

台灣原生杜鵑核糖體核酸內轉錄間隔區之選殖及分析¹

蔡奇助 蔡素蕙 黃勝忠²

摘 要

本研究設計一組核苷酸引子 (primer)，序列分別為 IT1: 5' TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT 3'和 IT2: 5' GTAAGTTTCTTCTCCTCCGCT 3'，利用聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，將14種台灣原生杜鵑 (*Rhododendron* spp.) 的5.8S核糖體核酸 (rRNA) 基因與內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 選殖。將上述PCR產物定序，14種台灣原生杜鵑內轉錄間隔區 (ITS) 長在642~648 bp間。其中5.8S rRNA基因區各種長皆為164 bp，且序列上並無差異。在ITS1區域中，長度具253、254及255 bp三類，其中有29個核苷酸具多型性。在ITS2區域中，長度具225、226及229 bp三類，且序列中有33個核苷酸具多型性。本研究之核酸引子能將台灣各原生杜鵑之ITS加以選殖，藉由分析ITS序列，可獲取有用的分子標誌，供探討杜鵑花屬的微演化 (microevolution) 及親緣研究上。未來在杜鵑花育種上，亦可供為品種鑑別，及品種專利之應用。

關鍵字：杜鵑、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

杜鵑花屬 (*Rhododendron*) 為杜鵑花科 (Ericaceae) 植物，全球約有850種原生種⁽²⁸⁾，由於分類觀點不同，亦有認為僅約500至600種⁽³⁶⁾，分佈於北半球寒帶及溫帶。我國西南各省產量亦極豐富，計有200餘種，本省產約19種⁽²⁾，後經呂和楊⁽¹⁾重新檢討及訂正，認為本省原生杜鵑有14種及一疑問種。

杜鵑花屬為常綠或落葉灌木，罕為喬木，芽具覆瓦狀鱗片數枚至多枚，花冠稍不整正，常為簇狀頂生，萼5深裂，罕6~10裂，雄蕊5~10個，罕較多，藥頂孔開裂，子房5~10室，花柱細長，具頭狀柱頭，蒴果胞間開裂，為世界上最著名之觀賞植物之一⁽²⁾。

聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術於1984年由Cetus公司發展出來，這是一套體外 (*in vitro*) 複製DNA的技術。由於此技術具快速、專一性、靈敏性且易於操作的優點，因此很適合被用來解決許多生物學上的問題，諸如人類遺傳 (human genetics)、免疫學 (immunology)、法醫學、演化生物學、生態及族群等科學。PCR的反應中，需於欲複製的DNA片段兩端，各設計一條引子 (primer)，於反應管中加入四種 deoxynucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)，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)

¹ 台中區農業改良場研究報告第 0485 號。

² 台中區農業改良場助理研究員、助理、研究員兼課長。

以及引子的延伸(extension)等三個過程，會將兩引子間的DNA片段大量的複製出來⁽⁴⁾。在真核細胞的核糖體核酸(ribosomal DNA, rDNA)為一群成縱線排列(tandem array)的重複性基因族(repeated gene families)，位於染色體的核仁組成區域(nucleolar organizer region)。上述rDNA 重複單位通常集中在同一條染色體中，也有可能分散於不同染色體^(3,12,35)。並且各個重複單位間皆能保持相似性，此現象可能受到不等重組(unequal recombination)和基因轉變(gene conversion)的調控⁽⁸⁾。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個轉錄間隔區會在製程中除去，形成成熟的rRNA (mature RNA)^(6,11,33)。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⁽³⁰⁾。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⁽¹¹⁾，即使在種內、族群中或個體內，rDNA也會受ITS和IGS的影響而造成具有長度異質性(length heterogeneity)^(12,31)。

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，將台灣原生杜鵑rDNA之ITS區域加以選殖並定序，供從事杜鵑花親緣研究、品種鑑定及品種專利之應用。

