

## 以 RAPD 標記分析台灣桑樹親緣關係

賴 樵 緯<sup>1)</sup> 潘 美 汶<sup>1)</sup> 張 哲 嘉<sup>2)</sup>

關鍵字：桑樹、分子標記、親緣關係、逢機擴增多型性核酸

**摘要：**桑樹為桑科(Moraceae)桑屬(*Morus*)之多年生木本植物，因屬異花授粉之風媒花且適應性廣、分布廣泛，因而遺傳背景複雜。早期的分類方法，主要建立在形態特徵的基礎上，但外表型(phenotype)易受環境因素影響而發生改變。本研究利用逢機擴增多型性核酸(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)技術，以台灣的 7 個種、雜交桑與未鑑定種等共 27 個品種(系)為材料，進行親緣性分析，並建立群集樹狀圖。結果顯示，此 27 個品種(系)可分為三群：第一群為與其他桑樹形態具明顯差異的長果桑(*M. laevigata*)，可獨立成一群集；第二群屬常綠型或休眠性較淺的台灣桑(*M. formosensis*)、島桑(*M. australis*)及廣東桑(*M. atropurpurea*)；第三群為休眠性較深且被視為桑原始三系的山桑(*M. bombycis*)、白桑(*M. alba*)及魯桑(*M. latifolia*)；其雜交桑'68H<sub>22</sub>021'、'68H<sub>22</sub>033'、'74H<sub>2</sub>006'及'苗粟 2 號'則與親本廣東桑同在第二群。本試驗也在 OP-A19 引子中發現專一性條帶。試驗結果有助於後續分類及育種之進行。

### 前 言

桑樹屬於桑科(Moraceae)桑屬(*Morus*)，多年生木本植物，具有落葉與常綠性。植株多為雌雄異株(dioecious)，行異花授粉，遺傳組成歧異度高，且適應性廣(Vijayan *et al.*, 2004; 2011; Vijayan, 2014)，易馴化出各種不同物種(species) (南澤, 1976; 吳, 1977; 曾和吳, 1979; Dandin, 1998)。

桑屬植物的科學性分類始自 Linné (1753)，依果實及葉片的性狀將桑樹分為七種(species)，後續由不同學者提出不同的修正系統，包括較具有代表性的小泉(1917)及堀田

---

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生及助理。

2) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

(1954)的鑑定方式。前者利用雌花的花柱長短及柱頭型態，將桑屬植物整理出 30 個種及一個變種(variety)；而堀田(1954)則以葉片的鐘乳體(cystolith)形態，將桑分為長形鐘乳體及短形鐘乳體，為現今日本常用之分類方法(Sharma *et al.*, 2000)。今臺灣桑樹之分類系統係以小泉的研究為基礎，將桑屬分為無花柱(macromorus)、長花柱(dolichostylae)及長花穗(longispica)等三大群(張，2006)。但其性狀並不適用於雄株，因此後續也有學者針對形態分類作改良，找出適合兩性植株皆適用的分類方法(Chang *et al.*, 2014)。

但形態分類上仍有許多時間與空間的限制，現今分子標記技術克服了許多形態或生化上的問題。已有許多學者對桑樹進行分子標記的相關研究，但其結果並不全然相同，且前人研究使用之品種(系)多屬於白桑(*M. alba*)、印度桑(*M. indica*)，或各地之特有種(Awasthi *et al.*, 2004；Vijayan *et al.*, 2004；Weiguo *et al.*, 2004；Ipek *et al.*, 2011；Chikkaswamy *et al.*, 2012；Kalpana *et al.*, 2012)，而國內桑樹品種(系)繁多，除有來自中國或日本的山桑、魯桑和廣東桑外，也包含臺灣桑及島桑等在地種，以及部份與野外採集到與外來種發生雜交的子代(張，2006)，因此國外研究所使用之品種與國內所擁有之桑樹品種(系)各有不同。

現今所記載的桑樹品種有上百餘種，其中有許多種類可能為同種異名(synonym)或同名異種(antonym)，在這些種類歸納不一的情形下，使得育種過程中遇到許多困難，故為助於後續育種之利用，釐清國內各品種(系)間遺傳歧異度有其必要性。本研究係以利用 RAPD 分子標記技術，分析 27 個台灣的桑樹品種(系)，建立臺灣桑樹之親緣關係，希望可以克服形態分析所面臨環境、樹齡等限制因子，俾後續研究之參考。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

本試驗參試植株種植於中興大學園藝系網室內，選用之品種(系)參考張(2006)及 Chang 等人(2014)之分類系統，從台灣桑樹七大系統中之已知種(species)、雜交種(hybrids)及未鑑定(unidentified)桑內每一種(species)選 1 至 3 個品種(系)、雜交桑 6 個品種(系)及未鑑定桑 3 個品種(系)，共 27 個品種(系)(表 1)並挑選新鮮且剛萌芽之展開幼葉及未完全展開幼葉為材料，以液態氮冷凍後貯藏於-20°C 待 DNA 萃取。

