airiti

藥用石斛屬植物葉綠體 DNA 序列的遺傳親緣分析與霍山石斛分子鑑定

孫永偉[1)]、郭昭麟[2)]、張珈錡[1)]、張惠如[1)]、廖玉珠[1)]、李美娟[1)]、鍾文全[1)]、文紀鑾[3)]

[1)] 行政院農業委員會種苗改良繁殖場副研究員、助理研究員、助理研究員、技士、副研究員兼課長、研究員兼課長

[2)] 中國醫藥大學中藥資源學系系主任

[3)] 行政院農業委員會種苗改良繁殖場副研究員(通訊作者)

地址：426 台中市新社區大南里興中街 46 號

電話：04-25825465

電子信箱：cluwen@tss.gov.tw

摘要：本研究針對多種藥用石斛屬植物，如霍山石斛、鐵皮石斛、銅皮石斛、黃花石斛、金釵石斛(春石斛)、櫻石斛、流蘇石斛、紫皮石斛、本場雜交種-種苗金皇 1 號(金釵石斛 x 黃花石斛)、種苗金童 1 號(金釵石斛 x 銅皮石斛)、銅皮石斛 x 霍山石斛、金釵石斛 x 櫻石斛，及非石斛屬之滇金石斛等，利用擴增及分析葉綠體 *matK* 之 DNA 序列，以判斷不同石斛種間植物遺傳差異性。結果顯示，葉綠體 *matK* 基因存在鹼基插入與缺失之序列差異性，適合作為品種間親緣分析工具。利用 MEGA 5.10 軟體對所有石斛品種進行群叢分析，所有測試石斛屬植物可區分為 3 群，第 1 群為黃花石斛與鐵皮石斛；第 2 群為霍山石斛、銅皮石斛、紫皮石斛、金釵石斛、櫻石斛；第 3 群為流蘇石斛與滇金石斛，本場育成雜交品種種苗金皇一號與黃花石斛為相同分群，雜交品種種苗金童一號與金釵石斛分群一致。本研究另開發一組由葉綠體 *trnL-trnF* 間隔區序列之分子標誌，只擴增霍山石斛特定 DNA 序列，其餘藥用石斛屬植物無法擴增 DNA 條帶，雖然雜交品種(銅皮 x 霍山)並未擴增出 DNA 條帶，仍值得進一步確認作為霍山石斛專一性分子標誌可行性。

關鍵詞：石斛屬、分子標誌、葉綠體、親緣分析

收到日期：2013 年 8 月 21 日

airiti

前　言

藥用石斛屬於蘭科(*Orchidaceae*)石斛屬(*Dendrobium*)，具有滋陰養胃、潤肺止咳、清熱明目、抗腫瘤、抗衰老、增強免疫力及擴張血管等功效，在「神農本草經」中被列為上品。由於人為過度採收、生態環境遭受破壞、生長極為緩慢等因素，已被中國列入《國家重點保護野生藥材物種名錄》，重點保護野生珍貴品種。由於藥用石斛種類繁多、遺傳背景複雜，藥材乾燥或粉碎後外表形態鑑別困難度高，更因石斛價格昂貴及外觀相近導致各種偽品充斥，尋找有效鑑別藥用石斛方法顯得非常重要。

分子標誌技術鑑定結果不受檢測個體組織器官、生育時期及生長環境影響，故近年利用 DNA 分子標誌技術鑑別石斛屬植物逐漸受到重視，如 RAPD、ISSR、SSR、AFLP、核糖體 rDNA ITS 及葉綠體 *matK* 基因等(朱等，2011；黃等，2010；楊等，2010；劉等，2008；劉等，2009；魏和方，2005；Pathak and Jaroli, 2012；Wu *et al*., 2009；Xu *et al*., 2005)。

本研究針對多種藥用石斛植物，如霍山石斛(*D. huoshanense*)、鐵皮石斛(*D. officinale*)、銅皮石斛(*D. moniliforme*)、黃花石斛(*D. tosaense*)、紫皮石斛(*D. devoninum*)、金釵石斛(*D. nobile*)、櫻石斛(*D. linawianum*)、流蘇石斛(*D. fimbriatum*)、滇金石斛(*Flickingeria albopurpurea*，非石斛屬植物)及本場雜交種-種苗金皇 1 號(*D.* Taiseed Tosnobile Taiseed Emperor No.1)與種苗金童 1 號(*D.* Cassiope Taiseed Golden Boy No.1)、銅皮石斛 x 霍山石斛等，利用擴增及分析葉綠體 *matK* 之 DNA 序列，以判斷不同石斛種間植物遺傳差異性，並希望建立霍山石斛專一性分子標誌。

材料與方法

本研究針對多種藥用石斛屬植物，如霍山石斛、鐵皮石斛、銅皮石斛(來自奮起湖及杉林溪)、黃花石斛、金釵石斛、櫻石斛、流蘇石斛、紫皮石斛、滇金石斛、本場雜交種-種苗金皇 1 號(金釵石斛 x 黃花石斛)與種苗金童 1 號(金釵石斛 x 銅皮石斛)、銅皮石斛 x 霍山石斛、及金釵石斛 x 櫻石斛等，利用擴增及分析葉綠體 *matK* 之 DNA 序列，以判斷不同石斛屬間植物遺傳差異性。

airiti

Genomic DNA 萃取

取測試品種新鮮葉片 0.1 g，利用植物 DNA 萃取試劑組（Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System, Viogene 公司生產）進行 DNA 萃取純化，淋洗出之 DNA 保存於-20℃冰箱備用並進行 PCR 反應。

