

Adh 基因應用於豆科及禾本科物種之鑑別

林思妤¹⁾、曾一航²⁾、林順福³⁾

¹⁾ 行政院農業委員會農業試驗所 生物技術組助理研究員

²⁾ 行政院農業委員會種苗改良繁殖場 助理研究員

³⁾ 國立臺灣大學農藝學系 副教授(通訊作者)

地址：10617 台北市羅斯福路四段一號

電話：02-33664769

傳真：02-33620879

電子信箱：shunfu@ntu.edu.tw

摘要：近年來 DNA 條碼被廣泛使用於親緣分析及物種鑑別上，不過目前常用之葉綠體及核糖體 DNA 條碼往往無法有效區分近緣物種，而為了改善現有植物 DNA 條碼解析度不足之問題，本研究先以紅豆品種間 *Adh* 基因序列變異為基礎，延伸至其他豆科物種，再試圖擴展至禾本科等其他作物，期能開發廣適用性之 DNA 條碼。比對 9 個臺灣紅豆品種之 *Adh1* 及 *Adh2* 基因序列發現，在紅豆品種間 *Adh1* 基因不具多型性，而 *Adh2* 基因則具有 15 個多型性位點，顯示對於紅豆種內品種鑑別 *Adh2* 基因比 *Adh1* 基因更具種內區分之潛力。依據豆科物種之 *Adh1* 及 *Adh2* 基因以及禾本科之 *Adh1* 基因序列分析結果，本研究分別針對豆科及禾本科各開發出兩組 *Adh* DNA 條碼，這些 *Adh* DNA 條碼皆可以長度多型性區別不同物種，種內也具有定序多型性，均可有效地應用在物種層級之鑑別及親緣分析，而在種內之鑑別則依物種而異，這些結果顯示本研究所開發之 *Adh* DNA 條碼確實可補充現今 DNA 條碼解析度不足之問題。

關鍵詞：DNA 條碼、酒精脫氫酵素(*Adh*)、物種鑑別、親緣分析、豆科、禾本科

前 言

DNA 條碼泛指可區分世界上大部分物種之短片段 DNA 序列 (Hollingsworth, 2011)，常被使用於辨識未知物種 (Ferri *et al.*, 2009)、解析物種複雜之演化 (DiMeglio *et al.*, 2014) 及檢測商品內含物等 (Stoeckle *et al.*, 2011; Galimberti *et al.*, 2013;

接受日期：109 年 8 月

Newmaster *et al.*, 2013)，不論在學術研究抑或是商品檢測上，DNA 條碼是不可或缺且易於使用之工具。DNA 條碼具有以下主要之優點：包括檢驗流程快速簡便且便宜，不受待測物形式（如粉狀或甚至輕微加工）所限，且由於 DNA 條碼具有廣適用性，可廣泛擴增大部分物種之目標 DNA 片段，因此不須因待測物種不同而替換分子標誌。CBOL (Consortium for the Barcode of Life) 是致力將標準化 DNA 條碼應用於物種鑑別的國際協會，其曾提出三個評估 DNA 條碼的面向，即廣適用度 (universality)、序列品質 (sequence quality) 及區辨力 (discriminatory power) (CBOL Plant Working Group, 2009)，此三面向除了可用來評估已開發之 DNA 條碼，也是開發新 DNA 條碼的重要條件。

目前在動物方面已有一好用的 DNA 條碼—*COI* (cytochrome c oxidase I) (Hebert *et al.*, 2003)，其在評估 DNA 條碼之三面向皆表現良好，已被證實在魚類、鳥類及昆蟲等不同族群中具有有良好的區辨力 (Hollingsworth, 2011)。然而，目前在植物方面並無一理想的 DNA 條碼 (Li *et al.*, 2015; Coissac *et al.*, 2016)，常見的葉綠體 DNA 條碼 (如：*rbcl* 及 *matK*) 及核糖體 DNA 條碼 (如：*ITS*) 皆有其缺點，尤其是解析度不足以區分親緣相近之物種 (Sang, 2002)。因此，為了補充目前 DNA 條碼解析度不足之狀況，學者提出可利用低拷貝數的核內基因，這類基因具有 intron 演化較快速、序列變異大的特點，可望區分不同物種甚至是品種 (Choi *et al.*, 2006; Zimmer and Wen, 2013)，並可藉此彌補葉綠體及核糖體 DNA 條碼解析度不足之問題。因此，本研究使用低拷貝數核內基因之一的酒精脫氫酵素 (alcohol dehydrogenase, *Adh*) 基因，探討其在物種間或物種內的解析能力。

Adh 基因在生物中大多以基因家族 (gene family) 的形式存在，而開花植物通常有 2~4 個 *Adh* 基因 (Gottlieb, 1982; Preiszner *et al.*, 2001)，但隨不同物種演化，可能如阿拉伯芥少至 1 個 *Adh* 基因 (Koch *et al.*, 2000)，或如四倍體棉花屬物種至少有 14 個 *Adh* 基因 (Small and Wendel, 2000)。在 *Adh* 基因序列結構方面，其通常具有 10 個 exon 及 9 個 intron，但也有例外，如大麥之 *Adh2* 及 *Adh3* 基因僅有 9 個 exon (Trick *et al.*, 1988)，阿拉伯芥只有 7 個 exon (Koch *et al.*, 2000)。然而即使有 intron 缺失的情形，但 exon 之分布及排列仍具保守性，如阿拉伯芥 *Adh* 基因之 exon 4 可對應玉米 *Adh1* 及 *Adh2* 基因之 exon 4、5、6，exon 5 則對應玉米 exon 7 及 8 (Chang and Meyerowitz, 1986)。

Adh 編碼區之序列亦十分保守，如豌豆與玉米 *Adh1/2* 之相似度為 75%，與阿拉伯芥 *Adh* 之相似度為 80% (Llewellyn *et al.*, 1987)，馬鈴薯 *Adh* 胺基酸序列與玉米、水稻、大麥及豌豆相似度介於 83-85% (Matton *et al.*, 1990)，水稻與玉米胺基酸序列之相似度在 *Adh1* 之間為 93.7%，而在 *Adh2* 之間為 88.7% (Xie and Wu, 1990)。相對於 exon 保守之特性，*Adh* 在非編碼區則具有變異大之特性，如菊科 *Brachyscome* 屬在種間發現 intron 3 有多個長片段插入所造成之長度變異，差異最大可達 435 bp (Denda *et al.*, 1995)；大麥在栽培種 (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) 與野生種 (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) 之間，也發現 intron 3 因為微衛星體 (microsatellite) 重複次數不同及 InDel 所造成之長度差異 (Petersen and Seberg, 1998)。

前人已有的數篇研究利用 *Adh* 基因進行屬間或種間之親緣分析 (Morton *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 2005; DiMeglio *et al.*, 2014)，但這些研究中所使用的 *Adh* 引子對大多只適用於單一屬，並無法廣泛適用在大部分物種，於是本研究擬開發適用於大部分物種並能區分種間或種內物種之 *Adh* DNA 條碼，期望能補充目前植物 DNA 條碼解析度不足之問題，並對 *Adh* 種內變異有更多了解。本研究先以紅豆品種間 *Adh* 基因序列變異為基礎，延伸至其他豆科物種，再試圖擴展至禾本科等其他作物，最後透過 *Adh* 基因序列的比對，開發廣適用性高且高鑑別效能之 DNA 條碼。

材料與方法

一、試驗材料

本研究之研究材料包括 7 個豆科物種及 5 個禾本科物種 (表一)，豆科之參試物種包含紅豆 (9 個品種)、綠豆 (1 個品種)、菜豆 (2 個品種)、樹豆 (3 個品種)、大豆 (3 個品種)、豌豆 (3 個品種) 及花生 (1 個品種)，禾本科之參試物種則包含水稻 (4 個品種)、高粱 (3 個品系)、玉米 (3 個品系)、小米 (2 個品系) 及燕麥 (4 個品系)。所有品種 (系) 皆種植於以細砂為基質之穴盤中，每穴依種子大小播 4~10 顆種子，每品種 (系) 各兩穴，早晚澆水；約兩周後，每品系隨機取樣 4 株植株並混合收取葉片，以進行 DNA 萃取。

