

分子標記在仙履蘭品種鑑定上之應用

孫永偉¹⁾、廖文毅²⁾、沈翰祖²⁾、劉明宗²⁾、廖玉珠²⁾、蔡瑜卿²⁾、
蕭吉雄²⁾、陳駿季²⁾

¹⁾ 行政院農委會種苗改良繁殖場助理研究員(通訊作者)

台中縣新社鄉大南村興中街 46 號

電話：04-25825420

電子信箱：sun@tss.gov.tw

²⁾ 行政院農委會種苗改良繁殖場助理研究員、助理研究員、助理研究員、技佐、助理研究員、場長、副研究員

摘要：近年來以 DNA 為研究基礎的分子標誌技術已成功應用於可作為區分植物品種差異之指紋分析方式。這些 DNA 技術包括逢機增幅多形性 DNA (RAPD ; random amplified polymorphism DNA)、增殖片段長度多型性 (AFLP ; amplified fragment length polymorphism) 、 SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 、內轉錄間隔區 (ITS ; internal transcribed spacer) 、簡單重複序列 (SSR ; simple sequence repeats) 等。仙履蘭 (*Paphiopedilum*) 由於花型奇特深受國內外賞花人士喜愛，育種者培育新品種不斷推陳出新，為台灣重要新興花卉作物。仙履蘭品種鑑定多以植株葉片形態色澤、花瓣及唇瓣形狀等外表形態上差異加以區分，此鑑定方式需累積豐富經驗且不同學者常有不同鑑定結果。因此，利用分子標記技術鑑定仙履蘭品種 DNA 層次差異性，配合 UPGMA 群叢分析方式，將可較精確區分各品種分類屬性。

關鍵字：仙履蘭、逢機增幅多形性 DNA、增殖片段長度多型性、內轉錄間隔區。

前　言

拖鞋蘭 (Slipper orchids) 泛指蘭科拖鞋蘭亞科 (*Cypripedioideae*) 植物，該亞科植物特色為具有囊袋狀唇瓣及兩個雄蕊。拖鞋蘭亞科包括喜普鞋蘭屬 (*Cypripedium*) 、芭菲爾拖鞋蘭屬 (*Paphiopedilum*) 、鬍拉蜜拖鞋蘭屬 (*Phragmipedium*) 及西麗妮拖鞋蘭屬 (*Selenipedium*) 等四個屬。台灣省仙履蘭協會已將芭菲爾拖鞋蘭屬定名為仙履蘭。仙

收到日期：94 年 9 月 12 日



履蘭字義起源於希臘字維納斯女神及拖鞋，分布範圍包括東印度、中國大陸南部、菲律賓、馬來西亞、新幾內亞及索羅門群島等地。目前已知的仙履蘭屬原生種約有 75 個，新的原生種正陸續被發現中(麥, 1987；Averyanow *et al.*, 2003；Cribb, 1998)。Pfitzer(1886)首先將仙履蘭作有系統分類研究，陸續一些學者從葉片形態色澤、花瓣及唇瓣形狀加以分類。目前有關仙履蘭之亞屬分類並不統一，主要分類方式有，Karasawa and Saito (1982)將仙履鞋蘭分成 *Parvisepalum*、*Brachypetalum*、*Polyantha*、*Cochlopetalum*、*Sigmatopetalum*、*Paphiopedilum* 六亞屬，Cox 等人(1997)及 Cribb 等人(1997)則將仙履鞋蘭分為 *Parvisepalum*、*Brachypetalum*、*Paphiopedilum* 三亞屬，其中，*Paphiopedilum* 亞屬再細分為 5 個節(sections)。*Parvisepalum* 亞屬包括 7 個原生種，具有膨脹且薄的唇瓣、大凸起假雄蕊及顆粒狀花粉。*Brachypetalum* 亞屬包括 4 個原生種，具有單一顏色的白色或黃色花朵、橢圓形到圓球型花瓣、卵圓形厚質地的唇瓣及棋盤格狀的樹片。*Paphiopedilum* 亞屬至少包括 60 個原生種，可再細分為 5 個節(sections)，*Paphiopedilum* 節包括 14 個原生種，具有均勻綠色的葉片、單花、湯匙狀花瓣及倒心形假雄蕊(中心呈盾狀)；*Barbata* 節葉片呈棋盤格狀、單花、具有發育良好之唇瓣、假雄蕊側面呈疣狀及寬半月形無盾狀；其他 3 個節，包括 *Pardalopetalum* (4 個原生種)、*Cochlopetalum* (5 個原生種)、*Coryopetalum* (11 個原生種)，為多花且花形種類歧異度大。由外表形態鑑定品種間差異性常需累積多年栽培經驗方可完成，且植株形態常受環境影響，因此部分原生物種之分類地位常有爭議。

