分子層次的種原鑑定

國立中興大學園藝學系
曾夢蛟、王昭月

一、前　言

植物種原的鑑定是種原保育中最基本也是最重要的工作之一。經由有性或無性繁殖得來的植株，常會有遺傳上或多或少的變異。因此區分、鑑別及建立品系特性的指標，是建全種原保育的關鍵工作。此外，種苗事業爲本省具有極大潛力的新興園藝事業，唯品種或F1種子的純度鑑定，一直是企業化生產上最大的困擾。因大多數種子或早期植株性狀均不易區分，僅能種植於田間，繼之在開花結果期始進行性狀比對調查，往往造成人力與時間之負擔。因此快速、簡便及有效的種子純度鑑定，以區別種子，將是開拓本省種苗內外銷市場的重要關鍵。過去二十年來同功異構酵素（isozymes）已廣泛地應用於物種遺傳特性、品種或野生種原的鑑定。近年來由於聚合酵素連鎖反應（polymerase chain reaction,PCR）技術的開發與利用，提供進一步在DNA層次上探討物種的親緣或基因特性。此對於某些以同功異構酵素仍無法區別的同種間之品系鑑定，則更具有代表性與正確性。本文即概述目前植物種原鑑定的方法及其優劣點，並探討同功異構酵素與逢機增殖多型性DNA（randomly amplified polymorphic DNA,RAPD）標誌，此二種技術在農業上研究及品種鑑定之應用現況。

二、植物種原與品種鑑定

目前檢驗植物基因穩定性的方法如表一所示。利用植物形態來區別植物品種，是最常使用的方法。既使到目前仍是區別大多數植物種原的重要依據。通常種苗公司在生產種苗時會預先在田間種植，先去除外表型不符合預期型態的植株。雖然此種田間外表型之鑑定是最簡單、直接的鑑定種原純度的方法，但未必是最快速、最正確與最具代表性的鑑定方式，因植物本身會有一些改變是無法從外表型去區別的。

表一：植物基因穩定性的檢驗方法（Potter and Jones,1991）

外表型－型態－定量分析，例如：株高、果大小等。
　　－定性分析，例如：花色、葉形等。
　－蛋白質電泳鑑定－變性(denaturing)
　　－非變性(non-denaturing)
　　－等電點(isoelectric focusing)
　　－一般染色(non-specific stain)
　　－酵素活性(enzyme activity)
　　－免疫染色(immunological staining)
　－二次代謝產物，例如：植物鹼，氣體產物
基　因－染色體－一般染色－異多倍體(aneuploidy)
　　－giemsa/C-banding－逆位(inversion)
　　－缺失(deletions)
　－限制酵素片段分析（RFLP）－ DNA 、染色體構造變化
　－逢機增殖多型性DNA（RAPD）－ DNA 序列變化

檢驗植物蛋白質的變化也是很常用的品種純度的鑑定方法。萃取自不同基因型或組織的蛋白質可利用電泳來分離。電泳的操作可在蛋白質變性或非變性下進行，蛋白質可依其大小、電荷或形狀予以分離而成蛋白質圖譜。利用二次元電泳可解析較清晰的蛋白質圖譜。所分離的蛋白質可利用 Coomassie blue 或 sliver　染色來染總蛋白質，或進行特別酵素染色來染同功異構酵素（isozyme）或利用抗體來偵測某一蛋白質。偵測蛋白質變化的情形已被廣泛用在研究種原穩定性、整齊度和組織培殖體之體細胞變異及商業種子純度之鑑定。

另一個利用生化分析調查種原之變異性（穩定性）是分析二次代謝產物。其主要是利用在冷凍保存種原和工業上植物細胞培養的檢定（Benson and Withers, 1987）。

分析外表型、蛋白質或二次代謝產物，雖可有效區別品種，但是不能提供完整的基因穩定度之背景。由於以上的分析元素取決於表現型特性或基因產物，因此受制於環境及生理因子的影響甚鉅。所以植物年齡、組織、生長環境、及生育情形均會影響所分析之蛋白質酵素的代表性。因此不同分析者之間之實驗數據常常不能互相比較。

有鑑於此，分析基因組（genomes）成爲在種原鑑定上之一重要研究工具。早期利用顯微鏡檢驗染色體在有絲或減數分裂時期的變化，可染色整個染色體或特殊區域，例如Giemsa或C-banding，可提供染色體數目、染色體異常（逆位、缺失、轉位）的資訊。

