

# 文心蘭‘草莓’品種5.8S rRNA基因 與內轉錄間隔區之選殖<sup>1</sup>

蔡奇助、黃勝忠、易美秀<sup>2</sup>

## 摘 要

本研究設計一組核酸引子(primer)，序列分別為IT1: 5' CGTAACAAGGTTTCC 3' 和 IT2: 5' AGTTTCTTCTCCTCC 3'，利用聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，可以將文心蘭‘草莓’品種(*Oncidium vokalanti* cv. "Strawberry")的5.8S核糖體核酸(rRNA)基因與內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)有效複製，複製產物長為699 bp，定序後，利用Blast分析與送入基因庫(GenBank)內其他高等植物相同區域比較，發現PCR複製的DNA片段中，有26 bp屬於18S rRNA基因的3'端，而52 bp屬於26S rRNA基因的5'端。因此，內轉錄間隔區(ITS)實長為621 bp，此區包含ITS1, 5.8S rRNA基因與ITS2等三區，其長度分別為211 bp, 163 bp及247 bp，G+C百分比分別為54.5, 58.3及56.3%。

**關鍵字：**文心蘭、聚合酵素連鎖反應、5.8S核糖體核酸基因、核糖體核酸內轉錄間隔區。

## 前 言

文心蘭(*Oncidium* spp.)為蘭科(Orchidaceae)文心蘭屬(*Oncidium*)植物，此類植物原產於熱帶美洲地區，已發現700多種原生種。植株特性大多為氣生性之複莖軸蘭，但亦有少數種類為地生蘭<sup>(12)</sup>。大多數的文心蘭植株與其近親堇花蘭(*Miltonias*)及齒舌蘭(*Odontoglossums*)十分相近，有的屬於扁平假球莖型；有些品種葉稍圓似洋蔥之葉片如*Onc. stiptatum*；有些則葉片小如扇形之鳶尾葉如*Onc. triquetrum*<sup>(1)</sup>等。

聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)技術自西元1984年問世後，建立了體外(*in vitro*)複製DNA的方法。在PCR的反應中，需於欲複製的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，在有適當的鹽和緩衝液下，DNA聚合酵素會行聚合反應，隨著溫度循環，經模板DNA兩股變性解鏈(denature)、引子煉合(annealing)以及引子的延伸(extension)等三過程，會將兩引子間的DNA片段大量複製<sup>(2)</sup>。由於此技術具快速、專一性、靈敏性且易於操作等優點，很適合用來探討許多生物學上的問題。

真核生物的核糖體核酸(ribosomal DNA, rDNA)為一群成縱線排列(tandem array)的重複性基因(repeated gene families)，位於染色體的核仁組成中心(nucleolar organizer region)。並且各個重複單位間皆能保持其相似性，此現象可能受到不等重組(unequal recombination)和基因

<sup>1</sup> 台中區農業改良場研究報告第 0478 號。

<sup>2</sup> 台中區農業改良場助理、研究員兼課長及助理。

轉變(gene conversion)的調控<sup>(7)</sup>。此外，每個重複單位(repeat unit)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)。當rDNA初轉錄形成一個轉錄單位(transcription unit)時，經一系列製程(processing)後，上述2個轉錄間隔區會在修飾的過程中除去，形成成熟的rRNA (mature RNA)<sup>(5,10,33)</sup>。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的地點。因此，rDNA在蛋白質合成，生物生長、發育與生殖上扮演重要角色<sup>(31)</sup>。另外，在rDNA之序列結構中，在18S、5.8S和26S rRNA基因區中之序列，在不同物種間相當一致；但在ITS和IGS的區域中，不同物種間之長度及序列上常有很大變異<sup>(10,23,37)</sup>。

本研究藉由比對基因庫中已發表之植物rDNA序列，設計一組引子，利用PCR技術，將文心蘭‘草莓’品種rDNA之ITS區域加以複製，以供進一步研究該序列，希能應用於品種鑑定、育種及品種專利等方面。

