

蝴蝶蘭品種分子鑑定應用

張惠如、鍾文全、楊佐琦
行政院農業委員會種苗改良繁殖場

摘要

植物品種權屬智財權的一種，可落實品種權保護與保障育種者權利，並進一步促進農業的發展。我國植物品種及種苗法自實施以來，已有 162 植物種類可申請品種權保護，其中以蝴蝶蘭(含朵麗蝶蘭)的申請案件最多約占五成的比例。蝴蝶蘭是台灣高經濟價值花卉之一，在全球大多數國家皆具有消費市場，且品種數量眾多。為加強蝴蝶蘭品種權保護，開發分子標誌品種鑑定系統，除可輔助現行性狀檢定方法外，還可提供侵權案件發生時的分子證據與配合蝴蝶蘭產業所需。簡單重複序列(simple sequence repeat, SSR)分子標誌具有高度多型性、高再現性、快速與可建立自動化高通量分析等優點，被廣泛應用於植物品種鑑定。本場整合國內已開發之 33 組 SSR 分子標誌，透過多方實驗室利用 12 個蝴蝶蘭原生種與 12 個蝴蝶蘭商業品種為共同試驗材料，最終篩選出 10 組具高度鑑別力的 SSR 分子標誌，運用於鑑別外部性狀相似的蝴蝶蘭品種。此 10 組 SSR 分子標誌試驗流程，已建立標準作業流程，依此 SOP 將進一步建立蝴蝶蘭 DNA 資料庫，並與國際上植物品種檢定單位進行合作，使得我國蝴蝶蘭品種鑑定技術能與國際交軌，提升鑑別結果的國際可信度，並落實我國品種權保護工作。

關鍵字：蝴蝶蘭品種、SSR 分子標誌、品種鑑定、植物品種權

前言

植物新品種為育種者心血結晶，為保障育種者權利及促進農業發展，國際植物新品種保護聯盟(UPOV)於 1961 年成立，世界各國紛紛加入 UPOV 並依公約之準則制定相關法令以保護植物新品種，所以保障育種者權利已是世界潮流及國際之規範。我國因礙於政治現實未能成為 UPOV 之會員國，但為保障國內育種者之權利、符合國內產業需求、加強與他國互惠合作及國際植物新品種保護公約(UPOV Act, 1991)之規範，於 1988 年公告施行「植物種苗法」，開放受理植物新品種權利登記，並於 2005 年 6 月 30 日完成修法公告新版「植物品種及種苗法」開始執行。目前公告有 162 種植物種類(統計至 2013 年 9 月底前)，受理植物品種權申請案件已達一千件以上。

蝴蝶蘭因花形花色優美、多樣化且花期長等優點，為我國出口高經濟價值花卉之一。根據財政部關稅總局統計資料，2012 年臺灣外銷花卉外銷總金額為 1 億 9463 萬美元，其中以蝴蝶蘭(含朵麗蝶蘭，以下以”蝴蝶蘭”統稱)佔比率最高為 1 億 1352 萬美元。跟 2011 年相比，整體蘭花及蝴蝶蘭亦有 16.26%及 15.26%的成長(李等，2013)。顯示在全球經濟景氣不佳的狀態下，我國蘭花產業在業者及相關人士的努力下仍然蓬勃發展，在國際舞臺佔有一席之地。為確保我國蝴蝶蘭產業競爭力，除維持育種能量、加強栽培管理、改善儲運技術及推動國際行銷外，維護蝴蝶蘭品種權及保障育種者權利亦是非常重要的工作。目前品種檢定方法仍以形

態觀察或測量外表性狀作為標準之檢定方法，如花色、花形與株高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，有時會受外在環境的影響，增加辨別的困難；或是在作物的某些生長期如苗期或種子等，並不容易以外表性狀來區分個別差異。因此，若能利用分子標誌技術可直接鑑定植物基因型的遺傳歧異度(genetic diversity)特性，不僅可輔助性狀檢定方法，提供分子層次上的鑑定依據，還可達到協助侵權鑑定分析的目的。因此本文將就如何應用 DNA 分子標誌技術於蝴蝶蘭品種鑑定進行簡介，並以本場這兩年透過農委會科技計畫的支持，進行國內已開發之蝴蝶蘭品種相關 DNA 分子標誌的整合，而建立蝴蝶蘭品種 SSR 分子鑑定技術平台。

