

分子檢測技術在仙履蘭品種鑑定上之應用

孫永偉、廖文毅、沈翰祖、劉明宗、廖玉珠、蔡瑜卿、蕭吉雄、陳駿季
種苗改良繁殖場

摘要

聚合連鎖反應 (PCR) 廣泛地被用於染色體 DNA 分析。近年，以 DNA 為研究基礎的技術已成功應用於可作為區分植物品種差異之指紋分析方式。這些 DNA 技術包括隨機增幅多形性 DNA (RAPD; random amplified polymorphism DNA)、增殖片段長度多型性(AFLP; amplified fragment length polymorphism)、SRAP (sequence-related amplified polymorphism)、內轉錄間隔區(ITS; internal transcribed spacer)、簡單重複序列(SSR; simple sequence repeats)等。本試驗選用 40 個仙履蘭原生種及雜交種作為試驗品種，分別測試 200 組 RAPD 引子、30 組 SRAP 引子、5 組 AFLP 引子及 ITS 序列分析。獲得初步結果如下。20 組 RAPD 引子具有多型性，可產生平均約 8 個 DNA 條帶，其中約 3 個具有多型性。以 UBC-31 引子為例，可將 *Parvisepalum* 亞屬原生種或雜交種 DNA 增幅出 500 bp 片段，可將 *Paphiopedilum* 亞屬原生種或雜交種 DNA 增幅出 750 bp 片段。ITS 核苷酸序列位於 18S 及 28S 核糖體 RNA 之間，本場設計之專一性引子可合成仙履蘭之 ITS 序列長度為 890 bp，比較各品種 ITS 序列相似度為 85~98%。SRAP 技術主要是增幅開放閱讀架構(ORF; open reading frame)之 DNA 片段，目前已篩選出可鑑定 *Paphiopedilum* 亞屬之引子，正進行特定片段 DNA 解序及設計專一性引子。AFLP 為較新作物品種分子檢定方式，此方式易顯示品種間分子歧異性及多型性，此特性為 RAPD 檢測技術欠缺，非常有利於作為品種鑑定工具。每一個 AFLP 引子對約可產生 20~50 個 DNA 多型性，因此非常適合作為拖鞋蘭品種鑑定之分子檢測工具。將 RAPD、SRAP 及 ITS 分子檢測方式獲得之資料合併，應用非加權配對算數平均法(unweighted pair-group method using arithmetic average; UPGMA)進行群叢分析(cluster)，並建立各品種間之親緣關係樹狀圖。初步結果顯示，仙履蘭原生種可分為 3 群，分別為

Parvisepalum、*Paphiopedilum* 及 *Brachypetalum* 亞屬，其中 *Paphiopedilum* 群可再細分為 5 個次群，此結果非常類似 Cribb 分類結果。此外，雜交種分類歸屬與親本分類屬性一致，亦即若雜交種親本皆為 *Parvisepalum* 亞屬，則雜交種被分類為 *Parvisepalum* 亞屬；若雜交種親本為 *Parvisepalum* 及 *Paphiopedilum* 亞屬，則雜交種將被分類為 *Parvisepalum* 或 *Paphiopedilum* 亞屬。

前言

仙履蘭(*Paphiopedilum*)字義起源於希臘字維納斯女神及拖鞋。仙履蘭屬分布範圍包括東印度、中國大陸南部、菲律賓、馬來西亞、新幾內亞及索羅門群島等地。目前已知仙履蘭屬原生種約有 75 個，新的原生種正陸續被發現中(麥, 1987; Averyanow *et al.*, 2003; Cribb, 1998)。從原生種地理分布及相對變化性較少的花型花色，或可將其分類歸為一主群或成為一亞科(subfamily)，目前已將其歸類為仙履蘭屬。現今仙履蘭屬內分類多採用形態分類方式，此方式缺點為複雜且易造成混淆。本研究希望利用生物技術作為仙履蘭品種鑑定及區分之輔助工具。生物技術之分子圖譜分析優勢，包括篩選可作為鑑定作物品種差異性之分子標記(marker)或具有功能性之基因。常用鑑定作物品種之生物技術有逢機增幅多形性 DNA、增殖片段長度多型性、SRAP、內轉錄間隔區、簡單重複序列等(Eiadthong *et al.*, 1999; Liu and Cordes, 2004; Ranamukhaarachchi *et al.*, 2001)。上述生物技術研究方式皆以聚合酵素鏈鎖反應(PCR; polymerase chain reaction)為基礎，各種研究方式皆有其特定應用方式及特色。

