

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以核糖體 RNA 基因為蝴蝶蘭屬植物的分子標誌

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2317-B-002-021-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 94 年 01 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所

計畫主持人：高燕玉

共同主持人：楊堯文

計畫參與人員：高玉馨、蘇玟玟；

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 4 月 25 日

蝴蝶蘭基因體研究計畫— 以核糖體 RNA 基因為蝴蝶蘭屬植物的分子標誌

【中文摘要】

核糖體 RNA 基因包括 18S-5.8S-26S rDNA (即 45S rDNA) 與 5S rDNA 兩種, 均為聚集型的重複性序列, 此兩種基因的重複單位皆包含轉錄區及基因間間隔區(IGS), 其中 18S 與 5.8S 間及 5.8S 與 26S 間又被內部轉錄間隔區(ITS)隔開, 分別為 ITS1 和 ITS2。ITS 和 IGS 之序列及長度在物種間的差異很大, 因此常用於親緣關係較近物種間的分析。本實驗以 *Phalaenopsis aphrodite* 之 5S rDNA 的基因轉錄區設計一對專一性的引子, 利用聚合酵素連鎖反應 (PCR) 擴增 28 種蝴蝶蘭及 1 種朵麗蘭植物之 IGS 序列, 做親緣關係樹的分析, 可將 28 種蝴蝶蘭分成 7 群。此結果與過去利用 ITS 序列分析的結果相比較, 共有四群植物相吻合, 同時 IGS 序列分析的結果, 與傳統依植物形態分類的結果較為一致。

關鍵詞：

蝴蝶蘭、基因間間隔區、親緣關係

【Abstract】

18S-5.8S-26S (45S) and 5S rDNAs are organized into clusters of tandem repeat with each repeat consisting of a transcribed region, and an intergenic spacer (IGS). In the transcribed region of 45S rDNA, on either side of 5.8S rDNA are found internal transcribed spacers (ITS), described as ITS1 and ITS2. The ITS and IGS have sequences diverged more than the transcribed region, and the presence of highly conserved sequences flanking each of ITS and IGS make them easy to amplify and useful for phylogenetic analyses of interspecies. In this study, the IGS sequences of 28 *Phalaenopsis* species and one *Doritis* species were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) which used specific primers devised by 5S rDNA transcribed region of *P. aphrodite*. The neighbor-joining tree constructed from IGS consensus sequences divides the 28 *Phalaenopsis* species into seven

groups. The species from four groups coincided with the results from the IGS and ITS sequences analyses. Additionally, species in IGS phylogenetic tree were in agreement with traditional taxonomic status.

Keywords:

Phalaenopsis, IGS, phylogeny

壹、前言

蝴蝶蘭屬於蘭科(Orchidaceae)之蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*), 依植物外部形態的特徵, Sweet (1980) 將其分成九個節(section), 包括 43 個原生種和 4 個天然雜交種(natural hybrid); Christenson (2001) 則將 63 個原生種分在五個亞屬(subgenus)和八個節。過去傳統上研究物種間的親緣關係(phylogenetic relationships)主要是依據形態(morphology)和交配能力(crossability)等性狀。近年來由於生物技術的發展, 以分子標誌(molecular markers)進行親緣關係分析已廣為分類學家所使用。

核糖體 RNA 基因包括 18S-5.8S-26S rDNA (即 45S rDNA) 和 5S rDNA 兩種, 均為頭尾相接排列(tandem)的重複性序列, 其重複的單位(repeating unit)包含轉錄區(transcribed region)和基因間間隔區(intergenic spacer; 簡稱 IGS)。在植物中, 45S rDNA 的拷貝數(copy numbers)為 600 至 8500 個, 其轉錄區域具高度保留性(conserved)序列, 而 IGS 的序列及長度在物種間的差異很大(Long and Dawid, 1980), 又 45S rDNA 的轉錄區域內尚有兩個內部轉錄間隔區(internal transcribed spacers; 簡稱 ITS), 分別為 ITS1 和 ITS2, 在物種間亦有差異; 而 5S rDNA 的拷貝數為 1000 至 50000 個, 含 120 bp 保留性序列的轉錄區域, 其 IGS 的序列及長度在物種間的差異亦很大(Sastri *et al.*, 1992), 因此 45S rDNA 的 ITS 序列以及 5S rDNA 的 IGS 序列, 常被用來探究物種親緣關係及演化的

重要依據(Udovicic *et al.*, 1995; Cronn *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1997)。