## 材料與方法

### 一、研究材料

本研究材料文心蘭‘草莓’品種(*Oncidium vokalanti* cv. "Strawberry")為一屬內雜交品種。依葉形將之歸類為劍葉文心蘭。

### 二、研究方法

#### (一) DNA之抽取

依Shure等人(1983)<sup>(29)</sup>的方法抽取文心蘭‘草莓’品種幼葉之總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

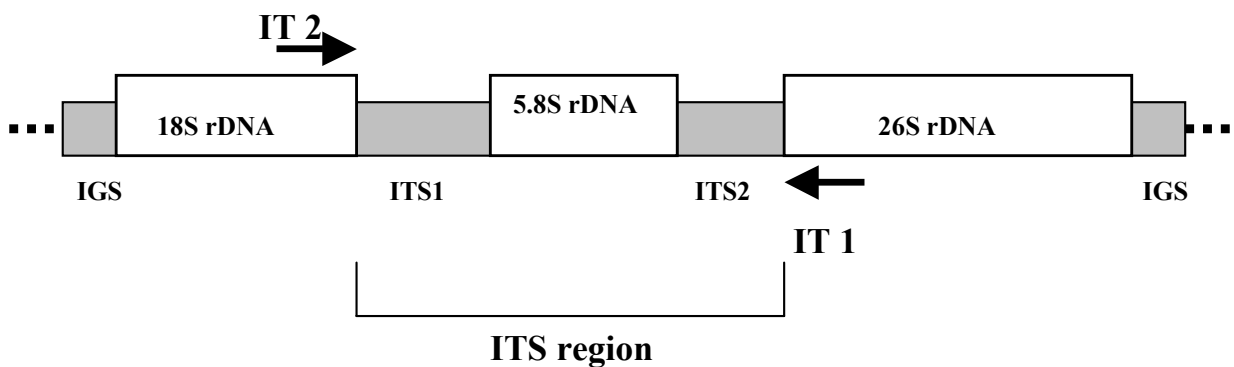
修改Arnheim and Erlich (1992)<sup>(2)</sup>的方法，反應內容物及濃度如下：10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (w/v) gelatin, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dTTP與IT1及IT2引子各0.5 μM，最後加入80 ng的模板DNA，加無菌水將總體積補成50 μl，置於0.6 ml的微量離心管，再於溶液表面加入50 μl的礦物油(mineral oil)，將微量離心管置入熱循環器(Biometra Co.)。反應的熱循環溫度及時間如下，先以94°C反應10分鐘，然後加1.25 units的Taq DNA聚合酵素，接下來溫度及時間如下，94°C反應45秒，52°C反應20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，50°C反應20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(40 mM Tris-Boric acid, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)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) DNA序列分析

依 Sambrook 等人(1989)<sup>(24)</sup>之法，利用大腸桿菌 JM109 製備勝任細胞(competent cell)。另外，將經 Glassmilk 回收 DNA 標準法(Geneclean Kit II, BIO 101 Co.)所回收之 DNA 與 T-vector (Promega Co.)行接合反應(ligation)<sup>(24)</sup>。將此接合後之質體與勝任細胞行轉型作用(transformation)<sup>(24)</sup>，經大腸桿菌培養、複製及質體抽取後，以 AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia Co.)之標準法行定序反應與電泳分離，配合自動定序儀，以讀取定序之 DNA 序列。

## 結果與討論

引子設計時，首先尋找目標 DNA 片段兩端之序列保留區(conserved sequence region)，在保留區內，尋找適合之序列當引子。引子的長度約 15~30 bp，G+C 百分比約 40~60%，且 3' 端序列最好為 CC, GG, GC CG，並避免同一種氮鹽基連續出現 4 個以上<sup>(19)</sup>。此外，引子本身或兩引子間不會形成二次或互補結構，以避免引子聚合物(primer dimer)產生<sup>(19,30)</sup>。由 GenBank 序列比對的結果，於 18S rRNA 基因的 3' 端與 26S rRNA 基因的 5' 端的序列保留區<sup>(16,17,32,34)</sup>各設計一條 15 mer 的引子(圖一)，序列分別為 IT1: 5' CGTAACAAGGTTTCC 3' and IT2: 5' AGTTTCTTCTCCTCC 3'，且其 G+C 百分比皆為 46.7%，引子 IT1 及 IT2 之 3' 端皆為 CC。利用上述這組引子可有效將文心蘭‘草莓’品種 rDNA 之 ITS 區域有效複製，其長度為 699 bp。