材料與方法

材料

本研究以14種台灣原生杜鵑為材料，分別為紅星杜鵑(*R. rubropunctatum*)、西施花(*R. ellipticum*)、金毛杜鵑(*R. oldhamii*)、烏來杜鵑(*R. kanehira*)、守城滿山紅(*R. mariesii*)、埔里杜鵑(*R. lasiostylum*)、中原氏杜鵑(*R. nakaharai*)、大屯杜鵑(*R. longiperulatum*)、唐杜鵑(*R. simsii*)、紅毛杜鵑(*R. rubropilosum*)、南湖杜鵑(*R. hyperythrum*)、森氏杜鵑(*R. morii*)、玉山杜鵑(*R. pseudochrysanthum*)及著生杜鵑(*R. kawakamii*)。

方法

一、DNA之抽取

依Shure等⁽²⁶⁾的方法抽取杜鵑幼葉之總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⁽⁴⁾

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 MgCl₂, 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，加無菌水使總體積成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)，接續溫度及時間如下，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緩衝液中電泳分離。經EtBr (ethidium bromide, 0.5 µg/ml)染色後，置於紫外燈箱上觀察、照相。

三、Glass milk回收DNA

利用Geneclean Kit II (BIO 101 Co.)為之，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)，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條帶切下，置入1.5 ml微量離心管中，每100 mg的膠塊加入500 l 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 (DNA量在5 µg以下，則加入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、DNA序列分析

(一)菌種與質體

實驗中所使用的細菌為大腸桿菌JM109，其載體屬pUC系列，在大腸桿菌中套數(copy number)很高。選殖所使用的載體為T-vector (Promega Co.)。

(二)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(yeast extract) 5 g/l，NaCl 10 g/l加水至1L，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，培養基倒於培養皿中，做為轉型後菌種篩選用。

(三)接合作用(ligation)

以pGEM T-vector (Promega Co.)為之，將PCR產物經電泳進一步純化，以Glass milk回收DNA後，取欲定序的DNA 50 ng，加入等量的1µl載體(T-vector) (50 ng)，及1µl 10x接合緩衝液(ligation buffer) (0.66 M Tris-HCl pH 7.5，5.50 mM MgCl₂，50 mM DTT)相混合，最後加入1 µl T4 DNA接合酵素(ligase) (3 units/µl)，補水至10 µl，於15°C下接合3~16小時。

(四)大腸桿菌勝任細胞(competent cell)的製備⁽²³⁾

將大腸桿菌以LB培養基37°C培養隔夜，取50 µl移入新鮮1 ml LB培養基中(約稀釋20倍)，37°C培養90分鐘後，於4°C下4,000 rpm離心10分鐘，以500 µl 100 mM CaCl₂懸浮，置於0°C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 CaCl₂懸浮，即完成勝任細胞的製備。

(五)大腸桿菌的轉型作用(transformation)⁽²³⁾

取大腸桿菌JM109新鮮製備的勝任細胞200 μ l，加入接合過的質體10 μ l，0 $^{\circ}$ C下靜置30分鐘，移入42 $^{\circ}$ C熱休克(heat shock) 2分鐘後，立刻移入0 $^{\circ}$ C冰中，加入400 μ l LB培養基於37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C下培養12~16小時。

(六)質體DNA抽取⁽²³⁾

轉型作用後塗於篩選培養基12~16小時，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 μ l 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 μ l Solution II (0.2 N NaOH, 10% SDS)混合均勻後，冰浴5分鐘後，再加入150 μ l Solution III (3 M KOAc pH 4.8)混合均勻，置於0 $^{\circ}$ C下10分鐘，以10,000 rpm離心10分鐘，取上層液，加0.6倍體積的2-propanol，置於 -20 $^{\circ}$ C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次後，真空乾燥10分鐘後，再溶於50 μ l TE中(加入RNase 20 μ g/ μ l)，用*Eco*RI 限制酵素將接入載體欲定序的DNA兩端切下，跑電泳，以確定欲定序的DNA與載體接合，並能隨質體複製。

(七)定序用質體的抽取

利用Qiagen-tip 20 (Qiagen Co.)為之，將隔夜培養的菌液5 ml，倒入10 ml離心管，於4 $^{\circ}$ C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 g/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1ml 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1ml 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至2次，然後倒置10分鐘後，溶於適量TE buffer中。

