

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

文心蘭基因組中微衛星 DNA 的選殖、分析及 DNA 指紋之開發
應用(2/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2317-B-002-009-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生命科學系

計畫主持人：何國傑

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 12 月 30 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 成果報告
□ 期中進度報告

文心蘭基因組中微衛星 DNA 的分析 選殖及 DNA 指紋之開發應用

計畫類別：□ 個別型計畫 ■ 整合型計畫

計畫編號：NSC 92 - 2317 - B - 002 - 009 -

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

計畫主持人：何國傑

共同主持人：葉開溫

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：□ 精簡報告 ■ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

□ 涉及專利或其他智慧財產權，□ 一年 □ 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學生命科學學系

中 華 民 國 9 3 年 0 8 月 1 5 日

前言

文心蘭 (*Oncidium* spp.) 為一種多年生草花，花盛開時宛如一群少女婆娑起舞，故又稱跳舞蘭，英文稱之為 dancing-doll orchid *oncidium*。花色多變化，有紫、黃、褐、黃綠及洋紅等。文心蘭為複莖地生或著生，品種多達 750 種以上，大部分原產於熱帶美洲，由平地到冷涼的高山地帶都有其蹤跡。文心蘭十多年前自泰國引進本省，由於花農及出口業者的努力，其切花已能終年出口至日本市場，因此栽培面積快速增加，已超過 150 公頃，也成為台灣第三大外銷切花。

文心蘭的繁殖法以下列三種為主：(1) 單一新生芽繁殖法，此法生長期較短，且成本較低。(2) 成熟已開花之單一偽莖繁殖法，因偽莖發芽發根後才成新個體，故費時較久，無法達到快速供應市場的目的。(3) 組織培養苗繁殖法，現在業者多以此組培苗為種苗，快速且能大量生產，但遺傳組成不穩定，常有差異大的兄弟株存在，在栽培過程中必須淘汰生長不良或特質不符合需求的植株，且往往需要等到開花才知道該如何進行篩選，費時又不合成本。目前在台灣，為了能快速繁殖到新植株，多以組織培養苗做為文心蘭的種苗，其來源有三種：(1) 經種莢播種，(2) 由走莖抽出之新苗，(3) 新苗增生出之幼芽。後兩者的新苗之遺傳組成變異小，但如果由種莢播種，則會因父母本雜交的結果，造成不同遺傳組成之兄弟株，這些幼苗在營養期不會有太大的差異，但所用的花朵之外表形態會有所差別 (林等, 1999; 賴, 1998)。

文心蘭為二倍體 ($2n$) 植物，但各品種間染色體的總個數並不一定，其中期 (metaphase) 的染色體大小約 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 。然而在染色體數目較多的品種，除了這些大小的染色體外，還有許多介於 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$ 的小型染色體的存在 (Nakaata and Hashimoto, 1990)。雖然 Karyotypic 的分析曾被用於植物之多樣性及親緣的研究 (Ohri and Pal, 1991; Li *et al.*, 2000)，但顯示的多樣性並不高。賴 (1998) 曾以 AFLP 技術分析文心蘭品種間的遺傳相關性，而能將所研究的 8 個品系依切花栽培用及盆花栽培用的兩大群分開。雖然 RFLP、RAPD 及 AFLP 等技術近來常用以評估物種間的異質性 (heterogeneity)，但在某些種其所顯示的多樣性 (polymorphism) 很低 (Udupa *et al.*, 1993)。本計畫欲藉由目前最常用於 DNA 指紋分析 (DNA fingerprint analysis) 的微衛星 (microsatellite) DNA marker 來分析文心蘭不同品系間的遺傳多樣性 (genetic diversity)，尤其期望能在組培苗期就能預測未來植株開花的良莠。就經濟觀點而言，花為主要的銷售標的，當花開時才知道其形態再篩選，已浪費相當高的成本，但進行品種間交配時，如何篩選優良的子代，尤其困難。因此利用新發展的分子生物技術來分析文心蘭的遺傳組成，如能在幼苗時期即能淘汰不合經濟價值的種苗，就可節省大量的成本。

1999 年 Rostiana *et al.* 發現微衛星 DNA 中的 $(CAGA)_4$ 可用以分析 horseradish 之 leaf-derived calli 的 somaclonal variation。其中 71% 的再生株顯示與母株有不同條帶型，而在葉的形狀及顏色上則只有 5% 的不同，可見在 horseradish 組織培養的過程中基因組中有可突變的位置存在，也顯示在 horseradish inter-SSR PCR 技術是偵測 horseradish 之 somaclonal variation 的一種非常有效的方法。

