

國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所

碩士論文

Institute of Molecular and Cellular Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

蝴蝶蘭 *Phalaenopsis stuartiana* 之  $(GA)_n$  微衛星體

序列的選殖與定位

Cloning and physical mapping of  
 $(GA)_n$  microsatellites in *Phalaenopsis stuartiana*

研究生：劉蓉 Jung Liu

指導教授：高燕玉 Yen-Yu Kao

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

## 目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
壹、 前言	1
貳、 材料方法	
一、 植物材料	8
二、 DNA 的抽取	8
三、 含 (GA) <sub>n</sub> 微衛星體序列選殖體的選殖	10
四、 南方氏雜交	13
五、 (GA) <sub>n</sub> 微衛星體序列的定序與分析	16
六、 螢光原位雜交	16
參、 結果	
一、 含 (GA) <sub>n</sub> 微衛星體序列的選殖	21
二、 含 (GA) <sub>n</sub> 微衛星體序列選殖體之定序分析	24
三、 螢光原位雜交	29
肆、 討論	37
伍、 參考文獻	42
陸、 附錄	48

## 摘要

微衛星體序列是以 1-6 bp 為組成單位的簡單重複性序列，普遍存在於真核生物的基因組中。本實驗利用 (GA)<sub>11</sub> 為引子進行單引子聚合酶連鎖反應，從蝴蝶蘭 *Phalaenopsis stuartiana* 基因組分離出 15 個富含 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列的選殖體，其中 14 個為複合型，序列長度最長為 726 bp，最短為 92 bp；而 GA 重複次數最高達 28 次，TC 重複次數最高達 32 次，序列間的相似度介於 35.98-78.57%，由 TIGR 資料庫比對結果，與許多植物之重複性序列相類似。挑選其中 8 個選殖體，以及朵麗蘭的 DpGA2 選殖體進行螢光原位雜交，結果訊號皆集中於 *P. stuartiana* 所有染色體的中節，且強度大致相同，與選殖體 DpGA2 只位於朵麗蘭一對染色體的中節不相吻合。選殖體 PstGA3 在 *P. violacea* 及朵麗蘭染色體上皆為散佈型，與前人研究 (GA)<sub>11</sub> 位於朵麗蘭中節的結果不符，而 PstGA16 在 *P. amboinensis* 為散佈型，而在 *P. mannii* 則聚集於中節，則與過去研究結果相符。(GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列是否為 *P. stuartiana* 具功能的中節序列，將來可以免疫染色法或免疫沉澱法加以證實。

## Abstract

Microsatellites are tandemly repeated tracts of DNA composed of 1–6 base pair long units and ubiquitous in eukaryotic genomes. In this study, fifteen clones riched in (GA)<sub>n</sub> microsatellites were isolated from *Phalaenopsis stuartiana* by single-primer PCR using (GA)<sub>11</sub> as a primer. All clones were compound except one imperfect repeat sequences. The insert size varied from 28 bp to 726 bp, and the maximum repeat numbers of GA and TC were 28 and 32 in these clones. The sequence identity ranged from 35.98 to 78.57% among them. According to the TIGR database, these sequences showed similarities with repetitive sequences in many plants. Nine clones, eight clones from *P. stuartiana* and DpGA2 from *P. pulcherrima*, were selected for physical mapping by fluorescence in situ hybridization (FISH). The signals were clustered at all centromeres of *P. stuartiana* chromosomes. It was found a quite exceptional distribution of DpGA2 which was clustered at the centromeric regions of only one pair of *P. pulcherrima* chromosomes. In situ hybridization to *P. violacea* and *P. pulcherrima* chromosomes with clone PstGA3 revealed dispersed signals. The result of the former but the latter was consistent with the previous study using synthetic oligonucleotides (GA)<sub>11</sub> as a probe. The signals of the clone PstGA16 were scattered along the chromosomes of *P. amboinensis*, but clustered at the centromeres of *P. mannii*. It was well correlated with the previous study. Whether (GA)<sub>n</sub> microsatellite is the functional centromeric element of *P. stuartiana* remained to resolve by immunostaining or chromatin immunoprecipitation in the future.

# 壹、前言

蝴蝶蘭的花色豐富，花型優美且花期甚長，因此深受一般大眾的喜愛，是台灣重要的經濟花卉作物之一。在分類上，蝴蝶蘭屬於蘭科 (Orchidaceae)、樹蘭亞科 (Epidendroideae)、萬代蘭族 (Vandae)、風蘭亞族 (Aeridinae) 的蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*) (Dressler, 1993)，主要分佈於亞洲熱帶及亞熱帶地區，而台灣是蝴蝶蘭分佈的北界限。1980 年 Sweet 根據花瓣 (petal) 及萼片 (sepal) 的形態特徵，將 43 個原生種和 4 個天然雜交種分屬於 9 個節 (sections)。2001 年 Christenson 又依據花粉塊 (pollinia) 的數目、花型、葉片以及生長的區域，將蝴蝶蘭分成 5 個亞屬 (subgenus) 及 8 個節，共包含 62 個原生種和 1 個天然雜交種。其中 *Phalaenopsis stuartiana* 主要生長於菲律賓群島的民答那峨島 (Mindanao) 海拔 300 公尺之原始森林中，葉片呈橢圓形，上有大理石般的斑紋，翼瓣和上萼片為純白色，側萼瓣呈乳黃色，基部有紅褐色的斑點，唇瓣為白底帶有褐斑。根據 Christenson (2001) 的分類，*P. stuartiana* 屬於 *Phalaenopsis* 亞屬之 *Phalaenopsis* 節，最早是 1881 年由 Heinrich G. Reichenbach 教授所描述，但因為 *P. stuartiana* 和同節的 *P. schilleriana* 葉片形態十分相似，所以原採集者誤認 *P. stuartiana* 為 *P. schilleriana* 之變異種。

*P. stuartiana* 花苞 (bud) 為綠色，花瓣為白色，而 *P. schilleriana* 花苞為紅色，花瓣為粉紅色，所以此兩種植物要等到開花時才比較容易分辨。

根據前人研究，二倍體原生種蝴蝶蘭具 38 條染色體 ( $2n = 2x = 38$ )，體細胞分裂中期長度約為 1.5~3.5  $\mu\text{m}$  (Woodard, 1951; Sagawa, 1962; Sagawa and Shoji, 1968)。Lin 等人 (2001) 利用細胞流測法 (flow cytometry) 測量 18 種蝴蝶蘭和 1 種朵麗蘭 (*Doritis pulcherrima*) 的 DNA 含量，其中 *P. stuartiana* 的基因組 DNA 含量為 3.13 pg/2C，是基因組 (genome) 較小的蝴蝶蘭之一。Kao 等人 (2001) 觀察 9 種蝴蝶蘭及 1 種朵麗蘭的染色體，將蝴蝶蘭的染色體分為大、中、小三型，其中 *P. stuartiana* 的 38 條染色體皆屬於小型染色體。Kao 等人 (2001) 也發現蝴蝶蘭染色體的大小與異染色質 (heterochromatin) 的多寡呈正比，即染色體較大的蝴蝶蘭含有較多的異染色質，而染色體較小的蝴蝶蘭異染色質較少，*P. stuartiana* 之異染色質含量約為 1.77%，而染色體較大之 *P. violacea* 其異染色質含量約為 27.17%，兩者相差近 15 倍。異染色質主要是由重複性序列 (repetitive sequence) 所組成 (Avramova, 2002)，主要分布在染色體的中節 (centromere)、中節兩側區域 (pericentromeric region)、端粒 (telomere) 以及核仁組成區 (nucleolar organizer region) 等。

真核生物的基因組中重複性序列佔有很大的比例。依據重複性序列在基因組的組成及分布，可分成兩大類，第一類是散佈型的重複性序列 (interspersed repetitive sequences)，主要由轉移元素 (mobile elements) 所組成，包含轉移子 (transposons) 及逆轉移子 (retrotransposons)。植物基因組中，重複性序列有 50 % 以上為逆轉移子組成 (Kubis *et al.*, 1998)。另外一類則是頭尾相接的重複性序列 (tandemly repeated sequences)，通常聚集在染色體某些特定的區域，例如中節、中節兩側與端粒等，這一類重複性序列包括衛星體序列 (satellite sequences)、端粒序列 (telomeric repeat) 以及核糖體 DNA。頭尾相接的重複性序列依單元體 (monomer) 的長度可分為三種：(1) 微衛星體序列 (microsatellite)，又稱為簡單重複序列 (simple sequence repeats, 簡稱 SSR)，單體長度為 1-6 bp；(2) 迷你衛星體序列 (minisatellite)，單體長度為 15-60 bp，總長約為 0.5-30 kb；(3) 衛星體序列 (satellite)，單體長度變化大，可達 1 kb 以上，而最常出現的單體長度為 150-180 bp 和 300-360 bp，總長可高達 100 Mb (Plohl *et al.*, 2008)。在哺乳動物的基因組中，長度超過 20 bp 的重複性序列出現頻率為平均每 6 kb 出現一次，而在植物的基因組中，則平均 33 kb 出現一次 (Powell *et al.*, 1996)。

微衛星體序列在許多植物的基因組中以雙核苷酸 (dinucleotide)

為重複單位的比例最高 (Wang *et al.*, 1994)，但是在 EST (expressed sequence tag) 序列中，則是以三核苷酸 (trinucleotide) 的重複單位最為常見，例如在水稻的 EST 微衛星體序列中，三核苷酸微衛星體序列佔了 73%，而雙核酸微衛星體序列只有 13% (Cardle *et al.*, 2000)。雙核苷酸微衛星體序列在人類的基因組中以 (AC) 或 (TG) 最為普遍，其次為 (AG) 或 (TC)，但在植物的基因組中則以 (AT) 佔大多數，而 (AG) 或 (TC) 次之 (Powell *et al.*, 1996)。三核苷酸微衛星體序列以 (AAG) 以及 (AAT) 較常出現在植物的基因組中 (Gupta *et al.*, 1996)。

微衛星體序列的選殖有三種方法：(1) 建構物種小片段插入基因組基因庫 (small-insert genomic DNA library)。首先將基因組 DNA 以限制酶切割後以電泳分析，切取小片段的基因組 DNA，轉殖到適當載體，建構小片段插入基因組基因庫，再以微衛星體序列為探針，進行菌落雜合 (colony hybridization) 或南方氏雜交 (Southern hybridization)，挑選含微衛星體序列的選殖體 (Lee *et al.*, 2004)。(2) 建構豐富性微衛星體序列基因組基因庫 (microsatellite-enriched genomic DNA library)。方法是先將基因組 DNA 以限制酶切割後跑電泳分析，切取小片段的基因組 DNA，以噬菌體作為載體，使 DNA 維持單股環狀，再以特定微衛星體序列為引子進行引子延伸反應



(primer extension reaction)，產生含該特定微衛星體序列的雙股 DNA，即可建構豐富性微衛星體序列基因組基因庫，再以該特定微衛星體序列為探針進行雜合反應來篩選 (Ostrander *et al.*, 1992)。(3) 單引子聚合酶連鎖反應 (single primer PCR)，又稱不對稱聚合酶連鎖反應 (asymmetric PCR) (Adams *et al.*, 2000)。若雙股 DNA 的 3' 端序列皆與特定微衛星體序列呈互補 (complementary)，則以此微衛星體序列作為引子進行單引子聚合酶連鎖反應，將擴增後 DNA 選殖到適當載體，進而篩選含有微衛星體序列的選殖體。

微衛星體序列在基因組分析上有許多應用：(1) 建立遺傳圖譜 (genetic map)。由於微衛星體序列在基因組中含量豐富，具高度多型性 (polymorphism) 且容易被偵測，所以已被廣泛作為分子標記，建立遺傳圖譜 (Maroof *et al.*, 1994)，利用微衛星體序列建立遺傳圖譜的植物包括水稻、小麥 (wheat) 和玉米等 (Röder *et al.*, 1998; Temnykh *et al.*, 2000; Sharopova *et al.*, 2002)。(2) 探討物種間之親緣關係。微衛星體序列演化快速，在不同物種間差異很大，即使是同一物種不同個體間也會有變化，所以可用來研究物種的演化以及物種間的親緣關係。例如黑麥屬 (*Secale*) 的五個物種 *S. silvestre*、*S. strictum africanum*、*S. strictum*、*S. cereale* 及 *S. vavilovii*，以兩種微衛星體序列 (AAC)<sub>5</sub> 及 (AAG)<sub>5</sub> 實質定位的結果，其中 *S. silvestre* 含量最多

且分佈與其他四個物種差異很大，推測其在演化上最早分化，而 *S. cereale* 及 *S. vavilovii* 訊號的分佈情形很類似，因此親緣關係最為接近 (Cuadrado and Jouve, 2002)。(3) 核型 (karyotype) 鑑定。利用不同微衛星體序列在不同染色體的分佈情形，可作為核型鑑定的標誌。例如大麥以十種三核苷酸微衛星體序列的組合，包括 (AAC)<sub>5</sub>、(AAG)<sub>5</sub>、(AAT)<sub>5</sub>、(AGG)<sub>5</sub>、(CAC)<sub>5</sub>、(CAT)<sub>5</sub>、(CAG)<sub>5</sub>、(ACT)<sub>5</sub>、(ACG)<sub>5</sub> 及 (GCC)<sub>5</sub> 作為探針，進行螢光原位雜交 (fluorescence *in situ* hybridization; 簡稱FISH)，依染色體上訊號強度的差異及分佈位置不同，用來區分大麥的七對染色體，藉以鑑定其核型 (Cuadrado and Jouve, 2007a)。

不同微衛星體序列在染色體的分佈依物種不同而異，例如七種微衛星體序列 (GA)<sub>12</sub>、(TA)<sub>10</sub>、(CA)<sub>8</sub>、(CAC)<sub>5</sub>、(GGAT)<sub>4</sub>、(GACA)<sub>4</sub> 及 (GATA)<sub>4</sub> 在甜菜 (sugar beet) 8 對染色體的分佈差異甚大，除了 (GACA)<sub>4</sub> 沒有訊號外，(CA)<sub>8</sub> 及 (CAC)<sub>5</sub> 在所有染色體中節皆呈現訊號，(GATA)<sub>4</sub> 只位於其中六條染色體的中節，而 (GA)<sub>12</sub> 散佈於所有染色體，但中節無訊號，(TA)<sub>10</sub> 與 (GGAT)<sub>4</sub> 除了在某些染色體的臂上聚集，訊號也散佈於所有染色體外上 (Schmidt and Heslop-Harrison 1996); 另外五種微衛星體序列 (A)<sub>16</sub>、(CA)<sub>8</sub>、(TA)<sub>9</sub>、(AAC)<sub>5</sub> 及 (GATA)<sub>4</sub> 定位於鷹豆 (chickpea) 染色體上的結果，其中 (CA)<sub>8</sub> 皆位於

