

利用分子標誌分析rDNA之ITS區域 鑑定文心蘭亞族品種¹

黃勝忠²、蔡奇助³、易美秀²

摘 要

利用PCR-amplified RFLP分析核糖體核酸(rDNA)內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS), 來鑑定24個文心蘭亞族(Oncidiinae)品種。分析樣本ITS區域之DNA利用PCR複製後, 以10種限制酶切割, 共產生166個DNA標誌, 其中有159個標誌在品種間具有多型性, 可供品種鑑別依據。經群叢分析(clustering analysis)後, 可將24個文心蘭品種分成四群及兩個各自成一群的品種。由樹狀關係圖發現, 文心蘭節(section *Oncidium*)與文心蘭屬(genus *Oncidium*)內其它成員具有明顯區別, 此結果支持文心蘭節(箭葉型文心蘭)有別於文心蘭屬內其它節(薄葉型文心蘭), 可以自成一新的屬。另外, 檢視DNA電泳條帶型, 也發現雜交品種具有加成性的DNA條帶型, 亦即文心蘭雜交品種個體內之ITS重複序列具有異質性。本研究在文心蘭亞族雜交品種所發現之加成性DNA條帶型, 可視為一有用的分子標誌, 供未來鑑別文心蘭品種及品種保護之用。

關鍵詞：文心蘭、內轉錄間隔區、分子標誌、品種鑑定、異質性。

前 言

以分類觀點而言, 可將文心蘭亞族(Oncidiinae)分為56至78屬, 總計大約1,000種原生種。此外, 由於文心蘭亞族內有許多屬可以進行屬間雜交, 因此又增加了107屬的人為雜交屬。目前將文心蘭亞族成員分為五群(alliances), 分別為 *Oncidium*, *Trichocentrum*, *Comparettia*, *Trichopilia*及 *Lockhartia*, 其中以文心蘭群(*Oncidium* alliance)為最大的一群⁽³³⁾。

就細胞、生態、形態學的觀點而言, 所有蘭科植物當中以文心蘭群內歧異度最大⁽¹⁰⁾。這群植物大部分成員的染色體數目為56條($2n=56$)⁽²⁹⁾, 另外, 有些成員的染色體數目較少($2n=24\sim44$)⁽⁶⁾, 而上述染色體數目較少的植物在種子之細胞壁也與文心蘭群內其它成員不一樣⁽⁸⁾。傳統上, 文心蘭亞族之分類以花朵特徵來歸類⁽⁷⁾。以 *Trichocentrum* 屬為例, 雖然這屬植物近來有許多學者認為它們與文心蘭屬內的騾耳型文心蘭(mule ear *oncidiums*)及鼠尾型文心蘭(rat tail *oncidiums*)等成員很相近, 但由於花形不同之故, 這屬植物並沒有置於文心蘭屬內。

¹ 台中區農業改良場研究報告第 0535 號。

² 行政院農業委員會台中區農業改良場研究員及助理。

³ 行政院農業委員會高雄區農業改良場助理研究員(前台中區農業改良場助理研究員)。

由葉綠體DNA的分析指出，*Trichocentrum*屬成員是源於文心蘭屬內騾耳型文心蘭⁽⁷⁾。最近的研究已將Plurituberculata節(騾耳型文心蘭)與Cellolletae節(鼠尾型文心蘭)從文心蘭屬分出來，並將之歸為Trichocentrum群⁽³³⁾。後來對於文心蘭屬進一步的訂正，也在其屬內的幾個節成立新的屬，如齒舌蘭屬(*Odontoglossum*)及堇花蘭屬(*Miltonia*)等，然而在文心蘭節內尚存在許多疑義待解決⁽³³⁾。

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中心(nucleolar organizer region)，通常集中在同一條染色體中，也可能分散於不同染色體^(1,12,32)。上述各個rDNA重複單位(repeat unit)間通常能保持相似性，此現象可能受到不等重組(unequal recombination)和基因轉變(gene conversion)的調控⁽⁵⁾。每個重複單位中，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)，分別稱為ITS1及ITS2。當rDNA初轉錄形成一個轉錄單位(transcription unit)時，經一系列製程(processing)後，上述兩個轉錄間隔區會在製程的過程中去除，形成成熟的rRNAs (mature RNAs)^(4,9,28)。在不同物種間上述三個rRNA基因的長度及序列相當一致，但在ITS和IGS的區域中，則其長度及序列常有很大變異^(9,31)，即使在種內、族群中或個體內，rDNA也會受ITS和IGS的影響而造成其長度具異質性(length heterogeneity)^(12,25)。

聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)技術除了是一個診斷工具外，已廣泛應用於研究解決遺傳(genetics)、生物醫學(biomedical sciences)、演化生物學(evolutionary biology)及生態學(ecology)等方面⁽²⁾。PCR本身可直接用來鑑定特定基因的存在與否，也可以用來偵測基因遺傳是否有異常(如突變、缺失、重組等)。在生物醫學上對遺傳疾病或腫瘤癌症的診斷及預後的評估，對細菌、病毒及黴菌感染的診斷，PCR更可以用於器官移植組織相容性的分析。特別是細胞間訊息的傳遞分子，諸如介白質(interleukines)及各種生長因子(growth factors)基因的表現都可用PCR來進行質與量的分析。它也可發展成為一個生產線大量複製特定的基因，進行基因密碼的讀取DNA序列及其他的運用。舉凡對生物標本及法醫學上的樣本鑑定，如從單一毛髮、一隻精蟲或一滴血液、唾液來找出兇手，也可以做DNA指紋(fingerprints)比對幫助親子關係的鑑定。另外在演化上的分析，經由PCR的運用也產生重大的進展。PCR-amplified RFLP是以PCR為基礎的一項指紋分析技術，首次被用來偵測14種(*Astragalus*)植物之葉綠體基因*rpoC1*, *C2*之遺傳變異⁽¹⁵⁾。本研究利用此種指紋技術分析rDNA之核糖體核酸內轉錄間隔區，以探討24種文心蘭亞族品種遺傳變異，並進一步探討其群叢關係。