微衛星 DNA 又稱為 short tandem repeats (STRs), simple sequence repeats (SSRs) 或 variable-number-of-tandem-repeat (VNTR)，存在於至今所有被研究過的生物之基因組中。其主要特徵為由一段短的 DNA 單位 (通常小於 10 個鹽基對) 作直線排列 (Jeffreys *et al.*, 1985; Winberg *et al.*, 1993; Richard *et al.*, Kumar and Rostad, 1998)，這類 DNA 在基因組中量非常多。在 1993 年，Morgante 及 Olivieri 對 EMBL 及 GenBank databases 作探索，發現以 2~3 個核苷酸為單位的 STR，在植物之基因組中，每 50 kb 就有一個存在。再加上它具有高度

的變異性 (hypervariability)、共同優勢性 (codominance) 及高度之重現性 (high reproducibility), 使微衛星 DNA 成為最有用且廣泛地應用於遺傳作圖及基因體的分析 (Liu *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Ramsay *et al.*, 1999), 基因組成的鑑定及變種的保護 (Smith and Helentjaris, 1996; Rajora *et al.*, 2001), 純種子的評鑑及生殖體的保存 (Brown *et al.*, 1996 ; Hahn and Grifo, 1996), 多樣性的研究 (Xiao *et al.*, 1996), 親系的鑑定及宗譜的分析 (van de Ven and McNicol, 1996; Ayres *et al.*, 1997; Bowers *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000), 藉助標幟之早期篩選 (Ayres *et al.*, 1997; Weising *et al.*, 1998) 等方面。

方法及材料

吾人將選擇本省用於切花最多的品種之一的 Onc. Gower Ramsey (俗稱南西) 及主要的盆花品種 Onc. Sweet Sugar (俗稱蜜糖) 為材料 (林等, 1999)。利用 M13mp18 為載體, 建立 genomic DNA library, 並篩選, 分析其 STR。

文心蘭 DNA 的萃取 :

DNA 之萃取將依個人過去抽取日日春 DNA 的方法執行 (Ho *et al.*, 2001)。簡述如下:

首先將文心蘭植株或癒合組織在液態氮存在下將其磨碎成粉末, 再加入萃取的緩衝液 (500 mM NaCl, 100 mM Tri-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% N-lauroyl sarcosine) 攪拌, 並放於 55°C 1-2 小時, 之後於 4°C 下以 10,000 xg 離心 10 分鐘 (重覆 2-3 次), 取上清液, 加入 0.6 倍體積的異丙醇混合, 於 4°C 下以 10,000 xg 離心 30 分鐘後取沈澱物。

將沈澱物回溶於 TE buffer (10 mM Tri-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 後, 每 1ml TE buffer, 加入 25 μ l 之 20% SDS、20 μ l 之 5mg/ml proteinase K 混合好後放於 37°C 下 1 小時。之後對每 ml TE buffer, 加入 175 μ l 的 5 M NaCl, 140 μ l 的 CTAB/NaCl 溶液混合後, 放置於 65°C 中 10 分鐘。

之後加入等體積的 chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 之溶液, 混合後低速離心 4-5 分鐘後取上清液, 並且重覆 3 次。再加入等體積的 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 之溶液, 混合後低速離心 4-5 分鐘取上清液, 並且重覆 3 次。再加入 0.6 倍異丙醇到上清液, 輕輕地混合後, 於 4°C 以 12,000 xg 離心 20 分鐘, 取其沈澱物。將沈澱物以 70% 酒精洗去 CTAB, 再以 12,000 xg 離心後並將沈澱物烘乾, 最後以適當體積的 TE buffer 回溶。

基因庫的建立及篩選 :

這方面將參考 Dayanandan *et al.* (1998) 及個人過去所用之方法 (Ho *et al.*, 1992; Ho *et al.*, 1993)。

100 μ g DNA 於 200 μ l 的緩衝液, 經 *Sau3A* 於 37°C 下處理 3 小時後, 經由 1% 的 agarose gel 電泳分離, 純化 250-1000 bp 的片段, 再接至 M13mp18 之載體, 之後將重組 DNA 分子轉形至 *E. coli* XL1-Blue MRF'。

