

生物技術於火鶴花品種開發與種苗繁殖之應用

撰文/莊耿彰·陳福旗·王昭月·謝廷芳

前言

火鶴花為天南星科 (Araceae)、火鶴花屬 (*Anthurium*) 的宿根植物，原產於中南美洲的多年生草本花卉，約有 600-700 種原生種。花朵的構造中包含獨特的肉穗狀花序及鮮豔的佛焰苞片，依型態可分為 4 個族群，分別是 *Anthurium andraeanum* 栽培種 (即目前切花栽培的主要品種來源)、*A. andraeanum* 與 *A. andreicola* (矮生品種) 的雜交種、*A. scherzerianum* (紅苞芋等) 及一些觀葉觀果的品種。依據荷蘭花卉拍賣協會 (VBN) 統計資料，2006 年火鶴花的拍賣數量為 2,432 萬枝，總值達 1,061 萬歐元，在所有切花中排名第七位，平均單價為 0.44 歐元 / 枝；在觀葉及觀花盆栽的銷售數量上，2006 年為 347 萬 5 千盆，總值為 1,192 萬歐元，在盆花中排名第四位，僅次於蝴蝶蘭、菊花、長壽花，平均單價為 3.43 歐元 / 盆。依據觀葉植物產業分析指

出，盆栽火鶴花具有持久耐儲運及易於包裝處理的特性，加上蒼翠茂密的葉片、週年開花且色彩繁多的諸多優點，儼然已成為一種相當吸引人的盆花產品。近幾年來，大型的火鶴花生產農場幾乎遍及世界各地，已發展成為亞熱帶地區重要的切花產業，而盆花生產也躋身進入國際貿易的商品行列。

依據 2007 年台灣農業統計年報，台灣火鶴花種植面積約 160 公頃，主要產區分佈於台中縣、南投縣、台南縣、高雄縣及屏東縣等地，2008 年內銷 887 萬支，平均單價為 11.2 元，產值約一億元新台幣 (台北等 5 大花市統計)；外銷以日本為主，總銷日數量約 490 公噸 (約 9 百萬支以上)，總值 366 萬美元，合計二億元新台幣以上，目前已取代夏威夷及模里西斯，成為日本火鶴花切花最大的供應國，為台灣僅次於文心蘭的第二大外銷切花作物 (圖一)。



圖一 2008年台灣火鶴花出口統計與2007年日本進口火鶴花國別統計

荷蘭統計局 (CBS) 資料顯示，1998 年荷蘭境內的火鶴花切花生產面積為 86 公頃，至 2004 年歐盟境內大型火鶴花切花農場面積為 202 公頃，火鶴盆花 372.5 公頃，相形之下，台灣火鶴花切花的栽培面積已達世界執牛耳之地位。

火鶴花之基本栽培特性

(一) 火鶴花的植株型態與生育

火鶴花是多年生草本植物，具有氣生的鬚根，革質的單葉螺旋排列在短縮的莖上，而其所謂的“花”則由苞片及肉穗花序所組成，其中 *A. andraeanum* (一般的切花火鶴花品種) 具些微的蔓生性，並以氣生根固著，而 *A. scherzerianum* (俗稱紅苞芋) 則具有基部多莖短簇的特性。*A. andraeanum* 的主莖依營養狀態、環境、品種的不同，每年可長出 3-8 片葉片，植株基部的側芽可形成吸芽，吸芽的形成能力因栽培環境與品種而異。

