

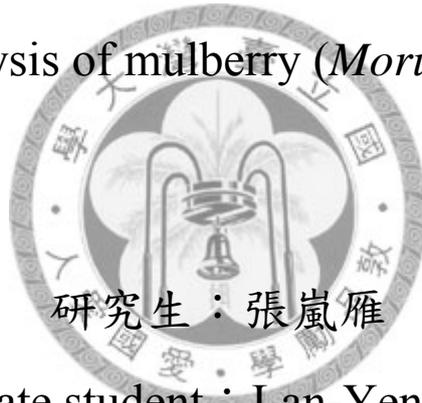
國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學系

碩士論文

Graduate Institute of Horticulture
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

臺灣桑樹種原分析

Germplasm analysis of mulberry (*Morus spp.*) in Taiwan



研究生：張嵐雁

Graduate student : Lan-Yen Chang

指導教授：李國譚 博士、楊雯如博士、張哲嘉 博士

Advisor: Kuo-Tan Li, Ph.D.

Wen-Ju Yang, Ph.D.

Jer-Chia Chang, Ph. D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

致謝

碩士班期間蒙眾人協助，得以順利兩年完成論文。首要感謝恩師 李國譚老師、楊雯如老師、張哲嘉老師對實驗及論文提出許多寶貴的意見，感謝李國譚老師的包容及指導，您在處理事情上樹立典範，讓學生自省並努力修正，感謝楊雯如老師在實驗及生活的照顧及提醒，字字珠璣也直入人心，讓我能面對自己並時時警剔，感謝桑樹達人張哲嘉老師在實驗過程的細心指導，不時地激勵，讓以正確的心情完成實驗。也深深感謝中研院的鍾美珠老師，帶我真實踏入染色體世界，指引我實驗方向並提供所需的物資及設備，讓我在最大的自由下完成試驗。因為老師們認真的做事態度，讓我明白身為專業農業人該有的態度及對原則的執著，並以此期許自己。感謝帶我做 FISH 的紹安學長，感謝芳綺學姐、桂端學姐、書芸學姐，已在 Zeiss 的滄茱學姐，感謝你們總是鼓勵我、為我解惑。感謝陳榮芳老師惠借流式細胞儀，感謝現已至南部的惠菁姐，當時對於流式細胞儀操作的協助。感謝苗栗區農業改良場提供材料，感謝苗改場長官的協助，也感謝邱祝芳小姐及彭達文先生毫不吝嗇地提供協助，讓我順利完成調查。

感謝林宗賢老師在 lab meeting 時，總是點出學生忽略的地方，讓我能再從不同角度去面對事情。感謝實驗室同窗李廉、嘉彬、孟姿、美蘭、嘉雲在這兩年來的守望相助，感謝本恣、芳怡、昇陽、漢芸、恩康、伊婷、大二園技小朋友們讓我們有做學長姊的訓練經驗，實驗室有你們參與真的很棒。感謝實驗室的妙真學姐、芳魁學長、一蘆學長、元聰學長、葦玲學姐、大璇學姐、宜霞學姐、瑋君學姐，隔壁家的小范學姐、已畢業的明雅學姐、小白學姐、祈男學長，除了平時關心外，也給我很多實驗及思考上的意見，讓我能順利突破，面對自己。感謝大學同學，在花卉館、加工館、造園館的大家，高中同窗柏仔、純恩三不五時的探望及打氣，感謝前室友上嘉、偽室友兆姐、現任室友球球陪我渡過離開實驗室的夜晚，感謝蛋研社老人幫的致好、小白叔伉儷、中宛等人適時的溫馨關心。

感謝我最最親愛的家人，感謝爸媽、小子及同在台北的奶奶、叔孀無限度地支持、包容與鼓勵，在我想家時給的溫暖，也感謝家裡狗子貝里跟快快，你們可愛的照片是安撫我的最佳良藥。感謝《老子》的「夫唯不盈，故能蔽而新成」，感謝一些協助我實驗但未提及的你們，感謝自己相信自己能完成碩士班的任務。一路上因眾人的協助讓我不孤單，讓我明白成功非一蹴可幾，謝謝你們！

目錄 Contents

目錄	i
圖目錄	iii
表目錄	iv
摘要	v
Abstract	vi
第一章 總論	1
Chapter 1. General introduction	
1.1 前言	2
1.2 桑樹簡介	3
1.3 桑屬植物之分類	4
1.4 數量分類學	9
1.5 桑樹細胞遺傳學之研究	12
1.6 結論及試驗假說	15
1.7 參考文獻	17
第二章 臺灣桑樹之歧異度分析	24
Chapter 2. Genetic diversity of mulberry (<i>Morus spp.</i>) in Taiwan	
2.1 摘要	25
2.2 前言	26
2.3 材料與方法	27
2.4 結果	32
2.5 討論	43
2.6 結論	47
2.7 參考文獻	48
2.8 Abstract	51
第三章 桑樹倍數體及 DNA 含量之鑑定	52
Chapter 3. Determining ploidy and DNA content of mulberry (<i>Morus spp.</i>)	
3.1 摘要	53
3.2 前言	54
3.3 材料與方法	55

3.4 結果.....	57
3.5 討論.....	59
3.6 結論.....	65
3.7 參考文獻.....	66
3.8 Abstract.....	69
第四章 臺灣桑樹之核型分析及 rDNA 染色圖譜.....	70
Chapter 4. Karyotype analysis and physical mapping of rDNA of mulberry (<i>Morus spp.</i>) in Taiwan	
4.1 摘要.....	71
4.2 前言.....	72
4.3 材料與方法.....	73
4.4 結果.....	76
4.5 討論.....	88
4.6 結論.....	91
4.7 參考文獻.....	92
4.8 Abstract.....	95
第五章 總結及未來展望.....	96
附錄.....	101



圖目錄 Contents of figures

- 圖 2.1. 臺灣桑樹種原中, 26 個桑樹品種(系)以 21 個營養性狀經群集分析(UPGMA)之聚樹狀圖.....33
Fig. 2.1. Dendrogram of the 26 mulberry accessions in Taiwan germplasm revealed by UPGMA clustering analysis based on 21 vegetative characters.
- 圖 2.2. 臺灣桑樹種原中, 26 個桑樹品種(系)以 21 個營養性狀經主成份分析之立體圖.....37
Fig. 2.2. Ordination of the 26 mulberry accessions in Taiwan germplasm determined by the first three principal component axes on the basis of 21 vegetative characters.
- 圖 2.3. 臺灣桑樹種原中, 26 個桑樹品種(系)以 9 個營養性狀經群集分析(UPGMA)之聚類樹狀圖.....38
Fig. 2.3. Dendrogram of the 26 mulberry accessions in Taiwan germplasm revealed by UPGMA clustering analysis based on 9 vegetative characters. Dissimilarity calculated by Euclidean distance coefficient.
- 圖 2.4. 臺灣桑樹 7 個種以 9 個營養性狀經群集分析之聚類樹狀圖.....40
Fig. 2.4. Dendrogram of the 7 mulberry species in Taiwan revealed by UPGMA clustering analysis based on 9 vegetative characters.
- 圖 3.1. 相對螢光強度與細胞核數目之頻度分佈度.....60
Fig. 3.1. Frequency distribution histograms plotting the number of nuclei as a function of their relative fluorescence intensity.
- 圖 3.2. 品系‘67C001’ (A) 二倍體及(B)三倍體個性在形態上的差異, 和(C)核 DNA 含量之流式細胞儀分析結果.....63
Fig. 3.2. The morphological differences between (A) diploid and (B) triploid individuals of accessions 67C001 and (C) flow cytometry analysis of nuclear DNA content.
- 圖 4.1. 臺灣桑樹 13 個品種(系)之核型.....77
Fig. 4.1. Karyotypes of 13 mulberry accessions.
- 圖 4.2. 以螢光原位雜交標記臺灣桑樹 8 個品種(系)之 18S-5.8S-26S (綠)及 5S (紅) rDNA 基因座於染色體的位置.....83
Fig. 4.2. FISH localization of 18S-5.8S-26S (green) and 5S (red) rDNA loci on somatic metaphase chromosomes (blue) of 8 mulberry accessions in Taiwan.

表目錄 Contents of tables

表 2.1. 試驗所用之 26 個品種 (系) 及其來源	29
Table 2.1. The 26 mulberry accessions used in the experiment and its origin.	
表 2.2. 試驗所調查的數量性狀及分級性狀	30
Table 2.2. Quantitative and Qualitative traits surveyed in the experiment.	
表 2.3. 臺灣桑樹種原中, 26 個桑樹品種 (系) 前四主成份之特徵值、變異數百分比、累計百分比及特徵向量	35
Table 2.3. Eigenvalues, percentage of variability, percentage of accumulated variability, and eigen vectors for the first four principal components among 26 mulberry accessions.	
表 2.4. 臺灣桑樹營養性狀檢索表	41
Table 2.4. A Key to species of <i>Morus spp.</i> in Taiwan, using the vegetative characters as identification traits.	
表 2.5. 臺灣桑樹種原中, 11 個雌株品種 (系) 及 1 個兩性株品種 (系) 之花柱長	42
Table 2.5. Mean style length of 11 female and 1 bisexual mulberry accessions in Taiwan.	
表 3.1. 臺灣桑樹種原中, 26 個桑樹品種 (系) 之倍數性、花性、收集來源、平均細胞核 DNA 含量	58
Table 3.1. The ploidy, species, sexuality, origins, mean DNA content and relative ratio of 26 <i>Morus spp.</i> accessions.	
表 3.2. 二倍體及三倍體品種 (系) 營養性狀之差異	61
Table 3.2. Differences between diploid (2X) and triploid (3x) mulberry accessions on vegetative traits.	
表 4.1. 臺灣桑樹 13 個品種 (系) 之核型特徵	81
Table 4.1. Karyotype characteristics of 13 mulberry accessions in Taiwan.	
表 4.2. 白桑 (<i>M. alba</i>) 三個品種 (系) 之染色體量測值與核型分析	86
Table 2. Measurements and calculated values in a representative karyotype of 3 <i>Morus alba</i> accessions.	
表 4.3. 烏桑 (<i>M. australis</i>) 及雜交桑 (<i>Morus spp.</i>) 四個品種 (系) 之染色體量測值與核型分析	87
Table 4.3. Measurements and calculated values in a representative karyotype of 4 mulberry accessions (<i>M. australis</i> and <i>Morus spp.</i>).	

摘要

桑樹 (*Morus spp.*) 已引入臺灣多年，為具發展潛力之多年生作物，多為雌雄異株，行異花授粉且分布廣泛，遺傳背景複雜，其分類尚待釐清。為瞭解臺灣桑樹種原間之親緣關係，本研究利用營養性狀進行歧異度分析，並以流式細胞儀及核型分析確認其倍體數，俾建立臺灣桑樹細胞遺傳資料庫。

自苗栗區農業改良場桑樹種原庫選出 26 個品種 (系)，在 2008 年調查記錄各品種 (系) 之 21 組營養性狀。經主成份分析及群集分析，受試品種 (系) 可分為三群 (一) 長果桑 (*Morus laevigata*)，(二) 廣東桑 (*M. atropurpurea*)、山桑 (*M. bombycis*)、島桑 (*M. australis*) 及臺灣桑 (*M. formosensis*)，及 (三) 白桑 (*M. alba*) 及魯桑 (*M. latifolia*)，群內親緣相近。從中選出葉寬、葉長葉寬比、葉柄寬、休眠需冷量、生長中芽形、休眠芽形、葉色、葉緣及葉尖等九個主要代表性狀，歸納出不受限於株性之桑樹檢索表，可供分類使用。

為估算種原倍體數，以流式細胞儀進行分析，結果顯示參試品種 (系) 可分為兩類，二倍體包括山桑、白桑、魯桑、島桑、臺灣桑及廣東桑，DNA 含量為 0.61-0.71 pg/2C。70C006 (*M. laevigata*) 為三倍體，DNA 含量為 1.06 pg/2C。67C001 (*M. australis*) 則有基因組各為 0.63 pg/2C 的二倍體和 0.98 pg/2C 的三倍體株，倍體數之差異亦會表現在形態上，三倍體植株較二倍體植株大。

桑樹 13 個品種 (系) 之染色體核型一致，14 對染色體中，僅第 2、5 及 14 對為次中位中節，其餘為中位中節，以螢光原位雜交技術 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 標定白桑、島桑、廣東桑及長果桑之 rDNA 基因座位置，分佈位置一致，種間無明顯差異。不同株性的品種 (系) 中，唯島桑及雜交桑之雄株品種 (系)，在第 3 對染色體有一條染色體之短臂染色深，但白桑不同株性品種 (系) 間則無條帶差異。

關鍵字：主成份分析、群集分析、流式細胞儀分析、核型分析、螢光原位雜交

Abstract

The mulberry (*Morus spp.*), a perennial crop valued for its economical importance, had led it a potential crop in the future. Because of its dioecious and cross-pollination nature, a complex genetic background of mulberry cultivars has been developed in Taiwan and the original classification system may need to be reexamined. In this study, the genetic relationship of the mulberry collection in Taiwan has been established by principal component analysis and clustering analysis based on vegetative traits. Besides, the ploidy and karyotype have also been examined to enrich the cytogenetic data base.

Twenty-six mulberry accessions from Miaoli District Agricultural Research and Extension Station (MDARES) were selected and 21 morphological characters were evaluated in 2008. Data were used for principal component analysis and clustering analysis. Accessions were grouped into three major clusters: (1) *Morus laevigata*, (2) *M. atropurpurea*, *M. bombycis*, *M. australis*, *M. formosensis*, and (3) *M. alba* and *M. latifolia*. Nine sets of morphological characters including leaf width, leaf lengths : widths ratio, petiole widths, chilling requirement, bud shape, dormant bud shape, mature leaf color, shape of leaf margin and leaf tip, were chosen to present a new key to mulberry in Taiwan, which is suitable for all sex types.

The ploidy of 26 mulberry accessions was determined by flow cytometer. Accessions of *M. bombycis*, *M. alba*, *M. latifolia*, *M. australis*, *M. formosensis*, and *M. atropurpurea* were diploids with genome sizes ranging from 0.61 to 0.71 pg/2C. Accessions 70C006 (*M. laevigata*) was a triploid with a genome size of 1.06 pg/2C. Accession 67C001 (*M. australis*) comprised diploid and triploid with genome size of 0.63 pg/2C and 0.98 pg/2C, respectively. The morphological characters were bigger in triploid also revealed the difference in ploidy level.

The karyotypes of 13 accessions were similar. Among the 14 pairs of chromosomes, chromosome 2, 5, 14 are submetacentric chromosomes while the others are metacentric. Fluorescence *in situ* hybridization of 5S rDNA and 18S-5.8S-25S rDNA in four species also revealed the resemblance among *M.* species. In *M. australis* and some mulberry hybrids, one p-arm of chromosome 3 showed dark staining in male but not in female plants. However, the difference in banding pattern between sex types was not observed in *M. alba*.

Keywords : Principal component analysis, clustering analysis, flow cytometric analysis, karyotypic analysis, fluorescence *in situ* hybridization (FISH)



第一章 總論

Chapter 1. General Introduction



1.1 前言

桑樹屬於桑科 (Moraceae) 桑屬 (*Morus*)，因具多元應用價值而廣受重視。桑葉可供飼蠶，衍生出的蠶桑業源自中國，學者自仰韶文化 (5000~3000 B.C.) 遺址發現蠶繭，可知蠶桑業源流甚早 (梁等, 2007)，除中國外，現已遍及日本、印度、土耳其、義大利、法國、巴西等地，2005 年全世界生絲總生產量已達 15 萬公噸，蠶絲需求逐年提升 (FAO, 2009)。其次，桑樹全株皆可入藥，《神農本草經》及《本草綱目》等古籍皆有記載其功效，特別是可治「消渴」，為今日所言的糖尿病，近來研究證實桑樹含可抑腸道內 α -glycosidases 活性的多羥基生物鹼，如 1-DNJ (1-deozynojirimycin) 及 fagomine，功能近似糖尿病治療藥物「糖祿」(王和羅, 2003; Asano *et al.*, 1994)。其果稱桑椹，為本土抗氧化活力最高之水果 (陳等人, 2004)，可供鮮食或加工，在「果樹少量多樣化」、「觀光採果」及「開發機能性果品」的政策及風潮下，果桑從趣味栽培轉為專業栽培，種植面積增至 500 公頃 (張, 2006a)。部份桑樹品種具有觀賞價值，枝條優美者如雲龍桑及枝垂桑，為庭園造景的良好素材 (張, 2006a)，由上述種種可知桑樹為具多元開發潛力之作物。

臺灣桑樹之記錄始於明朝永曆年間(西元 1661 年)，鄭成功攜蠶種來臺，時以野桑飼蠶，可知彼時有已適應於臺灣環境的桑樹在地種 (local species) 存在。日據時期為促進蠶桑業發展，設立有桑苗養成所 (苗栗區農業改良場前身)，研究學者開始自臺灣各地收集野生桑，引入日本、中國的種原，並進行雜交選育新品種(系)。現今臺灣桑樹除在地種島桑 (*Morus australis*) 及臺灣桑 (*M. formosensis*)，亦有廣東桑 (*M. atropurpurea*)、山桑 (*M. bombycis*)、白桑 (*M. alba*)、魯桑 (*M. latifolia*) 及長果桑 (*M. laevigata*) 等外來種 (余, 2005; 張, 2006a)。臺灣桑樹種原庫位於苗栗區農業改良場 (苗栗縣公館鄉)，保有葉用、果用及觀賞用計 238 個品種 (系)，但除少數種類可依前人方法由外觀分類鑑定外，其餘屬未鑑定品種 (系)，彼此間親緣有待鑑別，且現有之分類系統有誤，造成分類上的困擾。

此外，桑樹為異交作物，形態變異大；部份品種（系）葉片、枝條或果實等性狀大於其他品種（系），亦有不稔或結實不良的情況，疑為多倍體品種（系）（張，2006b）。桑樹具有多元應用價值，為符合不同育種目的，有必要針對種原進行親緣分析，供後續研究參考，以加速臺灣桑樹之育種，以利產業發展。

1.2 桑樹簡介

桑科植物 (Moraceae) 起源甚早，約白堊紀中期後出現 (Zerega *et al.*, 2005)，目前認為桑科植物可能源自熱帶地區，特別是亞洲及印度洋及太平洋島嶼一帶 (Berg, 2001a; Rohwer, 1993)。桑樹 (*Morus spp.*) 則可能起源自喜馬拉雅山低海拔地區 (Sánchez, 2000; Vijayan *et al.*, 2004)，今自然分佈於熱帶及亞熱帶，南緯 10° 至北緯 50° 間的美洲、亞洲、非洲及大洋洲 (南澤, 1976b)，其中以日本及中國一帶的桑樹之物種歧異度最高 (Sharma *et al.*, 2000)，後因人類遷徙，桑樹分布擴及歐洲等地，桑屬植物易適應不同的地理氣候，特化出不同的生態型 (ecotype) (Zhao *et al.*, 2007)。桑樹為雌雄異株，亦常經天然或人為而形成雜交種，使得桑屬植物遺傳背景相當複雜 (吳, 1977; 曾和吳, 1982; Dandin, 1998)。

桑樹為多年生喬木或灌木，常有乳汁。單葉，互生，三至五出脈，全緣或裂葉，托葉早落，形態變異大。桑樹可分為常綠及落葉兩類，常綠者終年生長，無明顯冬季休眠，而落葉性者，在秋季自然落葉，進入休眠，植株需要一段低溫以完成休眠，並在隔年春季萌芽生長，萌芽的早晚依品種（系）而異，僅略分萌芽期早、中及晚等三類 (南澤, 1976a)。

桑多為雌雄異株，少數雌雄同株，花序腋生，隨春天所萌的新芽而生。雌雄花器之構造明顯不同，雄花具四枚花被，內有四枚雄蕊，花絲頂端著生二腎形花藥，花藥室有二，花粉約 25 - 35 μm ，以風為授粉媒介，行異花授粉 (南澤, 1976b)。雌花具四枚花被，子房上位且呈球形，子房內有一室，頂生胚珠一枚，子房頂端生出花柱，二裂柱頭，柱頭有毛或乳頭狀突起。兩性株同時具有雄花、雌花或兩

性花，兩性花兼具雌雄花的特徵，外有四枚花被，四枚雄蕊環繞最內側的子房，子房頂端生出花柱，柱頭二裂。花序為柔荑花序（雄花）或穗狀花序（雌花）。每一雌花及兩性花可經受精後發育為核果（drupe），呈卵狀扁壓形，外有肉質花被包被，果實通稱為椹，屬多花果或複果（multiple fruit）（張, 2006b）。

1.3 桑屬植物之分類

1.3.1 形態分類

良好的分類系統可將植物物種分類、命名並展現出種間相似度及親緣關係（Sokal and Sneath, 1963），而外觀形態是傳統分類的重要依據（Sattler and Rutishauser, 1997）。桑樹為被子植物門、雙子葉植物綱、薔薇目、桑科桑屬（APG II, 2003）。林奈氏（1753）依據果實顏色、葉形及葉的絨毛將桑屬分為七種，後續學者參考林奈氏之分類，陸續針對形態及分佈地發表新種或新品種，抑或變更物種在分類階層的地位，以修正桑屬植物之分類系統（小泉, 1917; 堀田, 1954; Berg, 1986; Bureau, 1873; Gaudichaud, 1830; Greene, 1910; Katsumata, 1970; Kunth, 1818; Moretti, 1841; Zhou *et al.*, 2003），其中 Bureau、小泉和堀田曾提出代表性狀以供分類參考，而現今臺灣桑樹分類係以小泉之研究為基礎，並以其其他營養性狀輔佐分類（張, 2006b）。

1.3.1.1 林奈氏（Carl von Linné）之分類系統

林奈氏依據果實顏色、葉形及葉的絨毛將桑屬分為七種（species）：白桑（*M. alba* L.），葉形心臟形，葉片光滑，果實白色；黑桑（*M. nigra* L.）葉亦為心臟形，葉有細絨毛，果實為黑色；紅桑（*M. rubra* L.）葉片呈心臟形，葉有絨毛，花序為圓筒狀，樹分枝多；印度桑（*M. indica* L.）葉為卵形至橢圓形，葉片分佈不均勻鐵鏽色；韃靼桑（*M. tatarica* L.）與紅桑之葉片形態相似，但韃靼桑之葉柄較長且葉有缺刻；染科桑（*M. tinctoria* L.）葉片卵形，果實綠色，樹皮呈灰色；構樹（*M. papyrifera* L.）葉片為掌狀，而果實有毛（Linné, 1753）。

但因染科桑及構樹之花序非穗狀或柔荑花序，後續獨立為 *Chlorophora* 屬（或稱為 *Maclura*, Berg, 1986; Gaudichaud, 1830; Nuttall, 1818）及 *Broussonetia* 屬（Kunth, 1817）。

1.3.1.2 Ed Bureau 之分類系統

Ed Bureau（1873）利用葉片、枝條及花穗性狀，重新歸納出 5 個種，包含 19 個變種（variety）及 13 個亞變種（subvariety）。

黑桑（*M. nigra*）樹皮呈深褐色，葉近心臟形，少有裂葉，葉質厚，葉緣牙狀鋸齒，葉尖短尖狀，花序短橢圓形，雌花無柄且花柱頂端及乳頭狀或毛狀突起，果實為黑色肉質果。

白桑（*M. alba*）樹皮呈灰至暗灰色，葉常呈卵形，葉質軟而薄，葉緣呈不對稱鋸齒，葉基淺彎至深彎，葉尖鈍頭或短尖狀，白桑可依雌花穗形態分為兩類，一為短橢圓形的雌花穗，另一為長圓柱形雌花穗；短橢圓形雌花穗者再分為兩群，一為短花柱（<1 mm），一為長花柱（>1 mm）。Bureau 將林奈氏認定為種的韃靼桑及印度桑，依據其枝條及葉片性狀，將之歸類於白桑，韃靼桑之雌花序為短橢圓狀且花柱為短，且性狀與 *M. alba* var. *vulgaris* 相似，歸屬於其下之亞變種，而印度桑的雌花花序亦為短橢圓形，但花柱為長，歸屬於白桑變種之一。

紅桑（*M. rubra*）樹皮呈黃褐色至紅褐色，葉呈卵形，葉質軟，葉緣為均勻鋸齒狀，葉基深彎至淺灣，葉尖短而尖，花序圓柱狀，雌花花柱短，聚合果為圓柱形，成熟果實呈紅至紅黑色。

椴桑（*M. celtidifolia*）枝條細而軟，葉卵形至橢圓形，葉緣鋸齒，葉基直線或淺彎，葉尖短尖或尾狀，花序短，小花間距大，雌花花柱短，果實橢圓形。

美洲桑（*M. insignis*）葉卵形至尖矛狀，葉質厚，葉緣細鋸齒，葉基為不均勻且歪斜的淺彎形，葉尖短尖狀，葉柄短，花序長而呈圓柱狀，小花間花距大。

1.3.1.3 小泉源一 (Geniti Koidzumi) 之分類系統

日人小泉源一 (1917) 僅以雌花為主要分類性狀，依花柱分為長花柱 (dolichostylae) 和無花柱 (macromorus) 二大群，再針對柱頭形態分為柱頭絨毛狀突起 (pubescentes) 和柱頭乳狀突起 (papillosae) 等二亞群，並參照其自然分佈地，重新整理為 30 個種及 10 個變種，此系統為今日許多國家所參考的形態分類 (南澤, 1976c)。

長花柱且柱具絨毛狀突起者為阿拉伯桑 (*M. arabica*)；長花柱但柱頭為乳狀突起者包括朝鮮桑 (*M. mogolica*)、唐鬼桑 (*M. nigriiformis*)、圓葉桑 (*M. notabilis*)、山桑 (*M. bombycis*)、暹羅桑 (*M. rotundifolis*)、島桑 (*M. australis*) 及八丈桑 (*M. kagayamae*)。在小泉之分類中首度提及臺灣亦為島桑的分佈地。

無花柱且柱頭具絨毛狀突起包括天竺桑 (*M. serrata*)、黑桑 (*M. nigra*)、毛桑 (*M. tiliaefolia*) 及唐毛桑 (*M. cathayana*)，無花柱但柱頭為乳狀突起者含非洲桑 (*M. mesozygia*)、紅桑 (*M. rubra*)、八原桑 (*M. mollis*)、榎桑 (*M. celtidifolia*)、姬桑 (*M. microphylla*)、秘魯桑 (*M. perubiana*)、雲南桑 (*M. yunnanensis*)、美洲桑 (*M. insignis*)、小笠原桑 (*M. boninensis*)、魯桑 (*M. lhou*; *M. multicaulis*; *M. latifolia*)、白桑 (*M. alba*)、廣東桑 (*M. atropurpurea*)、*M. mallotifolia*；而無花柱且為長花穗者僅長果桑 (*M. laevigata*)、馬來桑 (*M. macroura*)、綠桑 (*M. viridis*)、長穗桑 (*M. wittiorum*) 及 *M. wallichiana*。

1.3.1.4 堀田氏 (Teikichi Hotta) 之分類系統

日人堀田禎吉針對日本及鄰近國家的野桑，提出許多新種與變種的報告，其中首次提及原生臺灣的臺灣桑 (*M. formosensis*)。他利用葉片中碳酸鈣結晶「鐘乳體」(cystolith) 形態，將桑樹區分為長形鐘乳體類 (dolichocystolithiae cell) 和短形鐘乳體類 (bracystolithiae cell) 等二類 (Sugimura *et al.*, 1998)，前者有山桑、島桑、八丈桑、山邊桑 (*M. cordatifolia*)、石材桑 (*M. yoshimurai*)、臺灣桑等，後者則有魯桑、白桑、廣東桑、毛桑、小笠原桑、朝鮮桑及瑞穗桑

(*M. mizuho*) (堀田,1954)。堀田氏之分類為日本主要採用的分類性狀 (Sharma *et al.*, 2000)。

1.3.1.5 現今臺灣之分類系統

現今臺灣所使用的形態分類，係以小泉提出的雌花花柱長為主要的分類性狀，分為長花穗、長花柱及無花柱等三大群，再依葉片、果實及休眠性等性狀區分出七個種 (張, 2006b)。

長花穗群之植株葉片大、葉面平滑，葉全緣呈橢圓形，花穗長圓柱形，每花穗小花數較他群者多，為長果桑 (*Morus laevigata*) 之特色。

長花柱群的共同特徵為葉尖呈尾狀或長尾狀，柱頭乳頭狀突起，花被及花軸表面有白色茸毛。冬季有明顯休眠現象為山桑 (*M. bombycis*)，冬季無明顯休眠現象者，若小花數多，花穗圓筒狀，雌花柱稍粗長為臺灣桑 (*M. formosensis*)，而島桑 (*M. australis*) 之小花數稀少，花穗扁平，花柱細長。

無花柱群之葉背有短毛或無，冬季有休眠現象，雌花柱頭為乳狀突起，。其中葉面平滑，葉尖中或短，小花數多、花穗多而呈圓筒狀為廣東桑 (*M. atropurpurea*)；而葉基淺或深彎者，葉尖短者白桑 (*M. alba*)，若葉面呈狀凹狀或皺縮，具強光澤，葉質厚柔軟，葉尖短者為魯桑 (*M. latifolia*) (朱, 1953; 余, 2005; 曾和吳, 1979; 張, 2006b; 小泉, 1917; 南澤, 1976c; 堀田, 1954)。

此分類系統以雌花為主要分類性狀，無法應用於雄性品種 (系)，應採用不同株性皆共有性狀，以便於辨識；此外，形態特徵的主觀認定及認定的先後順序，或以單一性狀進行鑑別的分類方式，都會影響分類結果 (徐, 1996)，應利用更為客觀的方式進行分析，才能決定分類性狀之先後順序。

1.3.2 同功異構酶與分子標誌的利用

同功異構酶乃一群具不同分子型態，但具有相同且專一的受質的酶，而物種間同功異構酶之變異由基因組成所決定，不受環境及生長情況影響，從各物種的酶譜表現可推測其同功異構酶的基因型組成，進一步推知物種間的親源關

係，並可用於種原鑑別。Hunter 及 Markert (1957) 首先將同功異構酶作為分子標誌，應用於植物中。Hirano (1980) 利用過氫氧化酶等七種酶及樹液內的蛋白質將 248 個桑樹品種(系)分成七大群，並推論群內品種(系)間的親緣關係相近，但因缺乏足夠的多型性，未能從群內分析其親緣關係。

物種間 DNA 序列的多型性 (DNA polymorphism) 亦可做為分類、親緣分析及物種歧異度分析上的重要特性。在核酸限制酶片段長度多型性 (RFLP, restriction fragment length polymorphism) 的技術開發後，分類研究邁入分子遺傳層次。以聚合酶連鎖反應 (PCR, polymerase chain reaction) 為基礎所開發的技術，改善 RFLP 需要大量 DNA 才可進行分析的缺點，增加使用的方便性。至今已有的不同的分子標誌被應用於分析各地區的桑樹種原，如以單一引子分析的逢機增幅多形性核酸 (RAPDs, random amplified polymorphic DNAs) (Awasthi *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2004)、以不同限制酶切出的特定分段進行分析的擴增片段長度多形性 (AFLP, Amplified fragment length polymorphism) (Botton *et al.*, 2005; Kafkas *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2000)、針對葉綠體中 *trnL-F* 及 rDNA 的 ITS 等保守性較高的片段 (Zhao *et al.*, 2005) 及利用 DNA 中保守性高的重複性序列發展出的內間隔簡單重複序列片段 (ISSR, inter-simple sequence repeats) (Awasthi *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007)，結果皆指出桑之遺傳歧異度高，可明顯分為野生種和栽培種兩群，但群內則依不同分析法而有不同結果 (Awasthi *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2006)。