近年來利用聚合酵素鏈鎖反應(PCR；polymerase chain reaction)為基礎的分子標記(marker)進行物種種原鑑定極為普遍，常被用來作為鑑定之分子標記包括逢機增幅多形性(RAPD)、特定序列擴增多形性(SRAP)、內轉錄間隔區(ITS)、簡單重複序列(SSR)等(Eiadthong *et al.*, 1999；Liu and Cordes, 2004；Ranamukhaarachchi *et al.*, 2001)，各研究方式皆有其特定應用方式及特色。分子標記方式鑑定蘭科作物品種差異性亦已逐漸被廣泛使用(孫等, 2005；蔡, 2003；Wannakrairoj, 2005)，因此利用不同的分子標記技術以作為仙履蘭品種鑑定及分類之輔助工具，將是非常可行之方式。

結 果

1. 逢機增幅多形性 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA；RAPD)

RAPD 技術於 1990 年開發，利用 8~10 寡核酸(bp)序列長度之逢機引子進行 PCR

反應，將細胞核特定 DNA 片段放大至電泳染色可見程度(Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990)。可適用於未知基因序列之 PCR 增幅(柯等, 2003 ; Chang *et al.*, 2000 ; Choi *et al.*, 2001 ; Fenwick and Ward, 2001 ; Kim *et al.*, 2001)。RAPD 技術雖然操作簡單、分析成本較低廉，但許多相關性研究顯示其所產生之 DNA 多型性條帶再現性低，此缺點限制該技術廣用性。近年來部分學者將 RAPD 所產生之特定 DNA 分子標記解序後重新設計專一性引子，此引子所產生之 DNA 條帶具有高度專一性，且沒有 RAPD 分子標誌再現性低之缺點，可作為鑑定特定品種之用。目前已知泰國 CITES 政府單位及本國部分農業研究單位利用 RAPD 方式區分仙履蘭品種差異性(孫等, 2005 ; Wannakrairoj, 2005)。若將篩選出特定 RAPD 分子標記定序並重新設計專一性引子對，或配合使用限制酶切割特定 DNA 片段，將可作為區分仙履蘭亞屬間或原生品種間差異之分子標記(markers)。

2. 內轉錄間隔區(Internal Transcribed Spacer；ITS)

位於細胞核之核糖體 DNA(rDNA；ribosomal DNA)為一群縱線排列之重複性基因家族，每個重複單位之基因排列次序為外基因間隔區(IGS；inter genic spacer)、小次單元(16-18 S)、ITS1、5.8 S、ITS2、大次單元(23-28 S)、IGS(圖 1)。ITS 基因區域其核酸序列雖不會編碼任何蛋白質產物，但具有高度快速演化及遺傳變異之特性，適合作為鑑定物種屬間或種間差異性或分類之依據(Devran *et al.*, 2002 ; Powers and Sandall, 1988 ; Robberts *et al.*, 2004 ; Tsai and Chou, 1999 ; Zillstra *et al.*, 1995)。由搜尋基因庫(NCBI；<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)資料得知，已有部分仙履蘭原生種之 18 S 及 ITS2 基因序列被發表。因此，由 18 S 基因序列末端(近 ITS1)及 ITS2 末端(近 28 S)，設計專一性引子對並進行 PCR 反應，將獲得之 PCR 產物解序，可得到接近 ITS1 至 ITS2 區域全長之基因序列，繼續進行 UPGMA 群叢分析(cluster analysis)即可獲得品種間親緣關係樹狀圖，判斷各品種間之親緣相似度。由於不同物種 ITS 之分子量相當接近，差異主要在於其組成之核酸序列，因此在電泳圖譜中不易由 DNA 條帶位置區分其差異性。為克服此一問題，將解序之不同物種 ITS 序列解序後再利用 SNP2CAPS 電腦程式分析限制酵素切位以進一步建立 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences)分子標記(Thiel *et al.*, 2004 ; Zhang and Stommel, 2001)。目前已由 ITS 技術獲得許多仙履蘭原生種及雜交種 ITS 序列資料及可鑑定特定亞屬之 ITS 序列限制酵素切位(Cox *et al.*, 1997 ; 孫等, 2005)

3. SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism)

SRAP 技術與 RAPD 類似，均是建立於 PCR 反應基礎，RAPD 是利用短片段隨機引子進行 PCR 反應，試驗結果之再現性低；SRAP 則是利用 forward 及 reverse 二條引子進行 PCR 反應，引子長度為 17 或 18 個核苷酸，因核心序列 3' 端之核酸序列分別為 CCGG (forward 引子)或 AATT (reverse 引子)，因此預期增幅產生核酸片段為具有功能性基因之 ORFs (open reading frames)(Li and Quiros, 2001 ; Ruiz, 2001)。該技術雖然較適於檢測特定基因是否變異，但應用於拖鞋蘭品種鑑定也有不錯效果，目前已成功篩選出可鑑定 *Paphiopedilum* 亞屬之 SRAP 引子對(孫等, 2005)，未來將可進一步進行特定片段 DNA 解序及設計專一性引子，以提升其應用性。

4. AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP 為較新作物品種分子檢定方式，此方式易顯示品種間分子歧異性及多型性，此特性為 RAPD 檢測技術欠缺，非常有利於作為品種鑑定工具。AFLP 以 PCR 反應為基礎可作為多基因座指紋分析技術，不需知道 DNA 序列情況下，可產生較多 DNA 多型性且試驗再現性高(Brugmans *et al.*, 2003 ; Ipek *et al.*, 2003 ; Vos *et al.*, 1995)，但分析成本高昂且技術層次高。AFLP 技術主要步驟有三：a. 染色體組 DNA 酶切及 adapters 粘合作用；b. 酶切 DNA 片段之選擇性增幅；c. 增幅 DNA 片段之電泳分析。孫等(2005)以 LI-COR 生物科技公司開發之 AFLP 方式，配合自動核酸定序儀之電泳分析測試 5 組 AFLP 引子，平均每一個 AFLP 引子對約可產生 20~50 個 DNA 多型性。因此該技術應非常適合作為仙履蘭品種鑑定及分類之分子檢測工具。

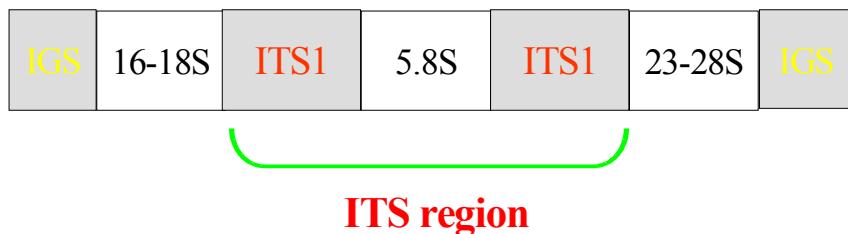


圖 1. 仙履蘭之 rDNA 結構，從 5'~3' 依序為 IGS、16~18S、ITS1、5.8S、ITS2、23~28S 及 IGS 等，其中 ITS1~ITS2 為 ITS 區域。

Fig. 1. The nuclear ribosomal DNA (rDNA) gene family is multigene family. In most eukaryotes, the 5' to 3' organization of the gene family is an intergenic spacer (IGS), the gene 18S, an ITS1, 5.8S, ITS2, 26S, and intergenic spacer (IGS). ITS, located between the repeating array of nuclear ITS1 and ITS2 ribosomal DNA genes.