形態分類

仙履蘭屬與鬍拉密拖鞋蘭屬演化來自相同物種，Atwood (1984)更認為鬍拉密拖鞋蘭屬或其祖先是從美洲漂移至亞洲，隨氣候變遷逐漸分布至熱帶與亞熱帶林區(Cribb, 1998)。Pfitzer(1886)首先將仙履蘭作有系統分類研究，陸續一些學者從葉片形態色澤、花瓣及唇瓣形狀加以分類。部份學者認為仙

履蘭屬可再細分為 *Parvisepalum*、*Brachypetalum*、*Paphiopedilum* 三亞屬(Cox *et al.*, 1997；Cribb, 1997)或 *Parvisepalum*、*Brachypetalum*、*Polyantha*、*Cochlopetalum*、*Sigmatopetalum*、*Paphiopedilum* 六亞屬(Karasawa and Saito, 1982)。*Parvisepalum* 亞屬包括 7 個原生種，具有膨脹且薄的唇瓣、大凸起假雄蕊及顆粒狀花粉。*Brachypetalum* 亞屬包括 4 個原生種，具有單一顏色的白色或黃色花朵、橢圓形到圓球型花瓣、卵圓形厚質地的唇瓣及棋盤格狀的樹片。*Paphiopedilum* 亞屬至少包括 60 個原生種，可再細分為 5 個節(sections)，*Paphiopedilum* 節包括 14 個原生種，具有均勻綠色的葉片、單花、湯匙狀花瓣及倒心形假雄蕊(中心呈盾狀)；*Barbata* 節葉片呈棋盤格狀、單花、具有發育良好之唇瓣、假雄蕊側面呈疣狀及寬半月形無盾狀；其他 3 個節，包括 *Pardalopetalum* (4 個原生種)、*Cochlopetalum* (5 個原生種)、*Coryopetalum* (11 個原生種)，為多花且花形種類歧異度大。由外表形態鑑定品種間差異性常需累積多年栽培經驗方可完成。

分子標記

1. 逢機增幅多形性 DNA (RAPD)

RAPD 技術於 1990 年開發，利用 8~10 bp 長度之逢機引子進行 PCR 反應，可將細胞核特定 DNA 片段放大至電泳染色可見程度(Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990)。由於逢機引子長度較短，因此 PCR 反應使用之粘合溫度亦較低(約 36~40°C)，RAPD 使用之逢機引子多為商業化產品，可適用於未知基因序列之 PCR 增幅(柯等, 2003；Chang *et al.*, 2000；Choi *et al.*, 2001；Fenwick and Ward, 2001；Kim *et al.*, 2001)。雖然操作簡單、分析成本較低廉，但試驗之再現性低，此缺點將限制該技術廣用性。篩選出特定分子標記經由 DNA 解序後可重新設計專一性引，即可改善試驗再現性低之缺點，篩選出之分子標記可作為鑑定特定品種之用。

本研究測試 UBC 逢機引子 200 組(UBC-1~100 及 UBC-801~900)進行 RAPD 試驗分析。結果顯示 20 組 UBC 引子具有多型性，可產生平均約 8 個 DNA 條帶，其中約 3 個具有多型性。UBC-31 引子可將 *Parvisepalum* 亞