材料與方法

一、試驗材料

本研究參試24個文心蘭品種，包含14個文心蘭屬品種、2個堇花蘭屬品種、1個蜘蛛蘭屬品種、3個兩屬雜交種、3個三屬雜交種及1個四屬雜交品種，詳見表一。

二、試驗方法

1. DNA之抽取

依Shure等人抽總DNA之法⁽²³⁾，稍加修改，抽取文心蘭亞族各品種之幼葉總DNA，其步驟如下：取文心蘭幼葉約0.5 g，剪成碎片，用液態氮在研鉢中研磨成粉，將粉末移至1.5 ml的離心管，加入700 μ l事先60 $^{\circ}$ C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)，混均勻後置於60 $^{\circ}$ C水浴下10分鐘，並常混合。然後加入700 μ l的phenol: chloroform=1: 1 (v/v, phenol經Tris pH 8.0飽和過)，充分混勻後於4 $^{\circ}$ C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NH₄OAc，置於-20 $^{\circ}$ C 2小時沈降DNA，取出離心管於4 $^{\circ}$ C下10,000 rpm離心10分鐘，倒掉上層液，以1 ml 70%酒精清洗後再離心，倒掉酒精，簡單乾燥後，加入400 μ l的TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)溶解DNA，並加入5 μ g RNase，於65 $^{\circ}$ C下反應10分鐘後，加入500 μ l同上的phenol: chloroform=1:1 (v/v)，於4 $^{\circ}$ C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 μ l 4.4 M NH₄OAc及3倍體積95%的酒精，均勻混合，置於-70 $^{\circ}$ C下30分鐘沈降DNA，然後取出於4 $^{\circ}$ C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 μ l的TE buffer及180 μ l的殺菌水溶解DNA，存於-20 $^{\circ}$ C中備用。

2. PCR反應

修改Arnheim and Erlich的方法⁽²⁾，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 μ M，最後加入80 ng的模板DNA，加無菌水總體積補成50 μ l，置於0.6 ml的微量離心管，再於溶液表面加入50 μ l的礦物油(mineral oil)，將微量離心管置入熱循環器(biometra)。反應的熱循環溫度及時間如下，先以94 $^{\circ}$ C反應10分鐘，然後加1.25 units的*Taq* DNA聚合酶，接下來溫度及時間如下，94 $^{\circ}$ C反應45秒，52 $^{\circ}$ C反應20秒，72 $^{\circ}$ C反應1分鐘等三步驟進行10個循環，接著再94 $^{\circ}$ C反應45秒，50 $^{\circ}$ C反應20秒，72 $^{\circ}$ C反應1分鐘等三步驟進行30個循環，最後72 $^{\circ}$ C反應10分鐘。將PCR複製產物取出，於0.8%瓊脂膠(agarose) TBE緩衝液中電泳分離。經EtBr (ethidium bromide, 0.5 μ g/ml)染色，可在紫外燈下觀察、照相。

表一、24 個文心蘭亞族品種名稱及代號

Table 1. List of 24 accessions of Oncidinae species and hybrids

Taxon abb.	Species/hybrids	Source	Genera/artificial genera	Collection
Onc-1	<i>Oncidium</i> Sharry Baby 'Sweet Fragrance'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS ¹
Onc-2	<i>Oncidium</i> Sweet Sugar 'Yellow King'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-3	<i>Oncidium ornithorhynchum</i>	natural species	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-4	<i>Oncidium</i> Kaizumic Delight 'Dogashima'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-5	<i>Oncidium</i> Gower Ramsey 'Volcano Queen'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-6	<i>Oncidium bryzatum</i> 'Taida'	natural species	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-7	<i>Oncidium</i> Taka 'H & R'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-8	<i>Oncidium</i> Robsan 'Orchid World'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-9	<i>Oncidium</i> Loke Lani 'Strawberry'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-10	<i>Oncidium</i> Robsan	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-11	<i>Oncidium</i> Popoki 'Mitzi'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-12	<i>Oncidium</i> Golden Wish	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-13	<i>Oncidium cheirophorum</i>	natural species	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Onc-14	<i>Oncidium</i> Twinkle 'Fragrance Fantasy'	intrageneric hybrid	<i>Oncidium</i>	TDAIS
Milt-1	<i>Miltonia</i> Limelight 'Imogene Smith'	intrageneric hybrid	<i>Miltonia</i>	TDAIS
Milt-2	<i>Miltonia</i> Lycaena	intrageneric hybrid	<i>Miltonia</i>	TDAIS
Brs	<i>Brassia</i> Eternal Wind 'Summer Dream'	intrageneric hybrid	<i>Brassia</i>	TDAIS
Mtssa	<i>Miltassia</i> Olmec 'Kanno'	bigeneric hybrid	<i>Miltassia</i> (<i>Brassia</i> x <i>Miltonia</i>)	TDAIS
Mtdm	<i>Miltonidium</i> Pupukea Sunset 'H & R'	bigeneric hybrid	<i>Miltonidium</i> (<i>Miltonia</i> x <i>Oncidium</i>)	TDAIS
Odcdm	<i>Odontocidium</i> Susan Kaufman Butterfly	bigeneric hybrid	<i>Odontocidium</i> (<i>Odontoglossum</i> x <i>Oncidium</i>)	TDAIS
Hwra	<i>Howeara</i> Lava Burst 'Puanani'	trigeneric hybrid	<i>Howeara</i> (<i>Leochilus</i> x <i>Oncidium</i> x <i>Rodriguezia</i>)	TDAIS
Colm-1	<i>Colmanara</i> Wildcat 'Doris'	trigeneric hybrid	<i>Colmanara</i> (<i>Miltonia</i> x <i>Odontoglossum</i> x <i>Oncidium</i>)	TDAIS
Colm-2	<i>Colmanara</i> Jungle Monarch 'Everglades'	trigeneric hybrid	<i>Colmanara</i> (<i>Miltonia</i> x <i>Odontoglossum</i> x <i>Oncidium</i>)	TDAIS
Billra	<i>Beallara</i> Marfitch 'Howard's Dream'	quadrigeneric hybrid	<i>Beallara</i> (<i>Brassia</i> x <i>Miltonia</i> x <i>Cochlioda</i> x <i>Odontoglossum</i>)	TDAIS