火鶴花進入開花期後，依循一葉一花的發育模式生長，植株生育在低溫及低光下所需時間較長。在花芽發育的過程中若遇到逆境，容易導致花芽的畸型或停止生長。

(二) 火鶴花的種苗繁殖

火鶴花的繁殖方式有種子繁殖、分株繁殖、截頂切斷、莖節切段及組織培養等 (圖二)，而商業生產上則以組織培養的方式為主。

1. 種子繁殖法

由於火鶴花具高異質性，因此利用種子繁殖之方式並不為商業切花栽培所採用，只有在進行品種改良時才會利用播種方式，而且從授粉，播種到植株開花的過程需耗時 2 年以上。

2. 分株繁殖法

利用自然狀態或頂芽切除方式產生的側芽為繁殖體，側芽生成的能力因品種及栽培環境而異，其種苗繁殖倍率約為 1-2 倍。



內含種子之漿果 (左)；頂芽及側芽 (中)；莖節 (右)

圖二 火鶴花繁殖方式

3. 截頂切斷法

利用老株（或植株）頂端帶根的部位作為繁殖材料，可在短期內獲得較大的植株，惟須注意切取之部位是否帶有具危害性的病原或病毒。

4. 莖節切段法

利用去頂後的老莖，切取含側芽帶有根系的部位，放置於濕潤的介質內促使側芽萌發新個體，其種苗增殖效率高於分株方式，但相對需時較長。

5. 組織培養法

為目前商業生產上經常採用的種苗生產方式，採用適當的培植體進行組織培養，在誘發不定芽後增殖種苗，再移入發根培養基中發根，並馴化為小苗；經由組織培養取得的種苗可確保不帶有大部份的病原菌，但對火鶴花組培苗而言，仍需進一步檢定不帶病毒及細菌性葉枯病菌，以確保種苗之健康。

早期由於火鶴花種苗取得不易、單價高，以致於仰賴分株、截頂或莖節切段等方式繁殖種苗，但自從細菌性葉枯病嚴重打擊產業之後，這些繁殖方式已不再被採用。目前商業用火鶴花種苗的主要來源為組織培養苗，但截頂刺激側芽生成以增加種苗數量仍為業者所採用。經由特定組培流程控制生產

的組培苗，在馴化的過程中培養在隔離、離地的乾淨無土介質高床上，經檢定不帶有主要病蟲害後，才可以在市場流通；健康之火鶴花種苗可以有效避免危害蟲及細菌性葉枯病在田區間的傳播，確保切花生產的成功率（圖三）。

生物技術在火鶴花產業上之研究現況

（一）PCR在火鶴花親緣鑑定上之應用

近二十年來，受惠於分子生物技術發展迅速，提高物種遺傳背景的辨識與親緣鑑定的準確性；在植物遺傳分析與利用方面，更成為輔助育種選拔及品種鑑別的有力工具之一。例如早期蛋白質層次的同功異構酵素 (isozymes) 與 DNA 層次的 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 分析，繼之發展的 RAPD (random amplified polymorphic DNA)、microsatellite DNA (simple sequence repeat, SSR 或 inter-simple sequence repeat, ISSR) 以及 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 等分析技術。然而利用同功異構酵素進行遺傳分析時，因可供標誌基因座較少，不如 DNA 分子層次分析之多型性高且穩定，因此自聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術被開發後，利用 DNA 層次的分子生物標誌，已廣泛被利用於種原 (品種) 鑑定、植物育種後裔遺傳之評估、種原演進的估測以及遺傳相似性等方面之探討。

隨機增幅多型性 DNA (RAPD) 具有指紋比對 (fingerprint) 的效用 (Welsh and McClelland, 1991)。Stiles 等人 (1993) 以 RAPD 標誌應用於木瓜栽培種間之基因分析，利用 11 種隨機引子產生的 RAPD 標誌，經由電腦以群叢分析 (cluster analysis) 分析其相關性，可清楚研判 11 個木瓜品系相關係數，以了解不同品系內的相似性，推斷種原歧異度 (diversity)，並建議此為快速且正確性高之種原鑑定方式。在火鶴花相關研究上，Kobayashi 等人 (1987) 則利用葉片之過氧化酶 (peroxidase, PRX) 分析，獲得不同栽培種間差異性的同功異構酵素圖譜。1999



