

## 藉由分析核糖體核酸內轉錄間隔區探討台灣原生石斛蘭之親緣關係

蔡奇助、黃柄龍、蘇育彥

### 摘 要

本研究藉由分析核糖體核酸(ribosomal DNA, rDNA)內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)之序列,以探討台灣 12 種原生石斛蘭的親緣關係。將所分析之樣本的 ITS 序列進行比較排列後,以 Kimura 2-parameters 換算物種兩兩間的遺傳距離(genetic distance),經不加權平均重法(unweighted pair-group method analysis, UPGMA)進行群叢分析並完成親緣關係樹狀圖(phylogenetic tree)。根據樹狀圖所呈現之物種間的親緣關係,台灣的原生石斛蘭主要可以分成四群,其中櫻石斛(*Dendrobium linawianum*)、白花石斛(*D. moniliforme*)、黃花石斛(*D. tosaense*)、細莖石斛(*D. leptocladum*)、紅鸞石斛(*D. falconeri*)與金草石斛(*D. aurantiacum*)成一類;鷹爪石斛(*D. chameleon*)與紅花石斛(*D. miyakei*)成一類;鵝石斛(*D. crumenatum*)與燕石斛(*D. equitans*)成一類。另外,大雙花石斛(*D. furcatopedicellatum*)與小雙花石斛(*D. soma*)成一類,但與其它石斛蘭遺傳距離甚遠。經由 DNA 分析,本研究支持原歸為石斛蘭屬的連珠石斛(*Epigeneium nakahara*)應與石斛蘭屬分開,並且也發現大雙花石斛與小雙花石斛也不適合置於石斛蘭屬內。

關鍵字:石斛蘭、親緣關係、核糖體核酸、內轉錄間隔區

### 前 言

石斛蘭為蘭科(Orchidaceae)石斛蘭屬(*Dendrobium*)植物,分佈於熱帶亞洲地區,是蘭科植物中第二大屬植物,成員超過 800 種。石斛蘭不僅花形多樣,花色亦相當豐富,因此是世界上重要的園藝植物之一,有部分石斛蘭還是廣被應用的中藥草(Lavarack *et al.*, 2000)。所以石斛蘭早已是蘭花育種的重要標的之一,經過一百多年來的育種,已經有超過 8000 種的石斛蘭品種被登錄(Lavarack *et al.*, 2000),另外沒有登錄的也不計其數。台灣也是石斛蘭的產地之一,依據記載,台灣產石斛蘭總計約 12 種(Tsi, 1999)。

---

<sup>1</sup> 行政院農業委員會高雄區農業改良場副研究員、助理研究員及研究助理

近年來，由於分子生物學急速的發展，DNA 分析已被廣泛應用於族群遺傳、演化、種原歧異度、純度及品種鑑定上。在 DNA 的分析中，目前最被廣為應用的是聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)技術，由於此技術具快速、專一性、靈敏性高且易於操作等優點，因此很適合被用來解決許多生物學相關的問題。在 PCR 的反應中，將欲複製的 DNA 片段兩端各設計一條引子(primer)，在反應管中加入四種 deoxynucleoside triphosphate(dATP, dCTP, dGTP 及 dTTP)，與微量的 DNA 當模板，在適當濃度的鹽及緩衝液下，DNA 聚合酵素可以進行聚合反應。隨著溫度循環，模板 DNA 兩股煉解(denature)、引子煉合(annealing)以及引子的延伸(extension)等三個過程，會將兩引子間的 DNA 片段大量複製出來(Arnheim and Erlich, 1992)。

在 DNA 分析上，為了得到較佳的分析結果，會依照所要分析的目標分類群之階層不同而分析不同的 DNA 片段。核糖體核酸(ribosomal DNA, rDNA)是目前廣泛被分析的 DNA 區域，它普遍存在於真核細胞中，是一群成縱線排列(tandem array)的重複性基因族(repeated gene families)，位於染色體的核仁組成中心(nucleolar organizer region) (Appels *et al.*, 1980; Kato *et al.*, 1990; Waldron *et al.*, 1983)。由於受到不等重組(unequal recombination)和基因轉變(gene conversion)的調控(Beech *et al.*, 1993)，各個重複單位間皆能保持相似性。每個 rDNA 重複單位中，包含一段可被轉錄的密碼序列(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)。在 rDNA 之序列結構中，18S、5.8S 和 26S rRNA 基因區中之序列在演化過程中變化較慢，因此適合應用於高分類階層演化方面的研究，其中由於 18S rRNA 基因區域的序列長度適中，因此已有相當多的研究被報導(review in Pace *et al.* 1989)。反之，由於 rDNA 之 ITS 和 IGS 的區域在不同物種間之長度及序列上常有很大變異(D'Ovidio, 1992)，因此，目前已有相當多的研究利用 ITS 區域進行種原親緣關係分析(review in 王等人, 1999)。

台灣原生石斛蘭由於族群本身就小，加上棲地破壞，環境變遷、以及人為濫採，已經造成台灣原生的石斛蘭在野外的族群更加稀少。對於這種既具觀賞價值，又具有藥性的植物，實在是台灣重要的植物資源，我們應該瞭解各種原的鑑別方式，以及它們之間的遺傳距離與親緣關係，以供日後我們對這群植物的保育、繁殖與利用上能更有根據，讓這種重要的原生植物資源能永續利用。然而，目前 DNA 指紋分析技術還甚少應用於石斛蘭的種原分析

