

應用 PCR-RFLP 技術分析千代蘭和蝴蝶蘭 雜交後代

蔡奇助、翁一司、劉文舜¹

摘 要

蝴蝶蘭是花卉產業中深具發展潛力的高經濟價值作物，本研究應用聚合酶連鎖反應-限制片段長度多型性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技術來探討千代蘭(*Ascocenda* John De Biase "Blue")(♀)與池上線條蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Chih Shang's Stripes)(♂)屬間雜交後代(F₁)之遺傳特性。在細胞核核糖體DNA之內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)，共分析 27 個F₁雜交後代，發現雜交後代在ITS 區域具雙親的條帶型；因此證實這些後代皆是千代蘭與蝴蝶蘭的雜交後代。進一步分析雜交後代之葉綠體基因組

關鍵字：聚合酶連鎖反應-限制片段長度多型性、細胞核核糖體 DNA、內轉錄間隔區、葉綠體基因組、母系遺傳

前 言

蘭科植物(Orchidaceae)是被子植物中最大、最具多樣性的科(family)，約有 900 個屬及 35,000 種⁽⁶⁾，為目前世界上重要的花卉產業之一。根據台灣 98 年外銷金額資料顯示，花卉外銷總金額為 1 億 1,070 萬美元，蘭花約占 78%，金額達 8,680 萬美元，其中蝴蝶蘭為 6,387 萬美元，佔台灣花卉外銷總金額 58%⁽²⁾，可知蘭花深受大眾喜愛頗深，所以培育新品種，將可增加經濟效益⁽¹⁾。新品種培育包括種間雜交(interspecific hybridization)與屬間雜交(intergeneric hybridization)二類，其中種間雜交(interspecific hybridization)方面，天然雜交(natural hybridization)普遍存在^(16,49)，如長距白鶴蘭(*Calanthe x dominii*)。屬間雜交(intergeneric hybridization)大部份是人工雜交，從英國皇家園藝協會(RHS)的記錄中，發現目前約有一千四百多個人工雜交屬(artificial genus)⁽⁵⁾。

近年來利用分子技術進行雜交後代之鑑定，已成為重要的參考依據，在

¹高雄區農業改良場副研究員、助理研究員、研究助理

DNA分子標誌技術方面，早期有限制片段長度多型性，簡稱RFLP(restriction fragment length polymorphism)⁽⁸⁾，之後也有逢機擴增多型性DNA，簡稱RAPD(random amplified polymorphic DNA)⁽⁵³⁾、簡單重複區間擴增多型性，簡稱ISSR(inter simple sequence repeat)⁽⁵⁵⁾、DNA擴增指紋，簡稱DAF(DNA amplification fingerprinting)⁽¹²⁾和聚合酶連鎖反應-限制片段長度多型性，簡稱PCR-RFLP出現，使雜交品種鑑定之DNA分子標誌技術發展趨於成熟。其中PCR-RFLP技術由於價格便宜、方法簡單，可在短時間內得到結果⁽³²⁾，已廣泛使用在植物中細胞核DNA⁽³⁸⁾、粒線體DNA(mitochondrial DNA)^(10,24,30)與葉綠體DNA(chloroplast DNA, cpDNA)^(18,21,23,45,48)等不同基因的分析上。

細胞核核糖體DNA(nuclear ribosomal DNA, nrDNA)與葉綠體DNA(chloroplast DNA, cpDNA)在雜交後代的遺傳特性分析上已有許多的報導，在nrDNA通常以雙親遺傳為主^(9,31,38)。cpDNA屬於細胞質的基因，其遺傳方式有別於細胞核基因的遺傳方式，通常是單親遺傳為主^(17,35,37,44)。高等植物中可分為裸子植物(gymnosperms)與被子植物(angiosperms)，裸子植物的cpDNA大部份以父系遺傳(paternal inheritance)為主^(37,44,51)，而被子植物的cpDNA約佔73%⁽²⁶⁾以母系遺傳(maternal inheritance)為主^(17,25,35,40)，但有少數被子植物屬於父系遺傳，如胡蘿蔔屬(*Daucus*)⁽¹¹⁾、獼猴桃屬(*Actinidia spp.*)^(14,46)、*Turnera*⁽⁴²⁾、牽牛屬(*Pharbitis*)⁽²⁷⁾和*Larrea*屬⁽⁵⁵⁾等。此外，亦有少數被子植物為雙系遺傳，如天竺葵屬(*Pelargonium*)⁽³⁴⁾和苜蓿(*Medicago*)⁽³³⁾等。