表一、本研究之豆科及禾本科參試物種

Table 1. List of tested leguminous and gramineous species

(A) 豆科 Leguminosae

物種	植物分類	染色體數目	品種	代號	來源
紅豆(Adzuki bean) <i>Vigna angularis</i>	蝶形花亞科 Faboideae 菜豆族 Phaseoleae	2n = 22	高雄選 1 號	AB_KS1	高雄區農業改良場
			高雄 2 號	AB_KS2	高雄區農業改良場
			高雄 3 號	AB_KS3	高雄區農業改良場
			高雄 5 號	AB_KS5	高雄區農業改良場
			高雄 6 號	AB_KS6	高雄區農業改良場
			高雄 7 號	AB_KS7	高雄區農業改良場
			高雄 8 號	AB_KS8	高雄區農業改良場
			高雄 9 號	AB_KS9	高雄區農業改良場
			高雄 10 號	AB_KS10	高雄區農業改良場
			綠豆(Mung bean) <i>Vigna radiata</i>	蝶形花亞科 Faboideae 菜豆族 Phaseoleae	2n = 22
菜豆(Common bean) <i>Phaseolus vulgaris</i>	蝶形花亞科 Faboideae 菜豆族 Phaseoleae	2n = 22	台中 3 號	CB_TC3	台中區農業改良場
			台中 5 號	CB_TC5	台中區農業改良場
樹豆(Pigeon pea) <i>Cajanus cajan</i>	蝶形花亞科 Faboideae 菜豆族 Phaseoleae	2n = 22	台東 1 號	PP_TT1	台東區農業改良場
			台東 2 號	PP_TT2	台東區農業改良場
			台東 3 號	PP_TT3	台東區農業改良場
大豆(Soybean) <i>Glycine max</i>	蝶形花亞科 Faboideae 菜豆族 Phaseoleae	2n = 40	大豆花蓮 1 號	SB_HL1	花蓮區農業改良場
			毛豆高雄 9 號	SB_KS9	高雄區農業改良場
			黑豆台南 3 號	SB_TN3	台南區農業改良場
豌豆(Pea) <i>Pisum sativum</i>	蝶形花亞科 Faboideae 蠶豆族 Viciae	2n = 14	台中 11 號	PE_TC11	台中區農業改良場
			台中 13 號	PE_TC13	台中區農業改良場
			台中 15 號	PE_TC15	台中區農業改良場
花生(Peanut) <i>Arachis hypogaea</i>	蝶形花亞科 Faboideae 岩黃耆族 Hedysareae	2n = 40	台南選 9 號	PN_TN9	台南區農業改良場

表一、本研究之豆科及禾本科參試物種(續)

Table 1. List of tested leguminous and gramineous species (continued)

(B) 禾本科 Gramineae

物種	植物分類	染色體數目	品種/品系	代號	來源
水稻 (Rice) <i>Oryza sativa</i>	稻亞科 Oryzoideae 稻族 Oryzeae	2n = 24	台南 13 號	R_TN13	台南區農業改良場
			台南 16 號	R_TN16	台南區農業改良場
			台稈糯 1 號	R_TGN1	台南區農業改良場
			大陸私	R_Ind	地方品種
高粱 (Sorghum) <i>Sorghum bicolor</i>	黍亞科 Panicoideae 蜀黍族 Andropogoneae	2n = 20	e28	S_e28	臺灣大學
			F7X	S_F7X	臺灣大學
			BTx623	S_BTx623	臺灣大學
玉米 (Maize) <i>Zea mays</i>	黍亞科 Panicoideae 蜀黍族 Andropogoneae	2n = 20	B73	M_B73	農業試驗所
			CML494	M_494	台南區農業改良場
			Su963106	M_Su	農業試驗所
小米 (Millet) <i>Setaria italica</i>	黍亞科 Panicoideae 黍族 Paniceae	2n = 18	PI433445	L_445	臺灣大學
			PI433446	L_446	臺灣大學
燕麥 (Oat) <i>Avena sativa</i>	羊茅亞科 Festucoideae 燕麥族 Aveneae	2n = 6x = 42	Gehl	O_Gehl	AAFC [§]
			Vao51	O_Vao51	AAFC [§]
			TX07CS1948	O_TX	AAFC [§]
			NTU1	O_NTU1	臺灣大學

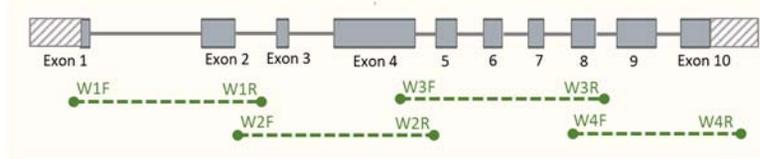
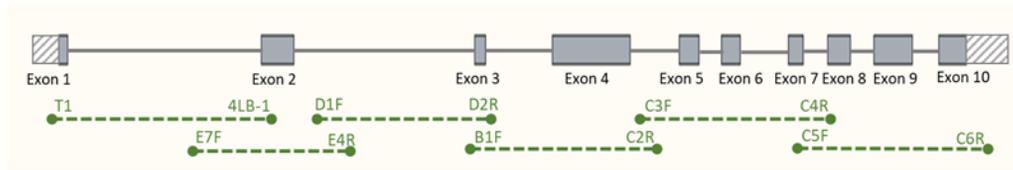
Note: § Kindly provided by Dr. Nicholas A. Tinker and Ms. Charlene P. Wight, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa Research and Development Centre.

表二、紅豆 *Adh1/Adh2* 增幅(A)及 *Adh* DNA 條碼(B)之引子列表Table 2. List of primers used for the amplification of *Adh1* and *Adh2* of adzuki bean (A) and *Adh* DNA barcodes (B)(A) Primers used to amplify the *Adh1* and *Adh2* genes in 9 adzuki bean varieties

Target gene	Primer	Sequence (5' → 3')	G/C (%)	T _m (°C)
<i>Adh1</i>	W1F	TGTA CTCTCTTCTTCAAGGTCAC	43	54
	W1R	GTGAAACCTTATTGAATGTCTTGG	38	53
	W2F	TCTGGGAAGCCAAGGTAAGA	50	56
	W2R	CTACAAGCACAGATGAGAATGA	41	53
	W3F	ACCATTTTGTCTGGTACTTCT	40	52
	W3R	GCATTAAATAGAGCAAGCAAGG	41	53
	W4F	GAGATGTGAATGTTGGCTTCC	48	55
	W4R	CTCATCCACAAAACGGCATT	45	55
<i>Adh2</i>	T1	CCATGTCTGCTACTGCTGGT	55	57
	4LB-1	ACTTCACCTTTCCAGGTGGTG	55	58
	E7F	TTCTCACTTTTGAAGTTGATTCTGA	32	54
	E4R	GGTATGTCCTACTTTTCACTCCG	48	56
	D1F	AATCCCAAAACCAGCTTCTC	45	54
	D2R	TGTAACATCATAACCTGAAGC	43	53
	B1F	GCTTTTCAGGGTCAGAATCC	50	54
	C2R	GGTTCACAAAACACAAAA	37	50
	C3F	CACATCAAATTCGCATAG	42	50
	C4R	TACCTTTAGTGCCACATCTC	45	52
	C5F	AGAGCACAACAAACCAGT	44	52
	C6R	CAGGAAGATGACCAAGAAAG	45	51

(B) *Adh* DNA barcodes

Target gene	Region	Primer	Sequence (5' → 3')	G/C (%)	T _m (°C)
<i>Adh1</i> of Leguminosae	Exon	Dex2F-11	TACTTCTGGGAAGCCAAGGT	50	56
	2-4	Dex4R	TCACCTACACTCTCCACAATC	48	54
<i>Adh2</i> of Leguminosae	Exon	EX5F	TTGGTGCTACTGTAAATGTTGC	41	55
	5-7	EX7R	TGGTTTGTGTGCTCTTTGGG	48	57
<i>Adh1</i> of Gramineae	Exon	Mex2F	ATCCTCTTCACCTCGCTCTG	55	57
	2-4	Mex4R	GCAGATCACACATGTTGCTCTC	50	57
<i>Adh1</i> of Gramineae	Exon	Mex6F	GCAGAAGGTGCAAGGATTGC	55	58
	6-8	Mex8R	GCGTTGATGTTGCCAGTGCA	55	60

(A) *Adh1* of adzuki bean(B) *Adh2* of adzuki bean

圖一、紅豆 *Adh1* 及 *Adh2* 基因全長擴增之引子位置示意圖。實心長方形表示 exon，實線表 intron，斜線長方形則為 5' 及 3' UTR，下方虛線表示用以擴增 *Adh1/2* 全長之引子對及擴增範圍。

Fig. 1. Locations of primers used to amplify full length *Adh1* and *Adh2* genes of adzuki bean. Shaded boxes represent exons and solid lines represent introns. Slash boxes at both ends of gene respectively represent 5' and 3' UTR. Dotted lines below the genes represent the regions amplified with primers used to confirm the *Adh1/2* sequences.