利用DNA分子標誌進行品種鑑定

遺傳標誌大致可分為外表型、生化及 DNA 分子標誌等三大類。外表型標誌是依形態學上、生理學上或物候學(Phenological)上所得差異，主要由肉眼觀察可得之現象；生化標誌是以等電點、膠體電泳及異構酶等分析所得差異為主；至於 DNA 分子標誌則有增幅片段長度多型性(amplification fragment length polymorphism, AFLP)、限制片段長度多型性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、隨機增幅多型性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、簡單重複序列(simple sequence repeat, SSR)和單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析方法等。

前兩類型標誌所得之差異性來自基因產物，而 DNA 分子標誌所得之差異性則來自 DNA 序列差異性。

由於 DNA 分子標誌的差異主要來自基因組序列上的變異，因此較不受環境影響，也不受鑑定時植物之發育期及人為因子影響，更具客觀、準確與快速性。加上技術上原先具有的快速檢測、多型性高及易於進行大量樣品的檢測等優點，使得 DNA 分子標誌應用於植物品種鑑定上已成為國際趨勢。各種 DNA 分子標誌技術具有不同之優缺點，如 RFLP 需要大量高品質的基因組 DNA，且完成一次試驗的時間較長。AFLP 的多型性高，但相關費用較高與分析結果不易判讀，在不同實驗室間再現性較低，RAPD 易存在有再現性低的現象，SSR 和 SNP 則皆需要有序列的資訊。藉由共顯性、費用、獲得可利用之標誌數量等多個面向，將上述 DNA 分子標誌方法的差異性整理如表一。

考量 DNA 分子標誌應用於品種鑑定上需突破的問題點，如鑑別力要高、沒有特定品種範圍；及優良分子標誌的特性，如再現性高、具共顯性、分析簡便等條件。目前以 SSR 和 SNP 兩種分子標誌為國際上最常應用於品種鑑定的技術，且此兩分子標誌可進一步搭配次世代定序儀，進而提升基因型分析的效率。

國內研究單位蝴蝶蘭 SSR 分子標誌之整合

蝴蝶蘭為我國外銷旗艦農產品之一，政府多年來投入大量研究經費，

進行蝴蝶蘭及蝴蝶蘭產業相關研究，尤其是分子標誌應用在可進行蝴蝶蘭親緣性分析或品種鑑別上，但所開發之技術及試驗流程間並無進行整合，且缺乏跨實驗室能力試驗進行再現性及鑑別性測試。因此，本場近年來在農委會經費支應下，與國內相關研究單位，包括農委會桃園區農業改良場、農委會臺南區農業改良場及國立成功大學，將各單位已開發之蝴蝶蘭品種 SSR 分子標誌，透過一套相同試驗材料：包括 12 個蝴蝶蘭原生種及 12 個商業品種(材料名單如表二)，進行已開發之 SSR 分子標誌的篩選，期所開發的分子標誌，能在遺傳歧異度高的 24 個試驗材料中，皆能增幅出目標條帶；若這些目標條帶具有高多型性、易於分析判別，才是優秀之品種識別標誌。在 24 個試驗材料中完成 33 組 SSR-PCR 的試驗，並將這些有差異性之 SSR-PCR 產物，以 ABI3730 儀器之系統進行毛細管電泳(其解析度高達 1 bp.)分析，最後再將原始數據進行解讀與分析。由實驗結果得知，在 33 組 SSR 引子對中，對於原生種的材料有較多組引子對無法增幅出目標條帶，經討論後發現此 33 組 SSR 引子對的設計，來自幾個特定品種的核酸序列資料，故其親源與某些原生種的歧異度較高，因而無法有目標條帶的增幅。透過這 24 個共同試驗材料，從 33 組引子對挑選出符合我們篩選目標的 16 組引子對，其相關分析資料如表三。

後續利用外表性狀具有高相似度的品種權品種及其對照品種，進一步進行這 16 組引子對之鑑別力分析。在這 16 組 SSR 引子對中，有些為 2 個核苷酸重複的目標區域，有些則為 3、4 及 6 個核苷酸重複區域。藉由毛細管電

泳的分析結果發現，兩個核苷酸重複的SSR引子會有較多的殘跡條帶(stutter)，容易造成判讀的問題。而4或6個核苷酸重複的引子對，雖然其較不易產生殘跡條帶，判讀較為容易，卻較不具多型性，難以鑑別極相似的蝴蝶蘭商業品種，如大白花系列品種。為了後續實際應用的最佳經濟考量，最後保留了10組SSR引子對，並完成建置此10組SSR引子組的PCR試驗條件、結果判讀依據、鑑別方法的參考品種及標準試驗流程。

