversity among populations

Nm = gene flow

表 4. 天竺草的 ISSR DNA 分子標誌之 POPGENE 分析表

Table 4. POPGENE analysis of guineagrass based on the ISSR DNA markers

Location	N ^{&}	H	I	Gst	Nm
Taichung	4	0.0640	0.0994		
Nantou	4	0.0493	0.0689		
Yunlin	3	0.0881	0.1265		
Chiayi	10	0.1488	0.2274		
Tainan	3	0.0582	0.0848		
Kaohsiung	4	0.0538	0.0853		
Pingtung	4	0.1210	0.1826		
Taitung	5	0.0985	0.1457		
Hualien	4	0.1053	0.1534		
Total	41	0.2068	0.3192	0.5779	0.3652

&: As shown in Table 3.

四、遺傳距離矩陣(Φ_{st})、UPGMA 歸群及主座標分析

14 個地區之綠天竺草及 9 個地區之天竺草，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。在綠天竺草方面，由表 5 得知 14 個地區間遺傳距離介於 0.0535-0.3574 間，其中以台東地區與花蓮地區之遺傳距離最近，而以嘉義地區與高雄地區之遺傳距離最遠。在遺傳相似度 0.15 處可將綠天竺草分為 5 群，第一群由台北和桃園地區在 0.0583 處歸為一群；第二群由新竹和苗栗地區在 0.0608 處歸成一小群，而台中和彰化地區在 0.0803 處為另一小群，二小群在 0.1225 處則歸成一群；第三群由台東和花蓮地區具相同之遺傳相似度再與屏東地區於 0.0752 處歸為一小群，再與宜蘭地區於 0.0965 處歸為一小群，最後與台南地區於 0.1133 處歸為一群；第四群由雲林和嘉義地區於 0.0752 處歸為一群；第五群由高雄地區獨立為一群（圖 2）。

天竺草的 UPGMA 歸群分析方面，由表 6 得知 9 個地區間遺傳距離介於 0.0188-0.3055 間，以台東地區與花蓮地區之遺傳距離為最近，南投地區與台東地區之遺傳距離為最遠。遺傳相似度 0.11 處可將天竺草分為 4 群，第一群由台中和南投地區在 0.0244 處歸成一小群，再與雲林地區在 0.0862 處組成一群；第二群由嘉義和台南地區在 0.0626 處歸成一小群，再與高雄地區在 0.0894 處組成一群；第三群由屏東地區獨立成一群，第四群由台東和花蓮地區所組成（圖 3）。

經由 ISSR DNA 分析結果，進行頻度分析(Nei, 1973)計算出兩種原之遺傳距離，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(cophenetic correlation coefficient，簡稱 r 值)，結果顯示綠天竺草和天竺草 r 值分別為 0.7741 和 0.8441。