含 microsatellite DNA 之選殖株的篩選

將轉形株長於含 tetracyclin (15 μ g/ml) 之 LB agar plate 上, 之後轉移至 nylon membrane, 經 80°C 烘 2 小時後浸於 2X SSC 10 分鐘, 再用 5X SSC, 0.5% SDS 洗滌 1 小時後晾乾備用。

雜交溶液含 6X SSC、5X Denhardt 及 0.4% SDS。雜交條件為 prehybridization 過夜, hybridization 則為 4-12 小時, 溫度則視所用之探針而定, 於 45-55°C 之間,

雜交後以 0.1% 及 6X SSC 於室溫洗滌一次，再於 45 °C 洗滌一次。

因目前尚無蘭花的 microsatellite DNA 組成發表，故將參考其他植物種類 microsatellite DNA 的組成，合成 oligonucleotide 作為篩選基因庫的探針。Oligonucleotides 如下：

(AAAG)₇, (AGAT)₇, (AAAT)₇, (AT)₁₅, (AG)₁₅, (ACG)₁₀, (CA)₁₅, (TC)₁₅, (TG)₁₅, (TAA)₈, (CATC)₄, (GGTA)₄, (GTAG)₄, (AGTG)₄, (GTGA)₄, (ACAG)₄, (CAGA)₄, (ACTG)₄, (GAA)₈, (GTG)₅, (GACA)₄

Sequencing of positive clones, design of primers and resolution of SSR polymorphism.

純化自 positive plaques 之 DNA 將以 ABI Prism 377 automated sequencer 定序，將依據 repeat 兩端的序列來設計 PCR 反應的引子，所產生的 DNA 再作進一步分析。

資料分析：

每一種 microsatellite 的 polymorphism information content (PIC) 將依 Weir (1996) 的方法決定： $PIC = 1 - \sum P_i^2$ ， P_i 為所偵測的 species 或 cultivars 中第 i 個對偶基因出現的頻率。而其多樣性指數 (diversity index, H) 將根據 Nei (1987) 的方法來計算：

$H = n / (n-1) (1 - \sum X_i^2)$ ， X_i 為第 i 種 genotype 在 population 中的出現頻率， n 為被分析之材料數。

遺傳相似性指數 (genetic similarity index, S) 則依 Nei and Li (1979) 的方法計算： $S = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ ， N_{ij} 為第一個及第二個 genotype 共有之 band 的數目， N_i 及 N_j 為其各別之 band 的總數。

結果與討論

第一年已完成 Ramsey 及 Sweet sugar 兩種文心蘭之基因體基因庫的建立，並篩選出含微衛星 DNA 選殖株，共獲得 13 種微衛星 DNA 【[TA]₄ [AG]₂₃ [TC]₅ [GGA]₂[GA]₃AG[GA]₃、TCATCT[TCA]₄、[CA]₅GACT[CA]₅CCA、[TAT]₉[TAA]₂ATAC[TAA]₅C[AAT]₂、[TG]₃TT[TG]₂[TTTG]₂、[TTG]₉、[ATAA]₄、[TTC]₂₈[TAA]₁₂CAA[TAA]₁₃、[TTA]₁₄、[TAA]₄CAG[TAA]₇CAA[TAA]₃CAG[TAA]₁₂】。另外，利用文心蘭 EST 基因庫，我們找到 56 種微衛星 DNA (表 1)。第二年則利用這 69 種微衛星 DNA 進行 ISSR—PCR 分析，發現在這 69 種微衛星 DNA 序列中，只有 4 種可以用為 ISSR—PCR 分析的引子，而在這可用的四種中，只有 2 種 (TCATCT[TCA]₄ 與 [GGA]₂[GA]₃AG[GA]₃) 可以用來進行 ISSR—PCR 分析。

由於第一年利用所找到的微衛星 DNA 兩旁序列合成探針對所收集的文心蘭品系基因體 DNA 進行 PCR 反應做 SSR 的分析，無法獲得大量可用的資訊。鑑於 1999 年 Rostiana 等人利用簡短重複序列間隔法 (inter-SSR) 用以分析辣根 (horseradish) 之 leaf-derived calli 的體細胞，所偵測到的變異 (somaclonal variation) 高達 71%。因此第二年朝兩方面同時進行：(1) 持續自文心蘭 Ramsey 及 Sweet Sugar 的基因體基因庫中，篩選微衛星 DNA；(2) 以 1999 年 Rostiana 等人所發表的文章為基礎，設計出 52 組微衛星 DNA 引子，利用 ISSR—PCR 分析文心蘭。