圖一、rRNA 基因之基本結構，及 PCR 複製核糖體核酸內轉錄間隔區(ITS)時，引子(IT1 及 IT2)所在位置。

Fig. 1. The structure of ribosomal RNA gene of higher plants. The positions of internal transcribed spacer (ITS) regions relative to 18S, 5.8S rDNA, 26S rDNA and the intergenic spacer (IGS).

Corresponding positions of primers (IT1 and IT2) used for PCR and sequencing.

我們將上述 PCR 產物進行定序，將序列送入基因庫進行比對，其中有 26 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 621 bp，其中有 211 bp 為 ITS1，163 bp 為 5.8S rRNA 基因，247 bp 為 ITS2 序列，G+C 百分比分別為 54.5、58.3 及 56.3% (圖二)。比較許多已發表之高等植物 rDNA 之 ITS 各區的長度與 G+C 百分比，發現 5.8S rRNA 基因之長度在 162~167 bp 間，但以 163 或 164 bp 二類為主；G+C 百分比幾乎皆在 50~60% 間。但在 ITS1 及 ITS2 區域之長度及 G+C 百分比變化很大，長度分別介於 204~294 bp 間及

188~247 bp間；G+C百分比分別介於34.0~72.7%及30.4~70.2%間(表一)。此外，將文心蘭‘草莓’品5.8S rRNA基因區序列與水稻(禾本科)<sup>(33)</sup>、蠶豆(豆科)<sup>(39)</sup>、煙草(茄科)<sup>(37)</sup>、芥菜(十字花科)<sup>(22)</sup>、香瓜(瓜科)<sup>(13)</sup>之相同區域比較，相似性分別為91.4, 85.9, 88.3, 90.8, 85.9%。其中，文心蘭與同為單子葉植物之水稻相似性最高。其餘蠶豆、煙草、芥菜及香瓜皆為雙子葉植物，與文心蘭的相似性稍低。此顯示，雖然文心蘭與上述物種間之親緣關係很遠，但於5.8S rRNA基因序列具有極高之相似性(圖三)。本研究文心蘭‘草莓’品種ITS各區序列中，ITS1與5.8S rRNA基因區之長度與G+C百分比皆無特異之處，但ITS2之長度卻比其它植物長。因此，就演化觀點而言，5.8S rRNA基因區為較保守之區域，但在ITS1及ITS2區域卻變化很大，此乃因基因區攸關生物體的存歿，不適當的變異會造成生物體死亡，以致在演化的過程中無法存續。但非基因區(如ITS1, ITS2)雖有部分生理功能，但僅限於少部份區域，以致變異容易被保存下來。就分類觀點，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, 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*)<sup>(39)</sup>與豇豆屬之*Vigna radiata*<sup>(28)</sup>雖屬同科，但蠶豆之ITS1之長度與G+C之百分比值皆較ITS2大；反之，*Vigna radiata*之ITS1之長度與G+C之百分比值卻較ITS2小。由於ITS1, ITS2區域在演化過程中容易產生變異，因其變異度大，因此適合探討較相近分類群之親緣關係(phylogenetic relationship)<sup>(18,27)</sup>。在高等植物中，以菊科植物的研究最多，如Madiinae亞族<sup>(3)</sup>，*Calycadenia*屬<sup>(4)</sup>，*Krigia*屬<sup>(14)</sup>，*Dendroseris*屬<sup>(25)</sup>及*Antennaria*屬<sup>(6)</sup>等之親緣研究。

```
TCGAGACCGA AGAAAATATC GAGCGATTTG AAAAACCCGT TAAATGAGGC CATTTCGGTC 60
GTCGCCCCCG ACACTTCTTT GAGTTGAAGG GGCACGACGG AAGATGGATG AACCAAAAC 120
ITS 1
CGGCGCAGCA TTGCGCCAAG GGAAGATCGA AAAGAGCGAG GCCCGCAACG GGCTCGATGA 180
TGTGGAGTGC TAGTGACGCG CATGCGGATA GACACGACTC TCGACAATGG ATATCTTGGC 240
TCTTGCATCG ATGAAGAGCG CAGCGAAATG CGATACGTGG TCGGAATTGC AGAATCCCGC 300
5.8S rRNA gene
GAACCATCGA GTCTTTGAAC GCAAGTTGCG CCCGAGGCCA GCCGGCCAAG GGCACGTCCG 360
CCTGGGCGTC AAGCGTTGCG TCGCTCCGTG CTAGCTATCT CGCCAATGGG CGTGTCGAGC 420
GATGCTCGGA TGTGAAGAGT GGCTCGTCGT GCTGGTTAGT GCCGCGGGCT GAAGAGCGGG 480
ITS 2
TTTTCTCTCA ATTGATGCGA ACCAACAAGC GGTGGGTGTA AAGCTCTGAT TGCAGCCTAC 540
GTTGTCTCGT GCTGTCCGAG AAAGATATTC CTTTCATTTG ATCCCCGACC ATGCGCTGGT 600
TCGGCATGCG GCGGCTTGGA A 621
```

