

利用葉綠體 *matK* 基因序列分析原生石斛蘭之遺傳歧異度¹

李文立² 李碩朋^{2,5} 陳甘澍² 林榮貴² 劉政道² 戴廷恩³ 鍾仁彬⁴

摘要

李文立、李碩朋、陳甘澍、林榮貴、戴廷恩、鍾仁彬。2009。利用葉綠體 *matK* 基因序列分析石斛蘭遺傳歧異度。台灣農業研究 58:61-71。

自不同原生石斛蘭基因組 DNA 中選殖葉綠體 *matK* 的基因片段經定序後比較其相似度，據以做為不同原生石斛蘭之親緣分析與分類依據，以 *matK* 基因序列分析結果顯示：各石斛蘭間的相似度介於 91.1 至 99.7%，顯示石斛蘭種間 *matK* 基因序列保守性高。細莖石斛 (*Dendrobium leptocladum*) 與其它參試石斛蘭之平均相似度為 91%，是差異性最大者；三星石斛 (*Epigeneium sanseiense*) 與連珠石斛 (*E. nakaharaei*) 二者間的相似度最高，達 99.7%，經由 *matK* 基因序列分析結果可將參試石斛蘭分為 4 個群，其中第 1 群的遺傳距離為 0.003，第 2 群的遺傳距離則介於 0.020-0.012 之間；第 3 群的離散度較大，遺傳距離介於 0.038-0.016 之間，而細莖石斛 (*D. leptocladum*) 因為 DNA 缺失變異較多而與其他石斛蘭間差異性最大，遺傳距離介於 0.089-0.074 之間，故被單獨歸類成第 4 群，本種也是台灣原生石斛特有種。

關鍵詞：石斛蘭、葉綠體、基因、遺傳、親緣分析。

前言

石斛蘭屬 (*Dendrobium*) 為蘭科第二大屬植物，原生於亞洲地區，在中國、印度、日本、韓國、印尼、菲律賓、澳洲及台灣等地均有發現。本屬植物對環境適應性極廣，具有各式各樣外部形態及花型，約有 1000 種以上，不僅分佈在高溫多濕的熱帶，也著生於海邊樹林或喜

馬拉雅山區，是適應性廣泛，生性強健的附生型蘭花 (Schelpe & Stewart 1995; Kamemoto *et al.* 1999; Lavarack *et al.* 2000)。台灣本島與離島之蘭嶼、綠島地區共有 12 種原生石斛蘭，多數著生在 alt. 100 m 到 2100 m 處之樹幹或樹冠層中 (Lavarack *et al.* 2000; Su *et al.* 2000)。由於本屬植物對環境及氣候適應性良好，在不同海拔高度也能正常生長，除具觀賞價值外，少數

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2347 號。接受日期：98 年 1 月 23 日。

2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹系助理研究員、助理研究員、研究員兼分所長、副研究員兼系主任、前研究員兼分所長。台灣 高雄縣 鳳山市。

3. 本所花卉研究中心副研究員。台灣 雲林縣 古坑鄉。

4. 私立明道大學助理教授。台灣 彰化縣 埤頭鄉。

5. 通訊作者，電子郵件：shoughpeng@fthes-tari.gov.tw；傳真機：(07)7315590。

品種並為傳統中醫使用之藥材 (Li 2007)。其中紅鸞石斛 (*D. falconeri*) 及紅花石斛 (*D. miyakei*)，因花色豔麗，觀賞價值高，受一般栽培者之喜愛 (圖 1)；黃花石斛 (*D. tosaense*)、白花石斛 (*D. moniliforme*) 被認為具有眼疾的醫療價值，目前正由陽明大學等學術單位進行相關研究。原生石斛蘭因為種類多且雜，因此在分類上，屬 (genus) 以下分有亞屬 (sub-genus)、節 (section)、群 (group) 等，有些種類因生長環境之變化及造成外部形態之差異，辨識不易甚至造成誤判，使一些石斛蘭種 (species) 的分類地位仍未確定。

色素體 (plastid) 為植物細胞中一群具有雙層膜與分裂增殖特性的胞器，一般認為與細胞核有相同的遺傳特性，常被應用於演化推論 (Howe 1996; Bodyl 1999; Zerges 2002) 及親緣性分析 (Delwiche & Palmer 1996; Margulis & Obar 1985; Martin *et al.* 1998; Raven 1970) 的研究上。在這些研究中，最常被應用於親緣分析的是 *matK* 基因，該基因長度約為 1500 bp，位於葉綠體 *trnK* 基因的插入子 (intron) 區域 (Hilu & Liang 1997)，是葉綠體基因組中演化最快速的編碼區域 (Neuhaus & Link 1987; Olmstead & Palmer 1994)，適合做為植物親緣分析的對象 (Sang *et al.* 1997)。

本研究係利用植物葉綠體 *matK* 基因的核苷酸序列進行原生石斛蘭親緣關係分析，有助於釐清不同種間親緣與演化關係之界定，除了可作為分群或分類之依據外，特定之 DNA 序列，經確證後更可作為種原鑑別之用。