前人研究使用之品種(系)多屬於白桑 (*M. alba* L.)、印度桑 (*M. indica* L.)，或各地的特有物，如黑桑 (*M. nigra*)、紅桑 (*M. rubra*)、長果桑 (*M. laevigata*)、八丈桑 (*M. kagayamae*) 等，國內桑樹品種(系)繁多，除來自中國或日本之山桑、魯桑和廣東桑，在地種以臺灣桑及島桑為主，部份野外收集品種(系)可能是在地種與外來種的雜交子代，釐清國內各品種(系)間遺傳歧異度確有必要 (張, 2006b)。

1.4 數量分類學

由於傳統形態分類常受形態特徵的主觀認定及認定的先後順序，或僅以單一性狀進行鑑定，而影響到分類結果。十八世紀末，數量分類學(numerical taxonomy)的基本概念和方法開始發展，從「定性」轉為「定量」的觀點，將生物性狀以數量化的方式描述，利用數據計算物種間相似度，以此為基礎進行分類，表明物種間親緣關係，但運算過程十分繁雜，在 1950 年代因電腦發明才加速發展，使數量分類更為簡便而廣泛地使用 (Jones and Luchsinger, 1987)。數量分類學並常配合形態、生化或分子標誌等特徵進行分析，參與分析的特徵愈多，分析結果愈客觀，已廣泛應用於種原資源特性及物種歧異度的探討 (徐, 1996)。

生物的性狀特徵包括數量性狀 (quantitative traits) 及質量性狀 (qualitative traits)，依性質不同具有不同的量化模式，分別是數值資料 (quantitative data)、分級資料 (multistate data) 及二元資料 (binary data) (Dunn and Everitt, 1982)。連續性變化的性狀，如葉片長、寬、厚度等為數值資料；不連續性變化性狀，如顏色、形狀等可以加以分級，經量化為分級資料，又如有無刺或有無茸毛，或是如 RFLP、RAPD 分子標記條帶的有無等，以二元資料，加以記錄 (徐, 1996; 翁, 2001)。

數量分類主要有兩類分類方法，分別是分群法 (Clustering method) 及排列法 (Ordination method)。分群法中的群集分析，主要是依分類單位 (operational taxonomic units, OTUs) 間相似或相異程度加以聚集而成樹狀圖，而排列法以主成份分析法 (principal component analysis, PCA) 較常用，係同時將多個性狀所得之數據資料，加以運算重組為主成份 (Principal component)，再藉由主成份分析結果，以少數主成份簡潔說明多種變量代表的意義，可知主成份與性狀特徵間的相關性，並可得知 OTUs 在空間排列上的關係 (翁, 2001)。

1.4.1 群集分析法

群集分析利用 OTUs 間的相似程度進行分類，每個 OTU 所量測的性狀共有

n 個，假設每個性狀（變量, variable）為一維（dimension），則每個 OTU 可視為 n 維空間中的某點。在 n 維座標中，以相異性（dissimilarity）或相似性（similarity）判定 OTUs 間的遠近程度，相異性係以計算 n 維空間中兩個 OTUs 的距離，並視為相異係數，在此係數趨近於 0 時表示此二 OTUs 相似程度愈高，數值越大之則愈低；相似性則是計算兩個 OTUs 的相關係數（correlation coefficient）或角餘弦係數（coefficient of cosine of included angle），若此係數趨近於 1 時，表示此二 OTUs 相似程度愈高，反之則愈低。將所有 OTUs 兩兩之間依相異性或相似性係數組成一相關矩陣（correlation matrix），再以最短距離法（single linkage method）、最長距離法（complete linkage method）、重心分群法（centroid method）、群平均分群法（group average method, 或稱 unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA）等分群方法，將相異性最小或相似性最大的 OTUs 先合併為一新類群，再重新計算新的類群與其他 OTUs 之間新的相異係數或相似係數，如此反覆組合，形成一階級分群樹狀圖，亦稱為聚類樹狀圖（易, 1990; 徐, 1996; 翁, 2001），即可清楚瞭解物種間之相似性遠近及親緣關係。

1.4.2 主成份分析法

主成份分析為一多變量分析法（multivariate analysis）。理論上，變數間彼此存在相關性，且具有某種程度之重複訊息，故透過線性轉換等步驟將數據簡化，計算出主成份值。而主成份間相互獨立，可不致重複表達原始資料之特性，並保留原有變數分佈特性下達到降低變數的維度，可以此少數主成份來分析結果，解釋變數間的關係（易, 1990; 徐, 1996）。

主成份分析時，亦將 OTUs 所量測的 n 個性狀（變量）假設為一維，則每個 OTU 可視為 n 維空間中的某點，將 n 維空間的各點投射至一條新軸線上，使每點至線的距離總和最小，使 n 維空間中各點關係可藉由投射至一新軸線上，便於瞭解 OTUs 之間的關係，此一新軸線即為主成份。主成份即為原始變量之

線性組合，根據此數學理論，原始變量經運算重組得到主成份，所形成的主成份個數與原始變量的個數相等，在各主成分之中，第一主成份（first principal component, PC1）擁有最大變異值（variance）、最大的特徵值（eigenvalue）及最大的變異解釋能力（可解釋的變異量=特徵值/總變量數），第二主成份（PC2）次之，依此類推（呂, 2005; 翁, 2001）。依據數學定義，各主成份間互相獨立（covariance = 0），故彼此解釋變異量互不重疊，在空間上相互垂直（Dunn and Everitt, 1982）。而理想的主成份參考個數設立，可以參照特徵值對主成份數目作的陡坡圖（scree plot）中，所出現的肘點（由陡坡變為平坦時的轉折點）（Cattell, 1966），或以總變異解釋能力 60-80%以上為判斷依據（易, 1990）。

群集分析可將 OTUs 明顯分群，主成份分析則可得知 OTUs 間的空間排列，兩者常相輔相成。群集分析法曾用於桑（白等人, 1997; Banerjee *et al.*, 2007）。白等人（1997）利用此方法調查 34 個雌株或兩性株品種（系）的雌花、葉片及果實的形態性狀，並分出四群，第一群為白桑、第二群是魯桑、第三群則包含蒙桑及鬼桑，第四群為浙江農桑、櫻桃桑及火桑等，白等人認為雌花為重要的分類性狀，葉片及果實則可輔助分類。Banerjee 等人(2007) 群集分析調查白桑 (*Morus alba*)、魯桑 (*Morus latifolia*) 及長果桑 (*Morus laevigata*) 的營養性狀，將其中 25 個品種（系）分為十個不同的群集，並針對性狀間的相關性進行分析，挑選出葉片長及葉片面積等數個性狀，作為葉桑育種的選拔依據。此外，透過主成份分析可瞭解主成份與性狀間的關係，利於選拔有效代表性狀，利用，如在甘藍菜地理小種（Dias *et al.*, 1993）與香蕉（Osuji *et al.*, 1997）等園藝作物之應用。

桑樹的數量分類研究分析過白桑、魯桑、長果桑，或其他地區之特有品種（系），調查性狀則針對雌株或兩性株之雌花性狀，如花柱長、花穗長度等，或是葉用桑重要的經濟性狀，如葉重、葉長寬、枝條長、單枝條長等為主，較不著重於雄株、雌株及兩性株之間共有的植物學性狀。目前臺灣種原，特別是島桑、臺灣桑及未鑑定桑等尚未研究，另外為克服雌雄異株之問題，將選擇有鑑別度且

適用不同株性的營養性狀，如葉尖、葉緣、葉片長寬、葉色、枝條顏色等植物學性狀，希望建立良好的分類系統。

1.5 桑樹細胞遺傳學之研究

細胞遺傳學係研究染色體結構、行為及功能與遺傳之間的關係 (Gill *et al.*, 1979)，20 世紀初由於顯微鏡設備及細胞染色技術改良，使得細胞遺傳學迅速發展。以顯微鏡直接觀測染色體數，可得知細胞染色體倍體數，輔以染色體之形態或減數分裂、有絲分裂時期之染色體行為，可作為親緣遠近之鑑定參考。

1.5.1 倍數體之研究

被子植物中，約有 30-80% 的物種具有多倍體的植株 (Stebbins, 1971; Leitch and Bennett, 1997)。大部份多倍體植株外觀巨大，生長勢強，其中偶數多倍體者具有正常稔性，但奇數多倍體者在減數分裂過程無法產生正常配子，不具稔性 (Jones, 2005)。桑樹為異交作物，形態變異大，部份品種 (系) 的枝條、葉片等性狀顯著大於其他品種 (系)，少數品種 (系) 同時不具稔性，疑為多倍體。

桑的染色體基數 $x = 14$ (Tahara, 1910)，大部份的桑樹為 2 倍體，但亦有 3、4、6、8 倍體之品種 (系) (大澤, 1916; Janaki-Ammal, 1948; 閔, 1959; 儲和孫, 1986)，黑桑 (*M. nigra* L.) 品種 (系) 中曾觀察到 22 倍體 ($2n = 308$) (吳, 1964)，可知桑屬植物的倍體數變化頗大。儲和孫 (1986) 針對廣東桑、魯桑、山桑、白桑、烏桑、瑞穗桑、八丈桑、長果桑及華桑等 9 個種調查各品種 (系) 之染色體倍數，其中八丈桑、長果桑及華桑等 3 種為多倍體，而魯桑、白桑、烏桑及瑞穗桑則有 2 倍體及多倍體的品種 (系)。相較於二倍體的桑樹，多倍體品種 (系) 可能具備外觀形態較大、植體內部份成份發生改變、抗耐性佳、生長遲緩或稔性改變等特徵 (南澤, 1976d)。

瞭解種原之倍數性有助於育種工作之進行，臺灣桑樹種原中，長果桑及少

數收集之野桑品種（系），外觀形態較其他品種（系）大，其中長果桑結實不良，稔性低，張（2006a）推測可能為多倍體，但未進一步證明。

1.5.2 核型分析之研究

核型為物種的穩定特徵，核型分析乃觀察不同種間有絲分裂中期聚縮緊密、容易分辨的染色體，記錄其數目、長度、真染色質與異染色質之分佈、中節位置等形態資料，作為物種歧異度的參考（Sybenga, 1992）。

桑樹之核型分析研究不多，現有文獻以山桑、魯桑、白桑及印度桑（蔣和朱, 1985; 儲和孫, 1987; Susheelamma *et al.*, 1990; Tahara, 1909）之研究為主。桑樹之第一對染色體較長，約為 2 μm ，其餘為 1 μm 以下（Tahara, 1909）。染色體絕對長度依其收縮程度不同而略有差異，在各種間染色體的相對長度差異不大，但各學者所觀察到的染色體中節位置卻不同（蔣和朱, 1985; 儲和孫, 1987; Oginuma *et al.*, 1995; Susheelamma *et al.*, 1990），山桑‘劍持’之核型有報導指出為 $2n = 2X = 24 m + 4 sm$ （蔣和朱, 1985），但 Susheelamma 等人（1990）認為所有染色體皆為中位中節，此差異可能是由於桑樹染色體較小，量測不易所造成。在近年顯微鏡設備及影像擷取系統的改進，應可獲得更好的結果。

1.5.3 性染色體之研究

被子植物中約 4~6% 為雌雄異花異株 (Yampolsky *et al.*, 1922; Renner *et al.*, 1995)，其中植物性別決定，有完全由基因所控制者，如蠅子草 (*Silene latifolia*) (Westergaard, 1958) 及酸模 (*Rumex acetosa*) (Parker and Clark, 1991)，亦有受基因及環境等因子影響者，如菠菜 (*Spinacia oleracea*) (Chailakhyan, 1979)。大澤 (1916) 從兩倍體桑樹觀察到 4 條染色較深的染色體，分別為第 1 對染色體，及另一對可能為異型染色體。Sinoto (1929) 調查山桑 (*M. bombycis* L.) 的染色體，認為桑第一對染色體為異型的性染色體，應類似蠅子草 (*Silene latifolia* Poir.) 由 Y 染色體的存在與否決定性別，但 Gill 等人 (1979) 在白桑中觀察到形態一致的第一對大染色體，且該染色體在雄株和雌株品種（系）減數

分裂時，皆會形成二價體，故認為此對染色體應與性別無關。關（1956）亦未觀察到異型染色體，認為桑樹應無性染色體。南澤（1976b）認為桑樹性別決定除了外在因數，遺傳上應由性染色體決定，並決定植株遺傳上的性別。後續學者曾觀察到桑樹第三對染色體為異型染色體（儲和孫, 1987），但迄今對於桑樹是否具備性染色體尚未有定論。

1.5.4 以螢光原位雜交技術標記 rDNA (ribosomal RNA fluorescent *in situ* hybridization, rDNA-FISH) 之應用

核糖體 RNA 基因 (rDNA) 可分為兩類，18S-5.8S-25S rDNA 及 5S rDNA，18S-5.8S-25S 與 5SrDNA 基因通常分佈於不同位置且成串地分佈 (Sone et al., 1999)，重覆數多且具高保守性。包含有 18S-5.8S-25S rDNA 的染色體片段，稱為核仁形成區 (NOR, nucleolar organizing region)，常可見核仁位於該片段上，形成次級縊縮點，有時可見染色體核仁形成區的基因鬆開，在核仁另一端連結衛星染色體；而 5S rDNA 通常位於不具核仁形成區的染色體上。在親緣相近的基因組中，核仁形成區的數目及位置可能有所不同，因此常用於作為染色體的標記，可用於近緣種間之比較 (Schubert and Wobus, 1985; Raina and Mukai, 1999)，應用於許多植物 (Leitch and Heslop-Harrison, 1992; Linde-Laursen *et al.*, 1992; Raina and Mukai, 1999; Li and Zhang, 2002; Chung *et al.*, 2008)，如檸檬及其近緣種 (Carvalho *et al.*, 2005)。

原位雜交技術 (*in situ* hybridization) 始自 1960 年代末期 (Gall and Pardue, 1969; John *et al.*, 1969)，原是以放射性同位素為標定基因序列的探針。因實驗費時、每次只能標定單一序列及後續放射性同位素廢棄物處理等問題，使得初期原位雜交技術的使用有所侷限。後續發展出可同時標記兩種以上基因序列的探針，並且可以非放射性標定與免疫螢光偵測同時進行的方式，改善以往的缺點及限制，使得螢光原位雜交技術成為實用的細胞學技術，再加螢光物質及螢光顯微鏡設備的開發及改進、影像擷取系統及影像軟體使用的進步，使得螢光

原位雜交技術更為廣泛應用於各類基因定位、染色體結構及組成、雜交物種之染色體轉位等研究上 (Kato *et al.*, 2005)。

細胞遺傳學之研究，可瞭解物種的染色體條數及其倍數性，亦可從中針對染色體的形態，推估物種之親緣關係，但目前僅針對少數種，以山桑、魯桑、白桑為主，其他品種(系)之核型尚不清楚(李及張, 2003)，而臺灣桑樹，除白桑及山桑之部份品種(系)染色體數目可由前人文獻中得知，其餘品種(系)資料闕如，希望從其核型資料進一步找出證據以佐證分類結果。

1.6 結論及試驗假說

桑為雌雄異株，風媒花，易馴化而衍生出新的種，遺傳背景複雜。臺灣桑的品種多元，除在來種島桑及臺灣桑，亦有自中國及日本引入之種原，經長期雜交、選拔及育種，已成一龐大的族群，瞭解其遺傳背景才便於利用(張, 2006a)。目前使用的分類方式皆有其優點及限制，形態分類可直接從外表形態觀察，但不易從少數主觀認定之性狀得知其親緣關係(張, 2006a)。分子標誌以 DNA 序列中的變異為鑑定種間親緣的重要工具，但目前需要更多的分子標記，才能得到較好的分類結果(Awasthi *et al.*, 2004)。細胞遺傳上的分類，可從核型分析及以 rDNA 螢光原位雜交技術的結果推知種間親緣及倍數體訊息，但研究少。

目前臺灣桑樹之分類仍由形態鑑定為主，以雌花為主要分類性狀，不適用於雄性品種(系)；此外，形態特徵的主觀認定及認定的先後順序，或以單一性狀進行鑑別的分類方式，都會影響分類結果，而其他方面之研究闕如，為今臺灣桑樹種原資料庫不足之處，使得臺灣桑樹的育種工作頗受限制。

本試驗以較客觀的數量分類學，由調查雌雄株皆存在且穩定的營養性狀著手，次由從形態的相似度建立種原之歧異度及親緣關係，篩選分類上權重大的性狀，據以修改目前臺灣桑樹形態分類系統(第二章)。其中部份品種(系)形態特別大且為不稔，疑為多倍體，以流式細胞儀鑑定桑之倍數性，並比較形態與倍

數性之關係，試圖找出可作為多倍體初步評估的性狀（第三章），再從核型分析著手，確認其染色體數目，希望由染色體核型，及以 rDNA 之分佈位置，輔助說明種原間的親緣關係，並從結果中判定有無性染色體存在（第四章），試驗結果可更為瞭解目前臺灣桑樹種原之親緣關係，修改現有分類系統，提供後續育種及其他相關研究參考。



1.7 參考文獻

- 王仁助、羅玉青. 2003. 桑樹機能性成份簡介. 農業世界 242: 34-39.
- 白勝、柯益富、餘茂德. 1997. 桑屬 (*Morus*) 植物形態數值分類研究. 四川蠶業 1997(2):23-28.
- 朱永康. 1953. 臺灣的桑樹品種. 臺灣農林 7:26-28.
- 余錫金. 2005. 蠶桑. p.237-250. 刊於: 潘芝等主編. 臺灣農家要覽: 農作篇(一)(增訂三版). 豐年社出版. 臺北市.
- 吳思敬、顏國慶. 1996. 成熟階段對桑葉抗氧化性之影響. 食品科學 23:412-421.
- 吳登楨. 1977. 桑樹之品種改良. 科學農業 25:242-244.
- 吳雲. 1964. 我國不同桑品種的倍數性鑑定. 蠶業科學 2:165-170.
- 李東升、張和禹. 2003. 桑樹種與品種分類研究進展. 中國蠶業. 24:15-17.
- 易任. 1990. 主成份分析與群集分析應用於雨量空間分佈之研究. 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告. 75 頁.
- 林志忠. 1999. 桑科. p.46. 刊於: 楊遠波、劉和義、呂勝由編著. 臺灣維管束植物簡誌. 第二卷. 行政院農委會出版. 臺北市.
- 徐克學. 1996. 數量分類學. 水產出版社. 基隆市.
- 翁儷倩. 2001. 柑橘遺傳歧異性之分析. 國立臺灣大學園藝所碩士論文. 90pp.
- 張哲嘉、范瑞君、張銘文、齊文隆、余錫金. 2005. 桑樹的分類與自然分佈. 中國園藝 51:13-18.
- 張哲嘉. 2006a. 臺灣桑樹之分類及品種改良. 臺灣園藝 52:377-392.
- 張哲嘉. 2006b. 果桑(桑椹)之生育與栽培管理. 農業世界雜誌 275:46-54.
- 梁國真、賴亮邵、劉燕儷、李汾陽. 2007. 中國通史 p.8. 五南圖書出版, 臺北.
- 陳彩雲、蕭寧馨、楊雯如、林宗賢. 2004. 臺灣水果抗氧化能力之研究. 中國園藝 50: 592(摘要).
- 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.
- 潘一樂. 2000. 桑種質資源和桑樹育種的研究現狀與展望. 蠶業科學 26:1-5.
- 蔣同慶、朱勇. 1985. 二倍體桑樹的核型分析. 蠶學通訊 1985(3):9-17.
- 盧英權. 1988. 栽桑學. 初版. p.1-136. 國立編譯館發行. 臺北市.

- 儲瑞銀、孫曉霞. 1986. 桑屬植物細胞遺傳學的研究 I. 部分桑品種的染色體數. 12: 199-202.
- 儲瑞銀、孫曉霞. 1987. 桑屬植物細胞遺傳學的研究 II. 四個桑品種的核型分析. 13: 129-132.
- 小泉源一. 1917. 桑屬植物考. 蠶試報 3:1.
- 大澤一衛. 1916. 桑の細胞學并に實驗的研究. 蚕試報告 1:215-292.
- 南澤吉三郎. 1976a. 栽桑學. p.145. 鳳鳴社. 東京. 日本.
- 南澤吉三郎. 1976b. 栽桑學. p.11-124. 鳳鳴社. 東京. 日本.
- 南澤吉三郎. 1976c. 栽桑學. p.125-131. 鳳鳴社. 東京. 日本.
- 南澤吉三郎. 1976d. 栽桑學. p.161-162. 鳳鳴社. 東京. 日本.
- 堀田禎吉. 1954. 桑樹分類之研究. 京都工藝纖維大學出版. 京都. 日本.
- 關 博夫. 1956. 桑樹の性染色体について. 日蚕雜. 25:191. (予報)
- 關 博夫. 1959. 桑屬植物の細胞學的研究. 信州大織紀要. 20:1-91.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 141:399-436.
- Asano, N., N. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu, and K. Matsui. 1994. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. Carbohydr. Res. 259:243-255.
- 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.
- Banerjee, R., S. Roychowdhuri, H. Sau, B. K. Das, P. Ghosh, and B. Saratchandra. 2007. Genetic diversity and interrelationship among mulberry genotypes. J. Genet. Genomics 34:691-697.
- Berg, C. C. 2001. Moreae, Artocarpeae, and Dorstenia (Moraceae), with introductions to the family and *Ficus* and with additions and corrections to flora neotropica monograph 7, p.53-54. In: C. C. Berg (ed.). Flora neotropica, Vol. 83. New York Botanical Garden Press, New York.
- Berg, C.C. 1986. The limitation and subdivision of the genus *Maclura* (Moraceae). Proc. K. Ned. Akad. Wet., Ser. C: Biol. Med. Sci. 89:241-247.
- Bhattacharya, E. and S. A. Ranade. 2001. Molecular distinction amongst varieties of mulberry using RAPD and DAMD profiles. BMC Plant Biol. 1:3-10.

- Botton, A., G. Barcaccia, S. Cappelozza, R. Da Tos, C. Bonghi, and A. Ramina. 2005. DNA fingerprinting sheds light on the origin of introduced mulberry (*Morus spp.*) accessions in Italy. *Genet. Resour. Crop Evol.* 52:181-192.
- Bureau, E. 1873. Moraceae, p.211-288. In: A. De Candolle (ed.). *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. Vol. 17. Bibliople apud medicine academiam, Paris, France.
- Carvalho, R., W. S. Soares Filho, A. C. Brasileiro-Vidal, and M. Guerra. 2005. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res.* 109:276-282.
- Cattell, R. B. 1966. The meaning and strategic use of factor analysis, p.174-243. In: R. B. Cattell (eds.). *Handbook of multivariate experimental psychology*. Rand McNally, Chicago.
- Chung, M.-C, Y.-I. Lee, Y.-Y. Cheng, Y.-J. Chou, and C.-F. Lu. 2008. Chromosomal polymorphism of ribosomal genes in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 116:745-753.
- Dandin, S. B. 1998. Mulberry: a versatile biosource in the service of mankind. *Acta Sericologica Sinica* 24:109-113.
- Dias, J. S., A. A. Monterio, and M. B. Lima. 1993. Numerical taxonomy of Portuguese Tronchuda cabbage and Galega kale landraces using morphological characters. *Euphytica* 69:51-68.
- Dunn, G. and B. S. Everitt. 1982. *An introduction to mathematical taxonomy*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- FAO. 2009. FAOSTAT: Mulberry production in 1990-2005. 28 May 2009. <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=291&lang=en>>
- Fransz, P. F., C. Alonso-Blanco, T. B. Liharska, A. J. M. Peeters, P. Zabel, and J. H. de Jong. 1996. High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence in situ hybridization to extended DNA fibers. *Plant J.* 9:421-430.
- Gall, J. G. and M. L. Pardue. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63:378-383.
- Gaudichaud, C. B. 1830. *Chlorophora*, p.509. In: C. B. Gaudichaud (ed.). *Voyage autour du Mode, entrepris par ordre du Roi, execute sur les corvettes de S. M. l'Uranie et la physicienne par M. Louis de Freycinet bontanique*.
- Gill, B. S. and R. C. Gupta. 1979. Cytological studies in the sex types of *Morus alba* L.

- (Moraceae). *Current Sci.* 48:35-36.
- Greene, E. L. 1910. Some southwestern mulberries, p.112-121. In: E. L. Greene (ed.). *Leaflets of botanical observation and criticism. Vol.2* Washington D. C., USA.
- Guerra, M., A. Pedrosa, A. E. B. Silva, M. T. M. Cornélio, K. G. B. Santos, and W. S. Soares Filho. 1997. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. *Braz. J. Genet.* 20:489-496.
- Guerra, M., K. G. B. Santos, A. E. B. Silva, and F. Ehrendorfer. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – a case of parallel chromosomal evolution. *Am. J. Bot.* 87:735-737.
- Hirano H. 1980. Thremmetological studies of protein variation in mulberry. *Bul. Sericult. Expt. Sta.* 28:67-186.
- Hunter, R. L. and C. L. Markert. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125:1294-1295.
- Janaki-Ammal, E. K. 1948. The origin of black mulberry. *J. Royal Horticult. Soc.* 73:117-120.
- John, H. A., M. L. Birnstiel, and K. W. Jones. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587.
- Jones, H. 2003. *Genetics: analysis of genes and genomes*, 6th ed. p.329-330. Jones and Bartlett publishers, Sudbury, M.A., USA.
- Jones, S. B. and A. E. Luchsinger. 1987. *Plant systematic*. McGraw-Hill international editions. Singapore, New York.
- Kafkas, S., M. Özgen, Y. Doğan, B. Özcan, S. Ercişli, and S. Serçe. 2008. Molecular characterization of mulberry accessions in Turkey by AFLP markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133:593-597.
- Kato, A., J. M. Vega, F. Han, J. C. Lamb, and J. A. Birchler. 2005. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Current opinion in plant biol.* 8:148-154.
- Katsumata, F. 1970. Relationship between the length of styles and shape of idioblasts in mulberry leaves, with special reference to the classification of mulberry tree. *J. Sericult. Sci. Japan.* 41:387-395.
- Kumekawa, N. and K. Oshigane. 2004. Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosomes of mulberry species with the diploid genome. *Genes Genet. Syst.* 79:387. (Abstract)

- Kunth, K. S. 1817. *Broussonetia*, p.32-33. In: Bonpland, A., A. Humboldt, and K. S. Kunth (eds.). *Nova genera et species plantarum*. Lutetiae Parisiorum: sumtibus Librariae Graeco-Latino-Germanico, Paris, France.
- Leitch, I. J. and J. S. Heslop-Harrison. 1992. Physical mapping of the 18S-5.8-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* 35:1013-1018.
- Leitch, I. J. and M. D. Bennett. 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci.* 2: 470-476.
- Li, D. and X. Zhang. 2002. Physical localization of the 18S-5.8S-26S rDNA and sequence analysis of ITS regions in *Thinopyrum ponticum* (Poaceae: Triticeae): implications for concerted evolution. *Ann. Bot.* 90:445-452
- Linde-Laursen, I, E. Ibsen, R. Von Bothmer, and H. Giese. 1992. Physical localization of active and inactive rRNA gene loci in *Hordeum marinum ssp. gussoneanum* (4X) by *in situ* hybridization. *Genome* 35:1032-1036.
- Linné, C. 1753. *Morus*, p.968. In: C. Linné (ed.). *Species plantarum*. Vol. 2. Stockholm, Sweden.
- Moretti, G. 1841. *Prodromo di una monografia della specie del genere Morus*. Istituto lombardo di scienze e lettere, 1842, 1:167.
- NIAS genebank. 2009. The list of mulberry accessions in germplasm. 10 Mar. 2009. <<http://www.gene.affrc.go.jp/ex-nises/mulberry/mulberryindex.html>>
- Oginuma, K. and H. Tobe. 1995. Karyomorphology of some Moraceae and Cecropiaceae (Urticales). *J. Plant Res.* 108:313-326.
- Osuji, J. O., B. E. Okoli, D. Vuylsteke, and R. Ortiz. 1997. Multivariate pattern of quantitative trait variation in triploid banana and plantain cultivars. *Sci. Hort.* 71:197-202.
- Raina, S. N. and Y. Mukai. 1999. Detection of a variable number of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal DNA loci by fluorescent *in situ* hybridization in diploid and tetraploid *Arachis* species. *Genome* 42:52-59.
- Rakoczy-Trojanowska, M. and H. Bolibok. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9:221-238.
- Renner, S. S. and R. E. Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *Amer. J. Bot.* 82:596-606.
- Ried, T., A. Baldini, T. C. Rand, and D. C. Ward. 1992. Simultaneous visualization of

- seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1388-1392.
- Rohwer, J. G. 1993. Moraceae, p.438-453. In: Kubitzki, K., Rohwer, J. G. and Bittrich, V. (eds.). The families and genera of vascular plants. Springer-Verlag, Berlin.
- Sánchez M.D. 2000. World distribution and utilization of mulberry, potential for animal feeding. FAO Electronic conference on mulberry for animal production. 10 Mar. 2009. <<http://www.fao.org/livestock/agap/frg/mulberry/Papers/HTML/Intro.htm>>
- Sattler, R. and R. Rutishauser. 1997. The fundamental relevance of morphology and morphogenesis to plant research. Annal Bot. 80:571-582.
- Schubert, I. and U. Wobus. 1985. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in Allium. Chromosoma 92:143-148
- 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.
- Sinoto, Y. 1929. Chromosome studies in some dioecious plants with special reference to Allosome. Cytologia 1:109-199.
- Sokal, R. R. and P. A. Sneath. 1963. A critique of current taxonomy, p.5-36. In: R. R. Sokal and P. A. Sneath (eds.). Principles of numerical taxonomy. W. H. Freeman and company, San Francisco, USA.
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. p.216. Addison-Wesley, MA, USA.
- Sugimura, Y, I. Nitta, Y. Morita Y. S. Ishikawa, T. Mori, E. Katani, and T. Furusawa. 1998. Microscopic detection of calcium deposited in idioblasts of mulberry leaves. J. Seri. Sci. Jap. 67:445-451.
- Susheelamma, B. N., J. S. Kumar, S. B. Dandin, M. S. Jolly, K. Sengupta, and R. Raju. 1990. Karyomorphological studies in a few exotic varieties of genus *Morus* L. Cytologia 55:107-114.
- Sybenga, J. 1992. The somatic chromosome complement: karyotype analysis, p.65-100. In: J. Sybenga.(ed.). Cytogenetics in plant breeding. Springer-Verlag. New York, USA
- Tahara, M. 1910. Ueber die Kernteilung bei *Morus*. Bot. Mag. Tokyo 24:281-289.
- Vijayan, K., P. P. Srivastava, and A. K. Awathi. 2004. Analysis of phylogenetic

relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers. *Genome* 47:439-448.

- 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 marker associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breeding* 125:298-301.
- Yampolsky, C. and H. Yampolsky. 1922. Distribution of sex forms in the Phanerogamic flora. *Bibliotheca Genet.* 3:1-62.
- Zerega, N. J. C., Clement, W. L., S. L. Datwyler, and G. D. Weiblen. 2005. Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37:402-416.
- Zhao, W., Y. Wang, T. Chen, G. Jia, X. Wang, J. Qi, Y. Pang, S. Wang, Z. 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.
- Zhao, W., Z. Zhou, X. Miao, Y. Zhang, S. Wang, J. Huang, H. Xiang, Y. Pan, and Y. Huang. 2007. A comparison of genetic variation among wild and cultivated *Morus* species (Moraceae: *Morus*) as revealed by ISSR and SSR markers. *Biodivers. Conserv.* 16: 275-290.
- 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. Biotechnol.* 4:563-569.
- Zhou, Z. and M. G. Gilbert. 2003. Moraceae, p.21-73. In: Wu, P. H. Raven and D. Hong (eds). *Flora of China* Vol. 5. Science Press, Beijing, China.