¹ TDAIS: Taichung District Agricultural Improvement Station.

3. DNA序列分析

依Sambrook等人之方法⁽²¹⁾，利用大腸桿菌JM109製備勝任細胞(competent cell)。另外，將經Glass milk回收DNA標準法(Geneclean Kit，BIO 101)所回收之DNA與T-vector (Promega Co.)行接合反應(ligation)。將此接合後之質體與勝任細胞行轉型作用(transformation)，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的序列。

4. 限制酶切割

將各DNA樣本之PCR產物分別用EcoRV、Hae^{III}、CfoI、TaqI、RsaI、MvaI、HinfI、MspI、BstOI、Hsp92I等10種限制酶切割，經2.5%-4.0% NuSieve 3:1 agarose gels (FMC Bioproducts)分離，經EtBr (ethidium bromide, 0.5 µg/ml)染色後，可在紫外燈下觀察、照相。

5. 統計分析

(1)樣本間兩兩相似度分析

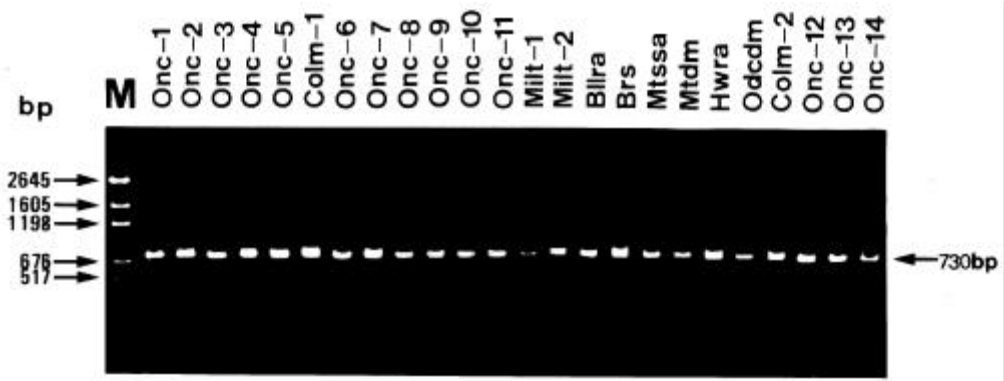
樣本間兩兩相似度，算法如下：相似度(similarity)= $2N_{AB}/(N_A+N_B)$ ， N_A 、 N_B 分別代表A、B二樣本的DNA條帶數， N_{AB} 為兩樣本共有的條帶數，依此法將所有樣本的兩兩相似度算出⁽¹⁷⁾。

(2)樹狀圖的完成

將樣本兩兩相似度排成一個三角距陣，以不加權平均重方式(unweighted pair-group method analysis, UPGMA)進行群叢分析(cluster analysis)繪製出樹狀關係圖(dendrogram)⁽²⁰⁾，此步驟可由NTSYS套裝軟體完成。

結果與討論

由GenBank序列比對前人研究蕃茄、胡蘿蔔及水稻之結果，於18S rRNA基因的3'端與26S rRNA基因的5'端之序列保留區^(13,14,25,26)各設計一條15 mer的引子，序列分別為IT1：5' CGTAACAAGGTTTCC 3'及IT2：5' AGTTTCTTCTCCTCC 3'，兩引子之G+C百分比皆為46.7%，且其3'端皆為CC。利用上述引子組可有效將24個文心蘭亞族品種之核糖體核酸之內轉錄間隔區(ITS)複製，其長大約730 bp (圖一)。將樣本Onc-9之PCR產物定序，以進一步確定上述PCR產物確為ITS。事實上，上述PCR產物含有66 bp的26S rRNA基因序列，及42 bp的18S rRNA基因序列，真正ITS區域長621 bp。ITS區域內含有ITS1、5.8S rRNA基因及ITS2等小區，其長分別為211、163及247 bp，G+C百分比分別為54.5、58.3及56.3%。與其它高等植物之相同區域相比⁽³⁰⁾，文心蘭之ITS區域在長度及G+C百分比上並無特別之處。