### 二、DNA 萃取流程

DNA 萃取使用 Viogene 基因體 DNA 抽取組 DNA extraction miniprep system(盟基生物科技股份有限公司)，並依照 Viogene 提供之操作手冊進行 DNA 的萃取，其流程如下：

採取 100 mg 經液態氮冷凍的植株葉片，使用液態氮將嫩葉研磨至細粉後轉至 1.5 ml 離心管中，加入 400  $\mu$ l 的 PX1 Buffer 和 4  $\mu$ l 的 RNase A (100 mg/ml)，搖晃均勻後，放置於 65°C 的加熱板上保溫約 10-15 分鐘(每 2-3 分鐘搖晃離心管使混合液充分與葉片粉末接觸)。

表 1. 試驗所用之 27 個品種(系)及其來源。

Table 1. The 27 mulberry accessions used in the experiment and their origins.

編號	種類	品種(系)名稱	株性	來源
1	山桑系( <i>M. bombycis</i> )	‘劍持’ (Kenmochi)	♀	日本
2	白桑系( <i>M. alba</i> )	‘改良鼠返’ (Kairyonezumigaeshi)	♂	日本
3	白桑系( <i>M. alba</i> )	‘新一之瀨’ (Shinichinose)	♀	日本
4	白桑系( <i>M. alba</i> )	‘枝垂桑’ (Shidagreguwa)	♀	日本
5	魯桑系( <i>M. latifolia</i> )	‘厚葉綠’ (Astubaroku)	♂	日本
6	魯桑系( <i>M. latifolia</i> )	‘湖喜’ (Hushi)	♂	日本
7	魯桑系( <i>M. latifolia</i> )	‘雲龍桑’ (Yunlungsang)	♂	日本
8	島桑系( <i>M. australis</i> )	‘台桑 1 號’ (Taisang No. 1)	♂	台灣野桑
9	島桑系( <i>M. australis</i> )	‘58C307’	♀	花蓮吉安
10	島桑系( <i>M. australis</i> )	‘67C001-A’	♀	台南新化
11	島桑系( <i>M. australis</i> )	‘67C001-B’	♂	台南新化
12	台灣桑系( <i>M. formosensis</i> )	‘58C398’	♀	花蓮瑞穗
13	台灣桑系( <i>M. formosensis</i> )	‘58C475’	♀	苗栗公館
14	台灣桑系( <i>M. formosensis</i> )	‘67C002’	♀	苗栗公館
15	廣東桑系( <i>M. atropurpurea</i> )	‘台桑 19 號’	♀	台北公館
16	廣東桑系( <i>M. atropurpurea</i> )	‘46C020’	♀	嘉義中埔
17	廣東桑系( <i>M. atropurpurea</i> )	‘Miaoli No. 1’	♀	苗栗大湖
18	長果桑( <i>M. laevigata</i> )	‘長果桑 1 號’ (Elongated fruit no. 1)	♀	高雄岡山
19	雜交桑(Hybrids)	‘68H <sub>22</sub> 021’	♀	‘46C019’*‘46C022’
20	雜交桑(Hybrids)	‘68H <sub>22</sub> 033’	♀	‘46C019’*‘46C022’
21	雜交桑(Hybrids)	‘74H <sub>2</sub> 006’	♀	‘台桑 19 號’*‘台桑 3 號’
22	雜交桑(Hybrids)	‘苗栗 2 號’ (Miaoli No. 2)	♀	‘台桑 19 號’*‘台桑 3 號’
23	雜交桑(Hybrids)	‘台桑 2 號’ (Taisang No. 2)	♀	‘46C005’*‘46C022’
24	雜交桑(Hybrids)	‘台桑 3 號’ (Taisang No. 3)	♂	‘46C005’*‘46C020’
25	未鑑定( <i>Mours</i> spp)	‘下營’	♀	台南
26	未鑑定( <i>Mours</i> spp)	‘94C001’	♀	彰化
27	未鑑定( <i>Mours</i> spp)	‘白果桑’ (white fruit)	♀	澳洲

(修改自張，2006、張，2009、Chang *et al.*, 2014)

其後再添加 130  $\mu$ l 的 PX2 Buffer，震盪使其緩衝液混合均勻後，放置於碎冰上約 5 分鐘，再將內部溶液移至放置在 Collection Tube 上面的 shearing tube 內，並使用離心機以轉速 13,000 rpm 全速離心 2 分鐘，完成後再將 Collection Tube 的溶液移至新的 2.0 ml 離心管內。

添加與濾液比 0.5 倍體積的 PX3 Buffer 和 1 倍的 98~100%乙醇至此溶液中，並上下顛倒混合約 3~5 次。

混合均勻後，每次吸取 650  $\mu$ l 的樣品，轉移至放置在 Collection Tube 上面的 Plant Genomic DNA Mini Column 內，蓋上蓋子，以速率約 10,000 rpm 進行離心 1 分鐘，再將 Collection Tube 內的濾液清除。將此步驟重複約 2-3 次，直至 2.0 ml 離心管內的樣品皆處理完畢。

