

藉由分析核糖體核酸內轉錄間隔區探討台灣原生杜鵑種原之親緣關係

蔡奇助¹、黃柄龍¹

摘 要

本研究藉由分析核糖體核酸(ribosomal DNA, rDNA)內轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)之序列,以探討台灣 20 種原生杜鵑的親緣關係。將 20 種台灣原生杜鵑的 ITS 序列進行比較排列後發現,在 ITS1 區域有 37 個變異處,在 ITS2 區域有 35 個變異處。以 Kimura 2-parameters 換算物種兩兩間的遺傳距離(genetic distance),發現這 20 種杜鵑間的遺傳距離介於 0-0.062 間。經不加權平均重法(unweighted pair-group method analysis, UPGMA)進行群叢分析,並完成親緣關係樹狀圖(phylogenetic tree)。根據樹狀圖所呈現之物種間的親緣關係,台灣的原生杜鵑主要可以分成六群,其中埔里杜鵑(*R. lasiostylum*)、紅毛杜鵑(*R. rubropilosum*)、烏來杜鵑(*R. kanehirai*)、南澳杜鵑(*R. breviperulatum*)、金毛杜鵑(*R. oldhamii*)、細葉杜鵑(*R. noriakianum*)、中原氏杜鵑(*R. nakaharai*)、台灣高山杜鵑(*R. taiwanalpinum*)、大屯杜鵑(*R. longiperulatum*)與唐杜鵑(*R. simsii*)歸於第一群;長卵葉馬銀花(*R. lamprophyllum*)與馬銀花(*R. ovatum*)歸在第二群;南湖杜鵑(*R. hyperythrum*)、森氏杜鵑(*R. morri*)、台灣杜鵑(*R. formosanum*)及玉山杜鵑(*R. pseudochrysanthum*)與紅星杜鵑(*R. rubropunctatum*)歸在第三群。此外,西施花、黃花杜鵑及守城滿山紅則分別自成一類。上述 ITS 序列所得的親緣關係與目前台灣原生杜鵑所歸屬的系統分類進一步比較,發現在亞屬及節的層次皆很相符。

關鍵字: 杜鵑花、親緣關係、核糖體核酸、內轉錄間隔區

前 言

杜鵑花屬(Subgenus *Rhododendron*)為杜鵑花科(Ericaceae)植物,是一種被廣泛被栽培與育種的重要園藝觀賞花卉(Kron *et al.*, 1993)。截至 1976 年為止,已有超過一千種的人工雜交杜鵑品種被培育出來(Beane, 1976)。全球約有 900 種原生種,主要分佈於歐、亞及北美三大洲。亞洲為主要的產區,

¹ 行政院農業委員會高雄區農業改良場副研究員及助理研究員

其中以中國大陸西南各省產量最為豐富，計約有 530 餘種。杜鵑除了供園藝觀賞外，亦可做為葯用、提煉香油、手工藝品等(馮及俞, 1988)。

台灣地區的杜鵑花分佈廣泛，從低海拔至高海拔皆有分佈。依花序、花色、葉形、葉質及花或葉的附屬物等傳統外部特徵區分為 19 種(劉等人, 1988)。後來呂及楊(1989)主張將埔里杜鵑處理為南澳杜鵑的同物異名；森氏杜鵑及紅星杜鵑處理為玉山杜鵑的同物異名；大屯杜鵑及中原氏杜鵑處理為唐杜鵑的同物異名；台灣高山杜鵑處理為紅毛杜鵑的同物異名。因此認為台灣原生杜鵑僅有 14 種及一個疑問種。

雖然外部形態、胚胎、比較解剖及化學分類等特徵已被廣泛應用於杜鵑花科的分類及親緣研究上(Kron *et al.*, 1999)，不過由於外部形態容易受到環境因子的影響而改變(Iqbal *et al.*, 1995)。近年來，由於分子生物學急速的發展，DNA 分析已被廣泛應用於族群遺傳、演化、種原歧異度、純度及品種鑑定上。在 DNA 的分析中，目前最被廣為應用的是聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)技術，由於此技術具快速、專一性、靈敏性高且易於操作等優點，因此很適合被用來解決許多生物學相關的問題。PCR 的反應中，需於欲複製的 DNA 片段兩端各設計一條引子(primer)，在反應管中加入四種 deoxynucleoside triphosphate(dATP, dCTP, dGTP 及 dTTP)，與微量的 DNA 當模板，在有適當的鹽及緩衝液下，DNA 聚合酵素可以進行聚合反應。隨著溫度循環，模板 DNA 兩股煉解(denature)、引子煉合(annealing)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(Arnheim and Erlich, 1992)。