(八)利用螢光標識法定序DNA

利用AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia Co.)進行DNA定序反應，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 μ l內含5~10 μ g的質體DNA，置於1.5 ml離心管中，加入8 μ l 2 M NaOH簡單振盪和離心後，置於室溫下10分鐘，加入7 μ l 3 M sodium acetate (pH 4.8)和4 μ l的水，隨後加入120 μ l 100%酒精，並加以混勻，於 -70 $^{\circ}$ C下靜置20分鐘後，取出並以12,000 rpm離心15分鐘，倒掉上層液，用70%酒精清洗1至2次，簡單真空抽氣乾燥。溶於10 μ l的無菌去離子水中，加入螢光引子(fluorescent primer) 2 μ l (約4~6

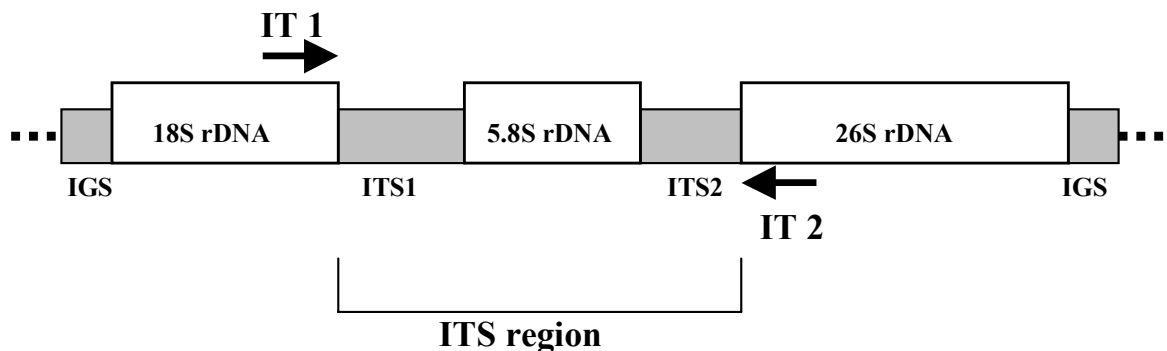
pmol)，再加2 μ l煉合緩衝液(annealing buffer)，總體積成14 μ l，經輕微振盪、離心後，置於65°C預熱5分鐘，即刻移至37°C中10分鐘，取出置於室溫下至少10分鐘，此時煉合完成。簡易離心後，加入1 μ l的延伸緩衝液(extension buffer)和3 μ l DMSO，即刻進行定序電泳反應。

2. 定序電泳反應

進入定序反應前，先分別分裝2.5 μ l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°C下至少1分鐘。加入2 μ l的T7 DNA polymerase (6~8 units/2 μ l)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 μ l於每一已於37°C預熱的A、C、G、T管中，用微量吸管(pipetman)混合2~3次後，再回置37°C，反應5分鐘後，分別於四管中加入stop solution，用微量吸管混合2~3次，取出置於90°C解凍2~3分鐘後，立刻插入冰中。取4~6 μ l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