結 論

仙履蘭原生種雖已被 CITES 列為受保護作物禁止買賣，但每年仍有許多植株被大量盜採及私下交易，此外由於花朵奇特多變深受世界各地消費者喜愛，已有許多業者從事雜交育種工作多年，陸續有新品種推陳出新，為保護原生種及育種者權益，利用分子標記技術輔助形態鑑定方式，已達到正確且快速區分品種差異之目的。由於各分子檢測技術受作物品種特性影響甚大，不同作物或品種有其適用之檢測技術，相關研究及分子標記資料庫建立，將可提升仙履蘭品種鑑定之正確性。

參考文獻

- 麥奮。 1987。 拖鞋蘭之芭菲爾鞋蘭屬。 淑馨出版社。
- 柯見螢、楊堯文、陳福旗。 2003。 利用逢機擴大多型性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 標記探討白鶴芋品種之遺傳變異性。 中國園藝 49：45-53。
- 孫永偉、廖文毅、沈翰祖、劉明宗、廖玉珠、蔡瑜卿、蕭吉雄、陳駿季。 2005。 生物技術在仙履蘭品種鑑定上之應用。 台灣國際仙履蘭暨蝴蝶蘭研討會專輯。
- Atwood, J. T. 1984. The relationships of the slipper orchids (subfamily Cypripedioideae), Orchidaceae. Selbyana 7: 129-247.
- Averyanow, L., P. Cribb, P. K. Loc, and N. T. Hiep. 2003. Slipper orchids of Vietnam. Published in North America by Timber Press, Inc., USA.
- Brugmans, B., R. G. M. van der Hulst, R. G. F. Visser, P. Lindhout, and H. J. van Eck. 2003. A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. Nucleic Acids Research 31: 1-9.
- 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.
- Choi, J. Y., J. N. Suh, I. S. So, and B. H. Kwack. 2001. Morphological and genetical characteristics of variegation induced in Korean native *Cymbidium goeringii* and *Cym. Kanran* leaves. Proceedings of APOC 7. p.171-173.
- Cox, A. V., A. M. Pridgeon, V. A. Albert, and M. W. Chase. 1997. Phylogeny of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. Pl. Syst. Evol. 208: 197-223.

- Cribb, P. J. 1998. The genus *Paphiopedilum*. Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd.
- Cribb, P. J. and N. McGough. 1997. The thindivide-slipper orchid distributions in China. In Dumont V. (ed.) Proceedings of the European Orchid Conference, Geneva 1997. E. O. C. Geneva.
- Devran, Z., U. Gozel, M. A. Sogut, S. Yildiz, and I. H. Elekcioglu. 2002. Identification of root-knot nematodes in the mediterranean region of Turkey by using rDNA and mtDNA markers. Turk. J. Agric. For. 26: 337-341.
- Eiadthong, W., K. Yonemori, A. Sugiura, N. Utsunomiya, and S. Subhadrabandhu. 1999. Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers. Scientia Horticulturae 82:57-66.
- Fenwick, A. L. and S. M. Ward. 2001. Use of random amplified polymorphic DNA markers for cultivar identification in mint. HortScience 36:761-764.
- Ipek, M., A. Ipek, and P. W. Simon. 2003. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and Isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128: 246-252.
- Karasawa, K. and K. Saito. 1982. A revision of the genus *Paphiopedilum* (Orchidaceae). Bull. Hiroshima Bot. Gard. 5: 1-69.
- Kim, H. Y., A. S. Na, J. B. Kim, and C. G. Been. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for genetic analysis of Phalaenopsis species. Proceedings of APOC 7. p.220-223.
- Li, G. and C. F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. Theor. Appl. Genet. 103: 455-461.
- Liu, Z. J. and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238: 1-37.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5129-5273.
- Powers, T. O. and L. J. Sandall. 1988. Estimation of genetic divergence in *Meloidogyne* mtDNA. J. of Nematology 20: 505-511.
- Ranamukhaarachchi, D. G., R. J. Henny, C. L. Guy, and Q. B. Li. 2001. DNA fingerprinting to