圖一、24 個文心蘭亞族品種核糖核酸之內轉錄間隔區經 PCR 複製結果。

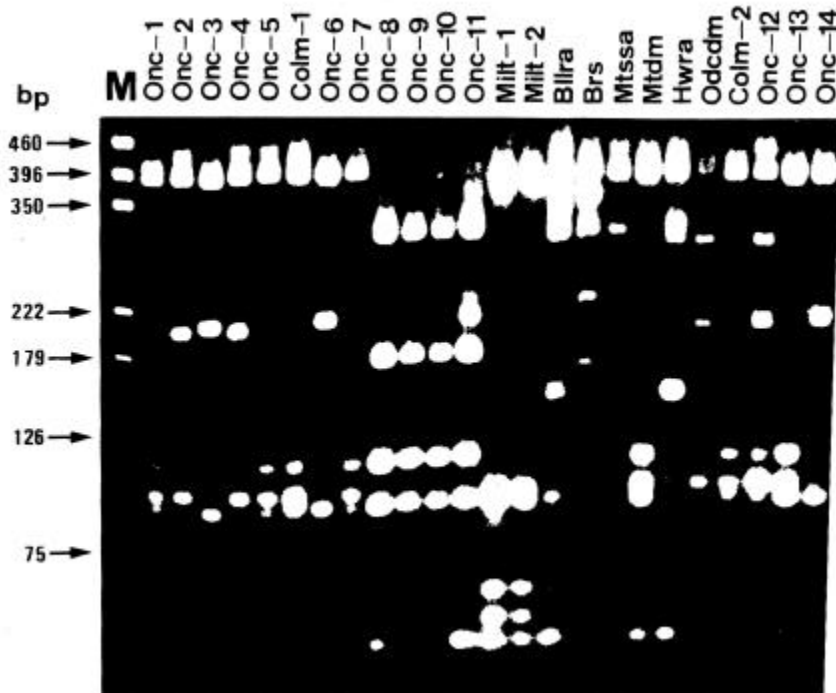
Fig. 1. The ITS region of rDNA in 24 accessions of Oncidiinae species and hybrids. The ITS region was obtained from the PCR amplification of primers IT1 and IT2. The taxon abbreviations of the 24 accessions are in Table 1.

24個文心蘭亞族(Oncidiinae)品種分別經10種限制酶切割，檢視DNA電泳條帶型，共產生166個DNA標誌(DNA marker)，其中有159個DNA標誌在品種間具多型性(polymorphism)，其中HaeIII, CfoI, TaqI, RsaI, MvaI, HinfI及MspI等限制酶可產生較多的多型性條帶，而EcoRV多型性條帶則最少(表二，圖二)。樣本兩兩間相似度介於0.37~1.00間，平均為0.56，其中以Onc-8及Onc-9最為相近，相似度達100%，以Milt-2及Onc-2相似度37%為最低(表三)。所分析的24個文心蘭亞族品種中，除Onc-8及Onc-9兩品種外，其餘品種皆可由上述多型性DNA標誌加以鑑別。樣本兩兩間相似度經群叢分析後，以相似度0.56為基準，可將24個文心蘭品種分成四群及一個自成一類品種。第一群由Onc-1, Onc-3, Onc-14, Mtdm, Onc-13, Onc-6, Colm-1, Colm-2, Onc-2, Onc-4, Onc-5, Onc-7, Onc-12及Odcdm組成；第二群由Bllra, Brs及Mtssa組成；第三群由Onc-8, Onc-9, Onc-10及Onc-11組成；第四群由Milt-1及Milt-2組成；另外Hwra自成一類(圖三)。

文心蘭亞族內屬間雜交(intergeneric cross)在蘭花育種上相當普遍，其中以文心蘭屬(*Oncidium*)，齒舌蘭屬(*Odontoglossum*)，堇花蘭屬(*Miltonia*)，*Miltoniopsis*，蜘蛛蘭屬(*Brassia*)，*Coclioda*，*Ada*，*Gomesa*及*Compantia*等屬常用來做親本，另外有時候也用*Aspassia*，*Rodriguezia*，*Trichocentrum*，*Macradenia*及*Erycina*等屬⁽¹⁸⁾。本研究由樹狀關係圖得知，第一群成員遺傳組成較複雜，其中有10個文心蘭屬內雜交種，2個二屬雜交種(bigenetic hybrid) (*Miltonidium*及*Odontocidium*)及2個三屬雜交種(trigenetic hybrid) (*Colmanara*)，就遺傳背景而言，上述雜交屬品種皆使用文心蘭屬為親本。第二群成員有一個蜘蛛蘭屬(*Brassia*)是屬內雜交種，一個兩屬雜交種(*Miltassia*)，一個四屬雜交種(quadrigenetic hybrid) (*Beallara*)，上述屬間雜交種皆使用蜘蛛蘭屬為親本。第三群成員皆為文心蘭屬內雜交種。第四群成員皆為堇花蘭屬之屬內雜交種。另外Hwra自成一類。