材料與方法

試驗材料

本試驗所使用的植物材料多數取自台灣本島與離島之蘭嶼、綠島地區，包括長距石斛 (*D. chameleon*)、鵝石斛 (*D. crumenatum*)、燕石斛 (*D. equitans*)、紅鸞石斛 (*D. falconeri*)、大雙花

石斛 (*D. furcatopedicellatum*)、紅花石斛 (*D. miyakei*)、白石斛 (*D. moniliforme*)、細莖石斛 (*D. leptocladum*)、連珠石斛 (*Epigeneium nakaharaei*) 及三星石斛 (*E. sanseiense*) 等 10 種、另有取自印尼之菲律賓燕石斛 (*D. batanense*) 1 種、菲律賓的扁石斛 (*D. lamellatum*) 與鞭尾石斛 (*D. junceum*) 等 2 種及泰國的流蘇石斛 (*D. fimbriata*) 1 種，合計 14 種原生石斛蘭，所有參試植物材料來源詳如表 1。

試驗方法

植物形態及園藝性狀調查

分別調查並紀錄上述 14 種原生石斛蘭試驗材料的株高、葉片大小、葉片形態、花朵大小、花色、香味、開花期等項目，作為種原特性及育種之基本資料。

DNA 萃取與純化

DNA 萃取方法為秤取 0.3 g 嫩葉，加入液態氮，再磨碎成粉狀。加入 2 mL 萃取液 (TNE buffer 2.0 mL, 20% SDS 112.5 μ L, 2-Mercaptoethanol 7.5 μ L)，經 65°C 水浴及離心 (13,000 rpm 4°C, 15 min) 後取上澄液加入等量 phenol/chloroform，去除蛋白質，離心 (12,000 rpm, 10 min) 後取上澄液，以異丙醇 (isopropanol) 沈降 DNA，再經 70% EtOH 清洗乾燥後將 DNA 溶於 Tris-EDTA (TE) 溶液中，以光電比色計 (Hitachi U-2000) 測定 A_{260} 及 A_{280} 讀值，計算 DNA 濃度並判定萃取效果 (Lee *et al.* 2007)。

聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 與電泳分析

以石斛蘭基因組 DNA 50 ng, 1 \times PCR 緩衝液 [10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% (w/v) Triton 100], dATP、dCTP、dGTP 及 dTTP 各 200 μ M, 1 μ M 引子及 1.2 U DNA polymerase (*Thermus brockianus*, 生工)，總反應體積為 25 μ L，混合液覆蓋 50 μ L 礦物油 (Sigma mineral oil M3516)，置入 PCR 儀 (ABI



圖 1. 9 種原生石斛蘭花朵圖片。(a) 紅花石斛；(b) 白石斛；(c) 連珠石斛；(d) 燕石斛；(e) 大雙花石斛；(f) 長距石斛；(g) 紅鸞石斛；(h) 鞭尾石斛；(i) 扁石斛。

Fig. 1. Flowers of nine species of *Dendrobium* and *Epigeneium* used this study. Note differences in color and shape of flowers among these species. (a) *D. miyakei*; (b) *D. moniliforme*; (c) *E. nakaharaei*; (d) *D. equitans*; (e) *D. furcatopedicellatum*; (f) *D. chameleon*; (g) *D. falconeri*; (h) *D. junceum*; (i) *D. lamellatum*.

表 1. 14 個參試蘭花物種

Table 1. Fourteen species of orchids (12 *Dendrobium*^z and 2 *Epigeneium*) used in this study

Species	Abbreviation	Accession No.	Section	Source
<i>Den. batanense</i>	<i>D. bat</i>	TARI. F. D0101.0	Rhopalanthe	Indonesia
<i>Den. chameleon</i>	<i>D. cha</i>	TARI. F. D0044.0	Calcarifera	Lilong Shan
<i>Den. crumenatum</i>	<i>D. cru</i>	TARI. F. D0040.0	Rhopalanthe	Green Island
<i>Den. equitans</i>	<i>D. equ</i>	TARI. F. D0054.0	Rhopalanthe	Orchid Island
<i>Den. falconeri</i>	<i>D. fal</i>	TARI. F. D0050.0	Dendrobium	Ku Kuan
<i>Den. fimbriatum</i>	<i>D. fim</i>	TARI. F. D0080.0	Dendrobium	Thailand
<i>Den. furcatopedicellatum</i>	<i>D. fur</i>	TARI. F. D0055.0	Grastidium	Taipingshan
<i>Den. junceum</i>	<i>D. jun</i>	TARI. F. D0087.0	Rhopalanthe	Philippines
<i>Den. lamellatum</i>	<i>D. lam</i>	TARI. F. D0115.0	Platyclaulon	Philippines
<i>Den. leptocladum</i>	<i>D. lep</i>	TARI. F. D0041.0	Grastidium	Tong Pu
<i>Den. miyakei</i>	<i>D. miy</i>	TARI. F. D0042.0	Pedilonum	Orchid Island
<i>Den. moniliforme</i>	<i>D. mon</i>	TARI. F. D0043.0	Dendrobium	Sun Link Sea
<i>Epi. nakaharaei</i>	<i>E. nak</i>	TARI. F. D0051.0	-	Alishan
<i>Epi. sanseiense</i>	<i>E. san</i>	TARI. F. D0049.0	-	Ku Kuan

^zThe classification of *Dendrobium* is base on Tsi *et al.* 1990 & Lavarack *et al.* 2000.

