利用PCR選殖菊花rDNA之內轉錄間隔區[1]

黃勝忠、蔡奇助、許謙信[2]

摘　要

設計一組引子(primer)，序列分別為IT1-5'CGTAACAAGGTTTCC3'和IT2-5'AGTTTCTTCTCCTCC3'，可有效複製6個菊花品種(系)的5.8S核糖體核酸(rRNA)基因與內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)，經聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)複製產物長度為747 bp。將其中一品種的內轉錄間隔區進行定序，扣除兩端引子長度(30 bp)，總長為717 bp，與其他高等植物的相同區域比較，發現PCR產物有27 bp屬於18S rRNA基因的3'端，與52 bp屬於26S rRNA基因的5'端。因此，內轉錄間隔區實長為638 bp，此區包含ITS1、5.8S rRNA基因與ITS2等三區，其長度分別為253 bp、164 bp及221 bp。由上述研究証實，本研究之引子可藉由PCR技術，將各菊花品種(系)rDNA之ITS有效選殖，其中ITS1及ITS2為變異快速之DNA區域，可以由此獲得許多分子標誌，供未來應用於品種鑑別及新品種保護上。

關鍵字：菊花、聚合酶連鎖反應、核糖體核酸、內轉錄間隔區。

前　言

菊花(*Dendranthema grandiflorum* Ramat)為菊科(Compositae)菊屬(Chrysanthemum)[(1)]，具54條染色體(chromosome)，且屬自交不親和之6倍體(2n=6x=54)植物[(33,35)]。菊花品種繁多，為世界三大重要切花之一[(18)]，在中國及日本的栽培歷史已有3,000年[(33)]。菊花之所以成為經濟栽培之花卉，其原因是菊花具有花色、花型繁多且多變化，容易進行產期調節，可以周年栽培提供切花，切花瓶插壽命長等優點。除了切花外，尚可做為盆花或花壇，是利用範圍廣之花卉。菊花為台灣地區歷年來栽培面積最大宗之切花作物[(3)]，栽培面積有1,600 公頃，年產量達三億餘支，主要除供應國內市場外，亦外銷日本、香港及東南亞等地，並曾有數千萬支之外銷實績。

真核生物的核糖體核酸(ribosomal DNA, rDNA)是一群成串(cluster)縱線排列(tandem array)的重覆性基因家族(repeated gene families)，位於染色體的核仁組成中心(nuclear organizer region)，通常集中在同一染色體中，也可能分散於不同染色體[(4,14,32)]。rDNA的各個重覆單位間皆能保持相似，此現象可能是受到不等重組(unequal recombination)和基因轉變 (gene conversion)的調控[(11)]。此外，每個重覆單位(repeat unit)包含一段可被轉錄的密碼序列

---

[1] 台中區農業改良場研究報告第 0520 號。

[2] 台中區農業改良場研究員及助理研究員。

(coding sequence)，和一段非轉錄的基因間隔區(intergenic spacer, IGS)。可轉錄的密碼序列中，包含18S、5.8S及26S rRNA等三個基因，其中5.8S rRNA基因分別與18S及26S rRNA基因間各有一個內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)。當rDNA初轉錄形成一轉錄單位(transcription unit)時，經一系列修飾(processing)，上述2個轉錄間隔區會在修飾的過程中除去，產生成熟的rRNA (mature RNA)[9,12,30]。成熟的18S、5.8S、26S rRNA與核糖體蛋白組成核糖體(ribosome)，而核糖體即是蛋白質合成地點。因此，rDNA在蛋白質合成，生物體生長、發育與生殖上扮演重要角色[26]。

在rDNA之結構中，在18S、5.8S和26S rRNA基因中之序列，在不同物種間亦相當一致；但在不同種內、族群中，ITS和IGS之區域中，其長度及序列上常有很大變異[12,14,28]。因此，ITS與IGS之DNA序列可提供一些有用的分子標誌。就ITS之序列而言，已有許多報告利用此序列來探討族群的親緣關係，如Madiinae亞族(菊科)[6]、*Calycadenia*屬(菊科)[7]、*Antennaria*屬(菊科) [10]、*Paeonia*屬(毛茛科)[22]、*Sorghum*屬(禾本科)[27]、*Arcenthobium*屬(Viscaceae)[19]及Apioideae亞族(Apiaceae)[13]等。

聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)技術自西元1984年問世後，因具有快速、專一性、靈敏性且易於操作等優點，適合用來解決分析許多生物學上的問題。在PCR的反應中，需於複製的DNA兩端，各設計一條引子(primer)，於反應管中加入四種deoxynucleoside triphosphate (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)當建材，和微量的DNA當模板(template DNA)，在含適當的鹽和緩衝液下，DNA聚合酶可以進行聚合反應。隨著改變溫度循環，經模板DNA兩股打開(denature)、引子煉合(annealing)以及引子的延伸(extension)等三過程，可以將兩引子間的DNA片段大量複製[5]。