PCR 反應

聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）以 MJ Research 公司製造之 PTC-200 Peltier Thermal Cycler 儀器進行。樣品 DNA 取 200 ng 做為模版（template DNA），使用特定核酸引子序列(表一)，以 KlenTaq DNA 聚合酶（購自 Protech 公司）為反應酵素，最終反應液之各成分濃度為 50 mM Tris-HCl pH 9.1，16 mM ammonium sulfate，3.5 mM $MgCl_2$，150 μg/ml BSA 以及 200 μM dATP、200 μM dTTP、200 μM dCTP、200 μM dGTP；反應體積為 25 μL，置於 0.2 mL 之微量離心管。PCR 反應條件為 94℃反應 2 分鐘，1 個循環；94℃反應 45 秒，45℃反應 45 秒，72℃反應 1 分，30 個循環；72℃反應 7 分鐘，1 個循環。

表一、 本試驗使用之葉綠體 *matK* 及 *trnL-trnF* 核酸引子序列

Table 1. The primer sequences used for PCR analysis and the molecular size amplified by these sequences of chloroplast *matK* and *trnL-trnF* genes in *Dendrobium*

Gene	Primer	Sequence of DNA marker (5’ → 3’)	Produced DNA fragment
matK	matKP1	CCT ATA TCC GCT ACT CCT TC	1410 bp
	matKP2	CTC AGT GAA TTT CAC CAC G	(劉等，2009)
trnL-trnF	DENS	TCG AAA TGA CAG AAA GGA	596 bp
	DENA	GTG CAT CAT CCC TAG TTT	(Wu *et al*., 2009)
trnL-trnF	trnLF450F	TTA GAT GAA GAA TCT ATC	450 bp
	DENA	GTG CAT CAT CCC TAG TTT	

電泳分析

經 PCR 後之反應液取 5 μL 進行電泳分析，加入 2 μL 追蹤染劑，以 1.5% 之瓊脂膠（agarose）膠片(0.6 g agarose 溶於 40 mL 0.5×TBE 緩衝液（1×：0.089 M Tris,

airiti

0.089 M Borate, 0.002 M EDTA）中，內含 DNA 染劑（Safe view DNA stain，C118-5，禾鑫生技開發企業社）），在 100V 之電壓下進行，電泳槽中之緩衝液亦為 0.5×TBE；電泳結束後以 Gel-Pro analyzer（Media Cybernetics）影像軟體，擷取電泳核酸條帶成影像檔，並進行條帶分子量大小及核酸片段型態分析。

DNA 回收及純化

以 Gene purification kit（Genemark）回收純化 DNA。以解剖刀切取 DNA 條帶膠塊，置入 1.5 mL 微量離心管中並加入 0.5 mL solution。移入 50℃水浴 5 min. 至膠塊完全溶解，加入適量 glass milk 使均勻混合，離心使 glass milk 沉澱，丟棄上層液。以 0.5 mL wash solution 清洗沉澱物 2 次，最後以 EB buffer 淋洗出沉澱物之 DNA。

DNA 序列分析

將回收純化之 DNA，寄送至源資國際生物科技股份有限公司(台北縣汐止市康寧街 169 巷 25 號 5F)進行定序分析，將獲得之 DNA 序列文字檔利用 NCBI 基因庫 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)進行搜尋比對。

群叢分析

將各品種 *matK* 序列利用 MEGA 5.10 軟體以不加權相對組法(unweighted pair-group method analysis, UPGMA)，進行群叢分析(cluster analysis)及繪製親緣關係樹狀圖。

結　果

圖一顯示藥用石斛種類繁多，只由未開花植株或花朵外表形態鑑別品種差異性困難度相當高。本研究利用擴增特定葉綠體 *matK* 基因(如圖二)，藉由 DNA 解序後分析各品種間序列差異性，利用 MEGA 5.10 軟體進行親緣關係群叢分析。所有測試藥用石斛植物可區分為 3 群，第 1 群為黃花石斛與鐵皮石斛；第 2 群為霍山石斛、銅皮石斛、紫皮石斛、金釵石斛、櫻石斛等；第 3 群為流蘇石斛與滇金石斛(如圖三)。種苗改良繁殖場雜交育成新品種種苗金皇一號(金釵石斛 X 黃花石斛)之遺傳親緣關係與黃花石斛關係較密切，雜交新品種種苗金童一號(金釵石斛 X

airiti

銅皮石斛)之遺傳親緣關係與金釵石斛關係較密切，銅皮石斛 X 霍山石斛雜交種與銅皮石斛關係密切。滇金石斛非 *Dendrobium* 屬植物及流蘇石斛均與其他藥用石斛有較遠遺傳距離，鐵皮與黃花石斛、金釵與櫻石斛之 DNA 序列呈現非常相似，植株外觀亦不易區分。

本次試驗另開發一組由葉綠體 *trnL-trnF* 間隔區序列之專一性分子標誌(trnL/F450)同時比較 Wu 等人(2009)開發之分子標誌(DENA/S)，測試結果顯示分子標誌 DENA/S 可擴增霍山石斛 596 bp DNA 條帶，但亦擴增其餘藥用石斛品種(鐵皮、金釵、流蘇、黃花石斛等) 900 bp DNA 條帶；分子標誌 trnL/F450 可擴增霍山石斛 450 bp DNA 條帶，其餘藥用石斛品種均未出現 DNA 條帶。本次實驗 2 組分子標誌(DENA/S 與 trnL/F450)均無法擴增雜交品種(銅皮石斛 x 霍山石斛)(如圖四)。