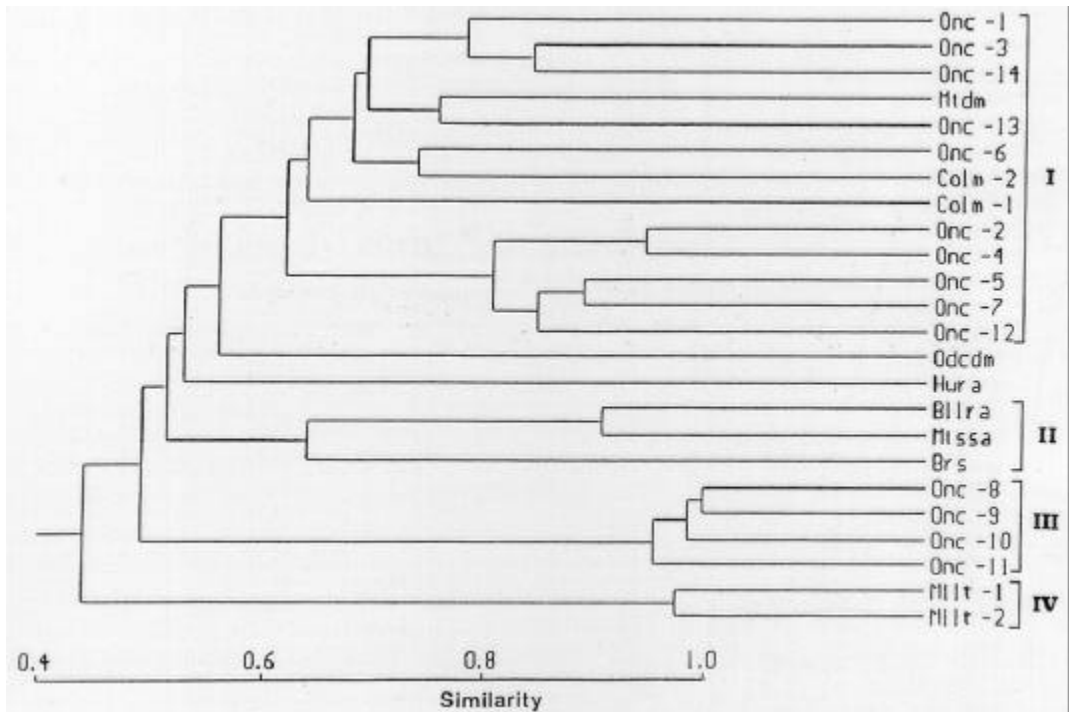
表二、24 個文心蘭亞族品種核糖核酸之內轉錄間隔區經 10 種限制酶切割產生的多型性條帶
 Table 2. Polymorphic fragments of the ITS of rDNA from 24 accessions of Oncidiinae species and hybrids digested with 10 restriction enzymes.

Restriction enzyme	Restriction site	Total bands (no. of polymorphic bands)
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC	2 (0)
<i>HaeIII</i>	GG↓CC	21 (20)
<i>CfoI</i>	GC↓GC	17 (16)
<i>TaqI</i>	T↓CGA	25 (24)
<i>RsaI</i>	GT↓AC	10 (10)
<i>MvaI</i>	CC↓(A/T)GG	16 (15)
<i>HinfI</i>	G↓ANTC	23 (22)
<i>MspI</i>	C↓CGG	30 (30)
<i>BstOI</i>	CC↓(A/T)GG	10 (10)
<i>Hsp92II</i>	CATG↓	12 (12)
Totals		166 (159)



圖二、24 個文心蘭亞族品種核糖核酸之內轉錄間隔區經 *HaeIII* 限制酶切割，3.0% NuSieve 3:1 瓊脂膠體電泳分離結果。

Fig. 2. Band patterns of the ITS region of rDNA of 24 accessions of Oncidiinae species and hybrids obtained by using PCR, digested with *HaeIII* restriction enzyme, and separated by 3.0% NuSieve 3:1 agarose gel. The taxon abbreviations are shown in Table 1.



圖三、以 PCR-amplified RFLP 偵測 24 個文心蘭亞族品種核糖核酸之內轉錄間隔區的序列差異，經 UPGMA 群叢分析所產生之樹狀關係圖。

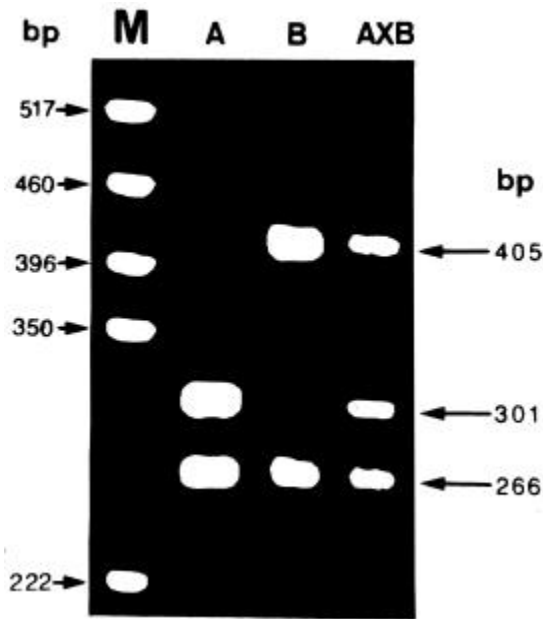
Fig. 3. Phylogenetic tree based on PCR-amplified RFLP in internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA among 24 accessions of Oncidiinae species and hybrids analysis by UPGMA. See Table 1 for the abbreviations.