過濾完成後，在 Plant Genomic DNA Mini Column 內添加 0.7 ml 的 WS Buffer，並以 13,000 rpm 離心約 30-60 秒，以清除 Plant Genomic DNA Mini Column 上之雜質，將此步驟重複兩次後移除濾液，最後再用全速(13,000 rpm)進行離心 3 分鐘，完全清除 Plant Genomic DNA Mini Column 內的 WS Buffer。

於 Plant Genomic DNA Mini Column 內添加 200  $\mu$ l 的 65°C TE 或滅菌之 ddH<sub>2</sub>O，置於室溫下 5 分鐘，以全速(13,000 rpm)離心 1 分鐘後將 DNA 洗出，並保存至 -40°C 中，待後續實驗使用

### 三、DNA 品質檢測與定量

核酸的吸光值主要落在於 230 nm、260 nm 和 280 nm 的波長上。230 nm 主要是由殘留於溶液內的酚類化合物與碳水化合物所影響；260 nm 則是我們所需要之核酸濃度；而 280 nm 是由蛋白質所影響的。因此 260/280 的比值可估計出樣本中核酸的純度，而 260/230 的比值則可估算殘留的酚類化合物與碳水化合物污染及程度。

光密度(optical density, OD)定義為材料遮光的能力，因此 1 O.D.值在不同種類的核酸中代表不同的濃度，以本試驗所取用之材料，雙股螺旋 DNA 舉例，1 O.D.即等同於~50  $\mu$ g/ml。依照上述之濃度定義，依算式可以計算出該核酸的實際濃度。而測量 DNA 濃度時，260/280 的理想值介於 1.7-1.9 之間；260/230 的理想值則介於 2.0-2.4。

以分光光度計(UNICAM UV-Visible Spectrometers)測量其基因組 DNA 於波長 230 nm、260 nm 及 280 nm 之吸光值以確認品質，進行 O.D.值之檢測，並經計算其濃度後添加適當的 TE 溶液，將 O.D.值 260 稀釋為 0.5，再取 1  $\mu$ l 以膠體電泳(gel electrophoresis)觀測其品質。

### 四、RAPD 擴增及膠體電泳分析

RAPD 分析反應液組成每管含有基因組 DNA 20 ng、0.2 mM dNTP、1 unit Taq (Fermentas)、10X buffer 和 1  $\mu$ M primer，混合後放進核酸熱循環儀(Gene Amp PCR system 2700)。

PCR 設定條件為 94°C 6 分鐘，接著以 94°C 45 秒、38°C 45 秒和 72°C 1 分鐘，進行 32 個循環，最後在 72°C 下 7 分鐘後終止反應維持在 4°C。

結束 PCR 反應後，配置 1.2%的 agarose 膠體(50 ml 的 0.5X TBE buffer、0.6 g 的 agarose、

2.5  $\mu$ l 的 EtBr)，並放置於 0.5X TBE buffer 內，取每個 PCR 產物 10  $\mu$ l 加上 2  $\mu$ l 的染劑(dye)，混合均勻後放入膠體內進行電泳反應，電壓為 70 安培，約跑 30 分鐘，電泳結束後進行拍照觀察，並以 100 bp DNA ladder (ProTech Bio-100 DNA ladder)作為條帶長度辨別之基準。每支引子重複兩次，並記錄兩次皆有出現的條帶。

## 五、統計分析

### (一) 1. 相似度計算：

依電泳結果所呈現之條帶，紀錄產生的條帶總數及多型性條帶數，並以 1 代表有擴增出條帶者，而 0 代表無擴增出條帶者，然後將所記錄之資料利用 Jaccard's coefficient 以下列公式計算樣品間的遺傳相似度(genetic similarity)並產生遺傳相似性矩陣表：

$$Gd_{ij}=(N_{ij})/(N_{ij}+N_i+N_j)$$

$N_i$ ：為樣品 i 所出現的條帶，但在樣品 j 上沒有

$N_j$ ：為樣品 j 所出現的條帶，但在樣品 i 上沒有

$N_{ij}$ ：為樣品 i 與樣品 j 共有的條帶

### (二) 2. 群集分析 (cluster analysis)：

將遺傳相似度的數值以軟體 MVSP version 3.22 進行 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)群集分析(cluster analysis)，繪出樹狀圖。

## 結 果

### 一、RAPD 條帶產生之結果

經 PCR 反應後的 9 支引子共擴增出條帶 57 條、多形性條帶共 34 條，其個別所擴增出的條帶數為 3-12 條、多型性條帶數為 2-9 條及多型性比率 50-75%，顯示出大部分引子皆可產生高比率的多型性。引子 OP-J19 則可擴增出最多可辨識條帶及有最高的多型性比率；相較之下，OP-A14 則擴增出的可辨識條帶數量較少僅有 3 條，另在 OP-A19 可找到基因型專一性的條帶(圖 1)。

表 2. RAPD 擴增所使用的 9 支引子、擴增條帶數、多型性條帶及比率。

Table 2. List of 9 primers employed in the study along with details of DNA marker amplification.

