

利用SCAR分子標誌鑑定 朵麗蝶蘭品種

張惠如¹、安志豪²、劉明宗³、廖文偉⁴、鍾文全⁵

一、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

1 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員
2 種苗改良繁殖場品種改良課 助理研究員
3 種苗改良繁殖場品種改良課 副研究員
4 種苗改良繁殖場品種改良課 研究員兼課長
5 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員兼課長

(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。

二、分子標誌試驗結果

（一）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 1），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

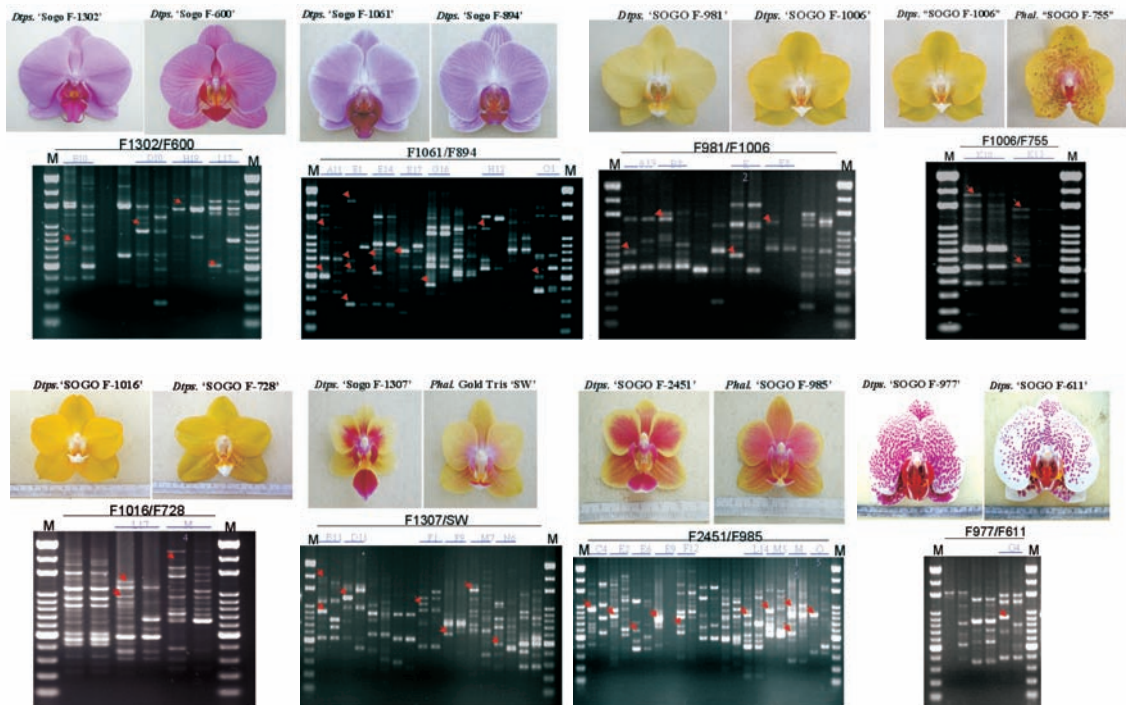


圖 1 八個受品種權保護品種（每組左方花朵圖片）及其對照品種（每組右方花朵圖片）之 RAPD-PCR 篩選差異性條帶電泳圖。經過三次重複性試驗後，圖中紅色箭頭處為出現在受保護品種之差異性條帶。

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。

(二) 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 2）。舉例來說以 Dorissr20/27 引子對產生約 1250b.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 300b.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 3），如此每個試驗材料可建立一組識別條碼。