中節，(GATA)<sub>4</sub> 散佈於異染色質只少數聚集於中節，其餘三個微衛星體序列皆散佈於真染色質區 (Gortner *et al.*,1998)。本研究室李 (2000) 將四種微衛星體序列 (AT)<sub>10</sub>、(CA)<sub>11</sub>、(GA)<sub>11</sub> 及 (GAA)<sub>7</sub> 定位於七種蝴蝶蘭與一種朵麗蘭的染色體上，其中除了 (GAA)<sub>7</sub> 訊號非常微弱外，(AT)<sub>10</sub> 及 (CA)<sub>11</sub> 皆散佈於染色體上，而 (GA)<sub>11</sub> 則聚集在 *P. aphrodite*、*P. stuartiana*、*P. equestris*、*P. lueddemanniana*、*P. manii* 以及朵麗蘭 *P. pulcherrima* 的中節，且前兩種蝴蝶蘭的訊號最強，但 (GA)<sub>11</sub> 在 *P. amboinensis* 及 *P. violacea* 卻是散佈型的分佈。彭 (2007) 從朵麗蘭分離兩個富含 (GA)<sub>n</sub> 的微衛星體序列 DpGA1 和 DpGA2，前者在朵麗蘭所有染色體中節皆偵測到訊號，後者卻只分佈在一對染色體的中節，顯示 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列在染色體分佈上呈現差異。本論文從 *P. stuartiana* 分離出 15 個含 (GA)<sub>n</sub> 的微衛星體序列，利用螢光原位雜交定位在染色體上，以了解其在 *P. stuartiana* 及其他蝴蝶蘭染色體的分佈情形。

## 貳、材料與方法

### 一、植物材料

本實驗使用之材料為二倍體原生種蝴蝶蘭 ( $2n = 38$ ) *Phalaenopsis stuartiana*、*Phalaenopsis amboinensis*、*Phalaenopsis mannii*、*Phalaenopsis violacea* 及 朵麗蘭 *Phalaenopsis pulcherrima*，以水苔種植於台灣大學園藝系精密溫室中。

### 二、DNA 的抽取

#### (1) 植物基因組 DNA 的萃取

蝴蝶蘭基因組 DNA 的萃取係參考 Gawel 和 Jarrent (1991) 及 Porebski 等人 (1997) 的方法。取 1.5~2 g 新鮮葉片置於預冷的研鉢中，加入液態氮磨成粉末，倒入離心管，加入 65 °C 之 15 ml CTAB 萃取緩衝液【2% CTAB (N-cetyl-N,N, N-trimethyl-ammonium bromide) ; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 1.4 M NaCl ; 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), pH 8.0 ; 1% PVP (polyvinylpyrrolidone)】，再加入 200  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol，均勻混合後，於 65 °C 搖盪 30~40 分鐘，加入 15 ml chloroform，充分混合，於 4 °C 以 8000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液，以 Miracloth (Calbiochem) 過濾至新的離心管，再加入 15 ml isopropanol，輕緩混合均勻，再於

4 °C 以 8000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，將離心管倒置，待殘留液體流完後，加入 1.5 ml 的 1 M NaCl，置於 65 °C 下搖蕩 30 分鐘，待 DNA 溶解後，將溶液分裝於微量離心管中，加入等體積之 chloroform，充分混合，以 13000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至新的微量離心管，加入 2.5 倍體積預冷 (-20 °C) 的絕對酒精，混合均勻，再以 12000 rpm 離心 10 分鐘沉澱 DNA，以 70 % 酒精清洗 2 次，晾乾後，溶於適量的 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 緩衝液，置 4 °C 冰箱保存。

## (2) 質體 DNA 的萃取

質體 DNA 萃取是以煮沸法 (boiling method) 進行 (Ausubel *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989)。將含有質體的大腸桿菌 (*E. coli*) 單一菌落置於 3 ml LB 培養液 (Luria-Bertani medium 內含 100 µg/ml ampicillin) 中，在 37 °C 下震盪培養。隔夜後，在 4 °C，以 8000 rpm 離心 2 分鐘，倒掉上清液，震盪使菌懸浮，加入 600 µl 的 STET 溶液 (8% sucrose ; 0.5% Triton-X-100 ; 50 mM EDTA , pH 8.0 ; 10 mM Tris-HCl , pH 8.0) 充分混合，將溶液移至微量離心管中，加入 37 µl 的 lysozyme (10 mg/ml 溶於 10 mM Tris-HCl , pH 8.0) ，以沸水煮 45 秒後，以 13000 rpm 離心 5 分鐘，用滅菌過的牙籤挑出管內的細菌殘骸，加入 300 µl 7.5M 的 ammonium acetate，搖勻後，將離心管置

於冰上 20 分鐘，以 13000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液移至新的微量離心管中，加入 600  $\mu$ l 的 isopropanol，於室溫靜置 20 分鐘，以 13000 rpm 離心 5 分鐘沉澱 DNA，倒掉上清液，以 70% 酒精清洗、晾乾，以 20  $\mu$ l 的二次蒸餾水溶解。

### 三、含 $(GA)_n$ 微衛星體序列選殖體的選殖

#### (1) 勝任細胞 (Competent cell) 的製備

勝任細胞的製備採用中央研究院分生所陳枝乾博士提供的方法。將單一菌落的大腸桿菌 XL-1 blue 置於 3 ml LB+Mg<sup>2+</sup> 培養液 (1% NaCl, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 50 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 中，在 37°C 搖盪培養隔夜後，取 120  $\mu$ l 菌液放入 30 ml LB+Mg<sup>2+</sup> 培養液中，於 37°C 繼續培養 3 小時。菌液以 5000 rpm，在 4°C 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 10 ml 轉殖緩衝液【transformation buffer: 100 mM MPOS (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid), 0.5% glucose, 85 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mM NaOH, 15% glycerol, pH 6.5】，震盪使細胞懸浮，再以 5000 rpm，在 4°C 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 3 ml 轉殖緩衝液，震盪使細胞懸浮，置於冰上 1 小時，分裝菌液，直接使用或保存於 -70°C。

#### (2) 選殖體的構築

利用單引子聚合酶連鎖反應，擴增含  $(GA)_n$  重複性序列

(Adams *et al.*, 2000)。以 (GA)<sub>11</sub> 做為引子，*P.stuartiana* 基因組 DNA 做為模版，進行單引子聚合酶連鎖反應。參考 Sambrook 等人 (1989) 的方法稍加修改，製備反應溶液如下表：

反應液	濃度	體積(μl)	最終濃度
Tag polymerase buffer (NEB)	10x	5	1x
dCTP	10 mM	1	0.2mM
dATP	10 mM	1	0.2 mM
dGTP	10 mM	1	0.2 mM
dTTP	10 mM	0.9	0.18 mM
dig-11-dUTP	1 mM	1	0.02 mM
plasmid DNA	100 ng/μl	0.5	1 ng/μl
M13 forward primer(24 mer) (5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3')	1 μg/μl	0.1	2 ng/μl
M13 reverse primer(22 mer) (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3')	1 μg/μl	0.1	2 ng/μl
RNase A	100/μl	0.5	0.1μg/μl
Tag polymerase (Biolab)	5 U/μl	0.5	2.5 units

上述反應液置於 200 μl 的離心管中，加入無菌水使最終體積為 50 μl，振盪混合後，短暫離心，置於 PCR 反應器中反應。PCR 反應程

式設定為:

Step1: 94°C, 2 mins

Step2: 94°C, 30 secs

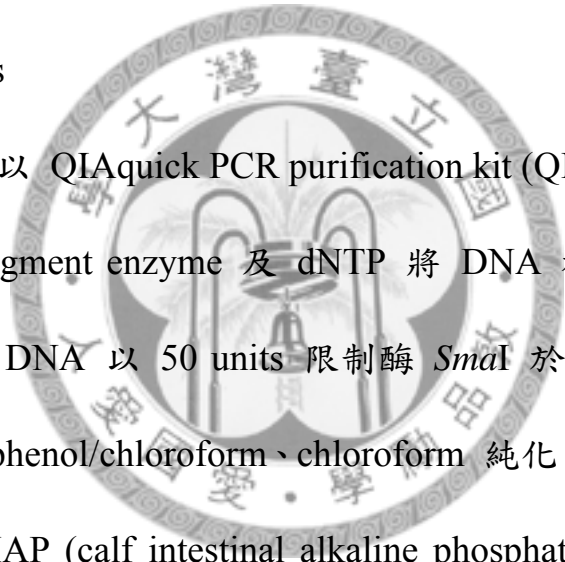
Step3: 53°C, 45 secs

Step4: 72°C, 50 secs

Step5: cycling to step 2, 44 cycles

Step6: 72°C, 10 mins

Step7: 4°C, 24 hrs



將反應後的產物以 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) 純化，並加入 Klenow fragment enzyme 及 dNTP 將 DNA 補齊。同時將 10 µg pUC18 質體 DNA 以 50 units 限制酶 *Sma*I 於 37 °C 處理 3 小時，經 phenol、phenol/chloroform、chloroform 純化，經酒精沈澱後，以 2 U/µl 的 CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase, Promega) 於 37 °C 處理 1 小時，再以 phenol、phenol/chloroform，chloroform 各純化一次，然後以酒精沈澱。將 100 ng 純化後的 DNA 與 100 ng CIAP 處理的 pUC18 DNA 混合，加入 2 unit T4 DNA 連接酵素 (T4 DNA ligase, MBI Fermentas)，使反應體積為 20 µl，於 16 °C 進行接合反應 (ligation) 20 小時建構重組 DNA。在 600 µl 勝任細胞液中加入 20 µl 接合反應混合液，置冰上 30 分鐘，於 42 °C 熱休克 1.5



分鐘，加入 100 ul LB+Mg<sup>2+</sup> 培養液，於 37 °C 培養 30 分鐘，離心倒去部分上清液，將剩餘菌液震盪後，均勻塗於篩選培養基【1.5% agar 的 LB 培養基，含 100 µg/ml ampicillin, 表層塗有 35 µl 的 200 mg/ml IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) 與 20 mg/ml X-gal (5-bromo -4 -chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 的混合液】，於 37 °C 培養 16-18 小時。挑選白色菌落至新的篩選培養基中培養，再次確認接合成功之菌落，並編號後保存。

#### 四、南方氏雜交 (Southern hybridization)

##### (1) 膠體電泳與轉印

係參考 Westneat 等人 (1988) 和 Kreike 等人 (1990) 的方法。取 5 µg DNA，以 *EcoRI* 及 *BamHI* 限制酵素於 37 °C 進行切割，以 1.2% 的瓊脂糖膠體 (agarose) 進行電泳，以 1× TAE (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8.0) 電泳緩衝液，20 伏特電壓泳動 16 小時。將膠體浸於 0.25 N HCl 搖盪 15 分鐘，以一次蒸餾水洗 2 分鐘，再以變性溶液 (deaturation solution) (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 搖盪兩次，每次 15 分鐘。然後以一次蒸餾水洗 2 分鐘，以轉移溶液 (transfer solution) (1 M ammonium acetate, 20 mM NaOH) 搖盪兩次，每次 10 分鐘。將轉印用的尼龍膜 (GeneScreen<sup>TM</sup> Hybridization Transfer Membrane, PerkinElmer) 裁切與膠體同樣大小，置於轉移溶

液浸泡。另準備一裝有適量轉移溶液的容器，於容器上架一玻璃片，再以一長條的 Whatman 3MM 濾紙橫跨玻璃片，兩端浸於轉移溶液內。將處理過的膠體置於濾紙上，鋪上尼龍膜，四周以保鮮膜封住，再依序鋪上兩層浸濕的濾紙、適量的衛生紙、一片玻璃和重約 0.5-1 公斤的書本，置於室溫，每隔一段時間更換衛生紙，經 16-20 小時後，取出尼龍膜，以 UV crosslinker (Stratagene) 0.12 焦耳處理，使 DNA 固定在膜上。尼龍膜烘乾後置於雜交袋內，可保存於 4 °C 或直接進行雜交反應。

## (2) 基因組 DNA 探針的標定

採用 DIG-nick translation (Roche) 的方法，以非放射性 digoxigenin-11-dUTP (Roche) 標定蝴蝶蘭的基因組 DNA。先用限制酵素 *Sau3AI* 將蝴蝶蘭基因組 DNA 切成 100-10000 bp 的片段，以 Gel Advanced™ Gel Extraction System (VIOGENE) 純化後，取 1 µg DNA 作為模板 (template)，加二次蒸餾水至 16 µl，加入 4 µl DIG-Nick translation mixture (Roche)，於 15 °C 反應 90 分鐘。加 1 µl 的 0.5 M EDTA 於 65 °C 10 分鐘終止反應。再加 2.5 µl 的 4 M LiCl 及 75 µl 預冷 (-20 °C) 的絕對酒精，混合均勻，置於 -70 °C 至少 1 小時。以 13000 rpm，在 4 °C 離心 15 分鐘沉澱 DNA，倒掉上清液，以 70% 酒精清洗一次，於 4 °C 以 13000 rpm 離心 5 分

鐘，晾乾後，溶於 10  $\mu$ l TE 溶液。

### (3) 雜交反應

參考 Roche 公司所提供之 DIG 螢光反應法，並加以修改。加入 15 ml 的預雜交溶液 (prehybridization solution) 【5 $\times$  SSPE, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 0.5% blocking reagent (Roche)】於放置尼龍膜的雜交袋中，趕出袋內氣泡並封口，置於 65  $^{\circ}$ C 烘箱中搖晃 3-5 小時。雜交前，將 100 ng 以 DIG 標定的探針及 20 ng DIG 標定的  $\lambda$ DNA-*Hind*III marker 探針置於微量離心管中，加入 50  $\mu$ l 的無菌水，以 100  $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘後，立即冰浴 5 分鐘。雜交時，將原本雜交袋內的預雜交溶液倒掉，加入 4 ml 新的預雜交溶液及變性的探針，混合均勻後，趕出氣泡並封口，置於 65  $^{\circ}$ C 烘箱中搖晃隔夜進行雜交反應。

