

45

高雄區農技報導

【第四十五期】

中華民國九十二年三月

發行單位

行政院農業委員會
高雄區農業改良場

DNA分子標誌在作物品種鑑別之應用 -以台灣原生石斛蘭為例



DNA分子標誌在作物品種鑑別之應用-以台灣原生石斛蘭為例

蔡奇助

一、前言

植物種苗業是台灣農業值得發展的方向之一，在世界潮流及國際公約下，品種保護及品種專利必定會影響未來我國整個種苗業的發展。因此，我們除了需積極育成優良的作物品種外，更需要保護我們現有的作物品種種原，研發現有種原的附加價值，以及建立品種的分子標誌，以保護國內育成的品種。台灣農業在許多優秀前輩的努力下，育成許多各式各樣優良的作物品種，這是台灣農業發展的一段光輝歷史，也造就今日台灣經濟奇蹟的基石，我們更以優良的農業技術為我國擴展不少友邦。由於時代變遷，台灣農業未來也需要隨著世界的脈動，繼續往前走。

在未來國際競爭下，台灣應該以品質及品牌開創出自己的一片天地，由於外部形態常常無法提供有效的作物鑑別，造成作物品種的認證與保護不易。因此，雖然我們有相當多優良的作物品種，然而卻無法有效的管理這些種原，讓這些重要的種原流落至其它地區，造成與本地農產品互相競爭的局面。由於分子生物學的發展，DNA分子的發現，以及結構與性質漸漸為大家所熟悉，現今的技術，我們已經很容易可以利用DNA分析技術做為作物品種鑑別的工具。由於DNA的序列相當的多，密密麻麻的訊息都可以做為作物品種鑑別的資料，並且這些訊息不會因為植物的不同生長階段或者不同器官而不同。換言之，植物的根、莖、葉、花、果實及種子等皆具有相同的DNA，因此皆可以進行DNA分析。再加上聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)技術的發展，使得我們分析時所需的樣本量極少，幾毫克的植物樣本就可以DNA進行分析，在幾小時內，就可以得到我們所需要的DNA訊息。利用此項技術，可以在幾小時的時間內，將原本一套的DNA分子，迅速增殖至幾億個分子。使得我們分析DNA時，更加省時、方便且容易。

由於DNA分析訊息可靠，而且遺傳訊息的資料相當多，因此應用在種原品種鑑定、親緣

關係與遺傳距離的探討，頗能呈現它優越的特性。以下以分析台灣原生石斛蘭種原為例，探討DNA分子標誌在種原鑑別、遺傳距離及種原親緣關係之應用。

二、台灣原生石斛蘭種原DNA鑑定

石斛蘭為蘭科(Orchidaceae)石斛蘭屬(*Dendrobium*)植物，分佈於熱帶亞洲地區，是蘭科植物中第二大屬植物，成員超過800種。石斛蘭不僅花形多樣，花色亦相當豐富，因此早已是蘭花育種的重要標的之一。在經過一百多年來的育種，已經有超過8000種的石斛蘭品種登錄。沒有登錄的也不計其數。台灣也是石斛蘭的產地之一，依據台灣植物誌記載，總計約有12種。在台灣本島、蘭嶼與綠島皆有石斛蘭的蹤跡，然而由於族群本身就小，加上棲地破壞、環境變遷、以及人為濫採，已經造成台灣原生的石斛蘭在野外的族群更加稀少。對於這種既具觀賞價值，又具有藥性的植物，實在是台灣重要的植物資源，我們應該瞭解各種原的鑑別方式，以及它們之間的遺傳距離與親緣關係，以供日後我們對這群植物的保育、繁殖與利用上能有根據，讓這種重要的原生植物資源能永續利用。

在應用DNA分析種原的研究中，核糖體核酸(rDNA)是目前被廣泛分析的DNA區域。它存在於真核細胞中，是一群成縱線排列的重複性基因族，位於染色體的核仁組成中心。由於受到不等重組和基因轉變的調控，各個重複單位間皆能保持相似性。在rDNA之序列結構中，內轉錄間隔區(ITS)(圖一)是變異較為快速的DNA區域，不同物種間之序列有很大變異，適合進行屬內種原的鑑定。目前已有相當多的研究利用ITS區域進行種原鑑定及親緣關係分析。

本研究參試12種台灣原生石斛蘭，並以白花蝴蝶蘭(*Phalaenopsis aphrodite*)為外群，利用聚合酵素連鎖反應(PCR)技術，將各種台灣原生石斛蘭的內轉錄間隔區(ITS)大量增殖，然後