圖二、文心蘭‘草莓’品種 5.8S 核糖體核酸(rRNA)基因及內轉錄間隔區(ITS)之序列。圖中區塊為 5.8S 核糖體核酸基因區；底線區域由上而下分別為 ITS 1 及 ITS 2。網底區為許多高等植物 rDNA 的 ITS1 之序列保留區。

Fig. 2. Nucleotide sequence of a 5.8S rRNA gene and of internal transcribed spacers from *Oncidium vokalanti* cv. ‘Strawberry’ (Accession number: AF124983). 5.8S rRNA gene was boxed. The ITS1 and ITS2 were underlined. Gray shadow region was putative conserved sequences in ITS1 region among many higher plants.

表一、文心蘭 '草莓' 品種 rDNA 之 ITS 各區長度與 G+C%及與其他高等植物之比較

Table 1. The comparison of the length and G+C content in ITS of rDNA between *Oncidium vokelanti* cv. 'Strawberry' and some other higher plants

Taxa, reference	Family	ITS1		5.8S rDNA		ITS2	
		Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)
<b>Monocots</b>							
<i>Oryza sativa</i> <sup>(33)*</sup>	Gramineae	196	72.7	163	59.5	232	59.5
<i>Imperata cylindrica</i> <sup>(35)</sup>	Gramineae	205	65.9	163	57.1	216	71.8
<i>Triticum aestivum</i> <sup>(9)</sup>	Gramineae	222	62.2	163	59.5	217	61.3
<i>Agave dasylirioides</i> <sup>(8)</sup>	Agavaceae	250	65.2			239	70.2
<i>Oncidium vokelanti</i>	Orchidaceae	211	54.5	163	58.3	247	56.3
<b>Dicots</b>							
<i>Chrysanthemum morifolium</i> <sup>(36)</sup>	Asteraceae	253	50.1	164	54.3	221	52.7
Madiinae <sup>(3)</sup>	Asteraceae	255-261	47.7-51.4	164	51.2-53.7	216-223	49.5-53.0
<i>Populus deltoides</i> <sup>(10)</sup>	Salicaceae	214	66.8	164	55.4	207	69.5
<i>Mimulus glaucescens</i> <sup>(23)</sup>	Scrophulariaceae	206	44.0	162	50.6	225	47.0
<i>Daucus carota</i> <sup>(39)</sup>	Apiaceae	215	49.4	164	54.2	224	52.3
Apioideae <sup>(11)</sup>	Apiaceae	204-221	49.1-57.7			216-226	42.7-59.6
<i>Vicia faba</i> <sup>(39)</sup>	Leguminosae	235	51.9	164	50.6	208	49.6
<i>Vigna radiata</i> <sup>(28)</sup>	Leguminosae	205	60.0	163	52.8	220	59.1
<i>Arceuthobium americanum</i> <sup>(21)</sup>	Viscaceae	209	34.0	167	41.9	227	30.4
<i>Paeonia</i> <sup>(26)</sup>	Ranunculaceae	267	54.3-56.6	164	53.7	220	57.2-59.5
<i>Gossypium</i> <sup>(38)</sup>	Malvaceae	293-294	58.0			210-226	61.0
<i>Nicotiana rustica</i> <sup>(37)</sup>	Solanaceae	216	69.4	163	55.2	217	65.4
<i>Lycopersicon esculentum</i> <sup>(15)</sup>	Solanaceae	236	62.3	163	55.2	224	68.3
<i>Sinapis alba</i> <sup>(22)</sup>	Cruciferae	265	50.6	163	52.8	188	54.3
<i>Canella winterana</i> <sup>(40)</sup>	Canellaceae	272	62.5	163	55.8	209	62.6
<i>Cucumis melo</i> <sup>(13)</sup>	Cucurbitaceae	216	55.6	163	58.9	237	60.2