第二章 臺灣桑樹之歧異度分析

Chapter 2. Genetic diversity of mulberry (*Morus spp.*) in Taiwan



第二章 臺灣桑樹之歧異度分析

2.1 摘要

臺灣桑樹種原多元，除在地種島桑及臺灣桑外，亦有自中國大陸及日本引入之品種（系），經過長期選育，已衍生為龐大的族群，其分類仍待釐清。本試驗於2008年自苗栗區農業改良場之桑樹種原庫中，選擇7個種與雜交桑、未鑑定桑等26個品種（系），調查各21個營養性狀後，再進行主成份分析及群集分析。結果顯示，吾人可將受試品種（系）分為（一）長果桑，（二）廣東桑、山桑、島桑及臺灣桑與（三）白桑及魯桑等三群。依據主成份分析的結果，挑選出葉寬、葉長葉寬比、葉柄寬、休眠需冷量、生長中芽形、休眠芽形、葉色、葉緣及葉尖等九個分類權重較大的特徵，歸納出不受株性所限的桑樹分類檢索表。長果桑與其他桑樹形態差異大，可獨立成一個種。白桑及魯桑的親緣相近，而山桑、島桑及臺灣桑的關係密切；常被視為白桑同種異名的廣東桑，在本試驗中證實與山桑、島桑及臺灣桑較為類似，和白桑具明顯差異。

關鍵字：主成份分析、群集分析、主要代表性狀、檢索表

2.2 前言

桑樹 (*Morus spp.*) 具有重要的經濟價值，葉可飼蠶，果實可供鮮食及加工之用，桑枝、桑葉、桑根、桑果各具多種機能性成份 (王, 2003; Asano *et al.*, 1994; 陳等人, 2004)，極具開發潛力。桑樹多為雌雄異株，行異花授粉，遺傳組成高度異質，植株易馴化而特化出不同種，廣佈於南緯 10 度至北緯 50 度間的溫暖地區 (南澤, 1976; 吳, 1977; 曾和吳, 1982; Dandin, 1998)。

桑樹為常綠或落葉性的多年生木本，具落葉性者於秋末落葉並進入休眠，經一段低溫以滿足休眠後，於隔年春季萌芽。多具乳汁，葉柄下方之枝上無環狀托葉痕，葉為膜質或紙質，單葉互生，花器外露，雌花序為穗狀花序 (林, 1999)，歸屬於被子植物門、雙子葉植物綱、薔薇目、桑科桑屬 (APG II, 2003)。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)，後續學者提出不同意見修正分類系統，其中以小泉(1917)和堀田(1954)的鑑定方式較具代表性。小泉 (1917) 利用雌花的花柱長，將桑屬植物分為長花柱 (*Dolichostylae*) 及短花柱 (*Macromorus*) 兩大群，再分為柱頭有毛類 (*Pubescentes*) 和柱頭有乳狀突起類 (*Papillosae*) 兩個亞群，對照各種自然分佈地，整理出 30 個種及一個變種，為多國所參考的分類方式；而堀田 (1954) 則以葉片的鐘乳體形態，將桑分為長形鐘乳體細胞類及短形鐘乳體細胞類，為現今日本常用之分類方法 (Sharma *et al.*, 2000)。

臺灣的桑樹種原，除了島桑和臺灣桑等在地種 (local species)，其他係由中國大陸或日本引入，經多年引種、選拔、育種及演化，已衍生為龐大族群 (張, 2006)，但各種原間親緣關係未明，為符合未來多元的育種需求，需建立種原間遺傳的基本資料並建立良好的分類系統以利使用。今臺灣桑樹之分類系統係以小泉的研究為基礎，將桑屬分為短花柱、長花柱及長花穗等三大群，第一群為魯桑、廣東桑、白桑，第二群則是山桑、島桑、臺灣桑，而第三群為長果桑，各群再依葉片、果實及休眠性深淺等性狀分出七種 (張, 2006; 吳和曾, 1979; 南澤; 1976; 小

泉, 1917)。但依原有分類系統，張氏(2006)觀察到少數已鑑定品種(系)中，部份性狀不符合分類特徵，如台桑2號及台桑3號終年常綠，卻被歸類於休眠性深的白桑。此外，此分類系統係以雌花為主要分類性狀，不適用於雄株品種(系)，而形態特徵的主觀認定及認定的先後順序，或以少數性狀進行鑑別的分類方式，都會影響分類結果(徐, 1996)，為今臺灣桑樹形態分類鑑定所面臨的問題。

數量分類學(Numerical taxonomy)係將調查物種以分類單位(operational taxonomic units, OTUs)區分，分類單位的眾多生物性狀，以數量化描述，透過數學運算分類單位之間的相似程度，將之重新組合，說明彼此的親緣關係，並以其結果作為基礎進行分類。群集分析法及主成份分析為常用的分析方式，群集分析法係將分類單位之間相似或相異程度加以聚集而成樹狀圖，而主成份分析則是將每個分類單位，多個性狀所得之數據資料加以運算，重組為主成份，再以少數主成份簡潔說明結果分類的意義，亦可知分類單位在空間排列的關係(徐, 1996; 翁, 2001)。數量分類學將眾多性狀特徵量化清楚，並將各性狀之比重皆視為一致，分析結果具客觀性(Sneath and Sokal, 1973)，已運用在其他多年生果樹，如杏(Pérez-Gonzales, 1992)、桃(Pérez *et al.*, 1993)、栗(Pereira-Lorenzo *et al.*, 1996)、桶柑(翁, 2001)等，而群集分析及主成份分析兩者結果常相輔相成，以此類似的結果可建立較客觀的分類系統。

本試驗係以群聚分析及主成份分析，以26個品種(系)的葉片、枝條等營養性狀，建立臺灣桑樹之親緣關係，並從中找出在分類上較重要的營養性狀，修正現有之桑樹分類，俾後續研究參考。

2.3 材料與方法

2.3.1 植物材料

本試驗於苗栗區農業改良場(苗栗縣公館鄉)桑樹種原庫進行，擇用品種(系)參考舊有分類系統(張, 2006a)，自臺灣桑樹七大系統中，每一種(species)各挑

選 1 至 3 個品種（系）（accessions）、雜交桑 6 個品種（系）及未鑑定桑 3 個品種（系），共 26 個品種（系）（表 2.1）進行形態調查。

其中‘劍持’、‘改良鼠返’、‘新一の瀨’、‘厚葉綠’、‘58C309’、‘67C001’、‘58C398’、‘58C475’及‘67C002’種植於葉桑種原區，行株距 1.8×0.9 公尺，株齡為 7 年生以上；‘68H₂₂021’、‘68H₂₂033’、‘74H₂006’、‘74H₂047’、‘台桑 1 號’、‘38C001’（湖喜）、‘70C006’（長果桑）、‘74C005’（雲龍桑）及‘69C002’（枝垂桑）植於果桑種原區一，行株距為 1.2×1.2 公尺，株齡為 5 年生；‘台桑 3 號’、‘台桑 2 號’、‘46C019’、‘46C020’、‘93C203’、‘94C001’、‘白果桑’及‘苗栗 1 號’（Chang, 2008）則植於果桑種原區二，行株距為 4×4 公尺，品種（系）株齡為 4 年生。各品種（系）植株按一般葉桑及果桑栽培進行灌溉、施肥及病蟲害管理。

種原區內除‘68H₂₂021’僅二株、‘74H₂₂047’僅有一株，其餘品種（系）皆有五株，各品種（系）選擇生長勢相近之三株進行取樣調查。

本試驗調查的 26 個品種（系）中，品種（系）內各植株間的重複數性狀表現一致，唯 67C001 有二株性狀與其他三株性狀表現略為不同，二株樹之葉片較小，枝條節間短，另三株則葉片大，枝條節間長，故在後續試驗將 67C001 分為編號‘67C001-A’及‘67C001-B’兩組各別調查。

2.3.2 性狀調查

2.3.2.1 營養性狀

營養性狀調查於 2008 年 1 月至 2008 年 6 月間進行，調查項目參考張氏（2006）及南澤（1976）描述的植物學性狀，分為數量性狀及分級性狀二大項（表 2.2），實際性狀差異如附錄二所示。為估算滿足植株休眠低溫量的休眠需冷量，記錄苗栗縣公館鄉苗栗區農業改良場每日之日均溫、當日最高及最低溫度，而估算方法則參考歐和陳（2000）所研發的低需冷模式，休眠期長度以「開始感應低溫的日期」為起點，至各供試品種（系）的萌芽日為終點，感應低溫起始日之研判方法，以單日累積之低溫單位為最大負值發生後的次一日（最大

表 2.1. 試驗所用之 26 個品種（系）及其來源

Table 2.1. The 26 mulberry accessions used in the experiment and its origin.

種類	品種名稱	株性	來源
山桑系 (<i>Morus bombycis</i>)	劍持 (Kenmochi)	♀	日本
白桑系 (<i>M. alba</i>)	改良鼠返 (Kairyonezumigaeshi)	♂	日本
	新一の瀨 (Shinichinose)	♀	日本
	69C002 (枝垂桑)	♀	日本
魯桑系 (<i>M. latifolia</i>)	厚葉綠 (Astubaroku)	♂	日本
	38C001 (湖喜)	♂	日本
	74C005 (雲龍桑)	♂	日本
島桑系 (<i>M. australis</i>)	台桑 1 號 (Taisang No. 1)	♂	臺灣野桑
	58C307	♀	花蓮吉安
	67C001-A	♀	台南新化
	67C001-B	♂	台南新化
臺灣桑系 (<i>M. formosensis</i>)	58C398	♀	花蓮瑞穗
	58C475	♀	苗栗公館
	67C002	♀	苗栗公館
廣東桑系 (<i>M. atropurpurea</i>)	46C019	♀	台北公館
	46C020	♀	嘉義中埔
	苗栗 1 號 (Miaoli No.1)	♀	苗栗大湖
長果桑 (<i>M. laevigata</i>)	70C006	♀	高雄岡山(中國雲南)
雜交桑 (Hybrids)	68H ₂ 021	♀	46C019*46C022
	68H ₂ 033	♂	46C019*46C022
	74H ₂ 006	♀	46C019*台桑 3 號
	74H ₂ 047	♀	46C019*台桑 3 號
	台桑 2 號 (Taisang No. 2)	♀	44C005*46C022
	台桑 3 號 (Taisang No. 3)	♂	44C005*46C020
未鑑定桑 (<i>Morus spp.</i>)	93C203	♀	台南
	94C001	♀	彰化
	白果桑 (成熟果實為白色)	♀	澳洲

(修改自張, 2006a; 2007)

表 2.2. 試驗所調查的數量性狀及分級性狀

Table 2.2. Quantitative and Qualitative traits surveyed in the experiment.

一、數量性狀

葉身長(cm)
葉身寬(cm)
葉柄長(cm)
葉柄寬(cm)
葉身長寬比
葉柄長寬比
葉身及葉柄長之比值
葉片厚度(mm)
節間長(cm)
休眠需冷量(Chilling unit, CU)

二、分級性狀

休眠芽形 (1: 正三角形; 2: 長三角形; 3: 卵形銳角)
生長中頂芽型態 (1: 簇型; 2: 箭型)
新芽顏色 (1: 綠色; 2: 帶紅色; 3: 帶紫色)
葉片缺刻 (0: 全緣; 1: 有缺刻)
成熟葉片顏色 (1: 深綠色; 2: 綠色)
葉形 (1: 心臟形; 2: 橢圓形)
葉尖長 (1: 鈍頭及尖頭; 2: 短尾狀; 3: 長尾狀)
葉基 (1: 直線形; 2: 淺彎形; 3: 深彎形)
葉緣 (1: 銳鋸齒; 2: 牙狀鋸齒; 3: 圓鋸齒; 4: 乳頭狀鋸齒; 5: 鈍鋸齒)
一年生成熟枝條之顏色 (1: 灰色; 2: 黃褐色; 3: 黑褐色)
主幹顏色 (1: 灰色; 2: 黃褐色; 3: 黑褐色)

負值為-24，即單日日均溫達 27.8°C 以下的當日），視為累計低溫的始點（Richardson *et al.*, 1974），自 2007 年 11 月 10 日開始計算。萌芽期為全株標定五個枝條，每七日調查一次，枝條上超過 50% 的芽點萌發，視為萌芽日。休眠需冷量以當日日均溫（附錄一附圖一）配合溫度準據（附錄一附表一）計算當日之低溫累積量，累計休眠期間各品種（系）之休眠需冷量（Chilling unit, CU）。

每株逢機選擇 12 個枝條，調查枝條中段之營養性狀，葉片樣本取用剛展開（bud break）葉片下第 5 片或第 6 片成熟葉。

2.3.2.2 株性及花柱長度

株性以各株標定之五個枝條上已萌發之花序來判定。此外，本試驗針對雌株及兩性株品種（系）挑選三株生長勢相近的植株，每株逢機選擇十二個花穗樣本，調查花穗中段十朵小花之花柱長，計算每個品種（系）及各個種之平均值及標準偏差。

2.3.3 統計分析

一品種（系）即為一運算分類單位（Operational taxonomic units, OTUs）。數量性狀之資料經平均，進行對數轉換，並將數據標準化。而分級性狀則轉換成一系列之二元性狀，並以 1 或 0 各表示有或無觀察到該性狀（Kaufman and Rosseeuw, 1990），分級性狀經轉換為二元性狀後，將數據以標準化。資料經處理後，以 NTSYS 軟體 version 2.1（Applied Biostatistics Inc., NY）分別進行主成份分析（Principal component analysis）及群集分析（Clustering analysis）（Rolf, 2000）。

主成份分析係將已標準化之數據以相關係數（Correlation coefficient）進行特徵相似性計算，求出特徵值及特徵向量，再進行投射（Projection）完成 OTUs 在 n 度空間的排列。

群集分析法係以歐氏距離係數（Euclidean distance coefficient）計算兩 OTUs 的非相似性得到相關矩陣，再以群間平均分群法（Unweighted pair-group method

with arithmetic mean, UPGMA) 分群，完成樹狀圖。

標準化公式： $\frac{Y_i - \bar{Y}}{\sigma}$

歐式距離係數公式： $E_{ab} = \sqrt{\sum_k (X_{ak} + X_{bk})^2}$

E_{ab} ：表 a、b 兩個體間之非相似性。

X_{ak} ：表示 a 個體第 k 個性狀的值，k = 1~38。

X_{bk} ：表示 b 個體第 k 個性狀的值，k = 1~38。

2.4 結果

2.4.1 以營養性狀進行群集分析及主成份分析

受試品種（系）可以群集分析及主成份分析，分為三群，第 1 群僅有長果桑‘70C006’；第 2 群包含廣東桑（‘46C019’、‘46C020’及‘苗栗 1 號’）、山桑（‘劍持’）、島桑（‘台桑 1 號’、‘58C307’、‘67C001-A’及‘67C001-B’）及臺灣桑（‘58C398’、‘58C475’及‘67C002’），及雜交桑‘68H₂₂021’、‘68H₂₂033’、‘74H₂006’、‘74H₂047’、‘台桑 2 號’及‘台桑 3 號’和未鑑定桑‘93C203’、‘94C001’；第 3 群則為魯桑（‘厚葉綠’、‘74C005’（雲龍桑）及‘38C001’（湖喜））及白桑（‘改良鼠返’、‘新一の瀨’、‘69C002’（枝垂桑））及未鑑定桑品種（系）‘白果桑’（圖 2.1）歸之。

試驗所用之長果桑‘70C006’為雌株，在距離係數為 2.22 時，與其他桑樹品種（系）分開，其營養性狀與其他桑樹顯著不同，休眠芽為卵狀銳角，營養生長的葉片大而厚，為橢圓形，葉緣為細鋸齒，葉尖呈長尾狀，葉柄較粗，節間較長，一年生枝條為黑褐色。

距離係數為 1.51 時，桑樹再分出包含有山桑、島桑、臺灣桑及廣東桑之品種（系）的第 2 群，和包括白桑及魯桑品種（系）的第 3 群。第 2 群的共同特徵為休眠芽形為長三角形，生長中的芽為箭形，且葉長寬比值大，葉片狹長，在距離係數為 1.21 時，可再分出子群 A 及子群 B。

第 2 群子群 A 之品種（系）葉色較淡、葉緣為牙狀鋸齒，葉尖多為短尾狀，

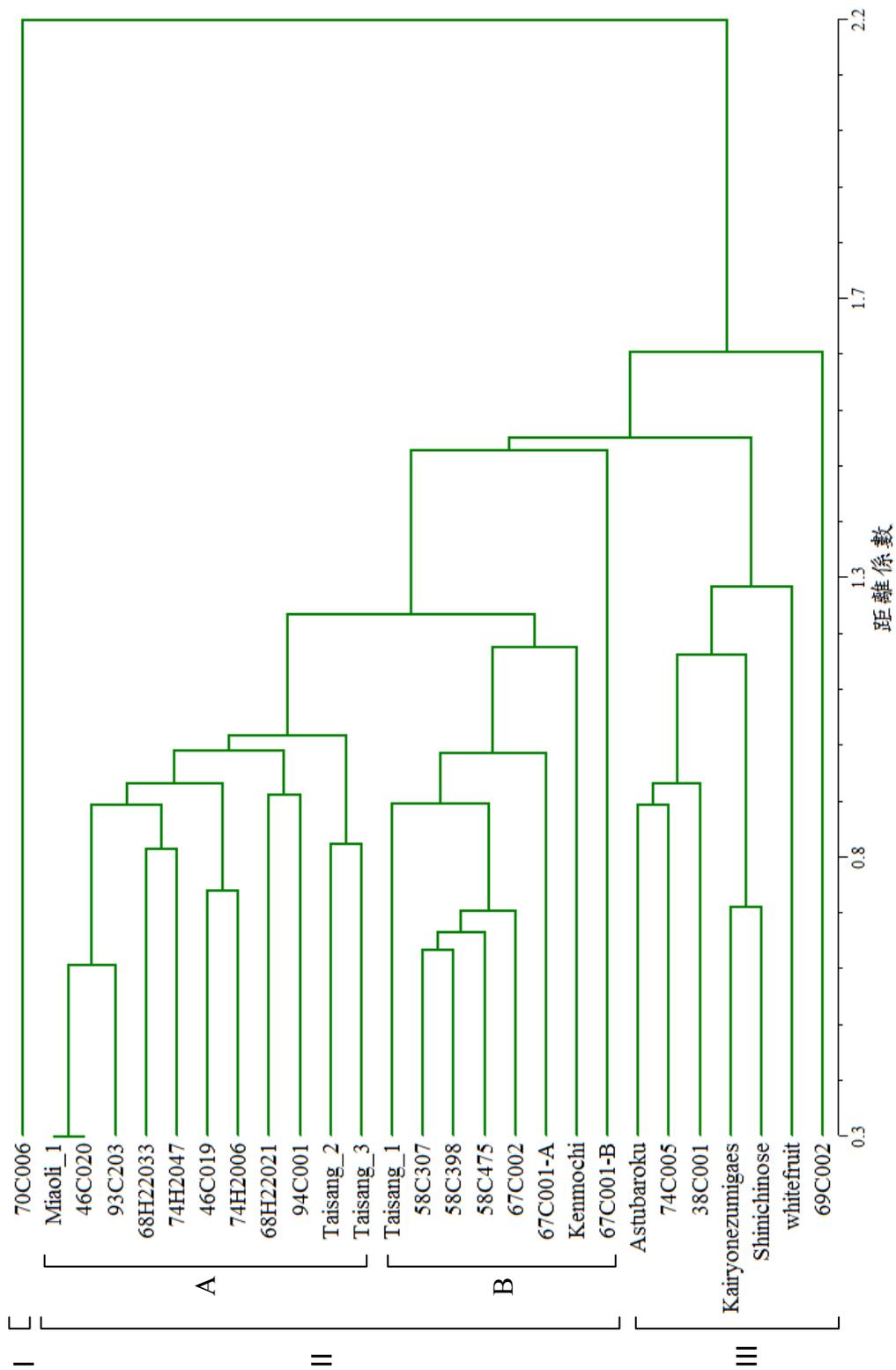


圖 2.1. 臺灣桑樹種原中，26 個參試品種（系）以 21 個營養性狀經群集分析(UPGMA)之聚樹狀圖
Fig. 2.1. Dendrogram of the 26 mulberry accessions revealed by UPGMA clustering analysis based on 21 vegetative characters. Dissimilarity calculated by Euclidean distance coefficient.

廣東桑‘46C019’、‘46C020’及‘苗栗 1 號’，未鑑定桑‘93C203’、‘94C001’及雜交桑‘68H₂₂021’、‘68H₂₂033’、‘74H₂006’、‘74H₂047’、‘台桑 2 號’及‘台桑 3 號’皆具備此特徵。第 2 群 subgroup B 的桑樹品種（系）成熟葉色較深、葉尖多為尾狀或長尾狀。其中山桑‘劍持’在距離係數為 1.15 時獨立分為一個分支，‘劍持’為雌株，其葉片常具二裂，具深休眠性（516 CU），與島桑和臺灣桑略有差異。子群 B 中不具休眠性（0 CU）的島桑及臺灣桑，則在距離係數為 0.7 時約略可分出。

第 3 群的白桑及魯桑，共同特徵為休眠芽形為正三角形，生長中的芽呈簇狀，葉片長寬比值小，葉片較圓，葉基多為淺彎至深彎，葉尖為鈍頭或尖頭，休眠性較深（492 - 516 CU）。在距離係數 1.66 即分出白桑‘69C002’（枝垂桑），枝垂桑（*M. alba* var. *pendula*）具備第 3 群之共同性狀，但其葉片較白桑及魯桑為小，葉柄細，一年生枝條顏色為偏紅的黃褐色，枝垂桑之性狀與其餘白桑品種（系）仍有較大的歧異度。其餘白桑及魯桑品種（系），在距離係數為 1.14 時可區分，魯桑葉片厚，葉緣呈鈍鋸齒，葉基呈深彎。

本試驗所記錄之 21 個營養性狀的資料經主成份分析後，前四個主成份具有 62.80% 的變異解釋能力（表 2.3），第一主成份可解釋的變異量為 25.2%，其中絕對值較大的性狀及其特徵向量值如下：休眠芽形為長三角形（-0.9285）、休眠芽形為正三角形者（0.8278）、生長中芽形為箭形（-0.8182）、生長中芽形為簇形（0.8182）、葉尖為短（0.8039）、葉柄長（0.7324）、葉寬（0.6879）及葉柄寬（0.6694）等。以上性狀在第一主成份即表現出不同的形態傾向，一為休眠芽形為長三角形、生長中芽形為箭形，葉柄較短且細、葉片較狹長的群體，山桑、廣東桑、島桑及臺灣桑屬之；另一為休眠芽形為正三角形、生長中芽形為簇形，葉柄較長且粗，葉片較寬的群體，魯桑及白桑屬之。

第二主成份可解釋變異量為 15.47%，其絕對值較大的性狀及其特徵向量值如下：節間長（0.6682）、葉尖為長尾狀（0.617）、葉色為深綠色（0.6054）、休眠需冷量（-0.5907）、休眠芽形為卵形銳角（0.5838）、葉緣為細鋸齒（0.5838）、

表 2.3. 桑樹參試品種（系）前四主成份之特徵值、變異數百分比、累計百分比及特徵向量

Table 2.3. Eigenvalues, percentage of variability, percentage of accumulated variability, and eigen vectors for the first four principal components among evaluated mulberry accessions.

	PC1	PC2	PC3	PC4
Eigen	10.3323	6.3413	6.0836	2.9903
變異數(%)	25.2008	15.4666	14.8382	7.2935
累積變異數 (%)	25.2008	40.6674	55.5055	62.7990
葉長	0.6382	0.5565	0.0411	0.2293
葉寬	0.6879	0.3362	-0.1338	0.3129
葉長寬比	-0.4318	0.2415	0.5352	-0.2346
葉柄長	0.7324	-0.0676	0.2156	-0.3369
葉柄寬	0.6694	0.4845	-0.2125	0.2216
葉柄長寬比	0.3039	-0.4254	0.3511	-0.5255
葉身葉柄長比	-0.3098	0.4442	-0.1332	0.5310
葉片厚度	0.5637	0.3949	0.2425	-0.0169
節間長	0.0574	0.6682	0.0838	-0.0426
需冷量	0.3193	-0.5907	0.4849	0.3393
休眠芽形				
正三角形	0.8278	-0.3404	-0.2428	0.0552
長三角度	-0.9285	0.0958	-0.0436	-0.0735
卵形銳角	0.3162	0.5838	0.6958	0.0500
生長中芽形				
箭形	-0.8182	0.4718	0.1703	0.0770
簇形	0.8182	-0.4718	-0.1703	-0.0770
新芽顏色				
綠色	0.5690	-0.1083	-0.0367	0.0085
偏紅色	0.0064	-0.2154	-0.1357	0.4441
偏紫色	-0.3557	0.1021	0.0321	-0.3643
葉片缺刻				
綠色	0.1603	-0.0381	-0.1094	0.0777
葉色				
綠色	-0.3473	-0.4024	0.7797	0.1292
深綠色	0.4450	0.6054	-0.4934	-0.0728
葉形				
橢圓形	-0.4561	0.0548	-0.5874	0.2659
心臟形	0.6167	-0.0674	0.4778	-0.3188
鈍頭及尖頭	0.8039	-0.4461	-0.1221	-0.1803
葉尖				
短尾狀	-0.5887	-0.4128	0.3645	0.3811
中長尾狀	-0.2757	0.5225	-0.5146	-0.4171
長尾狀	0.3022	0.6170	0.3634	0.2611
葉基				
直線形	-0.3061	0.4052	0.2522	-0.5422
淺彎形	-0.0813	-0.2232	-0.1756	0.6347
深彎形	0.5877	-0.2550	-0.1006	-0.1903
葉緣				
細鋸齒	0.3162	0.5838	0.6958	0.0500
牙狀鋸齒	-0.3205	0.5268	-0.4976	-0.1748
圓鋸齒	-0.4894	-0.5043	0.5061	0.0298
乳頭狀鋸齒	0.6495	-0.1214	-0.2374	-0.0867
鈍鋸齒	0.3478	-0.2165	-0.1874	0.2417
灰色	-0.1059	0.1177	-0.2013	0.0035
一年生枝條顏色				
黃褐色	-0.3162	-0.5838	-0.6958	-0.0500
黑褐色	-0.0367	-0.2502	0.6951	-0.0373
灰色	-0.4955	-0.2116	0.1210	-0.0923
主莖色				
褐色	0.0052	-0.2245	-0.6055	-0.2815
黑褐色	0.5929	0.1590	0.2567	0.2220

一年生枝條顏色為黃褐色 (-0.5838) 及葉長 (0.5565)。第二主成份中，可見一傾向為葉片較長，葉尖長尾狀，節間長，休眠需冷量少，或休眠芽形呈卵形銳角、葉色較深綠、葉緣細鋸齒、一年生枝條顏色黃褐色的性狀，另一群則為葉片短、節間短，休眠需冷量多者。第二主成份開始可將桑樹品種 (系) 區分出種，一為長果桑，以葉尖為長尾狀、休眠芽形為卵形銳角，葉緣為細鋸齒，節間長、葉片長、葉色深綠為特徵，而休眠需冷量較深者為廣東桑、魯桑及白桑，另外，島桑、臺灣桑的休眠需冷量淺，且葉色較深為其特色。

第三主成份可解釋的變異量為 14.84%，其絕對值較大的性狀及其特徵向量如下：葉色為綠色者 (0.7797)、休眠芽形為卵形銳角 (0.6958)、葉緣為細鋸齒 (0.6958)、一年生枝條顏色為黃褐色者 (-0.6958)、一年生枝條顏色為黑褐色 (0.6951)、主莖色為褐色 (-0.6055)、葉形為橢圓形者 (-0.5874) 及葉長寬比 (0.5352)。形態分為二傾向，一為葉長寬為 1.5 以上者，或葉色為綠、葉緣為細鋸齒、休眠芽形為卵形銳角、一年生枝條顏色為黑褐色；而另一為葉長寬比小於 1.4，或葉形為橢圓形，一年生枝條顏色為黃褐色者，主莖色為褐色者。

第四主成份可解釋的變異量為 7.29%，其絕對值較大的性狀及其特徵向量，依絕對值較大者排列如下：葉基為淺彎形 (0.6347)、葉基為直線形 (-0.5422)、葉身長/葉柄長 (0.5310)、葉柄長寬 (-0.5255)。在第四主成份中，呈現葉身長葉柄長比值大，葉柄長寬較小，葉基為淺彎形，另一傾向為葉身長葉柄長比值小，葉柄長寬比值大及葉基為直線形。

從前三主成份作圖，顯示主成份的結果與群集分析結果相似，可略將桑樹區分為三大群，第 1 群的長果桑、第 2 群則包含有廣東桑、山桑、臺灣桑和島桑及第 3 群的魯桑及白桑，其中第 2 群可再細分為 2 子群，一為包含廣東桑等品種 (系)，另一群則為山桑、島桑和臺灣桑 (圖 2.2)。

依據前四個主成份之可解釋變量值及不同性狀的特徵向量值之間的相關性 (表 2.3)，可挑選出影響力較大的葉寬、葉長葉寬比、葉柄寬、葉色、葉緣、葉

- | | | |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| ● 長果桑 <i>M. laevigata</i> | ● 臺灣桑 <i>M. formosensis</i> | ○ 雜交桑 <i>Morus spp.</i> |
| 1. 70C006 | 9. 58C475 | 19. 68H ₂₂ 021 |
| ● 廣東桑 <i>M. atropurpurea</i> | 10. 58C398 | 20. 68H ₂₂ 033 |
| 2. 苗栗 1 號 | 11. 67C002 | 21. 74H ₂ 006 |
| 3. 46C019 | ● 魯桑 <i>M. latifolia</i> | 22. 74H ₂ 047 |
| 4. 46C020 | 12. 厚葉綠 | 23. 台桑二號 |
| ● 島桑 <i>M. australis</i> | 13. 雲龍桑 | 24. 台桑三號 |
| 5. 台桑一號 | 14. 湖喜 | |
| 6. 58C307 | ● 山桑 <i>M. bombycis</i> | ○ 未鑑定桑 <i>Morus spp.</i> |
| 7. 67C001-A | 15. 劍持 | 25. 白果桑 |
| 8. 67C001-B | ● 白桑 <i>M. alba</i> | 26. 93C203 |
| | 16. 改良鼠返 | 27. 94C001 |
| | 17. 新一之瀨 | |
| | 18. 枝垂桑 | |

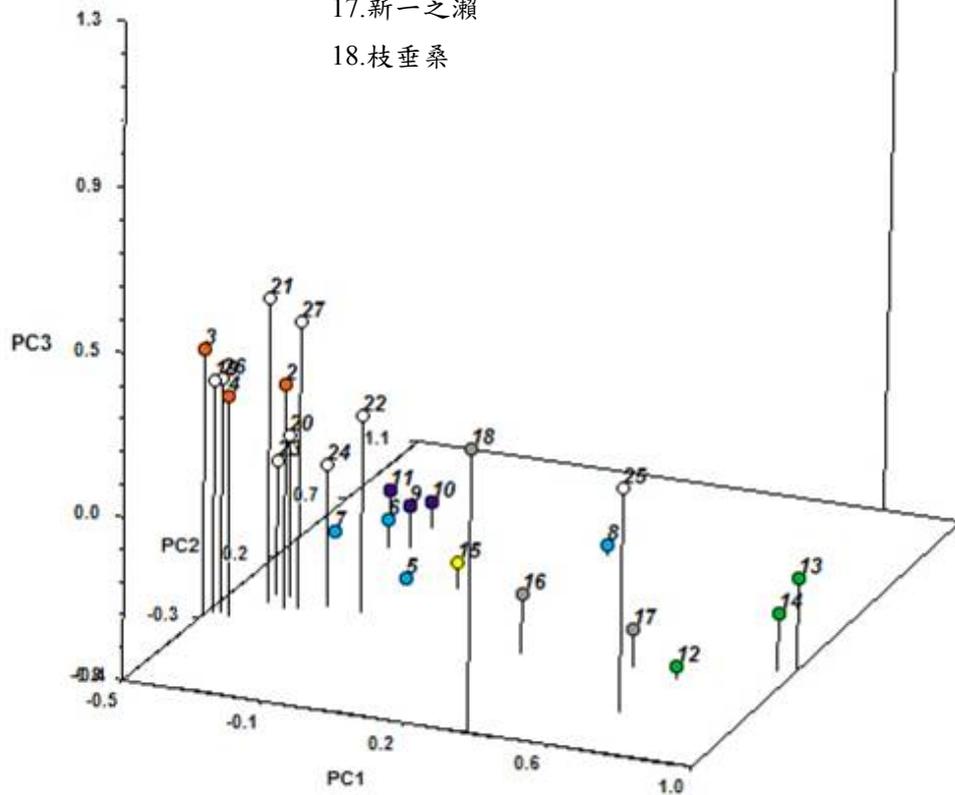


圖 2.2. 臺灣桑樹種原中，26 個參試品種（系）以 21 個營養性狀經主成份分析之立體圖

Fig. 2.2. Ordination of the 26 mulberry accessions in Taiwan determined by the first three principal component axes on the basis of 21 vegetative characters.

