

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

蝴蝶蘭屬植物的基因組組成與親緣關係的探討(II) 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 95-2313-B-002-074-

執行期間：95年08月01日至96年07月31日

執行單位：國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所

計畫主持人：高燕玉

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：吳凌巧

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 17 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

蝴蝶蘭屬植物的基因組組成與親緣關係的探討(II)

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2313-B-002-074

執行期間： 95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：高燕玉

計畫參與人員：吳凌巧

成果報告類型：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

執行單位：國立台灣大學

中 華 民 國 96 年 10 月 17 日

蝴蝶蘭屬植物的基因組組成與親緣關係的探討(II)

中文摘要

本研究利用基因組原位雜交技術探討基因組相似或不相似之蝴蝶蘭雜交種間之親緣關係。實驗結果，兩親本皆具小基因組的雜交種 *P. aphrodite* × *P. sanderiana* 染色體配對正常，親緣關係較為接近；而兩親本基因組相差甚大的雜交種 *P. amboinensis* × *P. stuartiana*，*P. mannii* × *P. stuartiana* 與 *Doritis pulcherrima* × *P. equestris* 染色體配對不正常，顯示親緣關係較為疏遠，此與其他研究者利用傳統染色法分析的結果相吻合，顯示 GISH 技術是一種探討物種親緣關係很有用的工具。

關鍵詞：蝴蝶蘭、基因組原位雜交、親緣關係

英文摘要

In this study, we investigated phylogenetic relationships of *Phalaenopsis* species by genomic *in situ* hybridization (GISH) of four hybrids derived from crosses between species with similar or dissimilar sizes of genomes. In the hybrid *P. aphrodite* × *P. sanderiana*, in which both parents possess small genomes, normal chromosome pairing was obtained. The result reveals that the two parents of this hybrid are closely related. However, hybrids in which one parent possesses a large and the other parent a small genome, such as *P. amboinensis* × *P. stuartiana*, *P. mannii* × *P. stuartiana* and *Doritis pulcherrima* × *P. equestris*, showed poor chromosome pairing and confirmed distant relationships between the two parental species. The results obtained from GISH are in agreement with those from traditional staining method of other investigators. This study demonstrates that GISH is a useful tool for investigating relationships of plant species.

Keywords: *Phalaenopsis*, genomic *in situ* hybridization, phylogenetic relationships

前言

在傳統基因組的分析(genome analysis)中，觀察第一子代(F₁)雜交種減數分裂時染色體配對的情形是最可靠又常用的方法(Singh, 2003)。由於蝴蝶蘭的生育期甚長(由交配至開花至少需二至三年以上)，且每棵植株產生的花朵數不多，無法在短時間內提供足夠且正確時期的材料做分析，因此有關蝴蝶蘭種間親緣關係的知識，就只有Arends (1970)的報告一篇而已。Arends (1970)觀察八種蝴蝶蘭雜交種減數分裂時染色體配對的情形，發現雜交種中若兩親本均具小型染色體或均具大型染色體者，染色體可正常配對，顯示兩親本間基因組的同源性(genome homology)很高；但若雜交種中一親本具小型染色體而另一親本具大型染色體者，則染色體配對不正常，因此兩親本間基因組的同源性則較低。除了基因組同源性的因素外，過去報導若一物種的染色體有較多的異染色質(heterochromatin)，會影響構造上的同源性，因而降低這些染色體與另一物種本為部分同源染色體(homoeologous chromosomes)的配對能力(Endrizzi and Phillips, 1960)。由於蝴蝶蘭中異染色質的含量與染色體的大小成正比，而一些原生種又同時兼具大、中、小型不同數目的染色體(Kao *et al.*, 2001)，因此是否會對雜交種中兩親本染色體的配對能力造成某種程度的影響，是值得探究的問題。