本研究藉由比對基因庫中已發表的DNA 序列，設計一組引子，利用PCR技術，將菊花rDNA之ITS選殖出來，可以獲得一些分子標誌，供未來應用於菊花品種鑑定及新品種保護等方面。

材料與方法

一、試驗材料

本研究以四個菊花商業品種及兩個台中區農業改良場雜交品系為材料，分別為寒紅梅(Cold Homae)，紅貴妃(Red Gafe)，黃秀芳(Yellow Shuho)，白秀芳(White Shuho)，紅貴妃×寒紅梅[Red Gafe (♀)×Cold Homae (♂)]，黃秀芳×寒紅梅[Yellow Shuho (♀)×Cold Homae]。

二、試驗方法

(一)DNA之抽取

修改Shure等人[25]的方法抽取菊花幼葉之總DNA。其步驟如下：取菊花幼葉約0.5 g，剪成碎片，用液態氮在研缽中研磨成粉，將粉末移至1.5 ml的離心管，加入700 µl事先60℃預熱過的urea buffer (8.0 M urea, 0.05 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.02 M

EDTA, 1% sarcosyl)，混合均勻後，置於60℃水浴下10分鐘，並時常混合。然後加入700 µl的phenol:chloroform=1:1 (v/v, phenol經Tris pH 8.0飽和過)，充分混勻後於4℃下10,000 rpm離心10分鐘，取上層液經過濾，移至另一新的離心管，並加入0.7倍體積的2-propanol與1/10體積4.4 M的NH_4OAc，置於-20℃ 2 hrs以沈降DNA，然後取出離心管於4℃下，以10,000 rpm離心10分鐘，倒掉上層液，以1 ml 70%酒精清洗之後再離心，倒掉酒精，簡單乾燥後，加入400 µl的TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)溶解DNA，並加入5 µg RNase，於65℃下反應10分鐘後，加入500 µl同上的phenol: chloroform=1:1 (v/v)，於4℃下10,000 rpm離心10分鐘，取上層液移至另一新的離心管，並加入45 µl 4.4 M NH_4OAc及3倍體積95%的酒精，均勻混合，置於-70℃下30分鐘以沈降DNA，然後取出並於4℃下10,000 rpm離心10分鐘，倒掉上層液，以1 ml 70%酒精清洗並離心DNA二次，最後倒掉上層液，抽氣乾燥，加入20 µl的TE buffer及180 µl的殺菌水溶解DNA，存於-20℃中備用。

(二)DNA定量

取總DNA抽取液5 µl溶於495 µl的水中，注於石英比色管中，經充分混合後，將比色管置入分光光度計(Hitachi U-2001 Spectrophotometer)中，以波長260 nm紫外光測定吸光度，所得的吸光度值乘以50，再乘以稀釋的倍數，即原抽取液之DNA濃度(ng/µl)。依不同樣品DNA抽取液的濃度，將各DNA樣本稀釋成8 ng/µl，做為模板DNA之用。

(三)PCR反應[5]

PCR的反應內容物及濃度如下：10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% (w/v) geltin, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dTTP與IT1及IT2引子各0.5 µM，最後加入80 ng的模板DNA，加無菌水總體積補成50 µl，置於0.6 ml的微量離心管，再於溶液表面加入50 µl的礦物油(mineral oil)，以防止熱循環過程中蒸散，將微量離心管置入熱循環器(Biometra)。反應的熱循溫度及時間如下，先以94℃反應10分鐘，然後加1.25 units的*Taq* DNA聚合脢，接下來溫度及時間如下，94℃反應45秒，52℃反應20秒，72℃反應1分鐘等三步驟進行10個循環，接著再94℃反應45秒，50℃反應20秒，72℃反應1分鐘等三步驟進行30個循環，最後72℃反應10分鐘。

(四)電泳分析[2]

取0.8 g的瓊脂粉末(agarose)，加熱溶於100 ml TBE緩衝液中(40 mM Tris-boric acid, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)，配成0.8%瓊脂膠，倒入適當模板架，架上齒梳(comb)，做成瓊脂膠平板電泳片，待凝固後，取出齒梳，將電泳片置入盛TBE緩衝液的電泳槽中，將擬分離的DNA樣品(即PCR複製產物)混以1/10倍體積的追蹤染劑(tracking dye) [0.25% bromophenol blue, 40% (w/v) sucrose in water]，於近齒孔端接負極通電後，DNA樣品會往正極跑。電壓視膠體大小(5 V/cm)而定，當追蹤染劑到達佔膠體長4/5時，關掉電源，取出膠體，經EtBr (ethidium bromide, 0.5 µg/ml)染色後，可在紫外燈下觀察、照相。