圖三 馴化的火鶴花組培苗

年王等人以農業試驗所「火鶴花育種」計畫中，30 個主要雜交親本栽培種作為材料，利用 ISSR 與 RAPD 兩種分子標誌技術分析親本間遺傳相似性並探討其鑑別能力。結果顯示，此兩種分子標誌在分析火鶴花栽培種間之遺傳相似性，均表現高度多型性。ISSR 分析結果，發現 dinucleotide motif : (TC)_n 明顯大量存在於火鶴花基因組內，以此作為引子所表現的多型性最高，在分析火鶴花栽培種間遺傳相似性之結果相近，兩種分子標誌亦均可鑑別部分栽培種。2005 年 Nowbuth 等人曾研究利用 Operon 引子進行 RAPD，分析 24 個火鶴花切花品種，這些分子層次之分析結果，有助於育種親本遺傳背景之瞭解，對加速優良雜交組合之獲得與提升育種效率，均具實用價值。

(二) 組織培養技術

利用組織培養技術取得的火鶴花種苗來源相當多樣，例如利用莖頂分生組織、側芽芽體、嫩葉、花序、花梗、再生組織的葉片與莖節、根段等為培養材料，誘導癒合組織、不定芽的發生、分化與體胚繁殖等都被應用於特定的目的技術開發上。就火鶴花種苗生產的應用而言，組培著重於穩定供應無變異且健康的種苗繁殖生產體系所需之材料。

1974 年 Pierik 首度報導以火鶴花的葉片與種子成功地誘導產生癒傷組織，建立火鶴花組織培養繁殖的契機，同時促進新品種推廣與產業的快速發展；1980 年 Kunisaki 利用生長點及腋芽進行培養，可產生多芽及增殖，此種芽長芽的組培方式應該較有利於低變異種苗生產，但是火鶴組織通常具有內生菌，表面消毒不易去除。1991 年 Kuehnle 等則建立原生質體培養的雛型，但卻無法誘發後續的細胞分裂，也發表了基因型對火鶴花癒傷組織誘導的影響；次年 Kuehnle 等發表以再生培植體誘導體胚發生，及體胚再生植株成功的案例；Hamidah 等 (1997) 也自紅苞芋葉片誘導體胚形成。1994 年 Norman 指出，在肉眼無法察覺且培養基沒有可辨識的污染狀態

下，細菌性葉枯病（危害火鶴花之主要病害）的病原仍然可能存在於火鶴花的癒傷組織或增殖的芽體內，推翻了一般認為組培苗不帶病原菌的認知。這些帶有病原菌的種苗，因其植株內病原濃度與栽培環境差異，可能在苗期或開花期才大量發病，而造成產業的損失。因此使得組織培養在火鶴花種苗利用上，多了一道以特定培養基篩檢細菌性葉枯病的過程，來確定組培苗不帶有重大危害種苗生產的病原菌。1997 年 Teng 則建立以液體或浮橋式大量培養火鶴花再生培植體的模式，提供一項可短期大量繁殖種苗的培養方式。