屬原生種或雜交種 DNA 增幅出 500 bp 片段，亦可將 *Paphiopedilum* 亞屬原生種或雜交種 DNA 增幅出 750 bp 片段(圖 1.)。目前正將部份增幅之 DNA 片段解序及設計可鑑定特定品種之專一性引子。

2. 內轉錄間隔區(ITS)

位於細胞核之核糖體 DNA(rDNA；ribosomal DNA)為一多基因家族，其 5'~3' 基因排列位置依序為 external transcribed spacer (ETS)、18S、ITS1、5.8S、ITS2、28S 及 intergenic spacer (IGS)(圖 2.)。ITS 基因區域位於 18S 及 28S rDNA 基因區域之間，雖不會編碼任何蛋白質產物，但具有高度快速演化特性，造成不同物種之 ITS 基因序列差異性，此特性適合作為鑑定物種屬間或種間差異性或分類之依據(Devran *et al.*, 2002；Powers and Sandall, 1988；Robberts *et al.*, 2004；Tsai and Chou, 1999；Zillstra *et al.*, 1995)。

本場設計之專一性引子可合成仙履蘭之 ITS 序列長度為 890 bp (圖 3.)，比較各品種 ITS 序列相似度為 85~98%。由於 ITS 解序後資料相當龐大，欲找出限制酵素切位之 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) 分子標記，困難度高。為解決此一問題，本實驗室利用 SNP2CAPS 電腦程式分析所有試驗之仙履蘭原生種及雜交種 ITS 序列，發現 *Pst*I 限制酵素可將仙履蘭一個 890 bp 之 ITS 片段切割成約 600 及 300 bp 之二個 DNA 片段，為 *Parvisepalum* 亞屬專有，亦即將可作為鑑定 *Parvisepalum* 亞屬品種之分子標記(Thiel *et al.*, 2004；Zhang and Stommel, 2001)。

3. SRAP

SRAP 技術與 RAPD 類似，均是建立於 PCR 反應基礎，RAPD 是利用短片段隨機引子進行 PCR 反應，試驗結果之再現性低；SRAP 則是利用 forward 及 reverse 二條引子進行 PCR 反應，因此試驗結果再現性高。SRAP 主要是增幅具有功能性基因之 ORFs (open reading frames)，適合作為品種特殊功能變異之檢定。SRAP 引子長度為 17 或 18 個核苷酸，核心序列長度 13 至 14 個核苷酸，且前 10 至 11 個核苷酸為非專一性組成，緊接著 CCGG (forward 引子)或 AATT (reverse 引子)，最後再接 3 個核苷酸為選擇性引子。

PCR 反應前 5 個 cycles 使用較低粘合溫度(35°C)，以確定引子能夠與 DNA 模板結合，隨後 35 個 cycles 使用粘合溫度為 50°C，能夠提昇增幅效率(Li and Quiros, 2001；Ruiz *et al.*, 2001)。本試驗測試 30 組 SRAP 引子(表 1.)，目前已篩選出可鑑定 *Paphiopedilum* 亞屬之引子(圖 4.)，正進行特定片段 DNA 解序及設計專一性引子。

4. AFLP

AFLP 為較新作物品種分子檢定方式，此方式易顯示品種間分子歧異性及多型性，此特性為 RAPD 檢測技術欠缺，非常有利於作為品種鑑定工具。AFLP 以 PCR 反應為基礎可作為多基因座指紋分析技術，不需知道 DNA 序列情況下，可產生較多 DNA 多型性且試驗再現性高(Ipek *et al.*, 2003)，但分析成本高昂且技術層次高。AFLP 技術主要步驟有三：a.染色體組 DNA 酶切及 adapters 粘合作用；b.酶切 DNA 片段之選擇性增幅；c.增幅 DNA 片段之電泳分析。本實驗室目前採用 LI-COR 生物科技公司開發之 AFLP 方式，配合自動核酸定序儀之電泳分析，使用之螢光物質為 IRDye-700 及 IRDye-800 標記於 EcoRI 引子上。測試 5 組 AFLP 引子獲得之初步結果為，每一個 AFLP 引子對約可產生 20~50 個 DNA 多型性(圖 5.)，因此非常適合作為仙履蘭品種鑑定之分子檢測工具(Brugmans *et al.*, 2003；Vos *et al.*, 1995)。