(五)Glass milk回收DNA

利用Geneclean Kit Ⅱ (BIO 101)為之，將PCR複製產物以瓊脂膠體電泳分離，經EtBr染色後，在UV-box使用長波長UV光觀察DNA條帶(band)，將此DNA回收供接合反應用，以便後續之定序工作。用解剖刀將上述DNA條帶膠塊切下，置入1.5 ml微量離心管中，每100 mg的膠塊加入500 µl NaI solution (6 M sodium iodide)，置於50℃水浴中，時常將微量離心管翻轉，至膠塊完全溶解後，取出並加入適量的Glass milk (回收DNA量在5 µg以下，則加入5 µl的Glass milk，每增加1 µg，需增加1 µl Glass milk)，翻轉數次，使之均勻混合，並置於冰中5分鐘，使DNA得以與Glass milk結合，瞬間離心，使Glass milk沈澱，倒掉上層液，以500~700 µl的new wash solution (NaCl/ethanol/water)清洗沈澱物3次，最後將沈澱物以適量無菌水懸浮，於10,000 rpm離心5分鐘，取上層液至一新的微量離心管，即取得回收之DNA。

(六)DNA序列分析

1.菌種與質體

實驗中所使用的細菌為大腸桿菌JM109，質體為T-vector。

2.培養液與洋菜培養基

(1)LB培養基：含tryptone (Peptone 135) 10 g/l，酵母萃取液5 g/l，NaCl 10 g/l加水至1公升，用NaOH調整至pH 7.5，殺菌備用。

(2)洋菜培養基：LB培養基加洋菜膠(15 g/l)殺菌後，分成2部分，一部分加入氨比西林(ampicillin, Ap) (0.1 µg/µl)，X-gal (0.08 µg/µl)及IPTG (0.08 µg/µl)，混勻後，倒培養基於培養皿中，做為轉型後菌種篩選用；另一部分僅加入Ap (0.1 µg/µl)，做為暫時保存轉型成功之菌種用。

3.接合作用(ligation)

利用pGEM T-vector (Promega)為之，將PCR產物經電泳進一步純化，以Glass milk回收DNA後，取預定序的DNA 50 ng，加入等量的1 µl質體(T-vector) (50 ng)，及1 µl 10x接合緩衝液(ligation buffer) (0.66 M Tris-HCl pH 7.5, 5.50 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT)相混合，最後加入1 µl T4 DNA接合酶(ligase) (3 units/µl)，補水至10 µl，於15℃下接合3~16 hrs。

4.大腸桿菌勝任細胞(competent cell)的製備[21]

將大腸桿菌以LB培養基37℃培養隔夜，取50 µl移入新鮮1 ml LB培養基中(約稀釋20倍)，37℃培養90分鐘後，於4℃下4,000 rpm離心10分鐘，以500 µl 100 mM $CaCl_2$懸浮，置於0℃下30分鐘後，以4,000 rpm離心5分鐘，除去上層液後，再以200 µl冰冷的100 mM $CaCl_2$懸浮，即完成勝任細胞之製備。

5.大腸桿菌的轉型作用(transformation)[21]

取大腸桿菌JM109新鮮製備的勝任細胞200 µl，加入接合過的質體10 µl，0℃下靜置30分鐘，移入42℃熱休克(heat shock) 2分鐘後，立刻移入0℃冰中，加入400 µl LB培

養基於37℃下培養45分鐘，取適量塗抹在含Ap、IPTG及X-gal之篩選用培養基中，於37℃下培養12~16 hrs。

6.質體DNA抽取[21]

轉型作用後塗於篩選培養基12~16 hrs，會形成藍、白菌落，用牙籤挑出白色菌落，培養於1.5 ml含1 ml LB培養基的微量離心管中，培養隔夜後，10,000 rpm離心30秒，除去上層液，倒置1分鐘，將殘留培養基完全除淨，加入100 µl solution Ⅰ (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA)振盪懸浮菌體，冰浴5分鐘，加200 µl solution Ⅱ (0.2N NaOH, 10% SDS)均勻混合後，冰浴5分鐘後，再加入150 µl solution Ⅲ (3M KOAc pH 4.8)混合均勻，置於0℃下10分鐘，以10,000 rpm離心10分鐘，取上清液，加0.6倍體積的2-propanol，置於-20℃下30分鐘，沈澱質體DNA，再以12,000 rpm離心10分鐘後，用70%酒精洗DNA 1至2次，真空乾燥10分鐘後，溶於50 µl TE中(加入RNase 20 µg/µl)，用*Eco*RI限制脢將接入質體欲定序的DNA 兩端切下，然後跑電泳，以確定欲定序的DNA片段已與質體接合，並能隨質體複製。