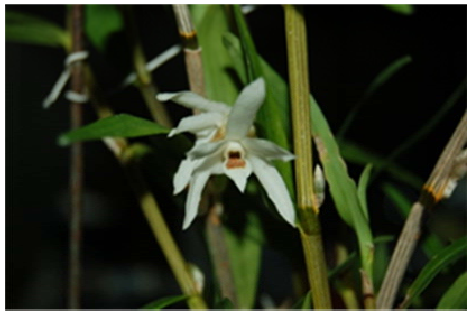
討　論

藥用石斛種類繁多，只由植株或花朵外表形態鑑別品種差異性困難度相當高，必須具有多年栽培經驗或資深中藥從業人員方能辨識，但過於近似或雜交品種尤其不易鑑定，藉由分子標誌技術或能彌補外表形態鑑定之不足。以鐵皮石斛與黃花石斛為例，二者植株外觀非常近似，鐵皮石斛因葉表皮呈鐵綠色(紫斑)而得名，唇瓣中部以上具 1 個明顯紫紅色斑塊為其特色(傅等，2002)；黃花石斛原生地為台灣、中國大陸及日本，唇瓣斑塊較小(傅等，2002)。金釵石斛與櫻石斛植株外觀亦非常相近，但櫻石斛莖在近兩端節的部分會內縮為其特徵，舌瓣上金釵石斛為一紅紫色大斑塊，櫻石斛為二小紅紫色斑塊(傅等，2002；Su, 2000)。

本研究利用 *matK* 基因進行群叢分析，可將所有測試藥用石斛植物區分為 3 群，黃花石斛與鐵皮石斛為親緣相近一群；霍山石斛、銅皮石斛、紫皮石斛、金釵石斛、櫻石斛等較相似；流蘇石斛與滇金石斛(非石斛屬植物)與上述石斛品種有較遠遺傳距離，此結果與外表形態表現一致，並與國外研究結果類似(丁等，2001；周等，2010；鄧等，2009；劉等，2009；Asahina *et al.*, 2010；Cheng *et al.*, 2004；Wang *et al.*, 2009；Zha *et al.*, 2009)。種苗改良繁殖場雜交育成新品種種苗金皇一號(金釵石斛 X 黃花石斛)之遺傳親緣關係與父本黃花石斛、鐵皮石斛關係較密切，雖然多數植物葉綠體具有母系遺傳(maternal inheritance)特性，Corriveau 與 Coleman (1988)研究發現百香果花粉生殖細胞中存在葉綠體 DNA，已陸續發現許多植物葉