在持續篩選微衛星 DNA 上，本實驗室陸續獲得 36 種微衛星 DNA 序列 【[AAAC]₄、[AAG]₅ [AAG]₉ [AAG]₄ [ACAA]₄ [ACTTCC]₄ [AG]₂₃ [AG]₅ [AG]₂₁ [AGA]₅ [AGA]₄ [AGC]₄ [AGC]₅ [AT]₅ [ATC]₄ [CAA]₄ [CAG]₄ [CAT]₄ [CCA]₄ [CCG]₅ [CT]₆ [CCT]₄ [GA]₁₃ [GA]₅ [GAA]₇ [GAT]₆ [GGA]₄ [TA]₅ [TC]₅ [TC]₁₀ [TCA]₄ [TCT]₄ [TGA]₄、[TTC]₄、[TTC]₅、[TTTG]₅】。

根據再設計的52組微衛星DNA引子進行ISSR—PCR分析，在這52組中有24組可以用來進行ISSR—PCR，但只有其中的14組引子【[AAAG]₄、[CATA]₄、[GATA]₄、[AACCC]₄、[AACG]₄ [AAGC]₄ [ACAG]₄ [ATCC]₄ [ACTG]₄ [CAGA]₄ [CATC]₄ [GTAG]₄ [GTGA]₄ [CAGA]₄】可以鑑別出文心蘭品系間或品系內的差異。經初步的ISSR—PCR分析，已可以成功的分別出Ramsey及Sweet sugar兩種文心蘭品系，也就是說可以經由本實驗室所建立的分析系統，區別出文心蘭切花與盆花品系。

目前由楊梅達明蘭園提供76株Ramsey種文心蘭，利用上述的分析系統來進行分析，本實驗是利用[GGA]₂[GA]₃AG[GA]₃、TCATCT[TCA]₄及[ACAG]₄分析76株文心蘭之間的差異。以[GGA]₂[GA]₃AG[GA]₃為例，76株文心蘭進行ISSR-PCR後，經polyacrylamide gel分析可以分為14群（圖1），並利用軟體分析計算這14群間的遺傳距離（genetic distances，表2）。達明蘭園提供的Ramsey種文心蘭主要由7顆母株而來，進一步由彼此的遺傳距離建構一親源關係樹（圖2）來分析，這14群之中 A、D、F、K 可歸為一群（，圖1B），G、H、I、J可歸為一群（，圖1B），而C與B可歸為一群（，圖1B），因此可歸納為7大群，與達明蘭園所提供的文心蘭資料相符。另外，在、與E更可以進一步歸作一群。

雖然達明蘭園所提供的Ramsey種文心蘭是由7顆母株繁殖而來，利用[GGA]₂[GA]₃AG[GA]₃為引子對76株文心蘭作ISSR—PCR分析，除了可以將這76株文心蘭依親源關係分為7大群，也由ISSR—PCR的分析可以看7大群之中的差異（、與）。就來看，利用[GGA]₂[GA]₃AG[GA]₃可以發現有4種變異。此外，、與E的親源關係相近，所以推斷達明蘭園所提供的7個Ramsey種文心蘭品系可能是有5種不同品系而來，而、與E可能是有同一品系變異所產生。

利用ISSR—PCR初步可區分不同植株之文心蘭，但無法區分文心蘭植株的個別特徵，此乃因為實驗室沒有具不同特徵的文心蘭植株，目前已再請達明蘭園收集不同特徵的文心蘭植株，以便作進一步的分析，達成總計畫的預期目標。

圖1、以[GGA]₂[GA]₃AG[GA]₃為引子利用簡短重複序列間隔分析法分析文心蘭南西品系。A—N分別代表不同之文心蘭南西品系，由達明蘭園所提供。達明蘭園提供76株文心蘭植株，而76株文心蘭依來源可以分為14種品系。

