

利用擴增片段長度多型性(AFLP)指紋技術鑑定六種蘭科野生種及雜交種的親源關係

本實驗中所使用的材料包括了三種野生種，分別為*Cyc. warscewiczii*、*Cyc. haagii*和*Morm. badium*及另外三種雜交品種，分別為*Cycd. Jumbo Puff*、*Cycd. Taiwan Gold*和*Cycd. Jumbo Jewel*。

首先利用不同野生種及雜交種蘭花的葉片或莖部分進行DNA萃取，再經由擴增片段長度多型性的技術來探討不同樣品DNA指紋的差異性(Vos et al., 1995)。由於此技術具有極高實驗可信度的特性因而常被應用於生物學上的研究，例如基因圖譜的建構(Mackill et al., 1996)及親緣關係的分析(Chang and Veilleux, 2009)。AFLP的實驗流程陳述如下：利用EcoRI及MseI兩種限制酶酵素進行DNA切割；切割後的DNA片段與接合子黏接；之後，分別使用預選引子及專一性引子藉由聚合酶連鎖反應進行兩次DNA擴增；擴增後的產物再經由聚丙烯酰胺膠電泳方法，分開不同大小的DNA片段；最後利用銀染進行DNA圖像的呈色。

在指紋的實驗中，共使用五種引子組合分別為E-TGA搭配M-CAA、M-CAT、M-CAC、M-CTA、M-CTT(圖一)。每種不同的引子組合皆可以在六種樣品中呈現獨特的DNA圖式。另外，從每種引子組合中，可發現有些品種之間具有較多的相同DNA片段；例如E-TGA/M-CTT的引子組合中(在圖一中具有深紅色的標記)，其中*Cycd. Jumbo Puff*與*Cycd. Taiwan Gold*就具有較多的相同DNA片段，而*Cycd. Jumbo Jewel*與*Cyc. haagii*兩種樣品也有相似的情形。

在一擬定的親源譜系中，*Cyc. haagii*為*Cycd. Taiwan Gold*的祖父母親本(圖二)，然而從指紋比對中發現，一些*Cyc. haagii*特定的片段無法在*Cycd. Taiwan Gold*的指紋樣式中找到相同的片段(如圖一中E-TGA/M-CTT引子組合下具有箭頭標記的片段)。因此根據這項證據顯示*Cyc. haagii*與*Cycd. Taiwan Gold*可能沒有親源關係；相較之下，*Cycd. Jumbo Jewel*與*Cyc. haagii*則具有高度的親源關係，可說明*Cycd. Jumbo Jewel*應為*Cyc. haagii*與*Morm. badium*的雜交後代(圖二)。

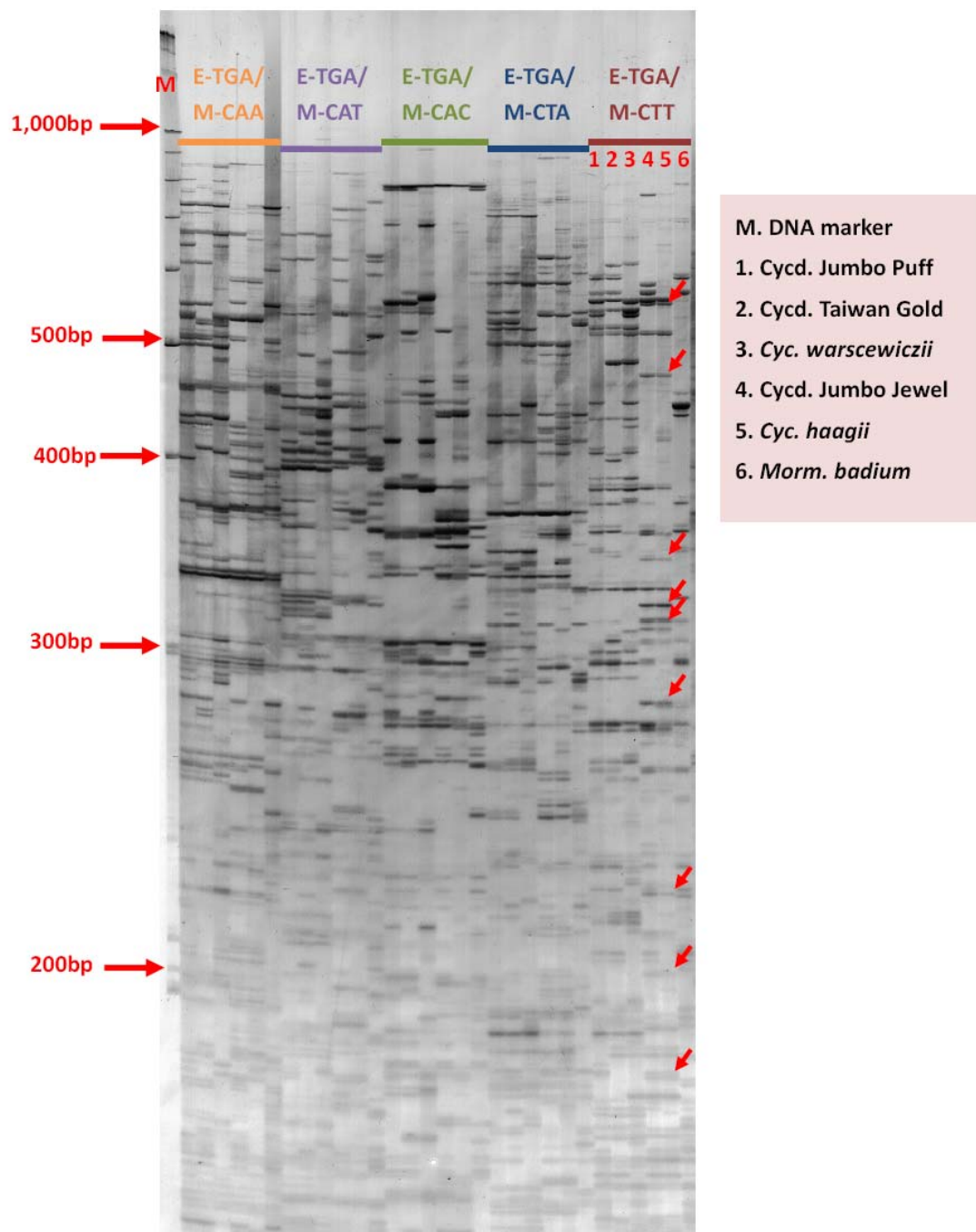
將六種樣本之五種引子組合所得到的指紋資料，利用親源分析程式Bio++進行分析，產生相似度矩陣(表一)及關係樹狀圖(圖三)的資料。在相似度矩陣中，*Cyc. haagii*分別與*Cycd. Taiwan Gold*及*Cycd. Jumbo Puff*的相似程度為37%及36%，而*Cycd. Taiwan Gold*與*Cycd. Jumbo Puff*的相似度卻高達83%，由此結果顯示*Cyc. haagii*與*Cycd. Taiwan Gold*及*Cycd. Jumbo Puff*皆有顯著的遺傳差異性。在樹狀圖中，*Cycd. Taiwan Gold*與*Cycd. Jumbo Puff*被歸類於同一的群族中，與*Cyc. haagii*之間具有相當遠的遺傳距離差異(圖三)。