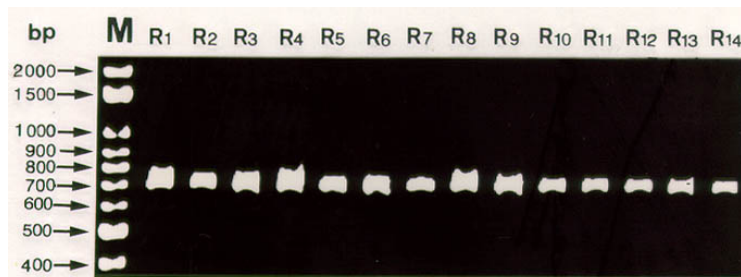
核酸引子設計時，首先尋找目標DNA片段兩端之序列保留區(conserved sequence region)，在保留區內，尋找適合之序列當引子。引子的長度約15~30 bp，G+C百分比約40~60%，且3'端序列最好為CC, GG, GC或CG，並避免同一種氮鹽基連續出現4個以上⁽¹⁹⁾。此外，引子本身或兩引子間不會形成二次或互補結構，以避免引子聚合物(primer dimer)產生^(19,29)。本研究參考水稻(禾本科)⁽³²⁾、蕃茄(茄科)⁽¹⁵⁾、芥菜(藜科)⁽²⁰⁾、洋香瓜(瓜科)⁽¹³⁾、草莓(薔薇科)⁽²⁷⁾及*Mimulus platycalyx*(玄參科)⁽²¹⁾之18S rRNA基因之3'端，與水稻⁽³⁴⁾、蕃茄⁽¹⁶⁾、石菖蒲(天南星科)⁽¹⁷⁾、*Lithophragma trifoliata*(虎耳草科)⁽¹⁷⁾及*Drimys winteri* (Winteraceae)⁽¹⁷⁾之26S rRNA基因5'端之序列保留區，分別設計引子IT1及IT2。引子長度一條22 mer，另一條為21mer，序列分別為IT1: 5' TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT 3' 和 IT2: 5' GTAAGTTTCTTCTCCTCCGCT 3' (圖一)。



圖一、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 of higher plants. The positions of internal transcribed spacer (ITS) regions relative to 18S, 5.8S and 26S rDNA, and the intergenic spacer (IGS). Corresponding positions of primers (IT1 and IT2) used for PCR and sequencing.

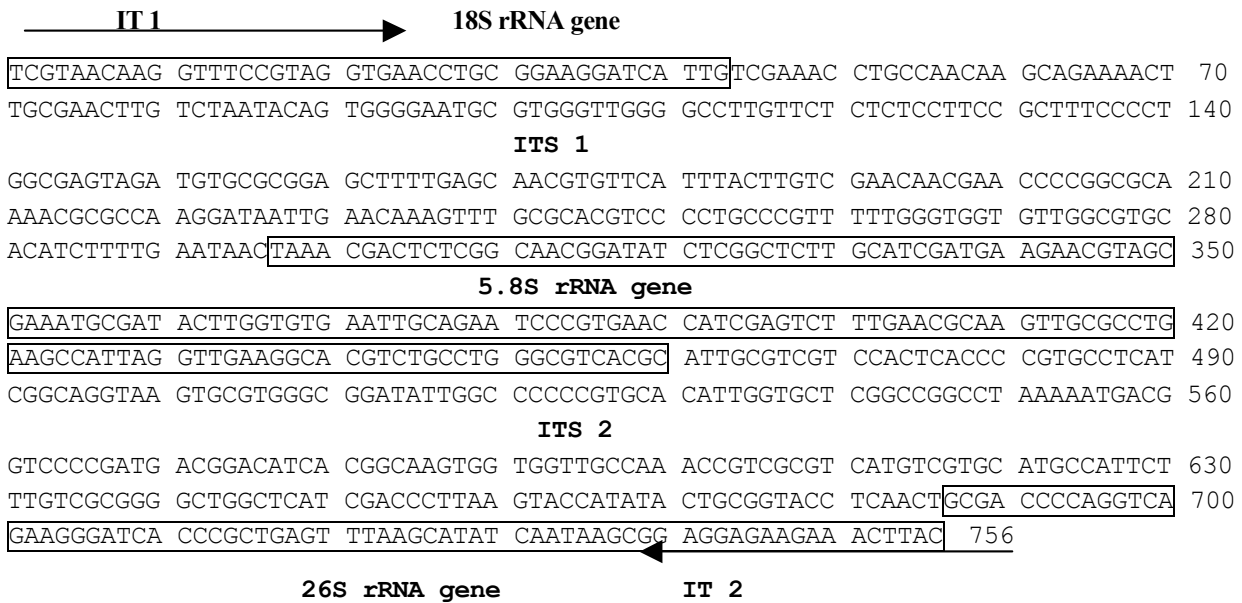
利用上述引子組可有效將14種台灣杜鵑之ITS區域選殖，各原生杜鵑之ITS區域之長並無明顯差異(圖二)。在PCR反應條件方面，為獲取特異性(specific)與產量高的複製產物，本研究採用以下二種策略行之，其一為熱開始，即先以94°C反應10分鐘後，使模板DNA(template DNA)兩股完全打開，以利引子煉合，然後再將Taq DNA polymerase加入反應管中，以避免在配製反應溶液時，若Taq DNA polymerase已先行加入，隨即能行聚合反應，而此時所製造的DNA皆為非特異性的複製產物⁽⁴⁾。另一策略是進行二步驟(2-step)之溫度循環，即提高起始的幾個溫度循環之煉合溫度，以避免引子與台灣原生杜鵑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⁽²²⁾。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台灣原生杜鵑rDNA之ITS大量且有效複製。