2700) 進行聚合酵素連鎖反應。反應溫度條件為 95°C 90 s 後，以 95°C 30 s、42°C 30 s、72°C 90 s 3 個步驟進行 40 次循環，最後以 72°C 600 s 結束，反應完成後試管保存於 4°C。引子序列如下：matK-F：5'-CGT AAA CAG TCT TCT TAT TTA CG-3'；matK-R：5'-TAT GTT TAC GAG CCA AAG TTC TA-3'。

電泳分析時取 10 μ L PCR 樣品於 1 \times TAE buffer 及 1.5% Agarose 中進行。以 100 V 電壓進行電泳至第一道染劑到達膠體頂端前 5 cm 處。膠體以溴化乙錠 (Ethidium bromide) 染色後在 260 nm 波長之紫外光下 (Transilluminator UVP Inc.) 觀察 DNA 條帶，並以影像分析系統 (AIPHA-INNOTE IS-1000) 及 AlphaImager 2000 軟體 (Clontech 公司) 進行照相及儲存檔案，再以熱感相片紙輸出紀錄。

聚合酵素連鎖反應 DNA 片段之選殖與分析

以 2 \times Rapid Ligation Buffer 5 μ L、pGEM-T vector 1 μ L、PCR 產物 2 μ L、T4 DNA Ligase 1 μ L 及滅菌水 1 μ L 依序加入 1.5 mL 離心管，置於室溫 90 min 進行黏接反應。取 2 μ L 已完成黏接反應溶液，加入勝任細胞 (Competent cell) 50 μ L，輕輕的用試管尖攪動溶液，混合均勻後置冰上再以 42°C 水浴器進行熱休克 (Heat-shock)，再加入 LB broth 於 37°C 培養 1.5 h，然後塗佈於含 IPTG 及 X-gal 之 Ampicillin LB medium 中於 37°C 培養過夜。每個培養皿挑選約 10 個白色菌落於 3 mL LB 含 Ampicillin 100 mg/L 液態培養基中培養過夜以備分析。

細菌質體萃取與選殖菌株系確認

選殖得到菌株以 Plasmid isolation Kit (Promega Co.) 進行細菌質體之萃取，質體 DNA 溶於 1 \times TE 溶液中並以電泳確認分子量，判定其品質。插入片段之確認則以限制酵素 EcoRI 剪切之片段大小判定，DNA 片段大小符合之選殖菌系，委託明欣生物科技公司進行解序。

DNA 序列分析與資料處理

解序所得到之序列結果以 DNASTAR 軟體 (DNASTAR, Madison, WI, USA) 中 Megalign 程式依 Hein 的計算公式 (Hein 2001) 加以分析，計算各核酸序列中的異同判別石斛蘭原生種間 matK 序列的相似度 (similarity) 並進行多序列對齊排列 (alignment) 分析，再計算出種間之相似度，繪製遺傳相似度圖。

結 果

種原特性調查

參試 14 種原生種石斛蘭種間的植物型態差異頗大，在移置鳳山分所溫室栽培 1 年後，利用外部形態差異可以區分多數石斛蘭種，僅三星石斛與連珠石斛因形態近似，不易藉外部形態分辨 (表 2)。在石斛蘭屬中，不同種之區別常由葉片的伸展角度、假球莖顏色、節間大小、新芽形狀，花朵形態與著生方式等特性來加以區分。14 種原生石斛蘭中，植株高度最高者為鴿石斛，含頂端之花序軸，可達 97 cm。紅鸚石斛雖然假球莖為匍匐性，但長度亦可達 80 cm。葉片長度則以流蘇石斛的 9.4 cm 為最長，紅鸚石斛和三星石斛葉長僅 2 cm，是所有參試品種中最短者；葉寬以紅花石斛的 2.9 cm 最寬，紅鸚石斛的 0.2 cm 為最窄。葉片數方面則以紅花石斛具有 20 葉片最多。一般石斛蘭的葉形均為橢圓形，但其葉片長度方面則長短不一，其中較為特殊者分別為雙花石斛細長形之葉片，以及燕石斛扁平銳三角形。一般而言，石斛植株都為叢生型，其假球莖為直立或下垂，但連珠石斛屬較特別為匍匐叢生型。石斛蘭的花朵是全株觀賞的重點，在花朵特性上，大雙花石斛花徑最大，花朵展開幅度達 6.4 cm，紅鸚石斛達 5.6 cm，花朵飽滿，但不若大雙花石斛花瓣之單薄纖細。細莖石斛花朵最小僅 1.5 cm 寬，是展開幅度最小的花朵。花瓣縱徑則以紅鸚石斛 6 cm 最大，細莖石斛 1 cm 最