本研究利用聚合酶連鎖反應-限制片段長度多型性技術(PCR-RFLP)來分析細胞核基因組(nuclear genome)的nrDNA，以及葉綠體基因組(chloroplast genome)的Ascocenda John De Biase "Blue", ♀) × 池上線條蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Chih Shang's Stripes, ♂)的屬間雜交後代F₁植株之細胞核基因組與葉綠體基因組之遺傳性。

材料與方法

一、試驗材料

本研究對象為以千代蘭(*Ascocenda* John De Biase "Blue", ♀)為母本，與池上線條蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Chih Shang's Stripes, ♂)為父本進行屬間雜交後代所產生之F₁植株，材料種植於高雄區農業改良場花卉研究室的溫室內。

二、試驗方法

(一)總 DNA 的萃取

利用 DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)的方法進行植物總 DNA 的萃取，取 0.1 克新鮮蘭花葉片置於研鉢，加入液態氮，快速研磨葉片成粉末狀，加入 AP1 buffer 400 µl，充分混合後，再加入 RNase A 4 µl，於 65°C 水浴作用 10 分鐘後，再加入 AP2 buffer 130 µl，充分混合後，冰浴 5 分鐘，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液倒入由 QIA shredder spin column 及 2 ml-collection tubes 組成的過濾管組，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，再將過濾後的溶液放入新的 1.5 ml 離心管，加入 1.5 倍過濾後的溶液體積之 AP3 buffer 充分混合，取 650 µl 混合液(分二次)放入由 DNeasy mini spin column 及 2ml-collection tubes 組成過濾管組，以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，再把 DNeasy mini spin column 移到新的 2 ml-collection tubes 上，加入 AW buffer 500 µl，充分混合後，以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，再一次加入 AW buffer 500 µl，充分混合後，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將 DNeasy mini spin column 移到新的 1.5 ml 離心管上，加入 AE buffer 100 µl，於室溫靜置 2 分鐘後，以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，即得總 DNA。

(二) nrDNA 之 ITS 的 PCR-RFLP 分析

反應液之總體積為 50 µl，反應試劑為無菌水(ddH₂O)取 33 µl、10X PCR buffer取 5 µl、10 mM dNTP取 1 µl、DMSO取 5 µl、引子組 10 µM為IT1-1 及IT2-1⁽⁴⁷⁾各取 2 µl、總DNA取 1 µl、Advantage II DNA polymerase Mix (Clontech)取 1 µl。將PCR反應液放入 0.2 ml離心管中，置於PCR反應儀 (Biometra)中進行PCR反應，其條件開始先以 94°C 變性 10 分鐘，再以 94°C 變性 45 秒、59°C 煉合 20 秒、72°C 延長 1 分鐘、重覆進行 10 循環，接著以 94°C 變性 45 秒、57°C 煉合 20 秒、72°C 延長 1 分鐘、重覆進行 30 循環，最後再延長 72°C 作用 7 分鐘，以 4°C 保存。將PCR產物取 11.5 µl、10X PCR buffer B取 1.5 µl、限制酶 *A*/ul (10 units/µl)取 2 µl，於 37°C 作用 12-16 小時，再利用 2%瓊脂凝膠(agarose gel)進行電泳分析。

(三)葉綠體 DNA *trnL* intron 的 PCR-RFLP 分析

反應液之總體積為 50 µl，反應試劑為ddH₂O取 33 µl、10X PCR buffer取 5 µl、10 mM dNTP取 1 µl、引子組(10 µM)為trnL-1 及trnL-2 (Taberlet *et al.*, 1991)各取 2 µl、總DNA取 1 µl、Advantage II DNA polymerase Mix (Clontech)取 1 µl，進行PCR反應，其條件開始先以 94°C 變性 5 分鐘，再以 94°C 變性 25 秒、65°C 煉合 25 秒、72°C 延長 30 秒、重覆進行 10 循環，接著以 94°C 變性 25 秒、64°C 煉合 25 秒、72°C 延長 30 秒、重覆進行 30 循環，最後再延長 72°C 作用 7 分鐘，以 4°C 反應終止。取PCR產物 11.5 µl、10X PCR buffer

取 1.5 μ l、限制酶 *TaqI* (10 units/ μ l)取 2 μ l，於 65 $^{\circ}$ C 作用 12-16 小時，再利用 2%瓊脂凝膠(agarose gel)進行電泳分析。

