

# 玫瑰品種 分子鑑定技術



農業部高雄區農業改良場 編印

中華民國112年8月





# CONTENTS

## 目錄 Agricultural technology report

3 前言

4 分子標誌之研究

6 玫瑰品種分子鑑定及其應用

15 結語



# 玫瑰品種 分子鑑定技術



文・圖/宋品慧

## 前言

玫瑰被譽為「花中皇后」，屬於薔薇科薔薇屬，木本多年生開花植物，生長於全球各地，尤其是北半球的亞熱帶和溫帶地區。玫瑰花極具觀賞價值，常用於切花生產或作為盆花等景觀植物販售、亦常用於食品及化妝品用途，加工生產香水、精油、花茶等。通常3,000公斤的玫瑰花瓣約可生產1公斤的玫瑰精油，除了玫瑰精油外，玫瑰露水也可當作化妝品基礎材料使用，而玫瑰果籽油也用於各種護膚產品和化妝品。另外，玫瑰果含有高量維生素C，養顏美容，也可作為保健食品，除此之外，花瓣帶有芳香氣味，所製作的玫瑰花茶、玫瑰果凍也深受消費者喜好，用途廣泛。

玫瑰花大而艷麗，花朵大小、顏色、花型和植株樣態繁多，透過種間雜交，已經開發出大量栽培品種，它們的顏色從黃、白、綠、橘、紫、紅和粉紅色等多種色調，有的單瓣或重瓣，有的花梗直挺適合切花，有的花梗軟可當圍籬，透過多倍體化和雜交，品種的數量已多達25,000種以上，加上栽培環境條件影響外表型態略顯差異，因此僅根據植株型態、花徑、花序、花朵形式等外表形態或含油量等特徵，對玫瑰品種進行分類和品種鑑定愈顯困難。





## 分子標誌之研究

去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 分子標誌具有種類多、多型性豐富、分布於整個基因體的特性，DNA 序列不因生長階段（幼年期、營養生長期、開花期、結果期等）產生差異，不受器官部位（根、莖、葉、花、果實）不同而改變，也不受環境及基因表現與否的限制，少量樣品即可進行多次分析、短時間檢測大量樣品，相較其他技術有較高的準確性及快速等優點。根據不同的核酸擴增技術，DNA 分子標誌技術可分為：

### 一、限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

植物基因體 DNA 使用限制切割酶進行核酸片段切割，再以膠體電泳分離長短不同的片段，由於酶切位點在每個品種分布狀態不同，酵素切割後可產生不同長度的核酸片段，因此可以分析品種間的遺傳歧異度和做為品種鑑定使用。

### 二、隨機增幅多型性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)

使用 8~12 核苷酸長度的核酸引子序列（此引子可由商業套組取得，適用於各種作物），隨機進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 擴增片段，片段小於 2kb 者可被複製擴增，擴增片段進行膠體電泳分析其片段多型性。此法操作容易且費用便宜。

### 三、增幅片段長度多型性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)

先用限制切割酶將植物基因體 DNA 切割，再於切割片段兩側接上轉接序列，接著針對轉接序列設計核酸引子，進行 PCR 擴增片段，最後膠體電泳分



離片段，片段長度多型性具有較高的解析度、再現性高，也不須事先知道序列資訊，是早期進行核酸鑑定常用的技術之一。

#### 四、微衛星序列也稱為簡單序列重複序列 (Simple Sequence Repeats, SSR) 或短串聯重複序列 (short tandem repeats, STR)

植物基因體DNA的某些序列，以1~5個核苷酸為單位，重複排列，重複的次數依不同品種而有所差異，利用重複序列前後的保守序列為引子進行PCR擴增片段，可將重複序列放大，PCR擴增片段後，進行片段長度多型性分析（以圖1為例，A、B、C代表不同品種，出現210bp、207bp、213bp不同核酸片段），核酸片段進一步可定序，完成更精準的基因分型與基因定位，此法具有高度再現性、可重複性、多對偶基因、易於操作與判讀，又可同時進行多組基因鑑定，增加分析效率與準確性等優點，也是人類DNA親子鑑定分析主流技術。