小；花距大小（唇瓣基部特化延伸出之漏斗狀構造，其量測是由花梗端往下量），以長距石斛居首，達 2.1 cm，三星石斛花距長為 1.7 cm，而細莖石斛則僅有 0.4 cm；花瓣色澤方面以紅鸚石斛，紅花石斛的粉紅色系，及鵲石斛的亮白色較具觀賞價值。部分原生石斛蘭花朵具有香氣，但多數為清淡型香味；鵲石斛、燕石斛、紅鸚石斛、白石斛等都略有香味。部分種類之石斛蘭會於假球莖或花序上分泌形狀似微小水滴的蜜露以吸引昆蟲，但在台灣的原生石斛蘭中並無此現象 (Lee 2002)。在花瓣方面，唇瓣是型態特化最多的花瓣，也是石斛蘭花朵顏色變化最豐富的地方；鵲石斛的唇瓣以白色為底，但近喉部則呈現黃色，同時也有三條突起產生；紅花石斛的唇瓣以紫紅色為主，另有數條深紫紅色的縱線；白石斛的唇瓣則較為單純，雖然以白色為主，但近喉部處有紫色斑塊。花粉塊的大小一般在 0.1 cm²，細莖石斛的花粉塊只有 0.01 cm²，是所有參試品種中最小的。花朵著生數目，以紅花石斛（可達 12 朵花）最多，鵲石斛、紅鸚石斛、連珠石斛、三星石斛等每節均單生一花；鵲石斛雖然單生一花，但

其花朵的綻放是整串的，相當具有觀賞價值。經由週年的開花期調查，白石斛花期長，整年可見其開花（僅 9 月上旬無），長距石斛及紅花石斛為每年底至翌年春開花，其它種石斛蘭則多在 2 月至 9 月間開花（表 2）。

石斛蘭原生種 matK 基因片段之選殖與分析

將蒐集自各地區的石斛蘭原生種依照材料與方法所述，以萃取之基因組 DNA 為模版，與所設計之 matK-F、matK-R 專一性引子在 55°C 的鍊合條件下進行 40 次增幅反應，經瓊脂膠體電泳分析，結果顯示以 matK 引子對可以得到 630 bp 之條帶。將所得之條帶純化，以熱休克法選殖入大腸桿菌，經解序後，將所得序列與美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的基因庫資料進行比對，結果顯示各個選殖之預期分子量片段為不同石斛蘭原生種 matK 基因之部分序列。在各個石斛蘭原生種間主要的變異區位引子鄰近前端，變異形態多數為缺失 (deletion) 變異，至於其他非鄰近前端引子區域之核苷酸序列的變異情形較小，其變異形態主

表 2. 不同石斛蘭屬物種植物外部型態調查表

Table 2. Phenotype of 14 species of orchids (12 *Dendrobium* and 2 *Epigeneium*) used in this study

Name	Florescence (month)	Plant Height (cm)	Leaf		Flower			
			Size (cm)	Shape	Size (cm)	Pedicle (cm)	Color	Aroma
<i>D. bat</i>	6-7	56	9.0 × 0.6	flat triangle	1.5 × 0.7	1.2	white	no
<i>D. cha</i>	12-2	26	7.0 × 2.8	oval-shaped	3.5 × 2.0	2	white with red line	no
<i>D. cru</i>	2-12	26	7.0 × 2.8	oval-shaped	3.3 × 3.4	1.2	white	yes
<i>D. equ</i>	2-12	41	8.0 × 0.5	flat triangle	2.4 × 1.9	0.7	white	yes
<i>D. fal</i>	3-5	80	5.6 × 0.3	slender	5.6 × 6.0	3.1	light pink	yes
<i>D. fim</i>	3-7	42	9.4 × 2.3	long oval-shaped	3.5 × 3.0	5	orange	yes
<i>D. fur</i>	6-8	77	6.0 × 0.5	slender	6.4 × 4.5	1.2	white with brown sport	no
<i>D. jun</i>	5-10	100	16.0 × 0.2	slender	3.2 × 2.0	2	yellow	no
<i>D. lam</i>	9-12	13	5.0 × 2.5	oval-shaped	2.1 × 1.5	1.7	cream white	yes
<i>D. lep</i>	4-9	33	6.5 × 0.4	slender	1.5 × 1.0	0.8	white	no
<i>D. miy</i>	1-5	45	8.5 × 1.7	long oval-shaped	1.8 × 1.5	1.9	deep pink	no
<i>D. mon</i>	4-9	35	3.9 × 0.7	long oval-shaped	4.0 × 3.3	2	white	yes
<i>E. nak</i>	8-5	7	3.0 × 1.2	oval-shaped	2.0 × 2.3	2	yellow	no
<i>E. san</i>	4	6	2.0 × 0.5	long oval-shaped	2.7 × 3.3	1.3	light pink	no

要為取代 (replace) 變異，其中細莖石斛在第 420 bp 與 424 bp 間缺失了 5 個核苷酸，481 bp 及 489 bp 間則缺失 9 個核苷酸，這些區域的缺失突變造成細莖石斛與其他石斛蘭原生種有較小之相似度 (圖 2)。