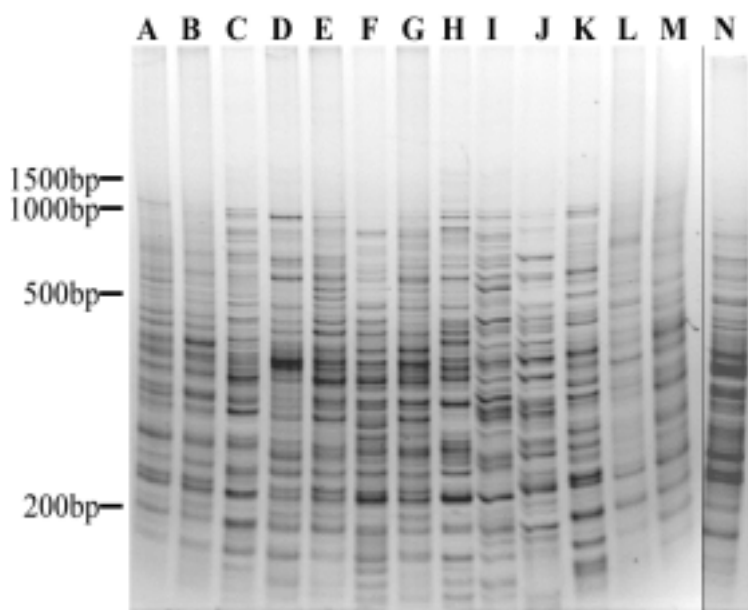


圖2、Ramsey文心蘭品系親源關係圖。

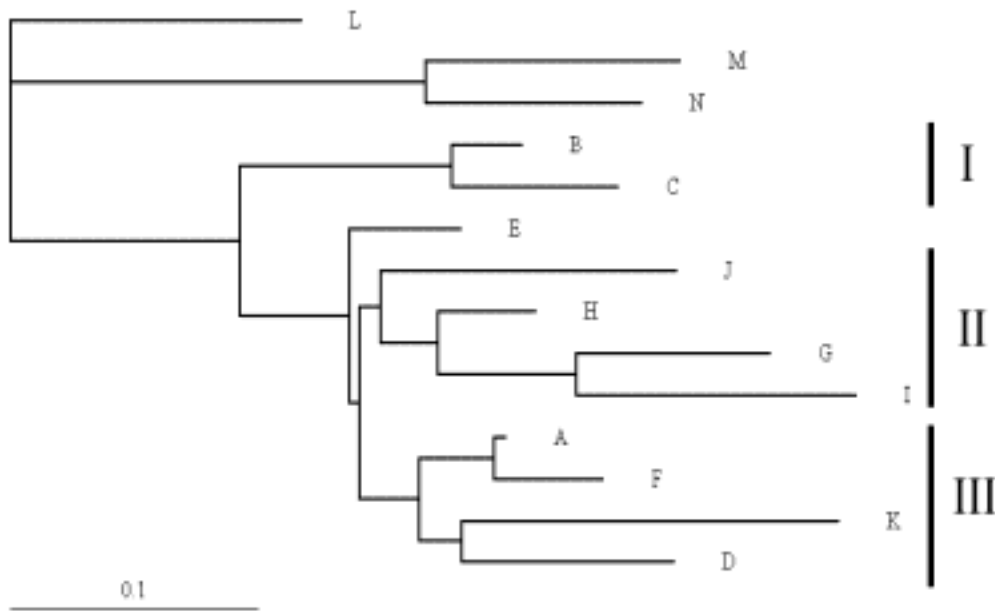


表1、利用文心蘭EST基因庫所找出的微衛星體DNA。

motif	repeat number	EST clone number	motif	repeat number	EST clone number
AAAC	4	OncidiumEST_009_81_H04	CT	6	OncidiumEST_006_32_C08
AAAC	4	OncidiumEST_010_96_H12	CTT	4	OncidiumEST_015_46_D10
AAG	5	OncidiumEST_013_72_F12	CTT	4	OncidiumEST_010_70_F10
AAG	9	OncidiumEST_012_54_B06	G	9	OncidiumEST_011_07_A07
AAG	4	OncidiumEST_012_07_A07	G	8	OncidiumEST_001_76_G04
AAG	4	OncidiumEST_006_35_C11	GA	13	OncidiumEST_008_71_F11
ACAA	4	OncidiumEST_005_16_B04	GA	9	OncidiumEST_014_85_H01
ACTTC	4	OncidiumEST_009_81_H04	GA	5	OncidiumEST_002_43_D07
AG	23	OncidiumEST_008_71_F11	GAA	7	OncidiumEST_005_85_H01
AG	5	OncidiumEST_008_71_F11	GAT	6	OncidiumEST_007_60_E12
AG	5	OncidiumEST_008_78_G02	GGA	5	OncidiumEST_007_87_H03
AG	21	OncidiumEST_008_05_A05	GGA	4	OncidiumEST_011_85_H01
AGA	5	OncidiumEST_011_23_B11	TA	5	OncidiumEST_012_09_A09
AGA	4	OncidiumEST_007_64_F04	TA	5	OncidiumEST_005_89_H05
AGC	4	OncidiumEST_012_06_A06	TA	5	OncidiumEST_015_48_D12
AGC	4	OncidiumEST_011_03_A03	TC	5	OncidiumEST_013_38_D02
AGC	5	OncidiumEST_001_69_F09	TC	5	OncidiumEST_008_32_C08
AT	5	OncidiumEST_005_04_A04	TC	10	OncidiumEST_002_58_E10
AT	5	OncidiumEST_007_72_F12	TC	7	OncidiumEST_002_58_E10
ATC	4	OncidiumEST_001_46_D10	TCA	4	OncidiumEST_002_47_D11
ATC	4	OncidiumEST_008_31_C07	TCA	4	OncidiumEST_015_14_B02
C	8	OncidiumEST_011_07_A07	TCT	4	OncidiumEST_008_43_D07
C	8	OncidiumEST_015_55_B07	TCT	4	OncidiumEST_012_16_B04
CAA	4	OncidiumEST_006_63_F03	TCT	4	OncidiumEST_012_50_B02
CAG	4	OncidiumEST_007_11_A11	TGA	4	OncidiumEST_014_43_D07
CAT	4	OncidiumEST_001_80_G08	TTC	4	OncidiumEST_008_38_D02
CCA	4	OncidiumEST_005_42_D06	TTC	5	OncidiumEST_009_57_B09
COG	5	OncidiumEST_001_40_D04	TTTG	5	OncidiumEST_013_12_A12

表2、Genetic distances of *Oncidium* spp.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
A														
B	0.2381													
C	0.2381	0.0952												