airiti


1-1


1-2


1-3


1-4


1-5

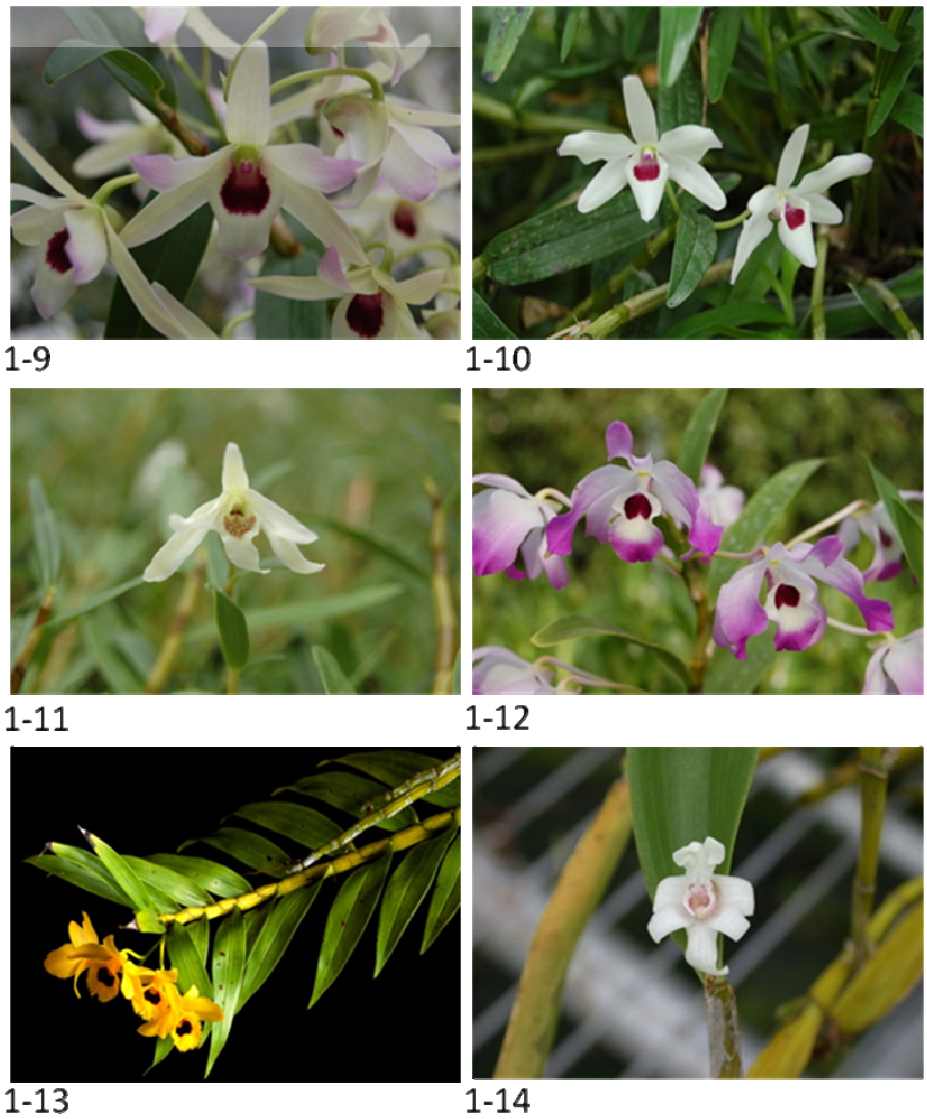

1-6


1-7


1-8

圖 1.continue

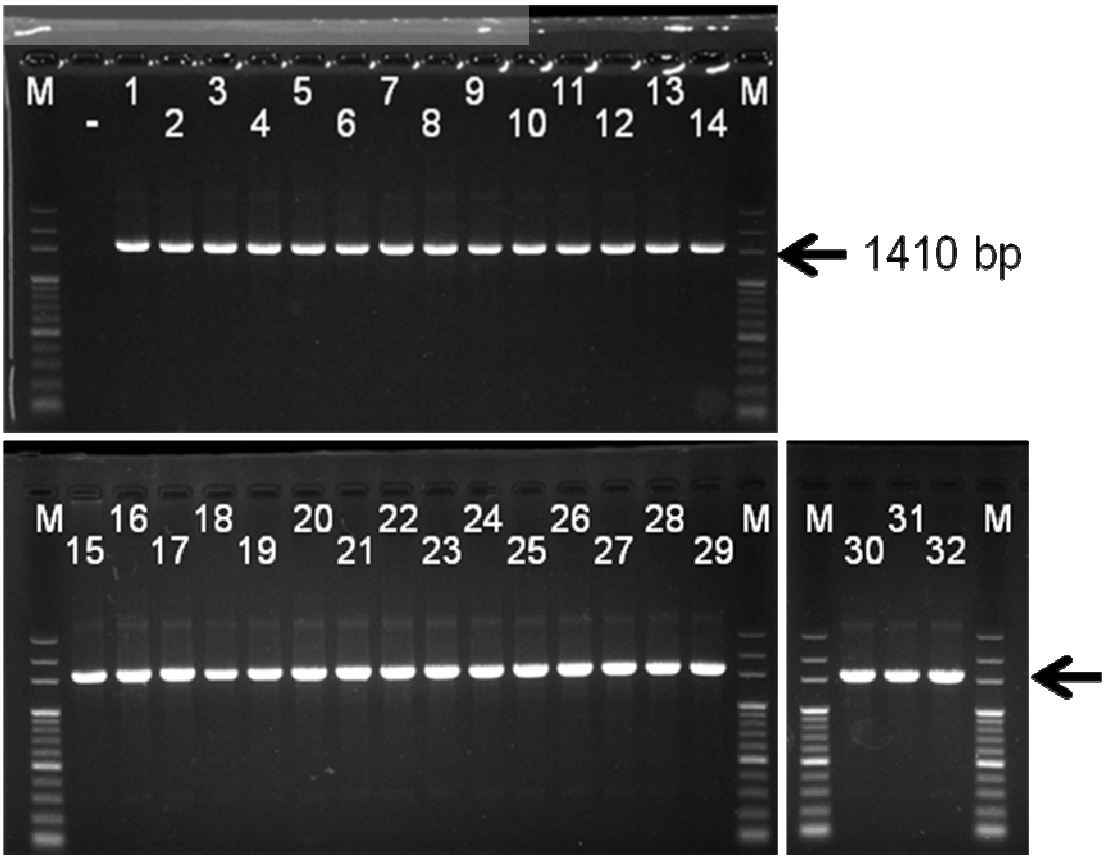
airiti



圖一、藥用石斛屬種原。1-1.霍山石斛；1-2.紫皮石斛；1-3.金釵石斛；1-4.櫻石斛；1-5.黃花石斛；1-6.鐵皮石斛；1-7.奮起湖銅皮石斛；1-8.杉林溪銅皮石斛；1-9.種苗金皇一號石斛；1-10.種苗金童一號石斛；1-11. 杉林溪銅皮石斛 X 霍山石斛；1-12. 金釵石斛 X 櫻石斛；1-13.流蘇石斛；1-14. 滇金石斛

Fig.1. Source of *Dendrobium* species. 1-1. *D. Huoshanense*; 1-2. *D. Devoninum*; 1-3. *D. Nobile*; 1-4. *D. Linawianum*; 1-5. *D. Tosaense*; 1-6. *D. Officinale*; 1-7. *D. moniliforme*(in Fenqihu); 1-8. *D. moniliforme*(in Sunlinksea); 1-9. *D.* Taiseed Tosnobile Taiseed Emperor No. 1; 1-10. *D.* Cassiope Taiseed Golden Boy No. 1; 1-11. *D. moniliforme*(in Sunlinksea)X *D. huoshanense*; 1-12. *D. nobile* X *D. linawianum*; 1-13. *D. fimbriatum*; 1-14. *Flickingeria albopurpurea*.