結果

分別針對細胞核中核糖體DNA(nrDNA)之ITS區域與cpDNA之 *trnL* intron 區域進行PCR-RFLP分析。nrDNA之ITS區域PCR產物約為 746 bp(圖 1)，將ITS區域之PCR產物利用限制酶 *AluI* 進行切割，然後電泳分離(圖 2)，發現親本中的千代蘭有二個條帶，分別約為 604 和 142 bp，而親本中的池上線條蝴蝶蘭ITS區域PCR產物並無 *AluI* 限制酶之限制切位，所以維持約為 746 bp。在所分析的 27 個 F_1 植株方面，可發現有三個條帶，分別約為 746、604 和 142 bp，因此雜交後代同時具有千代蘭(母本)與池上線條蝴蝶蘭(父本)的條帶型，因此可以證實 27 個 F_1 植株在ITS區域，屬於雙親遺傳(biparental inheritance)。

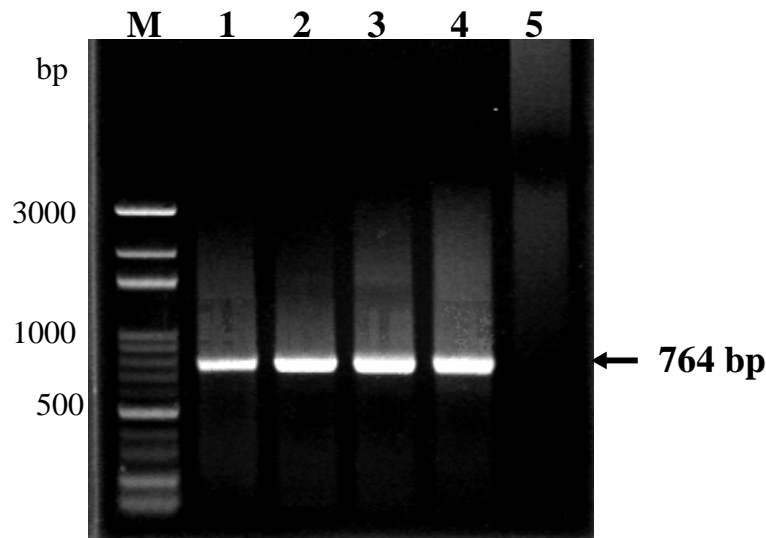


圖 1. 細胞核中核糖體DNA之內轉錄間隔區(ITS) PCR產物。Lane 1:表示千代蘭(母本); Lane 4:表示池上線條蝴蝶蘭(父本); Lanes 2-3:表示 F_1 植株; Lane 5: 表示negative control; M:100 bp DNA ladder marker.

Fig. 1. PCR products of internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. Lanes 1 and 4 represent maternal parent (*Ascocenda* John De Biase "Blue") and paternal parent (*Phalaenopsis* Chih Shang's Stripes), respectively. Lanes 2 and 3 represent F_1 hybrids. Lane 5: negative control. M:100 bp DNA ladder marker.