7.定序用質體的抽取

利用Qiagen-tip 20 (Qiagen)為之，將隔夜培養的菌液5 ml，倒入10 ml離心管，4℃下4,000 rpm離心10分鐘，倒置1分鐘後，加入0.3 ml buffer P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8.0, RNase 100 µg/ml)振盪懸浮細菌團(pellet)，之後加入0.3 ml buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS)，慢慢混勻，置於室溫下5分鐘，再加入冰冷的buffer P3 (3.0 M KOAc pH 5.5)，即刻慢慢混勻，置於冰中10分鐘，10,000 rpm離心15分鐘，取上層液注入事先已用1 ml QBT (750 mM NaCl, 50 mM Mops, 15% ethanol, 0.15% Trito X-100, pH 7.0)平衡過的QIAGEN-tip 20，再利用1 ml buffer QC (1.0 M NaCl, 50 mM Mops, 15% ethanol, pH 7.0)流洗QIAGEN-tip 20四次，用0.8 ml的buffer QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% ethanol, pH 8.5)將DNA溶洗出來，加入0.7倍體積的2-propanol沈澱DNA，混勻後，以12,000 rpm離心30分鐘，除去上層液，用1 ml 70%酒精1~2次，倒置10分鐘後，溶於適量TE buffer中。

8.利用螢光標識DNA定序法

利用AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia)進行，配合自動定序儀，以讀取質體中欲定序之DNA的序列，其方法如下：

(1)定序引子對質體的煉合

取32 µl內含5~10 µg的質體DNA，置於1.5 ml離心管中，加入8 µl 2 M NaOH簡單振盪和離心後，置於室溫下10分鐘，加入7 µl 3 M sodium acetate (pH 4.8)和4 µl的無菌水，隨後加入120 µl 100%酒精，並加以混勻，於-70℃下靜置20分鐘後，取出並12,000 rpm離心15分鐘，倒掉上層液，用70%酒精清洗1~2次，簡單真空抽氣乾燥。溶於10 µl的無菌去離子水中，加入螢光引子(fluorescent primer) 2 µl(約4~6 pmol)，再加2 µl煉合緩衝液(annealing buffer)，總體積成14 µl，輕微振盪、離心後，

置於65℃預熱5分鐘，即刻移至37℃中10分鐘，取出置於室溫下至少10分鐘，此時煉合完成。簡易離心後，加入1 μl的延伸緩衝液(extension buffer)和3 μl DMSO，即刻進行定序反應。

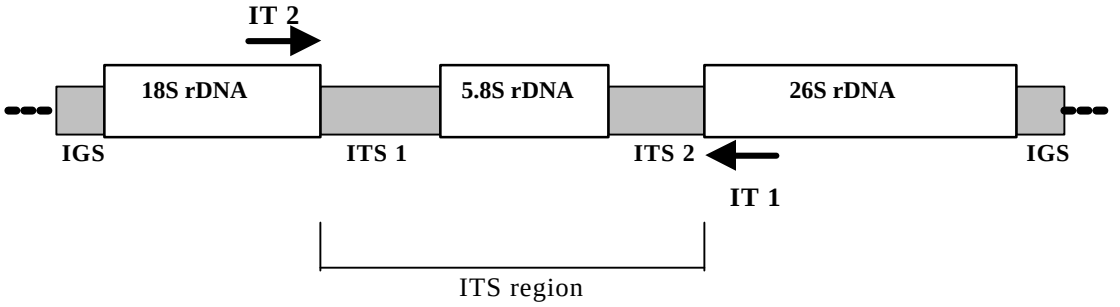
(2)定序反應

進入定序反應前，先分別分裝2.5 μl的"A" mix、"C" mix、"G" mix及"T" mix於新的離心管，置於冰中，待使用前，於37℃下至少1分鐘。加入2 μl的T7 DNA polymerase (6~8 units/2 μl)於已加延伸緩衝液和DMSO的煉合反應中，簡單振盪離心，即刻取4.5 μl於每一已37℃預熱的A、C、G、T mix管中，用微量吸管(pipetman)混合2~3次後，又置回37℃，反應5分鐘後，分別於4管中加入stop solution，再用微量吸管混合2~3次，取出置於90℃ 2~3分鐘後，立刻插入冰中。取4~6 μl跑定序膠體，以電泳加以分離，經電腦的記錄即可讀出序列來。