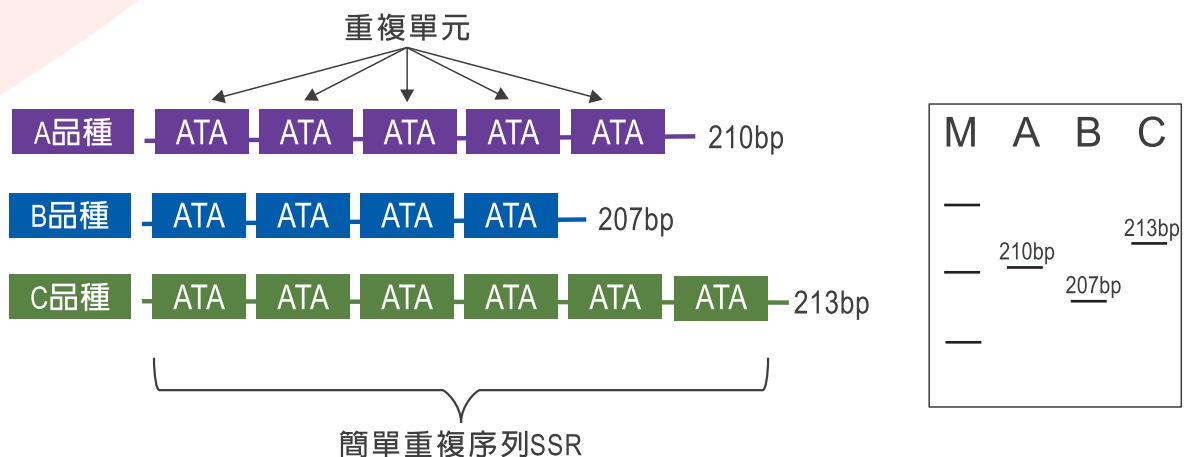


圖1. SSR分子標誌多型性分析

## 玫瑰品種分子鑑定及其應用

臺灣的農業技術全球頂尖，但如何保護育成作物的品種，是農業永續發展的基礎，其中「品種鑑定技術」就是保護品種的最佳工具，目前植物品種侵權鑑定大多依據植株外觀可區別性 (Distinctness)、一致性 (Uniformity) 與穩定性 (Stability) 的 DUS 性狀檢定差異來審查，這些性狀調查必須在指定機關進行，並有規定的送檢時間 (玫瑰需在每年9~11月)，因此，對於有時效迫切性的品種檢定，無法短時間完成檢定工作，另外植株外觀容易受到環境因素影響，需要足夠的材料在適當的場域進行檢定，檢定工作耗費大量勞力、技術、時間和金錢成本才能完成。相較之下，DNA 不會因組織或生長環境不同而改變，可輔助性狀檢定方法，提供分子鑑定層次上的鑑定依據。玫瑰品種分子鑑定技術的原理，和刑事鑑定或親緣關係鑑定相似，分析時只需要少量的玫瑰葉片、枝條，甚至是乾燥的玫瑰花瓣，經過一週的分析，就可鑑定玫瑰品種，也可避免品種外部特徵受環境影響而改變的誤判，甚至沒開花時也能鑑定，非常便利 (表1)。

近年來利用 DNA 分子標誌分析作物的遺傳變異及品種鑑定已蔚為主流，使用富貴粉等 44 個玫瑰品種，開發玫瑰品種 SSR 分子鑑定技術及品種 DNA 資料庫，玫瑰品種含括 13 個盆花品種，31 個切花品種，植株習性以直立型為主，少數半直立型，花瓣多為重瓣型，僅 4 個重瓣，及 2 個單瓣品種，花色多樣有



