

利用 SCAR 分子標誌鑑定朵麗蝶蘭品種

前言

我國位於熱帶及亞熱帶地區，原產的蘭花約有八十屬四百種，其中蝴蝶蘭屬名 *Phalaenopsis* 是由 *phalaena*（原意為蝶蛾）及 *opsis*（意為形象）而來。蝴蝶蘭屬的植物自然分布區只限於赤道南北緯各 23 度範圍內的東南亞及北澳地區。蝴蝶蘭因花期長、花序排列優美，因此特別受人喜愛。目前已發現約有五十個原生種，常見的約有二十多種，其分類方法始於一八六〇年，在常用的分類方法中以唇瓣的型態變化作為分類重點。

台灣於 2002 年加入世界貿易組織(WTO)，依據 WTO 之規範，各會員國應立法保護植物品種權。我國已於 2005 年修正公告實施「植物品種及種苗法」。目前所開放的作物種類共有 130 種，其中蔬菜類共有 56 種；花卉類共有 46 種，可進行國內植物品種權申請。目前申請案件以蝴蝶蘭(約 120 件)與朵麗蝶蘭(約 250 件)為大宗，共約三百多件。

為完全取得品種權的保護，必須經過兩道程序，其一是行政程序，包括申請、技術問卷的審查、費用的收取、組織 DUS (Distinctness、Uniformity、Stability)檢定、審核 DUS 報告及決定品種權的授予等；技術層面則要通過品種 DUS 檢定。檢定方法主要以外表性狀 DUS 檢定為主，即利用形態觀察或測量外表性狀如花色、花形、株高、葉形等的差異作為區分依據。然而作物品種、品系或營養系間的區別，有時易受外在環境的影響使得辨別困難度增加；或是作物苗期或種子期等，並不容易由外在性狀來區分個別差異。

分析 DNA 差異是現今作物遺傳研究的重點，在此領域中分子標誌 (molecular marker) 是非常有用的工具，用以分析作物的遺傳變異和遺傳組成，目前已經有多種分子標誌系統成功建立，如 RAPD (random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplification fragment length polymorphism)、SCAR(sequence characterized amplified region) 以及 SSR (simple sequence

repeat) 等。近年來，國際間發展分子標誌技術為輔助品種外表性狀檢定，作為品種鑑定時輔助的資料，特別是在再製品或種子(苗)上，但目前我國並無利用分子標誌應用於朵麗蝶蘭品種之鑑定。因此本研究將以朵麗蝶蘭為目標作物，應用分子生物原理與技術，建立重要品種(系)專一性的 SCAR 分子標誌，期未來能輔助品種性狀檢定結果，除作為釐清商業品種與智財權保護的客觀依據外。還可達到保障育種者權利、加速新品種育成、擴展國際市場與提升種苗產值之目標。

分子標誌試驗結果

1. RAPD 試驗結果：

以 500 個 RAPD 引子分析八個商業品種及其對照品種間差異條帶。將具有差異性條帶的 RAPD-PCR 組合再經過兩次確認性實驗，以篩選出較具穩定性之差異條帶(圖一)，進一步在每組挑選穩定性差異性條帶：在受保護品種 F1006 挑選了 RAPD 引子 K13; F1061 挑選了 RAPD 引子 G16; F981 挑選了 RAPD 引子 B8; F1307 及 F1302 皆挑選了 RAPD 引子 B11; F1016 挑選了 RAPD 引子 M4; F977 挑選了 RAPD 引子 E6; F2451 挑選了 RAPD 引子 C4。將挑選出的差異型條帶進行選殖後序列分析，依據序列的結果設計 SCAR 引子對。

2. SCAR 試驗結果

利用設計後的 SCAR 引子可組合成 86 組引子對，針對 30 個紅花系朵麗蝶蘭試驗材料進行 PCR 增幅試驗，試驗結果發現透過 Dorissr01/10、Dorissr20/27、Dorissr33/43、Dorissr32/43、Dorissr33/45、Dorissr35/42 共六個 SCAR 引子對組合，具有不同的差異性條帶，共產生 19 條再現性及穩定性高之分子標誌，將此 19 個鑑別標誌組合後可區分 30 個紅花系朵麗蝶蘭商業品種(圖二)。舉例來說以 Dorissr20/27 引子對產生約 1250 b.p 的分子標誌可以將品種--春天使、大觀火狐、香斌皇后與其他 27 個品種區分;以 Dorissr33/43 引子對產生約 300 b.p