結果與討論

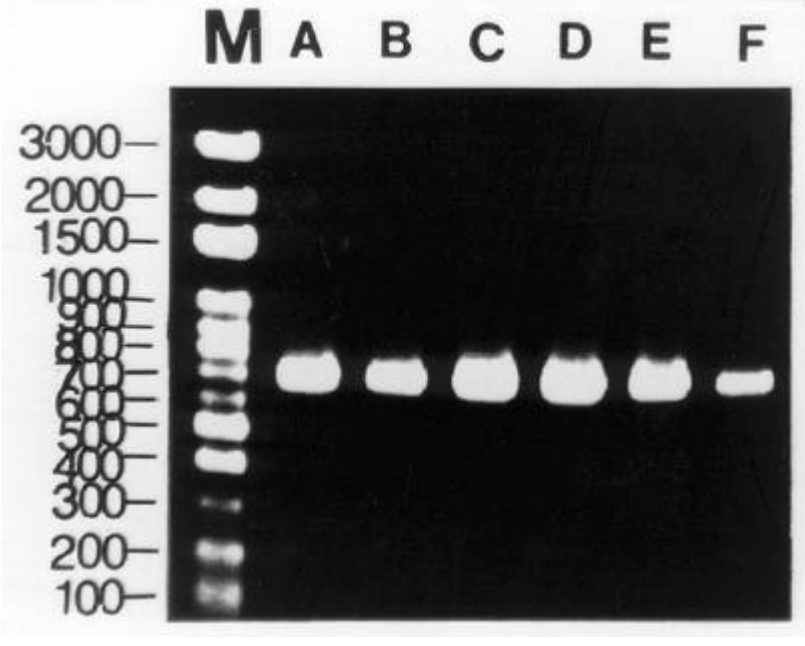
由GenBank序列比對的研究，於18S rRNA基因的3'端與26S rRNA基因的5'端的序列保留區(conserved sequence region)[16,17,29,31]各設計一條15 mer的引子(圖一)，序列分別為IT1-5' CGTAACAAGGTTTCC3'和IT2-5'AGTTTCTTCTCCTCC3'，其G+C百分比皆為 46.7%，引子IT1及IT2之3'端皆為CC。在PCR反應條件方面，為獲取特異性(specific)與產量高的複製產物，本研究採用以下二種策略行之，其一為熱開始，即先以94℃反應10分鐘後，使模板DNA (template DNA)兩股完全打開，以利引子煉合，然後再將Taq DNA polymerase加入反應管中，以避免在配製反應溶液時，若Taq DNA polymerase已先行加入，隨即能行聚合反應，而此時所製造的DNA皆為非特異性的複製產物[5]。另一策略是進行二步驟(2-step)之溫度循環，即提高起始的幾個溫度循環之煉合溫度，以避免引子與菊花基因組中其它不完全配對的區域煉合，產生非特異性產物。如此，早期高特異性PCR產物，在接下來的溫度循環即能佔有利先機，大量被複製[20]。但又不能將所有溫度循環的煉合溫度皆設定為較高溫狀態，此會造成PCR複製產物產量降低。經由上述二種策略確可將菊花rDNA之ITS大量且有效的複製，其長度約747 bp，且各樣本皆能有效複製(圖二)。

為進一步證實上述PCR產物即為菊花rDNA之ITS區域，我們將紅貴妃品種進行定序，扣除兩端各15 bp的引子，定出的序列長為717 bp，將此序列送入基因庫進行比對，證實此DNA片段為rDNA之ITS區域，其中有27 bp屬於18S rRNA基因3'端，52 bp屬於26S rRNA基因5'端，真正屬於ITS區域的序列有638 bp，其中有253 bp為ITS1，164 bp為5.8S rRNA基因，221 bp為ITS2序列，因此可證實PCR產物確為ITS。與菊科萵苣屬的萵苣(*Lactuca sativa* L.) rDNA之ITS[15]相比較，在5.8S rRNA基因區中，兩者長度皆為164 bp，其相似度為96.3%；在ITS1及ITS2區域中，萵苣的長度分別為251 bp及221 bp，與菊花紅貴妃品種相比較，兩者序列互有缺失(deletion)及插入(insertion)情形，相似度分別為67.0%及72.4%(圖三)。此結果亦支持rDNA中之ITS1及ITS2區域在演化過程中較容易產生變異。