在 DNA 分析上，為了得到較佳的分析結果，會依照所要分析的目標分類群的階層不同而分析不同的 DNA 片段。核糖體核酸(ribosomal DNA, rDNA)是目前廣泛被分析的 DNA 區域，它普遍存在於真核細胞中，是一群成縱線排列(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)(Appels *et al.*, 1980; Kato *et al.*, 1990; Waldron *et al.*, 1983)。由於受到不等重組(unequal recombination)和基因轉變(gene conversion)的調控(Beech *et al.*, 1993)，各個重複單位間皆能保持相似性。每個 rDNA 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)。在 rDNA 之序列結構中，18S、5.8S 和 26S rRNA 基因區中之序列在演化過程中變化較慢，因此適合應用於高分類階層演化方面的研究，其中由於 18S rRNA 基因區域的序列長度適中，因此已有相當多

的研究被報導(review in Pace *et al.* 1989)。反之，由於 rDNA 之 ITS 和 IGS 的區域在不同物種間之長度及序列上常有很大變異(D'Ovidio, 1992)，因此，目前已有相當多的研究利用 ITS 區域進行種原親緣關係分析(review in 王等人,1999)。在杜鵑花方面的研究，也曾採用 ITS 區域進行杜鵑花屬內 *Pentanthera* 節(section)遺傳關係的評估(Scheiber *et al.*, 2000)。

本研究利用 PCR 技術，將台灣所產的原生杜鵑 rDNA 之 ITS 區域加以選殖並定序，以探討台灣杜鵑的遺傳距離及親緣關係，供未來評估杜鵑種原歧異度及育種參考。

材料與方法

一、材料

本研究以 20 種台灣原生杜鵑為材料(表 1)，並以同為杜鵑花科的高山白株樹(*Gaultheria itoana*)為外群進行分析。

二、方法

(一)DNA 之抽取

依 Shure 等人(1983)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 260nm 紫外光吸光度，定量 DNA 後，存於-20°C 中備用。

(二)PCR 反應

PCR 的引子參考蔡等人(1999)，反應內容物及濃度如下：10mM Tris-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01%(w/v) gelatin, 0.2mM dATP, 0.2mM dGTP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dTTP 與 IT1 及 IT2 引子各 0.5μM，最後加入 10ng 的模板 DNA，加無菌水將總體積補成 50μl，置於 0.6ml 的微量離心管，再於溶液表面加入 50μl 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°C 反應 10 分鐘，然後加 1.25 units 的 Taq DNA 聚合酵素(Amersham)，接下來溫度及時間如下，94°C 反應 45 秒，58°C 反應 45 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，54°C 反應 45 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，在紫外燈下觀察、照相。

表 1. 20 種台灣原生杜鵑的名稱、系統分類、ITS 序列長度及基因庫中的序列代號
Table 1. A list of 20 taxa of *Rhododendron* spp. used, systematic classification, ITS length, and accession numbers.

代號 Abbreviations	物種及系統分類 species and classification ^a	中文名稱 chinese name	ITS 長度 ITS length (bp)	序列代號 Accession number in GenBank
Subgenus <i>Hymenantes</i> Section <i>Ponticum</i>				
<i>R. for</i>	<i>R. formosanum</i>	台灣杜鵑	642	AF285854
<i>R. hyp</i>	<i>R. hyperythrum</i>	南湖杜鵑	642	AF432426
<i>R. mor</i>	<i>R. morri</i>	森氏杜鵑	642	AF432422
<i>R. pse</i>	<i>R. pseudochrysanthum</i>	玉山杜鵑	642	AF432424
<i>R. rub</i>	<i>R. rubropunctatum</i>	紅星杜鵑	642	AF285842
Subgenus <i>Tsutsusi</i> Section <i>Tsutsusi</i>				
<i>R. bre</i>	<i>R. breviperulatum</i>	南澳杜鵑	643	AF432425
<i>R. kan</i>	<i>R. kanehirai</i>	烏來杜鵑	643	AF172290
<i>R. las</i>	<i>R. lasiostylum</i>	埔里杜鵑	643	AF285845
<i>R. lon</i>	<i>R. longiperulatum</i>	大屯杜鵑	643	AF285847
<i>R. nak</i>	<i>R. nakaharai</i>	中原氏杜鵑	643	AF285846
<i>R. nor</i>	<i>R. noriakianum</i>	細葉杜鵑	643	AF285856
<i>R. old</i>	<i>R. oldhamii</i>	金毛杜鵑	643	AF285843
<i>R. rubro</i>	<i>R. rubropilosum</i>	紅毛杜鵑	643	AF285849
<i>R. sim</i>	<i>R. simsii</i>	唐杜鵑	643	AF285848
<i>R. tai</i>	<i>R. taiwanalpinum</i>	台灣高山杜鵑	643	AF432479
Section <i>Brachycalyx</i>				
<i>R. mar</i>	<i>R. mariesii</i>	守城滿山紅	643	AF285844
Subgenus <i>Azaleastrum</i> Section <i>Azaleastrum</i>				
<i>R. lam</i>	<i>R. lamprophyllum</i>	長卵葉馬銀花	643	AF285855
<i>R. ova</i>	<i>R. ovatum</i>	馬銀花	643	AF432421
Section <i>Choniastrum</i>				
<i>R. ell</i>	<i>R. ellipticum</i>	西施花	643	AF285841
Subgenus <i>Rhododendron</i> Section <i>Vireya</i>				
<i>R. kaw</i>	<i>R. kawakamii</i>	黃花杜鵑	648	AF432450