二、DNA 萃取

每物種取 0.05 g 植物鮮葉及 2 顆直徑 3 mm 玻璃珠置入 2.0 ml 的離心管中，再將離心管開蓋放入冷凍乾燥機 24 小時，取出後以均質機 (Mini-BeadBeater-8) 打碎乾葉，並利用改良式 CTAB 法 (Doyle and Doyle, 1990) 萃取 DNA。萃取出 DNA 以微量分光光度計 (Nano Drop) 檢測品質及定量，檢測標準為 OD260/OD230 值須介於 2.0~2.3 以及 OD260/OD280 值 > 1.8，未達標準之樣本則予以淘汰，通過品質檢測之 DNA (原液) 以二次蒸餾水稀釋至 20 ng/μl，作為工作液於後續實驗使用，其餘原液則儲存於 -20°C 冰箱備用。

三、紅豆 *Adh1* 及 *Adh2* 序列擴增及比對

為探討 *Adh1* 及 *Adh2* 在紅豆品種間的差異，於是以前紅豆全基因體定序資料庫 VigGS (<http://viggs.dna.affrc.go.jp>) 中預測之紅豆 *Adh1* 及 *Adh2* 序列為模板設計引

子對 (圖一、表二 A)，對紅豆 9 個品種進行 PCR 擴增。PCR 溶液含 2 μ l DNA、正/反向引子 (2 μ M) 各 1.5 μ l 及 5 μ l Taq 2x Master Mix RED (Ampliqon)，PCR 進行條件為：94°C 5 分鐘，35 個循環之 94°C 30 秒、55°C (依各引子黏合溫度調整) 30 秒、72°C 10 秒，最後以 72°C 5 分鐘完成反應。之後以 1.5% LE (70 伏特，110 分鐘) 進行電泳分析，確認為單一產物後進行定序，定序結果以 CLC Genomic Workbench 6 軟體將各品種之序列修剪及連接，再以 BioEdit v7.2.5 進行排列比對。

四、Adh DNA 條碼之開發及親緣分析

本研究首先於 NCBI 資料庫 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中搜尋較完整且可信之 *Adh* 序列 (表三)，將其匯入 SnapGene® Viewer 2.8.1 軟體中記錄，之後比對相鄰同源或相對同源之 *Adh* 序列結構，且以 Clustal Omega 軟體 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 計算序列相似度，並依照分析結果推測可能較適於作為 *Adh* DNA 條碼之區域。

本研究分別針對構成世界上主要糧食作物之兩大科—豆科禾及禾本科物種設計 *Adh* 基因上之分子標誌，方法為比對已公布 *Adh* 序列之編碼區 (禾本科包含玉米、水稻及大麥，豆科則包含大豆、豌豆、紅豆、菜豆及同為雙子葉之草莓及馬鈴薯) (表三)，於 10 個 exon 上皆尋找長度約 20 mer、相似度高 (尤其在引子末端連續 5 bp 相同者為佳)、且符合 G/C 所佔百分比介於 40%與 60%之間、黏合溫度為 55~60 °C 之序列，以設計正向及反向引子，共設計約 35 組分子標誌 (未列)。接著以同前述 PCR 反應溶液、條件以及電泳條件進行反應，依電泳結果圖篩選能擴增出參試物種、條帶清晰且大部分為單一條帶之分子標誌，並以具長度多型性及條帶分子量較大者優先選擇進行定序。

將篩選出的 *Adh* DNA 條碼 (表二 B) 擴增序列進行定序，定序結果以 BioEdit v7.2.5 去除兩端不穩定序列，再以 MEGA 6 進行排列比對 (alignment) 以及親緣樹 (phylogenetic tree) 之繪製，親緣關係樹的繪製採用 maximum likelihood 法，模式為 Kimura 2-parameter model，並以 500 次 bootstrap 歸還抽樣估算機率。此外，也將定序結果於 NCBI 網站進行 BLAST 分析，以確認擴增出的產物是否為 *Adh*，以及能否正確地比對到目標作物。

表三、Adh 基因參考序列之所屬分類及來源

Table 3. Taxa and source of Adh genes reference sequences

Family	Species	Gene	Accession No.	Sequence type	Reference	
Leguminosae	Soybean (<i>Glycine max</i>)	<i>Adh1</i>	AF079058	Partial sequence	Preiszner <i>et al.</i> , unpublished	
		<i>Adh2</i>	AF079499	Partial sequence	Preiszner <i>et al.</i> , unpublished	
	Adzuki bean (<i>Vigna angularis</i>)	<i>Adh1</i>	Vigan.02G148500.01*	Complete sequence	This study	
		<i>Adh2</i>	Vigan.03G212600.01*	Complete sequence	This study	
Rosaceae	Pea (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Adh</i>	X06281	Complete sequence	Llewellyn <i>et al.</i> , 1987	
	Tepary bean (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	<i>Adh</i>	Z23171	Complete CDS	Garvin <i>et al.</i> , 1994	
		<i>Adh1</i>	AB191337	Partial CDS	Fukuda <i>et al.</i> , 2005	
	Japanese wisteria (<i>Wisteria floribunda</i>)	<i>Adh2</i>	AB191338	Partial CDS	Fukuda <i>et al.</i> , 2005	
		<i>Adh1</i>	AB191335	Partial CDS	Fukuda <i>et al.</i> , 2005	
	Shrubby sophora (<i>Sophora flavescens</i>)	<i>Adh2</i>	AB191336	Partial CDS	Fukuda <i>et al.</i> , 2005	
		<i>Adh</i>	X15588	Complete sequence	Wolyn and Jelenkovic, 1990	
	Solanaceae	Potato (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>Adh</i>	M25154	Complete CDS	Matton <i>et al.</i> , 1990
		Maize (<i>Zea mays</i>)	<i>Adh1</i>	X04049	Complete sequence	Dennis <i>et al.</i> , 1984
	<i>Adh2</i>		X02915	Complete sequence	Dennis <i>et al.</i> , 1985	
Gramineae	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	<i>Adh1</i>	AB469050	Complete sequence	Wu <i>et al.</i> , 2008	
		<i>Adh2</i>	AB208538	Complete sequence	Yoshida and Miyashita, 2005	
	Barley (<i>Hordeum vulgare</i>)	<i>Adh1</i>	X07774	mRNA	Good <i>et al.</i> , 1988	
		<i>Adh2</i>	X12733	Complete sequence	Trick <i>et al.</i> , 1988	
		<i>Adh3</i>	X12734	Complete sequence	Trick <i>et al.</i> , 1988	

註：* 紅豆全基因體定序資料庫(VigGS)之候選基因編號，其序列與本研究擴增之紅豆高維10號*Adh1*及*Adh2*之序列完全相同

Note: * The sequence is from Vigna Genome Server (VigGS) and is the same with *Adh1/2* of adzuki bean KS10 amplified in this study.

