

RAPD技術 是蘭科植物種源鑑別的利器

鳳山熱帶園藝試驗分所／邱金春

農業品種改良的效果取決於作物是否有可供利用的遺傳特性及遺傳變異幅度大小，因此種原的收集和保育在農業上非常重要。尤其是近年來地球生態環境急遽改變，使得許多植物種原正面臨絕種，因此世界各國均致力於加強植物種原的調查、收集及保存。此外，育種家辛苦培育出的新品種，更需要有一個完整精確的品種特性指標，以維護其專利權益；而種苗公司為了避免品種的混淆，更需建立精確的品種純度鑑定方法，作為種苗（種子）大量生產之品管指標。因此，發展一種快速、便捷、精確的種原鑑定方法，已成為推動農業科技研究發展的重要工作之一。

蘭科植物雖然在幾個世紀前就已經被植物學家所發現，但是在遺傳特性方面，至今仍然未被完全瞭解，因為族群數量非常龐大，且原產地分佈在世界各地，使得蘭科植物的種原收集不易；除此之外，花器構造高度特化複雜、植株生長速度緩慢、幼年性長等等因素，都使得蘭科植物的分類研究的進行比其他植物更困難。

如同其他花卉作物，蘭科植物在園藝栽培上，也常依據植株的生長習性、開花習性、原生地、栽培方式、花型等

指標加以分類，以便於作物的栽培管理，然而這種實用分類法並不能真正地區別不同蘭科植物特性上的差異。植物分類學上，傳統的鑑別方法多以植株的外部形態特性，如葉形、葉序、葉數、假球莖等性狀及花器的形態構造，作為分類的依據，其中又以花器的形態構造如花被、花序、蕊柱、花粉、子房等性狀，最常作為蘭花分類的指標。但植株外表形態的表現，除了受內在遺傳物質所控制外，也會受到外在環境因子及植株本身營養狀況所影響，使得種苗外表型態的表現可能有所差異，導致不同研究人員依據植物外表性狀所建立的分類檢索表，並不完全一致。因此對蘭科植物而言，若能發展一套精確的種苗鑑別技術，將有助於蘭科植物學術上的研究及產業上的應用。

去氧核糖核酸(DNA)是生物體最基本的遺傳物質，大量存於細胞核內的染色體上，經轉錄、轉譯等一連串生化反應過程後形成蛋白質，而後蛋白質再進行一系列的生理反應而表現出外表特性。不同的物種，其DNA組成有一定的序列，不容易受到外在環境影響而改變。因此，若能在分子層次上的標誌直接辨識植物的基因型差異，不僅解析度



台灣擁有許多原生石斛蘭種源，若積極加以改良發展成盆花品種，具有外銷潛力。RAPD技術可直接鑑別基因上的差異，有助於育種專利權之維護

靈敏，而且由於DNA在同一植物的各個器官、細胞都是相同，不會受到外在環境或植物生理年齡的影響，其分析的結果會更具有準確性。近年來由於分子生物學的不斷累積，更精密的儀器陸續被研發成功，因而帶動生物技術的相關研究發展突飛猛進。

聚合酵素連鎖反應（polymerase chain reaction, 簡稱PCR）技術為Kary Mullis於1984年首先開發成功，主要是應用DNA聚合反應，反覆地進行DNA的合成。早期的PCR反應，是以大腸菌的DNA聚合酵素進行實驗，但由於此類酵素不耐高溫，因此需要在每一循環過程中重新添加酵素，造成實驗的不便與效率的降低。直到1988年由溫泉中分離出嗜熱菌*Thermus aquaticus*，得到耐高溫的聚合酵素後，才使得PCR反應可以自動化，在幾個小時內準確地進行DNA片段的大量複製，以利於實驗的檢測，從此PCR技術才有劃時代的發展，走向真正實用的領域。

隨機增殖多型性DNA分子標誌（randomly amplified polymorphic DNA,

簡稱RAPD）技術是由PCR技術發展出來，屬於分子標誌技術之一，於1990年由Williams等人提出。一般植物的基因組大小約 $10^8 \sim 10^{10}$ 鹼基對，RAPD分析通常使用一組隨意設計的DNA小片段作為引子，來誘導進行PCR反應；在適當的溫度條件下，經由熱循環儀器反複合成DNA大片段，達到DNA片段的大量複製效果，通常以5~10個條帶最為普遍。所得到的PCR產物，因DNA片段大小不同，使得在洋菜膠體電泳移動速度有快慢之分，而可加以分離；經藥劑染色後，置於紫外光下，可看到不同大小的DNA增殖片段，於紫外光下照相製成RAPD的電泳條帶圖譜。RAPD圖譜會因引子不同及植物基因型的差異而有不同的變化，所以RAPD分子標誌技術可以作為判定兩物種間異同的工具之一。