本實驗依據李文靜(2002)從蝴蝶蘭 *Phalaenopsis aphrodite* 分離到的 5S rDNA 選殖體，根據轉錄區序列設計一對專一性的引子(primers)，以 28 種蝴蝶蘭及 1 種朵麗蘭植物之基因組 DNA 為模板(template)，利用聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, 簡稱 PCR) 擴增 IGS 序列，經選殖與定序後，做親緣關係樹的分析，以了解這些蝴蝶蘭屬植物在演化上的親緣關係。

貳、材料與方法

1. 植物材料

本實驗所使用的植物材料包括 28 種蝴蝶蘭及 1 種朵麗蘭。

2. 植物總 DNA 的抽取

植物總 DNA 的抽取係參考 Gawel 與 Jarret (1991) 的方法。取 2 克植物葉片，加入液態氮，快速磨成粉末，倒入離心管中，加 15 ml CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) DNA 萃取緩衝液及 200 μ l β -mercaptoethanol，混合均勻，放在 65 $^{\circ}$ C 搖盪 1 小時。加入 15 ml chloroform 充分混合，離心取上清液，以 Miracloth 過濾，再加入 15 ml isopropanol，輕緩混勻，離心沉澱 DNA。加入 1 ml 1 M NaCl，置 65 $^{\circ}$ C 烘箱 30 min 溶解 DNA，然後加入等量 chloroform 與 DNA 混合，離心取上清液，以 2.5 倍體積的 99% 酒精沉澱 DNA，再以 75% 酒精洗兩次，待乾後，加 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 緩衝液溶解，置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

3. IGS 序列的擴增、轉殖與定序

依據李文靜(2002)從 *Phalaenopsis aphrodite* 分離到的 5S rDNA 轉錄區序列設計一對專一性的引子，分別為 5'-TTGGGAATTCCTCGTGTTC-3' 和 5'-CTGCGGAATTCCTGATGGGATCC-3'，以不同蝴蝶蘭之 DNA 為模板，利用聚合酵素連鎖反應擴增 IGS 序列。純化後，裝載於 pUC18 載體，然後轉殖至大腸桿菌 XL1-Blue 內，然後以 dideoxy chain termination 方法定序 (Sanger, 1981)。

4. 親緣關係分析

以 Molecular Evolutionary Genetics

Analysis software (MEGA v. 2.0) 軟體分析序列間的親緣關係(Kumar *et al.*, 2001)。再利用 neighbor-joining (NJ)(Saitou and Nei, 1987) 的方式轉化為親緣關係樹。

參、結果與討論

28 種蝴蝶蘭與一種朵麗蘭的 IGS 一致性序列對齊排列後，以距離指數法做 neighbor-joining 樹(簡稱 IGS-NJ 樹)，可將植物區分成 7 群(圖 1)。依 Sweet (1980) 分類系統，第一群蝴蝶蘭分散於 3 個節，包括 *P. celebensis* (*Stauroglottis* 節)、*P. micholitzii* (*Amboinenses* 節)、*P. mariae*、*P. pallens*、*P. fasciata*、*P. lueddemanniana* 和 *P. pulchra* (*Zebrinae* 節)；第二群蝴蝶蘭分散於 2 個節，包括 *P. amboinensis* 和 *P. venosa* (*Amboinenses* 節)、*P. modesta* 和 *P. violacea* (*Zebrinae* 節)；第三群蝴蝶蘭分散於 2 個節，包括 *P. sumatrana* (*Zebrinae* 節)、*P. cornu-cervi* 和 *P. mannii* (*Polychilos* 節)；第四群蝴蝶蘭分散於 3 個節，包括 *P. fuscata* 和 *P. viridis* (*Fuscatae* 節)、*P. gigantea* (*Amboinenses* 節) 及 *P. maculata* (*Zebrinae* 節)；第五群蝴蝶蘭分散於 2 個節，包括 *P. equestris* (*Stauroglottis* 節)、*P. amabilis*、*P. aphrodite*、*P. sanderiana*、*P. stuartiana* 和 *P. schilleriana* (*Phalaenopsis* 節)；第六群蝴蝶蘭僅 *P. lowii* (*Proboscidioides* 節) 一種；第七群蝴蝶蘭分散於 2 個節，包括 *P. stobartiana* (*Aphyllae* 節)、*P. parishii* 及 *P. lobbii* (*Parishianae* 節)。結果顯示，IGS 序列的分析雖與 Sweet (1980) 的分類系統有差異，但與 Christenson (2001) 的分類結果則相當一致。此外歸於同一群的三種蝴蝶蘭 *P. amboinensis*、*P. venosa* 和 *P. violacea*，均包含大、中、小三型染色體 (Kao *et al.*, 2001)，且黃 (1999) 由 *P. violacea* 分離出的 Pvr I 重複性序列在此三種蝴蝶蘭染色體的分佈模式相似，同時利用 45S 與 5S rDNA 進行螢光原位雜交 (fluorescence *in situ* hybridization) 的結果