最近發展出在DNA的層次上分析基因組的變異之技術，亦即限制酵素片段分析（restriction fragment length polymorphisms, RFLPs）與逢機增殖多型性 DNA（randomly amplified polymorphic DNA,RAPD）。直接分析DNA 的優點爲：（一）解析度靈敏，即使單一核酸變

異都可偵測出來；（二）DNA種類在同一植物的各個器官、細胞都相同，因此，環境或生理年齡均不會干擾分析結果。

RFLP的方法主要是以限制酵素（restriction endonuclease）切割DNA，產生大小不等片段，經電泳分離後，再以經放射性標記之特定DNA探子進行雜交反應，由所得的自動放射顯像圖譜進行比對分析。DNA 序列之不同，變異、缺失、逆位及甲基化均可由此種分析而獲知。目前有許多重要經濟作物已利用此法建立染色體之基因圖譜，例如大豆、玉米、水稻等（Potter and Jones,1991)。可是此技術受限於特定DNA探子的來源及放射性元素操作的困擾，因此必須有純熟的試驗經驗與精巧的技術，且必須投入較多人力與經費。RAPD技術則爲將DNA 進行逢機片段的複製，再經ethidium bromide 染色複製之產品，於紫外光下顯像，比對其差異，此法極爲便捷與正確，在極短時間可比對大量樣品。

三、同功異構酵素與種原鑑定

同功異構酵素在不同物種間、種間、不同採樣部位或發育時期具有特異性（Perice and Brewbaker,1973；Mcmillin,1983；Ramirez et al.,1987）。利用同功異構酵素分子大小或電荷之差異，以電泳方式（electrophoresis），可以分離形成不同條帶（bands），得到不同物種組織之特定同功異構酵素圖譜（Shields et al., 1983）。由於同功異構酵素是基因的直接產物（Schiavo et al.,1983），且具有共顯性（codominance）、多型性（polymorphism），可直接作爲品種特性與種子純度鑑定之工具。在農業上有下列多方面之應用：（一）作爲原生種原、物種親緣或血緣關係之鑑定：例如在番椒（Conicella et al.,1990）、花生（Lu and Pickersgill,1993）及梨（林等氏，1994）栽培種與野生種原之研究已有報導；（二）鑑別栽培品種或新育成品種：例如在枇杷（Degani and Blumenfeld,1986）、甜櫻桃（Granger et al.,1993）、芹菜（Quiros et al.,1987）、甘藷（Kennedy and Tompson, 1991）、火鶴花（Kobayashi et al., 1987）、康乃馨（Arus and Messegner 1987）及樹薯（Ramirez et al.,1987）等作物之研究結果，顯示可區別不同栽培種；（三）種子純度之鑑定：Tanksley and Jones（1981）報導以ADH（alcohol dehydrogenase）檢測，可鑑定番茄F_1種子的純度；Arus et al.（1982）報導在甘藍、花椰菜等十字花科作物以浸潤12小時的種子，分析其PGM（phosphoglucomutase）及PGI（phosphoglucose isomerase）的差異同功異構酵素圖譜，可藉以測定雜交種子純度；（四）組織培養培殖體之鑑定：Colby and Peirce（1988）報導在蘆筍組織培養苗上，藉分析PRX（peroxidase），SKDH（shikimate dehydrogenase）等同功異構酵素，可標識同質多倍體；Nakano and Mii（1993）報導利用esterase同功異構酵素鑑定經原生質體融合再生的石竹；（五）特殊遺傳性狀篩選：Cap et al.（1991）報導分析APS（acid phosphatase）同功異構酵素，可快速篩選番茄抗根瘤線虫基因型之植株；（六）遺傳特性之研究：在葡萄（Parfitt and Arulsekar ,1989）及藍莓（Vorsa et al.,1988）的研究，顯示除了以同功異構酵素區分品種外，並可由其圖譜推算同功異構酵素基因的遺傳變異及遺傳行爲。

四、Randomly amplified polymorphic DNA（RAPD）marker與種原鑑定

聚合酵素連鎖反應技術（polymerase chain reaction,PCR）爲 Kary Mullis 1984年首先開發成功，並已成爲分子生物研究技術上之一重大突破。它可在數小時內準確地將某一特定DNA 進行"量"的放大，以利於實驗偵測或檢定。PCR反應原理係利用雙股DNA 在短期間置於高溫（92～94℃），經變性（denature）使雙股分開，後溫度下降（35～60℃），並利用反應緩衝液中適當的引子（primer）與模板DNA（template DNA）煉合（annealing）。繼之緩衝液中的DNA聚合酵素（polymerase）及合成DNA的4種核甘酸（dATP,dGTP,dCTP, dTTP）開始延伸（extension）產生新股 DNA。於是重覆上述的 denature、annealing 及 extension三步驟，使目標DNA（Target DNA）以2^n等比級數擴增。其後經由電泳分離，以 ethidium bromide染色，在UV光下即可檢視DNA片段。PCR 可應用於已知核甘酸序列（nucleotide sequence）之 DNA，使用特定引子（primer）擴增其DNA量以研究某特定基因，例如 D'Ovidio（1993）選定與小麥品質相關之glutenin基因上之特定核甘酸序列爲引子，經 PCR 反應後，篩檢不同品質的小麥品種。