^a:依據 Yang et al(1999)之系統分類

(三)Glass milk 回收 DNA

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)，用解剖刀將上述 DNA 條帶切下，置入 1.5ml 微量離心管中，每 100mg 的膠塊加入 500 μl

Nal solution(6M 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(Geneclean Kit II, BIO 101)(DNA 量在 5 μ g 以下, 加入 5 μ l 的 Glass milk, 每增加 1 μ g, 須增加 1 μ l 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 μ l 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 10,000rpm 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) 序列分析

回收的 DNA 以 PCR 所用的引子為讀序引子, 經由 dideoxy chain-termination 法, 以 ABI377 自動讀序儀進行非放射線標定讀序。每一樣本經由兩次或三次的重複確認序列。上述序列反應委託廠商代為行之, 讀序反應的步驟依據藥品商所建議的標準步驟行之。

(五) 資料分析

樣本兩兩間的遺傳距離(genetic distance)以 Kimura 2-parameters 為之(Kimura, 1980), 再經由 MEGA version 2.1 套裝軟體(Kumar *et al.*, 2001), 以不加權平均重法(unweighted pair-group method analysis, UPGMA)(Rohlf *et al.*, 1982)完成樹狀圖。

結果與討論

本研究所使用的引子, 以及 ITS1 及 ITS2 區域於 rDNA 所在的位置如圖 1。20 種杜鵑花及外群高山白株樹的 PCR 產物經電泳分離後, 呈現單一條帶, 此顯示每一種的 ITS 重複單位(repeat unit)的長度皆一致。因此後續的序列分析可以由 PCR 產物直接進行讀序。經序列分析後, 送入基因庫進行比對, 確實為杜鵑花的 ITS 區域, 其中有 70bp 的 26S rDNA 區域; 43bp 的 18S rDNA 區域。20 種杜鵑花的 ITS 區域長度介於 642-648bp 間, 其中 5.8S rDNA 區域各物種皆為 164bp, ITS1 區域介於 253-255bp 間; ITS2 區域介於 225-229bp 間。上述 21 個分類群的 ITS1 及 ITS2 序列經排列後, 總計有 493 個特徵。就 20 種杜鵑間的比較, 在 ITS1 區域中有 37 個鹼基對具多型性; 在 ITS2 區域中有 35 個鹼基對具多型性(圖 2)。總計可以發現 72 個變異處, 此結果明顯高於 Scheiber *et al.*(2000)利用 ITS 進行杜鵑花的分析(38 個變異處)。不過由於 Scheiber *et al.*(2000)是針對 *Pentanthera* 節內的 15 種及一個不同節外群杜鵑花進行分析。然而, 本研究的台灣原生杜鵑花之物種分別屬於四個不同的亞屬, 因此可以得到較多的鹼基對變異處。