結 果

一、紅豆 *Adh1* 及 *Adh2* 基因序列分析

紅豆 *Adh1* 基因全長 2543 bp，編碼區長 1143 bp，本研究結果顯示紅豆 9 個品種間並沒有任何多型性，且序列與 VigGS 所預測之 *Adh* (Vigan.03G212600.01) 完全相同。而在紅豆 *Adh2* 基因方面，9 個紅豆品種之 *Adh2* 基因序列共發現 14 個 SNPs 及 1 個 InDel (4 bp)，其中 2 個多型性位在 exon 上，其它 13 個位在 intron 上且集中於 intron 1 和 2。此外，這些多型性以 exon 3 為分界，在其之前及之後的多型性可各合併為一單倍型 (haplotype)，而此兩個單倍型可將 9 個參試臺灣品種紅豆分為三群，前面之單倍型可區分出第一群 (高雄 1、2、5 號)，之後的則可分出第三群 (高雄 6、10 號)，剩下的一群 (第二群) 則為高雄 8、9 號，而高雄 3、7 號因在大多數多型性位點為異結合，無法判斷分群。此外，比對紅豆 *Adh1* 及 *Adh2* 基因之 DNA 序列，因為 intron 間差異太大而無法排列比對，編碼區的相似度則為 79.88%。

二、跨科別物種間 *Adh* 基因之 DNA 序列比對

開花植物存在 *Adh* 基因數目差異 (通常有 2~4 個)，其 DNA 序列間亦可能具有變異，本研究經比對多個物種之參考序列，各物種 *Adh* DNA 序列之 exon 數量及長度都十分保守，除了大麥 *Adh2* 及 *Adh3* 基因僅有 9 個 exon (exon 9 和 10 合併，並缺失 18 bp) 以外，其他物種不論 *Adh1* 及 *Adh2* 基因在 exon 2~9 之長度依序皆為 137、47、326、83、76、62、96、162 及 117 bp，僅 exon 1 在起始密碼子後有 3 個鹼基之長度差異 (紅豆、菜豆、豌豆、大豆及草莓皆為 37 bp，水稻、玉米、大麥及馬鈴薯為 34 bp)，編碼區總長為 1140/1143 bp (380/381 個胺基酸)。

紅豆兩 *Adh* 基因與其他物種 *Adh* 編碼區之相似度列於表四，由表中可見不論在 DNA 序列 (表四 A) 或是胺基酸序列 (表四 B) 皆顯示紅豆 *Adh1* 基因與其他物種 *Adh* 基因之相似度高於 *Adh2* 之趨勢，其中 *Adh1* 與豆科物種胺基酸序列 (除了多花紫藤以外) 相似度高於 92.37%，與另兩個雙子葉物種 (草莓及馬鈴薯) 相似度也達 82.37% 以上，與單子葉物種之相似度也至少 76.94%；紅豆 *Adh2* 基因與其他豆科物種相似度介於 69.49-85.96%，與草莓和馬鈴薯之相似度約 75%，而與單子葉物種則介於 72.65-76.52%。在 DNA 序列的部分，相似度則介於 67.81-73.51% 之間。

表四、紅豆兩 *Adh* 與其他物種 *Adh* 於編碼區之相似度
 Table 4. Similarity of coding regions between two *Adh* of adzuki bean and the *Adh* of other species

	(A) DNA sequences																		
	Dicotyledon					Monocotyledon													
	Strawberry	Potato	Pea	Soybean	Tepary	<i>W. floribunda</i>	<i>S. flavescens</i>	Maize	Rice	Barley									
	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh3</i>	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh3</i>							
<i>Adh1</i> (<i>Adh_ch2</i>)	76.23	76.03	76.12	16.2	87.65	86.99	94.13	96.85	74.15	89.69	89.69	72.42	74.47	70.00	76.58	71.58	75.7	70.05	65.92
<i>Adh2</i> (<i>Adh_ch3</i>)	74.12	72.62	72.29	72.7	79.25	78.76	80.69	79.97	73.16	85.11	80.93	71.67	72.19	67.81	73.51	70.09	73.07	68.36	65.47

	(B) Amino acid sequences																		
	Dicotyledon					Monocotyledon													
	Strawberry	Potato	Pea	Soybean	Tepary	<i>W. floribunda</i>	<i>S. flavescens</i>	Maize	Rice	Barley									
	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh3</i>	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh1</i>	<i>Adh2</i>	<i>Adh3</i>							
<i>Adh1</i> (<i>Adh_ch2</i>)	82.37	83.42	83.68	83.68	92.37	92.47	97.36	97.63	79.42	82.55	93.22	75.85	82.59	80.21	84.17	80.74	81.79	76.94	79.42
<i>Adh2</i> (<i>Adh_ch3</i>)	75.26	75.53	75.79	75.79	79.21	78.49	77.71	78.16	72.88	85.96	80.51	69.49	75.73	73.35	76.52	74.67	74.93	72.65	73.61

註：多花紫藤、苦參及大豆之 *Adh* 參考序列未包含完整編碼區

Note: *Adh* sequences of *W. floribunda*, *S. flavescens* and soybean do not include total coding region.

三、*Adh1* 與 *Adh2* DNA 序列之比對—以紅豆、大豆、玉米及水稻為例

相對同源 *Adh* 基因間在 exon 長度的部分沒有差異，而在 exon 相似度的部分 (圖二 A)，分就禾本科之水稻及玉米而言，其 *Adh1* 與 *Adh2* 間之相似度在 exon 1 和 2 處約為 90%，之後遞減至 exon 6 為最低 (約 70%)，再逐漸增加至 exon 9 和 10 區域 (約 85%)。紅豆 exon 相似度之趨勢與禾本科作物相反，基因兩端之 exon 相似度較低，尤其 exon 1 只有 70%，其他 exon 相似度約 80%。大豆則缺少 exon 1 及 exon 10 的資料，若單以 exon 2-9 之數值來看並無一明顯趨勢，但其相似度介於 83~94%之間，則明顯高於同為豆科之紅豆。玉米和水稻在 *Adh1* 與 *Adh2* 編碼區之相似度相近 (82.37 及 82.63%)，紅豆則較低 (79.88%)，大豆相似度數值雖高達 88.71%，但其計算範圍僅包含 exon 2~9 之部分。

Adh1 與 *Adh2* 之間在各對應 intron 之長度差異如圖二 B 所示，紅豆之 intron 1 及 2 長度差異極大 (369 及 594 bp)，intron 3、4、6 也有約 100 bp 之長度差異；大豆如同紅豆在 intron 2 有最大之長度差異 (313 bp)，但其他 intron 長度僅 intron 6 差異稍大 (62 bp)；與豆科植物不同，玉米及水稻在 intron 2 長度差異小，差異最大者則為 intron 1，其餘只有水稻之 intron 3、玉米之 intron 6 差異較大 (此處定義差異小為 50 bp)；整體來看，有前端 intron 變異較大之趨勢。

四、*Adh* DNA 條碼開發及其擴增結果

本研究依據不同物種 *Adh* 的序列長度及核苷酸差異，共開發出四組廣適用性之 *Adh* DNA 條碼—Dex2F-11 + Dex4R、EX5F + EX7R、Mex2F + Mex4R 及 Mex6F + Mex8R，分別針對豆科 *Adh1* exon 2-4、*Adh2* exon 5-7 及禾本科 *Adh1* exon 2-4、exon 6-8 進行擴增及分析。其中 Dex2F-11 + Dex4R 引子對係針對豆科 *Adh1* exon 2-4 進行擴增 (圖三 A)，可得到菜豆族物種之清晰條帶，但大豆及樹豆同時擴增出兩個 *Adh*，花生及豌豆為多產物，僅有紅豆、綠豆及菜豆為單一產物。排列比對此三物種之 DNA 序列，可發現物種間有多處 SNPs，尤其菜豆在 intron 3 有 12 bp 之缺失，而造成與另兩物種之長度多型性，紅豆與綠豆長度僅差 1 bp。此外，在品種間的比對，紅豆及菜豆品種間序列完全相同。