### (4) 訊號偵測

雜交反應經過 16 小時後，取出尼龍膜以 250 ml 清洗溶液 (0.2 $\times$ SSPE, 0.1% SDS) 於 65  $^{\circ}$ C 洗兩次，每次 15 分鐘；再以 100 ml 清洗緩衝液 (washing buffer) 【0.3% Tween20+ buffer1 (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5)】洗 5 分鐘。將尼龍膜放入無菌袋中，加入 10 ml buffer 2 (buffer 1+ 0.5% blocking reagent)，趕走氣泡並封口，在室溫下搖盪 30 分鐘。倒掉 buffer 2，加入 10 ml 新鮮配製的

抗體溶液 (以 buffer 2 稀釋 7500 倍之 anti-DIG-AP conjugate), 趕出氣泡並封口, 混合均勻後, 在室溫搖盪 30 分鐘。取出尼龍膜, 以清洗緩衝液洗兩次, 每次 15 分鐘。再以 100 ml buffer 3 (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5 ; 0.1 M NaCl ; 0.05 M MgCl<sub>2</sub>) 浸潤 7 分鐘。將尼龍膜放入無菌袋中, 加入 0.8 ml 以 buffer 3 稀釋成 0.25 mM 的 CSPD 【 disodium 3-(4-methoxyspiro<1,2-dioxetane-3,2'-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1] decan> -4-yl) (Roche)】 溶液, 混合均勻, 趕出氣泡並密封袋口, 於 37 °C 反應 10 分鐘, 置於壓片匣中, 以 X 光底片 (Biomax ML, Kodak) 曝光 30 分鐘。將 X 光底片置於顯影液 (Kodak) 中顯影 1 分鐘, 於清水中清洗 1 分鐘, 最後置於定影液中 5 分鐘, 再以清水沖洗半小時。

##### 五、(GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列的定序與分析

將篩選出含 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列之選殖體以 dideoxy chain termination 的方法, 進行自動定序 (ABI PRISM 377-96 DNA sequencer, Perkin-Elmer)。所讀出的 DNA 序列, 利用國家衛生研究院提供的 EMBOSS (The European Molecular Biology Open Software Suite) 軟體分析, 並與 TIGR (Ouyang and Buell, 2004) 的資料庫進行比對。

##### 六、螢光原位雜交

## (1) 染色體的製備

以 70% 酒精消毒的刀片將蝴蝶蘭根尖取下，縱剖成兩半，置於裝有 2 mM 8-hydroxyquinoline 溶液的錐形瓶中，於 19 °C 震盪 8 小時，再以冰醋酸：酒精 (1:3) 溶液固定到隔天，換以 70% 酒精保存於 -20 °C。染色體的製備係參考 Andras 等人 (1999) 的方法。將儲存於 70% 酒精中的根尖泡於水中 10 分鐘，洗去酒精，再置於酵素緩衝液 (4 mM citric acid, 6 mM sodium citrate, pH4.8) 10 分鐘，將根尖前端含分生組織的部分切下，浸泡於酵素溶液中【含 2% (W/V) cellulose Onozuka R10 (Yakult Honsha), 1%(W/V) macerozyme Onozuka R10 (Yakult Honsha) 之酵素緩衝液】，在 37 °C 處理 1 至 1.5 小時。加無菌水 40  $\mu$ l，浸泡約 10 分鐘，減緩酵素作用。將水與除去細胞壁的根尖細胞混勻後，吸至新的微量離心管中，以 800 rpm 離心 5 分鐘，小心吸去部份上清液，再離心一次後，儘量將上清液移去，約留下 10  $\mu$ l 的水使根尖細胞懸浮。緩慢加入 40  $\mu$ l 固定液 (冰醋酸：99% 酒精 = 1：3)，並將細胞彈勻。吸取 8  $\mu$ l 的細胞懸浮液，於 10-15 公分的高度滴至 vectabond (Vector laboratories) 處理過的載玻片上，晾乾後在顯微鏡下觀察。挑選分裂細胞較多且染色體形態良好的玻片，置於電子乾燥箱中隔夜後，可直接進行雜交實驗或保存於 -20 °C 中待用。

## (2) 含 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列的標定

依長度大小採用不同的標定方法: 除了 PstGA20 長度大於 500 bp, 以 DIG-nick translation (Roche) 方法標定, 如前所述; PstGA3、PstGA9、PstGA16、PstG22、PstGA24、PstGA25、PstGA30 及 DpGA2 則以聚合酶連鎖反應標定。

## (3) 雜交反應

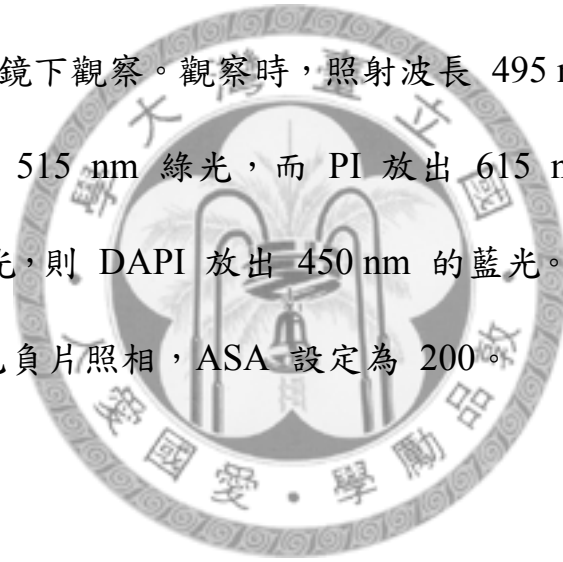
主要參考 Heslop-Harrison 等人 (1991) 的方法。在製備有染色體的載玻片上滴 200  $\mu$ l RNase A 溶液 (100  $\mu$ g/ml RNase A 溶於 2 $\times$  SSC), 蓋上消毒過的塑膠片, 置於潮濕容器中, 在 37 $^{\circ}$ C 處理 1 小時, 以 2 $\times$  SSC 溶液清洗 3 次, 每次 5 分鐘。然後以新鮮配製之 4% paraformaldehyde 溶液處理 10 分鐘, 以 2 $\times$  SSC 清洗 3 次, 每次 5 分鐘。再分別以 50%、70%、95% 酒精脫水各 3 分鐘, 置於電子乾燥箱中備用。將染色體玻片置於 65 $^{\circ}$ C 烘箱預熱 5 分鐘, 再放入 70% formamide 的 2 $\times$  SSC 溶液, 於 70 $^{\circ}$ C 下處理 2 分鐘, 使染色體變性。立刻將載玻片製於預冷 (-20 $^{\circ}$ C) 的 70%、95%、100% 酒精中, 脫水各 2 分鐘, 待其自然乾燥。將雜交混合液 (50% formamide, 10% dextran sulphate, 2 $\times$  SSC, 2-5 ng/ $\mu$ l 標識探針, 0.1% SDS) 以 80 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘, 冰浴 5 分鐘。然後每一載玻片滴上 20  $\mu$ l 雜交混合液, 蓋上蓋玻片 (22 $\times$ 22 mm), 以相片膠封滿四周, 載玻片置於 37 $^{\circ}$ C

培養箱中隔夜進行雜交。

#### (4) 訊號偵測

隔夜後，去除相片膠，將載玻片放入  $2\times$  SSC 中搖動，讓蓋玻片自然滑下。再將載玻片放入  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  的清洗液 ( $20\%$  formamide,  $0.2\times$  SSC) 中，處理 10 分鐘，接著以  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  的  $2\times$  SSC 溶液，清洗 5 分鐘。再置入室溫的  $2\times$  SSC 中，清洗 3 次，每次 5 分鐘。將載玻片浸泡於  $4\times$  SSC,  $0.2\%$  Tween20 溶液中 5 分鐘。在載玻片上加  $200\text{ }\mu\text{l}$  BSA 溶液【 $4\times$  SSC,  $0.2\%$  Tween20,  $5\%$  BSA (bovineserum albumin) (sigma)】，蓋上塑膠片，置於潮濕容器中，10 分鐘後，除去塑膠片，滴加  $50\text{ }\mu\text{l}$  anti-digoxigenin- fluorescein 溶液【 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  anti-digoxigenin-fluorescein (Roche),  $4\times$  SSC,  $5\%$  BSA,  $0.2\%$  Tween20】，蓋上塑膠片，置於潮濕容器中，在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  處理 1 小時。除去塑膠片，將載玻片放入  $4\times$  SSC,  $0.2\%$  Tween20 溶液中，清洗 3 次，每次 8 分鐘。取出載玻片，滴上  $200\text{ }\mu\text{l}$  兔子血清溶液 ( $5\%$  兔子血清溶於  $4\times$  SSC,  $0.2\%$  Tween20) ，蓋上塑膠片，在潮濕容器中處理 10 分鐘。除去塑膠片，滴上  $50\text{ }\mu\text{l}$  fluorescein-conjugated anti-sheep IgG 溶液【 $25\text{ }\mu\text{g/ml}$  anti-sheep IgG (Vector Laboratories),  $4\times$  SSC,  $5\%$  兔子血清,  $0.2\%$  Tween20】，蓋上塑膠片，置於潮濕容器中於  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  處理 1 小時。除去塑膠片，將載玻片放入  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  的  $4\times$

SSC, 0.2% Tween20 溶液中, 清洗 3 次, 每次 8 分鐘。以 PBS 緩衝液 (68 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 平衡 5 分鐘後, 以 PI (propidium iodide) 及 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1 µg/ml PI 及 0.1 µg/ml DAPI 溶於 PBS 緩衝液), 對比染色 10 分鐘, 再將載玻片浸於 PBS 緩衝液中 30 秒後取出晾乾, 滴上 12 µl 抗螢光衰退的 mounting medium (Vector Laboratories), 蓋上 22×22 mm 蓋玻片後, 置於 Olympus AX70 螢光顯微鏡下觀察。觀察時, 照射波長 495 nm 的激發光, 則 fluorescein 放出 515 nm 綠光, 而 PI 放出 615 nm 的紅光; 照射 355 nm 的激發光, 則 DAPI 放出 450 nm 的藍光。結果以 Fuji color Superia 200 彩色負片照相, ASA 設定為 200。





## 參、結果

### 一、含 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列的選殖

以 *P. stuartiana* 基因組 DNA 為模版，利用 (GA)<sub>11</sub> 為引子進行單引子聚合酶連鎖反應，將擴增的 DNA 選殖到 pUC18 質體中，共獲得 56 個白色菌落，隨機挑選 32 個菌落抽取質體 DNA，以限制酵素 *Bam*HI 和 *Eco*RI 進行切割，電泳分析檢測，其中 26 個選殖體含插入 (insert) DNA (圖1A)。將 *P. stuartiana* 基因組 DNA 以 dig-11-dUTP 標定作為探針，進行南方氏雜交，共有 17 個選殖體顯示雜交訊號 (圖1B)。依南方氏雜交訊號強度的差異與片段長度之不同，挑選 15 個選殖體，分別命名為 PstGA1、PstGA2、PstGA3、PstGA4、PstGA5、PstGA9、PstGA13、PstGA16、PstGA20、PstGA22、PstGA24、PstGA25、PstGA29、PstGA30 和 PstGA31，抽取質體 DNA 再進行第二次南方氏雜交，其中 PstGA3、PstGA5、PstGA20 及 PstGA29 四個選殖體訊號最強，PstGA4 和 PstGA9 訊號中等，其餘九個選殖體訊號較弱 (圖2)。

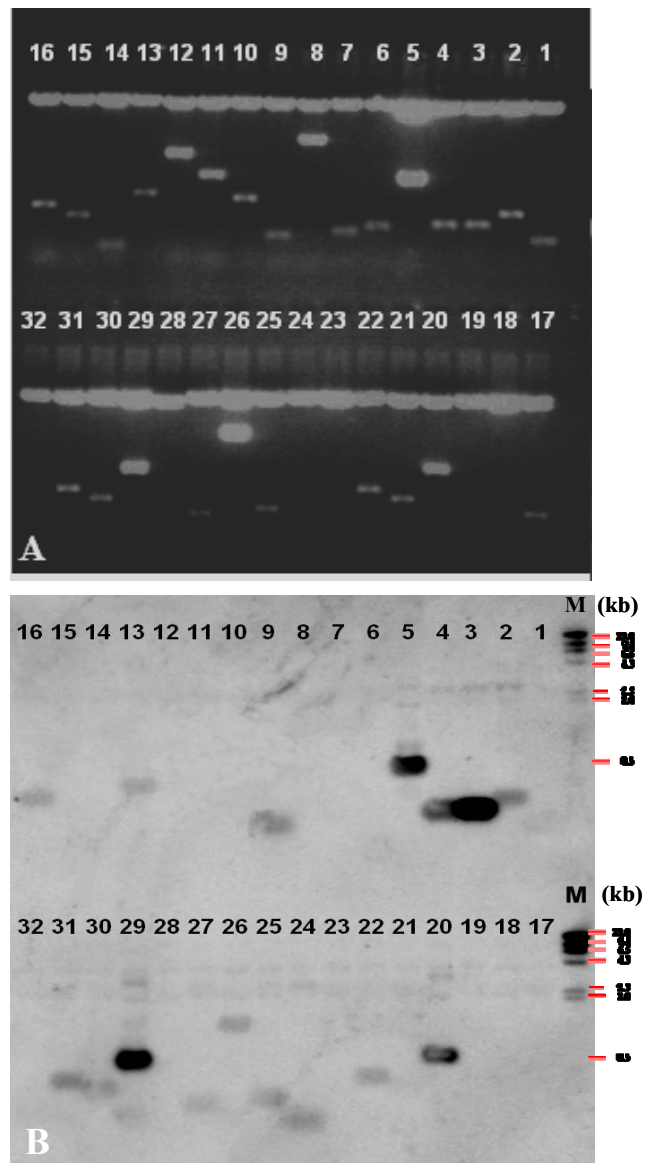


圖 1. 蝴蝶蘭 *P. stuartiana* 32 個含  $(GA)_n$  微衛星體序列之選殖體進行南方氏雜交結果。(A) 選殖體以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 限制酵素切割，進行膠體電泳後以 EtBr 染色的結果；(B) 將 A 圖 DNA 轉印後與 *P. stuartiana* 基因組 DNA 為探針進行南方氏雜交偵測的結果, M 為  $\lambda$ /*Hind*III 標誌。