D	0.1429	0.2857	0.3810											
E	0.0952	0.1429	0.2381	0.1429										
F	0.0476	0.1905	0.1905	0.1905	0.1429									
G	0.2381	0.3810	0.3810	0.3810	0.2381	0.2857								
H	0.0952	0.2381	0.2381	0.2381	0.0952	0.1429	0.1429							
I	0.3333	0.3810	0.4762	0.2857	0.2381	0.3810	0.1905	0.2381						
J	0.1905	0.3333	0.3333	0.2381	0.1905	0.2381	0.2381	0.1905	0.3333					
K	0.1905	0.4286	0.4286	0.2381	0.2857	0.2381	0.3333	0.2857	0.3333	0.2857				
L	0.3810	0.3333	0.4286	0.4286	0.2857	0.4286	0.3333	0.2857	0.3333	0.3810	0.4762			
M	0.5238	0.3810	0.4762	0.4762	0.5238	0.4762	0.6667	0.6190	0.5714	0.5238	0.5238	0.3333		
N	0.4286	0.4762	0.4762	0.4762	0.5238	0.4762	0.5714	0.5238	0.5714	0.4286	0.5238	0.4286	0.1905	

參考文獻

1. 林傑, 柯立祥, 洪震國 (1999) 文心蘭栽培管理及採後處理—農業推廣手冊 21。國立屏東科技大學農業推廣委員會編印。
2. 賴文雄 (1998) 利用 AFLP 比對系統分析文心蘭栽培種之遺傳圖譜。國立台灣大學植物研究所碩士論文。
3. Ayres, NM, McClung AM, Larkin PD, Bligh HFJ, Jones CA, Park WD (1997) Microsatellite and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 94:773-781.
4. Bowers J, Boursiquot J, This P, Chu K, Johansson H, Meredith C (1999) Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. *Science* 285:1562-1565.
5. Brown SM, Hopkins MS, Mitchell SE, Senior ML, Wang TY, Duncan RR, Gonzalez-Candelas F, Kresovich S (1996) Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* Moench (L.)]. *Theor. Appl. Genet.* 93:190-198.
6. Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 95:553-567.
7. Dayanandan, S., Rakora, O. P. and Bawa, K. S. (1998) Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theor. Appl. Genet.* 96:950-956.
8. Hahn WJ, Grifo FT (1996) Molecular markers in plant conservation genetics. In: Sobral BWS (ed) The impact of plant molecular genetics. Birkhauser, Boston, pp 113-116.
9. Ho, K.-C., Marschke, F. B., Tan, J.-A., Power, S. G., Wilson, E. M. and French, F. S. (1993) A complex response element in intron 1 of the androgen-regulated 20-KDa protein gene displays cell type-dependent androgen receptor specificity. *J. Biol.*

Chem. 268:27229-27235.