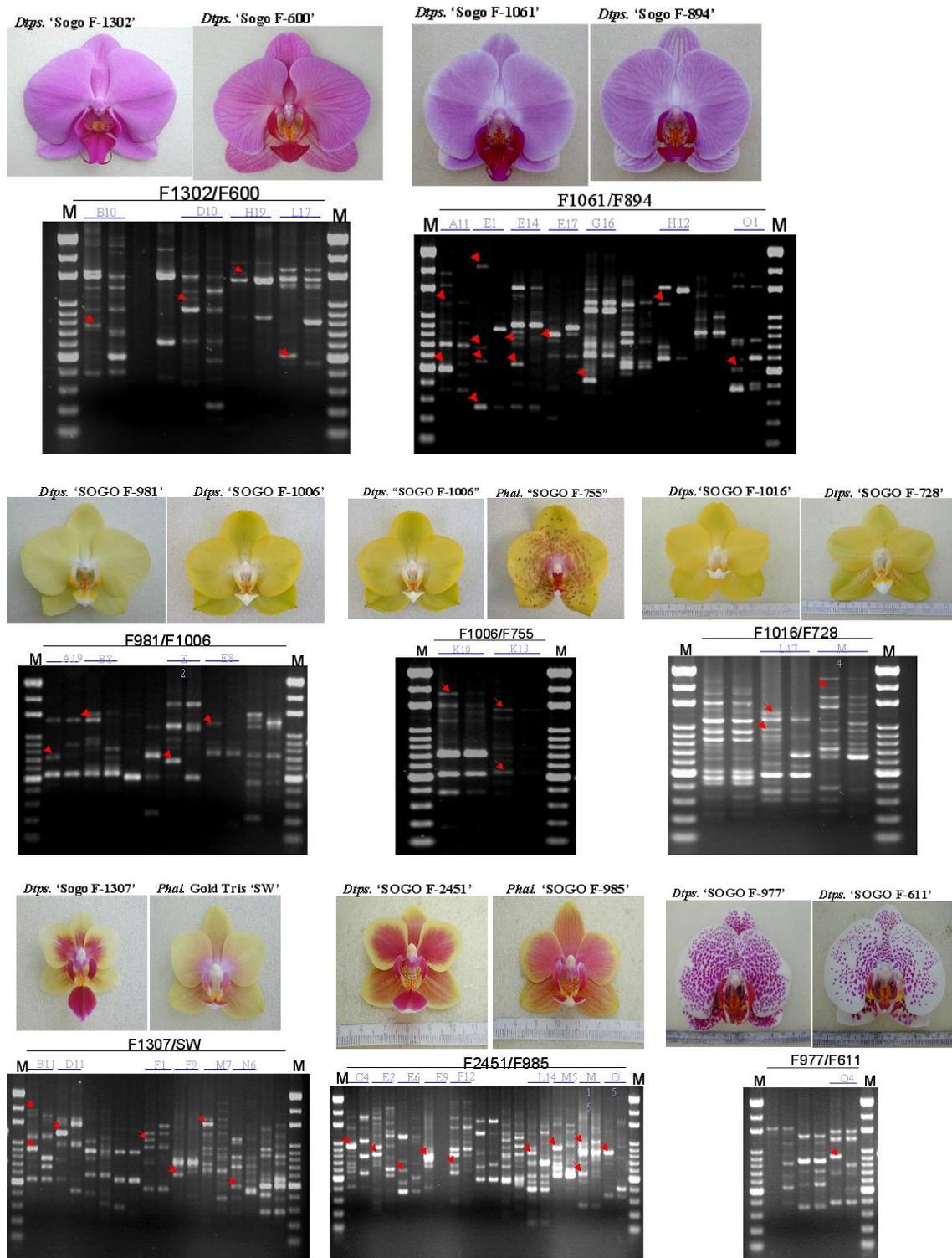
的分子標誌可以將品種--大觀火狐與其他 29 個品種區分。進一步依據這 19 個識別性分子標誌的有無，若有則給予 1 的編碼；若反之則給予 0 的編碼(圖三)，如此每個試驗材料可建立一組識別條碼。