結語

品種識別鑑定的技術涵蓋由外表性狀、蛋白質、生化成分鑑定到最直接的DNA分析，而每個層次的方法有其識別鑑定的技術面限制。以DNA分子標誌分析而言，儀器的穩定度、引子的靈敏度、藥品的廠牌等都會影響識別鑑定的結果，常常無法以單一實驗室的鑑定結果即能完成完全的識別鑑定，而必須藉重多次的綜合識別鑑定結果作完整的評估，才有可能達成識別鑑定結果的公信。因此本場除了整合國內研究單位蝴蝶蘭品種SSR分子鑑定流程，並進行國內不同實驗室間能力試驗外，也持續與荷蘭植物品種檢定機構Naktuinbouw進行技術交流與合作。未來可使我國分子鑑定方法與結果具有一致性外，同時具國際認可之效力。本場往後將利用所建立之試驗標準作業流程，並搭配商業軟體進行蝴蝶蘭核酸SSR分子標誌分析資料儲存，逐步建立蝴蝶蘭品種之DNA資料庫，能輔助現行之性狀檢定方法，有效提升品種鑑定的效率外，協助我國蝴蝶蘭品種侵權案件的釐清，

落實農業智財權之施行，加強臺灣蝴蝶蘭產業於國際市場的競爭力。

參考文獻

1. 李紅曦 (1999) 赴荷蘭參加「國際植物品種保護訓練班」出國報告。
2. 李蒼裕、宋俊承、曾俊弼、葉宜瑄 (2013) 台灣蘭花產業現況。臺灣蘭訊 6:5-17
3. 范美玲 (2003) 我國植物品種保護法規及其修正方向。植物品種檢定技術訓練班講義。
4. 林東杰 (2003) 蝴蝶蘭微衛星序列之選殖與特性分析，國立成功大學生命科學研究所碩士論文。
5. 莊晝婷、沈再木、顏永福、劉景平、鄭隨和 (2004) 利用 RAPD 與 ISSR 分子標誌技術鑑定台灣蝴蝶蘭及菲律賓蝴蝶蘭物種。彰化花卉博覽會花卉新科技海報展專刊。pp163-166。
6. 郭怡孜 (2009) 蝴蝶蘭基因連鎖微衛星分子標誌的研發及其應用研究，國立成功大學生命科學研究所碩士論文。
7. Cipriani G, Marrazzo MT, Gaspero GD, Pfeiffer A, Morgante M, and Testolin R (2008) A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. BMC Plant Biology 8:127.
8. Cubry P, Musoli P, Legnaté H, Pot D, de Bellis F, Poncet V, Anthony F, Dufour M, and Leroy T (2008) Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. Genome 51:50-63.
9. Decroocq V, Hagen LS, Favé MG, Eyquard JP, and Pierronnet A (2004) Microsatellite markers in the hexaploid *Prunus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple sequence repeats. Molecular Breeding 13:135-142.
10. George J, Dobrowolski MP, van Zijll de JE, Cogan N, Smith KF, and Forester JW (2006) Assessment of genetic diversity in cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.) detected by SSR polymorphisms. Genome 49:919-930.
11. Govan CL, Simpson DW, Johnson AW, Tobutt KR, and Sargent DJ (2008) A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. x ananassa* cultivars. Molecular Breeding 22:649-661.

12. Hayden TW, Nguyen TM, Waterman A, and Chalmers KJ (2008) Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9:80.
13. Hsu CC, Chung YL, Chen TC, Lee YL, Kuo YT, Tsai WC, Hsiao YY, Chen YW, Wu WL, and Chen HH (2011) An overview of the *Phalaenopsis* orchid genome through BAC end sequence analysis. *BMC Plant Biology* 11:3-13.
14. Liesebach H, Schneck V, and Ewald E (2009) Clonal fingerprinting in the genus *Populus* L. by nuclear microsatellite loci regarding differences between sections, species and hybrids. *Tree Genetics and Genomics* 6:259-269.
15. Robert J. C., and James C. R. 2003 Plant genetic resources and molecular markers: variety registration in a new era *Plant Genetic Resources* 1:81-87.
16. Teunissen H (2011) Molecular markers for (orchid) variety protection and identification. International Symposium on Orchid Molecular Markers and Genomics. 10th November, Tainan, Taiwan.