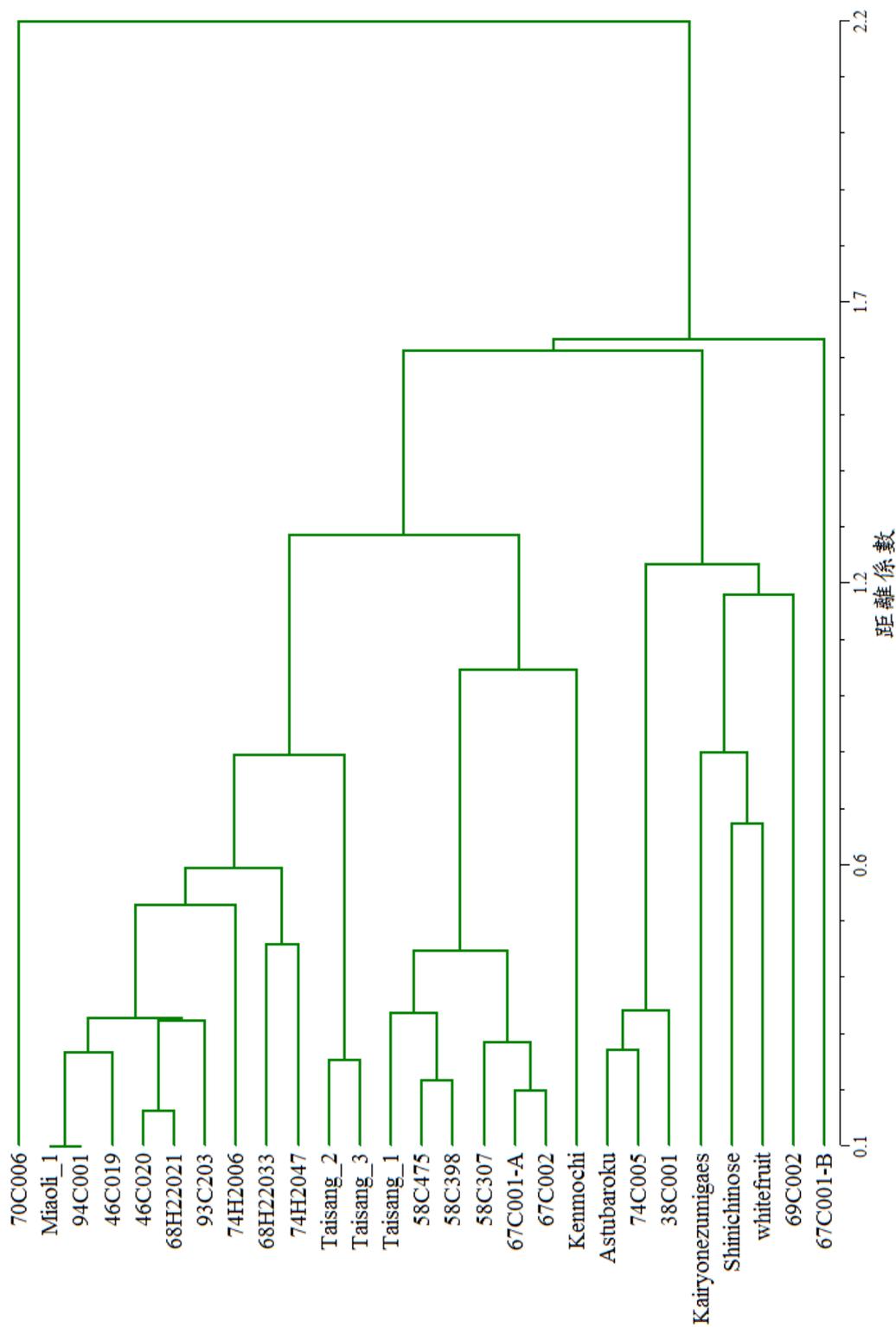


圖 2.3. 臺灣桑樹種原中，26 個參試品種（系）以 9 個營養性狀經群集分析(UPGMA)之聚樹狀圖
Fig. 2.3. Dendrogram of the 26 mulberry accessions revealed by UPGMA clustering analysis based on 9 vegetative characters. Dissimilarity calculated by Euclidean distance coefficient.

尖、休眠芽形、生長中芽形及休眠需冷量等 9 個性狀，重新進行群集分析，得到相似的群集結果，顯示此 9 個性狀確實在分類上有重要的意義（圖 2.4）。

臺灣桑和島桑之關係較近，在群集分析中歸類在同一大群中，魯桑及白桑之性狀較為相似，群集歸在同一群內。為方便日後鑑別，本試驗最後利用上述之 9 個分類性狀並參照各性狀在各主成份之特徵向量值，比較在分類上之比重，整理出臺灣桑樹適用之檢索表（表 2.4）。

2.4.2 桑樹株性及雌花花柱長

受試品種（系）中，雄株包含有白桑‘改良鼠返’，魯桑‘厚葉綠’、‘74C005’（雲龍桑）及‘38C001’（湖喜）、島桑‘台桑 1 號’及‘67C001-B’，雜交桑‘台桑 3 號。雌株為長果桑‘70C006’，廣東桑‘46C019’、‘46C020’及‘苗栗 1 號’，山桑‘劍持’，島桑‘58C307’、‘67C001-A’，臺灣桑‘58C398’、‘58C475’及‘67C002’，雜交桑‘68H₂₂021’、‘74H₂006’、‘74H₂047’及‘台桑 2 號’，白桑‘69C002’（枝垂桑），未鑑定桑‘93C203’、‘94C001’及‘白果桑’。兩性株則有白桑‘新一の瀨’、未鑑定桑‘68H₂₂033’。

本試驗各品種（系）內的雌花花柱長表現一致且性狀穩定，但同種內不同品種（系）的雌花花柱長並不一致（表 2.5）。臺灣桑、島桑、山桑之花柱長範圍為 0.35 - 0.70 公釐，屬長花柱。無花柱之長果桑及白桑之花柱長為 0.08 - 0.23 公釐，而廣東桑花柱長範圍為 0.32 - 0.83 公釐，種內變異大。

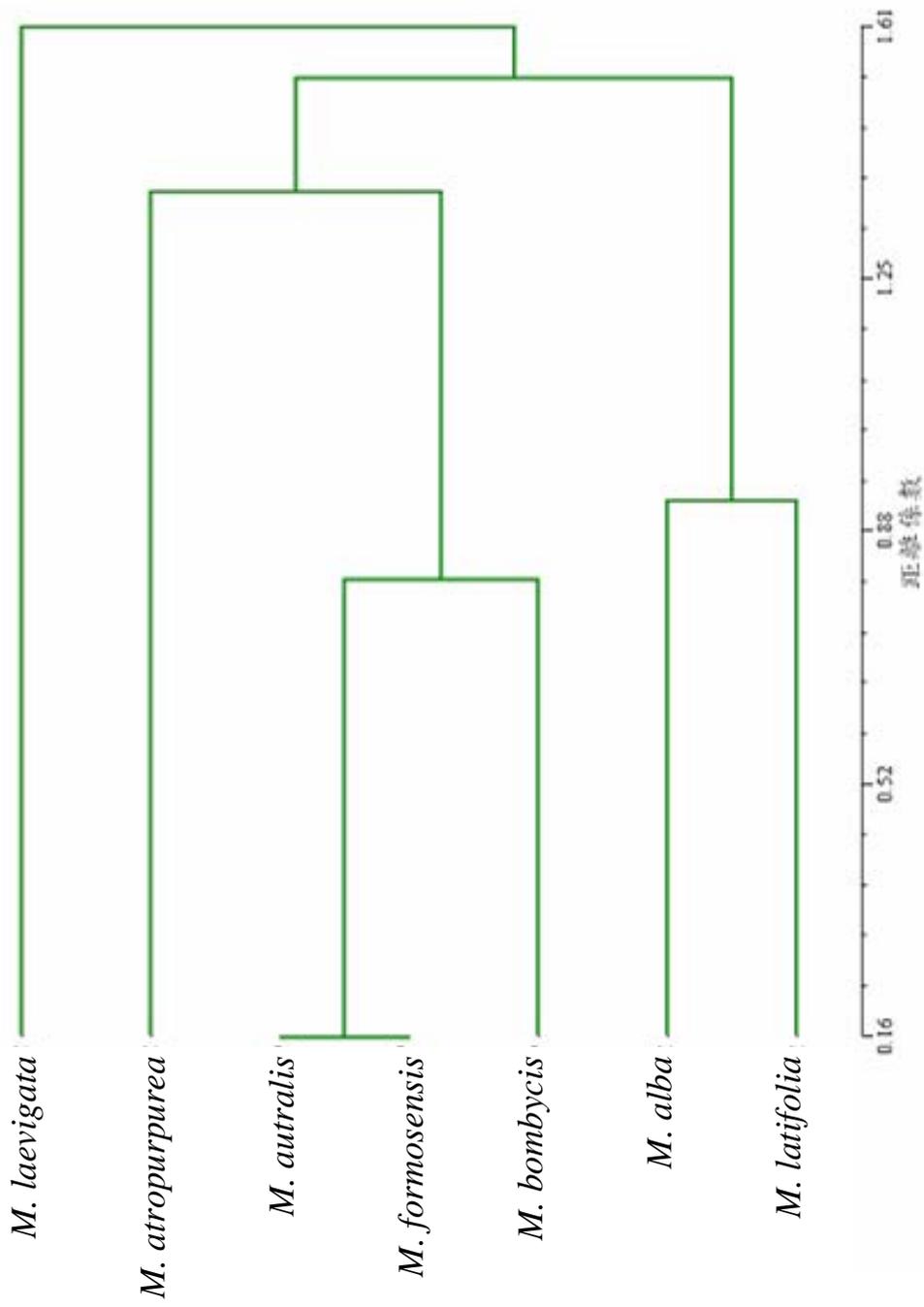


圖 2.4. 臺灣桑樹 7 個種以 9 個營養性狀經群集分析(UPGMA)之聚類樹狀圖

Fig. 2.4. Dendrogram of the 7 mulberry species in Taiwan revealed by UPGMA clustering analysis based on 9 vegetative characters. Dissimilarity calculated by Euclidean distance coefficient.

表 2.4. 臺灣桑樹營養性狀檢索表

Table 2.4. A Key to species of *Morus spp.* in Taiwan, using the vegetative characters as identification traits.

- A. 休眠芽形為卵形銳角，生長中芽形為箭形，葉柄寬葉緣為細鋸齒，葉片長寬比值大於 1.4，葉片較寬，葉尖為長尾狀，葉色為深綠，休眠需冷量多。
……………長果桑 (*M. laevigata*)
- AA. 休眠芽形為長三角形，生長中芽形為箭形，葉片長寬比值大於 1.4，葉片狹長。
B. 葉色較淡、葉緣為牙狀鋸齒，葉尖多為短尾狀，休眠需冷量中等。
……………廣東桑 (*M. atropurpurea*)
- BB. 葉色較深，葉緣亦為牙狀鋸齒，葉尖多為尾狀或長尾狀。
C. 休眠需冷量多
……………山桑 (*M. bombycis*)
- CC. 不具休眠性，為常綠
D. 新芽顏色為綠色
……………島桑 (*M. australis*)
- DD. 新芽顏色帶紅色至紫色
……………臺灣桑 (*M. formosensis*)
- AAA. 休眠芽形為正三角形，生長中芽形為簇形，葉片長寬比值小於 1.4，葉片較圓，葉尖為尖頭狀或鈍頭，休眠需冷量多。
E. 葉緣為圓鋸齒，葉基呈淺灣或深灣，葉片較薄
……………白桑 (*M. alba*)
- EE. 葉緣為鈍鋸齒，葉基為深灣，葉片較厚
……………魯桑 (*M. latifolia*)

表 2.5.臺灣桑樹中，11 個雌株品種（系）及 1 個兩性株品種（系）之花柱長
Table 2.5. Mean style lengths of 11 female and 1 bisexual mulberry accession in Taiwan.

種 species	品種（系） accession	花柱長(mm) Style lengths		種內平均花柱長(mm) Style lengths of species	
		Mean	SD	Mean	SD
島桑	58C307	0.70	0.06	0.66	0.08
	67C001-A	0.62	0.09		
山桑	劍持	0.58	0.04	-	-
廣東桑	46C019	0.32	0.05	0.56	0.22
	46C020	0.53	0.06		
	苗栗 1 號	0.83	0.07		
臺灣桑	58C398	0.54	0.03	0.42	0.10
	58C475	0.35	0.06		
	67C002	0.38	0.04		
長果桑	長果桑	0.11	0.03	-	-
白桑	69C002 (枝垂桑)	0.08	0.01	0.15	0.11
	新一の瀨	0.23	0.10		

註一：從苗栗改良場之桑樹種原中，11 個雌株品種（系）及 1 個兩性株品種（系）挑選三株生長勢相近的植株，每株隨機選擇十二個花穗樣本，調查花穗中間十個小花之花柱長平均值

Mean style length of 10 flowers from the middle section of the random selecting 12 spikes per tree. 3 vigorous individuals of 11 female accessions and 1 bisexual accession are selected at mulberry germplasm, MDARES.

2.5 討論

2.5.1 臺灣桑樹種原之遺傳歧異性

桑樹屬風媒花之多年生異交作物，各品種(系)基因型的遺傳歧異度大(Sharma *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, Vijayan *et al.*, 2004)，又桑分佈廣泛，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)。Zhao 等人(2008)以 ISSR 分子標記調查分散中國各地的種原，發現在長期栽培及選拔下，桑樹之基因型在不同地區有歧異度，地區內的基因型變異小，在印度也有類似的觀察結果(Vijayan *et al.*, 2006)。此外，桑樹自古即做飼蠶之用，許多桑樹在天擇或人擇的情況下選拔出，經人類活動被帶至不同地區，可能與當地野桑雜交，產生新的遺傳組合，使得桑之遺傳背景更形複雜(吳, 1977; 曾和吳, 1982; Dandin, 1998)。臺灣桑樹雖可按前人研究分為 7 個種，而種原經長年雜交、選拔已成一龐大族群(張, 2006)。利用本試驗之大量性狀資料的分析策略，應可建立更明確的分類系統。

本研究中所使用的長果桑(*M. laevigata*) '70C006' 在營養形態上較為特別，群集分析和主成份分析皆顯示與其他種明顯不同，獨立於外。多位學者亦以 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)、RAPD (Random amplified polymorphic DNA)、ISSR (inter-simple sequence repeats) 和 SSR (simple sequence repeats) 等分子標誌進行歧異度分析，結果顯示長果桑與白桑、魯桑等其他栽培種，在基因型上歧異度大(Sharma *et al.*, 2000; Awasthi *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007)。長果桑源自中國西南及喜馬拉雅山區一帶(Sharma *et al.*, 2000; Awasthi *et al.*, 2004)，推測地理隔離(geographical isolation)可能為造成差異的原因之一；此外，也因其不稔(張, 2006)，不易與其他種基因重組(gene recombination)，是造成與其他品種(系)歧異度較大的另一主要原因。

第 2 群中的山桑、島桑、臺灣桑及廣東桑的形態相似，再依葉色及葉尖性狀可再分出兩大群。臺灣桑為臺灣特有種，營養形態與島桑極相似，在群集分析和

主成份分析亦將臺灣桑和島桑分在同一群集內，推測臺灣桑可能是從島桑衍生而得的新種，或為島桑的變種。本試驗以群集分析和主成份分析，將山桑和島桑分在同群集內，其它學者以分子標記進歧異度分析的研究中，亦得相同結果

(Sharma *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2007)，外表型分析與分子標記分析的結果可互相對應，但分子標記分析需要經 DNA 萃取、純化、及 PCR 反應後才可分析得知其差異，而外表型分析可直接從形態的相似性建立種原歧異度，在田間即見不同種的性狀差異，且外表型是基因型及環境交互影響之結果 (Johannsen, 1926)，在育種選拔的過程，外表型更具參考價值。

傳統桑樹分類上，白桑和廣東桑常視為同種異名 (synonym)，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 及 Gilbert (2003) 認為在中國的白桑與廣東桑為同種，此二者樹皮均為灰色，葉為綠色、卵形，葉基為淺彎至深彎，葉尖為短尖或鈍頭狀，葉緣牙狀鋸齒或圓鋸齒，雌花穗短，無花柱且具休眠性，亦有部份分子標記分析支持此觀點 (Sharma *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2007)。

但張 (2006b) 曾提及臺灣桑樹種原中，廣東桑與白桑仍有所不同，廣東桑屬無花柱群，其葉尖為中或短，葉面平滑，花穗多、小花數多而呈圓筒狀，白桑亦為無花柱群，其葉尖短，葉基淺或深彎。本試驗調查結果可見臺灣現存的廣東桑與白桑差異很大，廣東桑之雌花柱長度為 0.3 - 0.8 公釐，並非為典型的「無花柱」群，而營養性狀又與山桑、島桑及臺灣桑較相似，如休眠芽形為長三角形，生長中芽形為箭形，葉片長寬比值大於 1.4，葉基為淺彎，葉尖為短尾狀，葉緣為牙狀鋸齒，休眠需冷量為 216 - 420 CU，而白桑休眠芽形為正三角形，生長中芽形為簇形，葉片長寬比值小於 1.4，葉基為淺彎，葉尖為尖頭或鈍頭狀，葉緣為圓鋸齒，葉片薄，休眠需冷量為 516 CU，廣東桑與白桑間形態差異頗大。由於廣東桑係自 1911 年引入臺灣 (蠶蜂場場誌編纂委員會, 1997)，推測當時引入的品系，可能與其它廣東桑及白桑即有明顯差異，造成不同的結果，此外，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），之前已與島桑、臺灣桑等在來種行基因重組，使得參試的廣東桑品種（系）營養形態更近似於島桑。

雜交桑‘台桑 3 號’係以島桑‘44C005’為母本、廣東桑‘46C020’為父本雜交而得（蠶蜂場場誌編纂委員會, 1997），但其營養形態與廣東桑相似，‘台桑 2 號’則是島桑‘44C005’為母本，未鑑定桑‘46C022’為父本而得，而其營養形態亦與廣東桑相似，因此‘46C022’應為廣東桑系，使得子代才具有此類特徵，從群集分析的結果來看，雖與多數廣東桑群集在同一大分支中，但仍獨立分出一小分支，可知存在歧異度。‘68H₂₂021’及‘68H₂₂033’之母本為廣東桑‘46C019’，父本為‘46C022’，而‘74H₂006’和‘74H₂047’則是廣東桑‘46C019’與父本‘台桑 3 號’之雜交子代，形態上承襲親本的特徵，歸類於廣東桑系。

本試驗結果將白桑和魯桑歸為同群，其它學者以分子標誌分析亦顯示此二者之基因型較相近（Sharma *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2007），與山桑、島桑及長果桑較遠。魯桑葉質厚，葉緣多呈鈍鋸齒，葉基呈深彎，白桑葉質薄，葉緣多為圓鋸齒，葉基為淺彎至深彎，可自營養性狀區分出白桑及魯桑。白桑‘69C002’（枝垂桑）（*M. alba* var. *pendula*），具有休眠芽形為正三角形，生長中的芽呈簇狀，葉片長寬比值小，葉片較圓，葉基多為淺彎至深彎，葉尖為鈍頭或尖頭，休眠性較深等白桑共同性狀，其他特徵與白桑其他品種（系）相比變異較大，符合群集分析或主成份分析結果。未鑑定桑‘白果桑’葉片較薄，葉緣為圓鋸齒，可歸類在白桑。

2.5.2 主要代表性狀

桑樹多為雌雄異株，傳統上以雌花性狀為分類依據（小泉, 1917; 張, 2006），依花柱長度將桑分為長花柱及無花柱兩群，以 0.5 公釐為界。本試驗田間調查結果顯示（表 2.5）花柱長的性狀不穩定，白桑及魯桑、長果桑的花柱長度約 0.08 - 0.2 公釐，為無花柱一類，而山桑、島桑及臺灣桑為長花柱，花柱長為 0.35 - 0.70 公釐，並不完全大於 0.5 公釐。原本歸類於短花柱的廣東桑，花柱長度為 0.3 - 0.8 公

釐，變異大且平均長度大於 0.5 公釐，應類歸於長花柱一群。Katsumata (1982) 以長花柱的八丈桑 (*M. kagayamae*) 與短花柱的白桑 (*M. alba*) 進行雜交，從子代的表現，他認為長花柱性狀對短花柱為不完全顯性，不適用以此單一性狀鑑別雜交種，或做為分類依據。

在傳統植物分類中，營養性狀與生殖性狀皆為分類的重要依據，特別是在研究較低級類群的分類時，營養器官的性狀常常更有價值(徐, 1996)，在小泉(1917)之前的研究學者 (Bureau, 1855; Linné, 1753)，也曾描述各種之間葉片、枝條顏色等性狀的差異。本試驗以營養性狀分析的結果，與花柱長之分群互相對照，兩個分群結果完全一致，廣東桑與山桑、島桑及臺灣桑為同一群，皆為長花柱，而短花柱的白桑、魯桑及長果桑則歸在親緣相近的一群，顯示可直接以營養性狀進行桑樹分類，不受限於株性。本試驗利用 21 個營養性狀，將臺灣的桑樹依性狀的相似度分為三大群，分類之架構與舊有系統相仿。

舊有分類系統的檢索表，僅以雌花 (Bureau, 1873; 小泉, 1917; 張, 2006b)，或是分為雄株及雌株，各以雄花或雌花的特徵為主要區別性狀 (Zhou and Gilbert, 2003)，但必須待桑樹開花，才能從雌花或雄花進行分類，不利於田間直接使用。本試驗利用主成份分析，從主成份與各性狀的相關性，選取出 9 個分類權重大的營養性狀做出檢索表，可不受限於株性，即便植株未開花，仍可直接以營養性狀進行分類，應用範圍廣且使用更為方便。

9 個營養性狀中，4 個為數量性狀、5 個為分級性狀；針對數量性狀，徐 (1996) 曾提及將數據進行比值的轉換如葉片長寬比，比直接量測的絕對數值穩定，其它數量性狀可能因環境氣候而有所變異，仍可提供排序或是相對指標做為參考，其它分級性狀穩定，則可直接以肉眼辨別。在本試驗中，首次將桑樹之休眠需冷量以數量化估算，舊有分類僅描述植株具有休眠性，或是將休眠期長短略分為深、淺二類或萌芽期早、中晚等 (Bureau, 1873; 南澤, 1976a; Zhou and Gilbert, 2003; 張, 2006b)，未有詳細說明。本試驗將休眠需冷量數據化，結果顯示引自中國的長果

桑 (480 CU)，和來自日本的白桑 (516 CU)、魯桑 (492 - 516 CU) 及山桑 (516 CU) 之休眠性為深，而臺灣在地種，如島桑及臺灣桑 (0 CU)，則為終年常綠，少數雜交桑亦為常綠，廣東桑休眠需冷量介於兩者 (216 - 420 CU) (附錄一附表二)，休眠需冷量為品系 (種) 的固定特性，在不同種原間需冷量差異大，與其他主要代表性狀可共同將桑樹分類。

2.6 結論

經由調查 26 個桑樹品種 (系) 之 21 個營養性狀，並利用主成份分析及群集分析後，可將其分為三大群，包含 (一) 長果桑、(二) 廣東桑、山桑、島桑及臺灣桑、(三) 白桑、魯桑，第二群可再細分為廣東桑一小群，山桑、島桑及臺灣桑為另一小群，群內親緣關係接近。廣東桑常視為白桑之異名同種，但本試驗所使用之廣東桑品種 (系) 形態與山桑、島桑及臺灣桑較接近，且雌花具長花柱，與短花柱的白桑差異明顯。對照 21 個營養性狀與主成份分析結果，選出葉寬、葉長葉寬比、葉柄寬、休眠需冷量、生長中芽形、休眠芽形、葉色、葉緣及葉尖等 9 個分類權重大的性狀，並做出不受限於株性的檢索表，可供田間直接鑑別分類使用。

2.7 參考文獻

- 王仁助. 2003. 桑樹機能性成份簡介. 農業世界 242:34-39.
- 吳登楨. 1977. 桑樹之品種改良. 科學農業 25:242-244.
- 林志忠. 1999. 桑科. p.46. 刊於：楊遠波、劉和義、呂勝由編著. 臺灣維管束植物簡誌. 第二卷. 行政院農委會出版. 臺北市.
- 徐克學. 1996. 數量分類學. 水產出版社. 基隆市.
- 翁儷倩. 2001. 桶柑遺傳歧異性之分析. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 張哲嘉. 2006. 臺灣桑樹之分類及品種改良. 臺灣園藝 52:377-392.
- 陳彩雲、蕭寧馨、楊雯如、林宗賢. 2004. 臺灣水果抗氧化能力之研究. 中國園藝 50: 592(摘要).
- 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.
- 歐錫坤、陳琦玲. 2000. 臺灣本地桃樹的需冷量評估與模式開發. 中國園藝 46:337-350.
- 盧英權. 1984. 栽桑學. 國立編譯館.
- 蠶蜂業改良場場誌編纂委員會. 1997. 臺灣省蠶蜂業改良場場誌. p.89-90. 蠶業改良場出版. 苗栗.
- 小泉源一. 1917. 桑屬植物考. 蠶試報 3:1.
- 南澤吉三郎. 1976. 栽桑學. p.127-129. 鳳鳴社. 東京. 日本.
- 堀田禎吉. 1954. 桑樹分類之研究. 京都工藝纖維大學出版. 京都. 日本.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 141:399-436.
- Asano, N., E. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu, and K. Matsui. 1994. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. Carbohydr. Res. 259:243-255.
- Bureau, E. 1873. Moraceae, p.211-288. In: A. DeCandolle (ed.). Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. Vol. 17. Paris, France.
- Chang, J.-C. 2008. 'Miaoli No. 1' mulberry : A new cultivar for berry production. HortScience 43:1594-1595.
- Dandin, S. B. 1998. Mulberry: a versatile biosource in the service of mankind. Acta Sericologica Sinica 24:109-113.

- Dias, J. S., A. A. Monterio, and M. B. Lima. 1993. Numerical taxonomy of Portuguese Tronchuda cabbage and Galega kale landraces using morphological characters. *Euphytica* 69:51-68.
- Hirano, H. 1982. Varietal difference of leaf protein profiles in mulberry. *Phytochemistry* 21:1513-1518.
- Jia, Z., M. Tang, and J. Wu. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals. *Food Chem.* 64:555-559.
- Johannsen, W. 1926. *Elemente der exakten erblichkeitslehre*. G. Fischer, Jena, Germany.
- Katsumata, F. 1982. Inheritance of some of the traits in an interspecific hybrid between *Morus kagayamae* Koidz. and kairyonezumigaeshi (a form of *Morus alba* L.). *J. Sericult. Sci.* 51:381-388
- Kaufman, L. and P. J. Rosseeuw. 1990. *Finding groups in data: An introduction to cluster analysis*. Wiley, New York.
- Linné, C. 1753. *Morus*, p.968. In: C. Linné (ed.). *Species plantarum*. Vol. 2. Stockholm, Sweden.
- NIAS genebank. 2009a. The list of mulberry accession in germplasm. 28 Mar. 2009. <<http://www.gene.affrc.go.jp/ex-nises/mulberry/mulberryindex.html>>
- NIAS genebank. 2009b. The character index of mulberry resource. 28 Mar. 2009. <http://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant_search_char.php?type=99>
- Osuji, J. O., B. E. Okoli, D. Vuylsteke, and R. Ortiz. 1997. Multivariate pattern of quantitative trait variation in triploid banana and plantain cultivars. *Sci. Hort.* 71:197-202.
- Pereira-Lorenzo, S., J. Fernández-López, and J. Moreno-González. 1996. Variability and grouping of northwestern Spanish chestnut cultivars. I. morphological traits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:183-189.
- Pérez, S., S. Montes, and C. Mejia. 1993. Analysis of peach germplasm in Mexico. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118:519-524.
- Pérez-Gonzales, S. 1992. Associations among morphological and phonological characters representing apricot germplasm in central Mexico. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:486-490.
- Revilla, P. and W. F. Tracy. 1995. Morphological characterization and classification of open-pollinated sweet corn cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120:112-118.

- Richardson, E. A., S. D. Seely, and D. R. Walker. 1974. A model for estimating the completion of rest for 'Redhaven' and 'Elberta' peach trees. *HortScience* 9:331-332.
- Rincon, F., B. Johnson, J. Crossa, and S. Taba. 1997. Identifying subsets of maize accessions by three-mode principal component analysis. *Crop Sci.* 37:1936-1943.
- Roa, A. A. 2002. Conservation status of mulberry genetic resources in India. 7 Jun. 2009. < <http://www.fao.org/docrep/005/ad107e/ad107e0o.htm#TopOfPage>>
- Rohlf, F. J. 1997. NTSYS. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00. User guide. Setauket, New York.
- 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.
- Vavilov, N. I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Ronald Press, New York.
- 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.
- 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. Wang, T. Chen, G. Jia, X. Wang, J. Qi, Y. Pan, S. Wang, Z. 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.
- Zhou, Z. and M. G. Gilbert. 2003. Moraceae, p.21-73. In: Wu, P. H. Raven and D. Hong (eds.). *Flora of China* Vol. 5. Science Press, Beijing, China

2.8 Abstract

M. australis, *M. formosensis*, and a few species introduced from China and Japan were major genetic source in Taiwan mulberry germplasm. After the long-term breeding program, it had become a complex population. The classification system adopted for mulberry in Taiwan remains some uncertainty. Twenty-six mulberry accessions were selected from Miaoli District Agricultural Research and Extension Station (MDARES) and 21 morphological characters were evaluated in 2008. Data were used for principal component analysis and clustering analysis. Accessions were grouped into three major clusters: (1) *Morus laevigata*; (2) *M. atropurpurea*, *M. bombycis*, *M. australis* and *M. formosensis*; (3) *M. alba* and *M. latifolia*. Based on the result of principal component, 9 morphological characters including widths, leaf lengths : widths ratio, petiole widths, chilling requirement, bud shape, dormant bud shape, mature leaf color, shape of leaf margin and leaf tip, were chosen to present a new key to mulberry in Taiwan, which is suitable for all sex types. Among all the species in this study, *M. laevigata* was distinctive from the rest. *M. alba* and *M. latifolia* had a close relationship. *M. bombycis*, *M. australis* and *M. formosensis* had similar appearances and were clustered together. *M. atropurpurea*, often regarded as a synonym of *M. alba* but was distinct from morphological traits in the study, showed a close relation with *M. bombycis*, *M. australis* and *M. formosensis*.