近年來在分子遺傳學上有一些新的技術陸續被開發出來，其中基因組原位雜交(genomic

in situ hybridization, 簡稱 GISH), 能有效成功地應用在基因組組成與親緣關係之研究 (Anamthawat-Jónsson *et al.*, 1990; Galasso *et al.*, 1997), 以彌補傳統染色法觀察減數分裂染色體配對所遭遇的困難, 因此本計劃利用基因組原位雜交的技術探討數種蝴蝶蘭雜交種減數分裂時染色體配對的情形。

研究方法

依據 Leitch 等人 (1994) 的方法進行基因組原位雜交。將找到肥厚期(diakinesis)或第一中期(metaphase I)的花粉塊, 以 2% cellulase 及 1% macerozyme 處理, 經製片後置-20℃備用。將蝴蝶蘭雜交種其中一親本之總 DNA 用 digoxigenin-11-dUTP 標定做成探針, 而將另一親本之總 DNA 以超音波打成較小長度, 做為覆蓋 DNA (blocking DNA), 與玻片上變性染色體之 DNA 雜交。染色體 DNA 的變性是將載玻片置於 70% formamide, 2× SSC, 70℃處理 2.5 分鐘, 雜交混合液含 50% formamide, 2× SSC, 10% dextran sulphate, 0.1% SDS, 探針, 以及濃度為探針 30 至 50 倍之覆蓋 DNA。雜交隔夜後, 載玻片以 0.1× SSC 及 20% formamide 溶液在 42℃處理 10 分鐘, 經 2× SSC 室溫下清洗 3 次, 每次 5 分鐘, 以 FITC-anti-dig 偵測雜交訊號 (綠色螢光), 並以 PI(propidium iodide)對比染色 (紅色螢光), 置螢光顯微鏡下觀察。

結果與討論

在六種蝴蝶蘭雜交種中, 除了 *Phalaenopsis mannii* × *P. leuddemanniana* 與 *P. mannii* × *P. violacea* 未開花, 未能取得花苞中的花粉塊觀察減數分裂時染色體配對的情形外, 其餘四種蝴蝶蘭雜交種 *P. aphrodite* × *P. sanderiana*, *P. amboinensis* × *P. stuartiana*, *P. mannii* × *P. stuartiana* 與 *Doritis pulcherrima* × *P. equestris* 染色體配對的結果見圖 1。

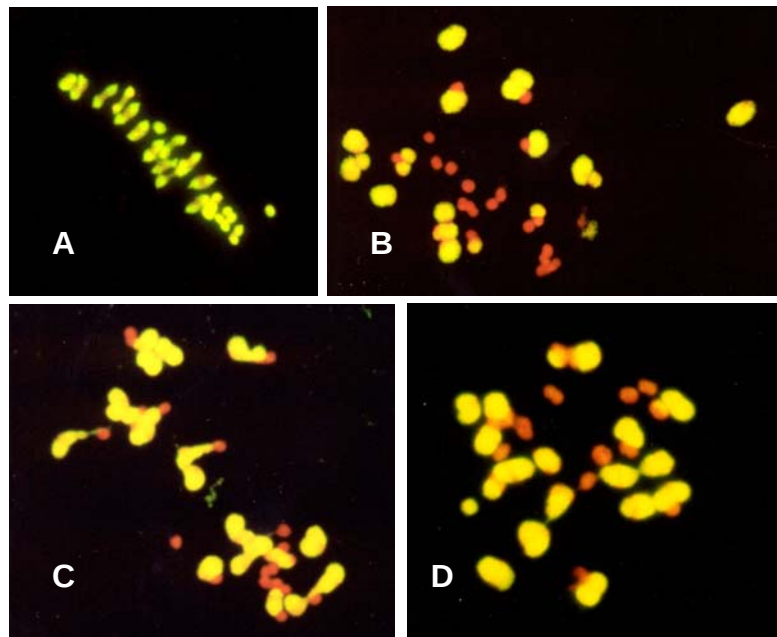


圖 1.利用 GISH 觀察蝴蝶蘭雜交種減數分裂時染色體配對的情形。

(A) *P. aphrodite* × *P. sanderiana*; (B) *P. amboinensis* × *P. stuartiana*;