圖二、利用 PCR 複製 14 種台灣原生杜鵑之核糖體核酸內轉錄間隔區(ITS)，經 0.8% 瓊膠分離結果。由左至右分別為分子標誌(1)、紅星杜鵑(2)、西施花(3)、金毛杜鵑(4)、烏來杜鵑(5)、守城滿山紅(6)、埔里杜鵑(7)、中原氏杜鵑(8)、大屯杜鵑(9)、唐杜鵑(10)、紅毛杜鵑(11)、南湖杜鵑(12)、森氏杜鵑(13)、玉山杜鵑(14)及著生杜鵑(15)。

Fig. 2. The rDNA ITS region of 14 *Rhododendron* species were amplified by PCR, separating on 0.8% agarose. Lane 1 is DNA marker, lanes 2 to 15 are *R. rubropunctatum*, *R. ellipticum*, *R. oldhamii*, *R. kanehira*, *R. mariesii*, *R. lasiostylum*, *R. nakaharai*, *R. longiperulatum*, *R. simsii*, *R. rubropilosum*, *R. hyperythrum*, *R. morii*, *R. pseudochrysanthum*, and *R. kawakamii*, respectively.

為進一步證實上述PCR產物即為台灣原生杜鵑rDNA之ITS區域，將14種杜鵑ITS區域分別定序，以烏來杜鵑為例，總長為756 bp，與其他高等植物的相同區域比較，發現PCR產物有43 bp屬於18S rRNA基因的3'端，有70 bp屬於26S rRNA基因的5'端。因此，內轉錄間隔區(ITS)實長為643 bp。其中有253 bp為ITS1區域，164 bp為5.8S rRNA基因，226 bp為ITS2區域(圖三)。比較14種杜鵑之核糖核酸內轉錄間隔區序列，ITS序列長在642~648 bp間，以著生杜鵑為最長。在5.8S rRNA 基因區中，長度皆為164 bp，且100%相似。在ITS1區域中，長度有些許差異，除西施花與守城滿山紅為254 bp 著生杜鵑為255 bp外，其餘皆為253 bp，其中有29個核苷酸具缺失(deletion)及插入(insertion)或取代(substitution)等多型性。在ITS2區域中，長度亦有些許差異，除著生杜鵑長為229 bp較為特殊外，其餘皆為225 bp 或226 bp，且序列中有33個核苷酸具缺失、插入或取代等多型性(圖四)。



圖三、烏來杜鵑 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 基因區。箭頭區為引子組所在位置。

Fig. 3. Nucleotide sequence of a 5.8S rRNA gene and of internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) from *Rhododendron kanehirai* Wilson (Accession number: AF172290). 5.8S rRNA gene is boxed. Arrow regions are the sequences of a pair of complementary primers (IT1 and IT2) for PCR amplification.