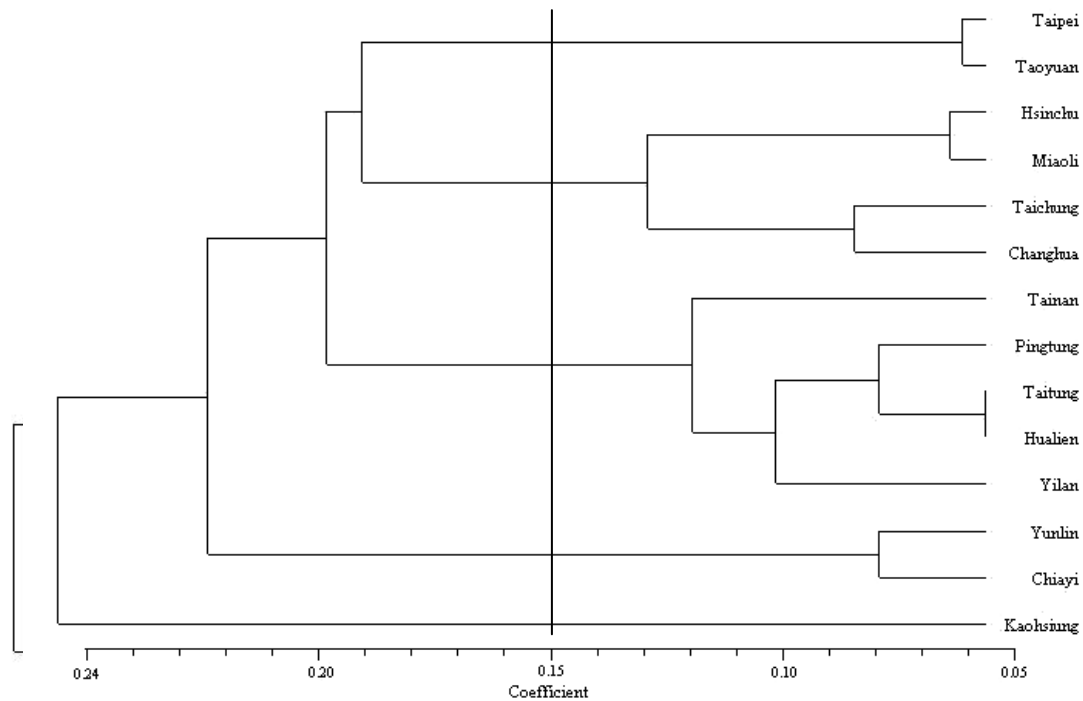


圖 2. 14 個地區的綠天竺草以 ISSR DNA 分子標誌利用 UPGMA 之歸群分析樹狀圖
 Fig. 2. UPGMA dendrogram based on the results of ISSR DNA markers of green panicgrass sampled from 14 different locations.

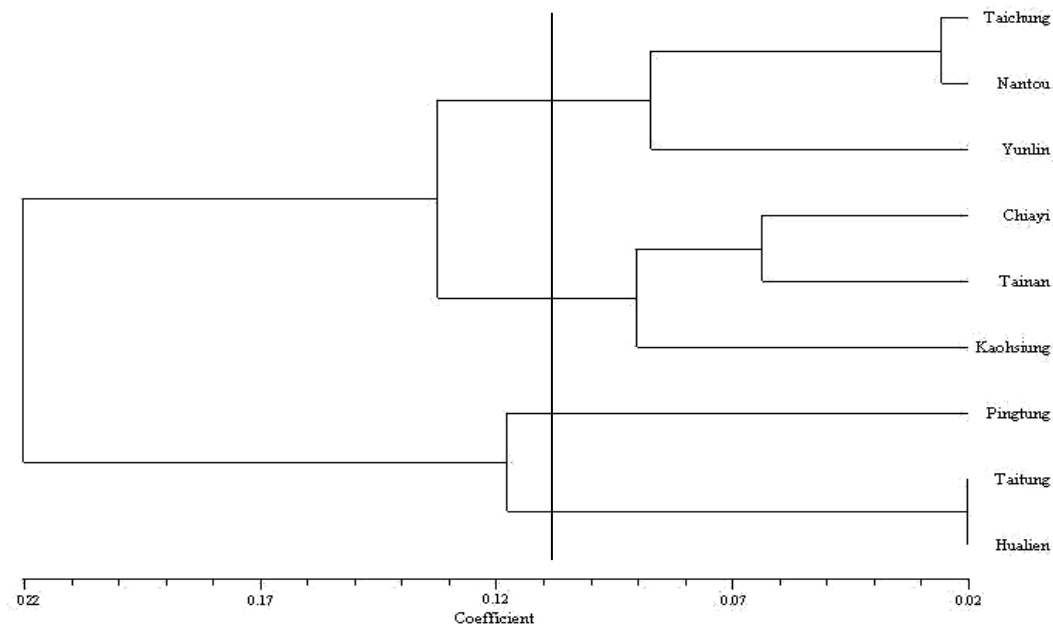


圖 3. 9 個地區的天竺草以 ISSR DNA 分子標誌利用 UPGMA 之歸群分析樹狀圖
 Fig. 3. UPGMA dendrogram based on the results of ISSR DNA markers of guineagrass sampled from 9 different locations.