Keyword: Principle component analysis, clustering analysis, representative trait, key

第三章 桑樹倍數體及 DNA 含量之鑑定

Chapter 3. Determining ploidy and DNA content in mulberry



第三章 桑樹倍數體及 DNA 含量之鑑定

3.1 摘要

桑樹形態變異大，但部份品系之外觀大於其化品系且不稔，疑為多倍體。為瞭解臺灣桑樹 (*Morus spp.*) 種原之倍體數，自苗栗區農業改良場，選出 26 個桑樹品種 (系)，取其幼葉製備細胞核懸浮液，以流式細胞儀進行分析。各樣本基因體以雞紅血球細胞核 (CEN, 2.5 pg) 為對照標準品，計算 DNA 含量。結果可大致分為兩類，山桑 (*M. bombycis*)、白桑 (*M. alba*)、魯桑 (*M. latifolia*)、島桑 (*M. australis*)、臺灣桑 (*M. formosensis*) 及廣東桑 (*M. atropurpurea*) 之 DNA 含量為 0.61-0.71 pg/2C，屬於二倍體。而 70C007 (*M. laevigata*) 為三倍體，DNA 含量為 1.06 pg/2C。特別的是，67C001 (*M. australis*) 觀察到基因組各為 0.63 pg/2C 的二倍體和 0.98 pg/2C 的三倍體株，形態上的差異係因倍體數不同造成。二倍體與三倍體品種 (系) 在葉寬、葉柄寬及節間長等營養性狀有顯著差異。本試驗結果可提供後續育種及其他研究之參考。

關鍵字：染色體數、多倍體、形態性狀、節間長

3.2 前言

桑樹 (*Morus spp.*) 為臺灣極具經濟價值的多年生木本，葉可飼蠶，果實供鮮食及加工之用，近年來陸續發現其根、枝條、葉片及果實中具機能性成份(王, 2003; 陳等人, 2004; Asano *et al.*, 1994)，使得桑樹及衍生產業備受矚目。桑樹多為雌雄異株，行異花授粉，形態變異大，但部份品種(系)之葉、枝條或果實等性狀皆大於其他品種(系)，且不稔或結實不良，疑有多倍體品種(系)存在(張, 2006)。

多倍體常在外觀形態、細胞組織及染色體等層次明顯不同，外觀上，多倍體桑樹葉片及枝條等性狀大於二倍體，細胞層次中，多倍體的體細胞與花粉母細胞較二倍體者大(關和押金, 1963)，保衛細胞之葉綠體數量亦會隨倍體數增加而增加(Sujathamma *et al.*, 2002)。染色體計數為確定物種倍體數的主要方式，Tahara (1910) 確認桑之染色體基數 $x = 14$ ，現已知大部份桑樹為 2 倍體，但亦有 3、4、6、8 倍體之品種(系)(儲和孫, 1986; 大澤, 1916; 關, 1959; Janaki-Ammal, 1948)，黑桑 (*M. nigra* L.) 中有 22 倍體品種(系)之記錄 ($2n = 308$) (吳, 1964)，可知桑屬植物的倍體數變化頗大，而分類於同種的桑樹品種(系)，倍體數可能不一致(儲和孫, 1986)。

傳統染色體觀測係使用植物根尖及頂芽等細胞分裂旺盛的植物細胞為材料，計算體細胞分裂中期之染色體數目。近年發展出流式細胞儀技術，可在流體狀態計數顆粒(細胞或核)的數目或其螢光染色之強度。將懸浮細胞核以螢光染劑(如 Propidium iodide 等)染色，偵測細胞核顆粒通過雷射光束後所被激發出螢光強度，由偵測器收集螢光訊號，經轉換成電子訊號後，利用軟體分析訊號，即可快速鑑定樣本 DNA 含量(Greilhuber, 1983; Michaelson *et al.*, 1991)。染色體數目與細胞核 DNA 含量有密切的正相關(Black and Beckman, 1983; Costich *et al.*, 1993)，可用於鑑定植物中的倍體數(De Laat *et al.*, 1987; Costich *et al.*, 1993; Ozias-Akins *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2002)。

臺灣桑樹之種類繁多，但有關其染色體數之研究闕如，本試驗以流式細胞分

析技術鑑別 26 個桑樹品種（系）之 DNA 含量，並以新一の瀨（ $2n = 28$ ）為桑樹之標準品種（系），估算倍體數，與形態資料進行對照，俾供育種工作參考。

3.3 材料與方法

3.3.1 試驗樣本的擇定

試驗材料取自苗栗區農業改良場，擇用品種（系）參考舊有分類系統（張, 2006），自臺灣桑樹七大系統，各種（species）挑選 1 至 3 個品種、雜交種 6 種及未鑑定桑 3 種，共 26 個品種（表 3.1）。每品種（系）皆有 1~3 株重複，每重複取二片新葉分析。狀況一致的葉片樣本可獲得一致的結果，預試驗中，取用最大展開葉、甫展開的新葉及尚包覆在芽上約三公分管長的新葉。觀察到三公分管長的新葉倍體數的狀況並不穩定，不適用以估算，而最大展開葉的葉片雖可讀到明顯的訊號峰，但是其訊號峰波幅較寬，而雜訊較多，Yamanouchi 等 (2008) 亦有觀察到類似情況。故以甫展開的新葉作為分析，可得到明顯且波幅較集中的訊號峰。取得樣品，置於 4°C 下保存並在 5 日內分析完畢。

3.3.2 細胞懸浮液製備

細胞懸浮液之製備參考 Galbraith 等人 (1983)。取樣時，每片新葉小心避開主葉脈及側葉脈，選擇葉片中段、面積約 0.79 cm^2 之葉圓片，加入 1 mL G-buffer (45 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mM sodium citrate, 20 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonate, 1% Triton-X 100, 及使用前方加入之 0.5% 2-mercaptoethanol)，以刮鬍刀片將葉片組織切碎，使細胞核懸浮於 G-buffer 中。細胞核懸浮液以 $30\text{ }\mu\text{m}$ 孔徑之尼龍濾網過濾後置於冰浴槽中備用。

3.3.2 基因體估算之標準液製備

於 1 mL G-buffer 中加入一滴雞紅血球細胞 (chicken erythrocyte nuclei, CEN, genome size = 2.5 pg, BioSure) 即完成。

3.3.3 樣品液及標準液之染色、配製

桑樹樣品的細胞懸浮液及標準品各加入 propidium iodide (50 µg/mL)及 RNase (10 µg/mL)，於 4°C 下處理約 1 小時後，即進行混合及分析。

所有桑樹品種（系）樣品之細胞懸浮液各取 240 µL，與 30 µL 雞紅血球標準品混合，作為估算各品種（系）基因體大小之樣品，即可進行分析。

3.3.4 流式細胞儀的分析設定

細胞核懸浮樣品係以 Epics Elite ESP 流式細胞儀 (Beckman Coulter Electronics, Hialeah, Florida) 分析，儀器之備有 15 mV 之 488 nm 氬離子雷射光束，樣品上機後，收集 600-640 nm 之螢光 (PMT4)，並調整激發之電壓，將樣品之訊號集中在 channel 的第二至第八格。每一組樣品混合液皆讀取 10000 個以上的懸浮核，且樣品結果的變異係數需小於百分之五。讀取後的結果以 WinMDI 2.9 (Flow Cytometry Core Facility, Scripps Research Institute; <http://facs.scripps.edu/software.html>) 編輯分析。

3.3.5 基因體及倍數體估算

桑樹基因體大小以下列公式估算：樣本的 DNA 含量 (pg/2C) = 2.500 pg/2C × 樣本螢光訊號的波峰值 ÷ CEN 螢光訊號的波峰值。

新一の瀨 (*M. alba*) 已知 $2n = 2X = 28$ ，故作為估算桑樹倍體數的參考品種（系）。先求各品種（系）與新一の瀨 DNA 含量之相對比例後，再計算其倍體數。相對比例 = 樣本平均 DNA 含量 (pg/2C) ÷ 新一の瀨的 DNA 含量 (pg/2C)；倍體數 = 2 × 相對比例。

3.3.6 統計分析

各種之 DNA 含量以 COSTAT ver. 6.2 (CoHort Software, USA) 進行最小顯著差異分析 (Least significant difference, LSD)，分析各種間是否有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。

3.3.7 性狀評估

為瞭解倍數體及性狀表現的關係，調查 26 個品種（系）的葉長、葉寬、葉柄長、葉柄寬、葉片厚度、節間長、休眠需冷量等七個營養性狀，依據倍體數的結果，區分為二倍體品種（系）及三倍體品種（系），以 t 檢測（Singh and Chaudhary, 1985）分析倍體數間性狀差異。

3.4 結果

3.4.1 基因體大小及倍體數分析

以 CEN (2.500 pg) 估算出白桑‘新一の瀨’ (*Morus alba*, $2n = 2X$) 之 DNA 含量為 0.655 pg/2C，再以 CEN 估算其餘品種（系）之 DNA 含量，估算結果另與‘新一の瀨’之 DNA 含量進行比較，推算其餘品種（系）之倍體數。參試品種（系）可分為兩類（表 3.1），一為長果桑‘70C006’（圖 3.1(A)）及島桑‘67C001-B’，DNA 含量各為 1.06 pg/2C 及 0.98 pg/2C，推測為三倍體。其餘品種（系）之 DNA 含量約 0.61-0.71 pg/2C，推測為二倍體，包含山桑‘劍持’，島桑‘67C001-A’、‘58C307’、‘台桑 1 號’，臺灣桑‘58C398’、‘58C495’、‘67C002’，廣東桑‘46C019’、‘46C020’、‘苗栗 1 號’，白桑‘改良鼠返’、‘新一の瀨’（圖 3.1(A)）、‘枝垂桑’，魯桑‘厚葉綠’、‘雲龍桑’、‘湖喜’，雜交桑‘台桑 2 號’、‘台桑 3 號’、‘68H₂₂021’、‘68H₂₂033’、‘74H₂006’、‘74H₂047’及未鑑定桑‘93C203’、‘94C001’、‘白果桑’。

將歸於同種之品種（系）DNA 含量數值，經平均後進行統計分析（表 3.1），魯桑及山桑平均 DNA 含量各為 0.670 pg/2C 及 0.660 pg/2C，略大於其他種的 0.632 ~ 0.647 pg/2C，魯桑、山桑與臺灣桑有顯著差異外，其餘種間差異不大。雜交桑‘74H₂006’、‘74H₂047’的雜交親本為‘46C019’與‘台桑 3 號’，子代的 DNA 含量介於兩親本間。此外，‘68H₂₂021’、‘68H₂₂033’亦為 46C019 的雜交子代，基因體大小與親本之間無顯著差異。

表 3.1、26 個桑樹品種（系）之倍數性、花性、收集來源、平均細胞核 DNA 含量

Table 3.1. The ploidy, species, sexuality, origins, mean DNA content and relative ratio of 26 *Morus spp.* accessions.

種 Species	品種（系） Accession	花性 Sex	來源 Origin	平均細胞核 DNA 含量 Mean DNA content (pg/2C nucleus)
3X				
長果桑 (<i>M. laevigata</i>)	70C006	♀	高雄岡山（疑自雲南）	1.058
島桑 (<i>M. australis</i>)	67C001-B (triploid)	♂	台南	0.979
2X *				
山桑 (<i>M. bombycis</i>)	劍持 (Kenmochi)	♀	日本	0.660^A
島桑 (<i>M. australis</i>)	67C001-A (diploid)	♀	台南	0.632
	58C307	♀	花蓮	0.650
	台桑 1 號 (Taisang No. 1)	♂	臺灣野桑	0.646
	Mean			0.642^B
臺灣桑 (<i>M. formosensis</i>)	58C398	♀	花蓮	0.642
	67C002	♀	苗栗	0.634
	58C495	♀	苗栗	0.625
	Mean			0.634^B
廣東桑 (<i>M. atropurpurea</i>)	46C020	♀	嘉義	0.664
	46C019	♀	台北	0.661
	72C002	♀	苗栗	0.617
	Mean			0.647^{AB}
白桑 (<i>M. alba</i>)	改良鼠返 (Kairyonezumigaeshi)	♂	日本	0.679
	新一の瀬 (Shinichinose)	♀	日本	0.655
	69C002	♀	日本	0.607
	Mean			0.647^{AB}
魯桑 (<i>M. latifolia</i>)	74C005	♂	日本	0.681
	厚葉綠 (Astubaroku)	♂	日本	0.677
	38C001	♂	日本	0.666
	Mean			0.675^A
雜交品種（系） Hybrids accessions	台桑 2 號 (Taisang No. 2)	♀	44C005 x 46C022	0.644
	台桑 3 號 (Taisang No. 3)	♂	44C005 x 46C020	0.649
	68H ₂₂ 021	♀	46C019 x 46C022	0.652
	68H ₂₂ 033	♀	46C019 x 46C022	0.659
	74H ₂ 006	♀	46C019 x Tai-sang No. 3	0.660
	74H ₂ 047	♀	46C019 x Tai-sang No. 3	0.645
未鑑定桑 Unknown species	白果桑	♀	澳洲	0.639
	93C203	♀	台南	0.607
	94C001	♀	彰化	0.711

*Nuclear DNA contents of 26 *Morus spp.* determined by flow cytometer of propidium iodide stained nuclei, using CEN as a standard.

*Means of diploid species with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

3.4.2 性狀評估

三倍體桑樹之部份形態，如葉長、葉寬、葉柄長、葉柄寬、葉片厚度及節間長大於二倍體品種（系），但葉片長度比值、葉長、葉柄長、休眠需冷量並無差異。將性狀與不同倍體數進行 t 檢測，其中葉寬、葉柄寬及節間長等三個性狀，在不同倍體間有顯著差異（表 3.2）。

3.5 討論

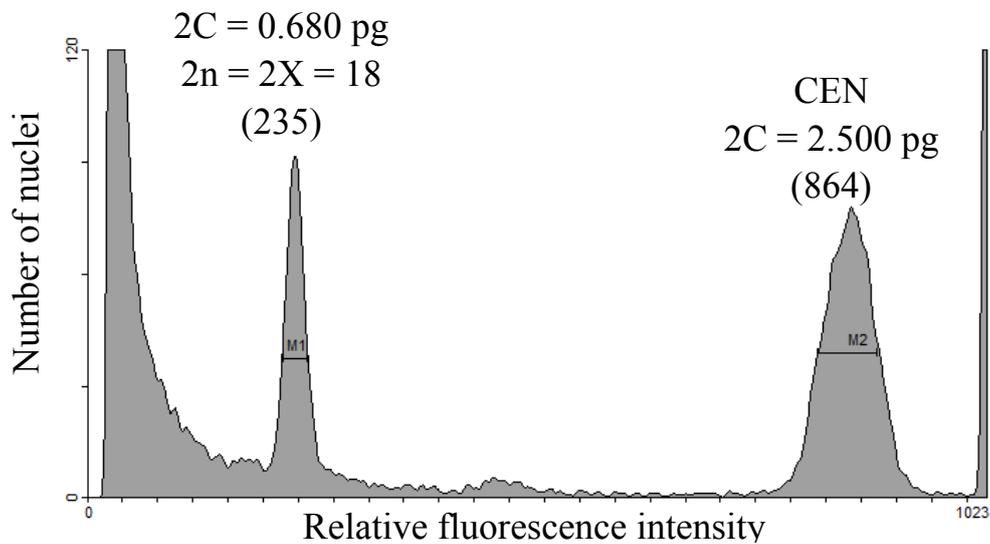
3.5.1 種內及種間的 DNA 含量變異

細胞的基因組 DNA 含量相當穩定，種內個體間差異不大（Dounce, 1955; Greilhuber, 1998），常用於估算屬內物種之倍體性。Ohri 和 Kumar（1986）以顯微密度測量法（Microdensitometry）測得二倍體白桑（*Morus alba*）之 DNA 含量為 1.7 pg/2C，而本試驗使用之二倍體白桑品種（系），平均 DNA 含量為 0.647pg/2C，與前人研究測得結果不同。顯微密度測量法係以 Feulgen 等染劑染細胞核，並與已知 DNA 含量的標準品，以目測的方式進行比較並估算樣本 DNA 含量，而流式細胞儀技術則使用偵測器，收集已染色的細胞核所發散的螢光訊號，再經一定程序轉換為電子訊號，因分析方法不同而造成不同的結果。

同品種（系）內 DNA 含量相當一致，但種內不同品種（系）間卻略有差異。桑樹常以高壓、扦插等方式行無性繁殖，品種（系）DNA 含量為均質，而種內不同品種（系）間的變異，除了是操作手法或儀器所造成的變異，亦可能是受環境影響，或由染色體的多態性，如異染色質、非整倍體等因數造成的結果（Greilhuber, 1998; Laurie and Bennett, 1985; Rayburn *et al.*, 1985）。

DNA 含量為種的特徵，特別是同倍體數但細胞核型不同的種，可由 DNA 含量進行區別（Costich *et al.*, 1993; Ozias-Akins *et al.*, 1994），本試驗僅可明確區分出不同倍數體的桑樹品種（系），如三倍體之 67C001-B 及二倍體之 67C001-A。同倍體數者，如二倍體桑樹之 DNA 含量，除在山桑、魯桑與臺灣桑有統計上的顯著差

(A) 新一の瀨 (*M. alba*)



(B) 70C006 (*M. laevigata*)

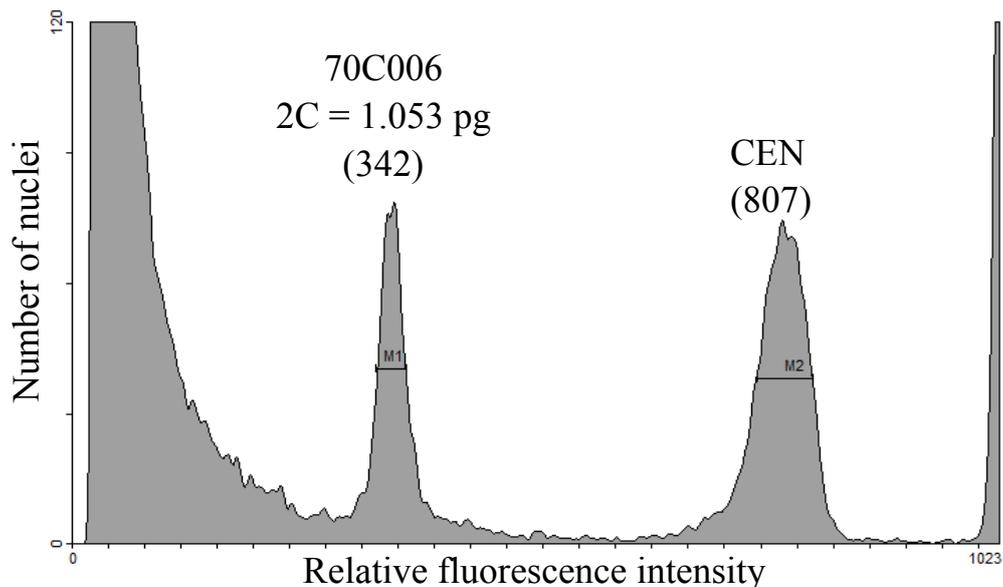


圖 3.1、相對螢光強度與細胞核數目之頻度分佈度

Fig. 3.1. Frequency distribution histograms plotting the number of nuclei as a function of their relative fluorescence intensity.

註一、雞血細胞 (2.500 pg) 作為校正標準品，以估算 DNA 含量。樣品：(A) 新一の瀨 (二倍體) (B) 70C006 (三倍體)。核 DNA 含量係自桑樹幼葉分離之懸浮核溶液，經 Propidium iodide 染色後，以流式細胞儀分析。

CEN is the calibration standard. Specimen: (A) diploid Shinichinose and (B) triploid 70C006. Nuclear DNA content analyzed by flow cytometry, using nuclei isolated from mulberry young leaves and stained with propidium iodide.

表 3.2 二倍體及三倍體桑樹品種（系）之營養性狀表現差異

Table 3.2. Difference between diploid(2X) and triploid(3x) mulberry on vegetative traits. Ploidy grouping was based on flow cytometry.

Ploidy		植物性狀 Plant characteristics							休眠需 冷量 (CU)
		葉長 (cm)	葉寬 (cm)	葉長寬 比	葉柄長 (cm)	葉柄寬 (mm)	葉片厚 度(mm)	節間長 (cm)	
3X (2n=42)	Mean	19.91	14.18	1.42	3.83	0.34	0.29	5.81	240
	SD	1.73	0.52	0.17	0.56	0.00	0.04	0.11	240
2X (2n=28)	Mean	13.91	10.19	1.4	3.25	0.26	0.26	3.65	297
	SD	1.95	1.90	0.1	0.80	0.04	0.02	0.65	219
t-test		NS	*	NS	NS	**	NS	**	NS

*Data were obtained for plants grown for one consecutive crop cycle (2008) at Miaoli District Agricultural Research and Extension Station(MDARES), Taiwan.

*The *t* test was of the difference between means.

*NS, *, ** Nonsignificant of significant difference between means at $P \leq 0.05, 0.01,$ respectively.

異外，其餘種間差異並不大。因桑樹染色體較小，第一對染色體為 2 μm ，其餘在 1 μm 以下（大澤, 1916; 儲和孫, 1986），無法透過 DNA 含量得知更多的染色體資料，如數目及大小，Meng 等人（2002）亦認為以流式細胞儀可估算物種倍數性，但無法確認具小染色體的物種是否為整倍體、染色體核型是否一致，需要以核型分析確認。

3.5.2 性狀與倍體數的關係

種原庫的島桑‘67C001’，從形態上即分為兩類型（圖 3.2(A)、(B)），67C001-A 之葉片較小，葉尖為中長尾，枝條節間短，而 67C001-B 之葉片明顯較大，葉尖為長尾狀，節間長，但此二者葉緣共同特徵為牙狀鋸齒、葉色深綠，葉基為淺彎型。在第二章以數量分類分析，67C001-A 及 67C001-B 皆分在山桑、島桑、臺灣桑及廣東桑一群，67C001-A 與其它島桑品種（系）群集在一起，但 67C001-B 在該群中獨立成一支，顯示 67C001-B 雖在形態具有該群的特徵，但與其他品種（系）仍有顯著差異。經流式細胞儀分析，證實外觀較小的 67C001-A 為二倍體，而形態外觀較大的 67C001-B 為三倍體（圖 2(C)），此二品種（系）除形態上有「量」的差異外，質量性狀頗為相似，應是來自同源親本，形態差異係由於不同倍數體所致。

多倍體的桑樹通常具外觀形態較大、植體內部份成份發生改變、抗耐性佳、生長遲緩、稔性改變等特性（朱等人, 1997; 南澤, 1976）。Sujathamma 等（2004）曾比較二、三及四倍體桑樹品種（系）的性狀差異，葉片長寬依倍體數增加而增加，但枝條長度卻以三倍體者最長，二倍體桑樹品種（系）居次，四倍體桑枝條最短，顯示性狀表現不一定與倍體數呈正相關。本試驗僅比較二倍體與三倍體之間性狀的關係，試驗中調查的性狀，如葉長、葉寬、葉柄長、葉柄寬、節間長等，三倍體之平均測量值皆大於二倍體，但唯有葉寬、節間長及葉柄寬的性狀有顯著差異。

葉長、葉厚等性狀，在二倍體的品種（系）間變異甚大，由於桑樹早期以養蠶為目的，葉桑育種上重視單位面積葉收量大的因數，如葉面積大、葉質厚等

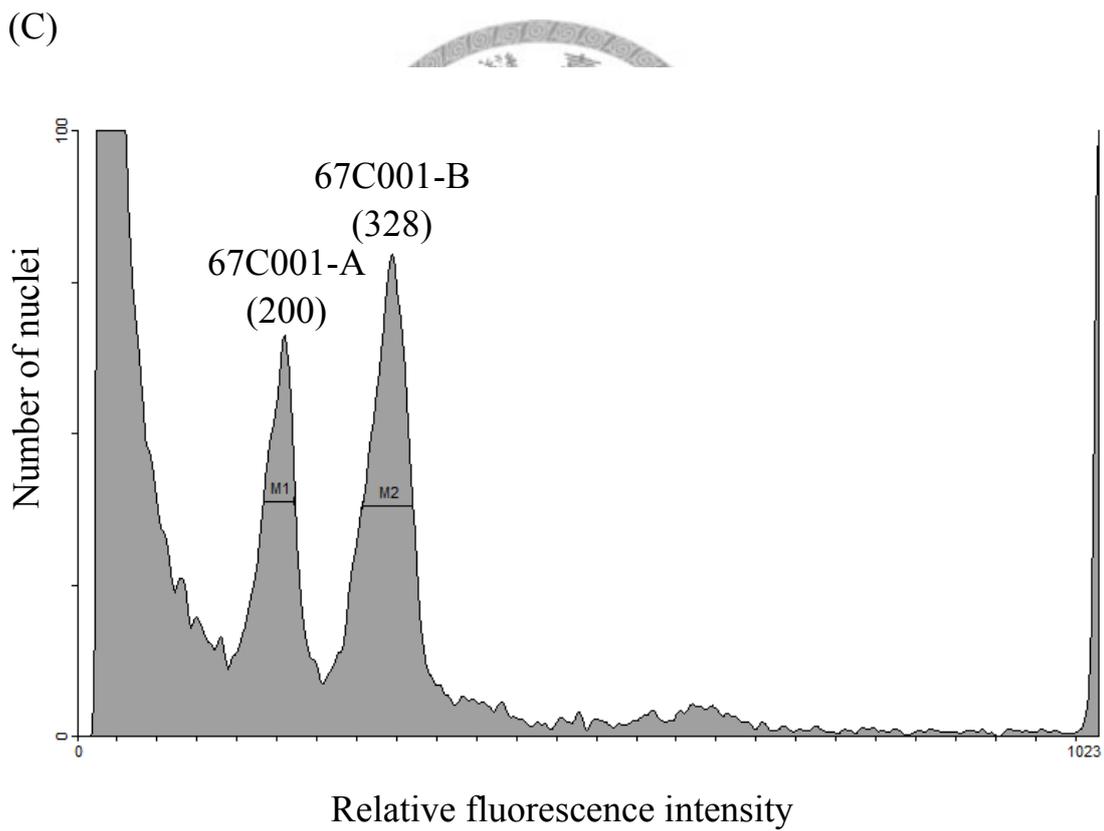
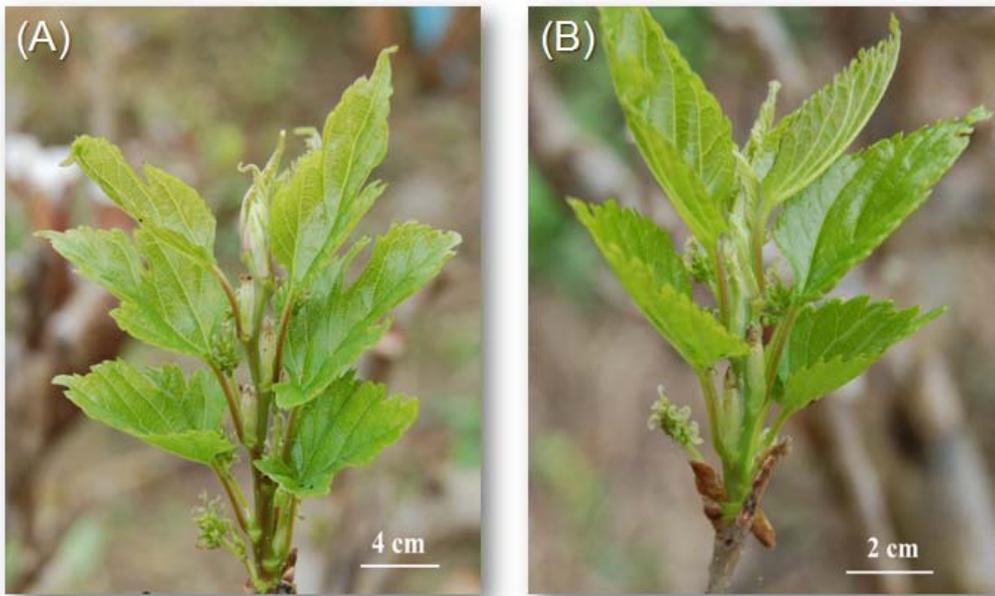


圖 3.2. (A) 品種 (系) 67C001 核 DNA 含量之流式細胞儀分析結果，及 (B) 二倍體和 (C) 三倍體個性在形態上的差異

Fig. 3.2. (A) Flow cytometry analysis of nuclear DNA content of accessions 67C001 and the morphological differences between (B) diploid and (C) triploid individuals.