結論

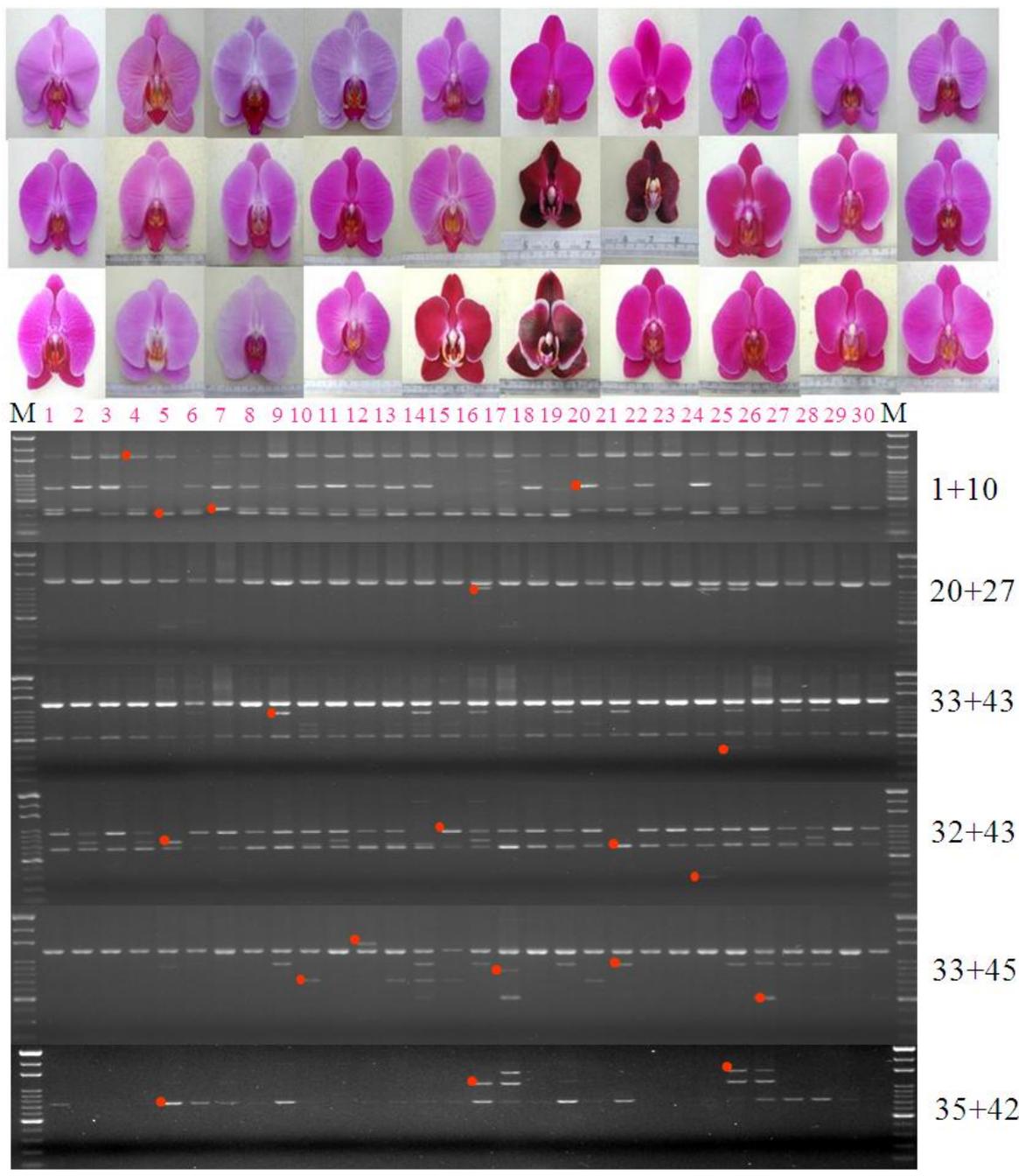
國際上相關研究報告中，利用RAPD、ITS及ISSR等分子標誌技術於蝴蝶蘭或朵麗蝶蘭品種鑑定與遺傳分析，包括泰國利用RAPD技術將36個樣品分別來自32個蝴蝶蘭屬、朵麗蝶蘭屬與金氏蝴蝶蘭屬品種分析其遺傳關係，而將蝴蝶蘭及其相關屬分類成11群。馬來西亞與伊朗大學利用RAPD技術將20個蝴蝶蘭品種分成三個群並分辨其遺傳距離與關係。台灣研究以RAPD 與ISSR 分子標誌鑑定所收集自台灣11份蝴蝶蘭及17份菲律賓蝴蝶蘭品種等。本試驗除了建立以RAPD-SCAR的鑑別系統外，另使用的材料也設定於受品種權保護的朵麗蝶蘭商業品種，故與上述研究報告有所區別。而利用本試驗所建立之19個SCAR分子標誌可以將30個紅花系的朵麗蝶蘭目標品種進行完全區分。但若以目標品種外的朵麗品種進行試驗，是否可以區分則需再進行試驗確認。因此，此一建立方法必須再進行識別性評估，才可實際用於輔助品種鑑別上。