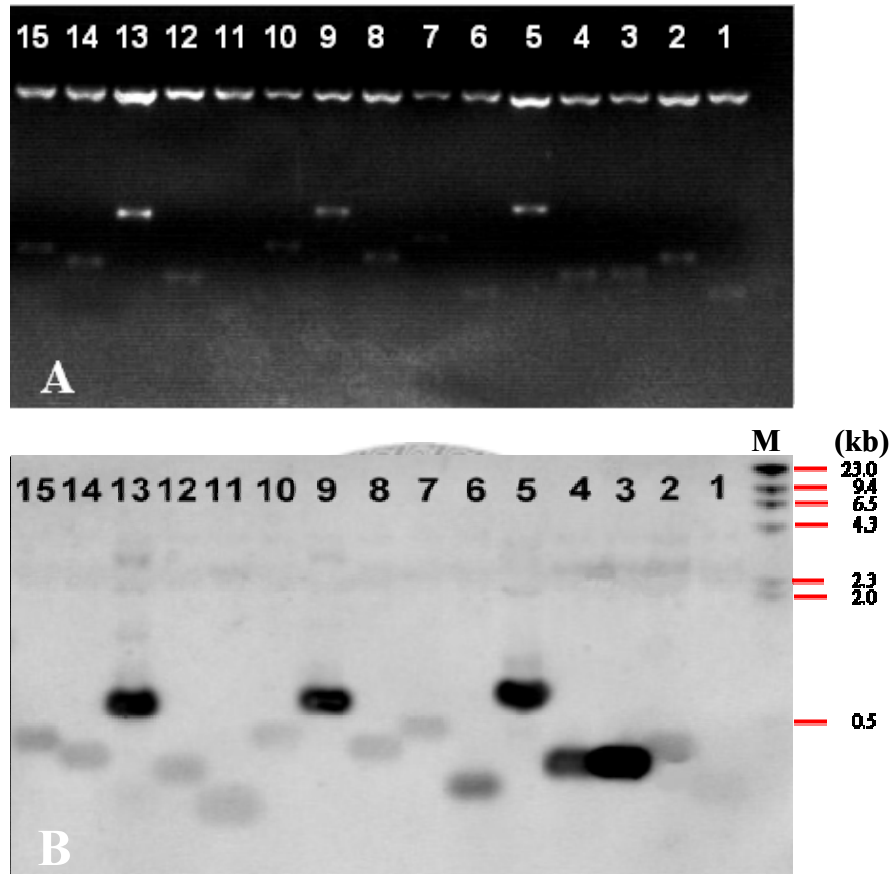


圖 2. 蝴蝶蘭 *P. stuartiana* 15 個經定序之含  $(GA)_n$  微衛星體序列選殖體進行南方氏雜交結果。(A) 選殖體以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 限制酵素切割，進行膠體電泳後以 EtBr 染色的結果；(B) 將 A 圖 DNA 轉印後與 *P. stuartiana* 基因組 DNA 為探針進行南方氏雜交偵測的結果，M 為  $\lambda$ /*Hind*III 標誌。編號 1-15 分別為 PstGA1、PstGA2、PstGA3、PstGA4、PstGA5、PstGA9、PstGA13、PstGA16、PstGA20、PstGA22、PstGA24、PstGA25、PstGA29、PstGA30 和 PstGA31。

## 二、含 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列選殖體之定序分析

15 個選殖體經定序後均為富含 (GA)<sub>n</sub> 之微衛星體序列 (附錄 1)，其中 PstGA29 選殖體含有一個 15 bp 迴紋序列 (palindrome sequence)。PstGA3、PstGA4、PstGA13、PstGA16、PstGA20、PstGA25、PstGA29、PstGA30 及 PstGA31 選殖體含有顛倒重複性序列 (inverted repeats) (表1)。其中 PstGA4 選殖體 GA 重複次數最多達 28 次，而 PstGA29 選殖體 TC 重複次數高達 32 次。PstGA5 選殖體的序列長度最長為 762 bp，而 PstGA24 選殖體的序列長度最短為 92 bp。將此 15 個微衛星體序列與 TIGR 資料庫序列比對結果，除了 PstGA4、PstGA24 和 PstGA31 三個選殖體沒有比對到與其他物種相似的序列外，其餘選殖體與玉米轉移子與逆轉移子，硬粒小麥的逆轉移子，番茄的微衛星體序列，水稻的 *adh1-adh2* 區域及中節序列相類似 (表2)。選殖體序列間相似度以 PstGA25 與 PstGA30 最高為 78.57%，而 PstGA2 與 PstGA9 的相似度最低為 35.98% (表3)。

表 1. 蝴蝶蘭 *P. stuartiana* 之 15 個含 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列選殖體的 GA 含量與重複情形。

選殖體	GA含量 (%)	顛倒重複性序列相似度 (%)	重複類型	重複次數	重複單位
PstGA1	82	no	Compound	40	(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>5</sub> ..(TG) <sub>4</sub> ..(GA) <sub>8</sub> ..(GA) <sub>2</sub>
PstGA2	87	no	Compound	60	(GA) <sub>3</sub> tt(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>5</sub> gt(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>5</sub> at(GA) <sub>4</sub> ..(GA) <sub>2</sub> t(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GGA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> tt(GA) <sub>4</sub>
PstGA3	47	81%	Compound	59	(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> t(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> taa(GA) <sub>2</sub> aa(GA) <sub>2</sub> ..(ATC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>4</sub> ..(TC) <sub>3</sub> cc(CTT) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> tt(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> aca(CTTG) <sub>2</sub> c(TCTT) <sub>2</sub>
PstGA4	46	82%	Compound	85	(GA) <sub>2</sub> g..(GT) <sub>4</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> gtg(AT) <sub>3</sub> aa(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>6</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ta(TCCC) <sub>2</sub> ..(CTC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>3</sub> tg(TC) <sub>3</sub>
PstGA5	49	no	Compound	160	(GA) <sub>7</sub> ..(GA) <sub>3</sub> aa(GA) <sub>4</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>4</sub> ..(TC) <sub>2</sub> (CCT) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> act(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> t(TC) <sub>11</sub> (GA) <sub>25</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(AAG) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>2</sub> aa(GA) <sub>3</sub> ..(GAGG) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>4</sub> ..(AAT) <sub>2</sub> (GA) <sub>5</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ta(TC) <sub>3</sub> ..(AAT) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>4</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>4</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(TC) <sub>3</sub>
PstGA9	38	no	Compound	58	(GA) <sub>4</sub> ta(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>4</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ag(GA) <sub>4</sub> ata(GA) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> tt(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> ..(CCT) <sub>2</sub> at(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> 5
PstGA13	63	76%	Compound	100	(GA) <sub>3</sub> ..(CAA) <sub>2</sub> taa(GA) <sub>4</sub> at(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GAA) <sub>2</sub> a(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>5</sub> ..(GA) <sub>2</sub> aga(GGA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> aa(GA) <sub>3</sub> gt(GA) <sub>2</sub> ..(TG) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>4</sub> (GGGA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GAAA) <sub>2</sub> gt(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> a(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>3</sub> ..(GA) <sub>4</sub> a(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(CTTT) <sub>2</sub> tgc(TCTA) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub>
PstGA16	68	80%	Compound	66	(GA) <sub>3</sub> a(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(AGG) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>5</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> a(GA) <sub>2</sub> ..(GAAA) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(ATGG) <sub>2</sub> gga(AAG) <sub>2</sub> att(GAAC) <sub>2</sub> ..(GA) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>4</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>3</sub> tt(TC) <sub>2</sub> ..(TC) <sub>4</sub> ..(TC) <sub>2</sub> ta(TC) <sub>7</sub>

(續)

選殖體	GA含量 (%)	顛倒重複性序列相似度 (%)	重複類型	重複次數	重複單位
PstGA20	74	100%	Compound	141	(GA) <sub>8</sub> ·(AATA) <sub>3</sub> (GA) <sub>2</sub> ·(AGGAG) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>5</sub> ·(GAGG) <sub>6</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GAGG) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>6</sub> g(CA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>5</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GGA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>4</sub> aa(GA) <sub>2</sub> aa(GA) <sub>2</sub> aa(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>7</sub> ·(GA) <sub>6</sub> ·(ATA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ta(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ta(TC) <sub>4</sub> ta(TC) <sub>2</sub> g(TC) <sub>2</sub> ga(TC) <sub>6</sub> ·(TC) <sub>7</sub>
PstGA22	50	no	Compound	70	(GA) <sub>6</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(AGGG) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>4</sub> ·(GA) <sub>4</sub> ·(GA) <sub>5</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GATA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ctt(CA) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ta(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>6</sub>
PstGA24	92	no	Compound	34	(GA) <sub>18</sub> ·(GA) <sub>3</sub> aa(GA) <sub>4</sub> gg(GA) <sub>2</sub> ct(AAG) <sub>2</sub> (GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub>
PstGA25	45	82%	Compound	57	(AGAA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> (GCAA) <sub>2</sub> ca(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(AGA) <sub>2</sub> ·(TTC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> t(TC) <sub>2</sub> ac(TCTT) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>4</sub> ·(TC) <sub>10</sub>
PstGA29	57	73%	Compound	159	(GA) <sub>8</sub> t(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>4</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GAGT) <sub>2</sub> gg(GA) <sub>2</sub> (AGA) <sub>2</sub> aa(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> a(GAGG) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> gg(GA) <sub>5</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>4</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GGA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> a(GA) <sub>2</sub> cg(ATGA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> gg(GA) <sub>4</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(AGA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ta(CCCT) <sub>2</sub> t(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>2</sub> c(TC) <sub>4</sub> ·(CCCT) <sub>2</sub> acc(TC) <sub>2</sub> cc(TC) <sub>5</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>2</sub> gc(TCTT) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>3</sub> c(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>3</sub> at(TC) <sub>3</sub> ·(TTG) <sub>2</sub> c(TC) <sub>3</sub> 2
PstGA30	56	80%	Compound	54	(GA) <sub>2</sub> tt(GA) <sub>3</sub> ·(AAG) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>4</sub> ·(GA) <sub>2</sub> (GCAA) <sub>2</sub> ca(GA) <sub>3</sub> ta(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>2</sub> (GCAA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>3</sub> c(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>10</sub>
PstGA31	53	81%	Imperfect	81	(GA) <sub>6</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>4</sub> aa(GA) <sub>2</sub> aa(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>6</sub> ·(GA) <sub>5</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>2</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(GA) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>4</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>5</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ·(TC) <sub>3</sub> ac(TC) <sub>2</sub> ·(TC) <sub>6</sub>

表2. 蝴蝶蘭 *P. stuartiana* 15 個選殖體之 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列的長度及 TIGR 資料庫序列比對的結果。

選殖體	片段長度 (bp)	與其他物種比對到的序列 *	資料庫登入號	序列相似度 (bp%)	E value
1 PstGA1	180	<i>Zea retrotransposon</i>	ZRSITERTO00222	29/38 (76%)	3.7
2 PstGA2	369	<i>Triticum turgidum</i> subsp. durum isolate TD2 Sukkula retrotransposon, partial sequence	TRSITERT00200018	44/57 (77%)	0.26
3 PstGA3	289	<i>Oryza sativa</i> adh1-adh2 region	ORSITETN00200004	45/60 (75%)	0.092
4 PstGA4	287	No significant similarity found			
5 PstGA5	726	<i>Zea retrotransposon</i>	ZRSITERTO00309	41/66 (62%)	3.9
6 PstGA9	189	Tomato dispersed repeat CRI associated with Cab-1 gene	FRSITOT00000014	45/63 (71%)	0.04
7 PstGA13	493	<i>L. esculentum</i> microsatellite repeat DNA region	FRSITOT00000012	97/144 (67%)	6.30E-06
8 PstGA16	377	<i>Zea</i> CACTA element	ZRSITERTO00250	118/185 (63%)	8.50E-06
9 PstGA20	686	<i>Zea retrotransposon</i>	ZRSITERTO00234	55/80 (68%)	0.11
10 PstGA22	432	<i>L. esculentum</i> microsatellite repeat DNA region	FRSITOT00000012	145/229 (63%)	1.30E-07
11 PstGA24	92	No significant similarity found			
12 PstGA25	252	<i>L. esculentum</i> microsatellite repeat DNA region	FRSITOT00000012	82/121 (67%)	2.30E-06
13 PstGA29	645	<i>Zea retrotransposon</i>	ZRSITERTO00156	45/57 (78%)	0.0083
14 PstGA30	319	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group DNA centromere sequence pH3.5, genomic survey sequence	ORSICMCM00200004	45/63 (71%)	0.051
15 PstGA31	404	No significant similarity found			

\*只列出相似度分數(score)最高者

表3. 蝴蝶蘭 *P. stuartiana* 15 個選殖體之 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列選相似度的比較。

	PstGA1	PstGA2	PstGA3	PstGA4	PstGA5	PstGA9	PstGA13	PstGA16	PstGA20	PstGA22	PstGA24	PstGA25	PstGA29	PstGA30	PstGA31
PstGA1	100	56.6667	48.3333	49.4444	58.3333	36.6667	62.7778	55	60	57.2222	69.5652	43.8889	56.1111	50.5556	57.2222
PstGA2	56.6667	100	38.0623	38.676	49.0515	<u>35.9788</u>	51.4905	58.2656	53.6585	43.3604	65.2174	36.1111	56.9106	41.3793	41.7344
PstGA3	48.3333	38.0623	100	57.4913	53.2872	57.1429	50.519	46.7128	49.1349	52.5952	67.3913	55.1587	52.9412	50.173	52.2491
PstGA4	49.4444	38.676	57.4913	100	59.5819	56.6138	55.7491	49.8258	51.5679	55.0523	72.8261	55.5556	58.5366	49.1289	56.446
PstGA5	58.3333	49.0515	53.2872	59.5819	100	56.6138	45.0304	46.4191	41.3994	53.7037	69.5652	55.1587	42.1705	54.232	52.9703
PstGA9	36.6667	<u>35.9788</u>	57.1429	56.6138	56.6138	100	55.5556	56.6138	55.5556	53.9683	57.6087	54.4974	51.3228	58.7302	60.8466
PstGA13	62.7778	51.4905	50.519	55.7491	45.0304	55.5556	100	53.3156	48.6815	49.7685	69.5652	52.381	50.9128	56.7398	54.2079
PstGA16	55	58.2656	46.7128	49.8258	46.4191	56.6138	53.3156	100	52.2546	46.4191	61.9565	46.8254	45.3581	47.6489	48.0106
PstGA20	60	53.6585	49.1349	51.5679	41.3994	55.5556	48.6815	52.2546	100	43.287	70.6522	55.5556	41.5504	53.2915	58.6634
PstGA22	57.2222	43.3604	52.5952	55.0523	53.7037	53.9683	49.7685	46.4191	43.287	100	65.2174	50	51.3889	52.0376	53.2178
PstGA24	69.5652	65.2174	67.3913	72.8261	69.5652	57.6087	69.5652	61.9565	70.6522	65.2174	100	63.0435	65.2174	63.0435	68.4783
PstGA25	43.8889	36.1111	55.1587	55.5556	55.1587	54.4974	52.381	46.8254	55.5556	50	63.0435	100	54.3651	<u>78.5714</u>	54.3651
PstGA29	56.1111	56.9106	52.9412	58.5366	42.1705	51.3228	50.9128	45.3581	41.5504	51.3889	65.2174	54.3651	100	52.6646	46.0396
PstGA30	50.5556	41.3793	50.173	49.1289	54.232	58.7302	56.7398	47.6489	53.2915	52.0376	63.0435	<u>78.5714</u>	52.6646	100	51.4107
PstGA31	57.2222	41.7344	52.2491	56.446	52.9703	60.8466	54.2079	48.0106	58.6634	53.2178	68.4783	54.3651	46.0396	51.4107	100