primer	序列(5'-3')	條帶	多型性 條帶數	多形性 比率
A14	TCTGTGCTGG	3	2	66%
A19	CAAACGTCGG	4	2	50%
B07	GGTGACGCAG	7	4	57%
C01	TTCGAGCCAG	7	4	57%
C20	ACTTCGCCAC	7	4	57%
D07	TTGGCACGGG	5	3	60%
I07	CAGCGACAAG	8	4	50%
J19	GGACACCACT	12	9	75%
K13	GGTTGTACCC	4	2	50%

## 二、群集分析

相似性矩陣表(表 3), 可知遺傳相似性從 0.608-1, 最相似的為'67C001-A'及'67C001-B', 最遠的是'長果桑 1 號'與'67C001-A'及'長果桑 1 號'與'67C001-B'。由樹狀圖可知, 所有品種系可區分為三大群, 第一群為'長果桑 1 號', 明顯的獨立於最外群; 第二群則涵蓋了島桑系('台桑 1 號'及'58C307')、台灣桑系('58C398'、'58C475'及'67C002')、廣東桑系('台桑 19 號'、'46C020'及'苗栗 1 號'), 其雜交桑'68H<sub>22</sub>021'、'68H<sub>22</sub>033'、'74H<sub>2</sub>006'及'苗栗 2 號'則與親本廣東桑同在第二群; 而第三群則包含魯桑系('厚葉綠'、'湖喜'、'雲龍桑')及山桑系('劍持')和大部分的白桑系('新一之瀨'、'枝垂桑'及'改良鼠返')。