上，僅有一篇藉由分析核糖體核酸內轉錄間隔區的 ITS2 區域，藉以探討幾種藥用石斛蘭(Lau *et al.*, 2001)。因此，本研究擬利用 PCR 技術，將台灣所產的原生石斛蘭 rDNA 之 ITS 區域加以選殖並定序，以探討台灣原生石斛蘭的遺傳距離及親緣關係，供未來評估石斛蘭種原歧異度及育種參考。

## 材料與方法

### 一、材料

本研究以 12 種台灣原生石斛蘭為材料(表 1)，並以同為蘭科的連珠石斛(*Epigeneium nakaharai*)及白花蝴蝶蘭(*Phalaenopsis aphrodite*)為外群進行分析。

表 1.12 種台灣原生石斛蘭的名稱、系統分類、ITS 序列長度及基因庫中的序列代號

Table 1.12 *Dendrobium* species, their systematic classification, ITS length, and accession numbers.

Abbrev.	Section <sup>a</sup>	Species and classification <sup>a</sup>	Source <sup>b</sup>	ITS length	Accession no. in GenBank
D.aur	Dendrobium	<i>Dendrobium aurantiacum</i>	A	638	AF521606
D.fal	Dendrobium	<i>Dendrobium falconeri</i>	A	640	AF521610
D.lin	Dendrobium	<i>Dendrobium linawianum</i>	B	635	AF521613
D.mon	Dendrobium	<i>Dendrobium moniforme</i>	A	637	AF521615
D.tos	Dendrobium	<i>Dendrobium tosaense</i>	B	636	AF521617
D.cha	Pedilonum	<i>Dendrobium chameleon</i>	B	640	AF521607
D.miy	Pedilonum	<i>Dendrobium miyakei</i>	A	641	AF521614
D.cru	Crumenatum	<i>Dendrobium crumenatum</i>	B	638	AF521608
D.equ	Crumenatum	<i>Dendrobium equitans</i>	A	642	AF521609
D.fur	Grastidium	<i>Dendrobium furcatopedicellatum</i>	B	649	AF521611
D.som	Grastidium	<i>Dendrobium somai</i>	B	653	AF521616
D.lep	Grastidium	<i>Dendrobium leptocladum</i>	B	637	AF521612

<sup>a</sup> The classification of *Dendrobium* is based on Tsi *et al.* (1999).

<sup>b</sup> A, Institute of Botany, Academia Sinica; B, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station.

### 二、方法

#### (一) DNA 之抽取

依 Shure 等人(1983)的方法抽取植物幼葉之總 DNA，以分光光度計

(Hitachi U-2001 Spectrophotometer)測定波長 260 nm 紫外光吸光度，定量 DNA 後，存於 -20°C 中備用。

## (二) PCR 反應

由 GenBank 序列比對的結果，於 18S rRNA 基因的 3'端(Takaiwa *et al.*, 1984; Kavanagh and Timmis, 1988; Kiss *et al.*, 1989a; Rathgeber and Capesius, 1989; Schiebel and Hemleben, 1989; Simovic *et al.*, 1992)與 26S rRNA 基因的 5' 端的序列保留區(Takaiwa *et al.*, 1985b; Kiss *et al.*, 1989b; Kuzoff *et al.*, 1998)各設計一條引子，引子序列如下(圖 1)：

IT1 : 5'GTAAGTTTCTTCTCCTCCGCT3'

IT2 : 5'TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT3'

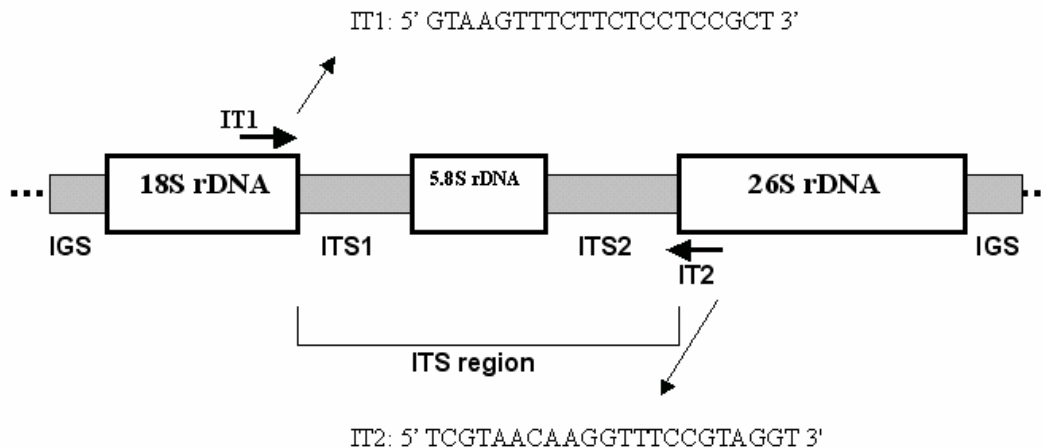


圖 1. rDNA 的基本結構，及 PCR 複製核糖體核酸基因間隔區(ITS)時，引子所在位置。

Fig. 1. The structure of ribosomal DNA. The positions of the internal transcribed spacer (ITS) regions relative to 18S and 26S rRNA genes and the intergenic spacer (IGS). The relative positions of the primers used for PCR are indicated.