	ITS 1						
<i>R. rubropunctatum</i>	TCGAAACCTG	CCAACAAGCA	GAAACTTGC	GAAGTTGTCT	-AA-TACAGTGG	GGAATGCGTG	60
<i>R. ellipticum</i>	-.-.....	
<i>R. oldhamii</i>	-.-.....	
<i>R. kanehira</i>	-.-.....	
<i>R. mariesii</i>	-..A.....	
<i>R. lasiostylum</i>	-.-.....	
<i>R. nakaharai</i>	-.-.....	
<i>R. longiperulatum</i>	-.-.....	
<i>R. simsii</i>	-.-.....	
<i>R. rubropilosum</i>	-.-.....	
<i>R. hyperythrum</i>	-.-.....	
<i>R. morii</i>	-.-.....	
<i>R.</i>	-.-.....	
<i>pseudochrysanthum</i>	-.-.....	
<i>R. kawakamii</i>	.T.....	T.-.G..A...	
<i>R. rubropunctatum</i>	GGTTGGGGCC	TCGTTATCTT	TCCTTCCGCT	TTCCCCTGGC	GAGTAGATGT	GCGCGGAGCT	120
<i>R. ellipticum</i>T...C...C..G	
<i>R. oldhamii</i>T...C..C	
<i>R. kanehira</i>T...C..C	
<i>R. mariesii</i>T...C...C..	
<i>R. lasiostylum</i>T...C..C	
<i>R. nakaharai</i>T...C..C	
<i>R. longiperulatum</i>T...C..C	
<i>R. simsii</i>T...C..C	
<i>R. rubropilosum</i>T...C..C	
<i>R. hyperythrum</i>	
<i>R. morii</i>	
<i>R.</i>	
<i>pseudochrysanthum</i>	
<i>R. kawakamii</i>C..	

<i>R. morii</i>
<i>R. pseudochrysanthum</i>
<i>R. kawakamii</i>A.....
(continous)								
<i>R. rubropunctatum</i>	CGGCAAGTGG	TGGTTGCCAA	ACCGTCGCGT	CATGTCGTGC	ATGCC-ATTCT	TTGTTCG-TTGG	180	
<i>R. ellipticum</i>GC.....-T.-CG..		
<i>R. oldhamii</i>-CGG..		
<i>R. kanehira</i>-CGG..		
<i>R. mariesii</i>T.....--CG..		
<i>R. lasiostylum</i>-CGG..		
<i>R. nakaharai</i>T.....-CGG..		
<i>R. longiperulatum</i>-CGG..		
<i>R. simsii</i>-CGG..		
<i>R. rubropilosum</i>-CGG..		
<i>R. hyperythrum</i>--CG..		
<i>R. morii</i>--CG..		
<i>R. pseudochrysanthum</i>--CG..		
<i>R. kawakamii</i>A.....-CG..
<i>R. rubropunctatum</i>	CTGGCTCATC	GACCCTTAAG	TACCAT--CAAC	TGTGGTACCT	CAACT	225		
<i>R. ellipticum</i>A.....T.....T.		
<i>R. oldhamii</i>T.....--AT..C.....		
<i>R. kanehira</i>--AT..C.....		
<i>R. mariesii</i>T.--..C		
<i>R. lasiostylum</i>--AT..C.....		
<i>R. nakaharai</i>T.....--AT..C.....		
<i>R. longiperulatum</i>--AT..C.....		
<i>R. simsii</i>--AT..C.....		
<i>R. rubropilosum</i>--AT..C.....		
<i>R. hyperythrum</i>--..		
<i>R. morii</i>--..		
<i>R. pseudochrysanthum</i>--..		
<i>R. kawakamii</i>G.....CAA.....C.....

圖四、比較 14 種台灣原生杜鵑之核糖體核酸內轉錄間隔區(ITS1, 5.8S rRNA 基因, ITS2)之序列，由上而下分別為紅星杜鵑(*R. rubropunctatum*)、西施花(*R. ellipticum*)、金毛杜鵑(*R. oldhamii*)、烏來杜鵑(*R. kanehira*)、守城滿山紅(*R. mariesii*)、埔里杜鵑(*R. lasiostylum*)、中原氏杜鵑(*R. nakaharai*)、大屯杜鵑(*R. longiperulatum*)、唐杜鵑(*R. simsii*)、紅毛杜鵑(*R. rubropilosum*)、南湖杜鵑(*R. hyperythrum*)、森氏杜鵑(*R. morii*)、玉山杜鵑(*R. pseudochrysanthum*) 及著生杜鵑(*R. kawakamii*)。