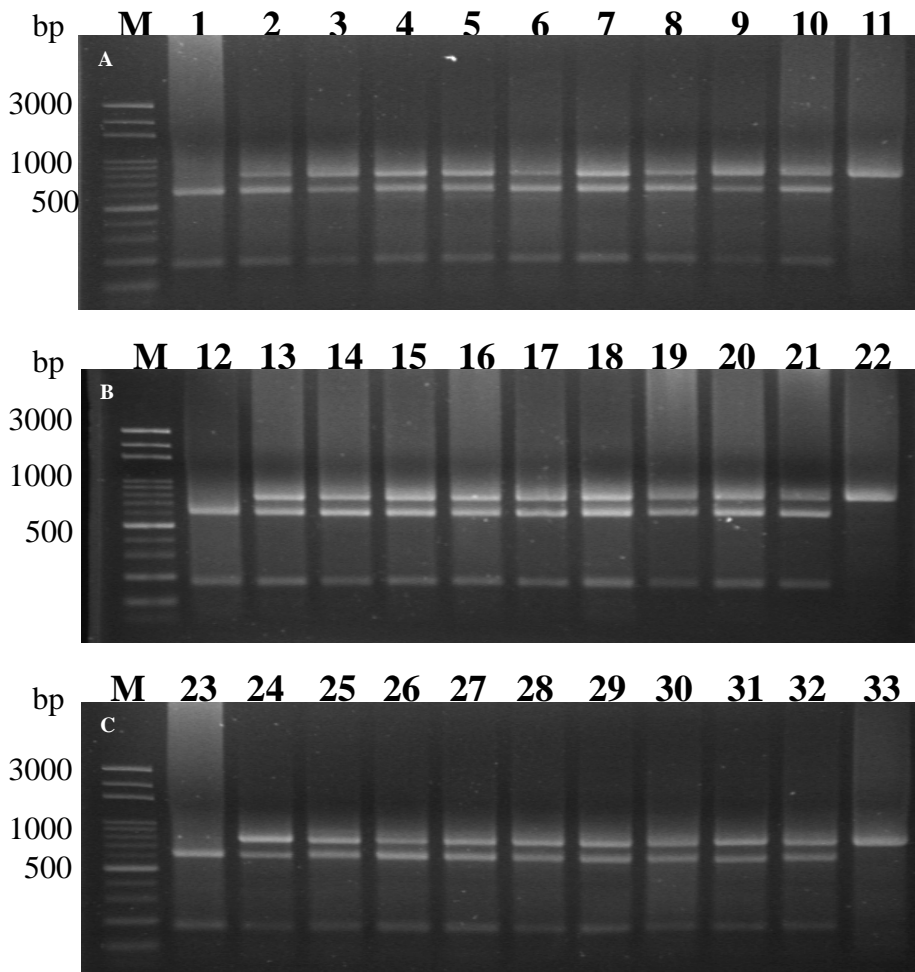


圖 2. 利用PCR-RFLP分析細胞核中核糖體DNA之內轉錄間隔區(ITS) PCR產物，使用限制酶*AluI*進行切割。Lanes 1, 12 及 23:表示千代蘭(母本); Lanes 11, 22 及 33:表示池上線條蝴蝶蘭(父本)。Lanes 2-10, 13-21 及 24-32:表示F₁植株; M: 100 bp DNA ladder marker.

Fig. 2. PCR-RFLP analysis of internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA PCR product for each sample was cut by *AluI* restriction enzyme. Lanes 1, 12, 23 and 11, 22, 33 represent maternal parent (*Ascocenda* John De Biase "Blue") and paternal parent (*Phalaenopsis* Chih Shang's Stripes), respectively. Lanes 2-10, 13-21, 24-32 represent F₁ hybrids. M: 100 bp DNA ladder marker.

利用PCR-RFLP分析cpDNA之*trnL* intron區域，*trnL* intron區域之PCR產物約為 785 bp(圖 3)，將其PCR產物利用限制酶*TaqI*進行切割(圖 4)，在親本中的千代蘭有四個條帶分別大約為 305、214、149 和 117 bp，而池上線條蝴蝶蘭的四個條帶分別大約為 300、250、149 和 86 bp。在 27 個雜交後代F₁植株之條帶，分別大約為 305、214、149 和 117 bp，與千代蘭(母本)的條帶型一致，因此千代蘭與蝴蝶蘭的屬間雜交屬於母系遺傳(maternal inheritance)。

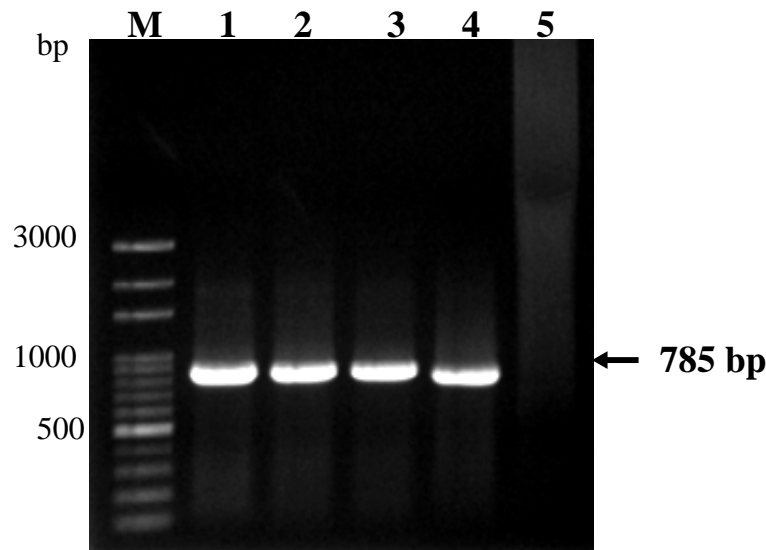


圖 3. 葉綠體基因組之 *trnL* intron 的PCR產物。Lane 1:表示千代蘭(母本)；Lanes 2-3:表示F₁植株；Lane 4:表示池上線條蝴蝶蘭 (父本)；Lane 5:表示negative control；M: 100 bp DNA ladder marker.

Fig. 3. PCR products for the *trnL* intron of chloroplast DNA. Lanes 1 and 4 represent maternal parent (*Ascocenda* John De Biase "Blue"), paternal parent (*Phalaenopsis* Chih Shang's Stripes), respectively. Lanes 2-3 represent F₁ hybrids. Lane 5: negative control M: 100 bp DNA ladder marker.