PCR 反應內容物及濃度如下：10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%(w/v)gelatin, 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 10 ng 的模板 DNA，加無菌水將總體積補成 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)，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°C 反應 10 分鐘，然後加 1.25 units 的 Taq

DNA 聚合酵素(Amersham)，接下來溫度及時間如下，94°C反應 45 秒，58°C反應 45 秒，72°C反應 1 分鐘等三步驟進行 10 個循環，接著再 94°C 反應 45 秒，54°C 反應 45 秒，72°C 反應 1 分鐘等三步驟進行 30 個循環，最後 72°C 反應 10 分鐘。將 PCR 複製產物，於 0.8 % 瓊膠(agarose)以 TBE 緩衝液中電泳分離。經 EtBr (ethidium bromide, 0.5 µg/ml)染色後，在紫外燈下觀察、照相。

### (三) Glass milk 回收 DNA

將 PCR 複製產物以瓊脂膠體電泳分離，經 EtBr 染色後，在 UV 燈箱使用長波長(365 nm)之 UV 光觀察 DNA 條帶(band)，用解剖刀將上述 DNA 條帶切下，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°C 水浴中，時常將微量離心管翻轉，至膠塊完全溶解後，取出並加入適當量的 Glass milk (Geneclean Kit II, BIO 101)(DNA 量在 5 µg 以下，加入 5 µl 的 Glass milk，每增加 1µg，須增加 1µl 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。

### (四) 序列分析

回收的 DNA 以 PCR 所用的引子為讀序引子，經由 dideoxy chain-termination 法，以 ABI377 自動讀序儀進行非放射線標定讀序。每一樣本經由兩次或三次的重複確認序列。上述序列反應委託廠商代為行之，讀序反應的步驟依據藥品商所建議的標準步驟行之。

### (五) 資料分析

樣本兩兩間的遺傳距離(genetic distance)以 Kimura 2-parameters 為之 (Kimura, 1980)，再經由 MEGA version 2.1 套裝軟體(Kumar *et al.*, 2001)，以不加權平均重法(unweighted pair-group method analysis, UPGMA) (Rohlf *et al.*, 1982)完成樹狀圖。

## 結果與討論

12 種石斛蘭及外群連珠石斛及白花蝴蝶蘭的 PCR 產物經電泳分離後，呈現單一條帶，此顯示每一種的 ITS 重複單位(repeat unit)的長度皆一致，其長約 750 bp。因此後續的序列分析可以由 PCR 產物直接進行讀序。12 種石斛蘭的 ITS 區域長度介於 635-653 bp 間，其中 5.8S rDNA 區域各物種皆

為 163 bp，ITS1 區域介於 230-240 bp 間；ITS2 區域介於 242-254 bp 間。上述 14 個分類群的 ITS 序列經排列後，總計有 684 個特徵。其中在 ITS1 區域中有 190 個具多型性(佔 74.5%)；5.8S rDNA 區域有 25 個具多型性(佔 15.3%)；ITS2 區域中有 187 個具多型性(佔 70.3%)(圖 2)。就 12 種石斛蘭兩兩間之比較，不同的核苷酸(nucleotide)的數目介於 22~147 個間，平均為 109.5 個。根據 ITS 序列比較，每一種石斛蘭皆有其特殊的 ITS 序列，而具多型性的區域主要集中於 ITS1 及 ITS2 區域，此結果與 Lau 等人(2001)針對 17 種石斛蘭的分析結果類似。

**ITS1**

	10	20	30	40	50	60	70
D. aur	TCGAGACCAA	AAT-ACATCG	AGCGATCTTG	AGAACACATT	AAAATAAGCG	G-TGGCTATT	GCTGCTGCCA
D. cha	.....TG.	...-.....	.....T.A.	...C.CGG.C	.....G.....	ATAT.C.T.	
D. cru	.....T.	...-.....	...A...T.G.	.....AG.C	.T...C.A	-C..A...	ATGTTC..A.
D. equ	.....T.	...-GT...	...AT...T.G.	.....AG.C	.T...T.A	-...A...	ATGT.C....
D. fal	.....G.	..C-...T.	.....T...	.C...C.G.A	..T.....	-C...AC..	.....A...
D. fur	.....G.	...-T....	.....TCG.	.....CTG.-	T.G...CA..	-C...G...	.....TC.TAG
D. lep	.....GG	..C-...A..	.....T...	T...C.G.A	.....-...-	AC..	.....A...
D. lin	.....G.	..C-...AT.	.....T...	T...CTG.A	.....-...-	CTG.	AG...-.....
D. miy	.....TG.	...-.....	.....T.A.	.....CG..C	.....C.....	-...-	A.AT.C..T.
D. mon	.....G.	..C-...A..	.....T...	T...CTG.A	...G.....	-...CA.	.....
D. som	.....G.	...-T....	.....TCG.	.....C.G.-	C.G...C...	-C...G...	.....C.TAG
D. tos	.....G.	..C-...A..	...A..T...	T...C.G..	...A.....	-C...C..	.....A...
E. nak	.....T.	...-TGCA.	.....TCC.	.....C.G.-	G.....	-...GG..	..C.AC....
P. aph	.....GG	...C.T.C..	.....ATCG.	.....C.G.-	G..CCG.A..	-C...GGCC	..C..C..CG