表 5. 綠天竺草遺傳變異分析之遺傳距離(Φ_{st})矩陣(左下角)和地理距離(右上角, 單位: km)

Table 5. Genetic distance matrix (Φ_{st}) (below diagonal) and geographical distance (above diagonal, unit:km) based on the ISSR results of green panicgrass

Locations	Taipei	Taoyuan	Hsinchu	Miaoli	Taichung	Changhua	Yunlin	Chiayi	Tainan	Kaohsiung	Pingtung	Taitung	Hualian	Yilan
Taipei		22.40	60.80	87.60	130.40	144.40	186.00	201.20	260.80	292.00	277.60	252.80	115.20	43.20
Taoyuan	0.0583		39.60	67.20	112.80	146.80	168.00	184.80	245.60	279.20	266.00	244.00	114.00	50.80
Hsinchu	0.1518	0.1026		30.00	78.80	90.40	134.00	152.40	212.80	247.20	236.00	224.00	111.20	76.00
Miaoli	0.2853	0.2177	0.0608		49.60	60.80	103.20	123.20	183.60	218.40	208.00	199.20	103.20	93.60
Taichung	0.1678	0.1227	0.0805	0.1522		15.60	87.20	105.60	134.00	169.20	159.20	157.60	97.20	124.80
Changhua	0.2470	0.1517	0.1064	0.1508	0.0803		75.20	64.00	123.20	160.80	152.00	156.00	108.80	140.00
Yunlin	0.2109	0.1953	0.2109	0.1923	0.2781	0.2788		26.00	80.80	120.00	113.60	131.20	128.80	177.60
Chiayi	0.2040	0.1727	0.2080	0.2185	0.2243	0.2467	0.0752		60.80	96.00	88.80	107.20	128.00	188.00
Tainan	0.2119	0.1351	0.1730	0.1689	0.1723	0.1663	0.1331	0.1465		43.20	46.00	102.40	180.40	249.60
Kaohsiung	0.3169	0.2206	0.2090	0.2181	0.2699	0.2327	0.3342	0.3574	0.1916		19.20	88.00	198.00	272.80
Pingtung	0.2128	0.1322	0.1965	0.2176	0.1835	0.1653	0.2058	0.2326	0.0777	0.1658		68.00	180.80	260.00
Taitung	0.2220	0.1734	0.2010	0.1766	0.2575	0.2161	0.2198	0.2707	0.1305	0.2015	0.0681		143.20	224.80
Hualian	0.1686	0.1278	0.1529	0.1539	0.1984	0.2076	0.1873	0.2351	0.0959	0.1963	0.0823	0.0535		84.80
Yilan	0.2578	0.2008	0.1771	0.1501	0.2611	0.2102	0.1860	0.2147	0.1492	0.2447	0.1253	0.0948	0.0693	

表 6. 天竺草遺傳變異分析之遺傳距離(Φ_{st})矩陣(左下角)和地理距離(右上角, 單位: km)

Table 6. Genetic distance matrix (Φ_{st}) (below diagonal) and geographical distance (above diagonal, unit:km) based on the ISSR results of guineagrass

Locations	Taichung	Nantou	Yunlin	Chiayi	Tainan	Kaohsiung	Pingtung	Taitung	Hualien
Taichung		24.80	87.20	105.60	134.00	169.20	159.20	157.60	97.20
Nantou	0.0244		38.00	50.00	111.20	145.60	134.40	134.00	94.00
Yunlin	0.0769	0.0954		26.00	80.80	120.00	113.60	131.20	128.80
Chiayi	0.0753	0.0619	0.1393		60.80	96.00	88.80	107.20	128.00
Tainan	0.1127	0.1103	0.1855	0.0626		43.20	46.00	102.40	180.40
Kaohsiung	0.1463	0.1497	0.2041	0.0847	0.0941		19.20	88.00	198.00
Pingtung	0.2215	0.2209	0.2493	0.1449	0.2127	0.1158		68.00	180.80
Taitung	0.2577	0.3055	0.2572	0.1892	0.2462	0.1813	0.1159		143.20
Hualien	0.2450	0.2885	0.2402	0.1783	0.2315	0.1739	0.1178	0.0188	