(Banerjee *et al.*, 2007)，因此葉片性狀在二倍體內變異大。有趣的是，葉片長寬的比值在二倍體或三倍體之間皆無顯著差異，且比值相近，顯示形態的比例樣式在倍數體間相當穩定，在本論文第二章的數量分類結果，即提出葉片長寬比屬於重要分類性狀之一，在本章節實驗顯示此性狀不因倍數體而明顯改變，可見此性狀在分類中的重要價值。

多倍體品種(系)除了性狀差異外，亦可能不稔。長果桑果實風味佳，糖度高，為一良好的果桑品種(系)，卻不稔。本試驗證實其為三倍體，會形成花器，但即便經過授粉，仍不會產生種子。雄株品種(系)島桑‘67C001-B’為三倍體，曾觀察到有花粉的產生，但與一般二倍體品種(系)相比，其花粉量稀少。此二品種(系)皆為奇數倍體的品種(系)，在減數分裂的過程，因配子體無法產生正常配對而導致不稔，若為恢復其稔性，可透過染色體加倍的方式，例如在莖頂生長組織滴加秋水仙素等物質，使細胞無法進行正常細胞分裂，以增加染色體倍數，而在後續減數分裂過程，染色體可正常配對，並產生配子，如長果桑等性狀優良、但為奇數倍體的品種(系)可利用此方法進行育種。

自然情況下，桑樹多倍體的形成眾說紛紜。Winkler (1916)及 Jørgensen (1928)曾先後報導，扦插時若不斷切除新芽，接下來生長出的不定芽可能為多倍體(南澤, 1976)，由於部份桑樹品系觀察到混倍體，如 2 倍體中有 3 倍體的細胞存在(蘇等人, 2000; Yamanouchi *et al.*, 2008)，可能在葉桑一年多收之栽培模式下，持續修剪而產生變異，又以無性繁殖的方式保存下來。此外，劇烈的環境變化亦為影響植物細胞正常分裂的因素之一，如海南島及廣西等地常受颱風侵襲的地區，氣溫冷熱驟變，特殊環境的衝擊使得該地區多倍體植株較多(林等人, 1999; 郭等人, 1990)，而臺灣常遭受颱風侵擾，可能為產生多倍體植株的原因之一。

3.6 結論

臺灣桑樹種原中，山桑、白桑、魯桑、島桑、臺灣桑之 DNA 含量為 0.61-0.71 pg/2C，屬於二倍體，而 70C007(*M. laevigata*)為三倍體，DNA 含量為 1.06 pg/2C。67C001 (*M. australis* Poir.)中，從外觀分為葉片較小、枝條細的 67C001-A，及葉片較大、枝條粗且節間較長的 67C001-B，數量分析皆歸於山桑、島桑、臺灣桑及廣東桑一群，但 67C001-B 獨立成一支，從流式細胞儀分析，確認 67C001-A 為 0.63 pg/2C 的二倍體，而 67C001-B 為 0.98 pg/2C 的三倍體，此二類的形態差異乃倍體數不同所致。二倍體及三倍體品種（系）在葉寬、葉柄寬及節間長等營養性狀有顯著差異，可利用此三個性狀做為三倍體品種（系）之篩選指標。



3.7 參考文獻

- 王仁助. 2003. 桑樹機能性成份簡介. 農業世界 242:34-39.
- 朱方容、雷扶生、胡樂山、白景彰、林強. 1997. 四倍體桑研究和應用的概述. 廣西蠶業 34:11-16.
- 何大彥、周明珠、何偉. 1989. 雲貴川地區桑屬植物細胞遺傳學的研究 I. 桑種及品種的染色體倍數性觀察. 蠶業科學 15:7-12.
- 吳雲. 1964. 我國不同桑品種的倍數性鑒定. 蠶業科學 2:165-170.
- 林強、朱方容、胡樂山、陳日彩、石華月. 1999. 桑樹染色體製片的直接酸解去壁法及其實用性研究. 廣西蠶業. 36:1-5.
- 張哲嘉. 2006. 臺灣桑樹之分類及品種改良. 臺灣園藝 52:377-392.
- 郭展雄、王穗虹、肖更生. 1990. 粵、桂、瓊三省區桑樹染色體數的觀察. 廣東蠶絲通訊 1990: 40-42.
- 陳彩雲、蕭寧馨、楊雯如、林宗賢. 2004. 臺灣水果抗氧化能力之研究. 中國園藝 50: 592(摘要).
- 儲瑞銀、孫曉霞. 1986. 桑屬植物細胞遺傳學的研究 I. 部份桑品種的染色體. 蠶業科學 12:199-202.
- 蘇超、蘇利紅、朱光義、韓明齋. 2000. 桑屬植物混倍體產生的途徑及分類. 北方蠶業 21:11-12.
- 大澤一衛. 1916. 桑の細胞學并に實驗的研究. 蚕試報告 1:215-292.
- 南澤吉三郎. 1976. 栽桑學. p.127-129. 鳳鳴社. 東京. 日本.
- 關 博夫、押金健吾. 1963. 倍数体桑樹に関する研究 (V) 育成倍数体桑樹の組織形態学的觀察. 日蚕雜 32:97-107.
- 關 博夫. 1959. 桑属植物の細胞学的研究. 信州大織紀要. 20:1-91.
- Asano, N., E. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu, and K. Matsui. 1994. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. Carbohydr. Res. 259:243-255.
- Banerjee, R., S. Roychowdhuri, H. Sau, B. K. Das, P. Ghosh, and B. Saratchandra. 2007. Genetic diversity and interrelationship among mulberry genotypes. J. Genet. Genomics 34:691-697.
- Bassi, P. 1990. Quantitative variation of nuclear DNA during plant development: A

- critical analysis. Biol. Rev. 65:185-225.
- Benett, M. D. and I.J. Leitch. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. Ann. Bot. 76:113-176.
- Black, C.L. and R. L. Beckmann. 1983. The variability of nuclear DNA and its implications for polyploidy in white ash (*Fraxinus Americana* L.: Oleaceae). Am J Bot 70:1420-1423
- Costich, D. E., R. Ortiz, T. R. Meagher, L. P. Bruederle, and N. Vorsa. 1993. Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. Theor. Appl. Genet. 86:1001-1006.
- De Laat, A. M. M., W. Gohde, and M. J. D. C. Vogelzang. 1987. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. Plant Breed. 99:303-307.
- Dounce, A. L. 1955. The isolation and composition of cell nuclei and nucleoli. In: E. Chargaff and J. N. Davidson (eds.). The nucleic acids, p.93-153. Academic Press, New York.
- Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma, and E. Firoozabady. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220:1049-1051.
- Greilhuber, J. 1998. Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. Ann. Bot. 82 (Suppl. A):27-35.
- Janaki-Ammal, E. K. 1948. The origin of black mulberry. J. Royal Horticult. Soc. 73:117-120.
- Lin, S, H.-C. Lee, W.-H. Chen, C.-C. Chen, Y.-Y. Kao, Y.-M. Fu, Y.-H. Chen, and T.-Y. Lin. 2001. Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. And *Doritis pulcherrima*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126:195-199.
- Laurie, D. A. and M. D. Bennett. 1985. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. Heredity 55:307-313.
- Rayburn, A. L., H. J. Price, J. D. Smith, and J. R. Gold. 1985. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. Amer. J. Bot. 72:1610-1617.
- Michaelson, M. J, H. J. Price, J. R. Ellison, and J. S. Johnston. 1991. Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. Am. J. Bot. 78:183-188.

- Ohri, D. and A. Kumar. 1986. Nuclear DNA amounts in some tropical hardwoods. *Caryologia* 39:303-307.
- Ozias-Akins, P. and R. L. Jarret. 1994. Nuclear DNA content and ploidy levels in the genus *Ipomoea*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:110-115.
- Singh, R. K. and B. D. Chaudhary. 1985. Biometrical methods in quantitative genetic analysis. Kalyani Publi., New Delhi, India.
- Sujathamma, P., J. Yang, and C. Lou. 2002. A comparative study on morphological and histological differences among different ploids of mulberry (*Morus spp.*). *Canye Kexue* 28:8-13.
- Tahara, M. 1910. Ueber die Kernteilung bei *Morus*. *Bot. Mag. Tokyo* 24: 281- 289.
- Yamanouchi, H., A. Koyama, T. Takyu, and T. Yoshioka. 2008. Flow cytometric analysis of various organs and cytochimeras of mulberry (*Morus spp.*). *J. Insect Biotechnol Sericol.* 77:95-108.



3.8 Abstract

A great morphological variability exists within the mulberry, but a few accessions larger in appearance and sterile were probably polyploidy. To determine the ploidy of Taiwan's mulberry, twenty-six mulberry accessions were selected from the Miaoli District Agricultural Research and Extension Station (MDARES) and DNA content was investigated. The ploidy of the 26 mulberry accessions was determined by flow cytometer. Genome size of each specimen was estimated by referring to the standard genome size of chicken erythrocyte nuclei (CEN, 2.500 pg). Accessions of *M. bombycis*, *M. alba*, *M. latifolia*, *M. australis*, *M. formosensis*, and *M. arapurplea* were diploids with genome sizes ranging from 0.61 to 0.71 pg/2C. Accessions 70C006 (*M. laevigata*) was a triploid with a genome size of 1.06 pg/2C. Accession 67C001 (*M. australis*) comprised diploid and triploid with genome size of 0.63 pg/2C and 0.98 pg/2C, respectively. The morphological characters were bigger in triploid also revealed the difference in ploidy level. Vegetative characters such as leaf width, petiole width and length of internode suggested to have a direct proportion between diploid and triploid were beneficial index for further triploid accessions investigation. Results of this experiment provided a basic database for further breeding and related work.

Keyword: polyploidy, morphological traits, length of the internode

第四章 臺灣桑樹之核型分析及 rDNA 之染色體圖譜

Chapter 4. Karyotype analysis and physical mapping of rDNA
of mulberry (*Morus spp.*) in Taiwan



第四章 臺灣桑樹之核型分析及 rDNA 之染色體圖譜

4.1 摘要

本試驗觀察臺灣桑樹 7 個種及雜交桑之 13 個品種（系）的染色體核型，及 4 個種之 5S rDNA 及 18S-5.8S-25S rDNA 分佈。山桑、島桑、臺灣桑、廣東桑、長果桑、魯桑、白桑及雜交桑之 13 個品種（系），核型結果在各種間幾乎完全相同，14 對染色體中，第二、五及十四對染色體為次中位中節，其餘為中位中節染色體。在第一對染色體的近中節之短臂上有次級縊縮點。本研究亦調查白桑、島桑及雜交桑不同株性品種（系）之染色體，在島桑及雜交桑中單性雄株之品種（系），皆觀察到第三對染色體有一條染色體之短臂染色較深，而單性雌株品種（系）則無此現象，但不同株性的白桑品系則無染色條帶的差異。以 18S-5.8S-25S rDNA 及 5S rDNA 基因為探針進行螢光原位雜交，參試品種（系）之 rDNA 分佈一致，18S-5.8S-25S rDNA 基因皆位於第一對染色體近中節之短臂，而 5S rDNA 基因則是在第六對染色體短臂上。臺灣桑樹種原之核型及 rDNA 分佈皆一致，未有明顯差異。

關鍵字：螢光原位雜交、性染色體、異染色質



4.2 前言

桑樹 (*Morus spp.*) 為近年極具發展潛力之作物，兼備果用、特用、機能性、藥用及觀賞用。桑多為雌雄異株，藉風力行異花授粉，遺傳質高度異質，桑樹又易適應於不同氣候，分佈甚廣，亦衍生出不同生態型 (Zhao *et al.*, 2007)，遺傳背景複雜。桑屬植物科學性分類始自林奈，將桑屬植物分為 7 種 (Linné, 1753)，其他學者陸續提出不同的分類意見，嘗提出 5 個種 (Bureau, 1855) 至 30 個種 (小泉, 1917)，至今在 IPNI (2008) 已登記有 170 多個種，其中亦不乏異名同種及歸類於其他屬的種，可見桑屬植物分類之混亂。臺灣除島桑及臺灣桑等在地種外，自日據時代起，從中國及日本等地引種，經多年引種、選拔、育種及演化，已衍生為龐大族群 (張, 2006)，因目前對於種原遺傳背景不明，使得育種工作有所限制。

傳統上係以形態分類，可依外觀大致區分出數種 (小泉, 1917; 堀田, 1954; 張, 2006)，但桑屬植物為異交，許多性狀的表現呈連續性的變異 (Susheelamma *et al.*, 1990)，因此在分類上尚需要如分子標記分析或細胞遺傳等證據支持 (Clausen, 1946; Baker, 1970; Chennaveeraiah *et al.*, 1983)。分子標記分析結果指出桑之遺傳歧異度高，可大致分出野生種和栽培種兩群，但群內則依不同分析法而有不同結果 (Awasthi *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2006)。

核型為物種穩定的特徵，可輔助瞭解物種間的關係，桑樹的染色體研究以倍體數估算為主 (Tahara, 1909; Janaki-Ammal, 1948; 關, 1959; 儲和孫, 1986)，詳盡的核型研究僅針對白桑、魯桑、山桑、廣東桑、印度桑及魯桑之少數品種 (系) (蔣和朱, 1985; 儲和孫, 1986; Susheelamma *et al.*, 1990; Oginuma *et al.*, 1995)，已知桑之染色體約 1 - 2 μm ，但各篇研究中，同種的核型卻不盡相同。

核醣體 RNA 基因 (ribosomal RNA gene, rDNA) 之分佈亦為種的特徵，真核生物 rDNA 包括 5S rDNA 及 18S-5.8S-25S rDNA，在高等植物中 18S-5.8S-25S 與 5S rDNA 常成串地分佈且位於不同染色體上，包含有 18S-5.8S-25S rDNA 的染色體片段，稱為核仁形成區 (NOR, nucleolar organizing region)，常可見核仁位於該片

段上，形成次級縊縮點，有時可見此部份的染色體鬆開，在核仁另一端連結衛星染色體；5S rDNA 則分佈於不具核仁形成區的染色體上。rDNA 的分佈位置及重複數在不同物種間可能頗具變異，可透過螢光原位雜交技術 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 將 rDNA 基因座在染色體上定位，已應用於植物的種原分析，如水稻 (Chung *et al.*, 2008) 及園藝作物的檸檬與其近緣種 (Carvalho *et al.*, 2005)。

桑樹性染色體之研究始自 Sinoto (1929)，他認為桑樹具有性染色體，但關 (1956) 及 Gill 等人 (1979) 觀察不到異型染色體，認為桑樹不具性染色體，後續儲和孫(1985)則認為桑具異型染色體，但迄今仍未有結論。

本試驗將分析臺灣桑樹種原主要 7 個種 (species) 之核型，並調查同種但不同株性的品種 (系) 間是否存在核型差異。此外，針對歧異度較大的白桑、長果桑、島桑及廣東桑等 4 種，建立 rDNA 圖譜。希望進一步瞭解臺灣桑樹之親緣關係，並試圖從核型分析中確認桑樹的性染色體是否存在，以利後續研究參考。



4.3 材料與方法

4.3.1 染色體製備

試驗樣品取自苗栗區農業改良場 (苗栗縣公館鄉)，品種 (系) 選擇則參考臺灣桑樹分類系統 (張, 2006)，從 7 個種 (species) 挑選出長果桑 '70C006'、山桑 '劍持'、臺灣桑 '58C398'、廣東桑 '46C019'、魯桑 '雲龍桑'，而為另外比較同種卻不同株性之核型，島桑、白桑及雜交桑的則選出島桑 '台桑 1 號' (單性雄株)、'67C001-A' (單性雌株, 二倍體)、'67C001-B' (雄株, 三倍體)，白桑 '新一の瀨' (兩性株)、'改良鼠返' (單性雄株)、'枝垂桑' (單性雌株) 及雜交桑 '台桑 2 號' (單性雌株)、'台桑 3 號' (單性雄株) 等品種 (系) 進行比較，共 13 個品種 (系) 進行核型分析。

於晴天早上十點半至下午兩點之間，採集營養生長枝梢的頂部、約 2 公分未完全展開且之葉芽，浸於 0.002 M 8-HQ (8-hydroxy quinoline, Nacalai Tesque

Inc, Japan), 4°C 下處理 2 至 3 小時。以二次水清洗 3 次, 浸於新鮮配置之 farmer's fluid (95%酒精: 醋酸= 3:1) 後, 以真空抽氣裝置抽氣 5 分鐘後, 靜置約 1 小時, 再更換一次固定液, 置於 4°C 下存放過夜。

挑出尚未展開, 仍包覆在芽內、約一公分以下的嫩葉, 以二次水清洗兩次。將嫩葉表面水分吸乾後, 置於 1.5 mL 離心管, 加入含 6% 果膠酶 (pectinase, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 和 6% 纖維素水解酶 (cellulase, Onoauka R-10, Yakukt Honsha, Japan) 之 75 mM HCl 溶液 (pH 4), 於 37°C 下處理 80 分鐘, 其中魯桑‘雲龍桑’、白桑‘新一の瀨’、‘改良鼠返’、‘枝垂桑’, 因葉芽質地較厚, 處理時間為 100 分鐘。葉片以二次水清洗, 再滴上固定液 (甲醇: 醋酸 = 3:1), 將細胞小心壓散於玻片上, 均勻滴上 5 滴固定液後, 利用酒精燈火焰燃盡固定液, 將細胞樣品固定於玻片上, 待玻片風乾, 備用。

本試驗所用之染色劑為 30 mL 之 67 mM NaH_2PO_3 溶液混合 30 mL 67 mM Na_2HPO_3 , 再加入 3 mL 之 Giemsa (Merck & Co. Inc., Germany) 使用前先濾掉浮在表層的結晶, 將已烤乾之玻片置於染色液中 20 分鐘。玻片取出前亦小心濾去浮在頂層之結晶, 以鑷子夾出玻片, 以清水沖去多餘染劑, 待玻片晾乾後, 即可在顯微鏡下觀察。

每品種 (系) 需觀察至少 15 個具染色體分散的細胞樣品, 以計算染色體條數。從中挑選五個數目完整、分散良好、形態和中節位置清晰的染色體樣品, 量測染色體參數, 如短臂、長臂及總長度, 並計算各染色體之臂率 (長臂/短臂) 以確定染色體著絲點位置。染色體之形態參考 Levan (1964) 之定義: M 為長短臂比值為 1 者; m 者則為長短臂比值 1.01~1.7; sm 係指長短臂比值 1.7~3; 長短臂比值為 3~7 則為 t, 而長短臂比值大於 7 則以 T 表示。亦計算染色體之相對長度 (單條染色體絕對長度/所有染色體絕對長度的總和)。

4.3.2 螢光原位雜交 DNA 探針的製備

試驗所使用的兩組 DNA 探針參考 Roche DIG-Nick translation Mix 及 Roche

Biotin-Nick translation Mix 的操作手冊(Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)進行探針標記製作。18S-5.8S-25S rDNA 探針係利用小麥 (*Triticum aestivum*) 的 18S-5.8S-25S rDNA 將 digoxigenin-11-dUTP (Roche) 以 nick translation 的方式標記。而 5S rDNA 則以 biotin-16-dUTP (Roche) 標記在小麥的 5S rDNA 上作成探針。

4.2.3 螢光原位雜交 (Fluorescence in-situ hybridization, FISH)

擇用長果桑‘70C006’、島桑‘台桑 1 號’、‘67C001’和‘67C001-B’、廣東桑‘46C019’、白桑‘新一の瀨’、‘改良鼠返’及‘枝垂桑’等 8 個品種 (系) 為材料，依上述染色體製備方式，保留細胞分裂中期的製片進行螢光原位雜交。

試驗方式參考自 Kao 等人 (2006)，並略作調整。將染色體玻片以冰冷固定液搖洗 5 分鐘，經系列酒精脫水 (70%、95%、100%) 各 5 分鐘後，取出置於 60°C 加熱板，烤 30 分鐘以上。乾燥的玻片以 10 mM HCl 搖洗 5 分鐘後，每玻片滴加 150 μ l 的 pepsin solution (5 mg/mL in 10 mM HCl)，置於 37°C 雜交箱內處理 2 至 3 小時，再以 10 mM HCl、2X SSC 搖洗各 5 分鐘。將多餘水分甩乾後，每片玻片滴加 150 μ l 冰冷的 70% formamide/ 2X SSC，蓋上塑膠片，置於 80°C 加熱板上處理 90 秒，使染色體 DNA 變性 (denaturation)，再迅速移除塑膠片，浸入冰冷的 70% 酒精中搖洗 5 分鐘，再依次以 95%、100% 的酒精各搖洗 5 分鐘後，晾乾。待樣本玻片完全乾燥後，再滴加 20 μ l 的探針混合液 (50% formamide, 10% dextran sulfate, 2X SSC, 探針 DNA (10-100 ng in 20 μ L), sheared salmon sperm DNA (1 μ g/ μ L))，蓋上拭淨的蓋玻片，以相片膠封起四周，置於雜交盒內於 37°C 中反應過夜。

去除封片膠及蓋玻片，以室溫的 2X SSC 搖洗 5 分鐘，42°C 的 2X SSC 下搖洗 10 分鐘，再以室溫下的 2X SSC、1X PBS (0.13 M NaCl, 7 mM NaHPO₄, 3 mM NaH₂PO₄) 各洗 5 分鐘。將玻片稍微甩乾後，每片滴加 100 μ L 的抗體混合液 [1X TNB solution (1x Buffer 1, 含有 1 M Tris-HCl at pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.05%

Tween-20, 0.5% blocking reagent (Roche), 20 µg/mL anti-DIG-rhodamin (Roche), 20 µg/mL fluorescein avidin D (Vector Laboratories, CA, USA)]，於雜交箱中反應 1 小時。待反應完全，以 1X Buffer 1 搖洗 3 次各 5 分鐘，約略甩乾後，倒扣於拭鏡紙上吸乾多餘液體。每片滴加 20 µL 含有 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1.5 µg/mL) 的抗螢光衰退劑 Vektorshield (Vector Laboratories, CA, USA) 作為副染劑，蓋上拭淨的蓋玻片，放置 20 分鐘後觀察。

利用螢光顯微鏡 (Imager A1, Zeiss, Jena, Germany) 觀察，輔以 CCD 影像擷取系統照相 (Cool Snap-fx, Photometrics, Tucson, AZ, USA)，並以 Image-Pro Plus 軟體 (v.5.0.2.0., Media Cybernetics Inc., USA) 調控擷取影像，而影像以 Adobe Photoshop 6.0 (Adobe System Incorporated, USA) 編輯。

4.4 結果

4.4.1 核型分析

4.4.1.1 臺灣桑樹種間核型之比較

試驗品種 (系) 中有二倍體及三倍體品種 (系) (表 4.1 及圖 4.1)，二倍體者核型為 $2n = 2X = 22m + 6sm$ ，包含山桑‘劍持’、島桑‘台桑 1 號’、‘67C001-A’、臺灣桑‘58C398’、廣東桑‘46C019’、魯桑‘雲龍桑’、白桑‘新一の瀨’、‘改良鼠返’、‘枝垂桑’及雜交桑‘台桑 2 號’、‘台桑 3 號’。三倍體者 $2n = 3x = 33m + 9sm$ ，為長果桑‘70C006’及島桑‘67C001-B’，參試品系之染色體數目與倍數體符合流式細胞儀分析之結果。所有的觀察品種 (系) 的染色體中節位置相同，第二、五及十四對染色體為次中位中節之染色體，其餘皆為中位中節的染色體，種間核型差異不明顯 (表 4.1 及圖 4.1)；各染色體之絕對長度依收縮程度不同而有異，亦可由相對長度進行比較，整體而言第一對染色體明顯大於其他對染色體，絕對長度約為 3.3 - 4.4 µm，相對長度為 4.0 - 7.7，而其餘 13 對染色體絕對長度 1.2 - 3.3 µm，相對長度為 1.1 - 4.8 (表 4.1)。在第一對染色體，短臂近中節位



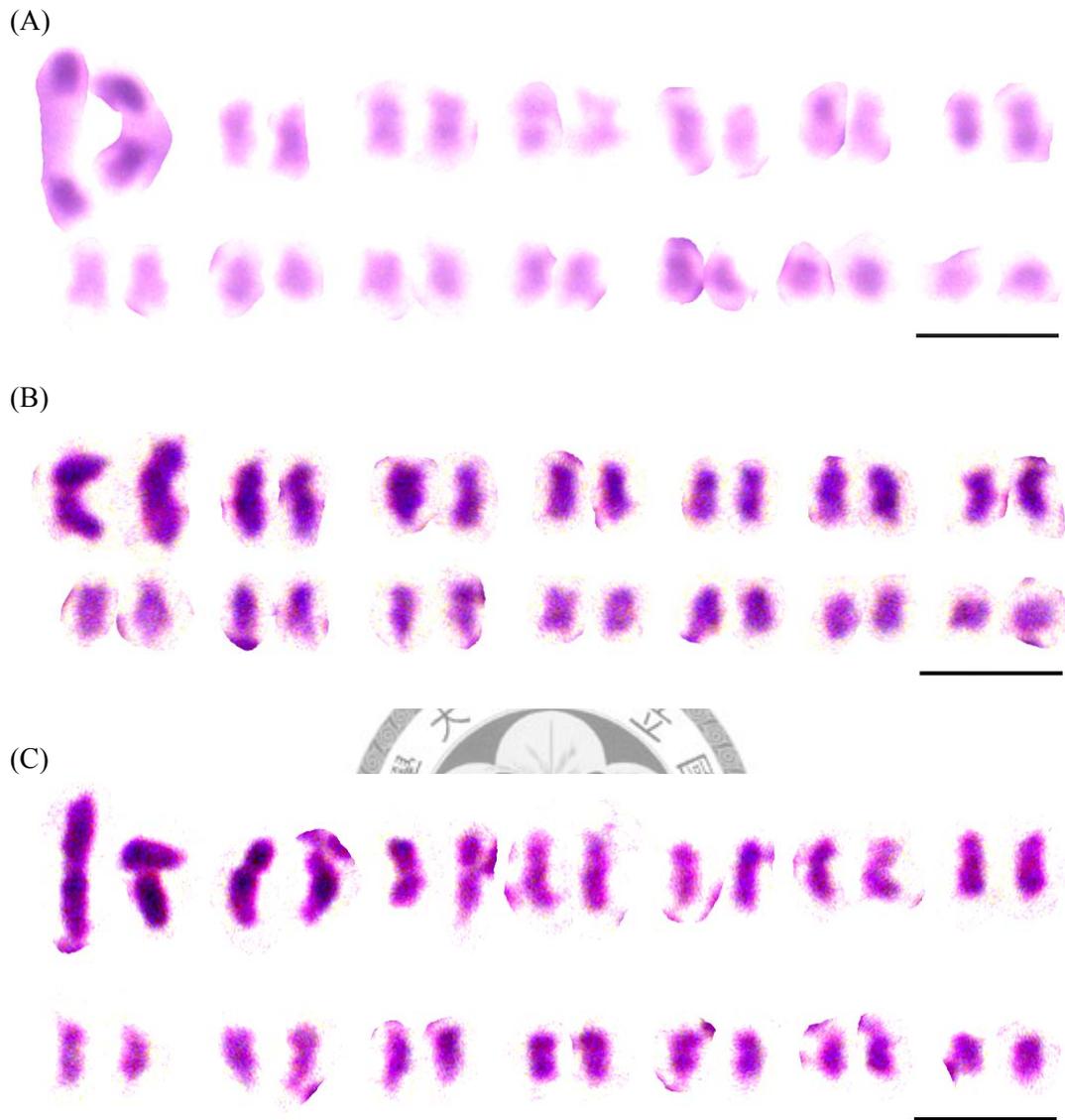


圖 4.1. 臺灣桑樹之核型：(A)白桑‘69C002’（枝垂桑）、(B) 白桑‘改良鼠返’及(C) 白桑‘新一の瀨’。14 對同源染色體係依照染色體之形態，依長度排序。尺標為 5 μm 。

Fig. 4.1. Karyotypes of (A) *M. alba* ‘69C002’, (B) *M. alba* ‘Kairyonezumigaeshi’ (C) *M. alba* ‘Shinichinose’. Fourteen homologous pairs of chromosomes were arranged according to their morphology and numbered to their length in descending order. Bar 5 μm .

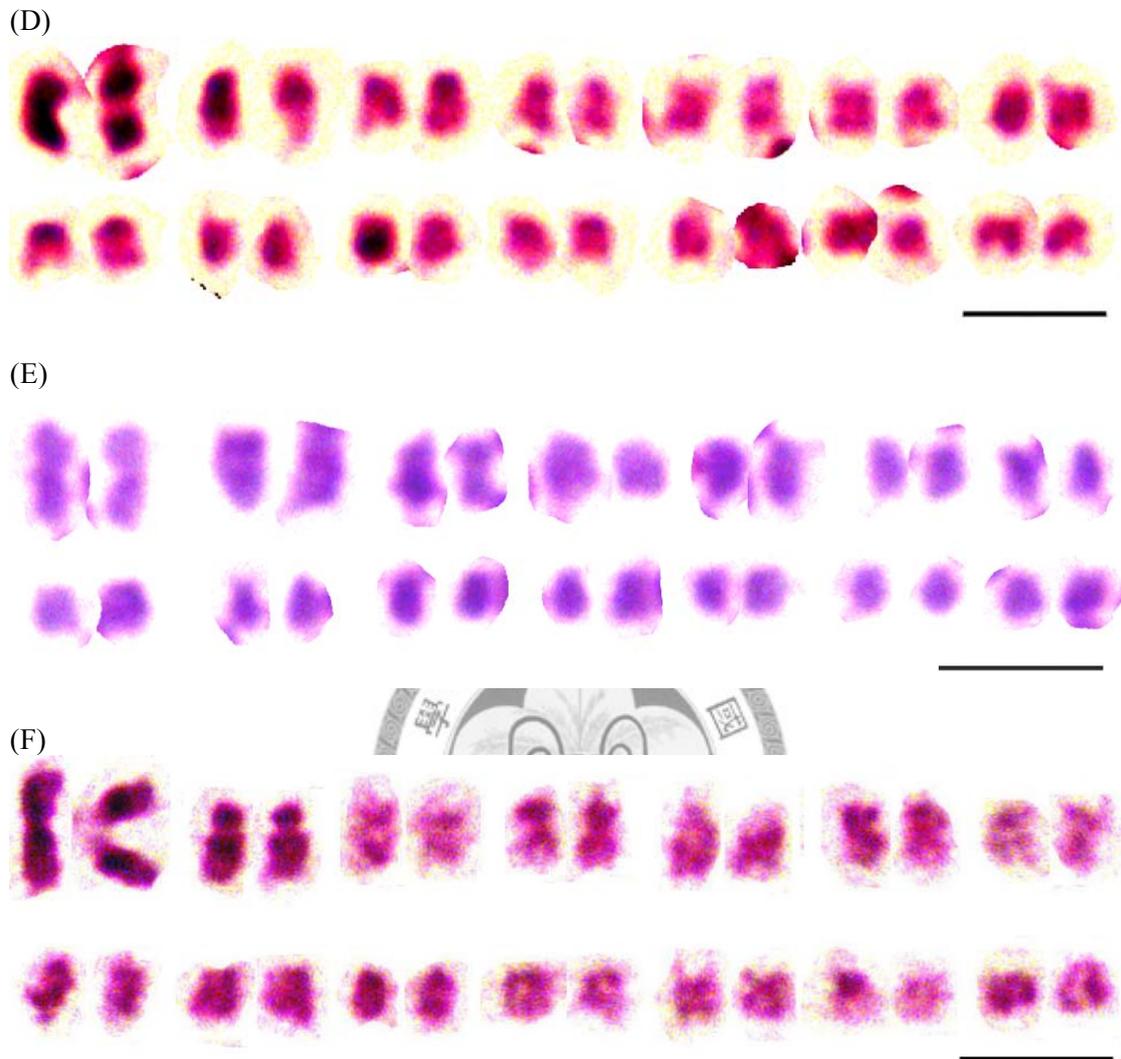


圖 4.1 (續) (D) 魯桑‘74C005’ (雲龍桑)、(E) 山桑‘劍持’、(F) 臺灣桑‘58C398’，
之核型。14 對同源染色體係依照染色體之形態，依長度排序。尺標為 5 μm 。

Fig. 4.1.(continued) Karyotypes of (D) *M. latifolia* ‘74C005’, (E) *M. bombycis* ‘Kenmochi’, (F) *M. formosensis* ‘58C398’. Fourteen homologous pairs of chromosomes were arranged according to their morphology and numbered to their length in descending order. Bar 5 μm .