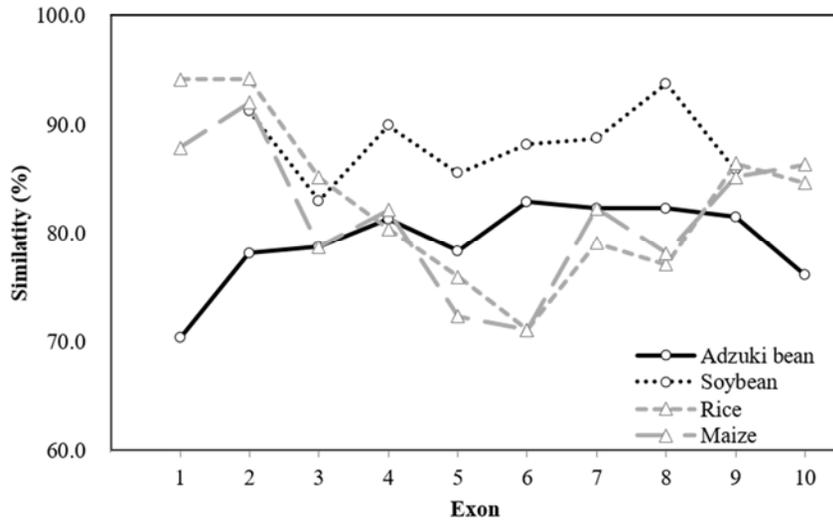
EX5F + EX7R 引子對可擴增出所有豆科參試物種 *Adh2* exon 5-7 (圖三 B)，產物長度約 400~600 bp，但在大豆、豌豆及花生條帶較不清晰，綠豆則有非單一產物。物種內的比對發現紅豆品種間有 2 個 SNPs，菜豆間則有 2 個 InDel (27 及 4

bp) 及 3 個 SNPs，大豆品種間有 2 個 SNPs，樹豆品種間則無差異，豌豆台中 13 與 15 號相同，而 11 號與它們有多處 SNPs。物種間的比對則發現，exon 6 及 7 序列大多保守，但仍有 SNPs 存在，且僅利用這些 SNPs 即可區分參試豆科；而在 intron 6 的部分，豌豆無法與其他豆類進行比對，而在可以排列比對的四個豆類中，紅豆及菜豆很明顯地共同具有幾段缺失，樹豆則在 241-269 特有一段缺失。將這些序列做親緣分析 (圖五 A)，第一分支區分出菜豆族及蠶豆族，而後，菜豆族分支中也可區分不同物種。

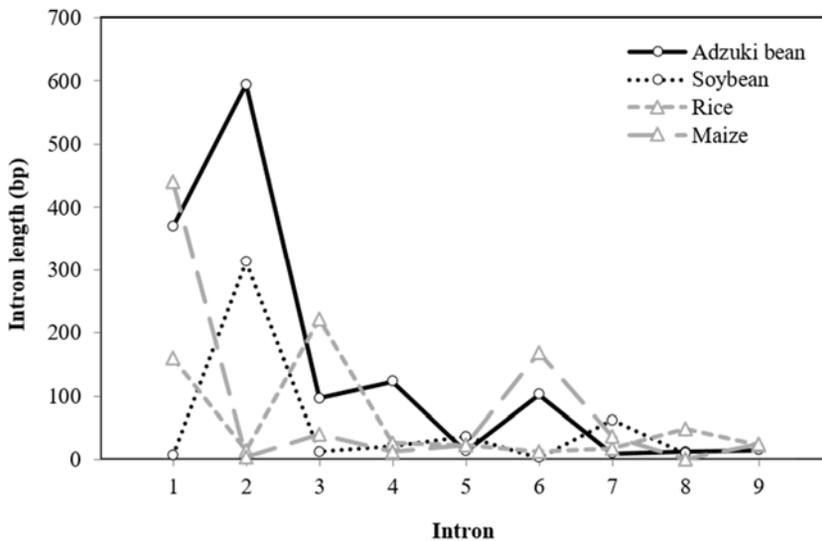
Mex2F + Mex4R 引子對可擴增禾本科物種之 *Adh1* exon 2-4 (圖四 A)，條帶介於 700-1200 bp，其中水稻為單一條帶 (約 1200 bp)，高粱主條帶約 1050 bp，玉米主條帶長約 750 bp，燕麥各品種皆因為多條帶而難定序，而小米只成功定序分子量較小之條帶。進行種內之比對發現私稻與粳稻間有 3 個多型性，高粱 e28 和 F7X 品系間有 2 個 SNPs，玉米及小米在品種間皆無差異。此外，水稻與玉米於 NCBI 皆 BLAST 到該物種之 *Adh1* 且 100% 相同，小米則和珍珠粟 (*Pennisetum glaucum*) 之 *Adh1* DNA 序列相似度為 85%，而高粱僅比對到同屬物種之可能 *Adh1*。將這些序列進行親緣分析 (圖五 B)，首先分出稻亞科及黍亞科，而後黍亞科分支區分出高粱，而小米及玉米則位於同一分支。

Mex6F + Mex8R 引子對可擴增出禾本科物種之 *Adh1* exon 6-8，由電泳結果圖 (圖四 B) 可見，僅玉米條帶與其他物種相差大，其餘物種條帶約 350-380 bp，而高粱與燕麥皆為長度相近之多條帶。在序列比對上，水稻、玉米及小米在品種間皆無差異，但物種間差異大。將此段序列做 BLAST，水稻與玉米皆分別與該物種 *Adh1* 具有 100% 相似度，而小米也與 BLAST 得到的小米 *Adh1* 序列有 98% 之相似度。

(A)

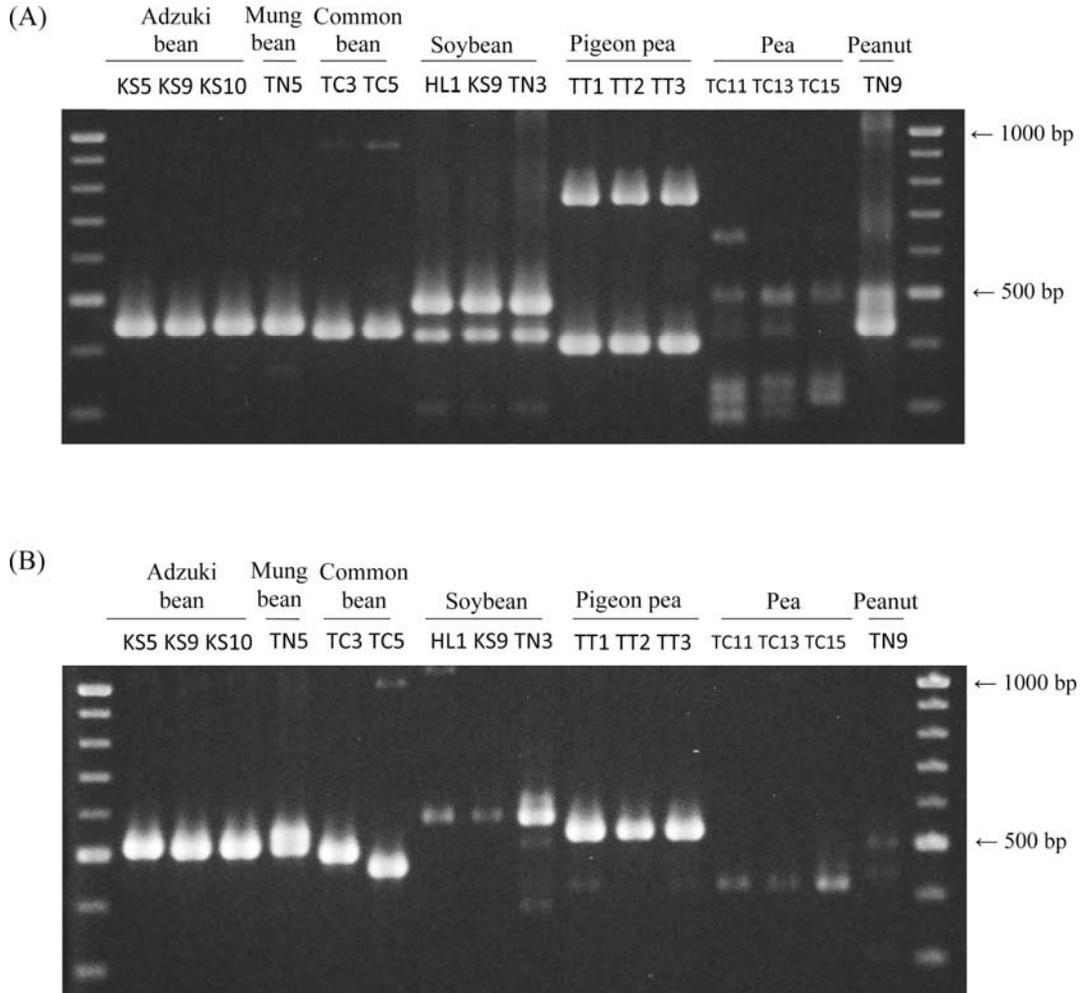


(B)



圖二、*Adh1* 與 *Adh2* 基因序列之比較。(A) *Adh1* 與 *Adh2* 基因之 exon DNA 序列相似度 (B) *Adh1* 與 *Adh2* 基因內 intron 長度之差異。

Fig. 2. Comparative analysis of *Adh1* and *Adh2* DNA sequences. (A) Similarity of exons between *Adh1* and *Adh2* genes. (B) Intron length difference between *Adh1* and *Adh2* genes.