石斛蘭原生種之親緣關係分析

透過石斛蘭原生種間 matK 部份核苷酸序列比較分析，其相似度介於 91.1 至 99.7% 之間 (表 3)，顯示石斛蘭原生種間 matK 核酸序列具有相當高的保守性，其中細莖石斛具有最大的差異性，與其他石斛平均相似度為 91.0%；相似度最高的為三星石斛與連珠石斛，其相似度達 99.7%，二者均為連珠石斛屬，在傳統分類學上被認為與石斛蘭屬的親緣較遠 (Schelpe & Stewart 1995; Lavarack *et al.* 2000)。將 14 種石斛蘭原生種的 matK 部分序列於 DNASTAR 軟體中，依照 Hein 的方法 (Hein 2001) 進行親緣關係分析，可以將 14 種石斛蘭原生種分為 4 群，其中三星石斛及連珠石斛被分為一群，其遺傳距離為 0.003，白花石斛、紅鸚石斛、長距石斛、紅花石斛、及燕石斛為第二群，其遺傳距離介於 0.020–0.012 之間。扁石斛、大雙花石斛、流蘇石斛、鞭尾石斛、鵠石斛及取自印尼之菲律賓燕石斛為第三群，此群的相似度較小，遺傳距離介於 0.038–0.016 之間，而細莖石斛因為缺失變異較多，與其他種石斛蘭的遺傳距離介於 0.089–0.074 之間，和其他參試石斛蘭種的差異最大，故被單獨歸類成一群 (圖 3)。

討 論

在傳統分類上，石斛蘭屬植物可以分為 *Athecebiium*、*Dendrobium*、*Rhopalobium*、*Xerobium* 等 4 個亞屬 (Schelep 1995)。台灣的原生石斛蘭列名其中的有 6 種，分別是屬於 *Dendrobium* 亞屬的白花石斛、櫻石斛、紅鸚石斛、金草石斛及紅花石斛以及 *Rhopalobium* 亞屬的鵠石斛。依據「中國蘭花全書」之記載，

可以將台灣原生石斛蘭分為石斛、暫花蘭及連珠石斛等 3 屬 (Chen & Tsi 1998)，在石斛屬下，再分為禾葉節 (*Grastidium*；大雙花石斛、小雙花石斛、細莖石斛等 3 種)，基腫石斛節 (*Dendrobium*；燕石斛與鵠石斛等 2 種)，大花石斛節 (*Eugenanthe*；長距石斛、紅花石斛、白花石斛、黃花石斛、紅鸚石斛、金草石斛及櫻石斛等 7 種)。就 Schelep 和 Chen & Tsi 等兩學者的分類方式，鵠石斛應被歸類為 *Rhopalobium* 亞屬或 *Dendrobium* 節，若依據植物外部特徵進行分類時往往有爭議之處。

DNA 序列於分類上之應用，主要是依據核苷酸的取代 (substitution)、重組 (rearrangements) 以及插入 (insertion)/缺失 (deletion) 等變異方式進行計算來評估不同樣品間的差異性。在這些變異中，插入與缺失事件常發生在非解碼區域，常被應用於譜系及演化傾向的解釋上 (Hilu & Alice 1999)。而 matK 基因為編碼區域快速演化的代表基因 (Olmstead & Palmer 1994)，其演化速率為葉綠體另一常被使用於演化與親緣分析之 *rbcL* 基因的 2–3 倍 (Steele & Vilgalys 1994; Plunkett *et al.* 1997; Johnson & Soltis 1994)，因此適合用於種或屬間的演化與親緣關係之界定。本研究利用 14 個石斛蘭原生種間 matK 基因部分序列進行親緣關係分析，可將參試石斛蘭原生種區分為 4 群 (圖 3)，其中三星石斛及連珠石斛在傳統的分類中被歸為連珠石斛屬 (*Epigeneium*) (Schelpe & Stewart 1995; Lavarack *et al.* 2000)，本研究之數據亦印證此論點，將此兩種石斛歸為同一群。白花石斛、紅鸚石斛、長距石斛、紅花石斛、及燕石斛被分為第二群，此群石斛在傳統分類上除了燕石斛外，其餘均被歸分為大花石斛節 (*Eugenanthe*) (Tsi *et al.* 1999)，此在以 matK 基因部份核苷酸序列為基礎之分子層次分類與傳統形態分類亦相符合。另外，扁石斛、大雙花石斛、流蘇石斛、鞭尾石斛、鵠石斛及取自印尼之菲