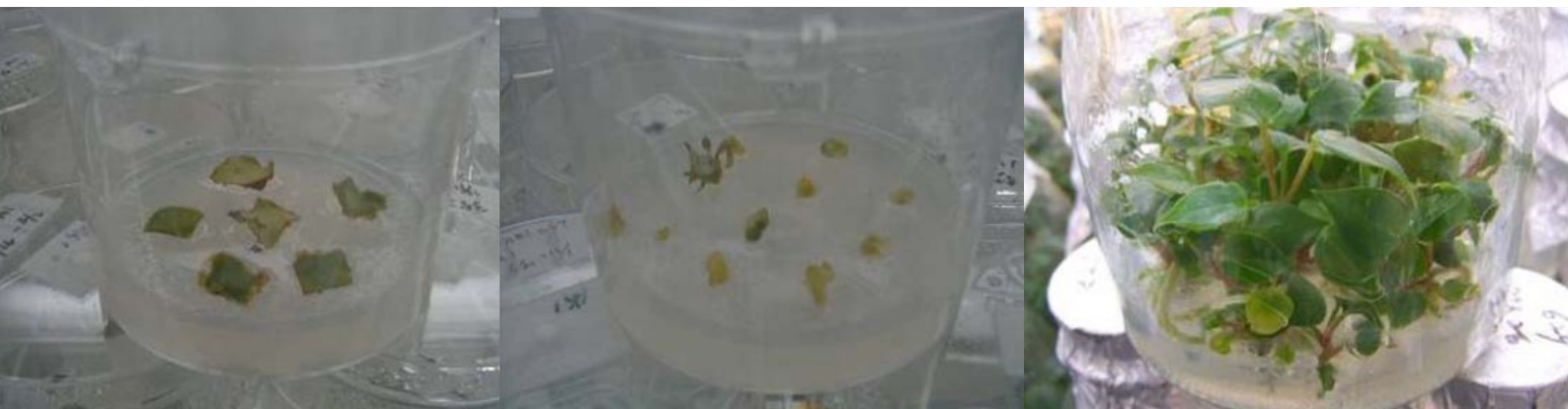
就組織培養繁殖火鶴花種苗而言，癒傷組織之誘發是成功與否的限制因子，且因不同的基因型（品種）而有明顯的差異，培養基與品種間的差異需各別克服。基本上以修正的 MS 或 Nitsch 培養基為基礎，適度調整（降低）氮源濃度與氮源型態，在適當的生長調節劑 (2,4-D, BA, TDZ, picloram) 下誘導癒傷組織發生（楊等人，2002、2003），但不適當的培養基會導致種苗變異率提高。在田間種苗培育上已經證實，高濃度的細胞分裂素會提高種苗變異率。由於從誘導癒傷組織及不定芽分化需時頗長，應該考慮以生長點進行培養，並去除內生菌之感染，經增殖產生之種苗品質較為穩定（圖四、五）。

(三) 單倍體花藥培養

2003 年印尼與荷蘭合作嘗試建立以花粉或花藥培養誘導單倍體植株的流程，期待經由單倍體株系的建立後，再透過染色體倍加技術獲得同質二倍體，以開發 F1 品種。單倍體植物在育種上，不但能縮短雜交育種週期且易於獲得自交系，而且亦能有效地經由物理或化學方法誘導突變。

(四) 原生質體培養

2007 年比利時的學者 Duquenne 等人以紅苞芋的葉片與胚為材料誘導癒傷組織，並成功地建立原生質體培養技術。而且可由雜交胚建立的原生質體上成功地誘導生成細胞壁，在進行細胞分裂時可成



誘導癒傷組織產生（左）；誘導植株再生（中）；再生植株的增殖（右）

圖四 組織培養過程



圖五 內生菌汙染的火鶴花組培苗

功地進入四細胞期。如何突破原生質體融合，尤其是不能雜交的植物，以及融合後核型的變化等，是當前原生質體培養研究的重點。雖然來自同一種植物所培養的細胞原生質體會自動融合，但來自異種的細胞融合則需藉助外力來誘導，在該報告中也嘗試將火鶴花與白鶴芋的原生質體以電融法成功地誘使其細胞融合，然而尚未見後續的報告。Kuehnle (1997) 則曾經報告火鶴花之原生質體分離及培養，目前亦無植株再生的例子。