10. Ho, K.-C., Quarmby, V. E., French, F. S. and Wilson, E. M. (1992) Molecular cloning of rat prostate transglutaminase complementary DNA: The major androgen-regulated protein DP1 of rat dorsal prostate and coagulating gland. **J. Biol. Chem.** 267:12660-12667.
11. Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature** 314:67-73.
12. Kumar, A. and Rogstad, S. H. (1998) A hierarchical analysis of minisatellite DNA diversity in Gambel oak (*Quercus gambelii* Nutt.; Fagaceae). **Mol. Ecology** 7:859-869.
13. Li, C. D., Rossnagel, B. G. and Scoles, G. J. (2000) The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 101:1259-1268.
14. Li, C.-D., Rossnagel, B. G. and Scoles, G. J. (2000) Tracing the phylogeny of the Hexaploid Oat *Avena sativa* with satellite DNAs. **Crop Sci.** 40:1755-1763.
15. Liu ZW, Biyashev RM, Saghai Maroof MA (1996) Development of simple sequence repeat markers and their integration into a barley linkage map. **Theor. Appl. Genet.** 93: 869-876.
16. Nakata, M. and Hashimoto, T. (1990) Cytological studies on phanerogams in southern peru chromosomes of orchid species. **Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B,** 16:157-169.
17. Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics Columbia University Press, New York.
18. Nei, M. and Li, W-H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 76:5269-5273.
19. Ohri, D. and Pal, M. (1991) The origin of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Karyotype and nuclear DNA amount. **Heredity** 66:367-372.
20. Rajora, O. P., Rahman, M. H. and Dayanandan, S. (2001) Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species. **Mol. Gen. Genet.** 264:871-882.
21. Ramsay L, Macaulay M, Cardle L, Morgante M, Ivanissevich SD, Maestri E, Powell W, Waugh R (1999) Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. **Plant J.** 17:415-425.
22. Richard, G-F., Henneguain, C., Thierry, A. and Dujon, B. (1999) Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts. **Res. Microbiol.** 150:589-602.
23. Rostiana, O., Niwa, M. and Marubashi, W. (1999) Efficiency of inter-simple sequence repeat PCR for detecting somaclonal variation among leaf-culture-regenerated plants of horseradish. **Breeding Science** 49:245-250.
24. Simth S, Helentjaris T (1996) DNA fingerprinting and plant variety protection. In: Paterson AH (ed) Genome mapping in plants. RG Landes, New York, pp 95-110.
25. Sokal RR, Sneath PHA (1963) Principles of numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
26. Udupa, S. M., Sharma, A., Sharma, R. P., and Pai, R. A. (1993) Narrow genetic variability in *cicer aritinum* L. as revealed by RFLP analysis. **J. Plant Biochem. and Biotech.** 2:83-86.
27. Ven WTG van de, McNicol RJ (1996) Microdatellites as DNA markers in *Sikta spruce*. **Theor. Appl. Genet.** 93: 613-617.
28. Weir, B. S. (1996) Genetic data analysis , 2nd edn. Sinauer Associates, Inc,

Sunderland, Massachusetts.

29. Weir, BS (1996) Genetic data analysis , 2nd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.
30. Weising K, Winter P, Huttel B, Kahl G (1998) Microsatellite markers for molecular breeding. ***J Crop Prod*** 1:113-143.
31. Winberg, B. C., Zhou, Z., Dallas, J. F., McIntype, C. L. and Gustafson, J. P. (1993) Characterization of microsatellite sequences from *Oryza sativa*. ***Genome*** 36:978-983.
32. Xiao J, Li J, Yuan L, McCouch SR, Tanksley SD (1996) Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. ***Theor. Appl. Genet.*** 92:637-643.
- 33.

可供推廣之研發成果資料表

 可申請專利 可技術移轉

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	計畫名稱： 計畫主持人： 計畫編號：學門領域：
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	中文： (100~500 字)
	英文：
可利用之產業 及 可開發之產品	
技術特點	
推廣及運用的價值	

1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。