	80	90	100	110	120	130	140
D. aur	A-----TAAA	ATCCATCCGA	G-TTGTCCTC	TCATCC----	CATTCTTTGG	GCG-----G	GGATGCGATG
D. cha	-----...G.	.....C.	T-.T..A..	.....-----	.CCCT.GG..	...-----	..TC.T..AT
D. cru	-----A.G.	.G.T...T.	T-.CA.AAT.	-..CAT----	.CCCT.GA..	.T.-----A	..TCAT..GT
D. equ	-----A.G.	.G.....T.	T-.CA.AAT.	...CTA----	.CCCT.GA..	.....-----A	..TCAT..GT
D. fal	-----...G.	.....C..A.	A-.CA.TG..	.T.....-----	.C.CT.AG..	.....-----T	..C.T....
D. fur	---AATA..G	.G...T.T.	...TG..	.G.....-----	.CC.TCGG..	.....-----	..GCA....
D. lep	-----...C.T.	...-CA..A..	.....-----	.C.AT...T	.....-----	..A.CAT....	
D. lin	-----...CT.	...-CA..G..	.....-----	.C.CT..G..	.T.-----	..TC.T..AT	
D. miy	-----...G.	.....C.	T-.CT..A..	.....-----	.CCCT.GG..	...-----	..TC.T..AT
D. mon	-----...C.	.....-CA..G..	.....-----	.C.CT..G..	.T.-----	..C.T....	
D. som	TAGAATA..G	.G.....CG	.G...TG..	.G.....-----	.CC..GGG..	.....-----	..GCA....
D. tos	-----...CTGA.	...-CA..G..	.....-----	.C.CTA.G..	.T.-----T	..C.T....	
E. nak	-----...G.	.G...C.	T-.C..TG..	...C..TGGG	GCCCT..G..	..GCGGGC	...AA....
P. aph	C----CGG.C	GG..GC..CC	-CC...G..	C.CG...-----	.CCGT.CG.A	.G.-----	..GC...GC.

	150	160	170	180	190	200	210
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

```

D.aur      AAGGATGGAT GAACCCCAAC ACCGGCGTAG CTCGCGCCA AGGGA-TTAT --CGAATCAT GGGCCCTAAA
D.cha      .G..G..... .A.T... ..C.A .A..... .T.TA.-- --.A.GAAGC .A...T.C..
D.cru      TGT....T. ...A.T... .T...T.C.. .AA...A... ..TA... --...G..C AA...T.T..
D.equ      .....T. ...A.T... ..C.. .A..... ..TA... --...GT.C AA.....T..
D.fal      ....T..... ..T... .T.....C.. .A..... ..T.-A... --...A..C AA...T.TG.
D.fur      .....A..... ..A..... ..C.. ..A..... ..-A... --...A..C .A.....TC.
D.lep      ...T...A ...T... .T.....C.. .A.A..... ..-A... --T...A..C AA...TAT..
D.lin      .....T... .T.....C.. .G.A..... ..-A.C. --T...A..C AA...AT..
D.miy      CG..G..... ..A.T... ..C.A .A..... ..T.TA... --.A..AAGC .A...G.C..
D.mon      .....AT.T... .T.....C.. .G.A..... ..-A... --T...A..C AA...TAT..
D.som      ....C...C .G..A...G. ....C.. ..A..... ..-A... --...A..C .A.....TC.
D.tos      .....TA.. .T.....C.. .G.A..... ..-A.C. --T...A..C AA...AT..
E.nak      .....A.T... ..C.. ..A..... ..-A... --T...A..C .A.....TC.
P.aph      GG...C..CC .G.A...G. ....CG. A.CG..... ..ACCGG TGA..GA..C AA...GGC.

```

5.8S rRNA

```

                220      230      240      250      260      270      280
D.aur      ATGGGTTA-- -TGTATTGGA GTGCTGTTGC ACGCCATATG GATTGGCAGC ACTCTCGGCA ATGGATATCT
D.cha      .....T-C G..GCA...G .....C..A. ....A..T. ....
D.cru      .....C-T-G G..GCA...T .G..C.... G.C....A. ....A..G. ....A..
D.equ      .....T-G G..GCA...T .G..TC.... G.C....A. ....A..T. ....A..
D.fal      T.....T-T G..GGA..T.G .....A..C.. ..A.....C .....A..T. ....
D.fur      TC...C-T-G GC.GCGC..G .....GC... ..A..... .....
D.lep      .....TGT G..GCA...G ...A..CC.. .....C .....A.....
D.lin      .....T-T G..GGA...G .....C.. .....T .....A.....
D.miy      .A...T-C G..GCAA..G ...A..... .T...C..A. ....A..T. ....
D.mon      .....T-T G..GGA...G ...T...C.. .....T .....A.....
D.som      CC...C-T-G G..GCGC..G .....C.. ....GC.C. ....A.....
D.tos      -.....T-T G..GGA...G ...T...C.. .....C .....A.....
E.nak      TC...T-G G..GCA..AG .....G.A .....A.....
P.aph      TC...CCCTC G..GGGC... ----- .CA.C. T.CC.A.G... ..A.....

```

(continued)

```

                290      300      310      320      330      340      350
D.aur      CGGCTCTCGC ATCGATGAAG AGCGCAGCGA AATGCCGATAC GTGGTGCGAA TTGCAGAATC CCGTGAACCA
D.cha      .....T..... ..C.....
D.cru      .....T..... ..C.....
D.equ      .....T..... ..C.....
D.fal      .....C.....
D.fur      .....C.....
D.lep      .....C.....
D.lin      T.....T..... ..C.....
D.miy      .....T..... ..C.....
D.mon      .....T..... ..C.....
D.som      .....C.....
D.tos      .....T..... ..C.....
E.nak      .....C.....
P.aph      .....C.....