表1. 植物品種性狀檢定與分子鑑定比較表

|      | 性狀檢定       | 分子鑑定                    |
|------|------------|-------------------------|
| 檢定材料 | 嚴格要求植株狀態   | 不拘<br>(植株各組織、器官具有DNA皆可) |
| 栽植時期 | 全年或指定栽培期   | 不拘                      |
| 栽植環境 | 露天或溫室      | 不拘                      |
| 栽培管理 | 慣行栽培       | 不拘                      |
| 調查時間 | 配合主要性狀發育時期 | 不拘                      |
| 檢定地點 | 少數檢定單位     | 具設備及標準作業流程的實驗室          |
| 試驗期間 | 一個生長季      | 1週內                     |
| 檢定內容 | DUS性狀檢定    | 核酸序列差異                  |

白、黃、紅、粉紅、紫色等，還有2個覆輪花色（花瓣前端顏色與底色不同），大多具有香氣，刺的有無依品種而異，從無刺到多刺都有，大多為具有品種權的玫瑰品種（表2，圖2）。



表2. 44個玫瑰品種及花色

| 編號  | 品種名  | 花色      | 編號  | 品種名    | 花色      |
|-----|------|---------|-----|--------|---------|
| R1  | 雪見   | 白       | R23 | 翡翠粉    | 粉紅      |
| R2  | 大鍵琴  | 黃       | R24 | 萬紫千紅   | 粉紅      |
| R3  | 桃喜之戀 | 紫       | R25 | 知音     | 粉紅      |
| R4  | 翡翠香檳 | 澄白      | R26 | 夢幻水晶   | 粉紅      |
| R5  | 翡翠珍珠 | 粉紅      | R27 | 安蘇菲·皮克 | 粉紅      |
| R6  | 富貴粉  | 粉紅      | R28 | 芳香愛人   | 粉紅      |
| R7  | 真心紫  | 桃紅      | R29 | 天堂紫    | 粉紫      |
| R8  | 太陽星  | 覆輪(粉/白) | R30 | 寶貝-粉   | 粉紅      |
| R9  | 心上人  | 粉紅      | R31 | 蜜糖     | 粉紅      |
| R10 | 紫愛你  | 粉紫      | R32 | 娜歐米 白  | 白       |
| R11 | 冒險家  | 紅       | R33 | 柔情少女   | 粉紅      |
| R12 | 翡翠甜心 | 粉紅      | R34 | 初戀情人   | 桃紅      |
| R13 | 雪拉莎德 | 桃紅      | R35 | 珍珠     | 白       |
| R14 | 雪之戀  | 粉紅      | R36 | 太陽神    | 橘       |
| R15 | 藍色天空 | 粉紫      | R37 | 花仙子    | 粉紅      |
| R16 | 紫玉   | 粉紅      | R38 | 性感史卡利  | 紅       |
| R17 | 賽姬   | 粉紅      | R39 | 巴黎戀人   | 桃紅      |
| R18 | 帕里斯  | 粉紅      | R41 | 黃金     | 橘       |
| R19 | 達芙妮  | 粉紅      | R42 | 水精靈    | 紫       |
| R20 | 季節女神 | 粉紅      | R43 | 黛安娜    | 紅       |
| R21 | 守護家園 | 粉紅      | R44 | 雙喜     | 覆輪(粉/白) |
| R22 | 赫克托爾 | 粉紅      | R45 | 佳娜紅    | 紅       |



圖2.44個玫瑰品種及花朵外觀



玫瑰分子鑑定技術的開發流程，包括萃取各個玫瑰品種DNA並以 $-20^{\circ}\text{C}$ 低溫進行保存，再依據次世代定序、美國國家生物技術資訊中心核苷酸資料庫及文獻，獲得部分基因組序列後，以SciRoKo等軟體探勘基因組序列，獲得SSR序列，鎖定3~5個核苷酸重複6次以上的SSR序列兩側設計分子標誌，分子標誌利用PCR擴增片段，最後篩選出可擴增、具再現性及多型性高的分子標誌，經篩選221組分子標誌，僅20組分子標誌具再現性與多型性，最後將這些分子標誌在各品種出現的多型性片段大小記錄，建立每一品種專屬的DNA圖譜資料庫，由於片段大小差異，對每個品種而言都是獨一無二的如同人類的指紋，因此又稱為DNA指紋圖譜，作為品種鑑定使用（圖3）。