（五）誘變(mutagenesis)育種

誘變育種 (mutation breeding) 是一種針對已經存在之基因型進行變異，以產生新型態植物品系的方式。較常使用之誘變方法為處理化學誘變劑如 EMS、疊氮化鈉 (NaN_3)，以及以物理方法的 γ 射線照射。誘變育種的缺點是無法預期結果，因此需要耗費較長的時間進行篩選。組織培養是另一種產生變異之方式，以不同來源的組織或是器官，在特殊的培養環境與培養基成分下進行繁殖時，皆會有不同程度的變異發生，藉此可以選育外表性狀發生變異之植株。火鶴花的盆花品種，包括 Red Hot 經由組培變異 (Orange Hot™) 選出新的花色品系，已在市場上流通。切花品種亦有花色變異的例子，如紅色苞片的「丘比特」在長期、大量的組培繁殖後，在田間也發現有粉紅色及桔色苞片的變異株，另外組培變異可使葉片產生斑紋 (圖六)，雖然這些被宣稱來自於組培變異的植株未經科學證實，但提供了一個利用誘變處理，產生新花色品系的可能性。2003 年 Puchooa 和 Sookun 以不同劑量的 γ -ray 處理火鶴花組培苗，認為火鶴花癒傷組織的致死劑量為 15Gy，對誘變處理而言 5Gy 是較適當的處理劑量。

（六）基因轉殖技術

基因轉殖的方法很多，常見者有基因槍轉殖



圖六 斑葉變異株

法、農桿菌轉殖法及電穿孔法等。利用這些轉殖方法不但可以突破物種親緣遠近的限制，縮短育種年限，甚至可以利用不同物種的特殊性狀基因進行育種，其應用範圍包含改變作物的株型、花型、花色、香味、延長瓶插壽命、抗蟲、抗病、耐逆境等，甚至可以應用在生產二次代謝產物上，例如在抗蟲育種上，選殖蘇力菌的毒蛋白基因，轉植到大豆、玉米、花椰菜等作物，以防禦蛾類幼蟲之侵害。未來可以將此技術應用在火鶴花之抗線蟲育種，或是以基因轉殖技術，將特定的花色或花型基因，由另一物種分離後再轉移至目標作物上，突破種間雜交之障礙，創造新的花色或花型；其他性狀之育種也可以採用此方式，將育種的目標作物所缺乏的性狀基因導入。

由昆蟲免疫反應中，可以分離出抗病基因 *attacin*，1996-1997 年陳等人將基因連接於核酸載

體上，利用農桿菌轉殖到火鶴花細胞核的染色體上 (Chen and Kuehnle, 1996; Chen *et al.*, 1997)。轉殖火鶴花接種細菌後，有些呈現抗細菌性葉枯病菌，有些則不抗。經過適當選拔，可望篩選出抗病之品種 (Kuehnle *et al.*, 2004)。其他植物之抗病基因亦可經過適當改造，轉移到火鶴花植體上，以選育出抗病品種。

此外，火鶴花缺乏帶有黃色基因的種原，而黃花也一直是火鶴花育種者的挑戰目標之一。屏東科技大學利用火鶴花白化苗之節間及幼苗葉片與農桿菌共培養，於篩選培養基誘導產生癒合組織，於再生培養基中分化產生轉殖之芽體，經報導基因及 PCR 分析證明已轉入火鶴基因組，利用此一技術未來可運用於抗蟲、抗病、香氣或花色基因的轉殖上。黃色花火鶴品種目前相當少，既有之品種色澤不深，且易受溫度影響而不表現黃色素，屏東科技大學已由文心蘭花朵選殖到類胡蘿蔔素結合蛋白基因 (*fibrillin*，或稱 *carotenoid-binding protein*, *CHRC*)，它的基因產物可以與類胡蘿蔔素結合並貯存在色素體中，導致花朵呈現黃色。瓜類花冠的黃色即是由類胡蘿蔔素與 *CHRC* 結合而表現的結果。因此，如能利用基因轉殖技術選育黃色花之火鶴花品種，將可增加切花市場新品種的選擇，創造利潤。