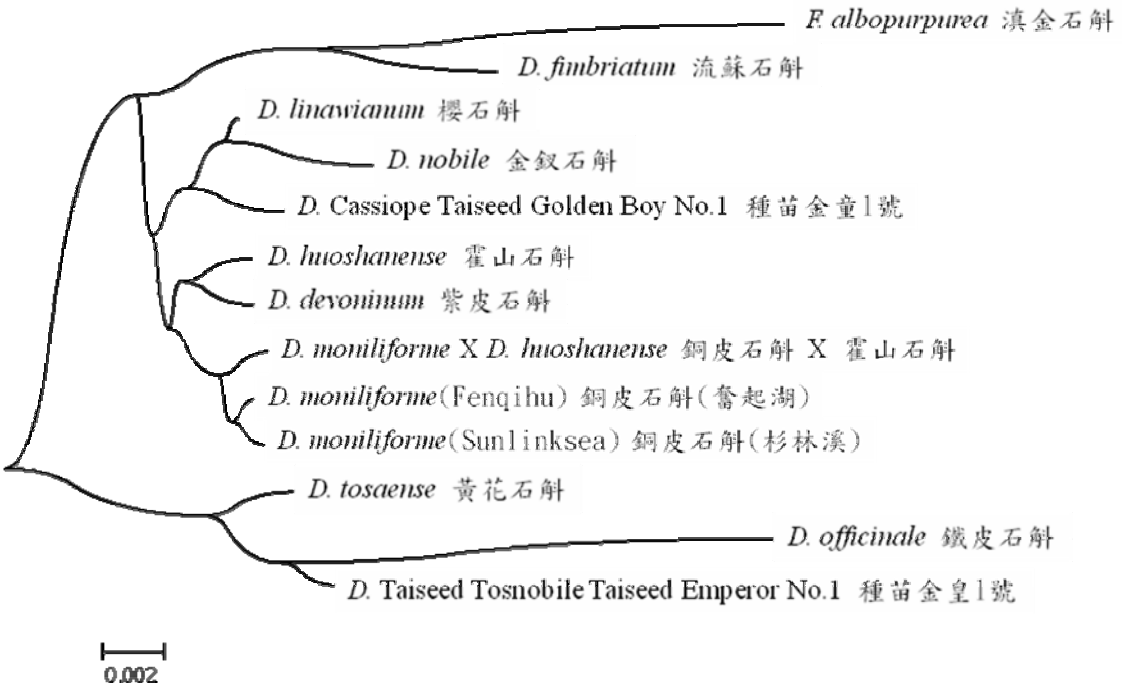
airiti



圖二、藥用石斛品種擴增葉綠體 *matK* 序列之 PCR 產物電泳圖。1~3.雜交種(銅皮 X 霍山)，4~6.鐵皮石斛，7.紫皮石斛，8~10.金釵石斛，11~13. 櫻石斛，14. 雜交種(金釵 X 櫻)，15.流蘇石斛，16~17.黃花石斛，18~20.滇金石斛，21~23. 雜交種-種苗金皇一號(金釵 x 黃花)，24~26.雜交種-種苗金童一號(金釵 x 銅皮)，27~30. 銅皮石斛，31~32.霍山石斛，M. molecular marker，-. 水。

Fig. 2. The chloroplast DNA matK gene region of *Dendrobium* species and hybrids were amplified by PCR, separating on 1.5% agarose. 1-3. Hybrid (*D. moniliforme* X *D. huoshanense*), 4-6. *D. officinale*, 7. *D. devoninum*, 8-10. *D. nobile*, 11-13. *D. linawianum*, 14. Hybrid (*D.nobile* X *D. linawianum*), 15. *D. finbriatum*, 16-17. *D. tosaense*, 18-20. *Flickingeria albopurpurea*, 21-23. Hybrid (*D.* Taiseed Tosnobile Taiseed Emperor No. 1- *D. nobile* X *D. tosaense*), 24-26. Hybrid (*D.* Cassiope Taiseed Golden Boy No. 1- *D. nobile* X *D. moniliforme*), 27-30. *D. moniliforme*, 31-32. *D. huoshanense*, M. molecular marker, -. Water.