結論

本試驗將 RAPD、SRAP 及 ITS 分析方式獲得之 DNA 多型性或序列資料合併，經由 UPGMA 群叢分析獲得之親圓樹狀圖關係結果得知，SRAP 分析方式可將仙履蘭原生種區分為 6 個群，雖然類似 Karasawa 及 Saito (1982)分類方式，但許多原生種分類歸屬位置並不正確。RAPD 及 ITS 分析方式可將仙履蘭原生種區分為 3 個群，分別為 *Parvisepalum*、*Brachypetalum* 及 *Paphiopedilum* 亞屬，其中 *Paphiopedilum* 亞屬可再細分為 4 個次群或節，但仍有部分原生種分類歸屬位置亦不正確；ITS 分析之 *Paphiopedilum* 亞屬可在細分為 5 個節，分別為 *Coryopedilum*、

Pardalopetalum、*Cochlopetalum*、*Barbata*、*Paphiopedilum* 等，此結果非常類似 Cox 等人(1997)及 Cribb (1997)分類結果。此外，雜交種分類歸屬與親本分類屬性一致，亦即若雜交種親本皆為 *Parvisepalum* 亞屬，則雜交種被分類為 *Parvisepalum* 亞屬；若雜交種親本為 *Parvisepalum* 及 *Paphiopedilum* 亞屬，則雜交種將被分類為 *Parvisepalum* 或 *Paphiopedilum* 亞屬(圖 6.)。

綜合上述試驗結果得知，比較各種生物技術在仙履蘭品種鑑定上之特色，RAPD 是一種簡單且便宜檢測技術，但試驗結果再現性低、產生較少可區分品種差異之 DNA 多型性及耗費較多人力重複進行類似工作為其缺點。SRAP 可增幅具有功能性基因之 ORFs DNA 片段，適合作為作物特定功能突變之鑑定，本試驗結果顯示雖然不適合作為仙履蘭品種鑑定工具，但於 *Paphiopedilum* 亞屬亦篩選出數組特定 DNA 片段或可作為鑑定品種之分子標記。AFLP 檢測方式試驗結果再現性高且可產生非常多 DNA 多型性，應非常適合作為仙履蘭品種檢測工具，但檢測技術及成本高為其不易廣泛使用之缺點，未來將配合螢光感測儀器及分析軟體將特定 DNA 回收定序，並重新設計專一性引子將可快速鑑定特定品種之基因型。由親緣關係樹狀圖結果顯示，ITS 序列分析非常適合作為仙履蘭品種親緣分類之依據且準確度亦相當高，配合 CAPS 技術找出限制酵素切位更可作為鑑定品種差異性之分子標記。

參考文獻

1. 麥奮. 1987. 拖鞋蘭之芭菲爾鞋蘭屬. 淑馨出版社.
2. 柯見螢、楊堯文、陳福旗. 2003. 利用逢機擴大多型性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)標記探討白鶴芋品種之遺傳變異性. 中國園藝 49:45-53.
3. Atwood, J. T. 1984. The relationships of the slipper orchids (subfamily Cypripediodeae), Orchidaceae. Selbyana 7: 129-247.
4. Averyanow, L., P. Cribb, P. K. Loc, and N. T. Hiep. 2003. Slipper orchids of Vietnam. Published in North America by Timber Press, Inc., USA.