```

ITS2

```

                360      370      380      390      400      410      420

```

D.aur TCGAGTCTTT GAACGCAAGT TGCGCCGAG GCCAACCGGC CAAGGGCACG TCTGCCTGGG CGTCAAGCGT  
D.cha .....T.A.A.....A.  
D.cru .....T.....A.  
D.equ .....A.....A.  
D.fal .....G.....A.  
D.fur .....G.....C.....  
D.lep .....A.....CA.....A.  
D.lin .....T.....TG.....C.....A.  
D.miy .....A..A.....A.  
D.mon .....T... ..T... TG.....C.....A.  
D.som .....G.....C.....  
D.tos .....A.....T.....C.....A.  
E.nak .....C.....  
P.aph .....G.....T... .G..... C.C..T.....G..

430 440 450 460 470 480 490  
D.aur TATGTCGCTC TGTGCCAAGT C---ACCCA TCATTGGATG GGCTGG---C GAAGGCTCGG ATGTGCATGG  
D.cha .....T... C.A.T..GCA .C--ATG... .GA..... .T..... A.....T... ..GA.  
D.cru .....A... C.A.A.G.T. TC--AT...T C..A..... .G.....-T AG.....T... ..T.GAT  
D.equ ..C...A... C.A...T. TC--AC...T CAGA...T... .G..... .G..... ..T.GA.  
D.fal ..T..... C.....T... ----T... ..GA.C... T.....  
D.fur ..GCA..... C.....C. .C--GT.TTG ..TA...T... ..C..... .G..... ..G.GA.  
D.lep ..T.A..... C.....T... ----T... ..GA..T... T.T..... C..... ..CA.  
D.lin ..T.A..... C.....T... ----T... ..CA..... T.T..... C..... ..C..  
D.miy .....C.A.TT.GCA .C--ATA... .GA..... .T.....-A C.....T... ..GA.  
D.mon ..T.A..A... ..T... ----T... ..CA..... T.T..... C..... ..C..  
D.som ..GCA..... C.....G.C. .C--GT...G ...A...GC. ...C..... .G...G... ..G.GA.  
D.tos ..T.A..T... C.....T.A. ----T... ..CA..... T.T.A---- T.....  
E.nak ..GC.....T C.....C. .C--A...G C..A...G.. T.TC...-G .G..... ..A.  
P.aph GGC.C..T... C.C...G..C .CCCAT...C G.CGC..CG. C.G..CCCGG CG...AC... .C...-A.A

500 510 520 530 540 550 560  
D.aur TGGCTCGTCG TGCCCT-TCG GCACGGTGGG CTGAAGAGCG GGTCATCATC TTGTTAGCCA CGAACAAATAA  
D.cha .....A... T..C-... .AG..... ..TA .....C...G..TG ..T.....  
D.cru .....A... ..C-... .TG..... T..... A...A.G. ....G..TG .....  
D.equ .....A... .A..C-... .TG..... ..CA...TA. .C...G..TG .....  
D.fal .....CC... .TG...C... ..GAT. ...T...T.T .C...G..TG .....  
D.fur .....A-... .TG...C... ..A.....A ..T..... .C...G...G .....C..  
D.lep .....AC-... .TG...C... ..T.T. ....T... .C...G..TG .C.....  
D.lin .....C-T. .TG...C... ..G... ..T... .C...G..TG .C.....  
D.miy .....A... T...-T. .AG..... T.....TA .....C...G..TG ..T.....  
D.mon .....C-T. .TG...C.T. ....G... ..T... .C...G..TG .C.....  
D.som .....A-... .TG...C... ..T..... .C...G...G .....C..  
D.tos .....C... ..C-T. .TG...C... ..G... ..T... .C...G.TTG .C.....  
E.nak .....A-... ATG...C... ..T... ..T...G... .CA..G... ..T..C..  
P.aph .....C.....G-... .G...C... ..CTGC.G... .CA.CG... ..G..G.C..

570 580 590 600 610 620 630



D. aur	GGGGTGGAT- AAAAAT----	--GAGGCCTA	TGCTATTGTG	CCGTGCAT-G	CCCAAGAGAT	GATTATAC--
D. cha	.....T	...T-----	.....G	..T.....C	T...T...-	..TG....A
D. cru	.....A	..GC-----	.....G	..T.....T	...T...-	..G..G..A
D. equ	.....T	..GC-----	...T...G	..T.....T	...T...-	..GG.G..A
D. fal	.....T	..G.G----	--A.....	.....T	AA..G..-	..TG....
D. fur	.....G	.G..GCAAG	GCA.....	C.T.G...A	T...TT.-	..AG....C
D. lep	.....T	-----	---A..A..	.....T	AA....-	..TG....
D. lin	.....T	..T-----	.....T	AA..GC..	..TG....	..G.C....
D. miy	.....T	..T-----	...T..G	..T.....C	T...T...-	..TG...GA
D. mon	.T.....T	..T-----	.....	.....T	AA..GC..	..TG....
D. som	.....G	.G..GCGAG	GC.....G	C.T.G...CA	T...TT.-	..GG....C
D. tos	.....T	-----	.....	.....ATAA	..GC..	..G....
E. nak	.....G	..GC-----	--A.....G	C.T.G...A	T.....-	..TTC.G..A
P. aph	.....G	..G-----	--A..C...C	GAGCGCGTC.	T..C.TGCC.	..GG...GA