Φ_{st} 遺傳距離矩陣以NTSYS進行主座標分析(PCA)的結果，在綠天竺草方面一維空間可解釋 40.77%、二維空間 72.61%及三維空間 93.99%之變異量(圖 4A)，結果第一群由台北和桃園地區組成；第二群由新竹、苗栗、台中和彰化地區所組成；第三群由台東、花蓮、屏東、宜蘭和台南地區所組成；第四群由雲林和嘉義地區所組成；第五群由高雄地區所組成。天竺草的主座標分析結果，一維空間可解釋 77.33%，二維空間為 97.83%，三維度空間可解釋 100%之變異量(圖 4B)，第一群由台中、南投和雲林地區所組成；第二群由嘉義、台南和高雄地區所組成；第三群由屏東地區組成；第四群由台東和花蓮地區所組成。

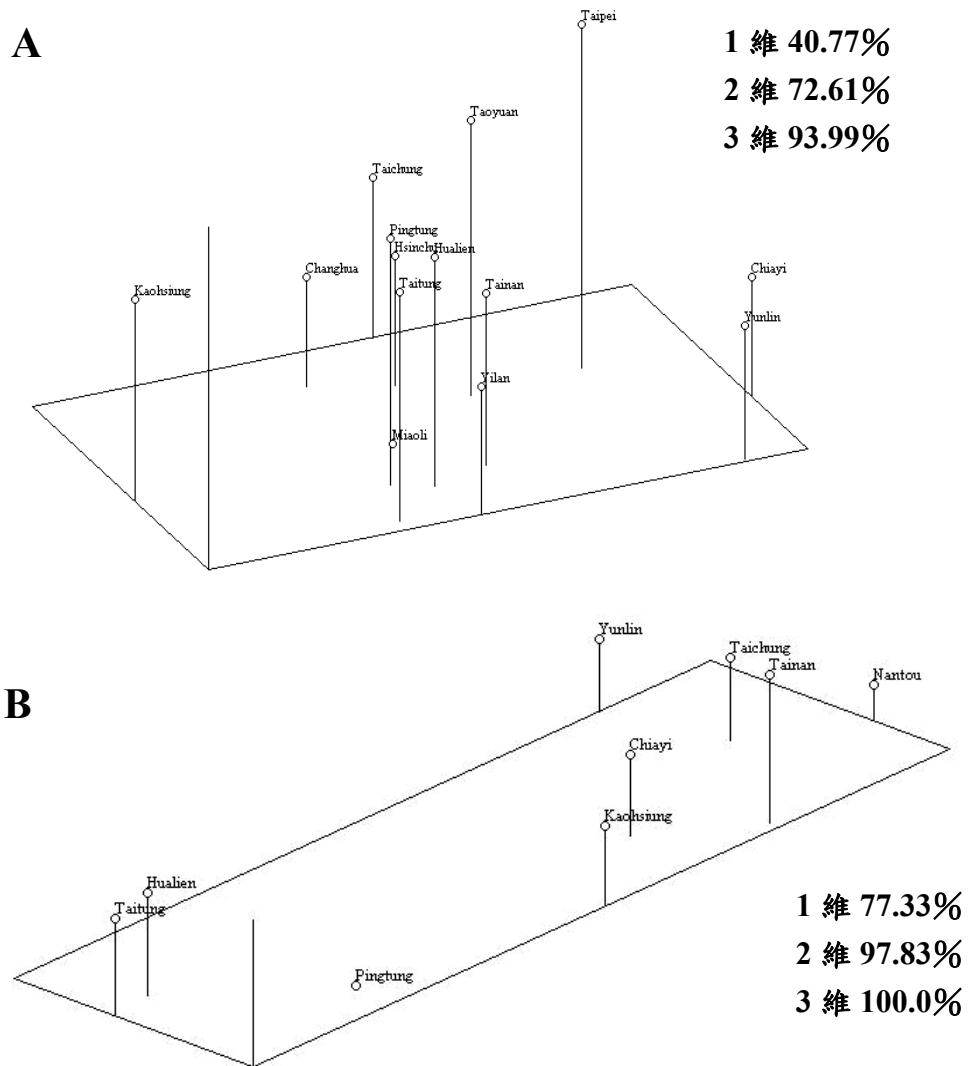


圖 4. 14 個地區之綠天竺草 (A) 及 9 個地區天竺草 (B) ISSR 分析結果的 3 維主座標分析座標圖。

Fig. 4. Results of 3-dimensional principal coordinate analysis based on the ISSR DNA fragments of green panicgrass (A) and guineagrass (B), which were collected from 14 and 9 different locations, respectively.