airiti



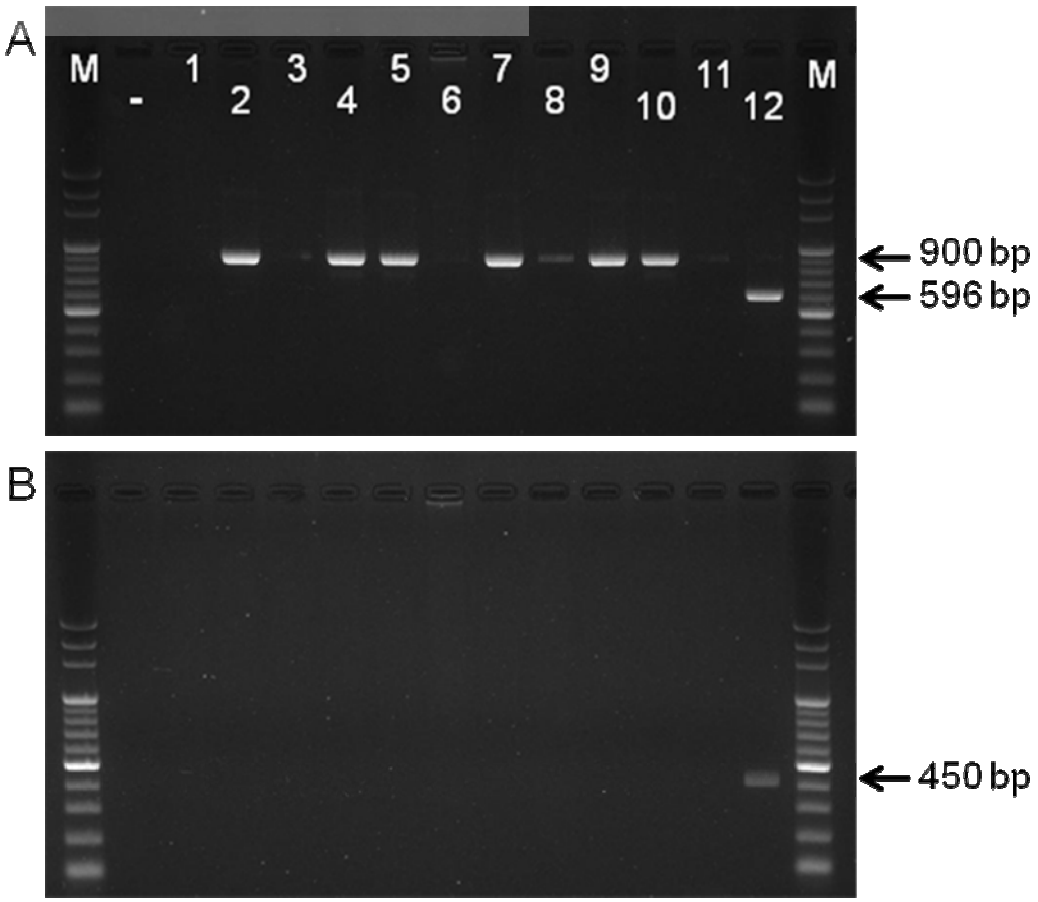
圖三、石斛屬植物利用葉綠體 *matK* DNA 序列，進行親緣關係樹狀圖分析

Fig. 3. Dendrogram of *Dendrobium* species using NJ phylogenetic cluster analysis based on genetic similarities of DNA sequences from chloroplast DNA *matK*.

綠體具有雙親(biparental)或父系遺傳(paternal inheritance)現象 (Hansen *et al*., 2007；Zhang, 2003)，金皇一號外表型態表現亦呈現與黃花石斛較多有較相似性狀，尤其植株直立性，葉形，花形趨近於黃花石斛 只是花大小與花色較接近金釵石斛，另外在成分上總多醣與生物鹼含量，也接近黃花石斛(資料未發表)，此結果與分子層次資料吻合。雜交新品種種苗金童一號(金釵石斛 X 銅皮石斛)之遺傳親緣關係與金釵石斛關係較密切，雜交種(銅皮石斛 X 霍山石斛)與銅皮石斛之遺傳相似度高，符合母系遺傳特性。此分子標誌結果可明確彌補外表型態不易區分雜交品種分類屬性之缺點。由於鐵皮與黃花石斛、金釵與櫻石斛之 DNA 序列呈現非常相似，植株外觀亦不易區分，目前尚無法開發出此 4 種石斛專一性分子標誌。

霍山石斛莖節部縊束如米粒狀，亦稱米斛，花瓣黃綠色，植株生長緩慢且非常矮小，常數株或數十株叢生一團。由於單價非常高，常造成偽品充斥中藥市場。

airiti



圖四、比較霍山石斛專一性分子標誌(DENA/DENS, A 與 trnLF450/DENA, B)擴增石斛屬植物之電泳圖。1.雜交種(銅皮 X 霍山)，2.鐵皮石斛，3.紫皮石斛，4.金釵石斛，5.雜交種(金釵 X 櫻)，6.流蘇石斛，7.黃花石斛，8.滇金石斛，9. 雜交種-種苗金皇一號(金釵 x 黃花)，10.雜交種-種苗金童一號(金釵 x 銅皮)，11. 銅皮石斛，12.霍山石斛，M. molecular marker，-. 水。

Fig. 4. PCR product of *Dendrobium* species and hybrids obtained with *D. huoshanense*-specific primers, DENA/S (A) and trnL/F450 (B) *trnL-trnF* rigion. 1. Hybrid (*D. moniliforme* X *D. huoshanense*), 2. *D. officinale*, 3. *D. devoninum*, 4. *D. nobile*, 5. Hybrid (*D.nobile* X *D. linawianum*), 6. *D. finbriatum*, 7. *D. tosaense*, 8. *Flickingeria albopurpurea*, 9. Hybrid (*D.* Taiseed Tosnobile Taiseed Emperor No. 1- *D. nobile* X *D. tosaense*), 10. Hybrid (*D.* Cassiope Taiseed Golden Boy No. 1- *D. nobile* X *D. moniliforme*), 11. *D. moniliforme*, 12. *D. huoshanense*, M. molecular marker, -. Water.