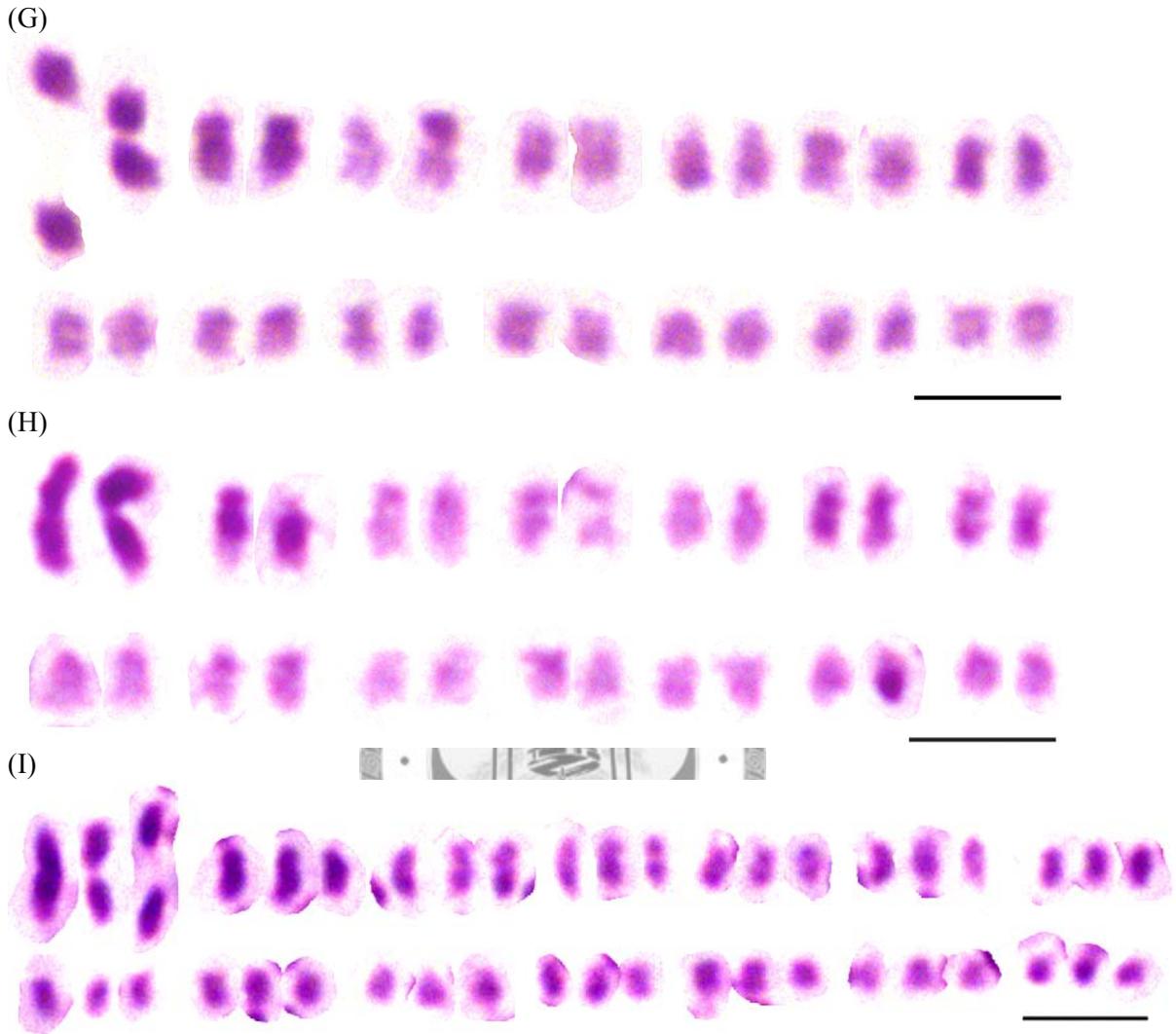


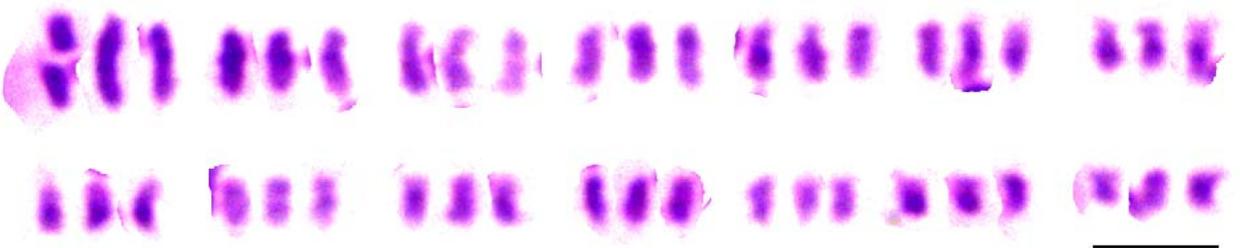
圖 4.1 (續) (G)島桑‘台桑 1 號’(H)島桑 ‘67C001-A’, (I)島桑‘67C001-B’ 之核型。
14 對同源染色體係依照染色體之形態，依長度排序。尺標為 5 μm 。

Fig. 4.1.(continued) Karyotypes of (G)*M. australis* ‘Taisang No. 1’, (H)*M. australis* ‘67C001-A’, (I) *M. australis* ‘67C001-B’. Fourteen homologous pairs of chromosomes were arranged according to their morphology and numbered to their length in descending order. Bar 5 μm .

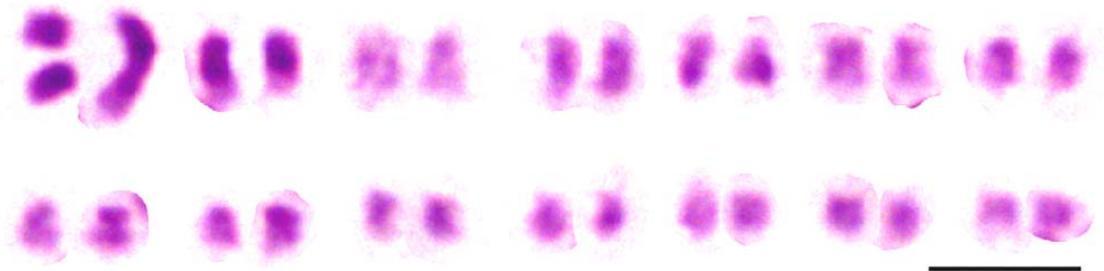
(J)



(K)



(L)



(M)



圖 4.1 (續) (J)廣東桑‘46C019’、(K)長果桑‘70C006’、(L)雜交桑‘台桑 2 號’、(M)雜交桑‘台桑 3 號’之核型。14 對同源染色體係依照染色體之形態，依長度排序。尺標為 5 μm 。

Fig. 4.1.(continued) Karyotype of (J) *M. atropurpurea* ‘46C019’, (K) *M. laevigata* ‘70C006’, (L) *Morus spp.*, hybrids ‘Taisang No. 2’, (M) *Morus spp.*, hybrids ‘Taisang No. 3’. Fourteen homologous pair of chromosomes were arranged according to their morphology and numbered to their length in descending order. Bar 5 μm .

表 4.1. 桑屬 13 個品種 (系) 之核型特徵

Table 4.1. Karyotype characteristics of 13 mulberry accessions.

種 species	品系 Accessions	株性 Sexuality	核型 Karyotype Formulae*	核仁形成區 數目 No. of NORs	染色體長度範圍 Range of chromosome length (μm)		染色體相對長度範圍 Range of chromosome relative length (μm)	
					Chromosome 1	Chromosome 2-14	Chromosome 1	Chromosome 2-14
山桑 <i>M. bombycis</i>	劍持	♀	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	3.8	1.2-2.4	7.4	1.1-4.7
島桑 <i>M. australi</i>	台桑 1 號	♂	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	4.5	1.4-3.0	7	1.6-4.7
	67C001-A	♀	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	4.6	1.7-3.0	6.8	1.7-4.4
	67C001-B	♂	$2n = 42 = 33 m + 9 sm$	3	4.1	1.2-2.5	5.1	1.6-3.1
臺灣桑 <i>M. formosensis</i>	58C398	♀	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	4.2	1.5-2.8	6.8	2.5-4.4
廣東桑 <i>M. atropurpurea</i>	46C019	♀	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	3.7	1.2-2.3	7.2	2.4-4.4
白桑 <i>M. alba</i>	枝垂桑	♀	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	3.6	1.2-2.1	7.2	2.4-4.1
	新一の瀨	♀	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	4	1.2-2.6	7.1	2.3-4.5
	改良鼠返	♂	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	4.2	1.2-2.6	7.7	2.3-4.5
魯桑 <i>M. latifolia</i>	雲龍桑	♂	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	3.3	1.3-3.3	6.8	2.2-4.5
長果桑 <i>M. laevigata</i>	70C006	♀	$2n = 42 = 33 m + 9 sm$	3	3.9	1.5-2.8	4	1.6-2.8
雜交桑 <i>Morus spp.</i> , Hybrids	台桑 2 號	♀	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	3.8	1.2-2.4	7.2	2.3-4.6
	台桑 3 號	♂	$2n = 28 = 22 m + 6 sm$	2	4.1	1.3-2.7	6.5	2.1-4.7

* 染色體形態分類命名參考 Levan *et al.* (1964). Chromosome nomenclature based on Levan *et al.* (1964)

置有次級縊縮點。所有的染色體之染色深淺相比，以第一對及第二對染色體之染色為最深，由於 Giemsa 染劑在異染色質及 AT-rich 區域染色較深，推測在此二對中有較多之異染色質或 AT-rich 區域存在（圖 4.1 (A) - (M)）。

4.4.1.2 不同株性之核型分析

不同株性的品種（系）中，白桑‘新一の瀨’（兩性株）、‘改良鼠返’（單性雄株）、‘枝垂桑’（單性雌株）三者染色體核型及染色條帶上無明顯差異（圖 4.1 (A) - (C); 表 4.1; 表 4.2）。島桑及雜交桑之品種（系）在染色體數目及臂率等資料無明顯差異（表 4.3），但單性雄株之島桑‘台桑 1 號’之第三對染色體，一染色體之短臂染色較深（圖 4.1 (G)），而島桑之單性雌株品種（系）‘67C001-A’，其第三對染色體之染色皆較淺（圖 4.1 (H)），在雜交桑‘台桑 3 號’（單性雄株）之染色體染色結果亦有觀察到類似的結果，其第三對染色體中有一染色體之短臂染色深（圖 4.1 (M)），而單性雌株之‘台桑 2 號’，第三對染色體染色皆較淺（圖 4.1 (L)），但在白桑中未見相同的染色條帶差異，此對染色體與性別之關連性有待後續研究釐清。

4.4.2 螢光原位雜交分析

利用螢光原位雜交技術，標記桑樹葉芽細胞染色體上 18S-5.8S-25S 及 5S rDNA 的分佈，其中綠色螢光為 18S-5.8S-25S rDNA 基因之標記，紅色螢光則為 5S rDNA 基因，而藍色螢光則為 DAPI 的副染色。桑樹之 18S-5.8S-25S 及 5S rDNA 基因座分佈於不同對染色體，而不同種間 rDNA 基因座分佈位置皆一致（圖 4.2），18S-5.8S-25S rDNA 位於第一組染色體短臂上之近中節位置，座落於次級縊縮點上，在桑樹有絲分裂中期的細胞中，常見雌株品種（系）第一組染色體有一條染色體，其 DNA 在近中節位置鬆開，由於有絲分裂中期 18S-5.8S-25S rDNA 基因仍進行轉譯，才觀察到此現象。而 5S rDNA 基因則位於第六對中位中節染色體之短臂，但 5S rDNA 基因之訊號較弱，可能是由於該基因重複數較少。

DAPI 係作為副染色，其染色之結果可與 Giemsa 之結果進行比照。四個種的

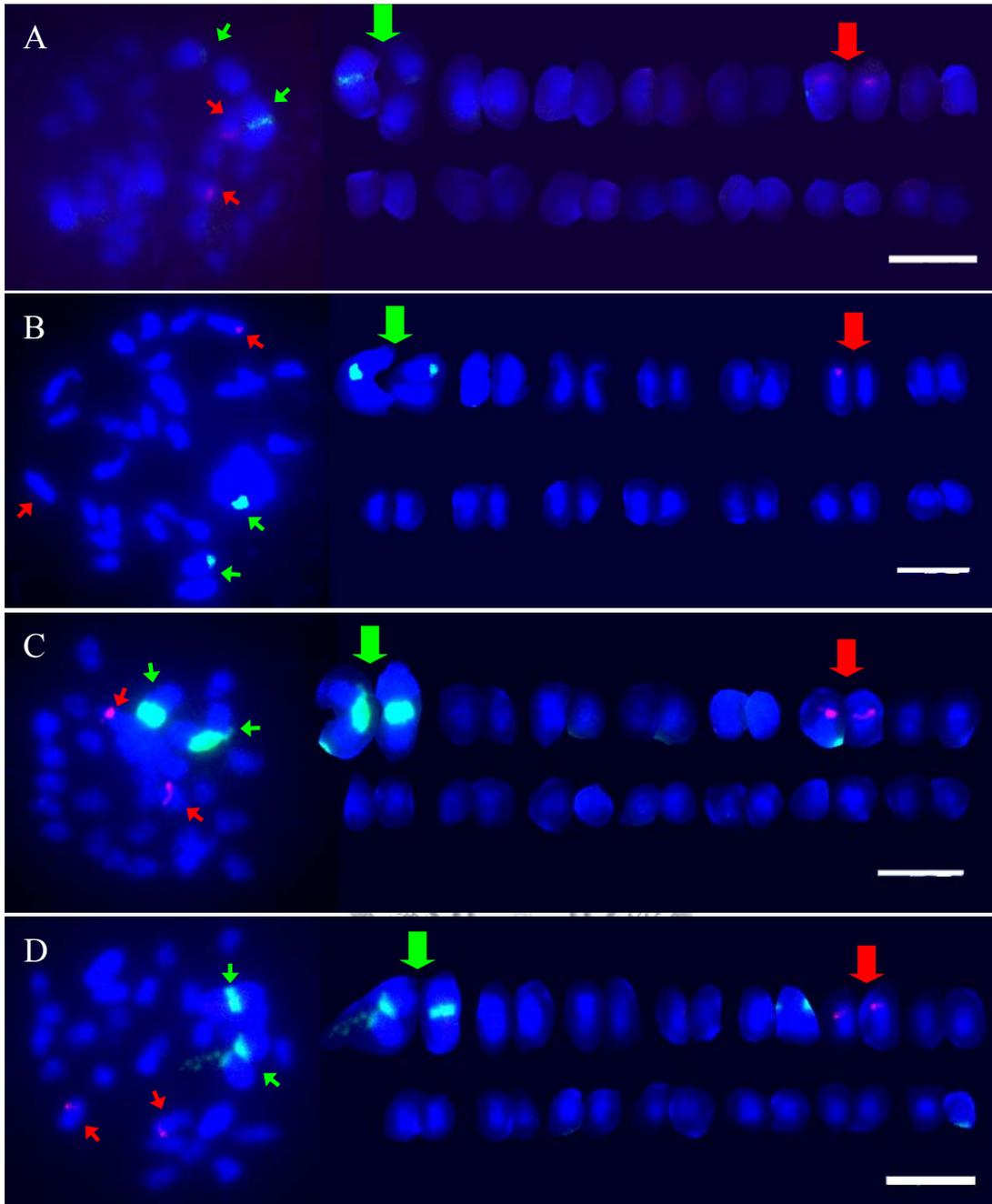


圖 4.2. 以螢光原位雜交標記臺灣桑樹之 18S-5.8S-26S (綠) 及 5S (紅) rDNA 基因座於染色體的位置。(A) 白桑 '69C002' (枝垂桑), (B) 白桑 '改良鼠返', (C) 白桑 '新一の瀬', (D) 廣東桑 '46C019'。各品種 (系) 之原始 rDNA - FISH 圖譜表示於左, 而相對應之核型則排列在右。尺標為 5 μ m。

Fig. 4.2. FISH localization of 18S-5.8S-26S (green) and 5S (red) rDNA loci on somatic metaphase chromosomes (blue) of (A) *M. alba* '69C002', (B) *M. alba* 'Kairyonezumigaeshi', (C) *M. alba* 'Shinichinose', (D) *M. atropurpurea* '46C019'. For each accession, chromosome complements with rDNA-FISH signals were shown at left and respective karyotypes were arranged and shown at right. Bar 5 μ m.

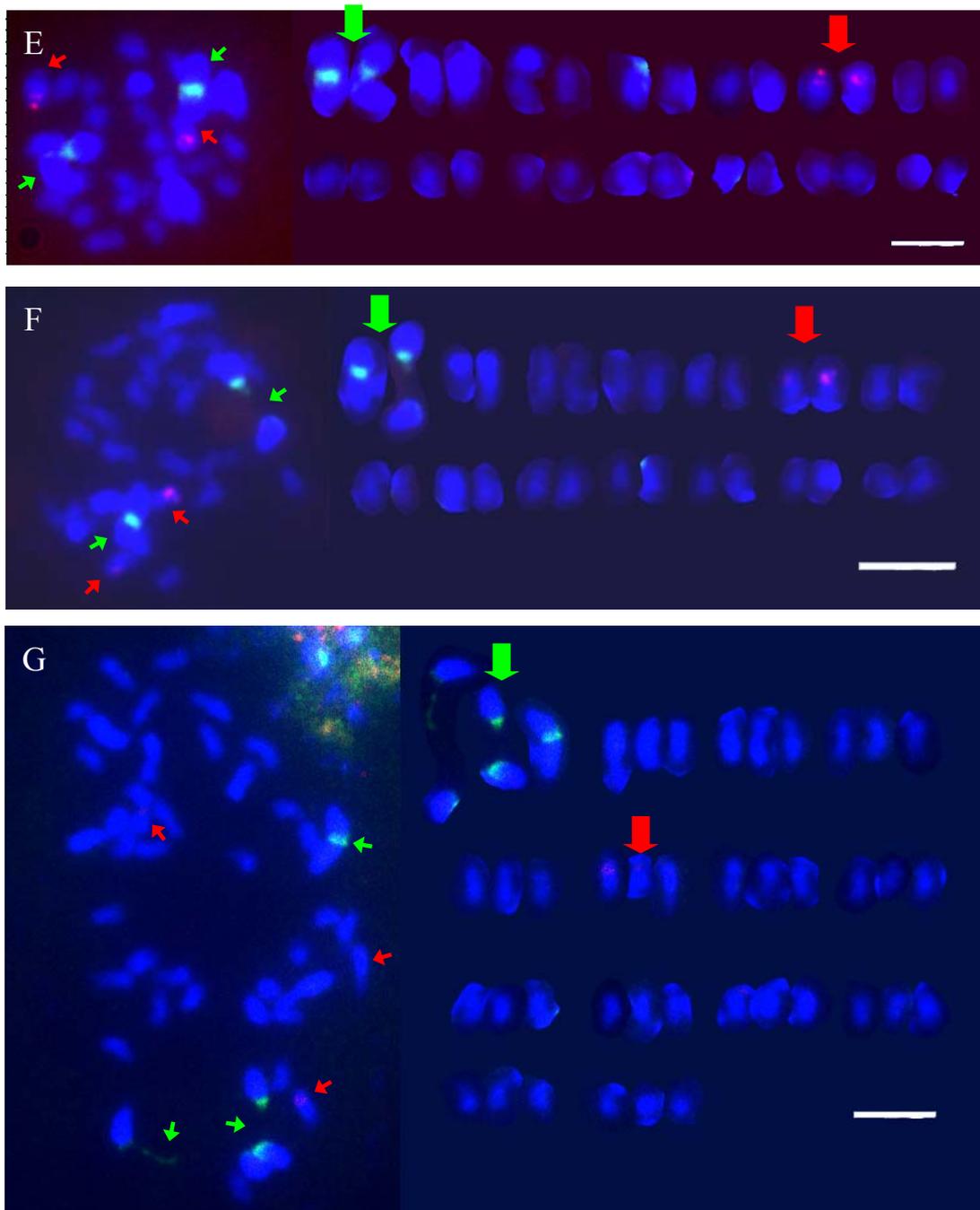


圖 4.2. (續) 以螢光原位雜交標記臺灣桑樹 18S-5.8S-26S (綠)及 5S (紅) rDNA 基因座於染色體的位置。(E)島桑‘台桑 1 號’,(F)島桑‘67C001-A’,(G)島桑‘67C001-B’。各品種(系)之原始 rDNA-FISH 圖譜表示於左,而相對應之核型則排列在右。尺標為 5 μ m。

Fig. 4.2.(continued) FISH localization of 18S-5.8S-26S (green) and 5S (red) rDNA loci on somatic metaphase chromosomes (blue) of (E) *M. australis* ‘Taisang No. 1’, (F) *M. australis* ‘67C001-A’, (G) *M. australis* ‘67C001-B’. For each accession, chromosome complements with rDNA-FISH signals were shown at left and respective karyotypes were arranged and shown at right. Bar 5 μ m.

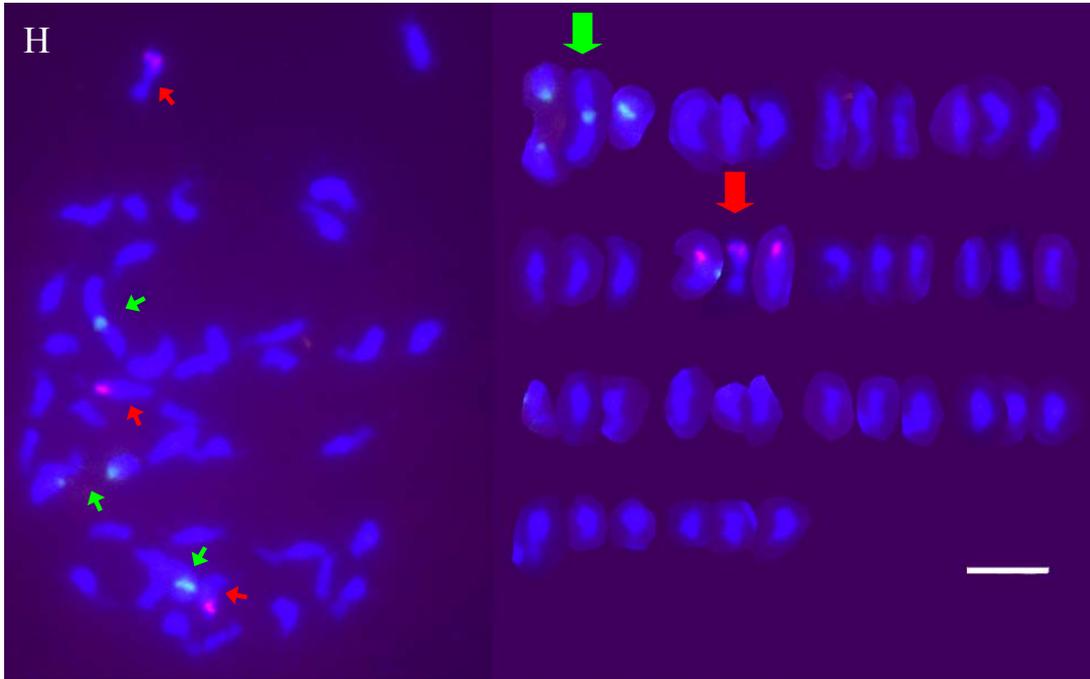


圖 4.2. (續) 以螢光原位雜交標記臺灣桑樹 18S-5.8S-26S (綠)及 5S (紅) rDNA 基因座於染色體的位置。(H)長果桑‘70C006’。各品種(系)之原始 rDNA-FISH 圖譜表示於左，而相對應之核型則排列在右。尺標為 5 μm 。

Fig. 4.2. (continued) FISH localization of 18S-5.8S-26S (green) and 5S (red) rDNA loci on somatic metaphase chromosomes (blue) of **(H)** *M. laevigata* ‘70C006’. For each accession, chromosome complements with rDNA-FISH signals were shown at left and respective karyotypes were arranged and shown at right. Bar 5 μm .

表 4.2. 白桑 (*M. alba*) 三個品種 (系) 之染色體量測值與核型分析*

Table 4.2. Measurements and calculated values in a representative karyotype of 3 *Morus alba* accessions.

variety	Chromosome	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		
枝垂桑 (<i>M. alba</i>)	短臂長	1.7	1.7	0.7	0.6	0.9	0.9	0.8	0.8	0.6	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.4	
	長臂長	1.9	1.9	1.4	1.4	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.3	1.0	1.1	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9	0.8	0.9	1.0	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.9	0.8	0.8	
	臂率	1.1	1.1	2.1	2.1	1.3	1.3	1.3	1.5	2.0	1.9	1.2	1.5	1.4	1.3	1.4	1.3	1.4	1.2	1.4	1.2	1.4	1.4	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	2.2	2.2	2.2
	相對長度	7.1	7.2	4.1	4.0	3.9	3.9	3.8	3.8	3.4	3.4	3.9	3.6	3.2	3.4	3.5	3.2	3.1	3.0	3.1	3.2	3.0	3.1	2.8	2.8	2.7	2.7	2.5	2.3	2.3	2.3
新一の瀨 (<i>M. alba</i>)	核型 ¹	m	m	sm	sm	m	m	m	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	sm	sm	
	短臂長	1.9	1.8	0.8	0.8	1.2	1.2	1.0	0.9	0.7	0.7	0.9	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4
	長臂長	2.1	2.0	1.8	1.7	1.3	1.4	1.2	1.3	1.2	1.3	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
	臂率	1.1	1.1	2.2	2.3	1.1	1.2	1.3	1.4	1.7	1.8	1.3	1.2	1.4	1.2	1.3	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.5	2.3	2.0	2.0
改良鼠返 (<i>M. alba</i>)	相對長度	7.2	6.9	4.5	4.4	4.4	4.5	3.9	4.0	3.6	3.6	3.6	3.3	3.4	3.3	3.5	3.1	3.1	3.1	3.0	2.9	2.7	2.5	2.8	2.8	2.6	2.6	2.7	2.2	2.4	2.4
	核型	m	m	sm	sm	m	m	m	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	sm	sm	
	短臂長	2.0	2.0	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	0.7	1.0	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.4	0.4	0.4
	長臂長	2.2	2.2	1.7	1.8	1.2	1.3	1.2	1.1	1.2	1.3	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8
改良鼠返 (<i>M. alba</i>)	臂率	1.1	1.1	2.1	2.2	1.2	1.3	1.2	1.1	1.9	2.0	1.2	1.4	1.4	1.2	1.5	1.2	1.3	1.2	1.3	1.2	1.3	1.4	1.5	1.2	1.3	1.1	1.1	2.0	2.6	2.6
	相對長度	7.7	7.7	4.4	4.6	3.9	4.1	4.1	3.7	3.4	3.6	3.8	3.4	3.2	3.2	3.1	3.2	3.1	3.0	3.1	2.9	2.6	2.8	2.6	2.6	2.7	2.9	2.7	2.2	2.3	2.3
	核型	m	m	sm	sm	m	m	m	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	sm	sm	sm

* 染色體形態分類命名參考 Levan *et al.*(1964). Chromosome nomenclature based on Levan *et al.*(1964)

表 4.3 烏桑 (*M. australis*) 及雜交桑 (*Morus spp.*) 四個品種 (系) 的染色體量測值與核型分析*
 Table 4.3. Measurements and calculated values in a representative karyotype of 4 mulberry accession (*M. australis* and *Morus spp.*).

variety	Chromo- some	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	
67C001-A	短臂長	2.1	2.4	0.9	1.0	1.4	1.4	1.2	1.2	0.8	0.8	1.3	1.1	1.0	1.1	1.1	0.9	1.0	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8	0.6	0.6	
	長臂長	2.5	2.5	2.1	2.4	1.9	2.0	1.5	1.4	1.6	1.7	1.5	1.6	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.2	1.2	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	0.9	1.2	1.1	
	臂率	1.2	1.0	2.4	2.5	1.3	1.4	1.3	1.1	1.9	2.2	1.1	1.4	1.3	1.2	1.2	1.6	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4	1.2	1.4	1.2	1.2	1.2	1.9	2.0	
	相對長度	6.5	6.9	4.1	4.7	4.7	4.9	3.8	3.6	3.3	3.5	3.8	3.8	3.4	3.4	3.4	3.2	3.2	3.0	2.9	2.9	2.7	2.7	2.7	2.9	2.7	2.4	2.6	2.3	
	核型	m	m	sm	sm	m	m	m	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	sm	sm	
台桑 一號	短臂長	2.0	1.9	0.9	0.9	1.2	1.3	1.1	1.1	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.5	0.5	
	長臂長	2.5	2.2	1.9	2.1	1.5	1.5	1.4	1.3	1.5	1.5	1.2	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0	0.9	0.9	1.1	0.9	
	臂率	1.2	1.1	2.3	2.3	1.3	1.2	1.3	1.2	1.9	1.8	1.3	1.4	1.4	1.3	1.2	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.5	1.4	1.4	2.2	1.9
	相對長度	7.2	6.7	4.5	4.8	4.4	4.6	4.1	3.8	3.8	3.7	3.3	3.2	3.2	3.1	3.1	3.2	3.1	3.1	2.9	3.0	2.9	2.9	2.8	2.8	2.8	2.5	2.4	2.5	2.3
	核型	m	m	sm	sm	m	m	m	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	
台桑 二號	短臂長	1.4	1.9	0.7	0.7	0.8	1.1	0.8	0.9	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.7	0.5	0.6	0.4	0.3	
	長臂長	1.7	1.9	1.7	1.4	1.2	1.1	1.0	1.1	1.3	1.1	0.9	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.7	0.9	0.8	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	
	臂率	1.2	1.0	2.6	2.1	1.5	1.1	1.3	1.3	2.0	1.7	1.3	1.3	1.0	1.3	1.4	1.5	1.1	1.3	1.1	1.2	1.2	1.2	1.5	1.4	1.0	1.3	1.3	2.1	2.6
	相對長度	6.5	7.8	5.0	4.3	4.1	4.6	3.8	4.2	3.9	3.5	3.4	3.1	3.2	3.3	3.2	2.9	2.8	3.0	3.2	3.0	2.7	3.0	2.8	2.9	2.5	2.6	2.5	2.1	
	核型	m	m	sm	sm	m	m	m	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	sm	sm	
台桑 三號	短臂長	1.7	1.8	1.0	0.7	1.4	1.3	1.1	1.1	0.8	0.7	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.6	0.8	0.7	0.7	0.6	0.4	0.4	
	長臂長	1.8	2.3	1.9	2.0	1.5	1.4	1.3	1.2	1.8	1.6	1.2	1.2	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9	0.9	0.8	0.7	0.9	0.9	
	臂率	1.0	1.3	2.0	2.8	1.1	1.1	1.2	1.1	2.2	2.2	1.4	1.5	1.2	1.2	1.2	1.3	1.2	1.2	1.2	1.3	1.6	1.5	1.4	1.1	1.3	1.3	2.3	2.3	
	相對長度	6.0	7.0	4.9	4.6	4.9	4.6	4.1	3.9	4.4	4.1	3.6	3.5	3.2	3.4	3.0	3.1	3.1	3.0	2.8	2.9	2.9	2.4	2.9	2.8	2.6	2.2	2.1	2.1	
	核型	m	m	sm	sm	m	m	m	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	sm	sm	

*染色體形態分類命名參考 Levan *et al.*(1964). Chromosome nomenclature based on Levan *et al.*(1964)

第一對染色體及第二對染色體中，皆見強烈的螢光訊號，尤其在第一對染色體中，近中節位置有兩條明顯的條帶。螢光訊號強的位置應為 AT-rich 區域，與 Giemsa 染色深的區域大致吻合。特別的是，在島桑‘台桑 1 號’中，亦觀察到在第三對染色體中，有一染色體短臂染色較深（圖 4.2(E)），在其他品種（系）中未有此現象，與 Giemsa 染色的結果一致。

4.5 討論

4.5.1 臺灣桑樹之核型

核型為每個種的特徵，不受染色體中小片段的突變而改變，可從種或族群間的核型資料如染色體數目、形態等，可作為推測物種親緣關係的參考（Dobigny, 2004; Guerra, 2008）。

桑屬植物之染色體研究始自 Tahara (1909)，他確認桑樹染色體基數 $x = 14$ 。參試品種（系）中，11 個品種（系）為 $2n = 2X = 28$ ，2 個品種（系）為 $2n = 3X = 42$ ，倍體數符合以流式細胞儀所進行的推斷，可知在桑樹中 DNA content 亦與染色體數目呈密切正相關。山桑‘劍持’、白桑‘枝垂桑’、‘新一の瀨’等染色體數目皆已報導過，與本研究結果相符。