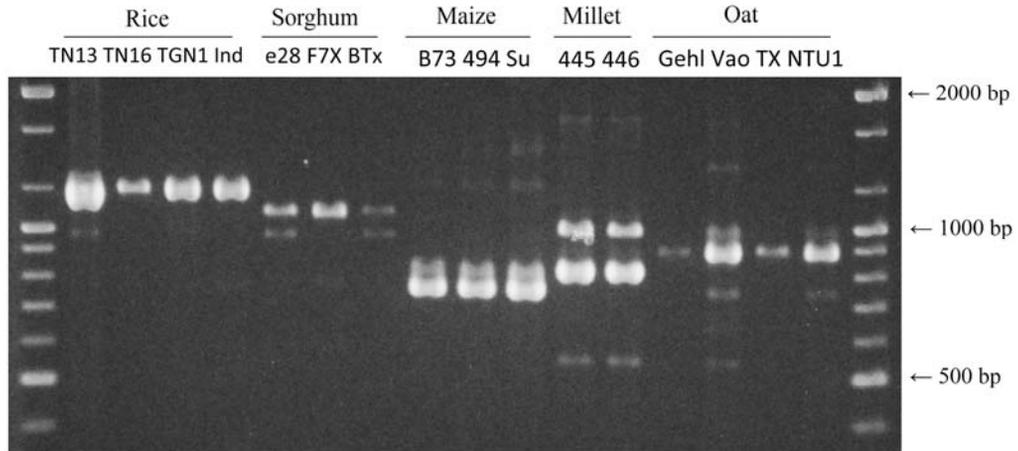
圖三、豆科物種 *Adh* DNA 條碼之電泳分析圖。

Fig. 3. Electrophoresis patterns of *Adh* barcodes for leguminous species.

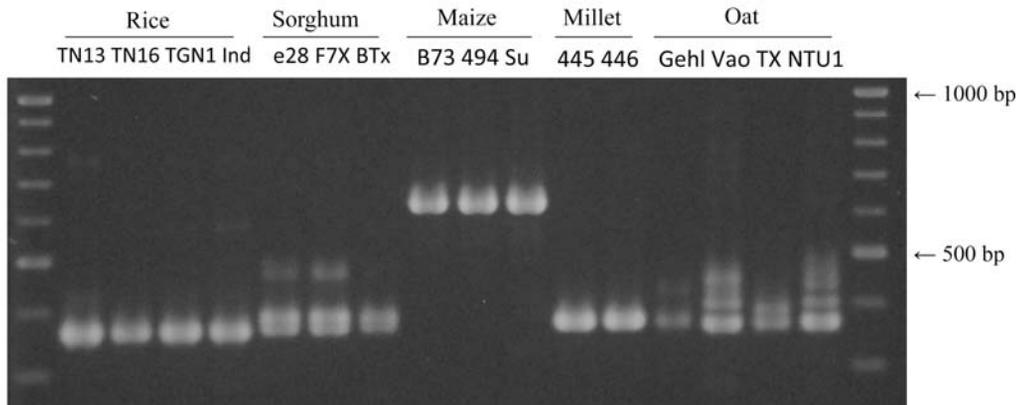
註：使用之分子標誌分別為 (A) Dex2F-11+Dex4R，擴增區域為豆科 *Adh1* 之 exon 2-4；(B) EX5F + EX7R，擴增區域為豆科 *Adh2* 之 exon 5-7。各參試品種代碼請參照表 1A。

Note: (A) *Adh1* exon 2-4 of leguminous species (amplified with Dex2F-11+Dex4R); (B) *Adh2* exon 5-7 of leguminous species (amplified with EX5F+EX7R). The full names of leguminous varieties are listed in table 1A.

(A)



(B)



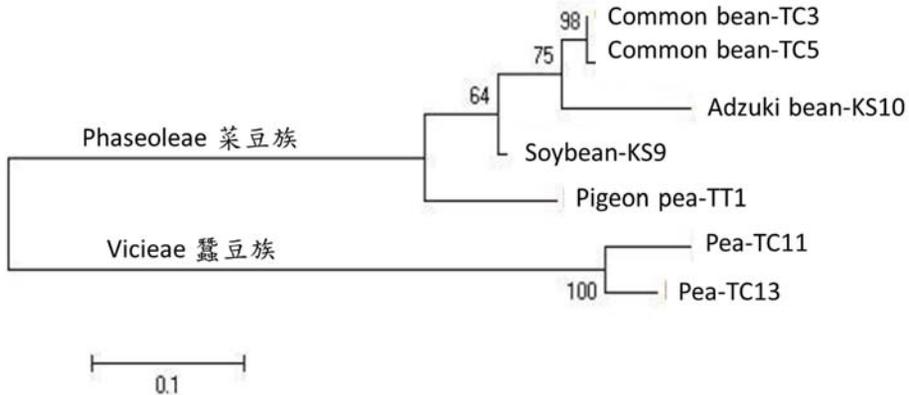
圖四、禾本科物種 *Adh* DNA 條碼之電泳分析圖。

Fig. 4. Electrophoresis patterns of *Adh* DNA barcodes for gramineous species.

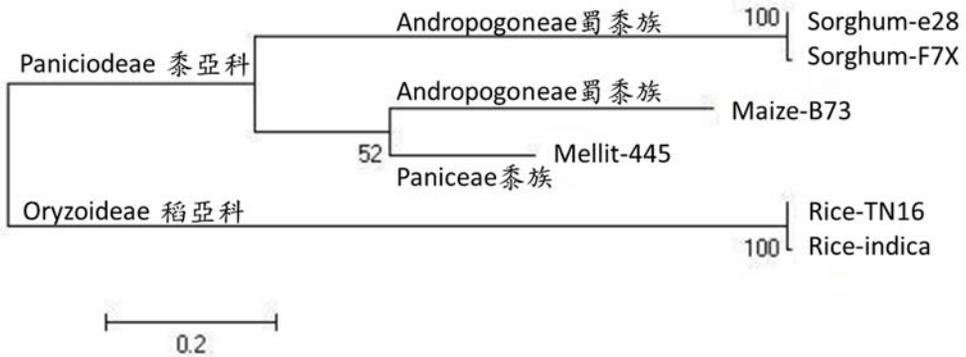
註：使用之分子標誌分別為 (A) Mex2F+Mex4R，擴增區域為禾本科 exon 2-4；
(B) Mex6F+Mex8R，擴增區域為禾本科 exon 6-8。各參試品種代碼請參照表 1B。

Note: (A) *Adh1* exon 2-4 of gramineous species (amplified with Mex2F+Mex4R); (B) *Adh1* exon 6-8 of gramineous species (amplified with Mex6F+Mex8R). The full names of gramineous varieties are listed in table 1B.

(A)



(B)



圖五、依據 *Adh* DNA 條碼所建立之豆科及禾本科物種親緣關係樹

(A) 以豆科物種 *Adh2* intron 5 至 intron 6 之 DNA 序列進行親緣分析

(B) 以禾本科物種 *Adh1* intron 2 至 intron3 之 DNA 序列進行親緣分析

Fig. 5. Phylogenetic trees of leguminous and gramineous species based on the DNA sequences amplified with *Adh* DNA barcodes.