從整體的證據來看，*Cycd. Taiwan Gold*似乎不是*Cyc. haagii*的雜交後代；而且，*Cycd. Taiwan Gold*似乎與*Cycd. Jumbo Puff*有兄弟姐妹的親源關係，因此推測它們同

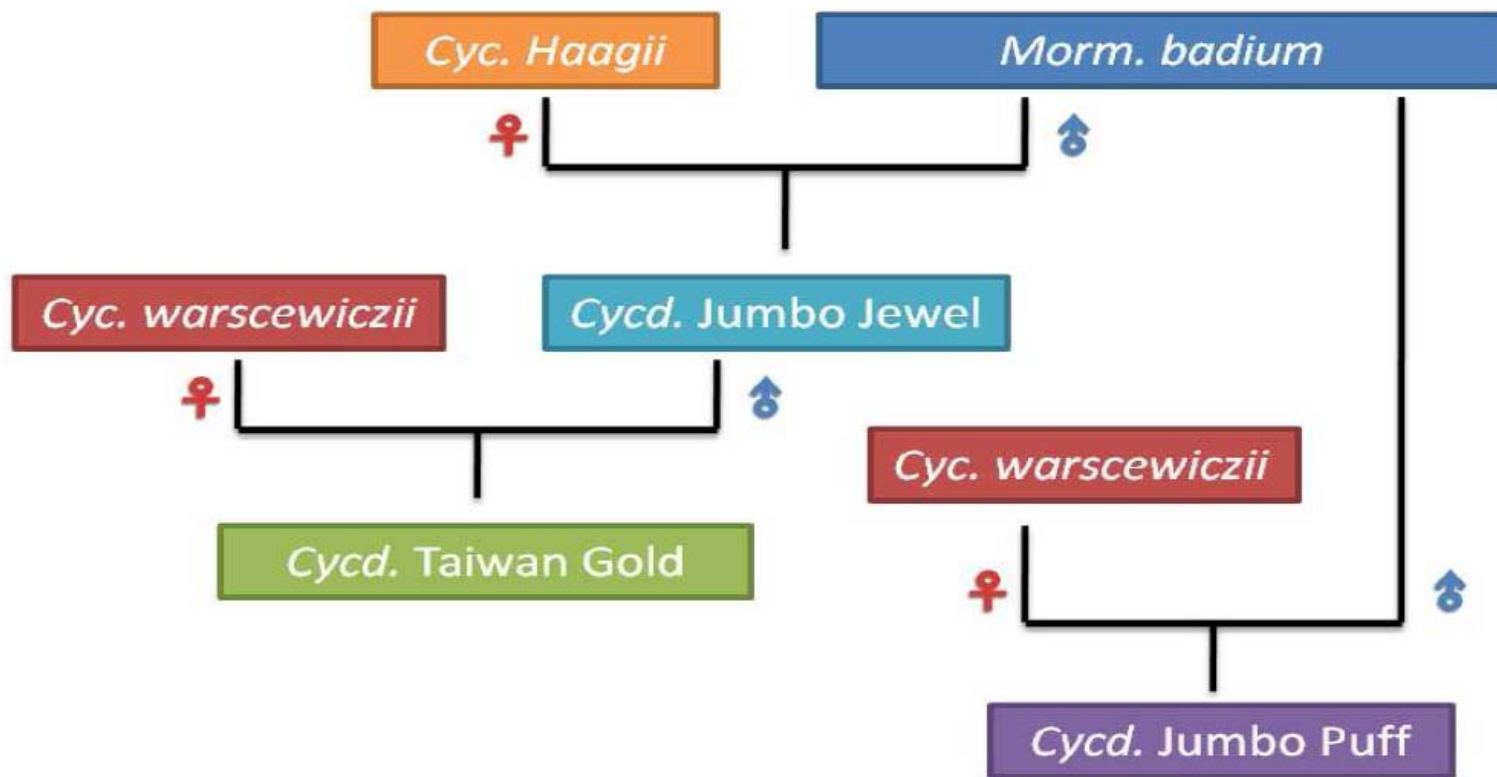
屬於*Cyc. warszewiczii*與 *Morm. badium*的雜交後代。