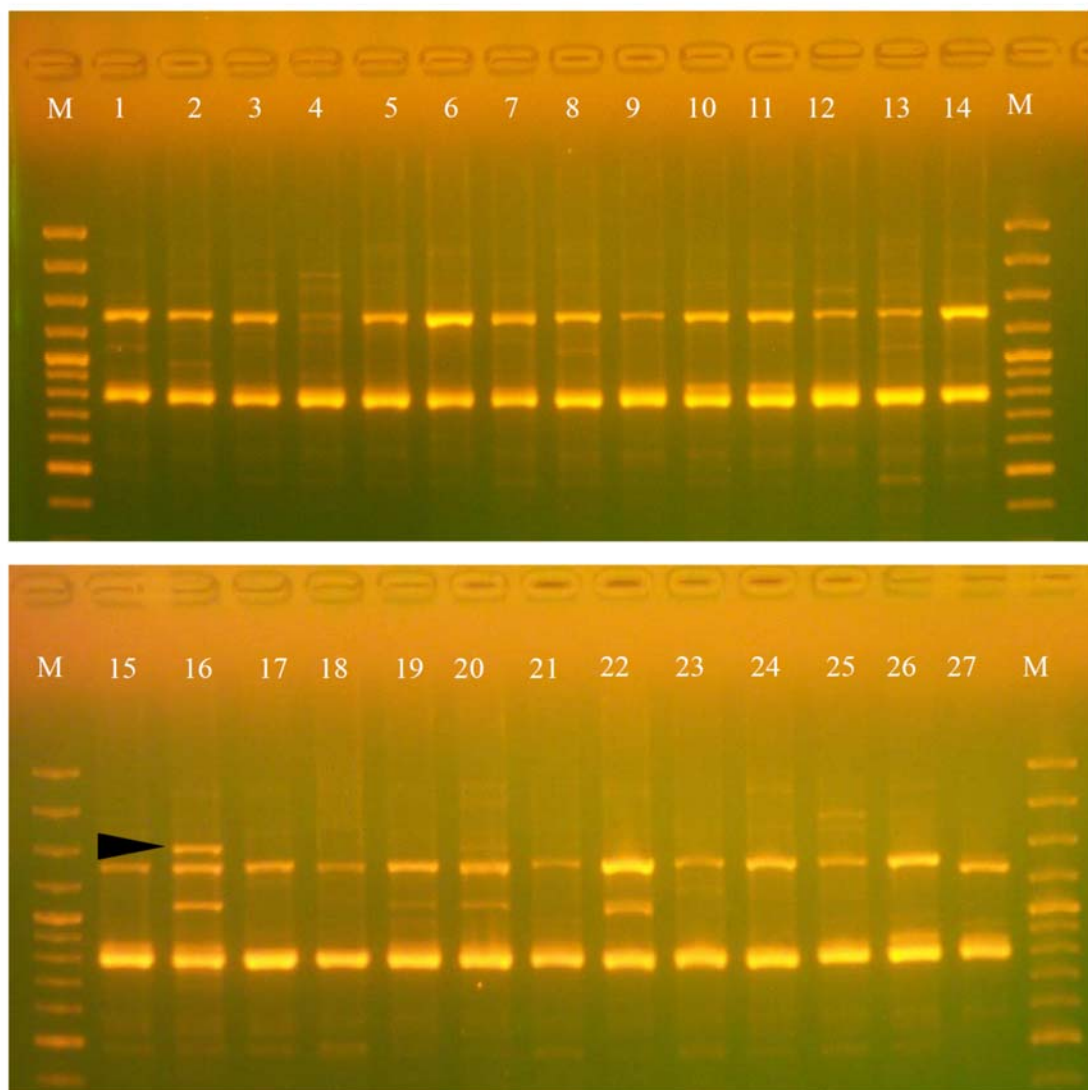


圖 1. 27 個品種(系)經引子 OP-A19 擴增出基因型專一性條帶。編號為表 1 之品種系順序。  
M: 100bp DNA ladder。

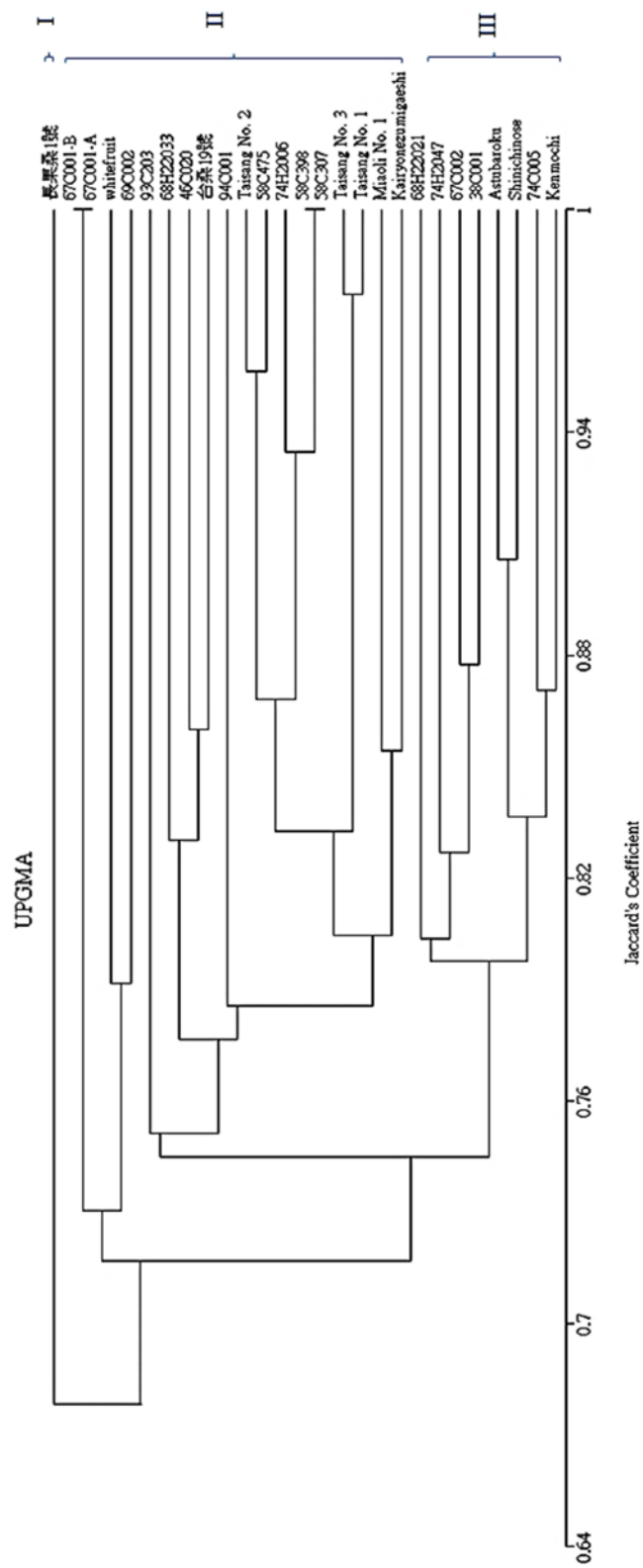
Fig. 1. The RAPD agarose gel electrophoresis profiles of 27 genotypes. The profiles were obtained using primers OP-A19. Numbers refers to the samples listed in Table 1. M: DNA marker. Arrow genotype means specific band.

表 3. 由 RAPD 標記分析產生的 27 個參試基因型遺傳相似性係數矩陣。  
 Table 3. Genetic similarity coefficients among 27 mulberry genotypes generated by RAPD marker.