5. Brugmans, B., R. G. M. van der Hulst, R. G. F. Visser, P. Lindhout, and H. J. van Eck. 2003. A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Research* 31: 1-9.
6. Chang, S. B., W. H. Chen, H. H. Chen, Y. M. Fu, and Y. S. Lin. 2000. RFLP and inheritance patterns of chloroplast DNA in intergeneric hybrids of *Phalaenopsis* and *Doritis*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41:219-223.
7. Choi, J. Y., J. N. Suh, I. S. So, and B. H. Kwack. 2001. Morphological and genetical characteristics of variegation induced in Korean native *Cymbidium goeringii* and *Cym. Kanran* leaves. *Proceedings of APOC* 7 pp171-173.
8. Cox, A. V., A. M. Pridgeon, V. A. Albert, M. W. Chase. 1997. Phylogeny of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Pl. Syst. Evol.* 208: 197-223.
9. Cribb, P. J. 1998. The genus *Paphiopedilum*. Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd.
10. Cribb, P. J. and N. McGough. 1997. The thindivide-slipper orchid distributions in China. In Dumont V. (ed.) *Proceedings of the European Orchid Conference, Geneva 1997*. E. O. C. Geneva.
11. Devran, Z., U. Gozel, M. A. Sogut, S. Yildiz, and I. H. Elekcioglu. 2002. Identification of root-knot nematodes in the mediterranean region of Turkey by using rDNA and mtDNA markers. *Turk. J. Agric. For.* 26: 337-341.
12. Eiadthong, W., K. Yonemori, A. Sugiura, N. Utsunomiya, S. Subhadrabandhu. 1999. Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers. *Scientia Horticulturae* 82:57-66.
13. Fenwick, A. L. and S. M. Ward. 2001. Use of random amplified polymorphic DNA markers for cultivar identification in mint. *HortScience* 36:761-764.
14. Ipek, M., A. Ipek, and P. W. Simon. 2003. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and Isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates

- in germplasm collections. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128: 246-252.
15. Karasawa, K. and K. Saito. 1982. A revision of the genus *Paphiopedilum* (Orchidaceae). Bull. Hiroshima Bot. Gard. 5: 1-69.
 16. Kim, H. Y., A. S. Na, J. B. Kim, and C. G. Been. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for genetic analysis of Phalaenopsis species. Proceedings of APOC 7 pp220-223.
 17. Li, G. and C. F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. Theor. Appl. Genet. 103: 455-461.
 18. Liu, Z. J. and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238: 1-37.
 19. Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5129-5273.
 20. Powers, T. O. and L. J. Sandall. 1988. Estimation of genetic divergence in Meloidogyne mtDNA. J. of Nematology 20: 505-511.
 21. Ranamukhaarachchi, D. G., R. J. Henny, C. L. Guy, and Q. B. Li. 2001. DNA fingerprinting to identify nine Anthurium pot plant cultivars and examine their genetic relationship. HortScience 36:758-760.
 22. Robberts, F. J. L., L. D. Liebowitz, and L. J. Chalkley. 2004. Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jiroveci* from south Africa. J. Clinical Microbiology 42: 1505-1510.
 23. Ruiz, J. J., B. Pico, G. Li, V. D'Antonio, B. Falk, and C. F. Quiros. 2001. Identification of markers linked to a celery mosaic virus resistance gene in celery. J. Amer. Sci. Hort. Sci. 126: 432-435.
 24. Thiel, T., R. Kota, I. Grosse, N. Stein, and A. Graner. 2004. SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. Nucleic Acids. Research 32: 1-5.
 25. Tsai, C. C. and C. H. Chou. 1999. Nucleotide sequence of a 5.8S ribosomal RNA

- gene and internal transcribed spacer of *Imperata cylindrical* (L.) Beauv. var. *major* (cogongrass). J. Genet. Mol. Biol. 10:41-47.
26. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23:4407-4414.
 27. Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18:7213-7218.
 28. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535.
 29. Zhang, Y. and J. R. Stommel. 2001. Development of SCAR and CAPS markers linked to the *Beta* gene in tomato. Crop Sci. 41: 1602-1608.
 30. Zijlstra, C., E. M. Lever, B. J. Uenk, and C. H. Van Silfhout. 1995. Differences between ITS regions of isolates of Root-Knot Nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology 85: 1231-1237.