開發的分子標誌還可分析玫瑰品種間親緣關係，依親緣遠近進行分群，提供育種者強化種原，加速新品種（系）育成。親緣關係以主座標分析（Principal Co-ordinates Analysis, PCoA）顯示，當品種（系）親緣關係越接近，表示組成結構越相似，因此群落結構相似度高的品種（系）會聚集在一起，反之則分開。

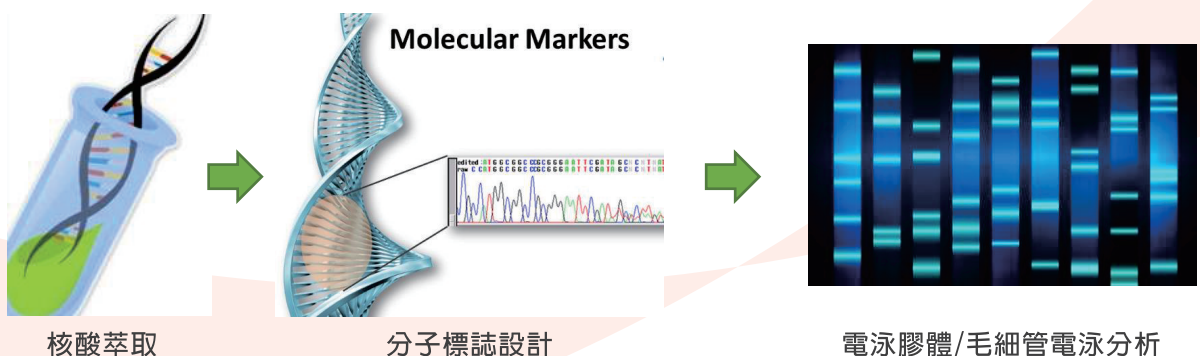


圖3.玫瑰品種分子鑑定技術開發流程

44種玫瑰品種，大致分成5群，第一群：R4、R5及R12各自分散，品種皆來至愛禮花卉公司代理的荷蘭橙色多盟 (Dümmen Orange)；第二群：R15～R18、R20～R23、R29、R31、R32、R45，其中R18～R23來至日本木村卓功品種，而R18與R21位置極為相近，可能種原限縮或長時間以相同目標進行選拔，導致部分品種歧異度較低；第三群：R1～R3、R6～R11，此群有木村先生、荷蘭橙色多盟和許古意先生所育成之品種；第四群：R37為獨立一群，其餘為第五群：R14、R19、R24～R28、R30、R33、R34、R38、R39、R41～R44，此群品種有來至福埠等代理商、也有本土育種家育成的品種，來源較為多樣(圖4)。