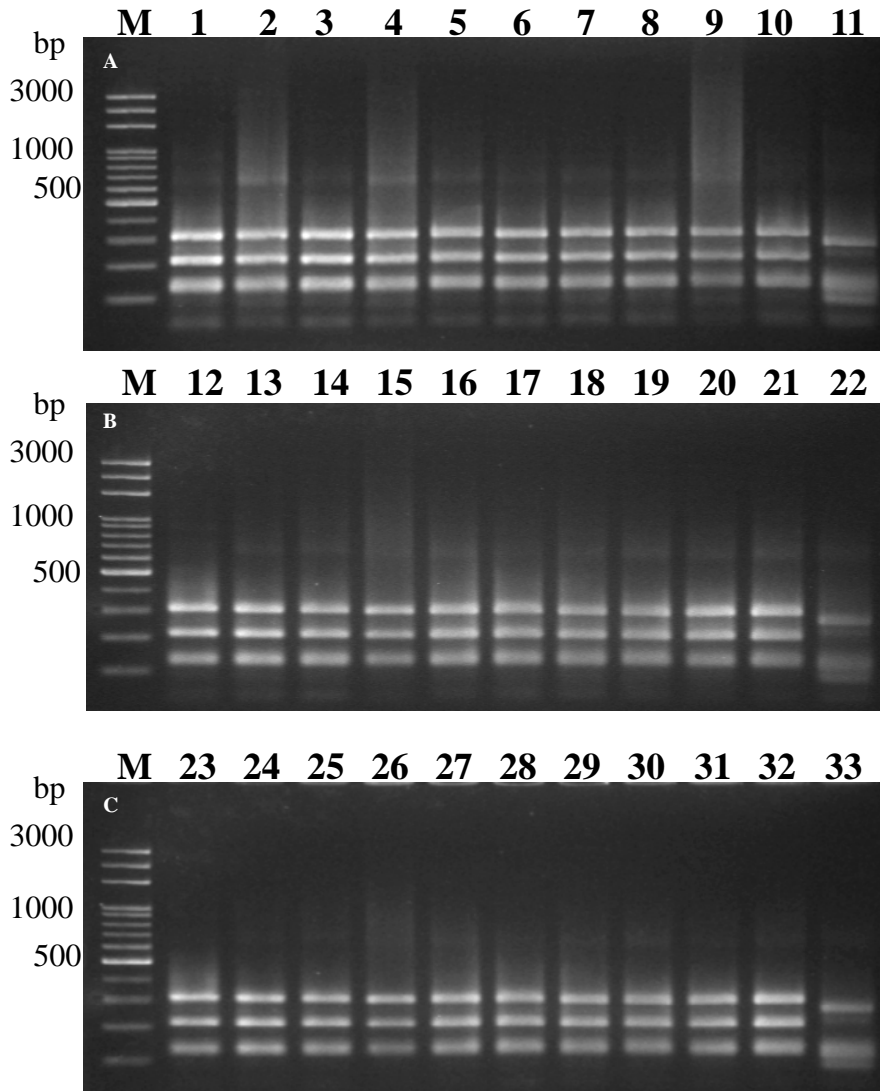


圖 4. 利用PCR-RFLP分析葉綠體基因組之 $trnL$ intron PCR產物，使用限制酶 $TaqI$ 切割。Lanes 1, 12 及 23: 千代蘭(母本); Lanes 11, 22 及 33: 池上線條蝴蝶蘭(父本); Lanes 2-10, 13-21 及 24-32: 表示 F_1 植株; M: 100 bp DNA ladder marker.

Fig. 4. PCR-RFLP analysis of $trnL$ intron of chloroplast DNA for each sample was cut by $TaqI$ restriction enzyme. Lanes 1, 12, 23 and 11, 22, 33 represent maternal parent (*Ascocenda* John De Biase "Blue") and paternal parent (*Phalaenopsis* Chih Shang's Stripes), respectively. Lanes 2-10, 13-21, 24-32 represent F_1 hybrids. M: 100 bp DNA ladder marker.