(C) *P. mannii* × *P. stuartiana*; (D) *Doritis pulcherrima* × *P. equestris*。

P. aphrodite, *P. sanderiana*, *P. stuartiana* 和 *P. equestris* 為具小基因組的蝴蝶蘭, 而 *P.*

amboinensis, *P. mannii* 和 *Doritis pulcherrima* 為具大基因組的蝴蝶蘭(Lin *et al.*, 2001)。圖 1 顯示兩親本同為小基因組的雜交種 *P. aphrodite* × *P. sanderiana* 減數分裂時染色體配對正常(圖 1. A)，但是一親本為大基因組而另一親本為小基因組的雜交種 *P. amboinensis* × *P. stuartiana*, *P. mannii* × *P. stuartiana* 與 *Doritis pulcherrima* × *P. equestris* 減數分裂時染色體配對則不正常(圖 1. B,C,D)，顯示基因組相似的蝴蝶蘭親緣關係較為接近，而基因組大小差異太大的蝴蝶蘭親緣關係較為疏遠。此結果與 Arends (1970)利用傳統染色法觀察八種蝴蝶蘭雜交種減數分裂時染色體配對的情形相吻合，也與過去我們利用 GISH 技術觀察以上四種蝴蝶蘭雜交種有絲分裂(mitosis)的情形相一致(Lin *et al.*, 2005)，顯示 GISH 技術是一種探討物種親緣關係很有用的工具。

參考文獻

1. Ananthawat-Jónsson, K., Schwarzacher, T., Leitch, A. R., and Heslop-Harrison, J. S. (1990). Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet.* 79:721-728.
2. Arends, J. C. (1970). Cytological observations on genome homology in eight interspecific hybrids of *Phalaenopsis*. *Genetica* 41:88-100.
3. Endrizzi, J. E., and Phillips, L. L. (1960). A hybrid between *Gossypium arboreum* L. and *G. raimondii* Ulb. *Can. J. Genet. Cyt.* 2:311-319.
4. Galasso, I., Blanco, A., Katsiotis, A., Pignone, D., and Heslop-Harrison, J. S. (1997). Genomic organization and phylogenetic relationships in the genus *Dasypyrum* analysed by Southern and in situ hybridization of total genomic and cloned DNA probes. *Chromosoma* 106: 53-61.
5. Kao, Y. Y., Chang, S. B., Lin, T. Y., Hsieh, C. H., Chen, Y. H., Chen, W. H., and Chen, C. C. (2001). Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. *Ann. Bot.* 87:387-395.
6. Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D., and Leitch, I. J. (1994). *In situ* hybridization: a practical guide. BIDS Scientific Publishers Limited, Oxford.
7. Lin, C. C., Chen, Y. H., Chen, W. H., Chen, C. C., and Kao, Y. Y. (2005). Genome organization and relationships of *Phalaenopsis* orchids inferred from genomic in situ hybridization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 339-345.
8. Lin, S., Lee, H. C., Chen, W. H., Chen, C. C., Kao, Y. Y., Fu, Y. M., Chen, Y. H., and Lin, T. Y. (2001). Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* species and *Doritis pulcherrima*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:195-199.
9. Singh, R. J. (2003). *Plant cytogenetics*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 277-306.

計畫成果自評

本計畫中尚有兩種蝴蝶蘭雜交種因未開花，未能取得花苞中的花粉塊觀察減數分裂時染色體配對的情形，但其餘四種蝴蝶蘭雜交種之實驗結果，符合過去文獻之報導，顯示 GISH 技術是一種很有用的工具。此結果可提供蝴蝶蘭育種時之參考依據。