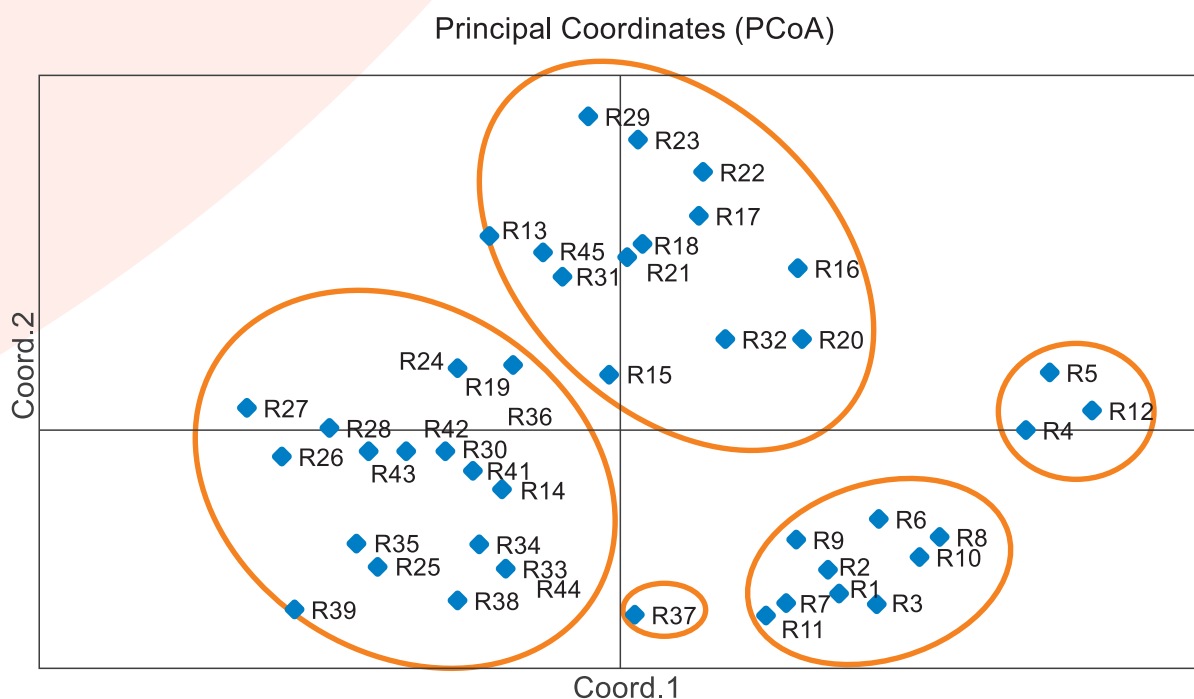


圖4.44個玫瑰品種主座標分析

玫瑰分子鑑定技術的操作步驟，分為DNA萃取，特定的DNA片段擴增及擴增片段測定(圖5)。其中DNA萃取部分，取樣的樣品為新長出的玫瑰嫩葉並利用藥劑進行DNA萃取後置於4°C保存備用；接著於已建立的DNA指紋圖譜資料庫中找出多型性佳的分子標誌，進行對照樣品及待測樣品特定的DNA片段的增幅，最後以電泳膠體或毛細管電泳進行測定、比對及品種判別。以2個未知玫瑰品種編號U1和U2進行分析，每一未知品種至少使用3組分子標誌進行確認，比對待知品種(U1、U2)與已知44個品種核酸片段多型性，找尋DNA圖譜一致的品種，依據DNA圖譜及植株型態外觀，最後判斷U1玫瑰為冒險家(R11)、U2玫瑰為太陽神(R36)(圖6)，利用分子鑑定時間約為7個工作天，採樣部位不受環境及時間影響，可快速鑑定品種，未來也可依需求擴增可鑑別的品種數量。