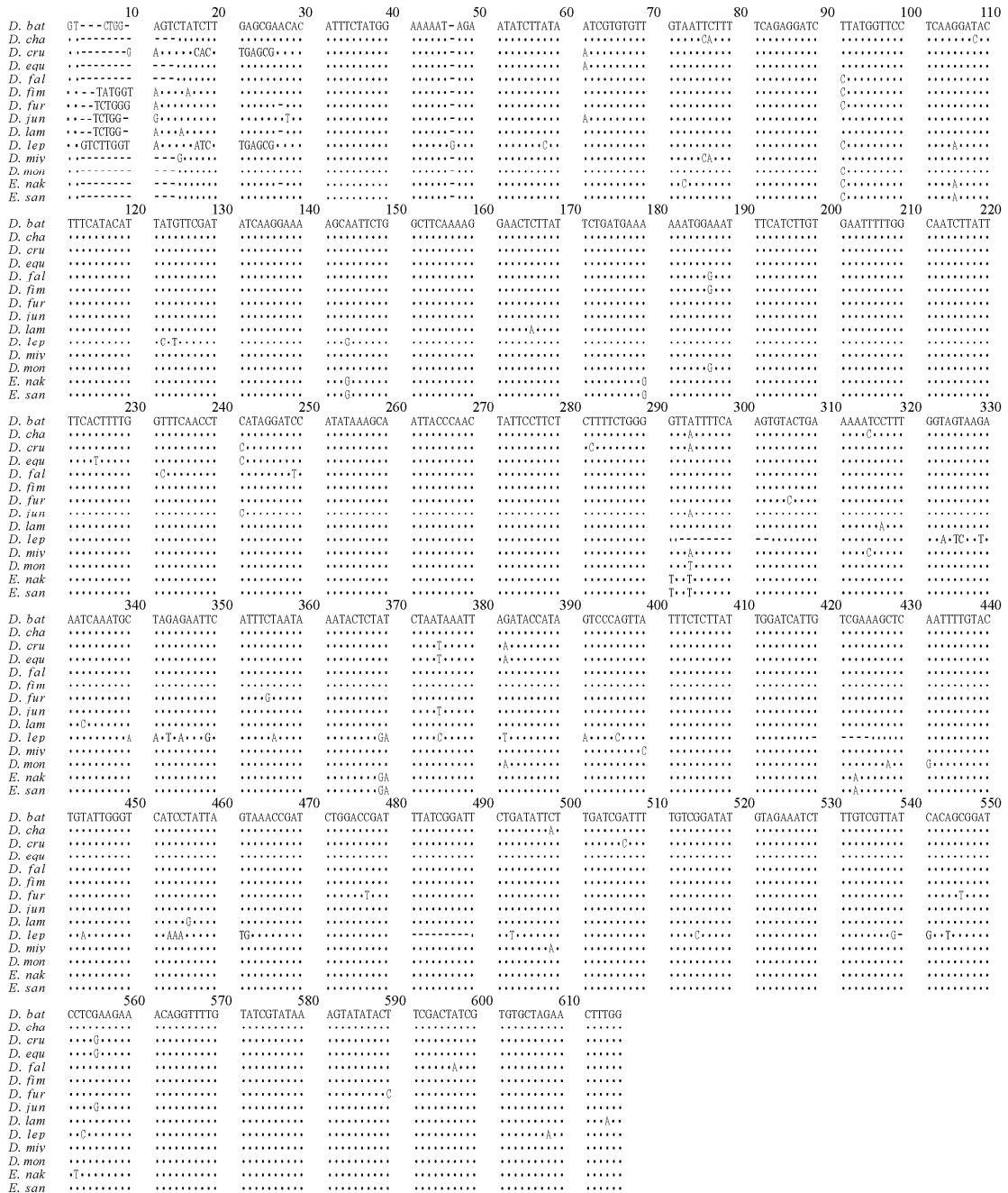


圖 2. 14 個蘭花種間之 matK 基因部份 DNA 序列比較。

Fig. 2. Sequences Comparison of matK gene sequence of 14 species of orchids (12 *Dendrobium* and 2 *Epigeneium*). [Abbreviations for the 14 *Dendrobium* species are shown in Table 1. Dots (·) indicate the same nucleotides and dashes (-) were introduced to maximize homology.]

表 3. 14 個石斛蘭種之 matK 序列遺傳相似度

Table 3. Similarities of the matK gene sequences among the 14 species of orchids (12 *Dendrobium* and 2 *Epigeneium*)

	<i>D. bat</i>	<i>D. cha</i>	<i>D. cru</i>	<i>D. equ</i>	<i>D. fal</i>	<i>D. fim</i>	<i>D. fur</i>	<i>D. jun</i>	<i>D. lam</i>	<i>D. lep</i>	<i>D. miy</i>	<i>D. mon</i>	<i>E. nak</i>	<i>E. san</i>
<i>D. bat</i>	100.0													
<i>D. cha</i>	98.0	100.0												
<i>D. cru</i>	97.5	96.5	100.0											
<i>D. equ</i>	99.0	98.0	97.9	100.0										
<i>D. fal</i>	98.2	98.2	96.4	98.2	100.0									
<i>D. fim</i>	98.4	98.5	96.6	98.5	99.3	100.0								
<i>D. fur</i>	97.7	98.0	96.2	98.0	98.5	98.5	100.0							
<i>D. jun</i>	99.2	98.3	97.7	99.3	98.2	98.2	97.9	100.0						
<i>D. lam</i>	97.7	98.0	96.2	98.0	98.2	98.4	98.0	97.9	100.0					
<i>D. lep</i>	91.3	91.6	92.6	91.7	91.9	92.0	91.3	91.3	91.1	100.0				
<i>D. miy</i>	97.9	99.5	96.4	97.9	98.0	98.3	97.8	98.2	97.8	91.4	100.0			
<i>D. mon</i>	97.9	98.2	96.7	98.3	98.8	99.2	98.3	98.2	98.0	92.1	98.0	100.0		
<i>E. nak</i>	97.0	97.4	95.5	97.2	97.7	98.0	97.5	97.4	97.2	92.6	97.2	97.9	100.0	
<i>E. san</i>	97.4	97.7	95.9	97.5	98.0	98.3	97.8	97.7	97.5	92.9	97.5	98.2	99.7	100.0