進一步分析增殖後DNA的序列，以獲取各個石斛蘭原生種之分子標誌。這些分子標誌所得到的訊息，可以有效作為種原鑑別的依據。進一步將各種原生石斛蘭之ITS序列比對編排，共可產生684個分子特徵(圖二)，由這些分子標誌可以換算出各種石斛蘭的遺傳距離及構築出種原間的親緣關係樹狀圖(圖三)。由樹狀圖得知，櫻石斛(*Dendrobium linawianum*)、白花石斛(*D. moniliforme*)、黃花石斛(*D. tosaense*)、細莖石斛(*D. leptocladum*)及紅鸚石斛(*D.*

falconeri)與金草石斛(*D. aurantiacum*)成一類;鷹爪石斛(*D. chameleon*)與紅花石斛(*D. miyakei*)成一類;此外，錦石斛(*D. crumenatum*)與燕石斛(*D. equitans*)成一類。另外，大雙花石斛(*D. furcatopedicellatum*)與小雙花石斛(*D. somai*)成一類，但與其它石斛蘭遺傳距離甚遠。經由DNA分析，本研究支持原歸為石斛蘭屬的連珠石斛(*E. nakaharai*)應與石斛蘭屬分開，並且也發現大雙花石斛與小雙花石斛也不適合置於石斛蘭屬內。



Dendrobium tosaense



Dendrobium linawianum

18S rDNA

5.8S rDNA

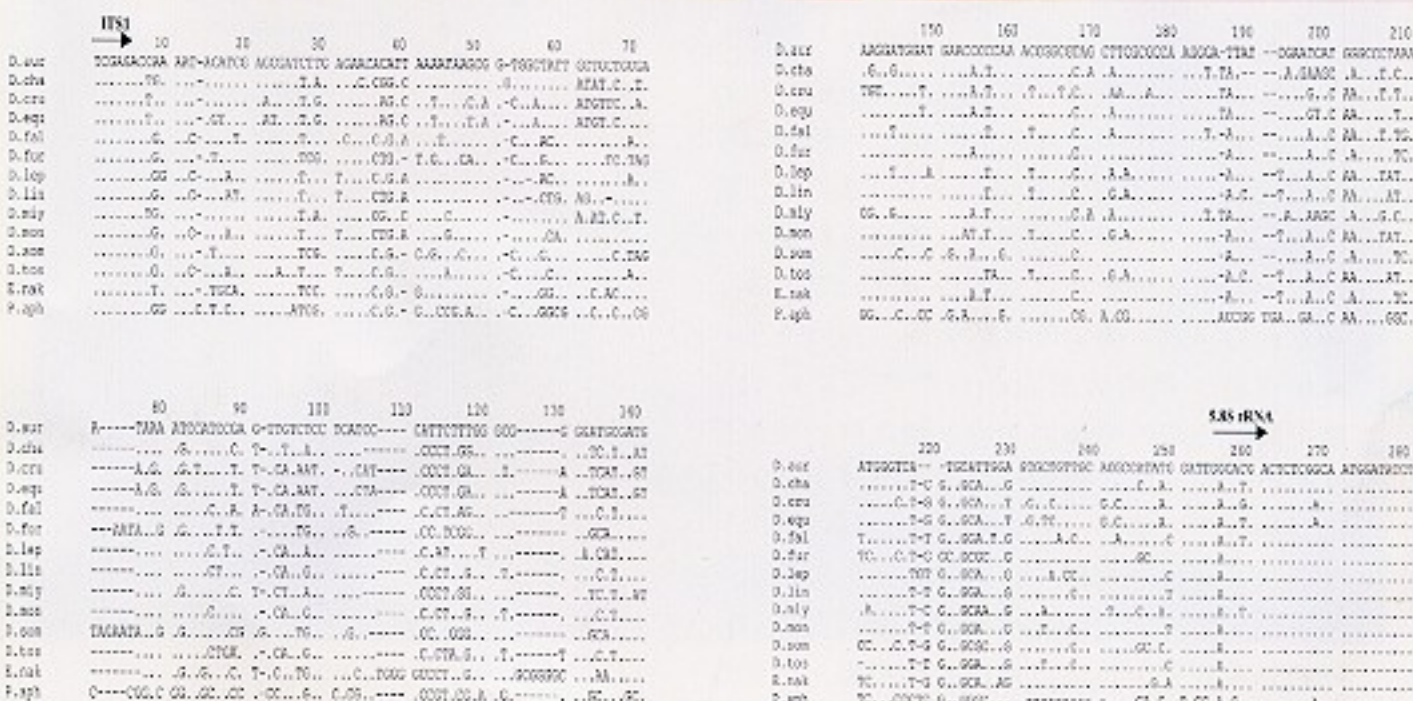
26S rDNA

ITS1

ITS2

ITS region

圖一、核糖體核酸的結構及內轉錄間隔區的所在位置



	290	300	310	320	330	340	350
D.aur	CGCTCTCC	ATCAATGAG	AGCGAGGGA	AAGGATAC	GTGTTGGGA	TTGAGATC	CGCGAGCA
D.cha
D.cru
D.egu
D.fal
D.fur
D.lep
D.lia	T.....
D.niy
D.mon
D.son
D.tor
E.nak
F.apt