各參試品種（系）中，二倍體核型皆為 $2n = 2X = 22 m + 6 sm$ ，三倍體則為 $2n = 3x = 33 m + 9 sm$ ，在第一對染色體近中節位置具核仁形成區，常見此段染色體鬆開，經 FISH 證實 18S-5.8S-25S rDNA 基因座落於此，而 5S rDNA 基因則位於第五組染色體之短臂上，種間核型差異不明顯。有趣的是，前人研究與本試驗結果不甚相同，蔣和朱（1985）認為山桑‘劍持’之核型 $2n = 2X = 24 m + 4 sm$ ，且次中位中節位於第二及十一對，而白桑‘新一の瀨’核型為 $2n = 2X = 24 m + 4 sm$ Susheelamma 等人（1990）則認為‘劍持’之染色體皆為中位中節，且魯桑之染色體皆為中位中節。Oginuma 等（1995）調查一島桑品系，核型為 $2n = 2X = 22 m + 6 sm$ ，但次中位中節染色體為第 8、9 及 12 對。由於早期核型分析乃將樣本鏡檢後進行

手繪，或是以較簡易的設備進行影像擷取，影像較為粗糙，染色體細節不清楚，而桑樹染色體約 1 - 4 μm ，中期染色體聚縮緊密，以當時技術測量不易，可能才造成觀察結果不同。

臺灣遺傳歧異較大的白桑、島桑、長果桑及廣東桑之 rDNA 分佈無顯著差異，Liu 等 (2005) 曾調查同為桑科但不同屬的 *Ficus carica* ($2n = 26$)，其 18S-5.8S-26S rDNA 位於第一對染色體短臂之近中節處，雖然此二屬之染色體數目有明顯差異，但之分佈類似，推測桑科植物之染色體 45S rDNA 分佈未受大幅度地重組，其分佈才如此一致。Kumekawa 等 (2004) 曾以 5S rDNA 的探針標記其於魯桑 'Garyuu' 染色體的位置，但未進一步比較種間差異。本試驗比較各種間 18S-5.8S-26S 及 5S rDNA 之分佈，未有觀察到分佈的多型性。

4.5.2 桑樹之性別決定

被子植物中約 4 ~ 6 % 為雌雄異花異株 (Yampolsky *et al.*, 1922; Renner *et al.*, 1995)，數量雖少卻分散於植物界分類之不同分支系統中 (Charlesworth *et al.*, 1994)。蠅子草和酸模為性別決定的模式植物，性別表達穩定，具有異型的性染色體，而性別決定機制由性染色體上的基因控制。另有物種之性別表現由基因決定，但環境因子亦可能影響性別之表現，如番木瓜、菠菜等。番木瓜之株型為雌株、雄株及兩性株，具有較原始的同型性染色體，遺傳上係由性染色體決定性別 (Ming *et al.*, 2007)，番木瓜雄、雌株的性別表現穩定，除雄株在花序末端，有時會產生雄蕊心皮化的現象，而兩性株則易受到環境因子如溫度、溼度及養分狀況之影響，發生性別轉換 (OECD, 2003)。桑樹性別遺傳研究較少，但株性與番木瓜類似，具雌株、雄株及兩性株，雌雄異株品種 (系) 的性別表現每年大致穩定，但兩性株品種 (系) 也常受外在因子如溫度、日長、濕度、化學物質、人工修剪等影響而發生性別轉換 (南澤, 1976; Ravindran *et al.*, 1987)，若以藥劑進行多倍體誘變，亦可能改變桑樹之性別 (Sirdar *et al.*, 1988; Dwivedi *et al.*, 1988)。

本試驗所調查之品種 (系) 中，白桑 '改良鼠返'、島桑 '台桑 1 號' 及雜交桑 '台

桑 3 號’為穩定的單性雄株，白桑‘枝垂桑’、島桑‘67C001-A’及雜交桑‘台桑 2 號’則為穩定的單性雌株，而白桑‘新一の瀨’依據日本桑樹種原庫的記載（NIAS genebank, 2009）為雄株，而今年度的調查中，‘新一の瀨’春季萌發的花為雄花，在修剪後，萌出來的花卻為兩性花，花性表現不穩定，無法由目前的資料斷定其為雄株或兩性株。

桑樹性別決定的遺傳模式未有定論，Sinoto (1929) 調查山桑 (*M. bombycis* L.) 的染色體，認為桑第一對染色體為異形的性染色體，且其性別決定之機制，應類似蠅子草 (*Silene latifolia* Poir.)，由 Y 染色體的存在與否決定性別。但關 (1956) 調查不同株性桑樹品種 (系) 的核型，觀察到形態一致的第一對大染色體，從中幾乎無法觀察到差異，Gill 等 (1979) 亦進一步觀察到該染色體在雄株及雌椴品系減數分裂時，皆會形成一價體，認為此對染色體應與性別無關，認為桑樹的性別係可能由遺傳及環境影響，但可能無法從染色體層次得知，後續儲和孫 (1985) 曾觀察到桑樹第三對染色體有異形染色體，但眾說紛紜，未有定論。本試驗結果亦確認桑樹之第一對染色體非異型染色體，而第一對染色體常可見有一條鬆開的情況，而染色體鬆成兩小段，各段長度約為 1-2 μm ，與其它對染色體長度相差不多，可能前人在觀察時錯判為異型染色體。

本試驗在不同株性的白桑、島桑及雜交桑品種 (系) 未觀察到顯著的核型差異，唯島桑及雜交桑單性雄株品種 (系)，可見第三對染色體有一染色體短臂的染色較深，而單性雌株品種 (系) 第三對染色體之染色皆較淺，但白桑中，不同株性品種 (系) 的第三對染色體無染色深淺的差異，可見此特徵並非為桑樹中普遍的情況，此對染色體與性別之關連性可能不高。此外染色體染色深之原因，一為該部份屬重複性序列之異染色質區，另一推測可能是該段基因經不活化，如甲基化等作用，而使該段基因收縮緊密，才呈現染色較深的結果，此外，DNA 甲基化可能具有種、組織、器官及生長發育之特異性 (Vanyushin, 2006)，尚需後續研究瞭解。

4.6 結論

核型為基因體在組成、構造及功能上經許多變動而成的最終結果，從種或族群間的核型資料如染色體數目、形態等，可以瞭解物種及種間之親緣關係。本試驗針對臺灣桑樹種原，利用 Giemsa 染色進行核型分析，並利用螢光原位雜交技術標記桑樹之 18S-5.8S-25S 及 5S rDNA 基因在桑樹葉芽細胞染色體上的分佈。結果顯示山桑、島桑、臺灣桑、廣東桑、長果桑、魯桑、白桑及雜交桑之核型大致相同，染色體大小為 1 - 4 μm ，第一對染色體近中節之短臂具有核仁形成區，染色體第 2、5 及 14 對染色體為次中位中節，其餘皆為中位中節染色體。有趣的是，在不同株性的白桑、島桑及雜交桑中，僅在島桑及雜交桑中單性雄株之品種（系），觀察到第 3 對染色體有一條染色體之短臂染色較深，但不同株性的白桑品種（系）中則無此差異，仍需進一步深入瞭解。以 18S-5.8S-25S 及 5S rDNA 基因為探針進行螢光原位雜交，結果顯示白桑、廣東桑、長果桑及島桑之 rDNA 分佈一致，18S-5.8S-25S rDNA 基因皆位於第一對染色體近中節之短臂，與次級縊縮點位置吻合，而 5S rDNA 基因則是在第六對染色體短臂上，重複數較少，訊號不明顯。

4.7 參考文獻

- 張哲嘉. 2006. 臺灣桑樹之分類及品種改良. 臺灣園藝 52:377-392.
- 儲瑞銀、孫曉霞. 1986. 桑屬植物細胞遺傳學的研究 I. 部分桑品種的染色體數. 12: 199-202.
- 儲瑞銀、孫曉霞. 1987. 桑屬植物細胞遺傳學的研究 II. 四個桑品種的核型分析. 13: 129-132.
- 蔣同慶、朱勇. 1985. 二倍體桑樹的核型分析. 蠶學通訊 1985(3):9-17.
- 小泉源一. 1917. 桑屬植物考. 蠶試報 3:1.
- 大澤一衛. 1916. 桑の細胞學并に實驗的研究. 蚕試報告 1:215-292.
- 南澤吉三郎. 1976. 栽桑學. p.108-114. 鳳鳴社. 東京. 日本.
- 關 博夫. 1956. 桑樹の性染色体について. 日蚕雜. 25:191. (予報)
- 關 博夫. 1959. 桑屬植物の細胞學的研究. 信州大織紀要. 20:1-91.
- Bureau, E. 1873. Moraceae, p.211-288. In: A. De Candolle (ed.). Prodrum Systematis Naturalis Regni Vegetabilis. Vol. 17. Bibliople apud medicine academiam, Paris, France.
- Carvalho, R., W. S. Soares Filho, A. C. Brasileiro-Vidal, and M. Guerra. 2005. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. Cytogenet Genome Res. 109:276-282.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. Heredity 88:94-101.
- Dandin, S. B. 1998. Mulberry: a versatile biosource in the service of mankind. Acta Sericologica Sinica 24:109-113.
- Dobigny, G, J-F Ducroz, T. J. Robinson, and V. Volobouev. 2004. Cytogenetics and cladistics. Syst. Biol. 53:470-484.
- Gill, B. S. and R. C. Gupta. 1979. Cytological studies in the sex types of *Morus alba* L. (Moraceae). Current Sci. 48:35-36.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. Cytogenet. Genome Res. 120:339-350.
- Linné, C. 1753. *Morus*, p.968. In: C. Linné (ed.). Species plantarum. Vol. 2. Stockholm, Sweden.
- IPNI. 2009. The International Plant Names Index: *Morus* L. 1 Jun. 2009. < <http://www.ipni.org> >

- Kao, F.-I., Y.-Y Cheng., T.-Y. Chow, H.-H. Chen, S.-M. Liu, C.-H. Cheng, and M.-C.Chung. 2006. An integrated map of *Oryza sativa* L. chromosome 5. *Theor. Appl. Genet.* 112:891-902.
- Kumekawa, N. and K. Oshigane. 2004. Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosomes of mulberry species with the diploid genome. *Genes Genet. Syst.* 79:387. (Abstract)
- Ming, R., Q. Yu, and P. H. Moore. 2008. Sex determination in papaya. *Seminars cell dev. Biol.* 18:401-408.
- NIAS genebank. The list of mulberry accession in germplasm. 28 Mar. 2009. <<http://www.gene.affrc.go.jp/ex-nises/mulberry/mulberryindex.html>>
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2003. Draft Consensus Document on the Biology of *Carica papaya* (L.) (Papaya). 2 Jun. 2009. <http://www.oecd.org/home/0,3305,en_2649_201185_1_1_1_1_1,00.html>
- Oginuma, K. and H. Tobe. 1995. Karyomorphology of some Moraceae and Cecropiaceae (Urticales). *J. Plant Res.* 108:313-326.
- Renner, S.S. and R.E. Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *Amer. J. Bot.* 82:596-606.
- Sinoto, Y. 1929. Chromosome studies in some dioecious plants with special reference to *Allosome*. *Cytologia* 1:109-199.
- Susheelamma, B. N., J. S. Kumar, S. B. Dandin, M. S. Jolly, K. Sengupta, and R. Raju. 1990. Karyomorphological studies in a few exotic varieties of genus *Morus* L. *Cytologia* 55:107-114.
- Sybenga, J. 1992. The somatic chromosome complement: karyotype analysis, p.65-100. In: J. Sybenga (ed.). *Cytogenetics in plant breeding*. Springer-Verlag, New York, USA
- Tahara, M. 1910. Ueber die Kernteilung bei *Morus*. *Bot. Mag. Tokyo* 24: 281- 289.
- Yampolsky, C. and H. Yampolsky. 1922. Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genet.* 3:1-62.
- Zhao, W., Y. Pan, Z. Zhang, S. Jia, X. Miao, and Y. Huang. 2005. Phlogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and trnL-F sequences. *Afr. J. Biotechnol.* 4:563-569.
- Zhao, W., Y. Wang, T. Chen, G. Jia, X. Wang, J. Qi, Y. Pang, S. Wang, Z. Li, Y. Huang, Y. Pan, and Y.H. Yang. 2007. Genetic structure of mulberry from different

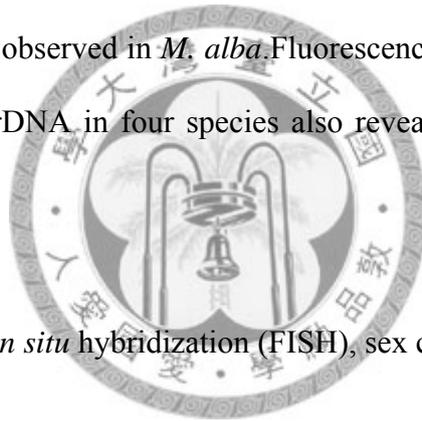
ecotypes revealed by ISSRs in China: An implications for conservation of local mulberry varieties. *Sci. Hort.* 115: 47–55.



4.8 Abstract

Karyotypes of 13 accessions from 7 species were assessed and the genomic distribution of 5S and 18S-5.8S-25S rDNA of 4 species were determined by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). There was no significant difference in karyotypes among species. Among the 14 pairs of chromosomes, chromosome 2, 5, 14 are submetacentric (sm) while the others are metacentric (m). A secondary constriction was observed near the centromere and on the p-arm of chromosome 1. The different sexual accessions of *M. alba*, *M. australis* and mulberry hybrids were also investigated. In *M. australis* and some mulberry hybrids, one p-arm of chromosome 3 showed dark staining in male but not in female plants. However, the difference in banding pattern between sex types was not observed in *M. alba*. Fluorescence *in situ* hybridization of 5S rDNA and 18S-5.8S-25S rDNA in four species also revealed the resemblance among *Morus* species.

Key words: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), sex chromosome, heterochromatin



第五章 總結及未來展望

Chapter 5. General conclusion and future studies



第五章 總結及未來展望

桑樹 (*Morus spp.*) 為近年來漸受重視之作物，多為雌雄異株，藉風行異花授粉，遺傳質高度異質，生長勢強，易馴化而衍生出不同生態型，遺傳背景複雜 (Dandin, 1998; Zhao *et al.*, 2007; 吳, 1977; 曾和吳, 1982)。臺灣之桑樹種原多元，除了島桑和臺灣桑等在地種，亦自日本引入之白桑、魯桑及山桑，和自中國引入之廣東桑及長果桑 (張, 2006)。

由於臺灣舊有的分類系統係以雌花為主要分類性狀，不適用於雄株品種 (系)，亦發現部份品種 (系) 不符合分類系統中所描述性狀，如常綠的台桑 2 號、台桑 3 號被歸於休眠性深的白桑 (張, 2006)。此外，傳統以「定性」方式進行分類，常受形態特徵的主觀認定及認定的先後順序，或以單一性狀進行分類，而影響最終分類結果 (徐, 1996)，本試驗利用客觀的數量分類學，量測分類單位眾多的生物性狀，以數量化的方式描述之，再運算分類單位之間的相似度，將分類單位重新組合，說明彼此的親緣關係，並以分析結果作為基礎進行分類 (徐, 1996; 翁, 2001)。參試品系涵蓋 7 個種，少數雜交桑和未鑑定桑共 26 個品種 (系)，調查 21 個營養性狀並經群集分析及主成份分析，結果顯示臺灣桑樹可明顯分為三大群，第 1 群為長果桑，第 2 群則包含廣東桑、山桑、島桑及臺灣桑，第 3 群則為白桑及魯桑。其中第二群可再細分為二子群，一為廣東桑，另一為山桑、島桑及臺灣桑，而每一群內的種原親緣關係較近。針對主成份分析之結果，挑選出葉寬、葉長葉寬比、葉柄寬、休眠需冷量、生長中芽形、休眠芽形、葉色、葉緣及葉尖等 9 個分類代表性狀，歸納出不受株性所限的桑樹分類檢索表，供田間使用。

種原庫有少數品種 (系) 之葉、枝條等性狀特別大於其他品種 (系)，並具不稔及著果不良的情形，疑為多倍體 (張, 2006)。以流式細胞儀分析參試品種 (系) 之 DNA 含量並估算倍體數。結果大致分為兩類，山桑、白桑、魯桑、島桑、臺灣桑及廣東桑之 DNA 含量為 0.61-0.71 pg/2C，屬於二倍體。而 '70C007' (*M. laevigata*)

為三倍體，DNA 含量為 1.06 pg/2C。‘67C001’ (*M. australis*) 觀察到基因組各為 0.63 pg/2C 的二倍體株，及 0.98 pg/2C 的三倍體株，形態上的差異係因倍體數不同造成。二倍體及三倍體在葉寬、葉柄寬及節間長等性狀會隨著倍數體增加而增加，可作為鑑別三倍體之評估性狀。因桑樹染色體較小，未能從 DNA 含量區分非整倍體及不同的核型系統，為確定其染色體數目，仍需核型分析鑑定。

核型為物種一穩定的特徵，從種或族群間的核型資料如染色體數目、形態等，可以更為瞭解物種及種間之關係 (Dobigny, 2004; Guerra, 2008)。本試驗調查臺灣桑樹 7 個種及雜交桑等 13 個品種 (系) 的染色體核型，並觀察具高保守性及重複性多的 5S rDNA 及 18S-5.8S-25S rDNA 之分佈，結果顯示山桑、島桑、臺灣桑、廣東桑、長果桑、魯桑、白桑及雜交桑之 13 個品種 (系) 核型在無明顯差異，其 14 對染色體中，第二、五及十四對染色體為次中位中節，其餘為中位中節染色體。本研究亦有調查白桑、島桑及雜交桑不同株性品種 (系) 之染色體，在白桑、島桑及雜交桑之中，染色體核型皆一致，唯島桑及雜交桑中單性雄株之品種 (系)，皆觀察到第三對染色體有一條染色體之短臂染色較深，而單性雌株品種 (系) 則無此現象，但白桑不同株性之品系間，染色條帶未有差異，其與性別之關連尚待後續研究瞭解。島桑、廣東桑、長果桑及白桑之 rDNA 分佈皆為一致，18S-5.8S-25S rDNA 位於第 1 對染色體近中節之短臂，而 5S rDNA 則分佈在第 6 對染色體短臂上，種間核型及 rDNA 分佈皆一致。

由上述研究可知，臺灣桑樹種原在外部型上有顯著差異，可利用營養性狀將桑樹進行分類，而不受限於株性，其中有部份品種 (系) 的外觀形態特別大，且不稔，乃為倍數化所致。

臺灣桑樹用途多元，如山桑‘劍持’，其葉質良好，為日本常用之葉桑品種 (系)，亦有報導指出其藥用價值；島桑及臺灣桑終年常綠，一年可多次採葉，為良好之葉桑種原；白桑及魯桑的品種 (系) 在日本常作為葉用桑，亦有做為觀賞用的品系，如枝條彎曲的‘74C005’ (雲龍桑)、枝條倒伏的‘69C002’ (枝垂桑) 及作為賞果

用，具白色果實的‘白果桑’，此外，近來針對白桑之藥用價值，也進行相當多研究（王, 2003; Asano *et al.*, 1994）。臺灣近年開始重視果桑育種，現有種原以長果桑、廣東桑及白桑具果桑育種潛力。長果桑因果實長 5 公分以上而得名，糖度可達 15-20°Brix，而歸屬於廣東桑的‘46C019’、‘苗栗 1 號’及‘93C203’可大量結實且果實品質優良，白桑具有白色及紫色的果實，果實糖度高而低酸，亦為其他國家常栽植之果桑種原（張, 2006）。

從本實驗之結果顯示，臺灣現有種原之親緣接近，為提高國內種原之遺傳雜異度，可自土耳其、美洲等地引入黑桑及紅桑，以豐富臺灣桑樹之基因庫。土耳其近來針對當地黑桑及紅桑品種（系）進行品質分析，果實抗氧化力高，機能性價值高（Ercisli *et al.*, 2007; Özgen *et al.*, 2009），黑桑顏色特殊，果實多汁微酸，風味獨特，而紅桑含較多乾物質，風味偏甜且低酸，此二種果實風味有別於臺灣現有品種（系），具有育種潛力。

桑樹多為雌雄異株，其性別決定可能受到環境的影響而改變，但遺傳本質之決定因子亦為一重要的訊息，試驗中觀察到不同株性的烏桑與雜交桑品種（系），在第 3 對染色體有所差異，但在白桑不同株性品系中未見此差異，與性別決定之關連尚待研究釐清。

參考文獻

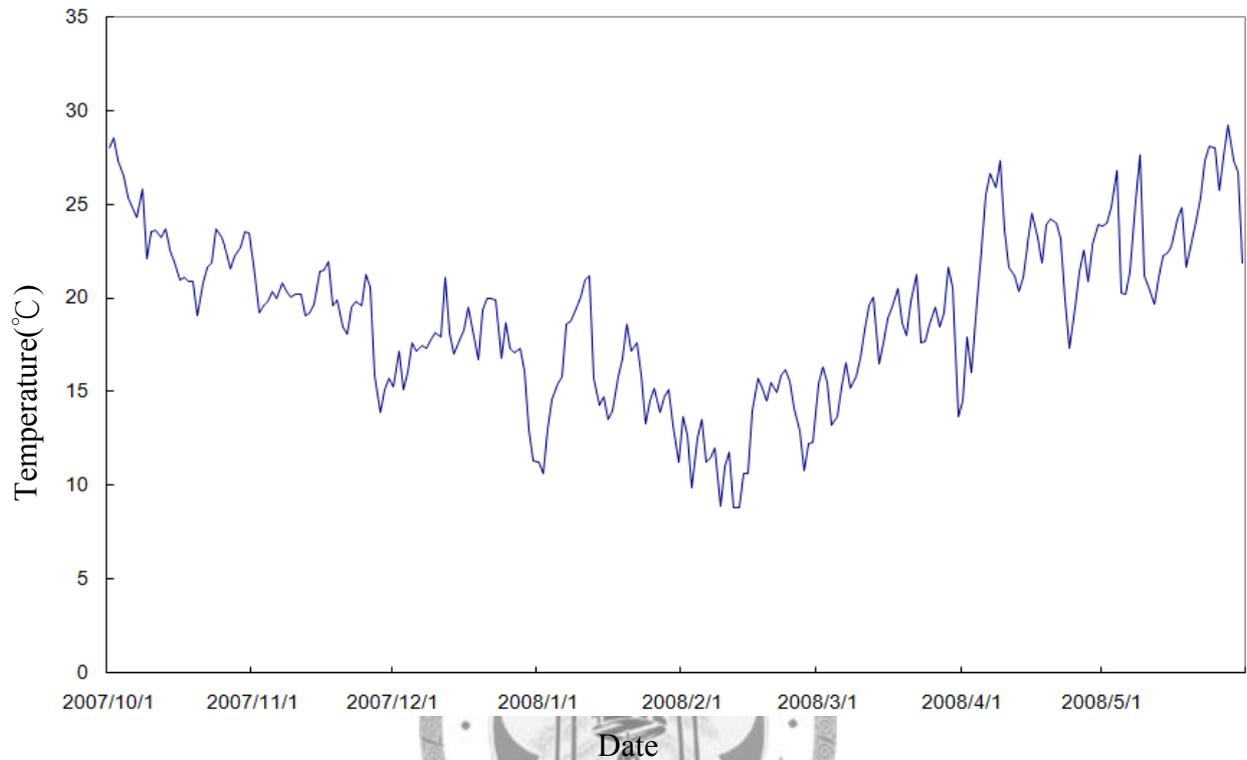
- 吳登楨. 1977. 桑樹之品種改良. 科學農業 25:242-244.
- 徐克學. 1996. 數量分類學. 水產出版社. 基隆市.
- 翁儷倩. 2001. 柑橘遺傳歧異性之分析. 國立臺灣大學園藝所碩士論文. 90pp.
- 張哲嘉. 2006. 臺灣桑樹之分類及品種改良. 臺灣園藝 52:377-392.
- 曾富生、吳登楨. 1979. 臺灣野生桑樹 (*Morus acidosa* Griff.) 農藝性狀之變異. 興大農藝學報 4:39-45.
- Dandin, S. B. 1998. Mulberry: a versatile biosource in the service of mankind. Acta Sericologica Sinica 24:109-113.
- Dobigny, G, J-F Ducroz, T. J. Robinson, and V. Volobouev. 2004. Cytogenetics and cladistics. Syst. Biol. 53:470-484.
- Ercisli, S. and E. Orhan. 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. Food Chem. 103: 1380-1384.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. Cytogenet. Genome Res. 120:339-350.
- Özgen M., S. Serçe, and C. Kaya. 2009. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. Sci. Hort. 119:275-279.
- Venkataraman, K. 1972. Wood phenolics in the chemotaxonomy of the Moraceae. Phytochemistry 11: 1571-1586.
- Zhao, W., Y. Wang, T. Chen, G. Jia, X. Wang, J. Qi, Y. Pang, S. Wang, Z. 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.

附錄

Appendix



附錄一、臺灣桑樹需冷量評估



附圖一、調查期間（2007/11/10～2008/4/10）苗栗公館地區之日均溫變化
Variation of temperature during experiment period (2007/11/10～2008/4/10) in
Gongguan, Maioli.

附表一、臺灣低需冷量評估之溫度準據

The criteria for calculating chill units values of Taiwan models.

Chill unit values	Corresponding temperatures (°C)
1.0	≤ 7.2
0.5	7.3 ~ 15.0
0	15.1 ~ 26.6
-0.5	26.7 ~ 27.8
-1	> 27.8

(歐與陳, 2000)

附表二、臺灣桑樹 26 個品種 (系) 之休眠需冷量估算值^a

Estimated chilling units of 26 mulberry accessions in Taiwan.

種 (Species)	品種 (系) (accessions)	累積 需冷量 (CU) ^a	種 (Species)	品種 (系) (accessions)	累積 需冷量 (CU) ^a
<i>M. laevigata</i>	70C006 (長果桑)	480	<i>M. bombycis</i>	劍持	516
<i>M. atropurpurea</i>	46C019	420	<i>M. formosensis</i>	58C398	0
	46C020	420		58C475	0
<i>M. alba</i>	苗栗 1 號	216	<i>Morus spp.</i>	67C002	0
	69C002 (枝垂桑)	516		68H ₂₂ 021	84
	新一の瀨	516		68H ₂₂ 033	216
	改良鼠返	516		74H ₂ 006	132
<i>M. latifolia</i>	38C001 (湖喜)	492	74H ₂ 047	84	
	厚葉綠	516	93C203	408	
	74C005 (雲龍桑)	504	94C001	504	
<i>M. australis</i>	台桑 1 號	0	台桑 2 號	0	
	58C307	0	台桑 3 號	0	
	67C001-A	0	白果桑	516	
	67C001-B	0			

^a 以臺灣低需冷模式(歐及陳,2000) 估算出之累積需冷量

附錄二、桑樹營養性狀之鑑定

(1) 休眠芽形

1. 正三角形



新一の瀨 (*M. alba*)

2. 長三角形



46C019 (*M. atropurpurea*)

3. 卵形銳角



70C006 (*M. laevigata*)

(2) 生長中的芽形

1. 簇形



38C001 (*M. latifolia*)

2. 箭形



46C019 (*M. atropurpurea*)

(3) 新芽顏色

1. 綠色



新一の瀨 (*M. alba*)

2. 偏紅色



58C475 (*M. formosensis*)

3. 偏紫色



46C019 (*M. atropurpurea*)

圖附一、桑樹 (1) 休眠芽形及 (2) 生長中芽形 (3) 新芽顏色 之形態分級。尺標為 1 公分。

Morphological grades of qualitative traits : (1) Bud shape in dormant and (2) in growing state, and (3) color of emerging buds in mulberry. Bar 1cm.

(4) 葉片缺刻

1. 無缺刻



厚葉綠 (*M. latifolia*)

2. 有缺刻



劍持 (*M. bombycis*)

(5) 成熟葉片顏色

1. 深綠色



厚葉綠 (*M. latifolia*)

2. 綠色



新一の瀨 (*M. alba*)

(6) 葉形

1. 橢圓形



70C006 (*M. laevigata*)

2. 心臟形



厚葉綠 (*M. latifolia*)

圖附一(續)、桑樹 (4) 葉片缺刻 及 (5) 葉色 (6) 葉形 之形態分級。尺標為 1 公分。

(continued) Morphological grades of qualitative traits : (4) Leaf serrate , (5) leaf color, and (6) leaf shape in mulberry. Bar 1cm.

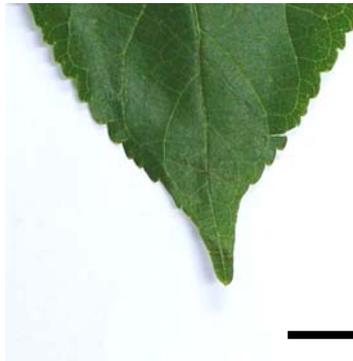
(7) 葉尖

1. 尖頭狀



新一の瀨 (*M. alba*)

2. 短尾狀



46C019 (*M. atropurpurea*)

3. 長尾狀



67C001 (*M. australis*)

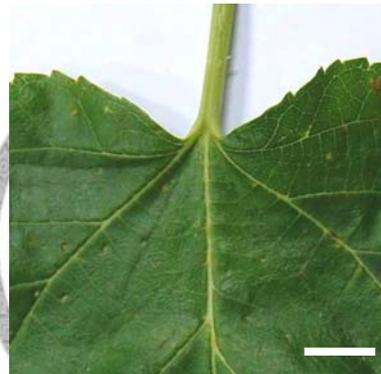
(8) 葉基

1. 直線形



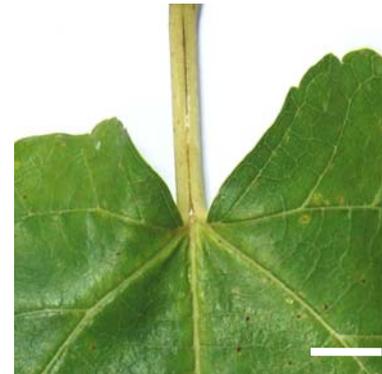
46C019 (*M. atropurpurea*)

2. 淺彎形



台桑 1 號 (*M. australis*)

3. 深彎形



新一の瀨 (*M. alba*)

(9) 葉緣

1. 細鋸齒



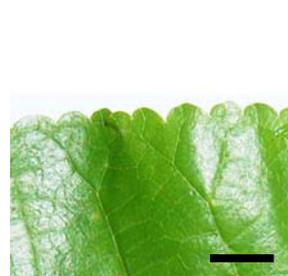
70C006
(*M. laevigata*)

2. 牙狀鋸齒



58C475
(*M. formosensis*)

3. 圓鋸齒



新一の瀨
(*M. alba*)

4. 鈍鋸齒



74C005
(*M. latifolia*)

圖附一(續)、桑樹 (7) 葉尖 及 (8) 葉基 (9) 葉緣 之形態分級。尺標為 1 公分。
(Continued) Morphological grades of qualitative traits : Shape of (7) leaf tip , (8) leaf base, and (9) leaf margin in mulberry. Bar 1cm.

(10)一年生枝條顏色

1.灰色

2.黃褐色

3.黑褐色



新一の瀨 (*M. alba*)



69C002 (*M. alba*)



70C006 (*M. laevigata*)

(11)主莖色

1.灰色



74C005 (*M. latifolia*)



2.黃褐色



新一の瀨 (*M. alba*)

圖附一（續）、桑樹 (10) 一年生枝條顏色 及 (11) 主莖色 之形態分級。尺標為 1 公分。

(Continued) Morphological grades of qualitative traits : Color of (10) the one-year shoot and (11) the trunk in mulberry. Bar 1cm.