分析的24個文心蘭亞族中，以Milt-1及Milt-2 (堇花蘭屬)與其它由文心蘭、蜘蛛蘭、齒舌蘭、*Leochilus*及*Rodriguezia*屬內或屬間雜交品種差異最大。雖然Mtdm品種也具有堇花蘭屬的親本(*Miltonia warscewiczii*)，但由樹狀圖得知Mtdm與Onc-13最相近。進一步檢視Mtdm的遺傳背景，發現Mtdm是由Onc-13 (*Oncidium cheiroporum*)與*Miltonia warscewiczii*雜交而來⁽¹⁶⁾，因此造成Mtdm與Onc-13能歸成一類。此外，第一群中雖然Onc-14是由Onc-3與Onc-13雜交而來，然而這三個樣本在樹狀圖中並沒有最相近，Onc-14與Onc-3 (*Oncidium ornithorhynchum*)反而與Onc-1最相近。由遺傳背景中得知，Onc-1有25% *Oncidium ornithorhynchum*的親本⁽¹⁶⁾。雖然如此，Onc-1, Onc-3, Onc-14, Mtdm及Onc-13仍然為較相近的一小群。另外，第一群中的Onc-2, Onc-4, Onc-5, Onc-7, Onc-12為較相近的另一小群，他們兩兩間的遺傳背景有75%以上的相似性⁽¹⁶⁾。其中Onc-5與Onc-7甚至達100%，但他們是經過不同的雜交過程而來⁽¹⁶⁾，雖然如此，本研究依然可發現可以將上述兩品種鑑別的分標誌。另外，第一群中尚有遺傳背景較複雜的Colm-1及Colm-2，皆由堇花蘭屬、齒舌蘭屬及文心蘭屬三屬雜交品種，因具有25%文心蘭屬的親本，而將上述兩個品種歸在第一群。然而較難理解的是，Colm-2並沒有與Colm-1較相近，

卻與原生種*Oncidium bryzatum* (Onc-6)最相近。此外，第一群中的Odcdm品種具有齒舌蘭屬25%的親本，其餘皆為文心蘭屬，其結果發現與群內其他品種關係較遠。

第二群的三個品種中，Bllra雖由四屬雜交而來，但其親本與二屬雜交品種Mtssa有44%相似性，而Bllra及Mtssa之親本來源與Brs品種間皆有25%相似⁽¹⁶⁾。第三群成員Onc-8, Onc-9, Onc-10及Onc-11皆為文心蘭屬文心蘭節(section *Oncidium*)成員內的雜交品種，品種間之遺傳背景有60%以上的相似性⁽¹⁶⁾。卻由樹狀圖卻發現與其它文心蘭屬內雜交種有明顯區別(圖三)。上述結果亦支持Dressler及Williams的研究，他們指出，由棲息地、染色體數目及雜交親和性(crossability)等觀點皆認為文心蘭節(箭葉型文心蘭)與其它文心蘭屬(薄葉型文心蘭)具明顯區別⁽¹¹⁾。雖然由種的證據顯示，文心蘭節與其它文心蘭屬成員具明顯區別，但依然無法自成一新的屬，其主要的關鍵在於文心蘭屬當初命名時所採用的模式種(type species)為文心蘭節的*O. variegatum*種，以致要將文心蘭節成員移出文心蘭屬會與標準命名法則相抵觸⁽³³⁾。此外，第四群的二個品種皆由*Miltonia*屬內雜交而來，但其大部分的親本皆未知，不過知道Milt-1是由Milt-2與*Miltonia Armstrongii*雜交而來⁽¹⁶⁾。在自成一群的品種Hwra方面，具有12.5%的遺傳背景，但其餘的親本為*Leochilus*及*Rodriguezia*屬成員⁽¹⁶⁾，這兩屬親本在本研究其他材料皆無出現，造就本品種與其他品種分離較遠，然而因具有12.5%文心蘭屬親本，使本品種與第一群有較相近的傾向。

此外，檢視DNA電泳條帶型，發現所分析的雜交品種之ITS重複序列(repeat sequence)具異質性，亦即在雜交品種可發現加成性的DNA條帶型，而上述ITS加成性這種現象並沒有在原生種中出現。如Onc. Twinkle 'Fragrance Fantasy'是由*O. ornithorhynchum*和*O. cheirophorum*雜交而來⁽¹⁶⁾，由PCR-amplified RFLP分析ITS所得的條帶型可發現，子代具有加成性，以*Bst*OI之分析為例，Onc. Twinkle 'Fragrance Fantasy'有405, 301, 266, 103及58 bp等條帶，*O. ornithorhynchum*有301, 266, 103及58 bp等四條帶，*O. cheirophorum*有405, 266及58 bp等三條帶(圖四)。雖然不等重組(unequal recombination)和基因轉變(gene conversion)可以保持rDNA各個重複單位之相似性⁽¹⁹⁾。然而Sang等人利用Direct DNA sequencing研究rDNA之ITS重複序列，發現芍藥屬(*Paeonia*)的天然四倍體雜交種也有鹽基對(base pair)加成性現象⁽²²⁾。另外，多倍體棉花也可由南方氏雜合分析(Southern blot analysis)偵測到ITS重複序列具加成性⁽³⁴⁾。本研究也發現，文心蘭亞族內雜交品種個體內可以偵測到rDNA之ITS的各個重複序列具異質現象。由於不等重組及基因轉變是發生在減數分裂(meiosis)時期，因此推論無性生殖(vegetative reproduction)物種⁽³⁾及世代較長(long generation)物種⁽²⁴⁾容易降低上述兩機制之作用，而同時擁有親代的重複序列。本研究所使用之材料皆為商業性品種，為維持品種之優良特性，常使用無性生殖繁殖(如組織培養或分株繁殖)，因此分析ITS重複序列時皆可發現異質現象。由於雜交後代的ITS重複序列同時擁有兩親代的ITS序列，很容易將子代與親代加以鑑別，因此可做為一個新品種的品種標誌。