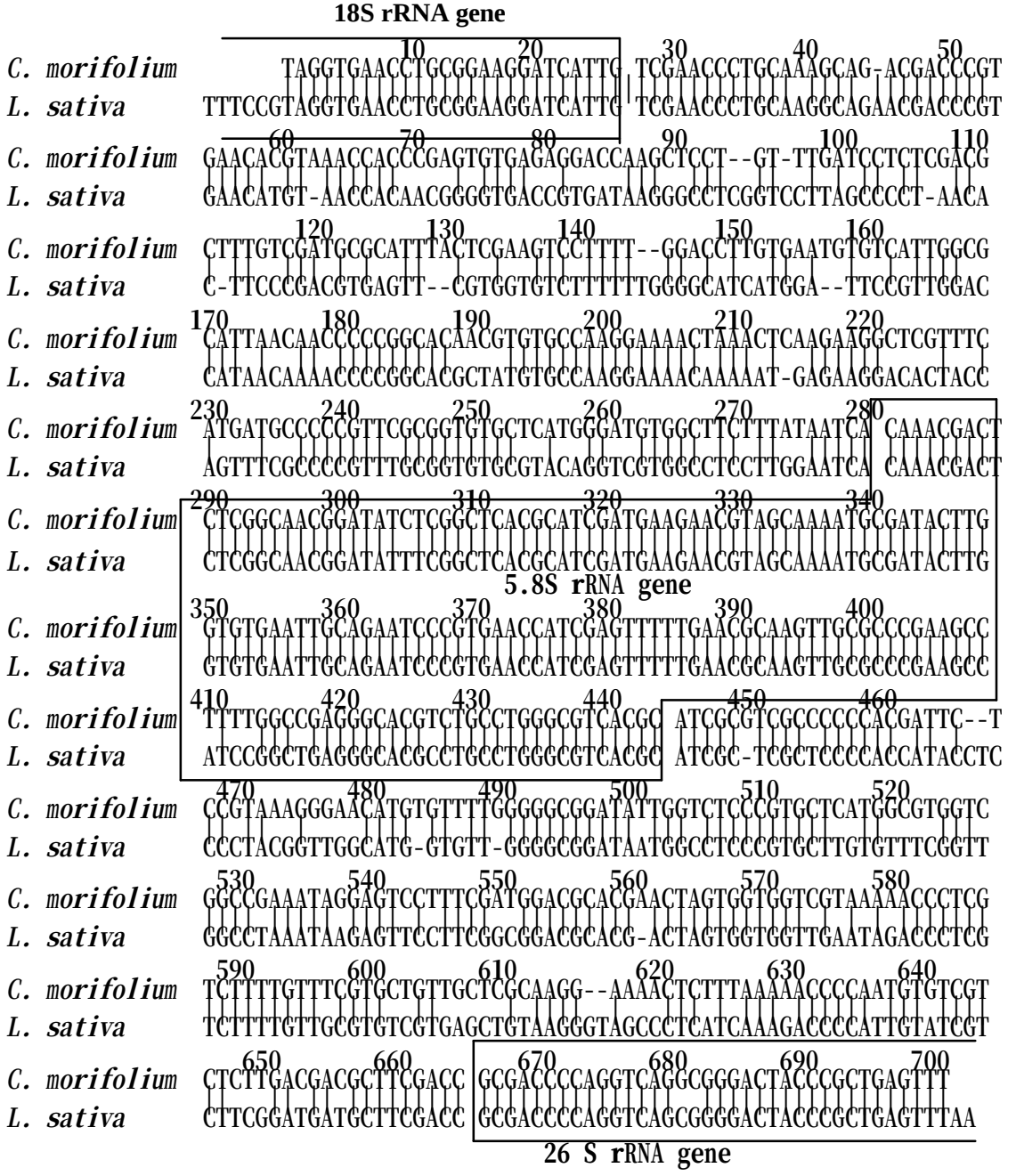
圖一、單一 rRNA 基因串之基本結構及利用 PCR 複製基因間隔區(ITS)之引子(IT1 及 IT2)位置圖。

Fig. 1. The positions of internal transcribed spacer (ITS) regions relative to 18S, and 26S rRNA genes and the intergenic spacer (IGS). Relative positions of primers (IT1 and IT2) used for PCR and sequencing are indicated.



圖二、利用 PCR 複製各菊花品種之核糖體核酸內轉錄間隔區(ITS)，經 0.8%瓊脂膠分離結果。由左至右分別為分子標誌(M)、寒紅梅(A)、紅貴妃(B)、黃秀芳(C)、白秀芳(D)、紅貴妃×寒紅梅(E)、及黃秀芳×寒紅梅(F)。

Fig. 2. The rDNA ITS region of *Chrysanthemum morifolium* Ramat were amplified by PCR, separating on 0.8% agarose. Lane 1 is marker; lane 2 to 7 are six samples, belonging 'Cold Homae', 'Red Gafe', 'Yellow Shuho', ' White Shuho', [Red Gafe (♀) x Cold Homae (♂)], and [Yellow Shuho (♀) x Cold Homae (♂)], respectively.



圖三、菊花紅貴妃品種(*C. morifolium*)與萵苣(*L. sativa*)之 5.8S 核糖體核酸及內轉錄間隔區序列比較。圖中框線區域即為基因區，由上而下分別為 18S、5.8S 及 26S 核糖體核酸基因。ITS1 位於 18S 與 5.8S rRNA 基因間；ITS2 位於 5.8S 與 26S rRNA 基因間。

Fig. 3. The comparison of nucleotide sequence of a 5.8S rRNA gene and of internal transcribed spacers between *Dendranthema granfdiflorum* Ramat 'Red Gafe' and *Lactuca sativa* L. (Accession numbers are AF116239 and L 13957 in Genbank, respectively). Positions of rRNA genes, i.e. 3'end of 18S rRNA gene, 5.8S rRNA, and 5' end of 26S rRNA, are boxed. The ITS1 locates between 18S and 5.8S rRNA, and ITS2 locates between 5.8S and 26S rRNA.