\*Represent the references.

<i>Oncidium vokelanti</i>	ACACGACTCT	CGACAATGGA	TATCTTGGCT	CTTGCATCGA	TGAAGAGCGC
<i>Oryza sativa</i>	.....	..G...C...	.....C....	..C.....	.....A..T.
<i>Vicia faba</i>	GAT.....	..G...C...	.....A....	.....	.....A..T.
<i>Nicotiana rustica</i>	.A.....	..G...C...	.....C....	..C.....	.....AGCT.
<i>Sinapis alba</i>	.A.....	..G...C...	.....	..C.....	.....A..T.
<i>Cucumis melo</i>	.A.....	..G...C...	.....C....	..C.....	.....A..T.
<i>Oncidium vokelanti</i>	AGCGAAATGC	GATACGTGGT	GCGAATTGCA	GAATCCCGCG	AACCATCGAG
<i>Oryza sativa</i>	.....	.....C....	.T.....	.....T.	.....
<i>Vicia faba</i>	.....	.....T....	.T.....	.....T.	.....
<i>Nicotiana rustica</i>	.....	.....T....	.T.....	.....T.	.....
<i>Sinapis alba</i>	.....	.....T....	.T.....	AG.....T.	.....
<i>Cucumis melo</i>	.....	.....T....	.T.....	.G.....	.....C....
<i>Oncidium vokelanti</i>	TCTTTGAACG	CAAGTTGCGC	CCGAGGCCAG	CCGGCCAAGG	GCACGTCCGC
<i>Oryza sativa</i>	.....	.....	.....T	.....G...	.....C.T..
<i>Vicia faba</i>	.....	.....	.....T	TA..TTG...	.....T..
<i>Nicotiana rustica</i>	.....	.....	...A...T	TA...G...	.....T..
<i>Sinapis alba</i>	.....	.....	..C.A..TT	.T...G...	.....T..
<i>Cucumis melo</i>	.....	.....	..GA..TT	.T...G...	.....T..
<i>Oncidium vokelanti</i>	CTGGGCGTCA	AGC			
<i>Oryza sativa</i>	.....	C..			
<i>Vicia faba</i>	.....T...A	CAT			
<i>Nicotiana rustica</i>	.....	C..			
<i>Sinapis alba</i>	.....T....	...			
<i>Cucumis melo</i>	.....T...A	CAA			

圖三、文心蘭‘草莓’品種 5.8S 核糖體核酸(rRNA)基因序列與水稻、蠶豆、煙草、芥菜、香瓜相同區域之比較。

Fig. 3. Compare nucleotide sequence of a 5.8S rRNA gene from *Oncidium vokelanti* with corresponding region of *Oryza sativa*, *Vicia faba*, *Nicotiana rustica*, *Sinapis alba* and *Cucumis melo*.