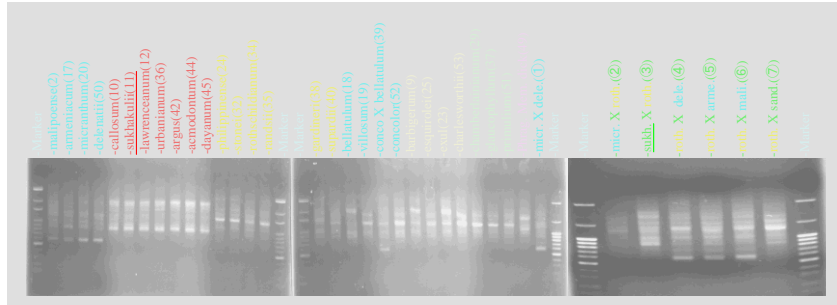


圖 1. 利用 UBC-31 隨機引子進行 RAPD 反應，並將反應結果進行電泳及溴化乙錠染色，觀察 DNA 電泳條帶圖譜。

Fig. 1. Ethidium-bromide-stained agarose gel of a RAPD reaction with primer UBC-31 of *Paphiopedilum*.

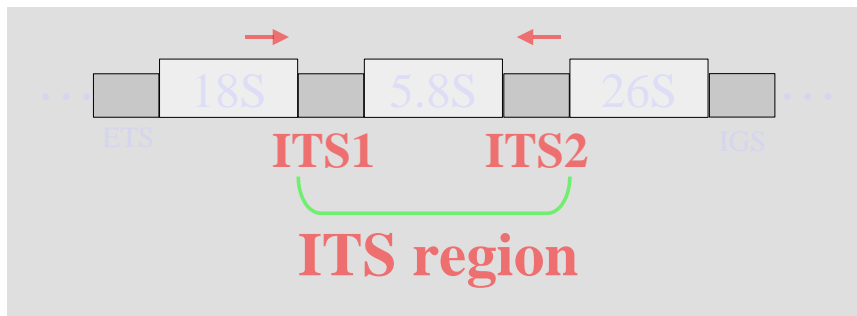


圖 2. 仙履蘭之 rDNA 結構，從 5'~3' 依序為 ETS、18S、ITS1、5.8S、ITS2、26S 及 IGS 等，其中 ITS1~ITS2 為 ITS 區域。

Fig. 2. The nuclear ribosomal DNA (rDNA) gene family is multigene family. In most eukaryotes, the 5' to 3' organization of the gene family is an external transcribed spacer (ETS), the gene 18S, an ITS1, 5.8S, ITS2, 26S, and intergenic spacer (IGS). ITS, located between the repeating array of nuclear 18S and 26S ribosomal DNA genes.

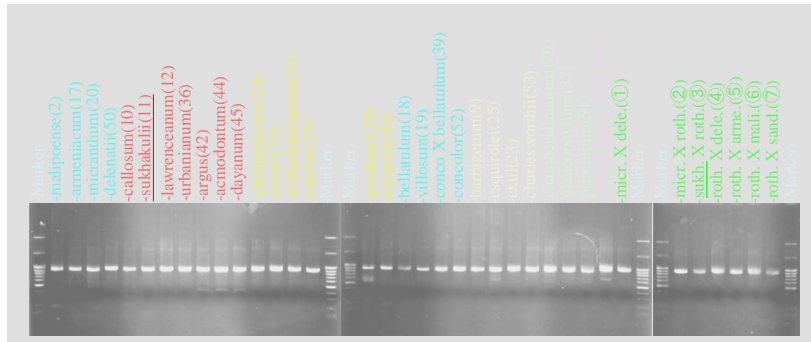


圖 3. 利用專一性 ITS 引子進行仙履蘭原生種及雜交種 PCR 反應之電泳圖譜。

Fig. 3. The ITS region of rDNA in *Paphiopedilum* species and hybrids. The ITS region was obtained from the PCR amplification of primers 18S and ITS2.