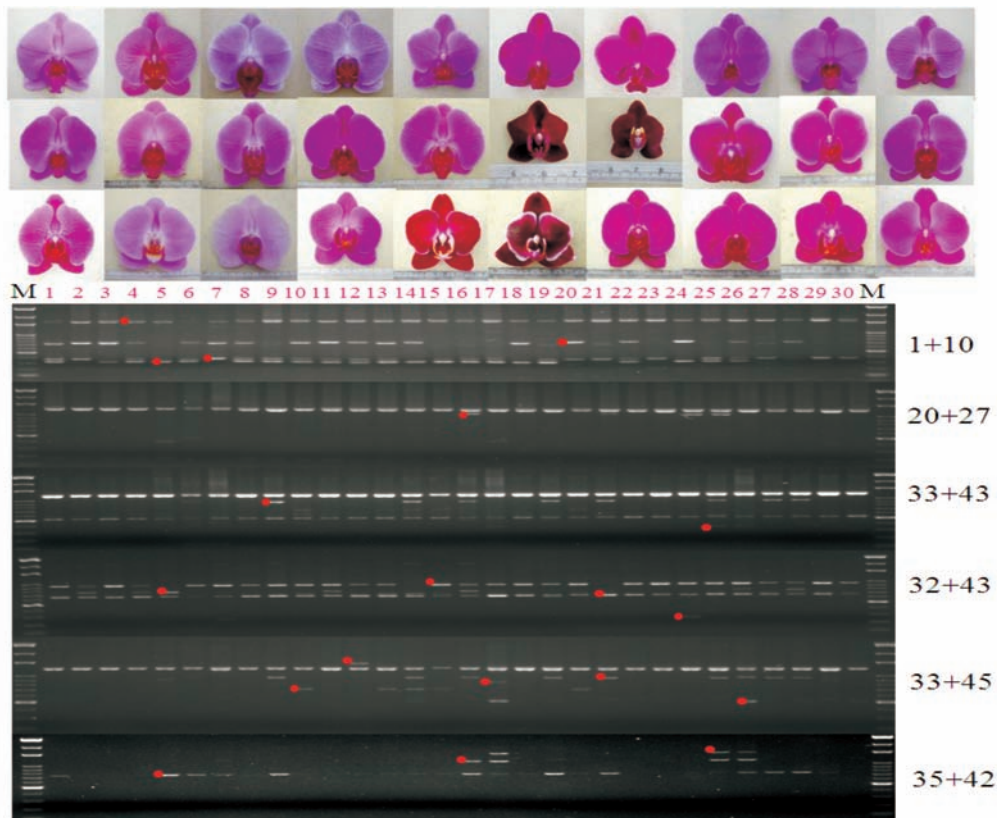


圖 2 30 個受品種權保護及其對照品種（上；如表一所列），分別由左至右、由上至下編碼 1~30；SCAR-PCR 篩選差異性條帶電泳圖（下），紅色點標示處為可鑑別之 SCAR 分子標誌共有 19 個。

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

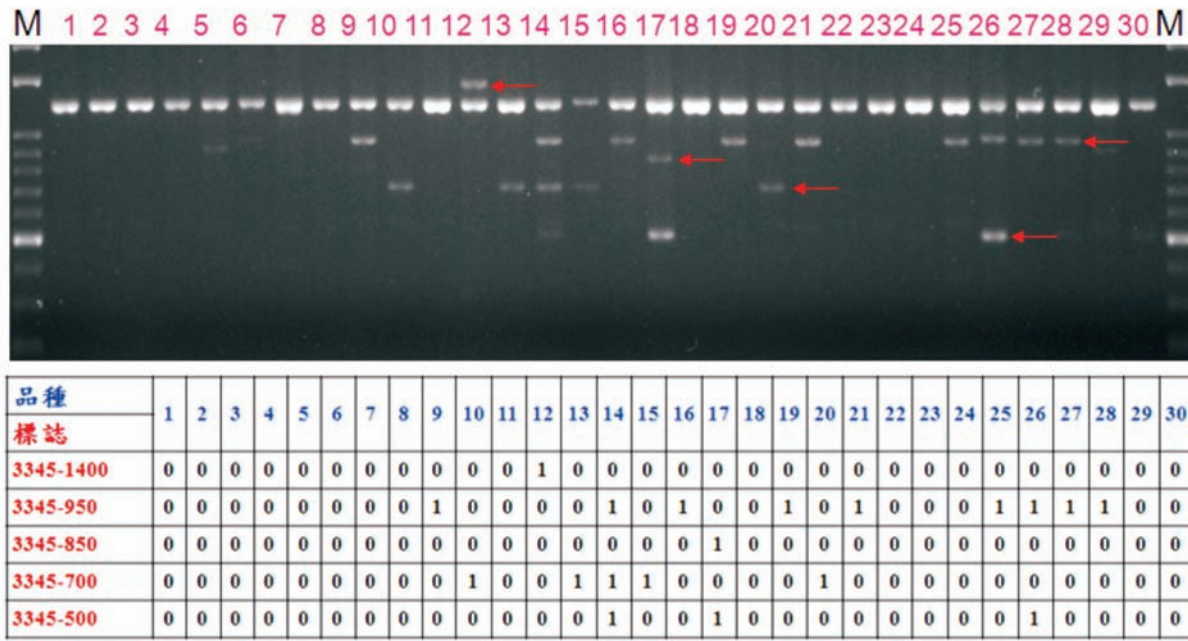


圖 3 將其中一組 SCAR-PCR 分析之分子標誌轉換成數字編碼

三、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。