另外，與菊科其它屬之ITS相比較，在Argyroxiphium, Arnica, Dubautia, Hulsea, Madia, Raillardella, Raillardiopsis, Wilkesia等屬中，其rDNA之ITS1長度在254~261 bp間，ITS2長度在216~223 bp間[8]；Krigia, Pyrrhopappus, Microseris, Agoseris, Stephanomeria及萵苣(Lactuca)等屬中，其rDNA之ITS1長度在246~253 bp間，ITS2長度在220~222 bp間[15]；Dendroseris rDNA之ITS1長度為253或254 bp，ITS2長度為224或225 bp[23]。就5.8S rRNA基因方面，上述各屬之序列長度皆為164 bp[8,15]。綜合前人研究與本研究結果，亦支持ITS1及ITS2為演化過程中較容易產生變異的區域。就分類觀點而言，ITS1與ITS2之長度及G+C百分比似乎與分類群無關，如單子葉植物與雙子葉植物之ITS1及ITS2之長度及G+C百分比並無一定的規則，甚至在科(Family)之階層亦如此。以豆科(Leguminosae)植物為例，野豌豆屬之蠶豆(*Vicia faba*)[34]與豇豆屬之*Vigna radiata*[24]雖屬同科，但蠶豆之ITS1之長度與G+C百分比之值皆較ITS2大；反之，*Vigna radiata*之ITS1之長度與G+C百分比之值卻較ITS2小。不過，在菊科已發表各屬植物中，rDNA之ITS1皆較ITS2長[15]，本研究之菊屬植物亦如此。由於ITS1、ITS2區域在演化過程中容易產生變異，而且因其變異度大，因此較適合探討較相近分類群之親緣關係(phylogenetic relationship)，以高等植物為例，菊科植物被研究最多，如Madiinae亞族[6]、Calycadenia屬[7]、Krigia屬[15]、Dendroseris屬[23]及Antennaria屬[10]等之親緣研究。

本研究所設計之引子組，確能利用PCR有效的將菊花rDNA之ITS加以選殖，而且並非僅針對某個品種，而是各種菊花品種(系)皆能有效選殖，因此，對菊花而言是一組廣效性引子。另外，由於ITS在演化的過程中是屬較易變異之區域。因此，可藉分析ITS區域來尋找各菊花品種(系)的分子標誌，以便可應用於品種鑑定及新品種專利上。

誌　謝

本研究承行政院國家科學委員會(NSC 88-2317-B-067A-001)計畫資助；邱苡珊小姐、白佳惠小姐協助試驗工作，謹此一併申謝。

參考文獻

1. 侯寬昭 1991 中國種子植物科屬詞典 p.142 修訂版 南天書局 台北 台灣。
2. 陳瑞英、周德源 1987 膠體電泳分析DNA片段 p.87-91 電泳分離技術研討會論文集(第九)。
3. 許謙信 1998 吸水預措時機對菊花切花品質之影響 p.215-222 唐菖蒲、百合及菊花研究現況與產發展研討會專刊 台中區農業改良場特刊第40號。
4. Appels, R., W. L. Gerlach, E. S. Dennis, H. Swift and W. J. Peacock. 1980. Molecular and chromosomal organization of DNA sequence coding for the ribosomal RNAs in cereals. Chromosoma 78: 293-311.
5. Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. Annu. Rev. Biochem. 61: 131-156.

6. Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed sequences of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae. Mol. Phylogenetic Evol. 1: 3-16.
7. Baldwin, B. G. 1993. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: Chromosomal and morphological evolution reexamined. Am. J. Bot. 80: 222-238.
8. Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Portor, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue. 1995. The ITS of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Missouri Bot. Gard. 82: 247-277.
9. Barker, R. F., N. P. Harberd, M. G. Jarvis and R. B. Flavell. 1988. Structure and evolution of the intergenic region in a ribosomal DNA repeat unit of wheat. J. Mol. Biol. 201: 1-17.
10. Bayer, R. J., D. E. Soltis and P. S. Soltis. 1996. Phylogenetic inferences in *Antennaria* (Asteraceae: Gnaphalieae: Cassiniinae) based on sequences from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). Am. J. Bot. 83: 516-527.
11. Beech, R. N. and C. Strobeck. 1993. Structure of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene family of white spruce (*Picea glauca*). Plant Mol. Biol. 22: 887-892.
12. D'Ovidio, R. 1992. Nucleotide sequence of a 5.8S rDNA gene and of the internal transcribed spacers from *Populus deltoides*. Plant Mol. Biol. 19: 1069-1072.
13. Downie, S. R. and D. S. Katz-Downie. 1996. A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Am. J. Bot. 80: 234-251.
14. Kato, A., T. Nakajima, J. Yamashita, K. Yakura and S. Tanifuji. 1990. The structure of the large spacer region of the rDNA in *Vicia faba* and *Pisum sativum*. Plant Mol. Biol. 14: 983-993.
15. Kim, K. -J. and R. K. Jansen. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear DNA. Pl. Syst. Evol. 190: 157-185.
16. Kiss, T., A. Szkukalek and F. Solymosy. 1989. Nucleotide sequence of a 17S (18S) rRNA gene from tomato. Nucl. Acids Res. 17: 2127.
17. Kiss, T., M. Kis and F. Solymosy. 1989. Nucleotide sequence of a 25S rRNA gene from tomato. Nucl. Acids Res. 17: 796.
18. Larson, R. A. 1992. Cut chrysanthemum. In Floriculture 2nd. p.3-42. Academic Press. San Diego California.
19. Nickrent, D. C., Schuette, K. P. and E. M. Starr. 1994. A molecular phylogeny of *Arcenthobium* (Viscaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Am. J. Bot. 81: 1149-1160.
20. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

21. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
22. Sang, T., D. J. Crawford and T. F. Stuessy. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6813-6817.
23. Sang, T., D. J. Crawford, S. C. Kim and T. F. Stuessy. 1994. Radiation of the endemic genus *Dendroseris* (Asteraceae) on the Juan Fernandez Islands: Evidence from sequences of the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. Amer. J. Bot. 81: 1494-1501.
24. Schiebel, K. and V. Hemleben. 1989. Nucleotide sequence of the 18S-25S spacer region from rDNA of mung bean. Nucl. Acids Res. 17: 2852-2852.
25. Shure, M., S. Wesster and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. Cell 35: 225-233.
26. Stern, S., T. Poers, L. M. Chang-Chien and H. F. Noller. 1989. RNA-protein interaction in 30S ribosomal subunit; folding and function of 16S rRNA. Science 244: 783-789.
27. Sun, Y., Skinner, D. Z., Liang, G. H. and S. H. Hulbert. 1994. Phylogenetic analysis of sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. Theor. Appl. Genet. 89: 26-32.
28. Taira, T., A. Kato and S. Tanifuji. 1988. Difference between two major size classes of carrot rDNA repeating units is due to reiteration of sequences of about 460 bp in the large spacer. Mol. Gen. Genet. 213: 170-174.
29. Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura. 1984. The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene. Nucl. Acids Res. 12: 5441-5448.
30. Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura. 1985. Nucleotide sequence of the 17-25S spacer region from rice rDNA. Plant Mol. Biol. 4: 355-364.
31. Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura. 1985. The complete nucleotide sequence of a rice 25S rRNA gene. Gene 37: 255-289.
32. Waldron, J., P. Dunsmuir and J. Bedbrook. 1983. Characterization of the rDNA repeat units in the *Mitchell Petunia* genome. Plant Mol. Biol. 2: 57-65.
33. Wolff, K., J. Peters-Van Rijn and H. Hofstra. 1994. RFLP analysis in *chrysanthemum*. I. Probe and primer development. Theor. Appl. Genet. 88: 472-478.
34. Yokota, Y., T. Kawata, Y. Iida, A. Kato and S. Tanifuji. 1989. Nucleotide sequences of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA. J. Mol. Evol. 29: 294-301.
35. Zagorski, J. S., P. D. Ascher and R. E. Winder. 1983. Multigenic self-incompatibility in hexaploid *Chrysanthemim*. Euphytica 32: 1-7.

Cloning of Internal Transcribed Spacer Region of rDNA in *Dendranthema grandiflorum* by Polymerase Chain Reaction[1]

Sheng-Chung Huang, Chi-Chu Tsai and Chian-Shinn Sheu[2]

ABSTRACT

Using polymerase chain reaction (PCR), the entire nucleotide sequences of internal transcribed spacer (ITS) region between 18S and 26S ribosomal RNA (rRNA) genes were amplified among six cultivars/lines of *Dendranthema grandiflorum* Ramat. Two primers for PCR, IT1-5' CGTAACAAGGTTTCC 3' and ITS2-5' AGTTTCTTCTCCTCC 3' were designed for amplification and sequencing. The length of PCR products including primers (30 bp) was 747 bp. To compare with other higher plant species, this sequence contained 27 bp of 18S rRNA gene, ITS region, and 52 bp of 26S rRNA gene. Therefore, the length of ITS region of *D. grandiflorum* is 638 bp in which 253 bp of ITS1, 164 bp of 5.8S rRNA gene, and 221 bp of ITS2 are present.

Key words: *Dendranthema grandiflorum* Ramat, PCR, rRNA, ITS region.

---

[1] Contribution No. 0520 from Taichung DAIS.

[2] Research Fellow and Assistant Horticulturists of Taichung DAIS, respectively.