	640	650	660	670	680	
D. aur	-CTTTTATGT	GATCCCAAAT	CATGCGTCGA	TCCAC--GAA	TGGCG-TTGT	GAAT
D. cha	-TA..A...	.....C...	...T--G.	.....-..T.	....	
D. cru	----.A.A..	.....TT--CG.	.....TG	....		
D. equ	-TAG.C.G..	.....G.A..C..	...T--G.	.....TG	....	
D. fal	-T...G.A	.....T.	...T....	..A--G.	.....TG	....
D. fur	-TAC.C.G..	.....G..C	.....G	...T--G.	C.A..GC.TG	....
D. lep	-TA..A.GT.	.....T.	..TT....	...T--G.	C....-ATC	....
D. lin	-T.A...G..	.....T.	.....T--G.	.....-ATC	....	
D. miy	-TAC.C....	.....C...	...T--G.	...T..-TC	....	
D. mon	-T...G..	.....T.	..A...T..	...T--G.	.....-ATC	....
D. som	-AC.CGG..	.....G..C	.....G	.....-G.	C.A..GC.TG	....
D. tos	-T...G..	.....TC	.....CTA.	...T--G.	.....-ATC	....
E. nak	-TA.CC.G..	.....CC	.....G	C.....-GG	C.A..GC.TG	....
P. aph	C.C.CCGC.C	.....TCC	..GG...C..C	C..C.CC.TG	C...GC.CG	...C

圖 2.比較 12 種台灣原生石斛蘭及連珠石斛與白花蝴蝶蘭之核糖體核酸內轉錄間隔區(ITS1, 5.8S rRNA 基因, ITS2)之序列，代號見(表 1)。

Fig. 2.Sequence comparison of ITS1, 5.8S rDNA, and ITS2 regions from 12 *Dendrobium* species and two outgroups, *E.[spell out] nakaharai* and *P.[spell out] aphrodite* in Taiwan. Abbreviations for the 12 *Dendrobium* species are shown in Table 1. Dots (.) indicate the same nucleotides, and gaps (-) were introduced to maximize homology.

將 12 個石斛蘭及兩個外群的 ITS 序列進行編排，以 Kimura

2-parameters 方法進行換算，其兩兩樣本間的遺傳距離介於 0.06-0.49 間，其中 12 種石斛蘭間的遺傳距離介於 0.06-0.28 間，其中大雙花石斛(*D. furcatopedicellatum*)與小雙花石斛(*D. somai*)的遺傳距離最近，僅有 0.06。小雙花石斛(*D. somai*)與鵝石斛(*D. crumenatum*)及黃花石斛(*D. tosaense*)與鵝石斛(*D. crumenatum*)的遺傳距離最遠，皆達 0.28。另外，外群白花蝴蝶蘭與其它的分類群間的遺傳距離較遠，介於 0.31-0.49 間(表 2)。

表 2.12 種台灣原生石斛蘭及兩個外群植物樣本兩兩間的遺傳距離

Table 2. Genetic distances of the ITS sequence among 12 *Dendrobium* species, as well as *Epigeneium nakaharai* and *Phalaenopsis aphrodite* according to the two-parameter method of Kimura

	<i>D.aur</i>	<i>D.cha</i>	<i>D.cru</i>	<i>D.equ</i>	<i>D.fal</i>	<i>D.fur</i>	<i>D.lep</i>	<i>D.lin</i>	<i>D.miy</i>	<i>D.mon</i>	<i>D.som</i>	<i>D.tos</i>	<i>E.nak</i>
<i>D.cha</i>	0.20												
<i>D.cru</i>	0.25	0.18											
<i>D.equ</i>	0.24	0.17	0.09										
<i>D.fal</i>	0.18	0.20	0.26	0.24									
<i>D.fur</i>	0.22	0.23	0.26	0.25	0.23								
<i>D.lep</i>	0.19	0.20	0.27	0.25	0.11	0.24							
<i>D.lin</i>	0.18	0.20	0.26	0.26	0.11	0.23	0.09						
<i>D.miy</i>	0.21	0.05	0.20	0.19	0.22	0.24	0.22	0.22					
<i>D.mon</i>	0.18	0.21	0.27	0.25	0.12	0.24	0.09	0.04	0.22				
<i>D.som</i>	0.22	0.24	0.28	0.27	0.24	0.06	0.25	0.25	0.25	0.26			
<i>D.tos</i>	0.19	0.22	0.28	0.27	0.12	0.24	0.11	0.07	0.23	0.07	0.25		
<i>E.nak</i>	0.22	0.23	0.27	0.23	0.21	0.15	0.22	0.22	0.25	0.23	0.16	0.24	
<i>P.aph</i>	0.42	0.45	0.49	0.49	0.43	0.35	0.45	0.42	0.46	0.42	0.31	0.43	0.34

將 12 種台灣原生石斛蘭的 ITS 序列進行比較排列後，以 Kimura 2-parameters 換算物種兩兩間的遺傳距離(genetic distance)，經不加權平均重法(unweighted pair-group method analysis, UPGMA)進行群叢分析並完成親緣關係樹狀圖(phylogenetic tree)。根據樹狀圖所呈現之物種間的親緣關係，台灣的原生石斛蘭主要可以分成四群，其中櫻石斛(*D. linawianum*)、白花石斛(*D. moniliforme*)、黃花石斛(*D. tosaense*)、細莖石斛(*D. leptoclandum*)及紅鸞石斛(*D. falconeri*)與金草石斛(*D. aurantiacum*)成一群；鷹爪石斛(*D.*