Fig. 4. The comparison of ITS1, 5.8S rRNA gene, and ITS2 regions of 14 *Rhododendron* species in Taiwan. *R. rubropunctatum* aligned with *R. ellipticum*, *R. oldhamii*, *R. kanehira*, *R. mariesii*, *R. lasiostylum*, *R. nakaharai*, *R. longiperulatum*, *R. simsii*, *R. rubropilosum*, *R. hyperythrum*, *R. morii*, *R. pseudochrysanthum*, and *R. kawakamii*. Dots (.) indicate the same nucleotides and gaps (-) are introduced to maximize homology.

由台灣原生杜鵑ITS序列之分析，可獲取一些分子標誌供進一步探討台灣杜鵑花的親緣關係。參試的14種台灣原生杜鵑中，屬喬木類的紅星杜鵑、南湖杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑極為相似，僅紅星杜鵑於ITS2區域有2個核苷酸差異。屬灌木類的金毛杜鵑、烏來杜鵑、埔里杜鵑、中原氏杜鵑、大屯杜鵑、唐杜鵑、紅毛杜鵑也很相似，有1~2個核苷酸具差異，

同屬灌木類的西施花及守城滿山紅為具差異性較高的二種。台灣原生杜鵑中唯一著生性的著生杜鵑是參試的14種台灣原生杜鵑中變異最大者(圖四)。據呂和楊⁽¹⁾的研究，紅星杜鵑與南湖杜鵑被歸類為同一種。另外，由外部形態、花期與海拔分佈，發現森氏杜鵑、玉山杜鵑並無分化，應合併為同一種，且玉山杜鵑與南湖杜鵑花期一致，且混生，各地標本顯示可能具雜交現象。此外，中原氏杜鵑、大屯杜鵑及唐杜鵑在外部形態非常相似，僅在葉形、葉長或地理分佈不同，因而將上述三種合併為同一種。本研究發現南湖杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑在ITS序列並未分化，支持將上述三種合併為同一種，但紅星杜鵑與上述三種卻具極小差異。此外，在中原氏杜鵑、大屯杜鵑及唐杜鵑兩兩間亦有2個核苷酸具差異。綜合上述之研究，所參試的14種台灣原生杜鵑中，紅星杜鵑、中原氏杜鵑、大屯杜鵑及唐杜鵑等四種的定位問題尚有待進一步蒐集更多資料以釐清。

本研究亦支持rDNA中之ITS1及ITS2區域在演化過程中較容易產生變異，而5.8S rRNA基因與18S和26S rRNA基因一樣，皆為序列較保留之區域，可應用於探討分類層次較高的親緣與演化之研究^(9,10)。ITS1, ITS2區域在演化過程中，為較容易產生變異之區域，因此適合探討較相近分類群之親緣關係(phylogenetic relationship)^(20,27)。以高等植物為例，菊科植物被研究最多，如Madiinae亞族⁽⁵⁾，*Calycadenia*屬⁽⁶⁾，*Krigia*屬⁽¹⁴⁾，*Dendroseris*屬⁽²⁴⁾及*Antennaria*屬⁽⁷⁾等之親緣研究。

本研究所設計之引子組，確能利用PCR將各種台灣原生杜鵑rDNA之ITS加以選殖，且並非僅針對某個種，因此是一組廣效性引子。另外，由於ITS在演化的過程中為較易變異之區域，因此可藉分析ITS區域序列來尋找各台灣原生杜鵑之分子標誌，探討杜鵑花屬的微演化(microevolution)及親緣研究。未來在杜鵑花育種上，亦可供為品種鑑別，及品種專利之應用。