利用 NTSYS-pc ver. 2.0 套裝軟體中的 Mantel test 程式，可檢測遺傳距離(Φ_{st})和地理距離的相關性，綠天竺草族群為 $r=0.2228$ ($p=0.0209$)，天竺草族群為 $r=0.3825$ ($p=0.0118$)，顯示二草種在遺傳距離與地理距離間大部份均有顯著相關性，顯示綠天竺草和天竺草族群之遺傳分化，符合距離隔離模式(isolation by distance model)。

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)，為適應不同的淘汰壓力，各地區間之族群會發展出獨特的外表性狀或內部特性的改變，因此有顯著的差異存在(陳等，2000)。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 為基礎的技術更靈敏的偵測物種遺傳變異。ISSR 可適用於許多物種，不需事先得知 DNA 序列(Gupta *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 1997)，具有較高比例之多型性(Zietkiewics *et al.*, 1994)，在作物種間及種內均有良好的鑑別效果等優點(Huang and Sun, 2000)，所以為作物種原遺傳歧異性分析及品種檢定之優良工具。

經由 AMOVA 的變方分析，ISSR 分析 74 個綠天竺草和 41 個天竺草，族群內的變異分別為 57.31%和 60.38%，族群間的變異分別為 42.69%和 39.62%，得知族群內的變異大，基因庫的豐富度高，有助於對環境的適應能力。

根據 Hamrick 及 Godt(1990)的研究分析，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($G_{st} = 0.213$)。本研究 ISSR 分析綠天竺草和天竺草族群遺傳分化指數分別為 $G_{st} = 0.5517$ 和 0.5779 略高於一般的自交植物，而且較多的變異存在族群間，遺傳分化現象明顯。Allard(1970)指出一個族群內的變異程度部份與生殖方式有關。然而，在地方種和野生近緣種中，各種層面上的多型性是很普遍的，即使在近親繁殖的族群中也存有可觀的變異性。

依據 Wright(1931)認為族群間的基因流 N_m 值若大於 1，則易使遺傳構造均質化，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)。另外二位學者 Ellstrand 和 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。本研究 ISSR 分析綠天竺草和天竺草基因流值分別為 0.4063 和 0.3652，分析結果顯示基因流有受到部分地理阻礙。若基因流使不同地方性族群的基因庫產生交流，則族群分化程度便會降低(Slatkin, 1987)。

計算兩兩樣本之遺傳相似度，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，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)，但 r 值易受參試樣品數目之增加而下降，故仍須參考 p 值以判斷樹狀圖與遺傳距離之相關性。ISSR 分析綠天竺草和天竺草之結果， r 值分別為 0.7741 和 0.8441，分析結果顯示樹狀圖有某種程度的扭曲，尚能表現出群團狀態。由 ISSR 分析之綠天竺草和天竺草，依遺傳距離矩陣所得之樹狀圖，若以遺傳相似度 50% 為截點，可將綠天竺草分為 5 群，天竺草分為 4 群，主座標分析與樹狀圖之結果，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。利用 Mantel test 檢測，經 ISSR 分析之綠天竺草和天竺草的遺傳距離與地理距離相關分別($r=0.2228$ ， $p=0.0209$)和($r=0.3825$ ， $p=0.0118$)；RAPD 分析之綠天竺草和天竺草的遺傳距離與地理距離相關分別為($r=0.5230$ ， $p=0.0000$)和($r=0.6912$ ， $p=0.0000$) (陳等，2009)，二者結果之綠天竺草和天竺草皆符合 Wright(1943)所提出的地理隔離(isolation by distance)模式，顯示綠天竺草和天竺草呈現自然的散佈，地理越相近的族群基因流也越強，因此距離越相近的族群，遺傳組成也越相似。