1990 年 Williams 及 Welsh 等人利用隨意引子（arbitrary primer），進行 PCR 反應。一般arbitrary primer 多爲 10～20 mers 之 oligonucleotide，以之進行 PCR，又稱爲 AP-PCR（arbitrary primer polymerase chain reaction）。而經此擴增之多型 DNA 片段則稱爲 RAPD（randomly amplified polymorphic DNA）marker。往後 1991～1994 年間，並陸續有 RAPD marker 與基因分析之相關研究發表。

RAPD可應用於：（一）種間基因分析與鑑定：Wilkie et al.（1993）利用10 mers 的隨意引子進行之RAPD marker，可鑑別石蒜科蔥屬（*Allium*）之不同種別及親緣關係；Halward et al.（1992）也以AP-PCR 反應區別花生栽培種與野生種的基因多型性差異；（二）栽培品種鑑定與分類：Yang and Quiros（1993）以10 mers 隨意引子之RAPD marker 分析，能將芹菜栽培種依多型性差異予以分類，並可將親緣相近之族群再予歸類；Stilies et al.（1993）以 RAPD marker 應用於木瓜栽培種間之基因分析，利用11種隨意引子產生的RAPD marker，經由電腦以 cluster analysis 分析其相關性，可清楚研判11個木瓜品系相關係數，以此探討不同品系內的相似性及種原岐異度（diversity），並建議此爲快速且正確性高之種原鑑定方法；此外，利用RAPD marker在油菜（Mailer et al.1994）、稻（Yu and Nguyen, 1994）、番茄（Foolad et al.,1993）、苜蓿（Barcaccia,1994）、咖啡（Orozco- Castillo et al.,1994）及玉米（Welsh et al.,1991）等作物之品種鑑定，也有報導。（三）建立基因圖譜：Williams et al.（1990）報導以特定 RAPD marker 鑑定大豆種間差異，並以此作爲標定大豆染色體的基因圖譜；（四）特定基因之分析：Penner（1993）應用RAPD marker檢測燕麥抗銹病基因；Haley et al.（1993）也同樣以RAPD marker 分析豆類抗銹病基因；利用AP-PCR技術，標定油菜恢復稔性基因（Delourme et al., 1994）、番椒矮化基因（Inai et al.,1993）、萵苣抗白粉病基因（Paran et al.,1991）及番茄抗青枯病基因（Martin et al.,1991）也有報導。這些 RAPD

marker將有助於選殖特定基因，或篩選特定性狀的品系；（五）營養繁殖體基因特性與變異之分析：針對組織培養營養體變異（somaclonal variation）之篩檢，利用RAPD marker可有效地鑑定in vitro derived clones之基因純度（Brown et al.,1993;Isabel et al.,1993）。

重要文獻

1.林文彬、曾夢蛟、倪正柱. 1994. 台灣野梨之復育(二)－分子標誌鑑定. 中國園藝 40(4): 269-281.

2.Arus, P., S. D. Tanksley, T. J. Orton and R. A. Jones. 1982. Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea.* Euphytica 31: 417-428.

3.Arus, P. and R. Messeguer.1987. Cultivar identification of carnations by means of isozyme markers. Acta Horticulture 216: 215-218.

4.Barcaccia, G. 1994. Development, comparability and potential applications of RAPD markers in the genus *Medicago.* J. Genet. Breed. 48: 161-168.

5.Benson, E. E. and L. A. Withers. 1987. Gas Chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures : a non-destructive method for assessing stability. Cryo-Letters 8: 35 -46.

6.Brown, P. T. H., F. D. Lange, E. Kranz and H. Lorz.1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. Mol. Gen. Genet. 237: 311-317.

7. Cap, G. B., P. A. Roberts, I. J. Thomason and T. Murashige. 1991. Embryo culture of Lycopersicun esculentum L.X Peruvianum hybrid genotypes possessing heat-stable resistance to *Meloidogyne incognita.* J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:1082-1088.