airiti

本研究進一步利用霍山石斛與其他藥用石斛品種之 *trnL-trnF* 間隔區序列呈現差異性之特性，設計 forward 引子(trnLF450F)配合 Wu 等人(2009)設計 reverse 引子(DENA)，此引子組只能擴增霍山石斛特定 DNA 序列，其餘藥用石斛屬植物無法擴增 DNA 條帶。Wu 等人(2009)設計引子組(DENS/DENA)雖能擴增霍山石斛 596 bp DNA 條帶，但鐵皮、黃花及金釵石斛等均出現 900 bp DNA 條帶，可能與內含子(intron)或嵌入(insertion)之 DNA 不同有關。本次試驗使用霍山石斛雜交種(銅皮石斛 x 霍山石斛)材料未出現 DNA 條帶，可能葉綠體 *trnL-trnF* 間隔區之分子標誌並未遺傳至 F1 所致，由於目前以霍山石斛為母本與其他石斛屬品種為父本雜交，均無法獲得種子，本研究可進一步測試較多以霍山石斛為父本之雜交後代以確認之。

參考文獻

丁小余、徐珞珊、徐紅、王崢濤、周開亞。2001。曲莖石斛及其近似種鑑別的形態和 DNA 分子證據。藥學學報 36: 868-873。

丁小余、徐珞珊、王崢濤、徐紅、周開亞。2002。束花石斛及其相似種的 DNA 分子鑑別。中國中藥雜誌 27: 407-411。

丁鴿、張代臻、張偉超、丁小余。2011。保健食品鐵皮石斛及其混淆品的分子鑑別及親緣關係分析。食品科學 3: 141-145。

白音。2007。藥用石斛鑑定方法的系統研究。北京中醫藥大學博士論文。

包英華、白音、王文全、閻玉凝。2007。美花石斛種質資源的 RAPD 分子鑑定。時珍國醫國藥 18: 1034-1035。

朱勝男、周振樺、馮尚國、汪尚、索那那、王慧中。2011。31 種石斛屬植物的 RAPD 遺傳多樣性分析。杭州師範大學學報 10: 333-339。

李靜。2010。石斛蘭種質資源鑑定評價。海南大學碩士論文。

沈穎。2004。石斛類 ISSR 標記研究與 ITS 序列分析。浙江大學碩士論文。

金國虔、蔡春海、于淩傑、李萍、葉波平。2006。霍山地區 4 種石斛屬植物的遺傳多態性分析。藥物生物技術 13: 28-31。

周倩、蔣賢慧、楊晶晶、高必達。2010。浙江樂青鐵皮石斛 rDNA ITS 序列的克隆及序列比對。基因組學與應用生物學 29: 513-517。

airiti

苑鶴、林二培、朱波、俞巧仙、斯金平。2011。鐵皮石斛人工栽培居群的遺傳多樣性研究。中草藥 42: 566-569。

黃海、李勁松、曹兵。2010。分子標記技術在石斛屬植物種質資源研究中的應用。生物技術通報 4: 75-87。

彭銳、李泉森、李隆雲。2004。石斛的分子生物學鑑定-基于 RAPD 分析。西南農業大學學報 26: 437-440。

馮尚國、胡旭、趙紅燕、王慧中。2010。DNA 分子標記在鐵皮石斛研究中的應用。中草藥 41: 499-502。

傅立國、陳潭清、郎楷永、洪濤、林祁、李勇。2002。中國高等植物(第一版)。13: 364-771。

楊立昌、鄧輝、乙引、張習敏、王亞築、林俊清。2010。藥用石斛 ISSR 分子標記研究。中藥材 33: 1841-1844。

楊春勇、李學蘭、王雲強、唐德英、張忠廉、高微微。2011。人工栽培石斛的 ISSR 標記分析。中國農學通報 27: 148-152。

趙瑞强。2012。基於分子標記的鐵皮石斛種質資源遺傳多樣性研究。浙江農林大學碩士論文。

鄧輝、陳乃富、李耀亭、劉明珍、何祥林。2009。霍山產 3 種藥用石斛及其雜交優勢種的 ISSR-PCR 分子標記鑑別。種子 28: 43-45。

劉明珍、陳乃富、劉秀珍、鄧輝、李耀亭、何祥林。2009。道地藥材霍山石斛及其相似種的分子鑑定。生物學雜誌 26: 34-36。

劉靜、何濤、淳澤。2008。分子標記技術在石斛屬植物中的應用研究進展。應用與環境生物學報 14: 855-862。

劉靜、何濤、淳澤。2009。基於 ITS 序列的中國藥用石斛及其混偽品的分子鑑定。中國中藥 34：2853-2856。

劉靜、何濤、淳澤。2009。藥用石斛的葉綠體 matK 基因序列分析及鑑別。藥學學報 44: 1051-1055。

應依、徐洪、王崢濤。2006。DNA 分子標記技術在中藥石斛類藥材鑑定中的應用。世界科學技術-中醫藥現代化 8: 65-70。

魏小勇、方花。2005。石斛屬藥用植物分子生物學研究。上海中醫藥大學學報 19: 47-49。

airiti

顧慧芬、莊意麗、馬子建、梅其春。2010。基於 ITS 序列分析鐵皮石斛與近緣類群的親緣關係。中成藥 32: 628-632。

Asahina H, J. Shinozaki, K. Masuda, Y. Morimitsu, and M. Satake. 2010. Identification of medicinal Dendrobium species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences. J. Nat. Med. 64: 133-138.

Cheng, K. T., S. F. Lo, C. Y. Lee, C. C. Chen, and H. S. Tsay. 2004. The rDNA sequence analysis of three Dendrobium species. J. FOOD DRUG ANAL. 12: 367-369.