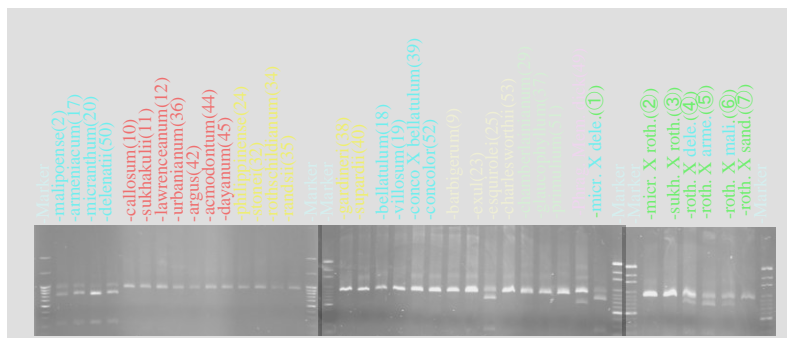


圖 4. 利用專一性 ITS 引子進行仙履蘭原生種及雜交種 PCR 反應之電泳圖譜。

Fig. 4. *PstI* restriction enzyme Digestion of amplified ITS region of *Paphiopedilum* species.

表 1. SRAP 引子組合。

Table 1. SRAP primer sets。

forward	reverse
me1 : TGA,GTC,CAA,ACC,GGA,TA	em1 : GAC,TGC,GTA,CGA,ATT,AAT
me2 : TGA,GTC,CAA,ACC,GGA,GC	em2 : GAC,TGC,GTA,CGA,ATT,TGC
me3 : TGA,GTC,CAA,ACC,GGA,AT	em3 : GAC,TGC,GTA,CGA,ATT,GAC
me4 : TGA,GTC,CAA,ACC,GGA,CC	em4 : GAC,TGC,GTA,CGA,ATT,TGA
me5 : TGA,GTC,CAA,ACC,GGA,AG	em5 : GAC,TGC,GTA,CGA,ATT,AAC
	em6 : GAC,TGC,GTA,CGA,ATT,GCA

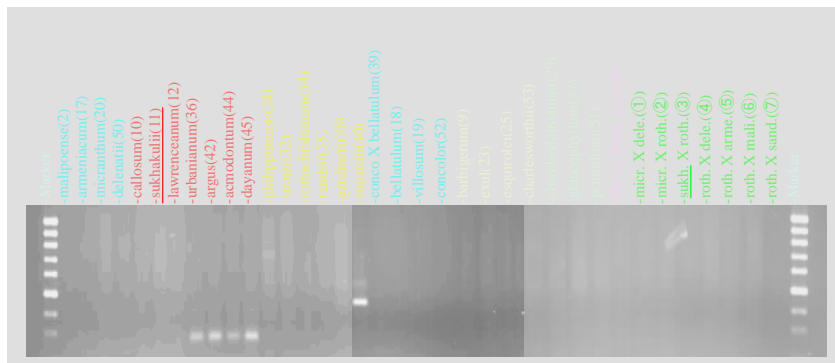


圖 5. 利用 SRAP 引子 me2 及 em2 進行仙履蘭原生種及雜交種 PCR 反應之電泳圖譜。

Fig. 5. SRAP amplified by primers me2-em2 in *Paphiopedilum* species. Marker is a 100-bp DNA ladder.