*chameleon*)與紅花石斛(*D. miyakei*)成一類；此外，鵝石斛(*D. crumenatum*)與燕石斛(*D. equitans*)成一類。另外，大雙花石斛(*D. furcatopedicellatum*)與小雙花石斛(*D. somai*)成一類，但與其它石斛蘭遺傳距離甚遠(圖 3)。

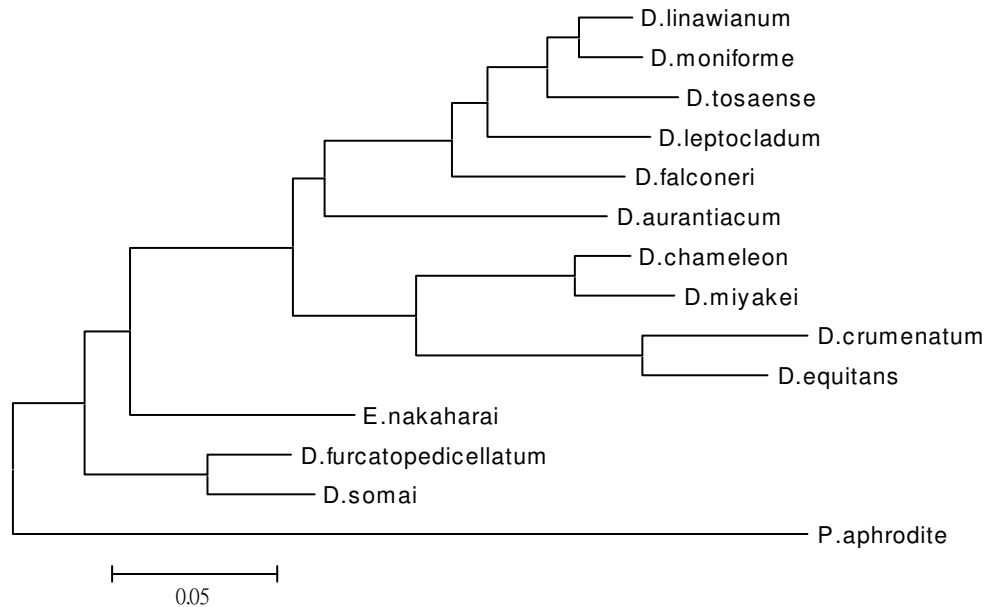


圖 3.12 種台灣原生石斛蘭的親緣關係樹狀圖。(物種代號見表 1)

Fig.3.A dendrogram of the 12 *Dendrobium* species and two outgroups, *Epigeneium nakaharai* and *Phalaenopsis aphrodite*, constructed from sequence comparisons of the ITS region of rDNA. Abbreviations of the 12 *Dendrobium* species are shown in Table 1.

根據 Tsi 等人(1999)的系統分類，台灣的原生石斛蘭分屬於四個不同的節(section)，分別為 *Dendrobium*, *Pedilonum*, *Crumenatum* 及 *Grastidium*。根據本研究的分子證據並不完全支持 Tsi 等人(1999)的系統分類。分子證據支持鵝石斛(*D. crumenatum*)與燕石斛(*D. equitans*)親緣關係相近，適合一起歸於 *Crumenatum* 節(Tsi *et al.*, 1999)。此外，鷹爪石斛(*D. chameleon*)與紅花石斛(*D. miyakei*)親緣關係相近，適合一起歸於 *Pedilonum* 節(Tsi *et al.*, 1999)。反之，分子證據將紅鸚石斛(*D. falconeri*)、櫻石斛(*D. linawianum*)、細莖石斛(*D. leptocladum*)、白花石斛(*D. moniforme*)、黃花石斛(*D. tosaense*)與金草石斛(*D. aurantiacum*)歸於一類。然而，Tsi 等人(1999)的系統分類將

紅鸞石斛(*D. falconeri*)、櫻石斛(*D. linawianum*)、白花石斛(*D. moniforme*)、黃花石斛(*D. tosaense*)與金草石斛(*D. aurantiacum*)歸於 *Dendrobium* 節，而細莖石斛(*D. leptocladum*)則被置於 *Grastidium* 節(Tsi *et al.*, 1999)。因此，本研究並不支持將細莖石斛(*D. leptocladum*)置於 *Grastidium* 節中。此外，分子證據也顯示，同屬於 *Grastidium* 節的大雙花石斛(*D. furcatopedicellatum*)與小雙花石斛(*D. somai*)非常相近且與其它石斛蘭物種的親緣關係很遠。此結果支持 Lavarack 等人(2000)，將 *Grastidium* 節處理為另一屬 *Grastidium*。此外，連珠石斛(*Epigeneium nakaharai*)先前也被處理為石斛蘭屬的成員，學名為 *Dendrobium nakaharai* (Lin, 1975)，直至最近，本種被處理為 *Epigeneium* 屬的成員(Lavarack *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2000)。本研究結果也發現，連珠石斛與其它石斛蘭成員的關係很遠，因此支持連珠石斛及其相近成員處理為不同蘭屬(genus)。

本研究顯示，台灣原生石斛蘭的 ITS 序列每一種皆不同，因此利用 ITS 序列可以用來鑑別每一種石斛蘭。分子證據支持連珠石斛(*E. nakaharai*)不適合置於石斛蘭屬。此外，也支持將大雙花石斛(*D. furcatopedicellatum*)與小雙花石斛(*D. somai*)處理為 *Grastidium* 屬。因此，藉由分析核糖體核酸(ribosomal DNA)內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)可以獲得足夠的分子標誌(molecular makers)，藉以應用於種原鑑別及親緣關係之分析，因此，未來可以進一步應用在其它廣大的石斛蘭種原上。