參考文獻

- Chang Y-K. and R. E. Veilleux (2009) Analysis of genetic variability among *Phalaenopsis* species and hybrids using amplified fragment length polymorphism. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134(1): 58-66.
- Mackill D. J. et al. (1996) Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977.
- Vos, P.R. et al. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.



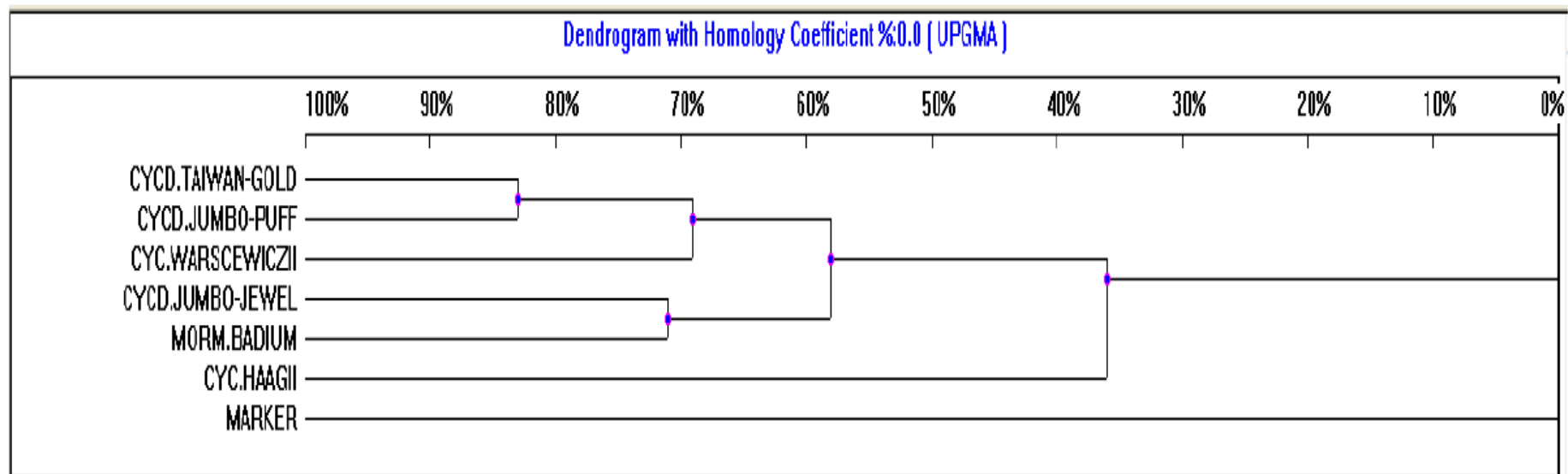
圖一、利用AFLP方法所得到之六種蘭花野生種及雜交種後代的指紋結果。在 E-TGA/M-CTT 的引子組合中，箭頭標示出 *Cyc. haagii* 的獨特 DNA 片段。



圖二、六種蘭花野生種及雜交種的擬定親源譜系圖。

表一、本研究之六種蘭花野生種及雜交種的相似度矩陣結果，顯示不同樣品之間的遺傳相似程度。

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
CYCD.TAIWAN-GOLD(L1)	1.00						
CYC.HAAGII(L2)	0.37	1.00					
CYC.WARSCEWICZII(L3)	0.70	0.51	1.00				
CYCD.JUMBO-JEWEL(L4)	0.61	0.66	0.42	1.00			
CYCD.JUMBO-PUFF(L5)	0.83	0.36	0.64	0.66	1.00		
MARKER(L6)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	
MORM.BADIUM(L7)	0.58	0.33	0.21	0.72	0.61	0.00	1.00



圖三、六種蘭花野生種及雜交種的親緣樹狀圖。此親緣關係是基於擴增片段長度多型性片段資料，經由未加權算術平均對群法(UPGMA法)分析的結果。