表一 分子標誌分析方法比較表

項目/方法	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Technique	RE+S+H*	PCR	RE+PCR	PCR	PCR
Polymorphism base on	D,I,R**	D,I	D,I	N° of repetitions	PM***
Co-dominants	yes	no	no	yes	yes
Cost	high	low	medium	medium	high
Reproducibility	yes	no	no	yes	yes
Knowledge of the genome	not required	no	no	yes	yes
Number of markers available	high	high	high	high	high
Possibility of automation	no	no	yes	yes	yes
Work load	4-12 days	1-2 days	2-3 days	1-2 days	1-2 days
Environmental influence	no	no	no	no	no
Multiplex	low	low	high	medium	medium

註：(*)RE--限制酶, S--transfer, H--雜合反應

(**)D--刪除, I--插入, R--重新排列

(***)PM--點突變

表二 12個蝴蝶蘭原生種及12個商業品種共同試驗材料

<i>Phalaenopsis</i> species				
代號				
1	<i>P. amabilis</i>	<i>Phal.</i> amabilis‘Tual Is’	ama	
2	<i>P. aphrodite</i>	<i>Phal.</i> aphrodite‘大武’	aph	
3	<i>P. schilleriana</i>	<i>Phal.</i> schilleriana ‘Quezon’	sch	
4	<i>P. stuartiana</i>	<i>Phal.</i> stuartiana‘Lcyte’	stu	
5	<i>P. equestris</i>	<i>Phal.</i> equestris‘Samar’	equ	
6	<i>P. lueddemanniana</i>	<i>Phal.</i> lueddemanniana‘Quezon’	lue	
7	<i>P. amboinensis</i>	<i>Phal.</i> amboinensis‘Sulawesi’	amb	
8	<i>P. pulcherrima</i>	<i>Phal.</i> pulcherrima	pul	
9	<i>P. venosa</i>	<i>Phal.</i> venosa‘Sulawesi’	ven	
10	<i>P. sumatrana</i>	<i>Phal.</i> sumatrana‘Sarawak’	sum	
11	<i>P. violacea</i>	<i>Phal.</i> violacea ‘Sumatra’	vio	
12	<i>P. mannii</i>	<i>Phal.</i> mannii‘Vietan’	man	
<i>Phalaenopsis</i> cultivars			代號	
1	SogoF1302	<i>Dtps.</i> Sogo Yoshida’ SOGO F1302’	463	紅花
2	天使之音	<i>Dtps.</i> Joy Angel Voice’ Angel Voice’	452	紅花
3	台大小可愛	<i>Phal.</i> Zuma's Pixie’ Taida Little Cutie’	930	紅花
4	台糖 K41731	<i>Dtps.</i> Taisuco Gloria’ Taisuco K41731’	799	黃花
5	育品黃金	<i>Dtps.</i> Sogo Golden’ Yu Pin Gold’	522	黃花
6	安慶綠蘋果	<i>Phal.</i> Brother Sweet Sugar’ An Ching Green Apple’	500	黃花
7	中營恩典	<i>Phal.</i> Join Grace’ TH.288-4’	437	白花
8	台糖 k52202	<i>Dtps.</i> Taisuco Flourish’ Taisuco K52202’	924	白花
9	鉅寶貴妃	<i>Dtps.</i> Gu Keng Beauty’ Jihbao Guifei’	863	白花
10	SogoF1138	<i>Dtps.</i> Leopard Prince’ SOGO F1138’	279	斑花
11	鉅寶 2033	<i>Dtps.</i> Jihbao Fairy’ JB2033’	628	斑花
12	SogoF1555	<i>Phal.</i> Sogo Lawrence’ SOGO F1555’	758	斑花

表三 SSR markers於24個蝴蝶蘭共同材料之鑑別力分析

SSR marker	Size range (bp)	No. of Unique allele	No. of Unique genotype	PIC value
N1	142~200	21	20	0.92
N2	282~336	22	24	0.94
N3	135~190	24	24	0.94
N4	208~269	16	20	0.88
N5	244~288	19	21	0.93
N6	194~220	13	18	0.89
N7	135~279	21	20	0.93
N9	163~269	24	22	0.94
N10	218~290	22	22	0.91
V312	93~165	17	16	0.88
PH053	141~157	5	10	0.71
Pm4007	431~464	11	15	0.86
Pm4008	122~155	9	16	0.84
Pm4077	221~272	6	8	0.69
Pm6009	220~250	10	10	0.81
Pm6015	255~274	10	15	0.80