圖四、文心蘭亞族內兩個原生種 *O. ornithorhynchum*, *O. cheirophorum* 及其雜交種品種 Onc. Twinkle 核糖核酸之內轉錄間隔區經 *Bst*OI 限制酶切割，2.5% NuSieve 3:1 瓊脂膠體電泳分離結果。

Fig. 4. The band patterns of ITS region of rDNAs of two *Oncidium* species and one intragenetic hybrid obtained by using PCR, digested with *Bst*OI, and separated by 2.5% NuSieve 3:1 agarose gel. Lanes 1 to 4 are pGEM marker, *O. ornithorhynchum*, *O. cheirophorum*, and Onc. Twinkle, respectively.

本研究藉由分析ITS序列，鑑定24個文心蘭亞族品種，可以獲得許多供進行品種鑑定的分子標誌。由上述樹狀圖與品種的遺傳背景的比較中發現，rDNA之ITS重複序列之遺傳並非由孟德爾遺傳方式遺傳，子代遺傳親代的方式常常會出現雙親代的加成性遺傳(即共顯性)。但有時候經多次雜交後，由於不等重組及基因轉變於減數分裂時發生作用，又會使得ITS的遺傳出現偏離現象，造成樹狀關係圖的品種相關性與遺傳背景有些不吻合情形出現，然而做為品種的鑑定與保護依然為一有用的分子標誌。由於本研究所分析的樣本中，尚有兩個屬內雜交種(Onc-8及Onc-9)無法加以鑑別。因此，本研究適用於文心蘭亞族屬間雜交種的鑑別，尤其子代又可保有親代的條帶型，為一新育成品種之品種保護的有用標誌。

誌 謝

本研究承行政院農業委員會(88生技-2.1-糧-02(14))計畫資助；邱苡珊小姐協助試驗工作，謹此一併申謝。

參考文獻

1. 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.
2. Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Ann. Rev. Biochem.* 61:131-156.
3. Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence of Angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 82:247-277.
4. 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.
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. Chase, M. W. and R. G. Olmstead. 1988. Isozyme number in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae): an evaluation of polyploidy. *Am. J. Bot.* 75:1080-1085.
7. Chase, M. W. and J. D. Palmer. 1989. Chloroplast DNA systematics of lilioid monocots: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae. *Am. J. Bot.* 76:1720-1730.
8. Chase, M. W. and J. S. Pippen. 1988. Seed morphology in the Oncidiinae and related subtribes (Orchidaceae). *Syst. Bot.* 13:313-323.
9. 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.
10. Dressler, R. L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.
11. Dressler, R. L. and N. H. Williams. 1982. Proposal for the conservation of the generic name 1779 *Oncidium* Swartz (Orchidaceae) with a conserved type species, *Oncidium altissimum* SW. *Taxon* 31:752-754.
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. Kiss, T., M. Kis, S. Abel and F. Solymosy. 1988. Nucleotide sequence through the 17S-25S spacer region from tomato rDNA. *Nucl. Acids Res.* 16:71-79.
14. Kiss, T., M. Kis and F. Solymosy. 1989. Nucleotide sequence of a 25S rRNA gene from tomato. *Nucl. Acids Res.* 17:796.

15. Liston, A. 1992. Variation in the chloroplast genes *rpoC1* and *rpoC2* of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from restriction site mapping of a PCR-amplified fragment. *Am. J. Bot.* 79:953-961.
16. Moir, W. W. G. 1995. *In: An orchid database.* Wildcatt Database Co., USA.
17. Nei, M and W. H. Li. 1979. Mathematical model for study genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5267-5273.
18. Rehfield, J. 1990. Frontier of orchid breeding: Oncidiinae intergenerics. *Orch Dig* 54:119-122.
19. Rogers, S. O. and A. J. Bendich. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9:509-520.
20. Rohlf, F. J., J. Kishpaugh and D. Kirk. 1982. Numerical taxonomy system of multivariate statistical programs. State Univ. New York, Stony Brook, New York.
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. Shure, M., S. Wessler and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35:225-233.
24. Suh, Y., L. B. Thien, H. E. Reeve and E.A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal sequences of nuclear ribosomal DNA in Winteraceae. *Am. J. Bot.* 80:1042-1055.
25. 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.
26. Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura. 1984. The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene. *Nucl. Acids Res.* 12:5441-5448.
27. 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.
28. Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura. 1985. The complete nucleotide sequence of a rice 25S rRNA gene. *Gene* 37:255-289.
29. Tanaka, R. and K. Kamemoto. 1984. Chromosome in orchids: counting and numbers. p.321-410. *In: Arditti, J. (ed.), Orchid biology: reviews and perspectives, III,* Cornell University Press, Ithaca, NY.

30. Tsai, C. C. and C. H. Chou. 1999. Nucleotide sequence of a 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer of *Imperata cylindrica* (L.) Beauv. var. *major* (cogongrass) J. Genet. Mol. Biol. 10:41-47.
31. 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.
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. Webster, P. 1992. The orchid genus book. USA.
34. 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.