8.Colby, L. W. and L. C. Peirce. 1988. Using an isozyme marker to identify doubled haploids from anther culture of asparagus. HortScience 23: 761-763.

9.Conicella, C., A. Errico and F. Saccardo. 1990. Cytogenetic and isozyme studies of wild and cultivated *Capsicum annuum.* Genome 33: 279-282.

10.Degani, C. and A. Blumenfeld. 1986. The use of isozyme analysis for differentiation between loquat cultivars. HortScience 21: 1457-1458.

11.Delourme, R., A. Bouchereau, N. Hubert and M. Renard and B. S. Landry. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic male sterility of rapeseed(*Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet. 88: 741-748.

12. D'Ovidio, Renato. 1993. Single-seed PCR of LMW glutenin genes to distinguish between durum wheat cultivars with good and poor technological properties. Plant Molecular. Biology 22:1173-1176.

13. Foolad,M. R., R. A.Jones and R. L. Rodriguez. 1993. RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. Plant Cell Report 12: 293-297.

14.Granger, A. R., G. R. Clarke and J. F. Jackson.1993.Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism.Theor. Appl. Genet. 86:458-464.

15. Halward, T., T. Stalker, E. LaRue and G. Kochert. 1992. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Molecular. Biology 18:315-325.

16.Haley, S. D., P. N. Miklas, J. R. Stavely, J. Byrum and J. D. Kelly. 1993.Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. Theor. Appl. Genet. 86: 505-512.

17.Inai, S., K. Ishikawa, O. Nunomura and H. Ikehashi. 1993.Genetic analysis of stunted growth by nuclear-cytoplasmic interaction in interspecific hybrids of *Capsicum* by using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87: 416-422.

18.Kennedy, L. S. and P. G. Thompson. 1991.Identification of sweet potato cultivars using isozyme analysis. HortScience 26: 300-302.

19. Kobayashi, R. S., J. L. Brewbaker and H. Kamemoto. 1987. Identification of *Anthurium andraeanum* cultivars by gel electrophoresis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:164-167.

20.Lu, J. and B. Pickersgill. 1993. Isozyme variation and species relationships in peanut and its wild relatives (*Arachis* L. -Leguminosae). Theor. Appl. Genet. 85: 550-560.

21.Mailer, R. J., R. Scarth and B. Fristensky. 1994.Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. Theor. Appl. Genet. 87: 697-704.

22.Martin, G. B., J. G. K. Williams and S. D. Tanksley. 1991.Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2336-2340.

23.McMillin, D. E. 1983. Plant isozymes: a historical perspective.pp.3-13 . In: S. D. Tanksley and T. J. Orton(eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Elsvier, Amsterdam.

24. Nakano, M. and M. Mii. 1993. Somatic hybridization between *Dianthus chinensis* and *D. barbatus* through protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 86: 1-5.

25. Orozco-Castillo, C., K. J. Chalmers, R. Waugh and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87: 934-940.

26.Paran, I., R. Kesseli and R. Michelmore. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. Genome 34: 1021-1027.

27. Parfitt, D. E. and S. Arulsekar. 1989. Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114: 486-491.

28. Peirce, L. C. and J. L. Brewbaker. 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science. HortScience 8:17-20.

29. Potter, R. H. and M. G. K. Jones. 1991. Molecular analysis of genetic stability. In J. H. Dodds (ed.) *In Vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. p.71-91. Chapman and Hall, London.

30. Quiros, C. F., M. McGrath and J. L. Stites. 1987. Use of stem proteins and isozymes for the identification of celery varieties. Plant Cell Rep. 6:114-117.

31. Ramirez, H., A. Hussain, W. Roca and W. Bushuk.1987. Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. Euphytica 36: 39-48.

32. Stiles, J.I., C. Lemme, S. Sondur, M.B. Morshidi and R. Manshardt. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. Theor. Appl. Genet. 85: 697-701.

33. Tanksley, S. D. and R. A. Jones. 1981. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F_1 hybrid of tomato. HortScience 16: 179-181.

34. Vorsa, N., P. S. Manos and M. I. van Heemstra. 1988. Isozyme variation and inheritance in blueberry. Genome 30: 776-781.

35. Welsh, J., R. J. Honeycutt, M. McClelland and W. S. Sobral. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Theor. Appl. Genet. 82:473-476.

36. Wilkie, S. E., P. G. Isaac and R. J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet. 86: 497-504.

37. Williams, J. G., 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 Acid Res. 18:6531-6535.

38. Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86:205-212.

39. Yu, L. X. and H. T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 87:668-672.