(七) 火鶴花花色之研究

Kamemoto 及其研究團隊將火鶴花佛焰苞的花色分為紅、橘紅、粉紅、桃紅及白色等五種基本顏色。Kamemoto 等 (1988) 指出火鶴花佛焰苞顏色之遺傳是由複對偶基因 (*multiple alleles*) 所控制，*Rr* 表示紅色，*Ro* 表示橘色，*r* 則表示白色之基因，因此基因型 *RrRr*、*RrRo* 及 *Rrr* 的表現型為紅色，*RoRo* 為橘紅色，*Ror* 為桃紅色，*rr* 為白色，而各顏色之深淺仍受修飾基因 (*modifying genes*) 之影響。而後之研究顯示，佛焰苞顏色至少受到兩對基因調節花青素所控制，*M* 基因控制 *cyandin 3-rutinoside* 的合成，*O* 基因控制 *3-rutinoside* 的合成，*O* 對 *M* 具上



圖七 低光照，20°C下青紅心（Pistache）的花色表現（正常為綠色紅心）

位性。Wannakraij 及 Kamemoto(1990) 指出隱性基因 *p* 會影響由 *M* 及 *O* 所控制的花青素顏色，因此產生了紫色佛焰苞，其基因型為 *M-O-p-p*。至於其它雜色花之遺傳基礎則無相關資料。2004 年 Collette 等人成功地建立火鶴花 RNA 萃取技術，並選殖了這兩種花青素生合成過程中的重要調控基因如 *ANS*、*CHS*、*F3H* 及 *DFR* 等（圖七）。

結語

目前台灣火鶴花的栽培面積仍逐年增加，但所栽種的火鶴花品種絕大部分由荷蘭引進。以種苗大量繁殖技術而言，台灣的組織培養技術已相當純熟，然而種苗純度與葉枯病檢測技術仍有待加強，經由生物技術的協助應可縮短研發時程。在協助新品種開發上，模里西斯與印尼已開始從事誘變與單倍體育種的開發工作，而台灣在火鶴花基因轉殖技術上則有領先的優勢。未來應優先考慮新花色基因與抗病性基因的導入研究。由於品種主要來自荷蘭，在台灣氣候環境下，如綠肩品種 (*obake*) 的花色表現並不穩定，而花色基因上的研究恰可提供改善台灣火鶴花週年花色不穩定的一個新研究空間。另外，如何透過對花色基因表現與調控之研究，穩定品種特性之表現，則直接影響農民收益與外銷競爭力。

AgBio

莊耿彰 行政院農業委員會農業試驗所 花卉研究中心
副研究員兼育種系主任
陳福旗 國立屏東科技大學 農園系 教授
王昭月 行政院農業委員會農業試驗所 生物技術組
助理研究員
謝廷芳 行政院農業委員會農業試驗所 花卉研究中心
研究員兼中心主任

參考文獻

1. 王昭月、莊耿彰、范明仁 (1999) 以逢機增殖多型性DNA(RAPD)進行火鶴花栽培種鑑定與遺傳歧異性之分析。中華農業研究，48:52-63。
2. 王昭月、莊耿彰、范明仁 (2001) 以ISSR與RAPD分子標誌分析火鶴花栽培種間遺傳相似性。中華農業研究，50:54-67。
3. 吳繼光、林素禎、林淑媛、莊耿彰 (2000) 微生物接種對於火鶴花(*Anthurium andraeanum*)組織培養苗生育之影響。中華農業研究，49:57-62。
4. 楊苑欣、陳福旗、蔡巨才 (2002) 細胞分裂素對火鶴花試管苗葉片培養再生之影響。中國園藝，48:371-378。
5. 楊苑欣、林金和、陳福旗 (2003) Thidiazuron 及 2,4-D 或 picloram 促進火鶴花試管苗葉片之培養基再生不定芽。中國園藝，49:375-381。
6. Chen, F. C. and Kuehne, A. R. (1996) *Obtaining transgenic Anthurium through Agrobacterium-mediated transformation of etiolated internodes*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:47 - 51.
7. Chen, F. C., Kuehne, A. R., and Sugii, N. (1997) *Anthurium roots for micropropagation and Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49:71-74.
8. Collette, V. E., Jameson, P. E., Schwinn, K. E., Umaharan, P., and Davies, K. M. (2004) *Temporal and spatial expression of flavonoid biosynthetic genes in flowers of Anthurium andraeanum*. Physiol Plant. 122:297-304.
9. Duquenne, B., Eeckhaut, T., Werbrouck, S., and van Huylenbroeck, J. (2007) *Effect of enzyme concentration on protoplast isolation and protoplast culture of Spathiphyllum and Anthurium*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 91:165-173.