律賓燕石斛等被歸分為第三群，這一群的物種相似度較小，遺傳距離較其他群為高，顯示在此群體中各個體間的差異性大。而細莖石斛因其花朵嬌小（約 1 cm），葉形細長如禾草，明顯與其他石斛蘭不同，在傳統的分類中被歸為石斛蘭屬之禾葉節 (*Grastidium*) (Tsi *et al.* 1999)

甚至將其獨立成 *Grastidium* 屬 (Lavarack *et al.* 2000)。本研究之結果亦顯示應將細莖石斛單獨區分為一群，因其 matK 部分基因序列中包含有較多的缺失變異，造成與其他石斛蘭原生種之差異性大，此結果與 RAPD (Lee 2002) 及 ITS 分析結果 (Tsai *et al.* 2004) 亦相符合。

此外，連珠石斛屬 (*Epigeneium*) 中的連珠石斛，其分類地位曾有學者認為應該合併在石斛蘭屬 (*Dendrobium*)，並將學名更正為 *Dendrobium nakaharai* (Lin 1975)，但近年來許多學者則將其獨立為連珠石斛屬 (*Epigeneium*) (Tsi *et al.* 1999; Lavarack *et al.* 2000; Tsai *et al.* 2004)。本研究結果顯示，連珠石斛屬的三星石斛及連珠石斛兩者間的相似度高達 99.7%，且與其他合併比較時，其 matK 序列之相似度較石斛蘭屬的扁石斛、大雙花、流蘇石斛、菲律賓燕石斛、鞭尾石斛、鵠石斛及細莖石斛更接近其他參試的石斛蘭屬材料。由於石斛蘭原生種有 1000 種以上，在屬 (genus) 以下有亞屬 (sub-genus)、節 (section)、群 (group) 等之區分，到目前為止，種 (species) 的分類歸屬，往往因為學者觀點的不同而改變其分類地位。利

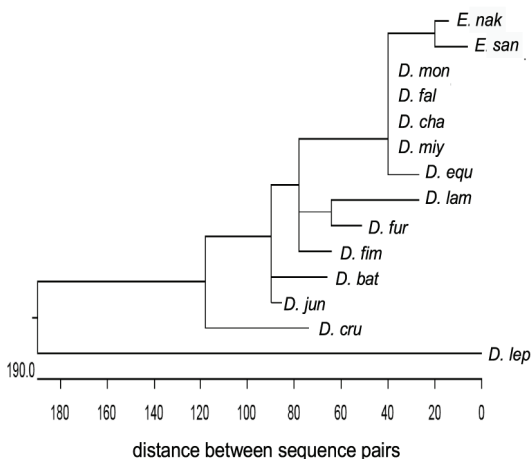


圖 3. 以 matK 基因序列為基礎之 14 個石斛蘭種間親緣分析圖。

Fig. 3. The dendrogram of the 14 species of orchids (12 *Dendrobium* and 2 *Epigeneium*) constructed from sequence of matK gene.

用 *matK* 基因核苷酸序列做為石斛蘭屬的分類依據，可簡易的將各個種類區分開，特別是在石斛蘭不同節的分類上。然而許多學者主張獨立為連珠石斛屬 (*Epigeneium*) 的三星石斛及連珠石斛之分類觀點上，本研究實驗數據支持將其合併至石斛蘭屬，此結果雖與目前許多學者的認知不同，卻是利用 *matK* 序列分析所得之分子證據。然而單獨使用一個分子特徵作為分類依據容易偏頗，若能在進行分類研究的同時，利用多項植物之特性，包含不同種類的分子標誌及外部形態特徵等特性進行綜合判別分類，或可給連珠石斛屬 (*Epigeneium*) 的分類地位給予更客觀之評估。

引用文獻 (Literature cited)