### 參考文獻

1. 王建波、張文駒、陳家寬 1999 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系統與進化研究中的應用 植物分類學報 37: 407-416。
2. 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.
3. Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 131-156.
4. Barker, R.F., Harberd, N.P., Jarvis, M.G., Flavell, R.B., 1988. Structure and evolution of the intergenic region in a ribosomal DNA repeat unit of wheat. *J. Mol. Biol.* 201: 1-17.
5. 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.
6. 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.
7. Doyle, J., Doyle, J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
  8. Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.
  9. 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.
  10. Kavanagh, T.A., Timmis, J.N., 1988. Structure of melon rDNA and nucleotide sequences of 17-25S spacer region. *Theor. Appl. Genet.* 76: 673-680.
  11. Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
  12. Kiss, T., Kis, M., Solymosy, F., 1989b. Nucleotide sequence of a 25S rRNA gene from tomato. *Nucl. Acids Res.* 17: 796.
  13. Kiss, T., Szukalek, A., Solymosy, F., 1989a. Nucleotide sequence of a 17S (18S) rRNA gene from tomato. *Nucl. Acids Res.* 17: 2127.
  14. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA 2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, AZ.
  15. Kuzoff, R.K., Sweere, J.A., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zimmer, E.A., 1998. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15: 251-263.
  16. Lau, D.T.W., Shaw P.C., Wang, J., But, P.P.H. 2001. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Planta Med.* 67: 456-460.
  17. Lavarack, B., Harris, W., Stocker, G., 2000. *Dendrobium* and its relatives. Timber Press, Portland, OR.
  18. Lin, T.P., 1975. Native orchids of Taiwan. Vol. 1. pp. 138-139. National Taiwan University, Taipei.
  19. Pace, N. R., D. K. Smith, G. J. Olsen and B. D. James. 1989. Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA-a review. *Gene* 82: 65-75.

20. Rathgeber, J., Capesius, I., 1989. Nucleotide sequence of the 18S-25S spacer region from mustard DNA. *Nucl. Acids Res.* 17: 7522-7522.
21. Ritland, C., Straus, N.A., 1993. High evolutionary divergence of the 5.8S ribosomal DNA in *Mimulus glaucescens* (Scrophulariaceae). *Plant Mol. Biol.* 22: 691-696.
22. Rohlf, F. J., J. Kishpaugh and D. Kirk. 1982. Numerical taxonomy system of multivariate statistical programs. State Univ. New York, Stony Brook, New York.
23. Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
24. Schiebel, K., Hemleben, V., 1989. Nucleotide sequence of the 18S-25S spacer region from rDNA of mung bean. *Nucl. Acids Res.* 17: 2852-2852.
25. Shure, M., S. Wessler and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-233.
26. Simovic, N., Wolyn, D., Jelenkovic, G., 1992. Sequence analysis of 18S ribosomal RNA gene in *Fragaria x Ananassa* Duch. Cultivated octoploid strawberry. *Plant Mol. Biol.* 18: 1217-1220.
27. Su, H.J., Leou, C.S., Chen, J.J., Hu, C.Y., 1998. Orchidaceae. In: *Flora of Taiwan*, 2nd ed., Vol. 5. pp. 839-849. Editorial Committee of the *Flora of Taiwan*, 2nd edition. Taipei.
28. Takaiwa, F., Oono, K., Sugiura, M., 1984. The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene. *Nucl. Acids Res.* 12: 5441-5448.
29. Takaiwa, F., Oono, K., Sugiura, M., 1985a. Nucleotide sequence of the 17-25S spacer region from rice rDNA. *Plant Mol. Biol.* 4: 355-364.
30. Takaiwa, F., Oono, K., Sugiura, M., 1985b. The complete nucleotide sequence of a rice 25S rRNA gene. *Gene* 37: 255-289.
31. Tsi, Z.H., Chen, S.C., Luo, Y.B., Zhu, G.H., 1999. Orchidaceae (3). In: Tsi, Z.H. (ed.), *Angiospermae, Monocotyledoneae, Flora Reipublicae Popularis Sinica*. Tomus 19. Science Press, Beijing. (in Chinese)
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.

## Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* spp. (*Orchidaceae*) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA

Chi-Chu Tsai, Ping-Long Huang and Yu-Yen Su <sup>1</sup>

### Abstract

The genetic relationship of 12 *Dendrobium* species in Taiwan was determined based on sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA. Aligned sequences of the complete ITS region obtained from the 12 taxa and two outgroups resulted in 684 characters. Genetic distances and a phylogenetic tree were constructed, and four main clusters were generated among the 12 *Dendrobium* species. From the results, *D. linawianum*, *D. moniforme*, *D. tosaense*, *D. leptocladum*, and *D. falconeri* are grouped with *D. aurantiacum*; *D. chameleon* is grouped with *D. miyakei*; and *D. crumenatum* is grouped with *D. equitans*. In addition, *D. furcatopedicellatum* and *D. somai* are grouped together but are separated from other *Dendrobium* species. In the present study, results also support *Epigeneium nakaharai* not being placed in the genus *Dendrobium*. In addition, it may be preferable to place *D. furcatopedicellatum* and *D. somai* in a genus different from *Dendrobium*.

Key words: *Dendrobium*; phylogeny; rDNA; ITS.

---

<sup>1</sup>.Associate Horticulturist, Assistant Horticulturist, and Assistant of Crop Improvement Division of KDARES, respectively.