討 論

利用ITS區域研究雜交後代之遺傳特性，直接以PCR產物定序或PCR-RFLP行之^(3,22,29,36,38,39,52)。本研究利用PCR-RFLP分析27個屬間雜交後代F₁植株，結果呈現雙親遺傳，此與曾被報導的香蕉(bananas)(*Musa acuminata* Colla × *M. balbisiana* Colla)⁽³⁸⁾、文心蘭雜交種*Oncidium Twinkle* (*O. ornithorhynchum* × *O. cheiroporum*)⁽³⁾有相同的結果。

nrDNA之ITS區域在進行有性生殖過程中，會經由不均勻重組(unequal crossing over)和基因轉變(gene conversion)的調控，發生協同演化(concerted evolution)現象，使rDNA能保持均質性(homogeneity)^(7,20,57)，如棉屬*Gossypium*⁽⁵²⁾及*Cardamine*⁽²²⁾。本研究的屬間雜交雜交後代之ITS區域，依然存在著異質性，同時具有雙親不同形式的ITS區域序列，表示協同演化尚未完成，此肇因於雜交後代F₁為近期事件。上述現象也在芍藥屬(*Paeonia*)的天然四倍體雜交種⁽⁴²⁾、香蕉(*Musa*)⁽³⁸⁾、百香果雜交種*Passiflora Aurora*、*P. Paola Gastaldo*和*P. Manta*⁽³⁶⁾等。此外，亦有異源四倍體*Nicotiana tabacum* rDNA存在著異質性(heterogeneity)與序列發生重組(rearrangement)現象⁽⁴⁹⁾。

由於蘭科植物為被子植物，而被子植物的葉綠體基因組多數是母系遺傳，其多數比例約佔73%⁽²⁶⁾。本研究利用PCR-RFLP技術分析葉綠體DNA之Ascocenda John De Biase "Blue", ♀) × 池上線條蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* Chih Shang's Stripes, ♂)屬間雜交後代F₁植株的葉綠體DNA遺傳方式，發現與曾報導的雜交後代如酸橙(*Citrus aurantium* L.) × 枸橘(*Poncirus trifoliata* (L.) Raf)雜交種⁽²³⁾、番木瓜(*Carica papaya* L.) × *Vasconcellea species*雜交種⁽¹⁹⁾和歐洲黑楊(Black Poplar) (*Populus nigra* L.)⁽²⁸⁾一樣，皆為母系遺傳。前人研究利用RFLP分析葉綠體DNA之*rbcl*基因，探討*Phalaenopsis* × *Doritis*與*Doritis* × *Phalaenopsis*雜交種之葉綠體DNA的遺傳性，結果也支持了本研究，屬於母系遺傳⁽¹³⁾。但並不是指所有的被子植物的葉綠體DNA皆為母系遺傳，如胡蘿蔔屬(*Daucus*)⁽¹¹⁾、獼猴桃屬(*Actinidia* spp.)^(14,46)、*Turnera*⁽⁴¹⁾、牽牛屬(*Pharbitis*)⁽²⁷⁾和*Larrea genera*⁽⁵⁵⁾等，則是提供了父系遺傳的證據，此外，亦有少數如天竺葵屬(*Pelargonium*)⁽³⁴⁾和苜蓿(*Medicago*)⁽³³⁾等，提供了雙系遺傳。在另一方面，裸子植物在1986年首先利用RFLP方法發現父系遺傳方式⁽³⁷⁾，可了解父系遺傳在裸子植物中較為普遍⁽²⁵⁾。

另外，高等植物細胞質經有性生殖之遺傳規律分析中，當雜交種為母系

遺傳時，通常會因為母本的配子細胞大，含有大量的細胞質，而父本的配子細胞較小，往往只含有少量的細胞質，所以母本對子代具有決定性的作用，也就是子代的葉綠體DNA會源自於母本，不會與父本葉綠體DNA進行遺傳重組。如一些植物利用超微結構的觀察，證明配子融合時精細胞的細胞質被排除在卵細胞之^(25,35)，因此可得知植物的葉綠體的遺傳方式為單親遺傳居多^(17,35,37,44)。例如在已確定一個雜交種的兩個親本的情況下，可以利用葉綠體DNA的遺傳特性來判斷雜交種的母本與父本，同時，反過來利用葉綠體DNA的遺傳特性來幫助確定雜交種的親本^(14,15)。