標記	1000	改松原種	新-2系	桂系品	厚壁品	滿春	香桂品	台系品	58C307	67C001-A	67C001-B	58C398	58C475	67C002	台系19號	46C020	苗栗1號	68W22021	68W22033	74W2006	苗栗2號	台系2號	台系3號	下營	94C001	whitefruit		
改松原種	1.000																											
新-2系	0.841	1.000																										
桂系品	0.844	0.518	1.000																									
厚壁品	0.880	0.773	0.905	1.000																								
滿春	0.886	0.860	0.853	0.864	1.000																							
香桂品	0.844	0.778	0.907	0.818	0.909	1.000																						
台系1號	0.717	0.889	0.696	0.727	0.702	0.713	0.696	1.000																				
58C307	0.783	0.756	0.723	0.756	0.766	0.841	0.723	0.878	1.000																			
67C001-A	0.771	0.783	0.787	0.783	0.792	0.787	0.790	0.867	0.729	1.000																		
67C001-B	0.771	0.783	0.787	0.783	0.792	0.787	0.790	0.867	0.729	1.000																		
58C398	0.717	0.727	0.660	0.689	0.702	0.773	0.660	0.833	0.951	0.694	0.694	1.000																
58C475	0.745	0.756	0.688	0.717	0.729	0.800	0.688	0.833	0.951	0.694	0.694	1.000																
67C002	0.822	0.837	0.723	0.717	0.766	0.841	0.688	0.791	0.860	0.729	0.823	0.860	1.000															
台系19號	0.864	0.818	0.745	0.739	0.787	0.823	0.745	0.773	0.884	0.680	0.680	0.857	0.884	1.000														
46C020	0.783	0.785	0.723	0.717	0.766	0.761	0.723	0.833	0.860	0.660	0.660	0.833	0.860	0.818	1.000													
苗栗1號	0.761	0.814	0.702	0.686	0.745	0.818	0.702	0.810	0.881	0.673	0.673	0.854	0.881	0.827	0.860	1.000												
苗栗2號	0.723	0.696	0.667	0.660	0.673	0.667	0.667	0.689	0.681	0.688	0.688	0.652	0.681	0.717	0.729	0.717	1.000											
68W22021	0.822	0.837	0.761	0.756	0.804	0.841	0.761	0.750	0.860	0.694	0.694	0.833	0.860	0.818	0.976	0.895	0.837	1.000										
68W22033	0.778	0.833	0.756	0.751	0.800	0.818	0.756	0.744	0.857	0.723	0.723	0.825	0.857	0.814	0.927	0.874	0.833	0.674	0.950	1.000								
74W2006	0.761	0.773	0.729	0.773	0.745	0.818	0.729	0.854	0.827	0.708	0.708	0.900	0.827	0.881	0.905	0.837	0.902	0.733	0.881	0.878	1.000							
苗栗3號	0.783	0.795	0.761	0.756	0.766	0.800	0.761	0.833	0.905	0.694	0.694	0.878	0.905	0.860	0.929	0.860	0.881	0.795	0.905	0.857	0.905	1.000						
台系2號	0.745	0.756	0.688	0.717	0.729	0.800	0.723	0.833	0.951	0.694	0.694	0.825	0.951	0.860	0.884	0.860	0.881	0.814	0.860	0.857	0.927	0.905	1.000					
台系3號	0.717	0.727	0.696	0.727	0.702	0.733	0.696	0.847	0.878	0.667	0.667	0.867	0.878	0.833	0.814	0.878	0.854	0.727	0.791	0.786	0.900	0.878	0.878	1.000				
下營	0.733	0.786	0.711	0.744	0.717	0.750	0.711	0.825	0.854	0.681	0.681	0.825	0.854	0.810	0.878	0.854	0.829	0.744	0.854	0.865	0.875	0.900	0.854	0.872	1.000			
94C001	0.756	0.767	0.733	0.767	0.729	0.814	0.733	0.850	0.878	0.702	0.702	0.867	0.878	0.833	0.902	0.791	0.854	0.727	0.878	0.875	0.949	0.925	0.878	0.850	0.872	1.000		
whitefruit	0.791	0.885	0.810	0.897	0.773	0.810	0.767	0.874	0.744	0.733	0.733	0.774	0.744	0.744	0.767	0.795	0.721	0.644	0.786	0.825	0.855	0.786	0.744	0.774	0.775	0.800	1.000	
標記	改松原種	新-2系	桂系品	厚壁品	滿春	香桂品	台系品	58C307	67C001-A	67C001-B	58C398	58C475	67C002	台系19號	46C020	苗栗1號	68W22021	68W22033	74W2006	苗栗2號	台系2號	台系3號	下營	94C001	whitefruit			



圖 2. 27 個參試桑樹基因型利用 Jaccard' s 係數分析 RAPD 數據經 UPGMA 群集分析產生之樹狀圖。  
 Fig. 2. Dendrogram generated by UPGMA cluster analysis, of 27 mulberry genotypes based on RAPD fingerprinting data using Jaccard' s coefficients.



## 討 論

桑樹屬多年生風媒花之異交作物，其適應性及廣，故各品種(系)基因型之間的遺傳歧異度大(Sharma *et al.*, 2000；Vijayan *et al.*, 2004；Zhao *et al.*, 2007；Chang *et al.*, 2014)，又桑樹分佈極廣，在不同環境形成不同的選拔壓力，使得各地區桑樹產生不同的基因選拔結果，後續子代遺傳結構可能與原本起源地不相同(Sharma *et al.*, 2000)。Ipek 等人(2011)利用 ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat)及 RAPD 分析發現，在同一地區或相似的氣候條件下所採集之桑樹品種的遺傳相似係數較不同地區接近，顯示不同環境對桑樹品系間之分佈具影響力。而 Zhao 等人(2007)也利用 ISSR 分子標記調查分散中國各地的桑樹種原，發現在長期的栽培及選拔下，桑樹之基因型在不同地區的歧異度較高，同地區內的基因型變異較小，在印度 Vijayan 等人(2006)也觀察到相似的結果。