\*數據為百分比

\*藍色底線為最高相似度,紅色底線為最低相似度



### 三、螢光原位雜交

從 15 個選殖體中挑選經南方氏雜交後訊號較強的二個選殖體 PstGA3 及 PstGA20，訊號中等的一個選殖體 PstGA9，以及訊號較弱的五個選殖體 PstGA16、PstGA22、PstGA24、PstGA25 及 PstGA30 (圖 2)，與 *P. stuartiana* 有絲分裂中期的染色體進行螢光原位雜交，結果顯示 8 個選殖體的訊號皆位於 *P. stuartiana* 所有染色體的中節處，除少數幾條染色體的訊號稍強外，其餘強度大致相同 (圖 3-6)。

PstGA3 與 *P. violacea* 及朵麗蘭有絲分裂中期染色體進行螢光原位雜交的結果，訊號散佈於所有染色體上 (圖 7)。將 PstGA16 實質定位於 *P. amboinensis* 與 *P. manni* 之染色體，結果前者所有染色體均呈現訊號但非常微弱，而後者訊號則聚集於染色體的中節處 (圖 8)。

彭 (2007) 曾由朵麗蘭選殖出二個富含 (GA)<sub>n</sub> 的微衛星體序列 DpGA1 與 DpGA2，其中 DpGA1 位於朵麗蘭所有染色體的中節處，而 DpGA2 只在一對染色體的中節呈現訊號。本實驗以 DpGA2 為探針，定位於 *P. stuartiana* 有絲分裂中期的染色體，結果 *P. stuartiana* 所有染色體的中節處皆呈現訊號 (圖 9)。

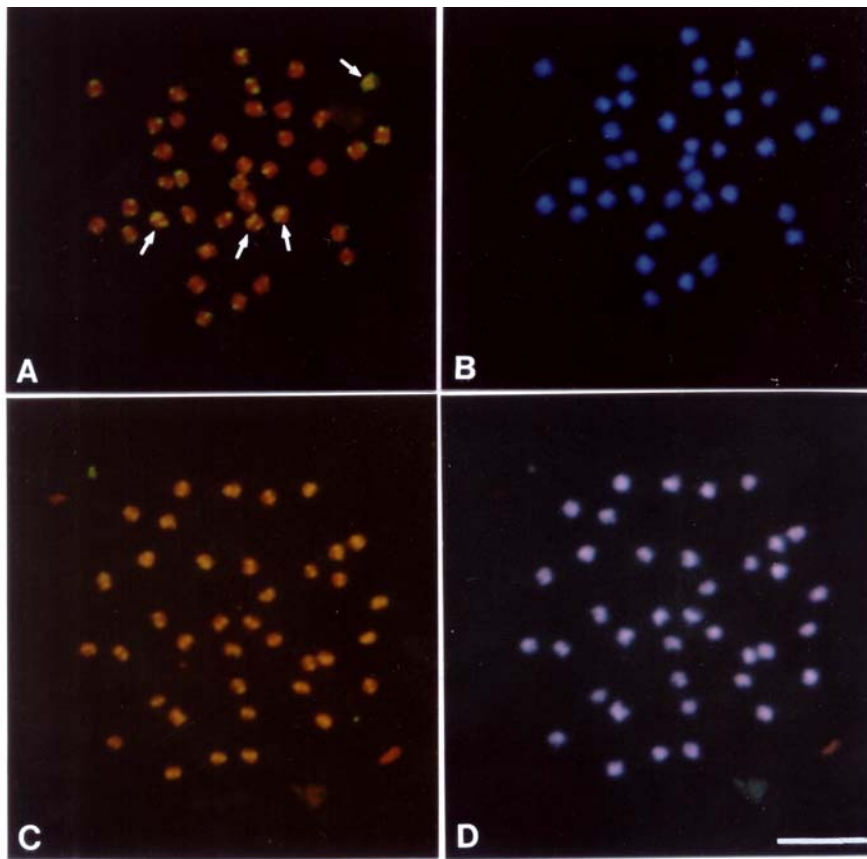


圖 3. 以 PstGA3 (A) ; PstGA9 (C) 為探針，與 *P. stuartiana* 根尖細胞有絲分裂中期染色體進行螢光原位雜交的結果。訊號呈現黃色，訊號稍強之染色體以箭號標示，染色體以 PI 對比染色呈現紅色。(B)(D) 圖分別為與 (A)(C) 相同的細胞，以 DAPI 染色，顯示染色體的外形。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

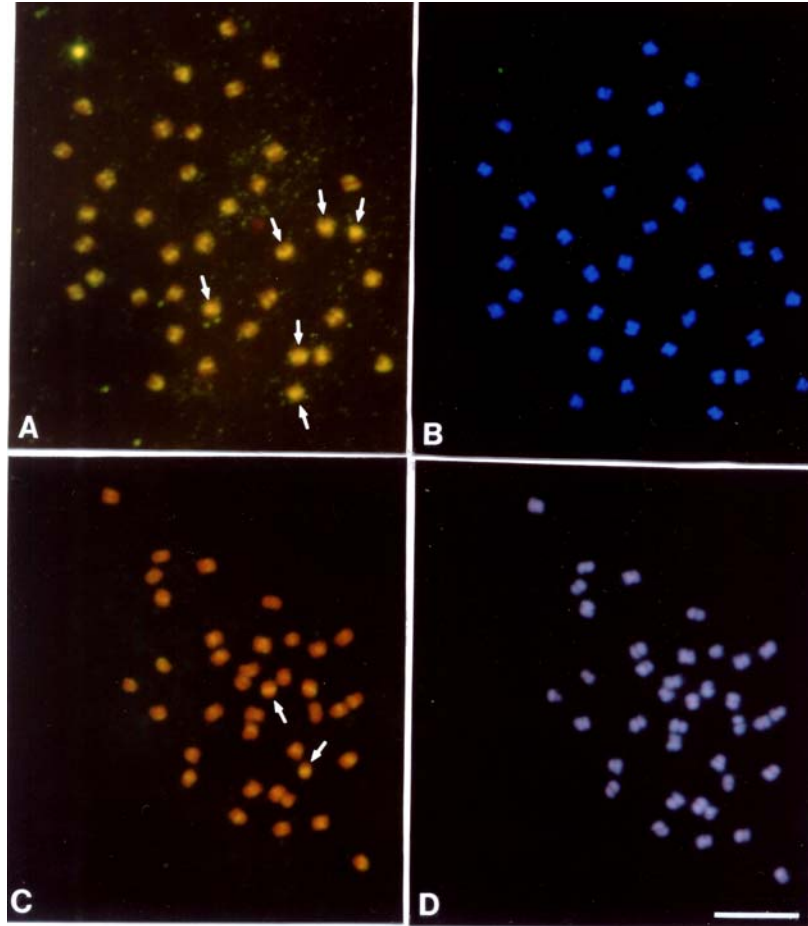


圖 4. 以 PstG16 (A) ; PstGA20 (C) 為探針，與 *P. stuartiana* 根尖細胞有絲分裂中期染色體進行螢光原位雜交的結果。訊號呈現黃色，訊號稍強之染色體以箭號標示，染色體以 PI 對比染色呈現紅色。(B)(D) 圖分別為與 (A)(C) 相同的細胞，以 DAPI 染色，顯示染色體的外形。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

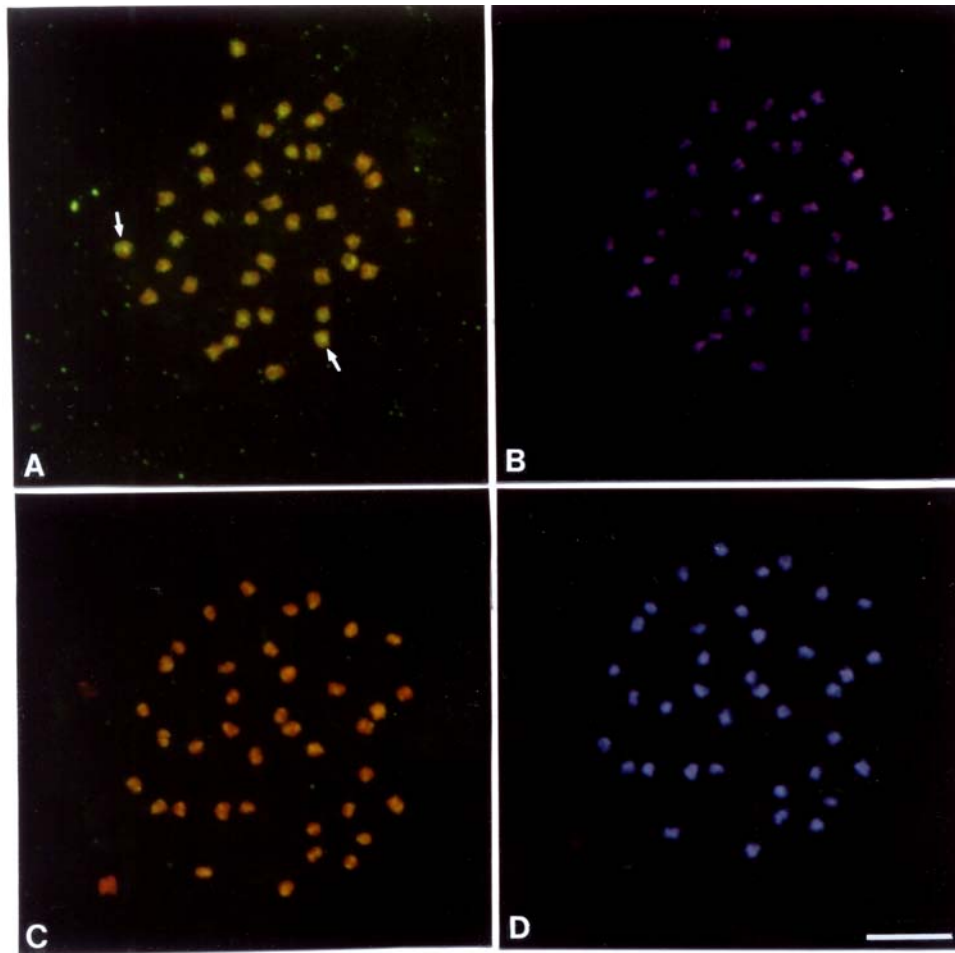


圖 5. 以 PstGA22 (A) ; PstGA24 (C) 為探針，與 *P. stuartiana* 根尖細胞有絲分裂中期染色體進行螢光原位雜交的結果。訊號呈現黃色，訊號稍強之染色體以箭號標示，染色體以 PI 對比染色呈現紅色。(B)(D) 圖分別為與 (A)(C) 相同的細胞，以 DAPI 染色，顯示染色體的外形。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

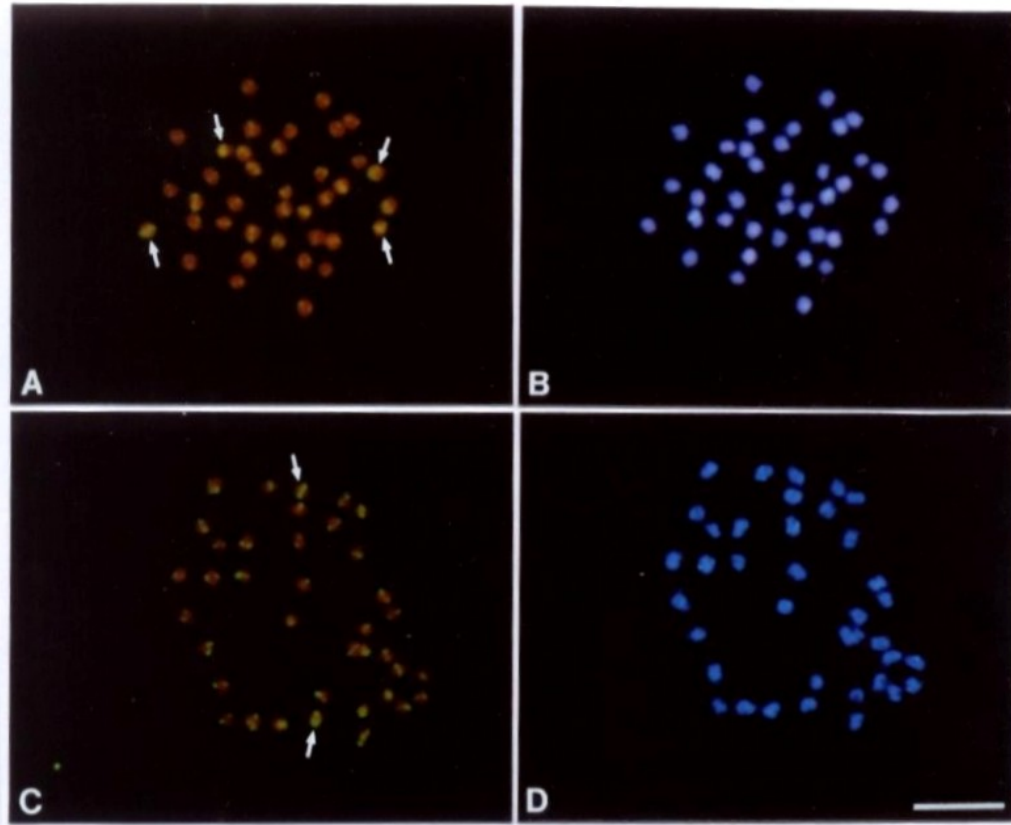


圖 6. 以 PstGA25 (A) ; PstGA30 (C) 為探針，與 *P. stuartiana* 根尖細胞有絲分裂中期染色體進行螢光原位雜交的結果。訊號呈現黃色，訊號稍強之染色體以箭號標示，染色體以 PI 對比染色呈現紅色。(B)(D) 圖分別為與 (A)(C) 相同的細胞，以 DAPI 染色，顯示染色體的外形。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