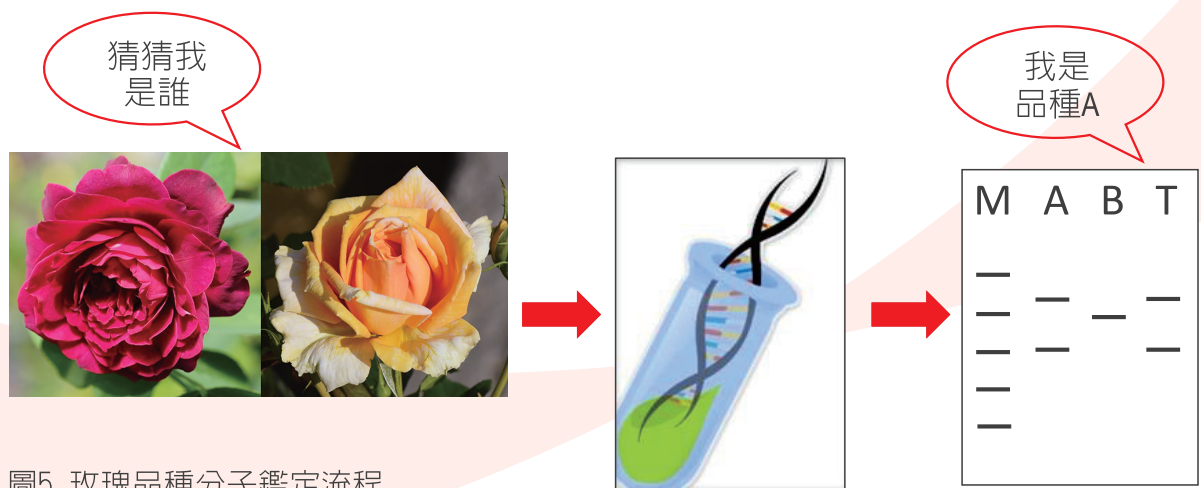


圖5.玫瑰品種分子鑑定流程



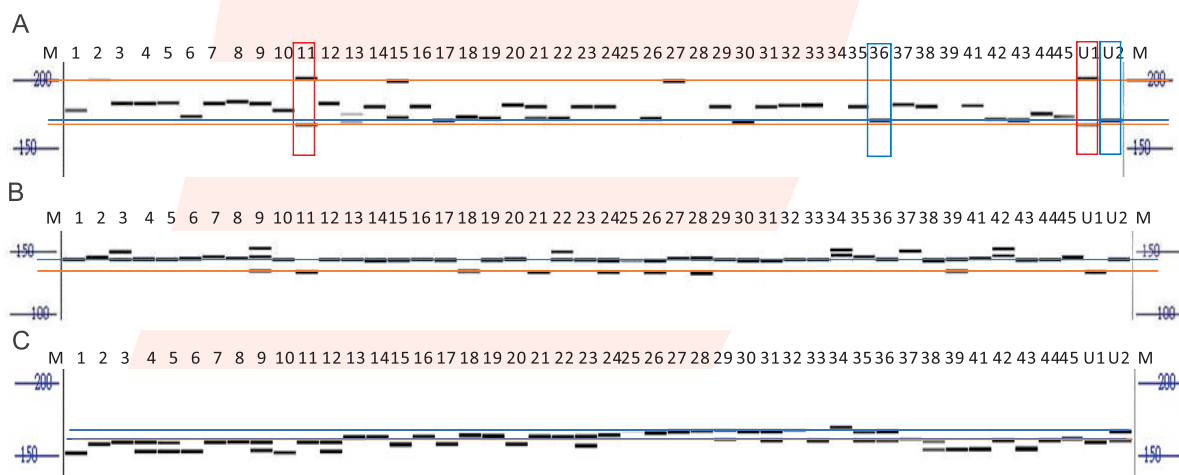


圖6. 鑑定U1及U2玫瑰品種

由於不同物種之間的DNA序列皆有其不同的編排順序，就像是身分證號碼一樣代表著獨立的個體，故利用玫瑰獨特的DNA指紋圖譜資料，以商品條碼的概念轉換成數字顯示的DNA條碼，首先選擇多型性佳的6組SSR分子標誌，經電泳分析，第1組分子標誌在44種玫瑰品種中，最多可出現8種核酸片段（197、179、176、173、170、169、167、164鹼基對），第2組最多可出現5種核酸片段（152、147、144、142、132鹼基對），第3組最多可出現5種核酸片段（167、164、161、158、152鹼基對），第4組最多可出現6種核酸片段（198、195、192、189、186、180鹼基對），第5組最多可出現7種核酸片段（153、150、147、144、141、138、135鹼基對），第6組最多可出現3種核酸片段（172、169、166鹼基對），以上6組最多可出現34種核酸片段；玫瑰‘雪見’（R1）以上述6組分子標誌分析，總共34種核酸片段皆一一記錄，並以