(A) *Adh2* intron 5-6 DNA sequences of leguminous species (amplified with EX5F + EX7R)

(B) *Adh1* intron 2-3 DNA sequences of gramineous species (amplified with Mex2F+Mex4R)

討 論

一、*Adh* 序列分析及其 DNA 條碼開發

良好之 DNA 條碼須可廣泛適用於親緣遠之物種間 (在高分類層級具廣適用性)，以及能區分親緣近之物種 (在低分類層級具高解析度)，因此 DNA 條碼具有兩個基本特點，一為足夠之序列變異以區分物種，二為保守之兩端序列以利應用於不同物種，此外應易於 PCR 擴增、定序，並產生可信之資料 (Hollingsworth *et al.*, 2011; Galimberti *et al.*, 2013)。因此本研究為開發廣適用性及高解析度之 *Adh* DNA 條碼，首先分析紅豆 *Adh* 基因種內差異，以及不同物種間 *Adh* 序列相似性。

1. 紅豆種內 *Adh* 基因之差異

Adh2 基因在臺灣 9 個紅豆品種間有 15 個多型性位點，如同預期地，多數位點(13 個)出現於 intron 區域，而雖然有 2 個 SNP 落在 exon 上，但因皆轉譯為相同之胺基酸 (synonymous substitutions)，因此在胺基酸序列上仍具保守性，不影響其功能。此些多型性位點可將 9 個臺灣紅豆品種分為三群，這表示 *Adh2* 基因能區分不同紅豆品種且具有區分種內之潛力。不同於紅豆 *Adh2* 基因具有多個多型性位點，紅豆 *Adh1* 基因於品種間之比較並無發現多型性，這可能是 *Adh1* 在紅豆品種間確實無多型性存在，或是因為參試紅豆品種親緣相近而無變異發生，不過就本研究結果來看，*Adh1* 基因並不具有區分紅豆不同品種之能力。此外，紅豆品種高雄 10 號之 *Adh2* 序列皆與 VigGS 預測 *Adh* (Vigan.02G148500.01) 完全相同，這顯示紅豆品種高雄 10 號可能與 VigGS 定序所用之京農 6 號血緣相近。

據我們所知目前尚未有比較相對同源 *Adh* 種內變異之研究，前人研究皆僅針對單一 *Adh* 基因進行種內分析，如：具有單一 *Adh* 基因之阿拉伯芥在品種間有多型性 (Innan *et al.*, 1996)、大麥在品種間有少數多型性 (Petersen and Seberg, 1998)。本研究首次對相對同源 *Adh* 種內變異進行探討，以紅豆 *Adh1* 及 *Adh2* 基因種內之 DNA 序列分析來看，*Adh2* 基因變異大於 *Adh1* 基因，由此推測 *Adh2* 基因之演化速度較 *Adh1* 基因快，因此才造成 *Adh2* 基因在品種間變異較多的情況，而此 *Adh* 基因演化速度不一的情形在棉屬中也有被觀察到 (Small and Wendel, 2000)。綜上所述，若要進行 DNA 條碼之開發，由於 *Adh2* 基因 DNA 序列變異大於 *Adh1* 基因，*Adh2* 較適宜用於開發區分不同品種之 DNA 條碼。

2. 不同物種 *Adh* DNA 序列分析

由物種間 *Adh* 基因之比對可發現 exon 長度十分保守，其中 exon 2、4、9、10 長度較長，較有機會找到符合引子設計條件之片段。在 intron 長度部分，以 intron 1-3 變異最大、intron 7-9 差異小，而為了能以長度多型性區分物種，因此以長度差異大者作為擴增片段為佳。從相對同源 *Adh* 基因間的分析來看（圖二），可發現玉米及水稻有前端及末端 exon 相似度較高的現象，而紅豆則相反，這表示若將引子設計在高相似度 exon 上較有可能同時擴增出兩個 *Adh* 基因。此外，相對同源 *Adh* 基因間以長度差異較大之 intron 為佳，因為即使無法避免同時擴增出兩個 *Adh* 基因，亦能以長度多型性區分。

二、*Adh* DNA 條碼分析不同物種之效果

本研究各開發出兩組豆科及禾本科之 *Adh* DNA 條碼，使用者可根據分析之「目的」及「分類層級」，選擇合適之分子標誌，甚至同一分子標誌之部分片段。在豆科物種方面，以 EX5F + EX7R 引子對為佳，Dex2F-11 + Dex4R 引子對作為補充。EX5F + EX7R 引子對可擴增出所有參試豆科物種，大部分為單一產物且條帶清晰，且物種間可以長度多型性區別，這使豆科物種間之鑑別快速且容易；而從種內來看，紅豆、菜豆、大豆及豌豆品種間皆具有 DNA 序列之多型性，表示此組分子標誌具有種內鑑別之能力。在親緣分析上，本研究與王 (2005) 利用 *Adh1* 基因和葉綠體基因建構之豆科物種演化樹大致相符，其中蠶豆族和菜豆族物種先被分開，菜豆族中豇豆屬與菜豆屬親緣最近。總結以上結果，可知 EX5F + EX7R 引子對在種間可以長度多型性區分、種內也具有 DNA 序列多型性，並可用於演化樹之建立，因此推薦作為豆科在親緣分析或是物種鑑別上之工具。

EX5F + EX7R 引子對仍有些不足之處，如綠豆兩條帶無法區分，此時便可嘗試使用 Dex2F-11 + Dex4R 引子對，其能成功擴增出菜豆族物種 *Adh1* exon 2-4 的部分，但在部分物種（如大豆及樹豆）中專一性可能較低，會同時擴增出兩個 *Adh* 序列，不過若僅要進行物種鑑別，此狀況反而利於判別。此分子標誌無法區分不同品種，因此僅適於種間之鑑別。此外，Dex2F-11 + Dex4R 引子對（擴增 *Adh1*）之解析度低於 EX5F + EX7R 引子對（擴增 *Adh2*），這可應證 *Adh2* 基因變異較大，比 *Adh1* 更有潛力做種內鑑別之依據。

本研究也開發出兩個禾本科 *Adh* DNA 條碼，其中以 Mex2F + Mex4R 引子對

為主，Mex6F + Mex8R 引子對為輔。Mex2F + Mex4R 引子對可擴增禾本科物種 *Adh1* exon 2-4 的部分，其產物在物種間有明顯之長度多型性，主要因為 intron 3 長度變異很大，這與在菊科 *Brachyscome* 屬及大麥所觀察到 intron 3 變異大的結果一致 (Denda *et al.*, 1995; Petersen and Seberg, 1998)，不過因為 intron 長度差異太大，物種間無法排列比對。在其 exon 的部分，物種間長度完全相同且相似度大多高達 90%，而有趣的是 exon 3 及 exon 4 在物種間皆具有多型性，且這些多型性足以區分所分析之禾本科物種。親緣分析結果(圖五 B)顯示，稻亞科與黍亞科先被分開，此符合植物分類之判定，但接著玉米與小米成一類與高粱分離，即不符高粱與玉米為蜀黍族而小米為蜀黍族的分類，不過小米與玉米分支之歸還取樣成功機率 (bootstrap 值) 僅 52%，信心水準不足以認定該處有一節點，或許增加不同屬之物種能使親緣分析更加正確。而物種內之多型性則依物種而異，在高粱中可區分不同品種，在水稻中僅能區分秈稻及粳稻，在小米及玉米中則無任何多型性。綜合來說，Mex2F + Mex4R 引子對在物種層級的區分表現良好，物種內則因物種而異，此外，此組引子對有一缺點，其最佳黏合溫度 (介於 53-57°C 間) 依物種有所不同，不過此缺點易於實驗中調整而予以克服。

另一組禾本科之 *Adh* DNA 條碼為 Mex6F + Mex8R 引子對，其與 Mex2F + Mex4R 引子對同針對禾本科 *Adh1* 擴增，不過位置是 exon 6-8，物種間條帶長度差異小，僅玉米在 intron 6 有約 250 bp 的插入而具明顯之長度多型性。由序列比較發現物種間可利用 exon 上的多型性區分，而特別的是 intron 7 長度差異小，在不同屬物種間可以排列比對，因此此段 intron 或許可與 exon 一同用於較高層級 (科內) 之親緣分析，可望能提供更多演化上的資訊。由於此組分子標誌在每個物種內都不具多型性，因此其解析度可能僅達種的層級。另外，由兩組禾本科 *Adh* 引子對擴增之區段可發現 *Adh1* exon 2-4 的變異度高於 exon 6-8，此結果與紅豆品種間多型性集中於前端 intron，以及 *Adh1* 與 *Adh2* intron 長度的差異也有前端較大之趨勢相類似，可推論 *Adh* 基因前端 intron (1-3) 有較大變異，不過此說法需更多證據支持。