由於RAPD可以直接辨識植物基因層次的差異，分析結果不受環境或取樣部位不同而影響，而且可在植物的任何



文心蘭是重要外銷花卉之一，RAPD技術可解明不同種源間的親緣關係，以作為育種之參考



10種蕙蘭屬不同種間RAPD親緣性樹狀圖

→ 生育階段進行偵測，具有操作程序簡便及鑑識效力強的特點，因此應用的範圍非常廣泛。因RAPD技術可以直接辨識基因型的差異，所以極適合於鑑別血緣相近的作物，並透過RAPD圖譜進一步分析種原間之遺傳歧異度，而解明不同種原間的親緣關係，可作為育種之參考。

除了應用於不同植物種間、品種間的品種鑑定、純度分析，作為鑑別種原及控制種苗品質的例行性分析工作外，

也應用於特定基因研究、建立基因連鎖群圖譜及基因遺傳工程上轉殖植物的鑑定篩選等，有助於植物族群分析、育種與系統發生學之相關研究。由於RAPD分子標誌在多種植物上，如玫瑰花、

菊花、矮牽牛、海芋等，都可以在不同種原間顯示不同的DNA條帶圖譜，作為區別種原的指標，亦可應用在蘭科植物如蝴蝶蘭、嘉德麗雅蘭、文心蘭、石斛蘭、國蘭等的種原鑑別。

以蕙蘭屬為例，在幼苗期即可以取極小部份葉片組織萃取DNA進行RAPD分析。四季蘭、寒蘭、觀音素心蘭、鳳蘭、報歲蘭、東亞蘭、金稜邊、春蘭、菅草蘭、綠花竹柏蘭等10種蕙蘭屬種原，以20組隨意短DNA片段引子進行



小型蕙蘭又稱「國蘭」，花具有香氣且葉型優美，許多小型蕙蘭產自台灣，是我們寶貴的資源之一。RAPD技術可作為種苗大量生產之品管指標

PCR反應後，都可由其產物分析篩選出能有效地區別種原之間差異性的RAPD電泳條帶圖譜。經進一步分析種原間遺傳的連鎖關係，10種蕙蘭屬種原其相似性係數介於0.39至0.75大致可分為4

群。地生蘭類的蕙蘭種原包括四季蘭、觀音素心蘭、寒蘭、報歲蘭、菅草蘭為第一群；第二群為春蘭與綠花竹柏蘭；第三群為半著生性的東亞蘭與金陵邊；著生性的

鳳蘭則與其他9種種原的相似性距離最遠。

由於植株的葉長、葉寬、葉形、假球莖大小等營養生長特性及花器、種子的外表性狀，仍是目前蘭科植物在進行鑑別時主要的依據，依RAPD分析結果，屬於著生性的種類，在遺傳連鎖關係上都另成其他群組，因此蘭科植物在傳統分類上，首先以著生性或地生性為依據加以區別，在DNA層次上也證實了其正確性。但植株的葉長、葉寬、葉形等性狀表現，常因不同栽培環境及不同生育階段而具有差異性，因而以此類指標進行分類，其精確性較低，也是造成不同研究人員分類檢索表不一致的原因。在供試的3種著生性蕙蘭中，雖然東亞蘭屬於大型蕙蘭類，但其遺傳連鎖關係與金陵邊相似性較高，而花莖下垂的鳳蘭則與供試的其他蕙蘭種原遺傳連鎖關係最遠，因此以花器、花莖等性狀作為分類依據，在DNA層次上也可以得到輔證。唯蘭科植物的生長緩慢，欲以花器特性作為鑑別種原的指標，需要



不同DNA分子標誌所製成的RAPD圖譜，可用來區別10種蕙蘭屬種原

長時間的等待。

台灣已獲准加入世界貿易組織 (World Trade Organization, WTO)，對我們的農業勢必造成一定程度的衝擊。面臨溫帶地區花卉輸出大國各種進口花卉的強力競爭，台灣未來花卉產業的發展策略，唯有朝向熱帶或亞熱帶花卉發展。蘭花屬高價位的花卉，由於氣候適宜，有多種原生蘭花產自台灣，握有豐富的種源，有利於台灣蘭花產業的發展，因而蘭科植物被列為未來我國花卉產業之重點作物之一，被認為未來仍然具有市場競爭潛力。

RAPD技術直接進行分子層次的分析，其優點為解析度靈敏，而且在同一植株的各個器官、組織的細胞都具有相同的DNA組成，不受環境或植株生育上的差異而影響分析的結果，因而在幼苗期就可以進行鑑定工作。蘭科植物通常需要經過數年的栽培才會開花，對於生長緩慢的蘭科植物而言，RAPD技術無疑是蘭科植物種原鑑別及控制種苗品質的分析利器。