- identify nine *Anthurium* pot plant cultivars and examine their genetic relationship. HortScience 36:758-760.
- Robberts, F. J. L., L. D. Liebowitz, and L. J. Chalkley. 2004. Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jiroveci* from south Africa. J. Clinical Microbiology 42: 1505-1510.
- Ruiz, J. J., B. Pico, G. Li, V. D'Antonio, B. Falk, and C. F. Quiros. 2001. Identification of markers linked to a celery mosaic virus resistance gene in celery. J. Amer. Sci. Hort. Sci. 126: 432-435.
- Thiel, T., R. Kota, I. Grosse, N. Stein, and A. Graner. 2004. SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. Nucleic Acids. Research 32: 1-5.
- Tsai, C. C. and C. H. Chou. 1999. Nucleotide sequence of a 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer of *Imperata cylindrical* (L.) Beauv. var. *major* (cogongrass). J. Genet. Mol. Biol. 10:41-47.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23:4407-4414.
- Wannakrairoj, S. 2005. Breeding : a tool for *Paphiopedilum* Conservation in Thailand. Taiwan International Orchids (*Paphiopedilum* & *Phalaenopsis*) Symposium.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18:7213-7218.
- 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 Research 18:6531-6535.
- Zhang, Y. and J. R. Stommel. 2001. Development of SCAR and CAPS markers linked to the *Beta* gene in tomato. Crop Sci. 41: 1602-1608.
- Zilstra, C., E. M. Lever, B. J. Uenk, and C. H. Van Silfhout. 1995. Differences between ITS regions of isolates of Root-Knot Nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology 85: 1231-1237.

Use of molecular markers for species identification in *Paphiopedilum*.

Yung-Wei Sun¹⁾、Wen-Yi Liao²⁾、Han-Tsu Shen²⁾、Ming-Chung Liu²⁾、
Yu-Ju Liao²⁾、Yu-Ching Tsai²⁾、Chi-Hsiung Hsiao²⁾、Junne-Jih Chen²⁾

¹⁾ Assistant researcher (corresponding author)

Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, No.46, Singjhong St., Sinshe Township ,
Taichung Country 42642, Taiwan, R.O.C

TEL: 04-25825420

E-mail: sun@tss.gov.tw

²⁾ Assistant researcher, Assistant researcher, Assistant researcher, Associate technical specialist,
Assistant researcher, Director, Assistant researcher.

Summary: The polymerase chain reaction (PCR) is widely used in genomic DNA analysis. More recently, DNA-based techniques have been used successfully in DNA fingerprinting of plant genomes. These include random amplified polymorphism DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), internal transcribed spacer (ITS), sequence-related amplified polymorphism (SRAP), simple sequence repeat polymorphism (SSR) and a few others. RAPD procedures were first developed in 1990 using PCR to randomly amplify anonymous segments of nuclear DNA with an identical pair of primers 8-10 bp in length. Because the primers are short and relatively low annealing temperatures are used, the likelihood of amplifying multiple products is great, with each product a different locus. The nuclear ribosomal DNA (rDNA) gene family is multigene family. In most eukaryotes, the 5' to 3' organization of the gene family is an external transcribed spacer (ETS), the gene 18S, an ITS1, 5.8S, ITS2, 28S, and intergenic spacer (IGS). ITS, located between the repeating array of nuclear 18S and 28S ribosomal DNA genes, is a versatile genetic marker. The ITS region does not encode any product, permitting it to evolve at a faster rate than the ribosomal coding regions. The level of variation in this region makes it suitable for detecting genetic variation among genus, species, and within species. This results in variability in what they amplify, from genotype to genotype, but also from one DNA sample to another. SRAP is a simple marker technique aimed for the amplification of open reading frames (ORFs). AFLP is a PCR-based multi-locus fingerprinting technique, which efficiently

identifies DNA polymorphisms without prior information on the DNA sequence of plants. The AFLP technique is based on the selective PCR amplification of restriction fragments from a total digest of genomic DNA. The technique involves three steps: (a) restriction of the DNA and ligation of adapters, (b) selective amplification of restriction fragments, (c) gel analysis of the amplified fragments. For *Paphiopedilum*, the molecular markers should provided a high number polymorphisms per run when compared to morphological characters.

Key words : *Paphiopedilum*, random amplified polymorphism DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), internal transcribed spacer (ITS).

Received for publication 12 September 2005