在高等植物中，可在ITS1區域中發現GGCRY-(4 to 7n)-GYGYCAAGGAA (Y表C或T, R表G或A)序列保留區，因此推測此保留區在rDNA初轉錄形成一個轉錄單位時，將之製程為成熟 rRNA (mature RNA)上，扮演重要角色<sup>(18)</sup>。本研究在文心蘭‘草莓’品種rDNA之ITS1區域中，雖發現類似上述序列保留區，但並非完全吻合，其序列為GGCGC-6n-GTGCCAAGGGA，差異在近3'端之倒數第二個為G，並非A。在基因庫中，有另外一種蘭科植物*Vanilla planifolia* rDNA之ITS已被定序，序列保留區亦非完全吻合，其序列為GGCGT-6n-GCGCCAAGGCA，差異在近3'端之倒數第二個為C，並非A<sup>(20)</sup> (圖四)。因前人在研究序列保留區時<sup>(18)</sup>，並無蘭科相對應區域供分析，目前ITS序列已定出的兩種蘭科植物，其ITS1序列保留區與前人之研究並不完全吻合。因此，在高等植物ITS1序列保留區的研究方面，需累積更多資料方能找出真正序列保留區。

Many higher plants GGCRY-(4 to 7n)-GYGYCAAGGAA  
*Vanilla planifolia* GGCGT- 6n -GCGCCAAGG□CA  
*Oncidium vokelanti* GGCGC- 6n -GCGCCAAGG□GA

圖四、許多高等植物 rDNA 的 ITS1 之序列保留區與蘭科植物 *Vanilla planifolia* 及文心蘭‘草莓’品種之相對應序列比較。序列中 R 表 G 或 A；Y 表 C 或 T；框線區域為不吻合處。

Fig. 4. To compare the conserved regions in ITS1 of many higher plants, *Vanilla planifolia* and *Oncidium vokelanti* cv. ‘Strawberry’. R represents G or A; Y represents C or T; Variable region was boxed.

rDNA之ITS區域在演化的過程中是較易變異的區域，因而適合探討較相近之分類群。因此，可藉分析 ITS區域來尋找各文心蘭品種(系)的分子標誌，以供未來文心蘭品種鑑定、育種及品種專利之應用。

## 誌 謝

本研究承行政院農業委員會 (88生技-2.1-糧-02(14)) 計畫補助；邱苡珊小姐、白佳惠小姐協助試驗，謹此一併申謝。

## 參考文獻

- 1.陳昭明 1998 文心蘭病蟲害種類及其防治方法介紹 台灣花卉園藝 130: 32-33。
- 2.Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. Annu. Rev. Biochem. 61: 131-156.
- 3.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.
- 4.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.
- 5.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.
- 6.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.
- 7.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.
- 8.Bogler, D. J. and B. B. Simpon. 1996. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. Am. J. Bot. 83: 1225-1235.
- 9.Chatterton, N. J., C. Hsiao, K. H. Asay, R. R. C. Wang and K. B. Jensen. 1992. Nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region of rDNA in wheat, *Triticum aestivum* L. Plant Mol. Biol. 20: 159-160.