Corriveau, J. L. and A. W. Coleman. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperms. Am. J. Bot. 75: 1443-1458.

Hansen, A. K., L. K. Escobar, L. E. Gilbert, and R. K. Jansen. 2007. Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae): implications for phylogenetic studies. Am. J. Bot. 94: 42-46.

Pathak, H. and D. P. Jaroli. 2012. DNA finger priting analysis of eight species of *Dendrobium* found in western ghats using RAPD and ISSR markers. Ind. J. Fund. Appl. Life Sci. 2: 306-311.

Su, H. J. 2000. Orchidaceae, in T. C. Huang (ed.), Fl. Taiwan 2nd ed. V. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Second Edition. Taipei, Taiwan: Department of Botany, National Taiwan University. 5: 839-849.

Takamiya, T., P. Wongsawad, N. Tajima, N. Shioda, J. F. Lu, C. L. Wen, J. B. Wu, T. Handa, H. Iijima, S. Kitanaka, and T. Yukawa. 2011. Identification od *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence. Biol. Pharm. Bull. 34: 779-782.

Wang, H. Z., S. G. Feng, J. J. Lu, N. N. Shi, and J. J. Liu. 2009. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae 122: 440-447.

Wu, S. J., Y. S. Liu, T. W. Chen, C. C. Ng, W. S. Tzeng, and Y. T. Shyu. 2009. Differentiation of medicinal *Dendrobium* species (Orchidaceae) using molecular markers and scanning electron microscopy. J. Food Drug Anal. 17: 474-488.

airiti

Xu, H., Z. Wang, X. Ding, K. Zhou, and L. Xu. 2005. Differentiation of *Dendrobium* species used as "Huangcao Shihu" by rDNA ITS sequence analysis. Planta 71: 1-3.

Yuan, Z. Q., J. Y. Zhang, and T. Liu. 2009. Phylogenetic relationship of China *Dendrobium* species based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. Biol. Plantarum 53: 155-158.

Zha, X., J. Luo, J. Wang, Z. Wei, and S. Jiang. 2009. Genetic characterization of the nine medicinal *Dendrobium* species using RAPD. African Biotechnology 8: 2064-2068.

Zhang, Q., Y. Liy, and Sodmergen. 2003. Examination of cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. Plant Cell Physiol. 44: 941-951.

Zhang, T., Z. T. Wang, L. S. Xu, and K. Y. Zhou. 2005. Application of mitochondrial nad 1 intron 2 sequences to molecular identification of some species of *Dendrobium* Sw. Chinese Traditional and Herbal Drugs 36: 1059-1062.

airiti

Cluster Analysis and Identify of Medicinal *Dendrobium* Species Using Chloroplast Genes Sequences and Molecular Marker for *D. huoshanense*

Yung-Wei Sun[1)]、Jia-Ci Chang[1)]、Hui-Ju Chang[1)]、Yu-Ju Liao[1)]、Mei-Jiuan Lee[1)]、Wen-Chuan Chung[1)]、Chi-Luan Wen[2)]

[1)] Associate Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, Associate Technical Specialist, Associate Researcher, Researcher, Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, TSIPS. Taiwan, R.O.C.

[2)] Associate Researcher(corresponding author), Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, TSIPS. Taiwan, R.O.C.

Address: No.46, Da Nan, Shing Sher Township, Taichung Country, Taiwan, R.O.C.

TEL: 04-25825465

E-mail: cluwen@tss.gov.tw

Summary: *Dendrobium* species have been used as important herbal medicines in Asia. This study, based on the analysis of chloroplast maturase-conding (*matK*) gene, conducted an genetic study to identify *Dendrobium* species (*D. officinale*, *D. devoninum*, *D. nobile*, *D. linawianum*, *D. finbriatum*, *D. tosaense*, *D. moniliforme*, *D. huoshanense*), hybrids (*D. moniliforme* X *D. huoshanense*, *D.nobile* X *D. linawianum*, *D.* Taiseed Tosnobile Taiseed Emperor No. 1- (*D. nobile* X *D. tosaense*), *D.* Cassiope Taiseed Golden Boy No. 1- (*D. nobile* X *D. moniliforme*)) and *Flickingeria albopurpurea* species. Results revealed that the *matK* gene was diverse and could be used for phylogenetic study. Based on the phylogenetic trees (MEGA 5.10 software) constructed from *matK* gene sequences, it was successfully to group *Dendrobium* species and *Flickingeria albopurpurea* into 3 clusters. The cluster 1 included *D. tosaense*, and *D. officinale*, whereas the cluster 2 composed by *D. huoshanense*, *D. moniliforme*, *D. devoninum*, *D. nobile* and *D. linawianum*. The cluster 3 containd *D. finbriatum* and *Flickingeria albopurpurea*. Taiseed Emperor No. 1 (*D. nobile* X *D. tosaense*) and Taiseed Goldenboy No. 1 (*D. nobile* X *D. moniliforme*) was clustered with *D. tosaense* and *D. nobile*, respectively. The developed marker trnLF450/DENA based on the chloroplasr DNA *trnL-trnF* spacer region was successful to specific

airiti

amplify the DNA of *D. huoshanense*, but not other *Dendrobium* species and *Flickingeria albopurpurea*. The marker trnLF450/DENA could be functional as a specific marker for *D. huoshanense* identification.

Key words: *Dendrobium*, molecular marker, chloroplast, phylogenetic analysis

Received for publication 21 August 2013.