參考文獻

1. 陳文輝. 2007. 台灣如何成為蝴蝶蘭王國. p.76. 科學人。
2. 陳玫伶. 2010. 國際商情雙周刊. 第 288 期。
3. 黃勝忠、蔡奇助、易美秀. 2002. 利用分子標誌分析 rDNA 之 ITS 區域鑑定文心蘭亞族品種. 臺中區農業改良場研究彙報. 74: 1-15.
4. 傅仰明、陳文輝、蔡媚婷、林益賢、邱明森、陳耀煌. 1997. 逢機增幅多型性 DNA 分子標誌在蝴蝶蘭原生種分類及演化親緣關係之研究. 台糖研究彙報. 157: 27-42.
5. 蔡奇助、莊畫婷. 2009. 遠緣雜交與分子遺傳鑑定技術在蝴蝶蘭育種之應用潛力. 農業生技產業季刊. 17: 37-45.
6. Arditti, J. 1992. Classification and naming of orchids, The Fundamentals of Orchid Biology, pp. 55-101, John Wiley and Sons Press.
7. Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Mo. Bot. Gard. 82: 247-277.
8. Beckman, J. S. and M. Soller 1983. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement: methodologies, mapping and cost. Theor. Appl. Genet. 67: 33-43.
9. Bellamy, A., C. Mathieu, F. Vedel, and H. Bannerot 1995. Cytoplasmic DNAs and nuclear rDNA restriction fragment length polymorphisms in commercial witloof chicories. Theor. Appl. Genet. 91: 505-509.
10. Benzie, J. A., H. E. Ballment, and S. Frusher 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: Concordant results from mtDNA and

- allozymes. *Aquaculture* 111: 89-93.
11. Bobolenz, K., T. Nothnagel, and M. Metzloff 1990. Paternal inheritance of plastids in the genus *Daucus*. *Mol. Gen. Genet.* 220: 489-491.
 12. Caetano-Anollés, G. and B. J. Bassam 1993. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 42: 189-200.
 13. 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.
 14. Cipriani, G., R. Testolin, and M. Morgante 1995. Paternal inheritance of plastids in interspecific hybrids of the genus *Actinidia* revealed by PCR-amplification of chloroplast DNA fragments. *Mol. Gen. Genet.* 247: 693-697.
 15. Corriveau, J. L. and A. W. Coleman 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Am. J. Bot.* 75: 1443-1458.
 16. Cronn, R. and J. F. Wendel 2004. Cryptic trysts, genomic mergers, and plant speciation. *New Phytol.* 161: 133-142.
 17. Corriveau, J. L. and A. W. Coleman 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Am. J. Bot.* 75: 1443-1458.
 18. Demesure, B., N. Sodji, and R. J. Petit 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4: 129-131.
 19. Droogenbroeck, B. Van., I. Maertens, A. Haegeman, T. Kyndt, C. O'Brien, R. A. Drew, and G. Gheysen 2005. Maternal inheritance of cytoplasmic organelles in intergeneric hybrids of *Carica papaya* L. and *Vasconcellea* spp. (Caricaceae Dumort., Brassicales) *Euphytica* 143: 161-168.
 20. Dover, G. A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-116.
 21. Dumolin-Lape`gue, S., M. H. Pemonge, and R. J. Petit 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Mol. Ecol.* 6: 393-397.

22. Franzke, A. and K. Mummenhoff 1999. Recent hybrid speciation in *Cardamine* (Brassicaceae) conversion of nuclear ribosomal ITS sequences in statu nascendi. *Theor. Appl. Genet.* 98: 831-834.
23. Fu, C. H., C. L. Chen, W. W. Guo, and X. X. Deng 2004. GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining Goutou sour orange and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Rep.* 23: 391-396.
24. Funckenstein, B., B. Cavari, T. Stadie, and E. Davidovitch 1990. Restriction site polymorphism of mitochondrial DNA of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) broodstock in Eilat, Israel. *Aquaculture* 89: 217-223.
25. Hagemann, R. 1992. Plastid genetics in higher plants; In Herrmann, R. G. (ed.), *Cell Organelles*, pp. 65-96, Springer-Verlag, Wien.
26. Harris, S. A. and R. Ingram 1991. Plastid DNA and biosystematics: the effect of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 40: 393-412.
27. Hu, Z. M., S. Y. Hu, and Z. J. Zhong 1996. Paternal inheritance of plastid DNA in genus *Pharbitis*. *Acta. Bot. Sin.* 38: 253-256.
28. Holderegger, R., S. Angelone, S. Brodbeck, D. Csencsics, F. Gugerli, S. E. Hoebee, and R. Finkeldey 2005. Application of genetic markers to the discrimination of European Black Poplar (*Populus nigra*) from American Black Poplar (*P. deltoides*) and Hybrid Poplars (*P. × canadensis*) in Switzerland. *Trees* 19: 742-747.
29. Kim, K. J. and R. K. Jansen 1994. Comparisons of phylogenetic hypothesis among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst. Evol.* 190: 157-185.
30. Klinbunga, S., D. J. Penman, B. J. McAndrew, and A. Tassanakajon 1999. Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* 1: 113-121.
31. Kovarik, A., J. Fajkus, B. Koukalova, and M. Bezdek 1996. Species-specific evolution of telomeric and rDNA repeats in the tobacco composite genome. *Theor. Appl. Genet.* 8: 1108-1111.
32. Manhart, L. and R. M. McCourt 1992. Molecular data and species