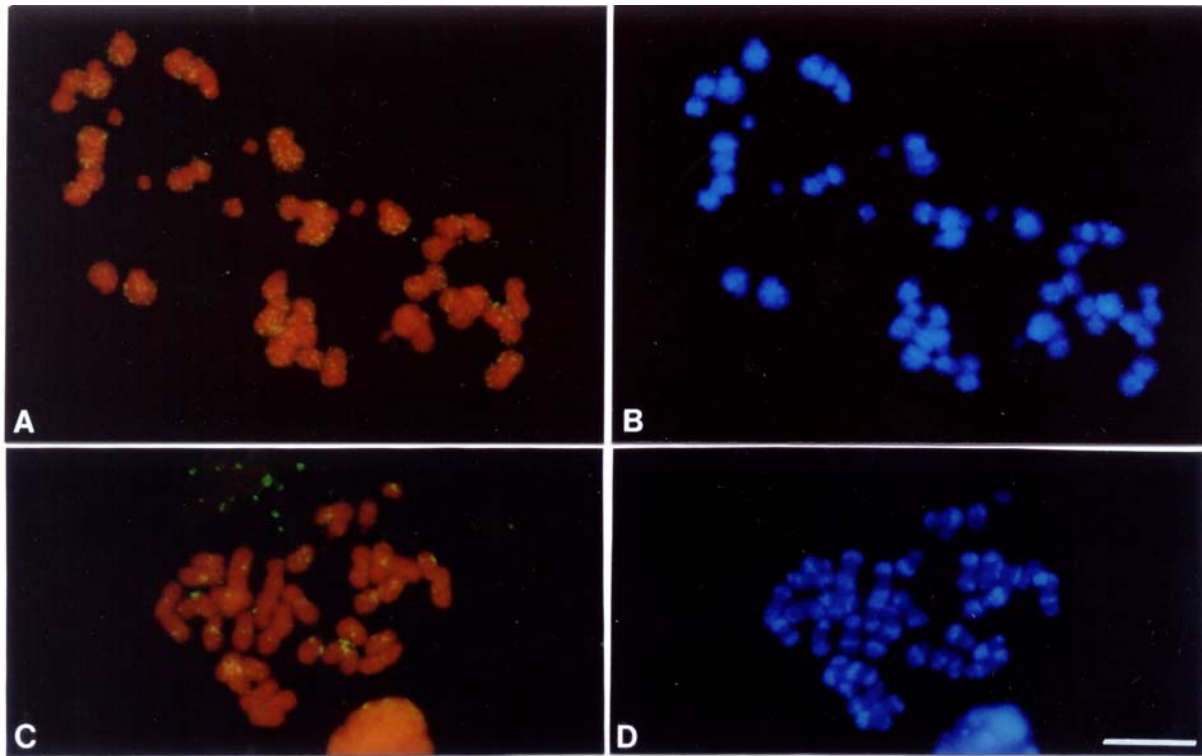


圖 7. 以 PstGA3 為探針與 *P. violacea* (A)；朵麗蘭 (C) 根尖細胞有絲分裂中期染色體進行螢光原位雜交的結果。訊號呈現黃色，染色體以 PI 對比染色呈現紅色。(B)(D) 圖分別為與 (A)(C) 相同的細胞，以 DAPI 染色，顯示染色體的外形。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

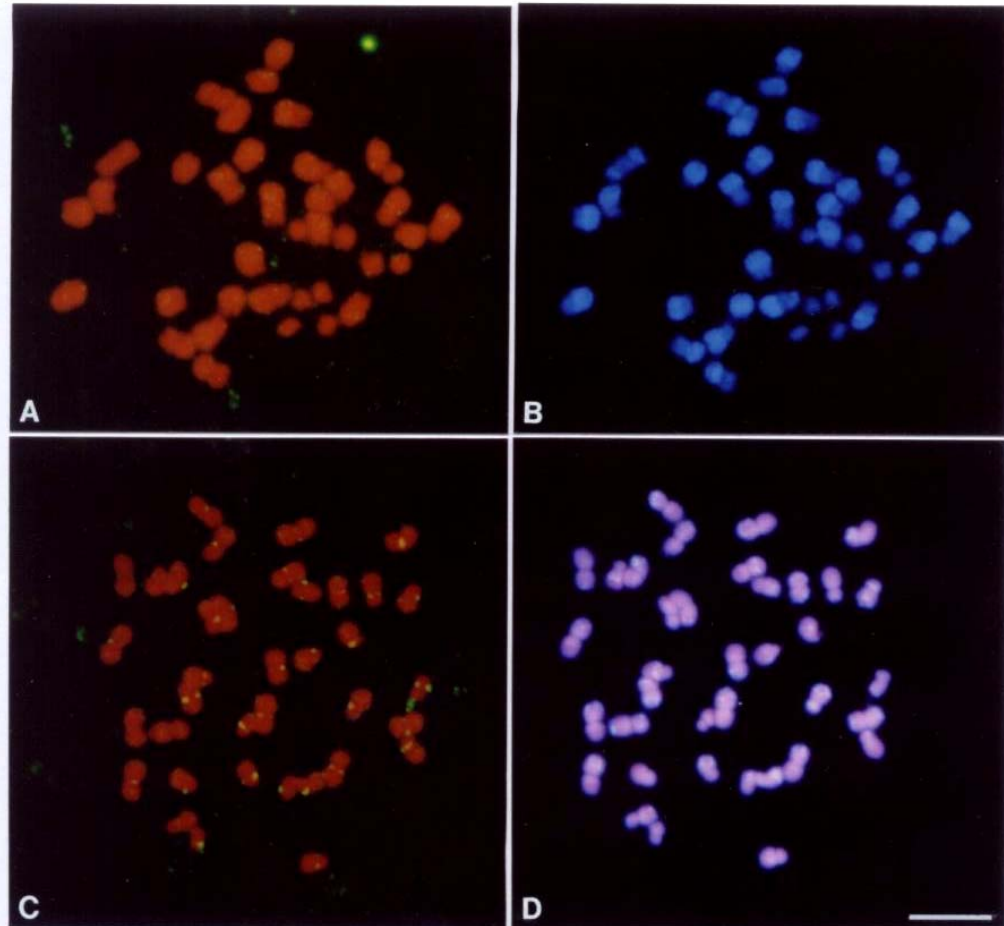


圖 8. 以 PstGA16 為探針與 *P. amboinensis* (A) ; *P. mannii* (C) 根尖細胞有絲分裂中期染色體進行螢光原位雜交的結果。訊號呈現黃色，染色體以 PI 對比染色呈現紅色。(B)(D) 圖分別為與 (A)(C) 圖相同的細胞，以 DAPI 染色，顯示染色體的外形。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。

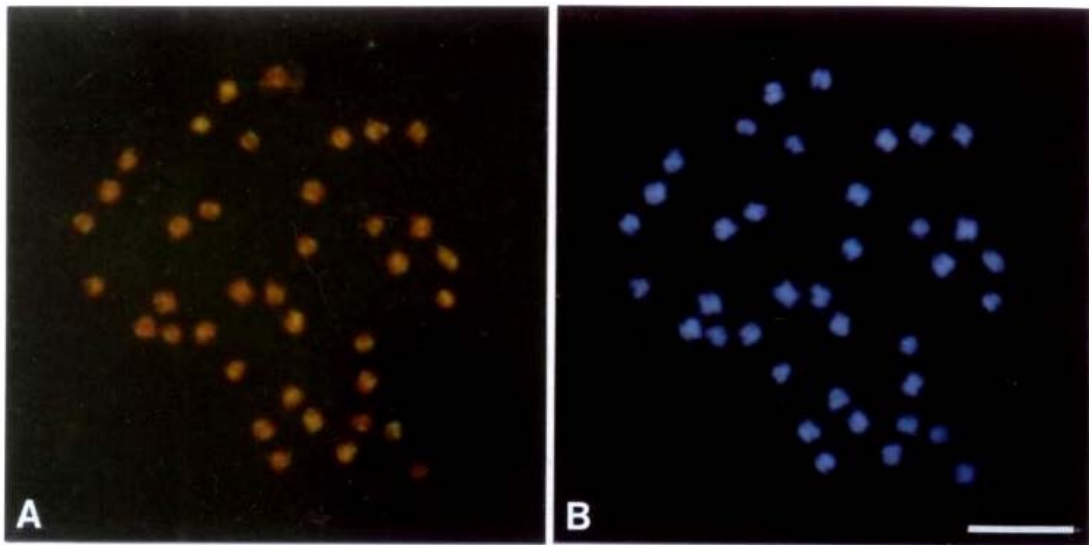


圖 9. (A) 以 DpGA2 為探針，與 *P. stuartiana* 根尖細胞有絲分裂中期染色體進行螢光原位雜交的結果。訊號呈現黃色，染色體以 PI 對比染色呈現紅色。(B) 圖為與 (A) 圖相同的細胞，以 DAPI 染色，顯示染色體的外形。Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ 。



## 肆、討論

本實驗以  $(GA)_{11}$  為引子進行單引子聚合酶連鎖反應，篩選富含  $(GA)_n$  微衛星體序列的選殖體，此方法之得以進行，必須模版 DNA 的 3' 端具備  $(CT)_n$  序列，選殖結果約有 81% (26/32) 的選殖體有插入 DNA，其中 65% (17/26) 的選殖體為重複性序列，只有 4 個片段長度大於 500 bp，完成定序的 15 個選殖體皆為富含  $(GA)_n$  微衛星體序列，選殖率為 100%，且序列沒有重複 (redundance) 的現象。林 (2003) 曾利用建構小片段插入基因組基因庫及豐富性微衛星體序列基因組基因庫的方法，從蝴蝶蘭台灣阿媽 (*Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*) 選殖含  $(AG)_n$  的微衛星體序列，前者有 83% 的選殖體有插入 DNA，片段長度介於 300-1000 bp 之間，有 65% (13/20) 的選殖體為微衛星體序列，只有 5 個微衛星體序列沒有重複，後者有 71% 的選殖體有插入 DNA，片段長度則介於 200-1000 bp 之間，且多數小於 500 bp，有 93% (25/27) 的選殖體為微衛星體序列，且皆沒有重複。本實驗選殖的方法既簡單又有效率。

微衛星體序列依重複方式可分成三種類型：(1) 連續型 (perfect repeat sequence)，為單一種微衛星體序列連續重複且不間斷。(2) 不連續型 (imperfect repeat sequences)，為單一種微衛星體序列重複，但中間被不重複的序列隔開。(3) 複合型 (compound repeat sequences)，

是由兩種以上的微衛星體序列組成 (Weber, 1990)。由 *P. stuartiana* 選殖出的 15 個含 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列，除 PstGA31 為不連續型外，其餘選殖體皆為複合型，機率為 93% (14/15) (表1)。依相同方法，彭 (2007) 由朵麗蘭選殖到的 DpGA1 與 DpGA2 皆為複合型微衛星體序列，吳 (2009) 由鹿角蝴蝶蘭 *P. cornu-cervi* 選殖的 11 個 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列中只有 2 個為不連續型，其餘皆為複合型微衛星體序列，機率達 82% (9/11)，林 (2003) 由台灣阿媽的小片段插入基因組基因庫選殖的五個 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列，有三個選殖體為連續型，其餘兩個為複合型，機率為 40% (2/5)，而由豐富性微衛星體序列基因組基因庫選殖出的 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列，則有 64 % 為連續型，20 % 為不連續型，只有 16 % 為複合型，顯示利用單引子聚合酶連鎖反應選殖出的微衛星體序列以複合型的機率較高。

所挑選的 8 個 *P. stuartiana* 之 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列，進行 FISH 定位結果，這些序列皆集中於 *P. stuartiana* 所有染色體的中節處，訊號強度大致相同，只有少數幾條染色體的訊號稍強 (圖 3-6)，應是序列拷貝數 (copy number) 差異所造成的。然而 8 個選殖體進行南方氏雜交的結果，訊號強弱有明顯差異 (圖 2)，與 FISH 的結果不符，可能是因為南方氏雜交訊號較強的序列雖然在整個基因組含量較多，但是不一定都聚集於染色體中節處，有些可能散佈於染色體

上，但因序列長度小於 10 kb 無法以螢光原位雜交偵測到 (Jiang and Gill, 1994)，才會呈現南方氏雜交訊號與螢光原位雜交訊號強度不一致的情形。

將 PstGA3 定位於 *P. violacea* 與朵麗蘭的染色體，訊號均散佈於所有染色體上 (圖 7)，此與李 (2000) 觀察到 (GA)<sub>11</sub> 只聚集於朵麗蘭染色體的中節不符，顯示朵麗蘭的 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列除了中節外應該還分佈於染色體其他位置。另外 PstGA16 也散佈於 *P. amboinensis* 染色體上，但訊號相當微弱，在 *P. mannii* 染色體上則集中於中節 (圖 8)，此與李 (2000) 觀察的結果相符。

由朵麗蘭選殖出的 DpGA1 與 DpGA2，前者位於朵麗蘭所有染色體的中節，而後者只位於朵麗蘭其中一對染色體的中節 (彭欣羚, 2007)。DpGA1 在 *P. stuartiana* 染色體未偵測到訊號，可能是 *P. stuartiana* 基因組缺乏其序列，或是探針製備發生問題造成的，而 DpGA2 則位於 *P. stuartiana* 所有染色體的中節 (圖 9)，與朵麗蘭定位結果大不相同。DpGA1 與 DpGA2 可作為建立朵麗蘭核型的標誌 (彭欣羚, 2007)，另外小麥核型的建立除了利用 (AG)<sub>12</sub> 外，還以其他 9 種微衛星體序列 (CAT)<sub>5</sub>、(AAC)<sub>5</sub>、(AAG)<sub>5</sub>、(AGG)<sub>5</sub>、(CAC)<sub>5</sub>、(ACG)<sub>5</sub>、(AAT)<sub>5</sub> 及 (CAG)<sub>5</sub> 分辨染色體 (Cuadrado *et al.*, 2008)。本實驗所選殖的 8 個 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列，訊號無明顯差異所以無法作為核型

分析的標誌，將來若能分離更多其他的微衛星體序列，或許在核型建立上有所幫助。

過去曾有研究發現其他植物的中節區域含有  $(GA)_n$  微衛星體序列，例如大麥所有染色體中節處 (Cuadrado and Jouve, 2007b)，小麥 B 基因組染色體的中節兩側區域 (Cuadrado and Schwarzacher, 1998)，阿拉伯芥以及番茄的中節兩側異染色質區 (Brandes *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2008)，然而在甜菜卻是散佈於整條染色體，中節區域則都沒有 (Schmidt and Heslop-Harrison 1996)。