0(無出現)或1(有出現)表示核酸片段出現與否，可獲得每一品種專屬的DNA條碼，建立玫瑰品種DNA條碼資料庫，再經條碼系統轉換成一維條碼或二維條碼(QR code)，方便條碼機或手機讀取(圖7)。另外也可將玫瑰品種DNA條碼資料與植株特性結合並數位化(圖8)，利用現今人手一機的便利性，只要掃描QR code即可方便、簡單的了解玫瑰品種及核酸資訊，透過資訊資訊數位化將可優化品種管理、推廣服務等效能，實際提升種苗管理的效益，並方便消費者快速獲取玫瑰品種資訊(圖9)。



圖7.玫瑰品種DNA條碼

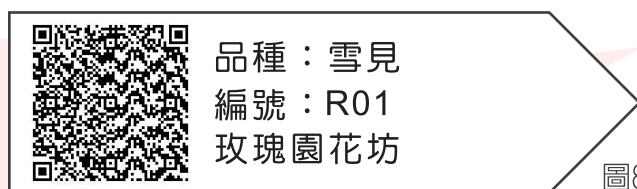
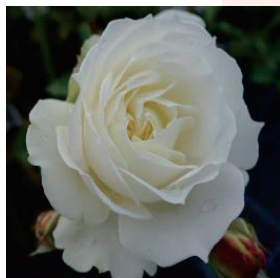


圖8.玫瑰品種標示牌(手機掃QR描碼)



|               |                                                                                                                                                                      |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 學名            | <i>Rosa rugosa</i>                                                                                                                                                   |
| 品種名           | 雪見                                                                                                                                                                   |
| 品種用途          | 切花                                                                                                                                                                   |
| 花色            | 白色                                                                                                                                                                   |
| 生長習性          | 直立型                                                                                                                                                                  |
| 刺的數目          | 少                                                                                                                                                                    |
| 花型            | 重瓣                                                                                                                                                                   |
| 花徑            | 中輪                                                                                                                                                                   |
| 香氣            | 強                                                                                                                                                                    |
| 核酸條碼          |   |
| DNA barcoding | 000100000001010000000100000001000                                                                                                                                    |
| 品種代碼          | R1                                                                                                                                                                   |

圖9. 玫瑰品種數位資訊

## 結語

由於分子標誌在品種鑑定方面極具價值的應用潛力，除了針對玫瑰等物種以外，也適用於已開發DNA鑑定的的大部分物種，可不受環境及基因表現與否的限制，在玫瑰不同生育時期或不同部位取樣，僅需少量樣品進行分析，亦能與外表型態鑑定同步進行，縮短鑑定時間，改善鑑定時間和精確度，相信此技術的應用可以提供種苗商、原料收購商等業者，在買賣時有更透明的資訊及公正的依據。透過共同認定標準化的操作方法與流程，未來亦可於有侵權疑慮時，作為執法依據的鑑定方法。





刊 名：高雄區農技報導

出版年月：112年8月

期 數：168期

篇 名：玫瑰品種分子鑑定技術

作 者：宋品慧

發行人：戴順發

總編輯：王裕權

執行編輯：吳倩芳

出版機關：農業部高雄區農業改良場

地 址：908126屏東縣長治鄉德和村德和路2-6號

網 址：<https://www.kdais.gov.tw/ws.php?id=413>

電 話：08-7389158

印刷廠：鳴昇彩色印刷有限公司

地 址：904010屏東縣九如鄉農場街17號

電 話：08-7392116

傳 真：08-7392950

發 行 量：1,500本

定 價：40元

展售書局：

國家書店 02-25180207

五南文化廣場 04-24378010

GPN：2008200192

ISSN：1812-3023

版權聲明：本著作採「創用CC」之授權模式，僅限於非營利、禁止改作且標示著作人姓名之條件下，得利用本著作



GPN：2008200192  
定價：40元