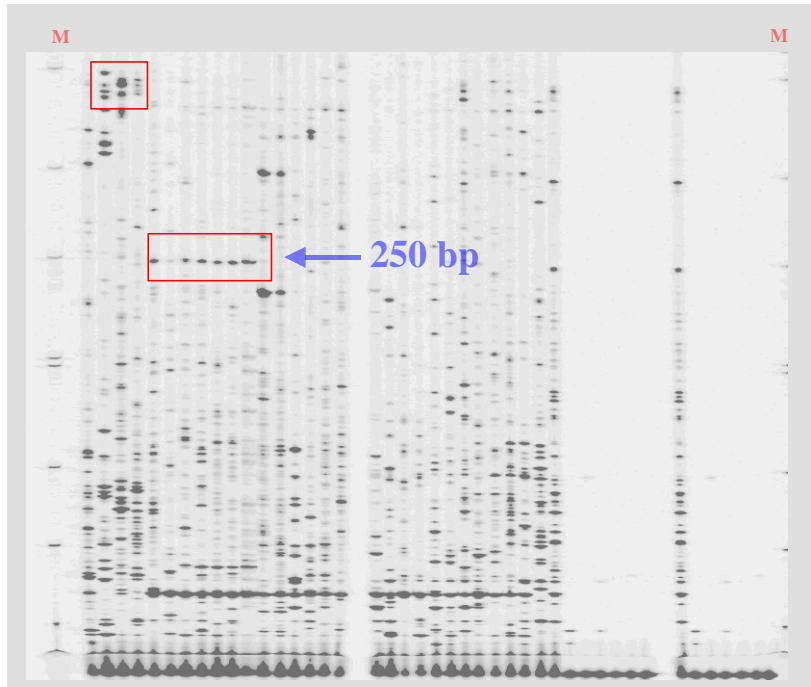


圖 6. 利用 AFLP 引子(IRDye 800 labeled EcoRI primer: E-AGC and MseI primer: M-CAA)進行仙履蘭原生種及雜交種 PCR 反應之電泳圖譜。
Fig. 6. AFLP (LI-COR) fingerprints of *Paphiopedilum* DNA using IRDye 800 labeled EcoRI primer: E-AGC and MseI primer: M-CAA.

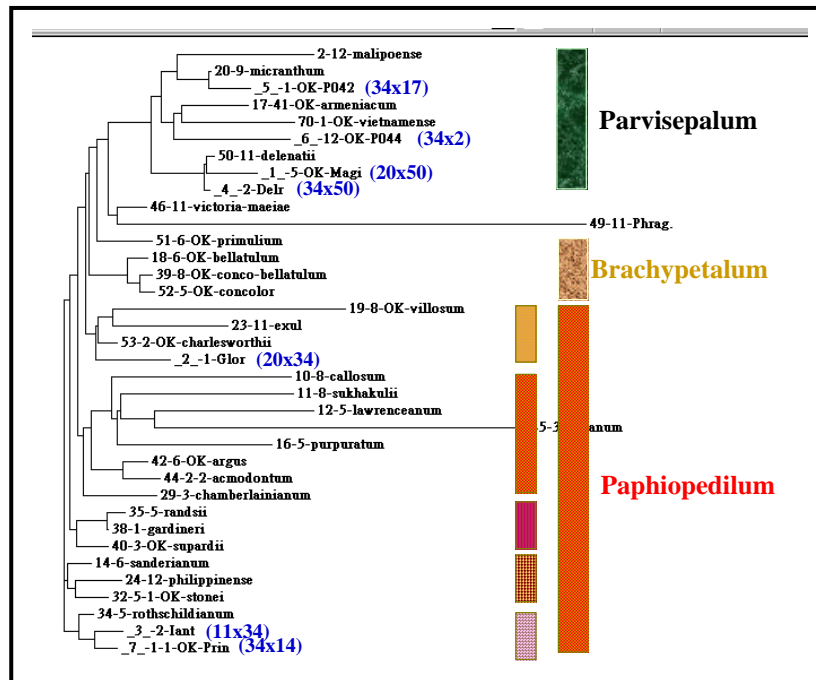


圖 7.仙履蘭原生種及雜交種之 ITS 序列進行 UPGMA 分析並繪製成親緣關係樹狀圖。

Fig. 7. Phylogenetic tree based on PCR amplified in ITS of rDNA among *Paphiopedilum* species and hybrids analysis by UPGMA.