- Bodyl, A. 1999. Evolutionary pathway of the apicomplexan plastids and its implications. *Microbiology* 7:266–267.
- Chen, S. C. and Z. H. Tsi. 1998. The Orchids of China. Flora Reipublicae Popularis Sinica. Tomus 19. Science Press. Beijing. 356 pp. (in Chinese)
- Delwiche, C. F. and J. D. Palmer. 1996. Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco gene in eubacteria and plastids. *Mol. Biol. Evol.* 13:873–882.
- Hein, J. 2001. An algorithm for statistical alignment of sequences related by a binary tree. *Pac. Symp. Biocomput.* 6:179–190.
- Hilu, K. W. and L. A. Alice. 1999. Evolutionary implications of *matK* indels in Poaceae. *Am. J. Bot.* 86:1735–1741.
- Hilu, K. W. and H. Liang. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *Am. J. Bot.* 84:830–839.
- Howe, C. J. 1996. RNA polymerases and plastid evolution. *Trends Plant Sci.* 1:323–324.
- Johnson, L. A. and D. E. Soltis. 1994. *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae *sensu stricto*. *Syst. Bot.* 19:143–156.
- Kamemoto, H., T. D. Amore, and A. R. Kuehnle. 1999. Breeding *Dendrobium* Orchids in Hawaii. Hawaii Univ. Press. Honolulu. 163 pp.
- Lavarack, P., G. Stocker, and W. Harris. 2000. *Dendrobium* and its Relatives. Timber Press. Portland, Oregon. 287 pp.
- Lee, S. P. 2002. Identification of Native *Dendrobium* Species by Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers. Master Thesis. Dept. Hortic., Natl. Chung Hsing Univ. 106 pp.
- Lee, W. L., Y. S. Teng, and R. Q. Lin. 2007. Using RAPD markers to study genetic variation among Lychee Cultivars. *J. Taiwan Agric. Res.* 56(4):281–288 (in Chinese with English abstract)
- Li, S. Z. 2007. Illustration of Compendium of Chinese Materia Medica. Shaanxi Normal Univ. Press. 670 pp.
- Lin, T. P. 1975. Native Orchids of Taiwan. vol. 1 Dept. Bot., Natl. Taiwan Univ. Taipei. 355 pp.
- Margulis, L. and R. Obar. 1985. *Heliobacterium* and the origin of chrysochloroplasts. *Biosystems* 17:317–325.
- Martin, W., B. Stoebe, V. Goremykin, S. Hansmann, M. Hasegawa, and K. V. Kowallik. 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393:162–165.
- Neuhaus, H. and G. Link. 1987. The chloroplast *trnA^{bs}*(UUU) gene from mustard (*Sinapsis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Curr. Genet.* 11:251–257.
- Olmstead, R. G. and J. D. Palmer. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *Am. J. Bot.* 81:1205–1224.
- Plunkett, G. M., D. E. Soltis, and P. S. Soltis. 1997. Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *matK* and *rbcL* sequence data. *Am. J. Bot.* 84:565–580.
- Raven, P. H. 1970. A multiple origin for plastids and mitochondria. *Science* 169:641–646.
- Sang, T., D. J. Crawford, and T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84:1120–1136.
- Schelpe, S. and J. Stewart. 1995. *Dendrobiums*-an Introduction to the Species in Cultivation. Orchid Sundries Ltd. Stour Provost. Dorset. 115 pp.
- Steele, K. P. and R. Vilgalys. 1994. Phylogenetic analysis of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene *matK*. *Syst. Bot.* 19:126–142.
- Su, H. J., C. S. Leou, J. J. Chen, and C. Y. Hu. 2000. Orchidaceae. p.839–849. *in: Flora of Taiwan*, vol. 5. (Huang, T. C. *et al.* eds.) 2nd ed. Editioil Committee, Dept. Bot. NTU, Taipei, Taiwan.
- Tsai, C. C., C. I. Peng, S. C. Huang, P. L. Huang, and C. H.

- Chou. 2004. Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Sci. Hort.* 101:315–325.
- Tsi, Z. H., S. C. Chen, Y. B. Luo, and G. H. Zhu. 1999. Orchidaceae (3). p.485. *in*: Angiospermae, Monocotyledoneae, Flora Reipublicae Popularis Sinica. Tomus 19. (Tsi, Z. H., ed.) Science Press. Beijing. (in Chinese)
- Zerges, W. 2002. Does complexity constrain organelle evolution? *Trends Plant Sci.* 7:175–182.

Genetic Relationships of *Dendrobium* (Orchidaceae) Species Based on Chloroplast-matK Gene Sequences¹

Wen-Li Lee², Shough-Peng Lee^{2,5}, Kan-Shu Chen², Rong-Quey Lin²,
Tsung-Dao Liou², Ting-Eni Dai³, and Jen-Ping Chung⁴

Abstract

Lee, W. L., S. P. Lee, K. S. Chen, R. Q. Lin, T. D. Liou, T. E. Dai, and J. P. Chung. 2009. Genetic relationships of *Dendrobium* (Orchidaceae) species based on Chloroplast-matK gene sequences. *J. Taiwan Agric. Res.* 58:61–71.

Dendrobium is an important genus of Orchidaceae, especially in Asia. In this study, chloroplast-matK sequences were used to identify genetic relationships of *Dendrobium* species. Results showed a high degree of similarity (91.1 to 99.7%) among different *Dendrobium* species tested, indicating that the matK gene sequences are highly conservative in *Dendrobium*. Similarity in *D. leptocladum* is 91.0% which is the most different from others *Dendrobium* species examined. *Epigeneium san* and *E. nak* had the highest similarity of 99.7% and, they were separated from the genus *Dendrobium*. Based on aligned sequences of matK regions, the 14 *Dendrobium* species were divided into four main groups with the genetic distance of 0.003 for group 1; 0.020–0.012 for group 2; 0.038–0.016 for group 3 and 0.089–0.074 in *D. leptocladum* for group 4. *D. leptocladum* is a group high genetic divergence due to mass deletion of its matK sequences through mutation and it is a native species in Taiwan.

Key words: *Dendrobium*, Chloroplast, matK gene, Genetic relationships, Phylogenetic analysis.

-
1. Contribution No.2347 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: January 23, 2009.
 2. Respectively, Assistant Horticulturist, Assistant Horticulturist, Horticulturist and Director, Associate Horticulturist and Head, and Late Horticulturist and Director, TARI, FengShan, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
 3. Associate Horticulturist and Head, Floriculture Research Center, TARI, Gukeng, Yunlin, Taiwan, ROC.
 4. Assistant Professor, Mingdao University, Peetow, ChangHua, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, e-mail: shoughpeng@fthes-tari.gov.tw; Fax: (07)7315590.