參考文獻

10. Hamidah, M., Karim, A.G.A., and Debergh, P. (1997) *Somatic embryogenesis and plant regeneration in Anthurium scherzerianum*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 48:189-193.
11. Henny, R. J., Poole, R. T., and Conover, C. A. (1988) "Southern Blush" *Anthurium*. HortScience 23:922-923.
12. Kamemoto, H., and Kuehnle, A. R. (1996) *Breeding Anthuriums in Hawaii*. University of Hawaii Press. pp132.
13. Kamemoto, H., Iwata, R. Y., and Marutani, M. (1988) *Genetics of the major spathe colors in anthurium*. Hawaii Inst. Trop. Agr. Humam Resources Res. Ser. 56.
14. Kobayashi, R. S., Brewbaker, J. L., and Kamemoto, H. (1987) *Identification of Anthurium andraeanum cultivars by gel electrophoresis*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:164-167.
15. Kuehnle, A. (1997) *Progress in protoplast isolation and culture from axenic tissues of hybrid Anthurium*. Aroideana 20:147 - 154.
16. Kuehnle, A. R., and Sugii, N. (1991) *Callus induction and plantlet regeneration in tissue cultures of Hawaiian Anthuriums*. HortScience 26:919-921.
17. Kuehnle, A. R., Chen, F. C., and Sugii, N. (1992) *Somatic embryogenesis and plant regeneration in Anthurium andraeanum hybrids*. Plant Cell Rep. 11:438-442.
18. Kuehnle, A. R., Fujii, T., Chen, F. C., Alvarez, A., Sugii, N., Fukui, R., Aragon, S., and Jaynes, J. M. (2004) *Peptide biocides for engineering bacterial blight tolerance (and susceptibility) in cut flower anthurium*. HortScience 39:1327-1331.
19. Kunisaki, J. T. (1980) *In vitro propagation of Anthurium andraeanum Lind*. HortScience 15:508-509.
20. Norman, D. J., and Alvarez, A. M. (1994) *Latent infections of in vitro anthurium caused by Xanthomonas campestris pv. dieffenbachia*. Plant Cell Tissue Organ Cult 39: 55-61.
21. Nowbuth, P., Khittoo, G., Bahorun, T., and Venkatasamy, S. (2005) *Assessing genetic diversity of some Anthurium andraeanum Hort. Cut-flower cultivars using RAPD Markers*. Afri. J. Biotechnol. 4:1189-1194.
22. Pierik, R. L. M., Steegmans, H. H. M., and Van der Meys, J. A. J. (1974) *Plantlet formation in callus tissues of Anthurium andraeanum Lind*. Sci. Hort. 2:193 - 198.
23. Puchooa, D., and Sookun, D. (2003) *Induced mutation and in vitro culture of Anthurium andraeanum*. Food and Agricultural Research Council, R duit, Mauritius p17-27.
24. Stiles, J. I., Lemme, C., Sondur, S., Morshidi, M. B., and Manshardt, R. (1993) *Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars*. Theor. Appl. Genet. 85:697 - 701.
25. Teng, W. L. (1997) *Regeneration of Anthurium adventitious shoots using liquid or raft culture*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 49:153 - 156,
26. Wannakrairoj, S., and Kamemoto, H. (1990) *Inheritance of purple spathe in Anthurium*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:169-171.
27. Welsh, J., and McClelland, M. (1991) *Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers*. Nucleic Acids Res. 19: 5275-5279.