參考文獻

- 陳紫淵、胡澤寬、黃秋蘭、吳詩都、曾富生。2000。台灣地區百慕達草 (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) 種內變異之研究。農林學報 49(4): 19-31。
- 陳章和、李小芳、黃茂雅、周先葉。2001。外來植物堅尼草生態學研究。生態科學 20(1,2): 37-40。
- 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)：37-50。

- 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。
- Andersen, W. R. and D. J. Fairbanks. 1990. Molecular markers : important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity* 6: 61-53.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Duke, J. A. 1983. *Panicum maximum* Jacq.. Handbook of Energy Crops. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Panicum_maximum.html
- Ellstrand, N. C. and D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size : implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Excoffer, 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.
- Huang, J. C. and M. Sun. 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potatoes 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.
- 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.
- Smith, J. S.C. and O. S. Smith. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Adv. Agron.* 47: 85-140.
- Wolfe, A. D. and A. Liston. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. *In: Soltis, D. E., P. S. Soltis, J. J. Doyle, eds. Plant Molecular Systematics II.* Boston: Kluwer, 43–86.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16 : 97-159.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Yeh, F. C., R. C. Yang, TBJ Boyle, ZH 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.

Genetic diversity of *Panicum maximum* determined by ISSR DNA markers in Taiwan⁽¹⁾

Mei-Ru Chen⁽²⁾ Chin-Jin Hou⁽²⁾ Jeng-Bin Lin⁽³⁾* Shin-Lon Ho⁽²⁾

Abstract

Guineagrass (*Panicum maximum*) is a perennial forage grass which is original from tropical Africa and subtropical India. Guineagrass was introduced from Philippines in 1908, who grew well in Taiwan. In the past one hundred years, there were many various ecotypes observed. In this study, we have collected 115 lines, containing 41 lines of guineagrass and 74 lines of green guineagrass from 21 counties in Taiwan for determining the genetic variation and the geographical distribution of these two species by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers. According to ISSR analysis, 10 UBC primers were positive. In green panicgrass, 54 bands were amplified, and 46 bands were polymorphism. The percentage of polymorphism was 83.7%. The values of genetic differentiation (G_{st}) was 0.5517, and the gene flow (N_m) was 0.4063. The genetic distance matrix range was from 0.0535 to 0.3574. Green panicgrass could be divided into 5 groups based on the genetic similarity with 0.15 as the critical point. It included the 1st group with Taipei and Taoyuan, the 2nd with Hsinchu, Miaoli, Taichung and Changhua, the 3rd with Tainan, Pingtung, Taitung, Hualien and Yunlin, the 4th with Yilan and Chiayi, and the 5th Kaohsiung, respectively. For guineagrass, 49 bands were generated, and 36 bands were polymorphic typing. The percentage of polymorphism was 68.5%. The values of genetic differentiation (G_{st}) was 0.5779, and the gene flow (N_m) was 0.3652. The genetic distance matrix located between 0.0188 and 0.3055. Guineagrass could be divided into 4 groups based on the genetic similarity with 0.11 as the critical point. It included the 1st group included Taichung, Nantou and Yunlin, the 2nd with Chiayi, Tainan and Kaohsiung, the 3rd with Pingtung, the 4th with Taitung and Hualien, respectively. The values of genetic distance and geographic distance for these two species were $r=0.2228$ ($p=0.0209$) and $r=0.3825$ ($p=0.0118$), respectively. These results revealed that both guineagrass and green guineagrass showed a significant relationship each other and met the requirement of the model for distant isolation.

Key Words: *Panicum maximum*, ISSR, Cluster analysis.

(1) Contribution No.1532 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Postgraduate, Associate Professor and Assistant Professor, Institute of Agriculture, National Chiayi University.

(3) Associate Researcher, Division of Forage Crops, Livestock Research Institute, Council of Agriculture.

* Corresponding author.