染色體中節具有連結姊妹染色分體 (sister chromatid) 的功能，在細胞分裂時，使染色體能夠正確的分離。根據過去研究，組成中節的 DNA 序列在各個物種間差異性很大 (Henikoff *et al.*, 2001)。大部分真核生物的中節是由許多重複性序列所組成，包含大量的衛星體序列和轉移元素，目前許多生物已經找到專一性的重複性序列，例如人類染色體中節為 171-bp  $\alpha$ -satellite DNA 組成 (Schueler *et al.*, 2001)；果蠅的迷你染色體 (minichromosome) 中節存在  $(AATAT)_n$  和  $(AAGAG)_n$  微衛星體序列 (Sun *et al.*, 2003)；大麥 (barley) 中節具  $(AGGGAG)_n$  微衛星體序列；水稻中節為 155-bp CentO 衛星體序列；而玉米 (maize) 中節為 156-bp CentC 衛星體序列 (Jiang *et al.*, 2003)。由於中節著絲點蛋白質 (kinetochore protein) CENH3

(centromere-specific histone 3) 的保守性很高 (Henikoff *et al.*, 2001)，因此過去為判定是否為具有功能的中節序列，常以免疫染色法 (immunostaining) 觀察著絲點蛋白質 CENH3 與此序列結合來證明 (Zhang *et al.*, 2005)，或以免疫沉澱法 (chromatin immunoprecipitation) 直接分離與 CENH3 結合的序列來證明 (Nagaki *et al.*, 2004)。本實驗選殖的 8 個  $(GA)_n$  微衛星體序列皆聚集於 *P. stuartiana* 所有染色體的中節，是否與中節的功能有關，將來可以此兩種方法確認。



## 伍、參考文獻

- 李宜學. (2000). 利用螢光原位雜交探討微衛星體序列在蝴蝶蘭的實質分佈. 國立台灣大學植物學研究所碩士論文.
- 林東杰. (2003). 蝴蝶蘭微衛星序列之選殖與特性分析. 國立成功大學生物學研究所碩士論文.
- 吳凌巧. (2009). 鹿角蝴蝶蘭 *Phalaenopsis cornu-cervi* 含 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列的選殖與定位. 國立台灣大學分子與細胞生物學研究所碩士論文.
- 彭欣羚. (2007). 利用數種重複性 DNA 序列的分佈建立朵麗蘭的核型. 國立台灣大學分子與細胞生物學研究所碩士論文.
- Adams, S.P., Leitch, I.J., Bennett, M.D. and Leitch, A.R.** (2000). *Aloe* L. – a second plant family without (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. *Chromosoma* **109**, 201–205.
- Andras, S.C., Hartman, T.P., Marshall, J.A., Marchant, R., Power, J.B., Cocking, E.C., and Davey, M.R.** (1999). A drop-spreading technique to produce cytoplasm-free mitotic preparations from plants with small chromosomes. *Chromosome Res.* **7**, 641-647.
- Ausubel, F.M., R. Brent, D.D., More, J.G., Sediman, J.A., Smith, and K. Struhl.** (1989). *Current protocols in molecular biology.* (Greene Publishing).
- Avramova, Z.** (2002). Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences. *Plant Physiol.* **129**, 40-49.
- Brandes, A., Thompson, H., Dean, C. and Heslop-Harrison, J.S.**

(1997). Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. Chromosome Res. **5**, 238-246.

**Cardle, L., Ramsay, L., Milbourne, D., Macaulay, M., Marshall, D. and Waugh, R.** (2000). Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. Genetics **156**, 847-854.

**Chang, S.B., Yang, T.J., Datema, E., Vugt, J.V., Vosman, B., Kuipers, A., Meznikova, M., Szinay, D., Lankhorst, R.K., Jacobsen, E. and Jong, H.D.** (2008). FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. Chromosome Res. **16**, 919-933.

**Christenson, E.A.** (2001). *Phalaenopsis* : a monograph. (Oregon: Timber Press).

**Cuadrado, A. and Schwarzacher, T.** (1998). The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. Chromosoma **107**, 587-594.

**Cuadrado, A. and Jouve, N.** (2002). Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in the genus *Secale*. J. Hered. **93**, 339-345.

**Cuadrado, A. and Jouve, N.** (2007a). The non-random distribution of long clusters of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. Chromosome Res. **15**, 711-720.

**Cuadrado, A. and Jouve, N.** (2007b). Similarities in the chromosomal distribution of AG and AC repeats within and between *Drosophila* , human and barley chromosomes. Cytogenet. Genome Res. **119**, 91-99.

**Cuadrado, A., Cardoso, M. and Jouve, N.** (2008). Increasing the physical markers of wheat chromosomes using SSRs as FISH probes. Genome **51**, 809-815.

- Dressler, R.L.** (1993). Phylogeny and classification of the orchid family. (Cambridge University Press, Cambridge).
- Gawel, N.J. and Jarrent, R.L.** (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol. Bio. Rep.* **9**, 262-266.
- Gortner, G., Nenno, M., Weising, K., Zink, D., Nagl, W. and Kahl, G.** (1998). Chromosomal localization and distribution of SSRs and the *Arabidopsis*-type telomere sequence in the genome of *Cicer arietinum* L. *Chromosome Res.* **6**, 97-104.
- Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C. and Ramesh, B.** (1996). Microsatellites in plants: a new class of molecular marker. *Curr. Sci.* **70**, 45-54.
- Henikoff, S., Ahmad, K. and Malik, H.S.** (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* **293**, 1098-1102.
- Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T., Anamthawat-J'onsson, K., Leitch, A.R., Shi, M. and Leitch, I.J.** (1991). *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* **3**, 109-115.
- Jiang, J., Birchler, J.A., Parrott, W.A. and Dawe, R.K.** (2003). A molecular view of plant centromeres. *Trends Plant Sci.* **8**, 570-575.
- Jiang, J. and Gill, B.S.** (1994). Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping : the first 10 years. *Genome* **37**, 717-725.
- 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.
- Kreike, J.** (1990). Genetic analysis of forest tree populations: isolation of



DNA from spruce and fir apices. *Plant Mol Biol.* **14**, 877-879.

**Kubis, S., Schmidt, T. and Heslop-Harrison, J.S.** (1998). Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Ann. Bot.* **82**, 45-55.

**Lee, J.M., Nahm, S.H., Kim, Y.M. and Kim, B.D.** (2004). Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.* **108**, 619-627.

**Lin, S., Lee, H.C., 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.

**Maroof, M.A.S., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. and Allard, R.W.** (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 5466-5470.

**Nagaki, K., Cheng, Z., Ouyang, S., Talbert, P.B., Kim, M., Jones, K.M., Henikoff, S., Buell, C.R. and Jiang, J.** (2004). Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nature Genetics* **36**, 138-145.

**Ostrander, E.A., Jong, P.M., Rine, J. and Duyk, G.** (1992). Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3419-3423.

**Ouyang, S. and Buell, C.R.** (2004). The TIGR Plant Repeat Databases: a collective resource for the identification of repetitive sequences in plants. *Nucleic Acids Res.* **32**, D360-D363.

**Plohl, M., Luchetti, A., Meštrović, N. and Mantovani, B.** (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* **409**, 72-82.

- Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R.** (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Bio. Rep.* **15**, 8-19.
- Powell, W., Machray, G.C. and Provan, J.** (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trans Plant Sci.* **1**, 215-222.
- Röder, M.S., Korzun, V., Gill, B.S. and Ganal, M.W.** (1998). The physical mapping of microsatellite markers in wheat. *Genome* **41**, 278-283.
- Sagawa, Y.** (1962). Cytological studies of the genus *Phalaenopsis*. *Am. Orchid Soc. Bull.* **31**, 459-465.
- Sagawa, Y. and Shoji, T.** (1968). Chromosome numbers in *Phalaenopsis* and *Doritis*. *Bull. Pacific Orchid Soc.* **26**, 9-13.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schmidt, T. and Heslop-Harrison, J.S.** (1996). The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 8761-8765.
- Schueler, M.G., Higgins, A.W., Rudd, M.K., Gustashaw, K. and Willard, H.F.** (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* **294**, 109-115.
- Sharopova, N., McMullen, M.D., Schultz, L. et al.** (2002). Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Mol. Bio.* **48**, 463-481.
- Sun, X., Le, H.D., Wahlstrom, J.M. and Karpen, G.H.** (2003). Sequence analysis of a functional *Drosophila* centromere. *Genome Res.* **13**, 182-194.

- Sweet, H.R.** (1980). The genus *Phalaenopsis*. (Day Printing Corp., Pomona, California).
- Temnykh, S., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T. and McCouch, S.R.** (2000). Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **100**, 697-712.
- Wang, Z., Weber, J. L., Zhong, G. and Tanksley, S. D.** (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* **88**, 1-6.
- Weber, J.L.** (1990). Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> • (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* **7**, 524-530.
- Westneat, D.F., Noon, W.A., Reeve, H.K. and Aquadro, C.F.** (1988). Improved hybridization conditions for DNA 'fingerprints' probed with M13. *Nucleic Acid Res.* **16**, 4161.
- Woodard, J.W.** (1951). Some chromosome numbers in *Phalaenopsis*. *Am. Orchid Soc. Bull.* **20**, 356-358.
- Zhang, W., Yi, C., Bao, W., Liu, B., Cui, J., Yu, H., Cao, X., Gu, M., Liu, M. and Cheng, Z.** (2005). The transcribed 165-bp CentO satellite is the major functional centromeric element in the wild rice species *Oryza punctata*. *Plant Physiol.* **139**, 306-315.

附錄 1: 蝴蝶蘭 *P. stuartiana* 15 個選殖體之 (GA)<sub>n</sub> 微衛星體序列，黑色方框為顛倒重複性序列，灰色背景為迴紋序列。

### PstGA1 180bp

(GA)<sub>9</sub>GTGGAA(GA)<sub>3</sub>GTGGGG(GA)<sub>2</sub>AAGCAA(GA)<sub>3</sub>GGGAGTCA(GA)<sub>2</sub>GCGAT  
AGAAA(GA)<sub>2</sub>GCTGGAT(GA)<sub>5</sub>GTAACACAGAGTGCAAGAAAGTGAT(TG)<sub>4</sub>AT  
ATTTCAA(GA)<sub>8</sub>GTTGGAATGAGCGGGTAAGATA(GA)<sub>2</sub>A

### PstGA2 369bp

(GA)<sub>9</sub>TT(GA)<sub>9</sub>AAGAGGAAAGCAGGAAA(GA)<sub>2</sub>AAACAAAA(GA)<sub>2</sub>GGGAGG(G  
A)<sub>2</sub>GGGATAGAAAGTTA(GA)<sub>5</sub>GT(GA)<sub>3</sub>AAAATTTAAAGAA(GA)<sub>2</sub>GTGAATAG  
AAAGGGAGTAAGGGAAGGAGGGATTGCA(GA)<sub>5</sub>AT(GA)<sub>4</sub>AATGTGGAAA(GA  
)<sub>2</sub>T(GA)<sub>2</sub>TATATGAAGTGTGGGAGGGTGATAAAGGGGGATAAT(GA)<sub>3</sub>AAGAA  
AGTGTGGGGGATTGAGCGAAA(GA)<sub>2</sub>AACAAGATTGAAAAGATAGAGGAAG  
GGATGGGGAA(GGA)<sub>2</sub>ATGGAGGGAATTAGGGAGGGTAAGGGCACAAGAA  
AGT(GA)<sub>2</sub>TT(GA)<sub>4</sub>

### PstGA3 289bp

(GA)<sub>9</sub>TTGCAA(GA)<sub>2</sub>GGGGTATGGAA(GA)<sub>2</sub>T(GA)<sub>3</sub>GCAAGAGCAACTGAGGG  
AGTGCAAGT(GA)<sub>3</sub>GTGCAAGAAATGGAATTA(GA)<sub>2</sub>AAAA(GA)<sub>2</sub>TATG(GA)<sub>2</sub>T  
AA(GA)<sub>2</sub>AA(GA)<sub>2</sub>ATGAACG(ATC)<sub>2</sub>TAGC(TC)<sub>3</sub>TTTCTATCGCTCTATGACTC  
C(TC)<sub>3</sub>ATGCTT(TC)<sub>3</sub>CCAC(TC)<sub>4</sub>CCAC(TC)<sub>3</sub>CC(CTT)<sub>2</sub>TCTTACTCTTTTTTTC  
T(TC)<sub>2</sub>TT(TC)<sub>2</sub>ATTATCCT(TC)<sub>2</sub>ACA(CTTG)<sub>2</sub>C(TCTT)<sub>2</sub>TCCT

### PstGA4 287bp

A(GA)<sub>28</sub>AAATAA AAAAGA(GT)<sub>4</sub>GGTGT(GA)<sub>3</sub>AGATAAA(GA)<sub>2</sub>GTG(AT)<sub>3</sub>AA(G  
A)<sub>2</sub>TTTGAGT(GA)<sub>3</sub>TTTATATG(TC)<sub>2</sub>GTG(TC)<sub>6</sub>TTTT(TC)<sub>2</sub>TA(TCCC)<sub>2</sub>TCACA(C  
TC)<sub>2</sub>CCTCATAC(TC)<sub>3</sub>AACCTTAGTTTA(TC)<sub>9</sub>TTCTGATTT(TC)<sub>5</sub>TATCTTGTGC  
(TC)<sub>3</sub>TTTTTTTCTT(TC)<sub>3</sub>TG(TC)<sub>3</sub>T

### PstGA5 726 bp

(GA)<sub>7</sub>AATA(GA)<sub>3</sub>AA(GA)<sub>4</sub>ATGAGGGT(GA)<sub>2</sub>GCAATAGAGTGG(GA)<sub>3</sub>GCAAAA  
(GA)<sub>2</sub>AGAGTAAGAAAGTTA(GA)<sub>3</sub>ATGAAA(GA)<sub>2</sub>TAAAGAAACATA(GA)<sub>2</sub>AG  
ATAGTGC(TC)<sub>2</sub>TTATCCATTCTTGCAATCACACCC(TC)<sub>2</sub>TTTT(TC)<sub>4</sub>ATAA(TC)  
2(CCT)<sub>2</sub>CTAATTTTTCTTTCTATTTG(TC)<sub>3</sub>ACT(TC)<sub>2</sub>TTGTIACCT(TC)<sub>2</sub>TTTCT  
TACTTGCTT(TC)<sub>2</sub>T(TC)<sub>11</sub>(GA)<sub>25</sub>GCAAAGATAGTGAAAGTTAAGGAAATACT  
A(GA)<sub>2</sub>TGAGGATGAAT(AAG)<sub>2</sub>AAATTTAAG(GA)<sub>3</sub>GGGAGCTTGGGAGG(GA)  
2AA(GA)<sub>3</sub>AAAAGT(GAGG)<sub>2</sub>GCAA(GA)<sub>2</sub>GTGAA(GA)<sub>3</sub>AAGAGTGTT(GA)<sub>4</sub>AA