本試驗所選用之'長果桑 1 號'獨立於最外群，在許多學者的研究中，不論是利用 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)、RAPD、ISSR (inter-simple sequence repeats)和 SSR (simple sequence repeats)等分子標記技術進行歧異度分析，皆有相同的結果，顯示長果桑與白桑、魯桑等其它物種，在基因型上具有較大的歧異度(Sharma *et al.*, 2000；Awasthi *et al.*, 2004；Vijayan *et al.*, 2004；Zhao *et al.*, 2005；Zhao *et al.*, 2007)，而其營養性狀如休眠芽、葉片、枝條色澤等也與它桑樹顯著不同(張，2009；Chang *et al.*, 2014)。但也並非所有結果都符合上述前人的研究，如盧(2008)的研究中指出，長果桑與廣東桑系親緣較近，而最外群的則為山桑系的'劍持'。

第二群主要涵蓋對象為島桑系、台灣桑系、廣東桑系。Chang 等人(2014)的試驗中指出，臺灣桑為臺灣特有種，營養形態與島桑極相似，經由分析的結果認為臺灣桑可能是從島桑衍生而得的新種，或為島桑的變種。從本試驗樹狀圖之結果觀察，部分台灣桑與島桑兩者之間親緣關係接近('58C307'、'58C475')，此結果可能與上述研究相符。傳統桑樹分類上，白桑和廣東桑常視為同種異名，並將廣東桑歸類在無花柱類，與白桑及魯桑關係密切(Bureau, 1873；小泉，1917；Zhou and Gilbert, 2003)。Zhou 和 Gilbert (2003)也認為在中國白桑與廣東桑為同種，此二者在形態特徵上具相似處，也有部份的分子標記結果支持此一觀點(Sharma *et al.*, 2000；Zhao *et al.*, 2007)。但在張(2006)的報告提及臺灣桑樹種原中，廣東桑與白桑仍有所不同，在其形態特徵上即有明顯差別，如花柱長短、葉片、小花、花穗數量等。其中休眠需冷量(chilling requirement)也明顯不同，如廣東桑為 216-420 CU，而白桑為 516 CU (Chang *et al.*, 2014)。盧(2008)的研究中也顯示出廣東桑系更與台灣桑、島桑親源接近。此結果可能原因為試驗所用的廣東桑品系乃 1957 年後，自臺灣各地收集而來(蠶蜂場場誌編纂委員會，1997)，這些品系可能已與島桑、臺灣桑等在來種發生基因重組，使得參試的廣東桑品種(系)營養形態更近似於島桑(張，2009)。

本試驗結果將白桑、魯桑及山桑歸為同群，此結果與其他學者以分子標誌分析之結果

相似，亦顯示此三者之基因型較相近(Sharma *et al.*, 2000；Zhao *et al.*, 2007；Vijayan *et al.*, 2004)。但此結果與 Chang 等人(2014)及盧(2008)的實驗結果略有不同，Chang 等人(2014)以形態分類研究指出，雖白桑與魯桑為同一群，但山桑則與廣東桑親源較近。而盧(2008)分子標記分析的結果顯示，魯桑與白桑相近，但山桑則獨立為最外群。

桑的原始三系即為白桑、山桑與魯桑(南澤，1976；盧，1984)，而從個別休眠需冷量觀察此三種桑皆屬於需冷量較深的品種約 500 CU (Chang *et al.*, 2014)，雖然分子標記可從分子層次上分析不同種之間的親緣關係，但已有許多研究發現，其結果會依不同分析方法而有差異(Vijayan *et al.*, 2004；Awasthi *et al.*, 2004；Ipek *et al.*, 2011；Chikkaswamy *et al.*, 2012；Kalpanaa *et al.*, 2012)，可能受到基因組內重複和非重複區域數量的不同、非同源條帶造成的誤差、背景過於雜亂影響觀察的結果等非人為與人為因素影響。亦有學者指出形態外觀可能受到多種基因調控，或者受到與環境之間的交感所影響，故與分子標記分析之結果會有差異(Vijayan *et al.*, 2006)。

## 誌 謝

本研究之部份內容蒙科技部 MOST 103-2313-B-005-MY3 計畫之補助，謹致謝忱。

## 參 考 文 獻

- 小泉源一。1917。桑屬植物考。蠶試報 3:1。
- 吳登楨。1977。桑樹之品種改良。科學農業 25:242-244。
- 南澤吉三郎。1976。栽桑學。鳳鳴社。145pp。
- 堀田禎吉。1954。桑樹分類之研究。京都工藝纖維大學出版。
- 張哲嘉。2006。台灣桑樹之分類及品種改良。臺灣園藝 52:377-392。
- 張嵐雁。2009。臺灣桑樹種源分析。臺灣大學園藝所碩士論文。台北。
- 曾富生、吳登楨。1979。臺灣野生桑樹(*Morus acidosa* Griff.)農藝性狀之變異。興大農藝學報 4:39-45。
- 盧英權。1984。栽桑學。國立編譯館。136pp。
- 盧美君。2008。以 RAPD 及 ISSR 分析桑樹品種間親緣關係。農業生技產業研討會暨成果發表會。
- Awasthi, A. K., G. M. Nagaraja1, G. V. Naik, S. Kanginakudru, K. Thangavelu, and J. Nagaraju. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. BMC Genet. 5: 1-9.
- Bureau, E. 1873. Moraceae. In: Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. A. DeCandolle (ed.). Vol. 17. Paris, France. pp. 211-288.