10. 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.
11. 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.
12. Dressler, R. L. 1990. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University. U.S.A. p.332.
13. Kavanagh, T. A. and J. N. Timmis. 1988. Structure of melon rDNA and nucleotide sequences of 17-25S spacer region. *Theor. Appl. Genet.* 76: 673-680.
14. 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.
15. Kiss, T., M. Kis, S. Abel and F. Solymosy. 1988. Nucleotide sequence through the 17S-25S spacer region from tomato rDNA. *Nucl. Acids Res.* 16: 7179.
16. Kiss, T., M. Kis and F. Solymosy. 1989. Nucleotide sequence of a 25S rRNA gene from tomato. *Nucl. Acids Res.* 17: 796.
17. Kiss, T., A. Szukalek and F. Solymosy. 1989. Nucleotide sequence of a 17S (18S) rRNA gene from tomato. *Nucl. Acids Res.* 17: 2127.
18. Liu, J. S. and C. L. Schardl. 1994. A conserved sequence in internal transcribed spacer of plant nuclear rRNA genes. *Plant Mol. Biol.* 26: 775-778.
19. Lowe, T., J. Sharefkin, S. Q. Yang and C. W. Dieffenbach. 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucl. Acids Res.* 18: 1757-1761.
20. Mai, J. C. and A. W. Coleman. 1996. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants (Unpublished)
21. Nickrent, D. L., I. L. Carbondale, K. P. Schuette and E. M. Starr. 1994. A molecular phylogeny of *Arcanthobium* (Viscaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences *Am. J. Bot.* 81: 1149-1160.
22. Rathgeber, J. and I. Capesius. 1989. Nucleotide sequence of the 18S-25S spacer region from mustard DNA. *Nucl. Acids Res.* 17: 7522.
23. Ritland, C. and N. A. Straus. 1993. High evolutionary divergence of the 5.8S ribosomal DNA in *Mimulus glaucescens* (Scrophulariaceae). *Plant Mol. Biol.* 22: 691-696.
24. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
25. 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. *Am. J. Bot.* 81: 1494-1501.
26. 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.
27. Schaal, B. A. and G. H. Learn. 1988. Ribosomal DNA variation within and among plant populations. Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1207-1216.
  28. Schiebel, K. and V. Hemleben. 1989. Nucleotide sequence of the 18S -25S spacer region from rDNA of mung bean. Nucl. Acids Res. 17: 2852.
  29. Shure, M., S. Wessler and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. Cell 35: 225-233.
  30. Sommer, R. and D. Tautz. 1989. Minimal homology requirements for PCR primers. Nucl. Acids Res. 17: 6749.
  31. Stern, S., T. Poers, L. M. Chang-Chien and H. F. Noller. 1989. RNA-protein interactions in 30S ribosomal subunit; folding and function of 16S rRNA. Science 244: 783-789.
  32. Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura. 1984. The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene. Nucl. Acids Res. 12: 5441-5448.
  33. 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.
  34. Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura. 1985. The complete nucleotide sequence of a rice 25S rRNA gene. Gene 37: 255-289.
  35. Tsai, C. C. and C. H. Chou. 1999. Sequence of a 5.8S rRNA gene and of internal transcribed spacer from *Imperata cylindrica*. Plant Mol. Biol. (In press).
  36. Tsai, C. C., S. C. Huang, C. S. Sheu and Y. S. Chiu. 1999. Sequence of a 5.8S rRNA gene and of internal transcribed spacer from *Chrysanthemum morifolium* Ramat "Red Gafe". Plant Mol. Biol. (In press).
  37. Venkateswarlu, K. and R. Nazar. 1991. A conserved core structure in the 18-25S rRNA intergenic region from tobacco, *Nicotiana rustica*. Plant Mol. Biol. 17: 189-194.
  38. Wendel, J. F., A. Schnabel and T. Seelanan. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 280-284.
  39. 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.
  40. Youngbae, S., L. B. Thien and E. A. Zimmer. 1992. Nucleotide sequences of the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene in *Canella winterana* (Magnoliales; Canellaceae). Nucl. Acids Res. 20: 6101-6102.

# Nucleotide Sequence of 5.8S Ribosomal RNA Genes and of Internal Transcribed Spacers from *Oncidium vokelanti* cv. 'Strawberry'<sup>1</sup>

Chi-Chu Tsai, Sheng-Chung Huang and Mei-Shiou Yih<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The nucleotide sequence of internal transcribed spacer (ITS) region between 18S and 26S ribosomal RNA (rRNA) genes of *Oncidium vokelanti* cv. 'Strawberry' was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The primers for PCR, IT1: 5'CGTAACAAGGTTTCC 3' and IT2: 5' AGTTTCTTCTCCTCC 3' were designed for amplification and sequencing. The length of PCR product was 699 bp. Compare the obtained sequence with the sequence of ITS from other higher plant species, showed that the cloned sequence contained 52 bp of 26S rRNA gene, ITS region and 26 bp of 18S rRNA gene. Thus, the length of ITS region was 621 bp, including 211 bp of ITS1, 163 bp of 5.8S rRNA gene and 247 bp of ITS2. The G+C contents were 54.5, 58.3, and 56.3%, respectively.

**Key words:** *Oncidium*, polymerase chain reaction, 5.8S rRNA, internal transcribed spacer.

---

<sup>1</sup> Contribution No. 0478 from Taichung DAIS.

<sup>2</sup> Assistant, Head of Crops Improvement Division and Assistant, Taichung District Agricultural Improvement Station, Taiwan, ROC.