亦得到非常類似的結果(李, 2002), 因此推測三者的親緣關係應較為接近。

將 IGS 序列的分析與過去 ITS 序列的分析結果(趙, 2003)相比較, 吻合的植物共有四群, 包括: (a) *P. pallens*、*P. fasciata* 和 *P. pulchra*; (b) *P. amboinensis*、*P. venosa*、*P. modesta* 和 *P. violacea*; (c) *P. cornu-cervi* 和 *P. mannii*; (d) *P. fuscata* 和 *P. viridis*。

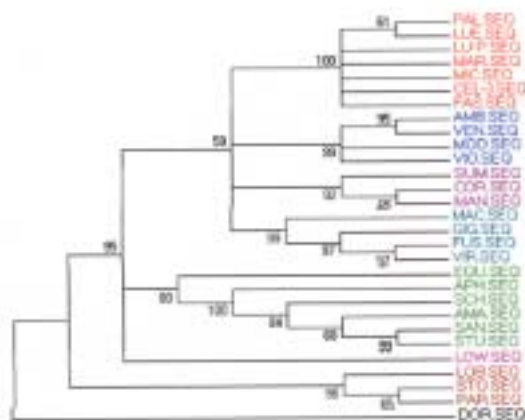


圖 1. 28 種蝴蝶蘭屬植物 5S rDNA 之 IGS-NJ 樹, 共分成 7 群, 分別以不同顏色代表。

肆、參考文獻

- [1] 李文靜. 2002. 蝴蝶蘭屬植物核糖體 RNA 基因的選殖及實質定位. 國立台灣大學植物學研究所碩士論文.
- [2] 黃建豪. 1999. 蝴蝶蘭兩種重複性 DNA 序列的分離與定性. 國立台灣大學植物學研究所碩士論文.
- [3] 趙芷瑩. 2003. 以 rDNA 之 ITS 序列探討蝴蝶蘭屬植物之親緣關係. 國立台灣大學植物學研究所碩士論文.
- [4] Arends, J. C. 1970. Cytological observation on genome homology in eight interspecific hybrids of *Phalaenopsis*. *Genetica*. 41: 88-100.
- [5] Christenson, E. A. (2001). *Phalaenopsis*: a monograph. Timber Press, Portland, Oregon.
- [6] Cox, A. V., A. M. Pridgeon, V. A. Albert and M. W. Chase. 1997. Phylogenetics of the slipper orchids (*Cypripedioideae*, *Orchidaceae*): nuclear rDNA ITS sequence. *Plant Syst. Evol.* 208: 197-223.
- [7] Cronn, R. C., X. Zhao, A. H. Paterson and J. F. Wendel. 1996. Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and all polyploid cottons. *J. Mol. Evol.* 42: 685-705.
- [8] Gawel, N. J. and R. L. Jarret. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 262-266.
- [9] Kao, Y. Y., S. B. Chang, T. Y. Lin, C. H. Hsieh, Y. H. Chen, W. H. Chen, and C. C. Chen. 2001. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. *Ann. Bot.* 87: 387-395.
- [10] Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. *MEGA2*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- [11] Long, E. O. and I. B. Dawid. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 727-764.
- [12] Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- [13] Sanger, F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214: 1205-1210.
- [14] Sastri, D. C., K. Hilu, R. Appels, E. S. Lagudah, J. Playford and B. R. Baum. 1992. An overview of evolution in plant 5S rDNA. *Plant Syst. Evol.* 183: 169-181.
- [15] Sweet, H. R. 1980. The genus *Phalaenopsis*. Day Printing Corp., Pomona, California.
- [16] Udovicic, F., G. I. McFadden and P. Y. Ladiges. 1995. Phylogeny of *Eucalyptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* 4: 247-256.

伍、計畫成果自評

本研究內容與原計畫相符, 已達成預定成效。成果可發表於學術期刊, 並可提供蝴蝶蘭育種上之參考資訊。