Identification on the Species and Hybrids of the Oncidiinae by Using the Marker of Internal Transcribed Spacer of rDNA¹

Sheng-Chung Huang², Chi-Chu Tsai³ and Meei-Shiou Yih²

ABSTRACT

The internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA (rDNA) could be used as a marker to identify genetic differences among 24 accessions of species and hybrids of the Oncidiinae based on PCR-amplified RFLP analysis. The ITS region of rDNA in 24 respective accessions of the Oncidiinae was amplified by a pair of complementary primers to conserved regions at 3' end of 17S and 5' end of 25S of rRNA genes. DNA fragments of ITS were digested with ten restriction enzymes and then subjected to electrophoresis. Among the 166 bands that appeared, 159 bands were polymorphic. From the cluster analysis on the pattern of band distribution in all samples, four major groups and two individual clusters not belonging to any of the four groups were identified based on molecular data. Section *Oncidium*, belonging to genus *Oncidium* in traditional view, was shown to separate from other accessions of genus *Oncidium*. In addition, additive DNA band pattern was shown within individuals of hybrid cultivars. In other words, sequence heterogeneity of ITS repeat family was shown within individuals of hybrid cultivars. In short, a technology to identify Oncidiinae cultivars and to protect the right of plant breeders was shown in present study.

Keywords: Oncidiinae, PCR, internal transcribed spacer, sequence heterogeneity.

¹Contribution No. 0535 of Taichung District Agricultural Improvement Station.

This research was supported by funding from the Council of Agriculture, Executive Yuan, R.O.C.

²Research fellows, Assistant Researcher, Taichung District Agricultural Improvement Station, Changhua, Taiwan.

³Assistant Agronomists, Kaohsiung District Agricultural Improvement Station, Pingtung, Taiwan.

表三、24 個文心蘭亞族品種兩兩間之相似矩陣

Table 3. Similarity matrix of DNA band patterns among 24 accessions of Oncidiinae species and hybrids according to Nei and Lis' coefficient of similarity

	Onc-1	Onc-2	Onc-3	Onc-4	Onc-5	Onc-6	Onc-7	Onc-8	Onc-9	Onc-10	Onc-11	Onc-12	Onc-13	Onc-14	Milt-1	Milt-2	Brs	Mtssa	Mtdm	Odcdm	Hwra	Colm-1	Colm-2	Bllra	
Onc-1	1.00																								
Onc-2	0.64	1.00																							
Onc-3	0.76	0.49	1.00																						
Onc-4	0.65	0.95	0.52	1.00																					
Onc-5	0.75	0.83	0.63	0.80	1.00																				
Onc-6	0.68	0.62	0.65	0.59	0.65	1.00																			
Onc-7	0.73	0.80	0.59	0.78	0.88	0.63	1.00																		
Onc-8	0.47	0.52	0.47	0.52	0.53	0.63	0.47	1.00																	
Onc-9	0.47	0.52	0.47	0.52	0.53	0.63	0.47	1.00	1.00																
Onc-10	0.46	0.50	0.45	0.50	0.53	0.61	0.48	0.99	0.99	1.00															
Onc-11	0.46	0.52	0.46	0.52	0.51	0.63	0.45	0.96	0.96	0.95	1.00														
Onc-12	0.69	0.84	0.57	0.81	0.88	0.62	0.83	0.53	0.53	0.51	0.51	1.00													
Onc-13	0.64	0.56	0.68	0.53	0.63	0.70	0.61	0.58	0.58	0.56	0.55	0.60	1.00												
Onc-14	0.80	0.53	0.84	0.53	0.66	0.68	0.62	0.52	0.52	0.51	0.51	0.65	0.80	1.00											
Milt-1	0.47	0.43	0.44	0.41	0.44	0.51	0.42	0.39	0.39	0.37	0.38	0.44	0.54	0.49	1.00										
Milt-2	0.47	0.43	0.44	0.41	0.44	0.51	0.42	0.39	0.39	0.37	0.38	0.44	0.54	0.49	0.98	1.00									
Brs	0.57	0.52	0.51	0.48	0.53	0.70	0.53	0.51	0.51	0.49	0.51	0.51	0.58	0.55	0.53	0.53	1.00								
Mtssa	0.52	0.50	0.44	0.48	0.51	0.58	0.52	0.44	0.44	0.42	0.43	0.51	0.46	0.49	0.42	0.44	0.64	1.00							
Mtdm	0.71	0.63	0.61	0.63	0.66	0.63	0.71	0.44	0.44	0.43	0.43	0.63	0.76	0.71	0.47	0.47	0.53	0.50	1.00						
Odcdm	0.59	0.54	0.53	0.58	0.61	0.57	0.55	0.56	0.56	0.54	0.54	0.62	0.48	0.59	0.40	0.40	0.49	0.46	0.53	1.00					
Hwra	0.50	0.55	0.44	0.52	0.55	0.63	0.55	0.49	0.49	0.47	0.49	0.59	0.55	0.49	0.44	0.46	0.57	0.50	0.51	0.54	1.00				
Colm-1	0.64	0.58	0.59	0.57	0.63	0.59	0.64	0.44	0.44	0.42	0.42	0.61	0.63	0.64	0.45	0.45	0.48	0.50	0.69	0.61	0.47	1.00			
Colm-2	0.73	0.63	0.63	0.59	0.70	0.74	0.71	0.46	0.46	0.44	0.44	0.67	0.68	0.67	0.46	0.46	0.55	0.52	0.71	0.52	0.55	0.69	1.00		
Bllra	0.53	0.51	0.45	0.49	0.52	0.60	0.53	0.45	0.45	0.43	0.43	0.54	0.47	0.50	0.43	0.45	0.64	0.91	0.51	0.49	0.51	0.51	0.53	1.00	