- concepts in the algae. *J. Phycol.* 28: 730-737.
33. Masoud, S. A., L. B. Johnson, and E. L. Sorensen 1990. High transmission of paternal plastid DNA in alfalfa plants demonstrated by restriction fragment polymorphic analysis. *Theor. Appl. Genet.* 79: 49-55.
 34. Metzloff, M., T. Borner, and R. Hagemann 1981. Variations of chloroplast DNAs in the genus *Pelargonium* and their biparental inheritance. *Theor. Appl. Genet.* 60: 37-41.
 35. Mogensen, H. L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am. J. Bot.* 83: 383-404.
 36. Muschner, V. C., A. P. Lorenz-Lemke, M. Vecchia, S. L. Bonatto, F. M. Salzano, and L. B. Freitas 2006. Differential organellar inheritance in *Passiflora*'s (*Passifloraceae*) subgenera. *Genetica* 128: 449-453.
 37. Neale, D. B., N. C. Wheeler, and R. W. Allard 1986. *Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas-fir*. *Can. J. For. Res.* 16: 1152-1154.
 38. Nwakanma, D. C., M. Pillay, B. E. Okoli, and A. Tenkouano 2003. PCR-RFLP of the ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) provides markers for the A and B genomes in *Musa* L. *Theor. Appl. Genet.* 108: 154-159.
 39. O'Kane, S. L., B. A. Schaal, and I. A. Al-Shehbaz 1996. The origins of *Arabidopsis suecica* as indicated by nuclear rDNA sequences. *Syst. Bot.* 21: 559-566.
 40. Reboud, X. and C. Zeyl 1994. Organelle inheritance in plants. *Heredity* 72: 132-140.
 41. Sang, T., D. J. Crawford, and T. F. Stuessy 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 6813-6817.
 42. Shore, J. S. and M. Triassi 1998. Paternally biased cpDNA inheritance in *Turnera ulmifolia* (*Turneraceae*). *Am. J. Bot.* 85: 328-332.
 43. Skalick´a, K., K. Yoonglim, R. Matya´sˇek, B. Koukalov´a, A. R. Leitch, and A. Kovarˇik 2003. Rapid evolution of parental rDNA synthetic

- tobacco allotetraploid line. *Am. J. Bot.* 90: 988-996.
44. Stine, M., B. B. Sears, and D. E. Keathley 1989. Inheritance of plastids in intergenic hybrids of blue spruce and white spruce. *Theor. Appl. Genet.* 78: 768-774.
 45. Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105-1109.
 46. Testolin, R. and G. Cipriani 1997. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia*. *Theor. Appl. Genet.* 94: 897-903.
 47. Tsai, C. C. and S. C. Huang (2001) The internal transcribed spacer of ribosomal DNA as a marker for identifying species and hybrids of the *Oncidinae*. *J. Hort. Sci. Biotech.* 76: 674-680.
 48. Vekemans, X., O. Hardy, B. Berken, B. Fofana, and J. P. Baudoin 1998. Use of PCR-RFLP on chloroplast DNA to investigate phylogenetic relationships in the genus *Phaseolus*. *Biot. Agron. Soc. Environ.* 2: 128-134.
 49. Volkov, R. A., N. V. Borisjuk, I. I. Panchuk, D. Schweizer, and V. Hemleben 1999. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Mol. Biol. Evol.* 16: 311-320.
 50. Peakall, R., C. C. Bower, A. E. Logan, and H. I. Nicol 1997. Confirmation of the hybrid origin of *Chiloglottis* × *pescottiana* (Orchidaceae: Diurideae).
 51. Wagner, D. B., D. R. Govindaraju, C. W. Yeatman, and J. A. Pitel 1989. Paternal chloroplast DNA inheritance in a diallel cross of Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.) *J. Heredity* 80: 483-485.
 52. Wendel, J. F., A. Schnabel, and T. Seelanan 1995a. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 280-284.
 53. Wendel, J. F., A. Schnabel, and T. Seelanan 1995b. An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypioides* reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4: 298-313.
 54. 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 Res.* 18: 6531-6535.
55. Yang, T. W., Y. A. Yang, and Z. Xiong 2000. Paternal inheritance of chloroplast DNA in interspecific hybrids in the genus *Larrea* (Zygophyllaceae). *Am. J. Bot.* 87: 1452-1458.
56. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
57. Zimmer, E. A., S. L. Martin, S. M. Beverley, Y. W. Kan, and A. C. Wilson 1980. Rapid duplication and loss of genes coding for the alphachains of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2158-2162.