	500	510	520	530	540	550	560
D.aur	TGCTGGCC	TGCTTCCG	GCAGCTGG	CGAGAGGG	GGGACATC	TTTATACC	CGACAGAA
D.cha
D.cru
D.egu
D.fal
D.fur
D.lep
D.lia
D.niy
D.mon
D.son
D.tor
E.nak
F.apt

	360	370	380	390	400	410	420
D.aur	TTGAGCTT	GAAGGAGT	TCGCTGAG	GGGAGTGC	CAAGGGGAG	TCGCTGAG	GGTCAAGGT
D.cha
D.cru
D.egu
D.fal
D.fur
D.lep
D.lia
D.niy
D.mon
D.son
D.tor
E.nak
F.apt

	570	580	590	600	610	620	630
D.aur	CGGCGGAG	AAAGT---	GAAGGCTA	TCTATATG	CGGCGTCC	CCAGAGAT	GATATATC
D.cha
D.cru
D.egu
D.fal
D.fur
D.lep
D.lia
D.niy
D.mon
D.son
D.tor
E.nak
F.apt

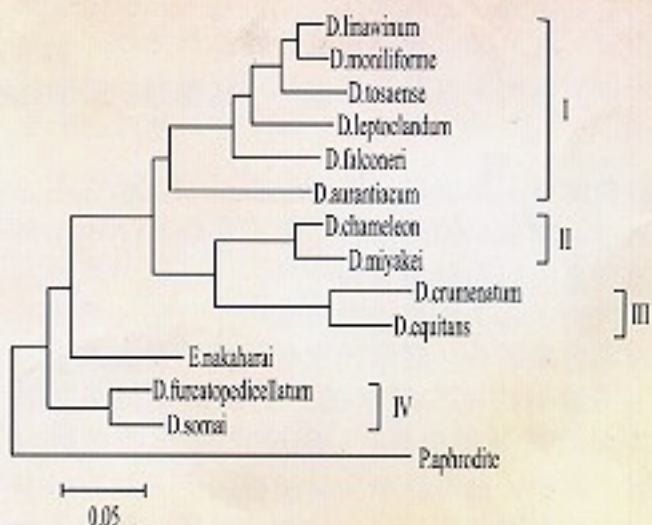
	430	440	450	460	470	480	490
D.aur	TTGTCGTC	TTGGGAGT	C---AGCA	TGATGAGC	CGCTGG---C	GAAGCTGG	AGGATGATG
D.cha
D.cru
D.egu
D.fal
D.fur
D.lep
D.lia
D.niy
D.mon
D.son
D.tor
E.nak
F.apt

	640	650	660	670	680	
D.aur	-CTTTTATG	TGATCCAAAT	ATGCGGCGGA	TCCAC--GAA	TGGCC-ATGT	GAAT
D.cha
D.cru
D.egu
D.fal
D.fur
D.lep
D.lia
D.niy
D.mon
D.son
D.tor
E.nak
F.apt

圖二、台灣原生石斛蘭ITS序列編排比較之結果

三、未來展望

綜觀全球，世界各國莫不積極投入龐大的人力、物力去發展生物技術，農業生物科技也是其中重要的一環。據估計，到了西元2050年時，全世界的人口將會增加至100億。以目前全球所能應用的耕地面積，以及漸漸耗損的水資源，未來的世界將可能回到蠻荒時期，為了爭奪食物而戰。農業所具的生態、生活及生存的重要性，實不容忽視。台灣是個海島型國家，有三分之二地區為山區，因此耕地面積相當有限，而且水資源無法有效孕育與保存，加上耕地變化的情形日益嚴重，未來糧食問題是我們無法避免的問題。我們應該積極發展台灣的農業，培育自己的作物品種，發展自己的作物特色。此外，也可以利用生物技術，培育各



圖三、台灣原生石斛蘭親緣關係樹狀圖

種耐乾旱、耐鹽分、高品質及高產的各類作物品種，並利用DNA鑑定技術，建立品種保護與認證制度，以造福農民，並讓後代子子孫孫資源永不匱乏。