表一、30個紅花系朵麗蝶蘭材料其代號與名稱

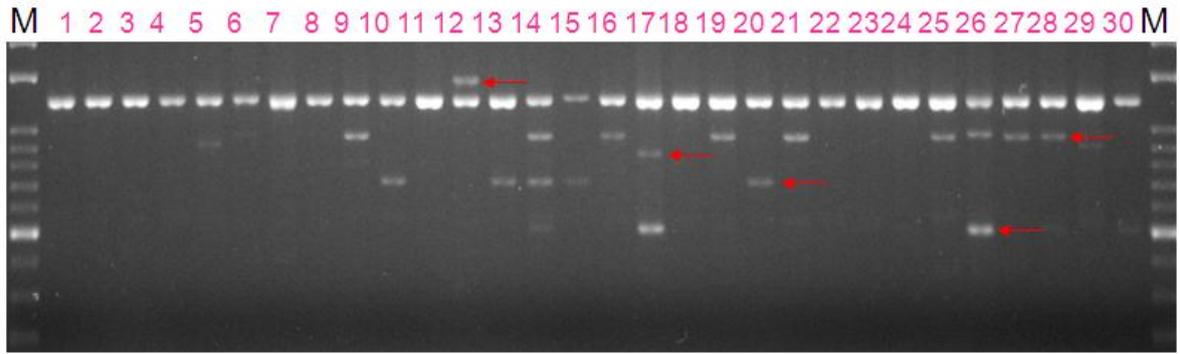
代號	申請/對照	公開案號	中文品種名	英文品種名
1	申請品種	463	世芥天使	Dtps. Sogo Yoshida 'Sogo F-1302'
2	對照品種	C463		Dtps. Kung's Valentine 'Sogo F-600'
3	申請品種	456	世芥彩蝶	Dtps. Sogo Moonhalo 'Sogo F-1061'
4	對照品種	C456		Dtps. Tinny Honey 'Sogo F-894'
5	申請品種	459	世芥歡心	Dtps. Sogo Wedding 'Sogo F-879'
6	申請品種	436	金車雪莉娜	Dtps. Sinica Cherry 'King Car Shelina'
7	對照品種	C436		Dtps. Queen Beer 'Mantefon'
8	申請品種	438	賓友之星	Dtps. Ben You Star
9	對照品種	C438		Dtps. Ben You Beauty
10	申請品種	478	立匠火鳥	Dtps. Bread Rose 'Lih Jianq Firebird'
11	對照品種	C478		Dtps. Sinica Sunday
12	申請品種	488	台霖甜心	Dtps. Tai Lin Lady 'N16'
13	對照品種	C488		Phal. (Tai Lin Angel × New Eagle) × Dtps. Luchia Star 'N60'
14	申請品種	499	台大紅玫瑰	Dtps. Taida Firebird 'Taida Red Rose'
15	對照品種	C499		Dtps. Taida Firebird 'Taida Red Crane'
16	申請品種	510	春天使	Dtps. Happy News 'Spring Angel'
17	對照品種	C510		Dtps. I-Hsin Black Jack 'KH5706#077'
18	申請品種	514	立匠鑽石	Dtps. Mei Dar Diamond 'Lih Jianq Diamond'
19	對照品種	C514		Dtps. Ruey-Lin Beauty'瑞利
20	申請品種	516	維納斯	Dtps. Lih Jianq Venus 'Venus'
21	申請品種	517	四季紅	Dtps. Leopard Prince 'Season Red'
22	申請品種	538	台霖桃絲 N92	Dtps. Tai Lin Pink 'Torce N92'
23	對照品種	C538		Dtps. Luchia Beauty 'TMR0601'
24	申請品種	552	大觀火狐	Dtps. Tai-Kan Fire Fox 'Fire Fox'
25	申請品種	571	香斌皇后	Dtps. Taida Pearl 'Champion Queen'
26	對照品種	C571		Dtps. Ever Spring Prince '75 號'
27	申請品種	572	千大紅玫瑰	Dtps. Rusy-Lih Red Rose 'Chien Da Red Rose'
28	對照品種	C572	巨寶紅玫瑰	Dtps. Jubo Pao Red Rose '巨寶紅玫瑰'
29	申請品種	581	台糖紅珍珠	Dtps. Taisuco Stellar 'Red Pear1'
30	申請品種	625	紫羅蘭 23	Dtps. Charm Sun Glory 'Violet 23'



圖一、八個受品種權保護品種(每組左方花朵圖片)及其對照品種(每組右方花朵圖片)之 RAPD-PCR 篩選差異性條帶電泳圖。經過三次重複性試驗後，圖中紅色箭頭處為出現在受保護品種之差異性條帶。



圖二、30 個受品種權保護及其對照品種(上；如表一所列)，分別由左至右、由上至下編碼 1~30；SCAR-PCR 篩選差異性條帶電泳圖(下)，紅色點標示處為可鑑別之 SCAR 分子標誌共有 19 個。



品種	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	29	30
標誌																														
3345-1400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3345-950	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
3345-850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3345-700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3345-500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

圖三、將其中一組SCAR-PCR分析之分子標誌轉換成數字編碼