- Chang, L. Y., K. T. Li, W. J. Yang, J. C. Chang, and M. W. Chang. 2014. Phenotypic classification of mulberry (*Morus*) species in Taiwan using numerical taxonomic analysis through the characterization of vegetative traits and chilling requirements. *Sci. Hort.* 176: 208–217.
- Chikkaswamy, B. K., R. C. Paramanik, A. Debnath, and M. S. Sadana. 2012. Evaluation of genetic diversity in mulberry varieties using molecular markers. *Nature Sci.* 10: 45-60.
- Dandin, S. B. 1998. Mulberry: a versatile biosource in the service of mankind. *Acta Sericologica Sinica* 24: 109-113.
- Ipek, M., L. Pirlak, and S. Kafkas. 2011. Molecular characterization of mulberry (*Morus* spp.) genotypes via RAPD and ISSR. *J. Sci. Food Agric.* 92: 1633-1637.
- Kalpana, D., S. H. Choi, T. K. Choi, K. Senthil, and Y. S. Lee. 2012. Assessment of genetic diversity among varieties of mulberry using RAPD and ISSR fingerprinting. *Sci. Hort.* 134: 79-87.
- Sharma, A., R. Sharma, and H. Machii. 2000. Assessment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1049-1055.
- Vijayan, K., P. P. Srivatsava, C. V. Nair, A. K. Awasthi, A. Tikader, B. Sreenivasa, and S. R. Urs. 2006. Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breed.* 125: 298-301.
- Vijayan, K., P. P. Srivastava, and A. K. Awasthi. 2004. Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers. *Genome* 47: 439-448.
- Vijayan, K., Tikader, A., Weiguo, Z., Nair, C.V., Ercisli, S., Tsou, C.H., 2011. Chapter 5 *Morus*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 75-95.
- Vijayan, K. 2014. Biotechnology of mulberry (*Morus* L.)-A review. *Emir. J. Food Agric.* 26: 472.
- Weiguo, Z. and P. Yile. 2004. Genetic diversity of genus *Morus* revealed by RAPD markers. *Int. J. Agric Biol.* 6: 950-954.
- Zhou, Z. and M. G. Gilbert. 2003. Moraceae. In: Wu, P. H. Raven and D. Hong (eds.). *Flora of China* Vol. 5. Science Press, Beijing, China. pp. 21-73.
- Zhao, W., Y. Pan, Z. Zhang, S. Jia, X. Miao, and Y. Huang. 2005. Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and trnL-F sequences. *Afr. J. Biotech.* 4: 563-569.
- Zhao, W., Y. T. Wang, G. Chen, X. Jia, J. Wang, Y. Qi, S. Pang, Z. Wang, Y. Li, Y. Huang, Y. Pan, and Y. H. Yang. 2007. Genetic structure of mulberry from different ecotypes revealed by ISSRs in China: An implications for conservation of local mulberry varieties. *Sci. Hort.* 115: 47-55.

## Assessing the Genetic Relationships of Mulberry Species (*Morus*) in Taiwan Using RAPD Markers

Chiao-Wei Lai<sup>1)</sup>    Mei-Wen Pan<sup>1)</sup>    Jer-Chia Chang<sup>2)</sup>

Key words: Mulberry, Molecular marker, Genetic relationship, Random Amplified Polymorphic DNA

### Summary

Mulberry is a perennial plant that belongs to genus *Morus* and family Moraceae. Because mulberry is cross- and wind pollinated, it readily adapts and disperses to diverse environments, thereby resulting in a comparatively complex hereditary background. In Taiwan, mulberry populations are classified into seven species based on their morphological characteristics and chilling requirements. However, further characterization using molecular markers is necessary to establish their genetic relationships. In this study, RAPD markers was used to perform the genetic analysis of 27 accessions collected in Taiwan. The results were used to construct a genetic similarity coefficient and dendrogram, respectively, that suggested a classification system with three clusters: (1) *M. laevigata*, which was obviously differing from the other species; (2) *M. formosensis*, *M. australis*, and *M. atropurpurea*, in which *M. atropurpurea*, which is often regarded as a synonymous to *M. alba*, was similar to *M. formosensis* and *M. australis*; and (3) *M. bombycis*, *M. alba*, and *M. latifolia*, which required more chilling. The hybrids '68H<sub>22</sub>021', '68H<sub>22</sub>033', '74H<sub>2</sub>006', and 'Miaoli No. 2' were classified in the second cluster, just like their parental accessions. A specific band from OP-A19 primer was used for identifying the species. The results of this study will promote the taxonomy and breeding of mulberry in Taiwan.

- 
- 1) Graduate Student in MS. Program and Research Assistant, respectively, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.  
Corresponding author.