AGACTAATAGAGGG(AAT)<sub>2</sub>(GA)<sub>5</sub>TCCC(TC)<sub>2</sub>TTTCAC(TC)<sub>2</sub>TATCACTT(TC)<sub>2</sub>TA(TC)<sub>3</sub>CCTCATTCC(AAT)<sub>2</sub>GCTCACTCCCTACATCCCTTTT(TC)<sub>2</sub>CGCCTCCCTA(TC)<sub>2</sub>CTTTCC(TC)<sub>3</sub>TATTTCCC(TC)<sub>4</sub>CCTTCTATAC(TC)<sub>2</sub>CCTATGA(TC)<sub>3</sub>ATACATTT(TC)<sub>4</sub>TTTCCC(TC)<sub>2</sub>AACCTTGTCATTTTTTCT(TC)<sub>3</sub>TTTTTTAAC(TC)<sub>9</sub>

### PstGA9 189bp

C(GA)<sub>4</sub>TA(GA)<sub>3</sub>GTGTGCGAAA(GA)<sub>4</sub>CATA(GA)<sub>2</sub>AG(GA)<sub>4</sub>ATA(GA)<sub>2</sub>TATCAC(TC)<sub>2</sub>TATATTGAT(TC)<sub>3</sub>TT(TC)<sub>2</sub>TTCATAGACAC(TC)<sub>3</sub>TATTTTTT(CCT)<sub>2</sub>AT(TC)<sub>2</sub>T AATGAACCA(TC)<sub>25</sub>T

### PstGA13 493bp

(GA)<sub>9</sub>AGGAG(CAA)<sub>2</sub>TAA(GA)<sub>4</sub>AT(GA)<sub>3</sub>AATA CAGAAAGAG(GA)<sub>3</sub>CTAAG(GA)<sub>2</sub>A(GA)<sub>2</sub>AAGAGTGGGTGAGT(GA)<sub>2</sub>AAGGCCGACGTTGAGT(GA)<sub>5</sub>GTGAA GGAAATAGAAG(GA)<sub>2</sub>AGA(GGA)<sub>2</sub>AAGAAA(GA)<sub>2</sub>AA(GA)<sub>3</sub>GT(GA)<sub>2</sub>AAGACT GTAAA(TG)<sub>3</sub>AAAGATAAG(GA)<sub>4</sub>(GGGA)<sub>2</sub>TGGAAAAGCAGTGT(GA)<sub>2</sub>TGCG T(GAAA)<sub>2</sub>GT(GA)<sub>2</sub>AATAGTTA(GA)<sub>2</sub>A(GA)<sub>2</sub>GTGATTAT(GA)<sub>3</sub>GGGGATATCTTT A(GA)<sub>4</sub>A(GA)<sub>2</sub>GCAATATTGG(GA)<sub>2</sub>AATAAG(TC)<sub>2</sub>ACTTCTG(CTTT)<sub>2</sub>TGC(TCTA)<sub>2</sub>TCGATCTTCATCCC(TC)<sub>2</sub>TTTTCAATTCCCTGCCTCTTCGCCTCGT(TC)<sub>2</sub>G CTGTATCCACCTTCAATTCCATC TATT(TC)<sub>2</sub>TTCTTATA(TC)<sub>2</sub>ATCTTACA(TC)<sub>12</sub>

### PstGA16 377bp

A(GA)<sub>9</sub>A(GA)<sub>2</sub>TTGAAAGAA(GA)<sub>2</sub>GTGAATA(GA)<sub>2</sub>TGGACTGAGGGA(AGG)<sub>2</sub>GACTGC A(GA)<sub>5</sub>AGAA(GA)<sub>2</sub>AAGGGGGAAA(GA)<sub>2</sub>A(GA)<sub>2</sub>TATATGAAGGGTG GGAGGGTGATAAAGGGGGATAATGAGC(GAAA)<sub>2</sub>GTGAGGGGGGATTGAGC GAACAAGAAACAAGATTAA(GA)<sub>2</sub>TAGAGGAAGGGATGGGGAAAGAGGA(AATGG)<sub>2</sub>GGA(AAG)<sub>2</sub>ATT(GAAC)<sub>2</sub>AAGAAACAAGATTGAA(GA)<sub>2</sub>TAGAGGAATG GATAC(TC)<sub>4</sub>TATCTGTTGA(TC)<sub>2</sub>TTTCT(TC)<sub>2</sub>TAACCTGA(TC)<sub>3</sub>TT(TC)<sub>2</sub>ATTCT AAA(TC)<sub>4</sub>CCTA(TC)<sub>2</sub>TA(TC)<sub>7</sub>

### PstGA20 686bp

A(GA)<sub>8</sub>GGAAGTG(AATA)<sub>3</sub>(GA)<sub>2</sub>AAGATAGA(AGGAG)<sub>2</sub>AATGGAAA(GA)<sub>2</sub>TG GGGAGGG(GA)<sub>5</sub>GGCGGAATGAAGT(GAGG)<sub>6</sub>GTGATATAGAAATTTA(GA)<sub>2</sub>T AGTGGGAA(GA)<sub>2</sub>AAGGGAGTGAGG(GA)<sub>2</sub>AAGCAA(GAGG)<sub>2</sub>GTGG(GA)<sub>2</sub>AA AAGGGAAAGGTATAGAAATATT(GA)<sub>2</sub>TATAGGAAAAAAGAGCTCTAGGATAT GAGCACAAGAAAAAATTGT(GA)<sub>4</sub>AGTTT(GA)<sub>3</sub>GCCCCAAAACTGT(GA)<sub>8</sub>G(CA)<sub>3</sub>CGTGTGAAGATATAGAAG(GA)<sub>5</sub>ATGAGCATGAGGTGTAGCACGAAAG

AG(GA)<sub>5</sub>AAAGAAAATATAA(GA)<sub>2</sub>TATAG(GGA)<sub>2</sub>TGGGGGAAAGGGGAAAA  
AGT(GA)<sub>4</sub>AA(GA)<sub>2</sub>AA(GA)<sub>2</sub>AA(GA)<sub>2</sub>AAGT(GA)<sub>7</sub>CAATAAAATATAAAAGAAA  
(GA)<sub>6</sub>GGAT(ATA)<sub>2</sub>TTAAAGAAA(GA)<sub>3</sub>CATATA(GA)<sub>2</sub>GGGGGGAGGGTGTAGA  
GGGTCACCTCGGT(GA)<sub>3</sub>GTGT(GA)<sub>3</sub>TA(TC)<sub>3</sub>TT(TGC(TC))<sub>9</sub>TA(TC)<sub>4</sub>TAT(TC)<sub>2</sub>G  
(TC)<sub>2</sub>GA(TC)<sub>6</sub>TATACATGCGCTCC(TC)<sub>7</sub>T

**PstGA22 432bp**

A(GA)<sub>6</sub>AAGG(GA)<sub>3</sub>AGAAGGGAGCGAGTAAAAGGGGGG(AGGG)<sub>2</sub>ATGAAGC  
AA(GA)<sub>2</sub>TAGGTATGAGTGAAAGT(GA)<sub>2</sub>AATAAT(GA)<sub>4</sub>ATAGGGG(GA)<sub>4</sub>GTGC  
TACTCAA(GA)<sub>5</sub>TTGAAA(GA)<sub>2</sub>AAGGCAGGGAGG(GA)<sub>2</sub>GCGACA(GA)<sub>2</sub>AAT  
T(GATA)<sub>2</sub>GAAT(GA)<sub>3</sub>TAAGC(TC)<sub>2</sub>TACTTTGCGATCCTCACATCG(TC)<sub>3</sub>TTCT  
CACCTATATTTTTCTTTACTCCCTCTATATTGTTTCATATT(TC)<sub>2</sub>TA(TC)<sub>2</sub>CCT  
CGTGCTCTATCTT(TC)<sub>2</sub>CTT(CA)<sub>3</sub>ATAGCTTCCACTATCAATG(TC)<sub>3</sub>TA(TC)<sub>2</sub>AT  
GCTCCCTCAACCTTAT(TC)<sub>2</sub>ACCT(TC)<sub>2</sub>TTTACTATTTCTATAACTTTCTGTAT  
TTTTTCC(TC)<sub>8</sub>T

**PstGA24 92bp**

(GA)<sub>18</sub>GGGAGT(GA)<sub>3</sub>AA(GA)<sub>4</sub>GG(GA)<sub>2</sub>CT(AAG)<sub>2</sub>(GA)<sub>2</sub>CAAAGTGA(GA)<sub>3</sub>

**PstGA25 252bp**

AA(AGAATGAT(AGAA)<sub>2</sub>AGATGGAAG(GA)<sub>3</sub>GGGAAT(GA)<sub>2</sub>GTTAAGT(GA)<sub>3</sub>G  
GCAC(GA)<sub>2</sub>(GCAA)<sub>2</sub>CA(GA)<sub>3</sub>TAACCTGAAA(GA)<sub>2</sub>AGATAGAAAAAT(AGA)<sub>2</sub>TA  
GAAAAGCTTCTAT(TTC)<sub>2</sub>ACTCATCTT(TC)<sub>2</sub>ACTT(TC)<sub>2</sub>T(TC)<sub>2</sub>AC(TCTT)<sub>2</sub>TC  
TATCAC(TC)<sub>2</sub>TACCTTCTGC(TC)<sub>14</sub>ACCATATTT(TC)<sub>10</sub>T

**PstGA29 645bp**

(GA)<sub>8</sub>T(GA)<sub>2</sub>AAAATTA(GA)<sub>2</sub>AAGTAAGATA(GA)<sub>4</sub>AAGCAAAGGAAAATGTT  
A(GA)<sub>2</sub>GCACTGATGTAGAAAATGAAAGAGC(GAGT)<sub>2</sub>GG(GA)<sub>2</sub>(AGA)<sub>2</sub>A(A  
A)<sub>2</sub>ACAAAAAT(GA)<sub>2</sub>AGATAAAAAAATGTAA(GA)<sub>2</sub>A(GAGG)<sub>2</sub>GTGG(GA)<sub>2</sub>GG  
(GA)<sub>5</sub>TAAA(GA)<sub>3</sub>AAGAAATAA(GA)<sub>3</sub>GCTAGTGAGGGCGGAA(GA)<sub>4</sub>CGAAAA  
GCATGC(GA)<sub>3</sub>TAAGGT(GA)<sub>2</sub>TAGTGGG(GGA)<sub>2</sub>AAAATGGGG(GA)<sub>3</sub>GGAAGA  
TAAA(GA)<sub>3</sub>GG(GA)<sub>2</sub>A(GA)<sub>2</sub>CG(ATGA)<sub>2</sub>ATCAAGATAGTGG(GA)<sub>3</sub>GG(GA)<sub>4</sub>GG  
GACAGAAAGAGT(GA)<sub>3</sub>CAGAT(AGA)<sub>2</sub>GT(GA)<sub>2</sub>TA(CCCT)<sub>2</sub>T(TC)<sub>2</sub>TGTTCAA  
CCC(TC)<sub>2</sub>GATGC(TC)<sub>3</sub>ACTCTTTCT(TC)<sub>2</sub>C(TC)<sub>4</sub>ACTT(CCCT)<sub>2</sub>ACC(TC)<sub>2</sub>CC  
(TC)<sub>5</sub>ACTCAACATCTTCC(TC)<sub>3</sub>ACTCACCCAC(TC)<sub>2</sub>GC(TCTT)<sub>2</sub>CCTTAG(TC)<sub>3</sub>  
C(TC)<sub>3</sub>TGTATT(TC)<sub>3</sub>AT(TC)<sub>3</sub>CCTTA(TTG)<sub>2</sub>C(TC)<sub>32</sub>

**PstGA30 319bp**

GCACAAGAAAGT(GA)<sub>2</sub>TT(GA)<sub>3</sub>GTGGGAAGTAGAAAAGAGCACGAAAGAA  
TGATAGAAATAAAGATGA(AAG)<sub>2</sub>AAAGGGAAT(GA)<sub>2</sub>GTATAAGC(GA)<sub>4</sub>GCCG  
T(GA)<sub>2</sub>(GCAA)<sub>2</sub>CA(GA)<sub>3</sub>TA(GA)<sub>2</sub>AGGAAA(GA)<sub>2</sub>AGAAA(GA)<sub>2</sub>(GCAA)<sub>2</sub>CA(  
GA)<sub>3</sub>TATTCAAAA(GA)<sub>2</sub>AGATAGAAAAGCTTGCTATGTTTTCACTCATCTTT  
TTTCACTTTCACT(TC)<sub>2</sub>ACTCTTTCCTTCTATCAC(TC)<sub>2</sub>TACCTTCCGC(TC)<sub>2</sub>T  
TGCTT(TC)<sub>3</sub>C(TC)<sub>2</sub>TTATTTA(TC)<sub>10</sub>

**PstGA31 404bp**

(GA)<sub>8</sub>AAATAAAATAA(GA)<sub>3</sub>TAGAGCGAGGATGGAGGAAGG(GA)<sub>2</sub>ACAAAGT  
(GA)<sub>4</sub>AA(GA)<sub>2</sub>AA(GA)<sub>2</sub>AAGT(GA)<sub>6</sub>AGATGAAGTAGGAAAGAAA(GA)<sub>5</sub>GGAT  
AAGATAGTAAAGGAA(GA)<sub>3</sub>AATA(GA)<sub>3</sub>GGGGAGGGGAGGGTA(GA)<sub>2</sub>GGGTC  
ACTTGGT(GA)<sub>3</sub>GTGAAA(GA)<sub>3</sub>TCTTCTTTTGCTCTT(TC)<sub>3</sub>CCCTCCCA(TC)  
4CATTCTTTTGCATCTTT(TC)<sub>3</sub>TTTATACTTGCACTTCC(TC)<sub>5</sub>TTTTGCTCTA(  
TC)<sub>3</sub>TTCTTCCCTTAG(TC)<sub>3</sub>ATATTCATCTGTCTTTG(TC)<sub>3</sub>AC(TC)<sub>2</sub>ACTTGT  
TCTTCATTCT(TC)<sub>9</sub>T