本研究利用核內基因演化較快速及 intron 變異大之特點，以 *Adh* 基因開發四組適用於豆科及禾本科物種之 DNA 條碼，其中 EX5F+7R 引子對及 Mex2F+4R 引子對分別可針對豆科及禾本科物種進行物種及品種鑑別，並應用於親緣分析。CBOL 協會提出的 DNA 條碼三大評估指標包含廣適用性、序列品質及區辨力，而

本研究開發之 *Adh* DNA 條碼，除了在廣適用性方面達到分類學上科的層級並具備良好之序列品質外，在區辨力方面亦可進行種內（品種間）之區分，此顯示 *Adh* DNA 條碼可補充目前植物 DNA 條碼解析度不足之問題，因此未來可將其納入植物 DNA 條碼系統，以使整個系統更加完善。

致 謝

本研究承蒙各單位提供植物材料，包含農業試驗所、台中區農業改良場、台南區農業改良場、高雄區農業改良場、花蓮區農業改良場、台東區農業改良場、以及臺大農藝系陳凱儀副教授、林彥蓉教授、黃永芬助理教授，謹致謝忱。

引用文獻

- 王雲平。2005。豆類作物種間及種內基因體對應區域之 DNA 序列差異。國立臺灣大學農藝學研究所碩士論文。
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 106 : 12794-12797.
- Chang, C. and E. M. Meyerowitz. 1986. Molecular cloning and DNA sequence of the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83 : 1408-1412.
- Choi, H. K., M. A. Luckow, J. Doyle, and D. R. Cook. 2006. Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. *Mol. Genet. Genomics* 276 : 56-70.
- Coissac, E., P. M. Hollingsworth, S. Lavergne, and P. Taberlet. 2016. From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. *Mol. Ecol.* 25 : 1423-1428.
- Denda, T., K. Kosuge, K. Watanabe, M. Ito, Y. Suzuki, P. S. Short, and T. Yahara. 1995. Intron length variation of the *Adh* gene in *Brachyscome* (Asteraceae). *Plant Mol. Biol.* 28 : 1067-1073.
- DiMeglio, L. M., G. Staudt, H. Yu, and T. M. Davis. 2014. A phylogenetic analysis of the genus *Fragaria* (strawberry) using intron-containing sequence from the *ADH-1* gene. *PLoS One* 9 : e102237.

- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 : 13-15.
- Ferri, G., M. Alu, B. Corradini, and G. Beduschi. 2009. Forensic botany: species identification of botanical trace evidence using a multigene barcoding approach. *Int. J. Legal Med.* 123 : 395-401.
- Fukuda, T., J. Yokoyama, T. Nakamura, I. J. Song, T. Ito, T. Ochiai, A. Kanno, T. Kameya, and M. Maki. 2005. Molecular phylogeny and evolution of alcohol dehydrogenase (*Adh*) genes in legumes. *BMC Plant Biol.* 5 : 6.
- Galimberti, A., F. De Mattia, A. Losa, I. Bruni, S. Federici, M. Casiraghi, S. Martellos, and M. Labra. 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Res. Intl.* 50 : 55-63.
- Gottlieb, L. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216 : 373-380.
- Hebert, P. D., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270 : 313-321.
- Hollingsworth, P. M. 2011. Refining the DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 108 : 19451-19452.
- Hollingsworth, P. M., S. W. Graham, and D. P. Little. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One* 6 : e19254.
- Innan, H., F. Tajima, R. Terauchi, and N. T. Miyashita. 1996. Intragenic recombination in the *Adh* locus of the wild plant *Arabidopsis thaliana*. *Genet. Soc. Amer.* 143 : 1761-1770.
- Koch, M. A., B. Haubold, and T. Mitchell-Olds. 2000. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (Brassicaceae). *Mol. Biol. Evol.* 17 : 1483-1498.
- Li, X., Y. Yang, R. J. Henry, M. Rossetto, Y. Wang, and S. Chen. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90 : 157-166.
- Llewellyn, D., E. Finnegan, J. Ellis, E. Dennis, and W. Peacock. 1987. Structure and expression of an alcohol dehydrogenase 1 gene from *Pisum sativum* (cv. "Greenfeast"). *J. Mol. Biol.* 195 : 115-123.

- Matton, D. P., P. Constabel, and N. Brisson. 1990. Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. *Plant Mol. Biol.* 14 : 775-783.
- Morton, B. R., B. S. Gaut, and D. M. T. Clegg. 1996. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in the palm and Grass families. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93 : 11735-11739.
- Newmaster, S.G., M. Grguric, D. Shanmughanandhan, S. Ramalingam, and S. Ragupathy. 2013. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Medicine* 11 : 222.
- Petersen, G. and O. Seberg. 1998. Molecular characterization and sequence polymorphism of the alcohol dehydrogenase 1 gene in *Hordeum vulgare* L. *Euphytica* 102 : 57-63.
- Preisznner, J., T. VanToai, L. Huynh, R. Bolla, and H. Yen. 2001. Structure and activity of a soybean *Adh* promoter in transgenic hairy roots. *Plant Cell Rpt.* 20 : 763-769.
- Sang, T. 2002. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37 : 121-147.
- Small, R. L., and J. F. Wendel. 2000. Copy number lability and evolutionary dynamics of the *Adh* gene family in diploid and tetraploid cotton (*Gossypium*). *Genetics* 155 : 1913-1926.
- Stoeckle, M. Y., C. C. Gamble, R. Kirpekar, G. Young, S. Ahmed, and D. P. Little. 2011. Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Sci. Rep.* 1 : 42.
- Trick, M., E. S. Dennis, K. J. Edwards, and W. J. Peacock. 1988. Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase gene family of barley. *Plant Mol. Biol.* 11 : 147-160.
- Xie, Y. and R. Wu. 1990. Molecular analysis of an alcohol dehydrogenase-encoding genomic clone (*adh2*) from rice. *Gene* 87 : 185-191.
- Zimmer, E. A. and J. Wen. 2013. Reprint of: using nuclear gene data for plant phylogenetics: progress and prospects. *Mol. Phylogenet Evol.* 66 : 539-550.

Application of *Adh* Genes in the Identification of Leguminous and Gramineous Species

Ssu-Yu Lin¹⁾、Yi-Hang Tseng²⁾、Shun-Fu Lin³⁾

¹⁾ Assistant Researcher, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Taiwan R.O.C.

²⁾ Assistant Researcher, Taiwan Seed and Seeding Improvement and Propagation Station, Council of Agriculture, Taiwan R.O.C.

³⁾ Associate Professor (Corresponding Author), Department of Agronomy, National Taiwan University, Taiwan R.O.C.

TEL: 886-2-33664769

FAX: 886-2-33620879

E-mail: james7309@tss.gov.tw

Summary: DNA barcodes have been widely applied in phylogeny analysis and species identification. However, chloroplast and nuclear ribosomal gene sequences, which are commonly used as plant DNA barcodes, usually couldn't distinguish closely related species. To solve this problem, sequences of a nuclear gene, *Adh*, of several adzuki bean varieties, leguminous and other gramineous species were obtained. *Adh1* and *Adh2* genes of nine adzuki bean varieties developed in Taiwan were sequenced and aligned. Among nine adzuki bean varieties, no sequence difference was found in the *Adh1* gene and 15 polymorphic sites were detected in the *Adh2* gene. It suggested that the *Adh2* gene showed higher potential to distinguish closely related species. Based on the variations of *Adh* DNA sequences, we developed four *Adh* DNA barcodes including two for *Adh1* and *Adh2* genes of leguminous species and additional two *Adh* DNA barcodes for *Adh1* genes of gramineous species. These *Adh* DNA barcodes were successfully used to reconstruct phylogenetic tree and identify plants at inter-species and intra-species levels.

Key words: DNA barcode, alcohol dehydrogenase (*Adh*), species identification, phylogeny, Leguminosae, Gramineae