誌 謝

本研究承行政院原住民委員會經費補助，邱苡珊及白佳惠小姐協助試驗，國立中興大學分生所陳所長良築提供寶貴意見，謹此一併申謝。

參考文獻

1. 呂勝由、楊遠波 1989 台灣杜鵑花屬植物之訂正 林業試驗所研究報告季刊 4:155-166。
2. 劉業經、呂福原、歐辰雄 1988 臺灣樹木誌 p.517-524 國立中興大學農學院叢書。
3. 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.
4. Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61:131-156.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Chaw, S. M., H. Long, B. S. Wang, A. Zharkikh and W. H. Li. 1993. The phylogenetic position of Taxaceae based on 18S rRNA sequences. *J. Mol. Evol.* 37:624-630.
10. Conran, J. G. and J. M. Dowd. 1993. The phylogenetic relationships of *Byblis* and *Roridula* (Byblidaceae- Roridulaceae) inferred from parital 18S ribosomal RNA sequences. *Plant Syst. Evol.* 188:73-86.
11. 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.
12. 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.
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. *Plant Syst. Evol.* 190:157-185.
15. Kiss, T., A. Szkukalek and F. Solymosy. 1989. Nucleotide sequence of a 17S (18S) rRNA gene from tomato. *Nucl. Acids Res.* 17:2127.
16. Kiss, T., M. Kis and F. Solymosy. 1989. Nucleotide sequence of a 25S rRNA gene from tomato. *Nucl. Acids Res.* 17:796.
17. Kuzoff, R. K., J. A. Sweere, D. E. Soltis, P. S. Soltis and E. A. Zimmer. 1998. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15:251-263.
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. Rathgeber, J. and I. Capesius. 1989. Nucleotide sequence of the 18S-25S spacer region from mustard DNA. *Nucl. Acids Res.* 17:7522.

21. 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.
22. 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.
23. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
24. 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.
25. Schaal, B. A. and G. H. Learn. 1988. Ribosomal DNA variation within and among plant populations. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75:1207-1216.
26. Shure, M., S. Wessler and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35:225-233.
27. Simovic, N., D. Wolyn and G. Jelenkovic. 1992. Sequence analysis of 18S ribosomal RNA gene in *Fragaria X Ananassa* Duch. Cultivated octoploid strawberry. *Plant Mol. Biol.* 18:1217-1220.
28. Sleumer, H. 1966. Ericaceae. *In: van Steenis, Flora Malesiana.* 6:470-668.
29. Sommer, R. and D. Tautz. 1989. Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucl. Acids Res.* 17:6749.
30. 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.
31. 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.
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. 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.
36. Willis, J. C. 1985. *A dictionary of the flowering plants & ferns*. Cambr. Univ. Press.

Cloning and Characterization of Internal Transcribed Spacer Region of rDNA in *Rhododendron* Species in Taiwan¹

Chi-Chu Tsai, Suh-Huey Tsai and Sheng-Chung Huang²

ABSTRACT

The entire nucleotide sequence of internal transcribed spacer (ITS) region between 18S and 26S ribosomal RNA (rRNA) genes among 14 *Rhododendron* species in Taiwan were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The primers of PCR, IT1: 5' TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT 3' and IT2: 5' GTAAGTTTCTTCTCCTCCGCT 3' were designed for amplification. The PCR products of 14 *Rhododendron* species were sequenced. To compare with the sequence of ITS region of other higher plant species, the length of ITS in 14 *Rhododendron* species were ranged from 642 to 648 bp. These 5.8S rRNA gene, ITS1, and ITS2 were included within ITS region. In 5.8S rRNA gene, no variation was revealed between 14 *Rhododendron* species. In ITS1 and ITS2 regions, variable length and sequence, generated from deletion, insertion, and substitution, were introduced between 14 *Rhododendron* species. Therefore, the microevolution and phylogeny of *Rhododendron* species could be studied based on the sequence of ITS. For further application, ITS region is a good marker for cultivar identification and protection as well.

Key words: *Rhododendron*, polymerase chain reaction (PCR), 5.8S rRNA gene, internal transcribed spacer (ITS).

¹. Contribution No. 0485 of Taichung DAIS.

². Assistant Horticulturist, Assistant, and Head of Crops Improvement Division of Taichung DAIS, respectively.