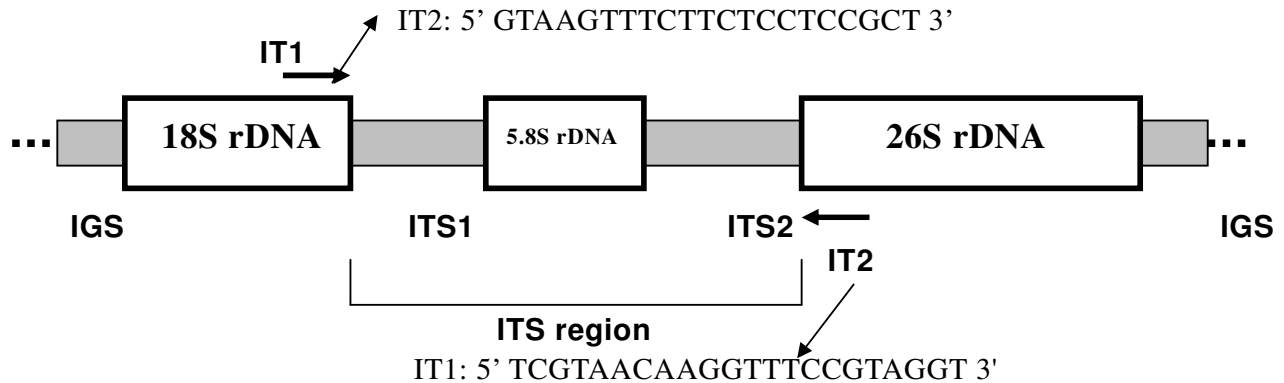


圖 1. rDNA 的基本結構，及 PCR 複製核糖體核酸基因間隔區(ITS)時引子所在位置。
 Fig. 1. The structure of ribosomal DNA of higher plants. The positions of internal transcribed spacer(ITS)regions relative to 18S, 5.8S and 26S rDNA, and the intergenic spacer(IGS). Corresponding positions of primers(IT1 and IT2)used for PCR and sequencing.

ITS1		10	20	30	40	50	60	70	80	90
R. for	-TCGAAACCT	GCCAACAAGC	AGAAAACGTG	CGAACTTGTC	T--AATACAG	TGGGGAATGC	GTGGGTTGGG	GCCTCGTT--	ATCITTCCTT	
R. hyp	-.....T..	
R. mor	-.....T..	
R. pse	-.....T..	
R. rub	-.....T..	
R. bre	-.....T..T..	C...C....	
R. kan	-.....T..T..	C...C....	
R. las	-.....T..T..	C...C....	
R. lon	-.....T..T..	C...C....	
R. nak	-.....T..T..	C...C....	
R. nor	-.....T..T..	C...C....	
R. old	-.....T..T..	C...C....	
R. rubro	-.....T..T..	C...C....	
R. sim	-.....T..T..	C...C....	
R. tai	-.....T..T..	C...C....	
R. mar	-.....T..	A-T..	C.....	
R. lam	-.....	T.....	T.....	C.....	G-...G...	T.....T..	C.....	
R. ova	-.....	T.....	T.....	C.....	A-...AG...	T.....T..	C.....	
R. ell	-.....T..T..	C.....	
R. kaw	-T.....T..	T-...G..AT..	C.....	
G. ito	T.GA.....ACC.	A	AT.C.TTC	G..A.G...TT..	...CA...GC	C..GCC....	
		100	110	120	130	140	150	160	170	180
R. for	CCGCTTTCCC	CTCGCGAGTA	GATGTTTCGG	GAGCTTTCGG	GCAACGTGTT	CATTT-ACTT	GTCAAACAA-	CGAACCCCGG	CGCAAAACGC	
R. hypG.....	.G....	
R. morG.....	.G....	
R. pseG.....	.G....	
R. rubG.....	.G....	
R. breG.....	.G....T.AG....	
R. kanG.....	.G....T.AG....	
R. lasG.....	.G....T.AG....	

R. lonG.....G....T.AG.....
 R. nakG.....G....T.AG.....
 R. norG.....G....T.AG.....
 R. oldG.....G....T.AG.....
 R. rubroG.....G....T.AG.....
 R. simG.....G....T.AG.....
 R. taiG.....G....T.AG.....
 R. marG.....G....T.AG.....
 R. lamG.....TT.....G.....
 R. ovaG.....TT.....G.....
 R. ellG.....G..T.....T.....A.....
 R. kawG.....T.....T.....G.....T.....
 G. ito ..AT.....C.....CG.A..GC..C...G....C. TTG..TG.....

ITS2

190 200 210 220 230 240 250 260 270
 R. for GCCAAGGATA A-TTGAACAA AGTTTGTGCA CGTCCCTGCG CCGTTTCCGG GTGGTGTGG CGTGCACA-T CTTTCGAATA ACATTGCGTC
 R. hypT.....
 R. morT.....
 R. pseT.....
 R. rubT.....
 R. bre-A......C.....TT.....T.....
 R. kanC.....TT.....T.....
 R. lasC.....TT.....T.....
 R. lonC.....TT.....T.....
 R. nakC.....TT.....T.....
 R. norC.....TT.....T.....
 R. oldC.....TT.....T.....
 R. rubro-A......C.....TT.....T.....
 R. sim-T......C.....TT.....T.....
 R. taiC.....TT.....T.....
 R. marG......C.....TT.....T.....
 R. lamC.....T......C.....
 R. ovaG......C.....T......C.....
 R. ellC.....T.....T.....
 R. kawTT.....T.....
 G. itoA..A......A--.C.....TGC..GT...T.....A.G..A.....AT.....

280 290 300 310 320 330 340 350 360
 R. for ATCCAATCAC CCCGTGCCTC ATCGA-CGGG TAAGTGTGTG GCGGATATT GGCCCCCGT TCACATCCGT GCTCGGTGG CCTAAAAATG
 R. hypT.....C.....
 R. morT.....C.....
 R. pseT.....C.....
 R. rubT.....C.....
 R. bre G.....G-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. kan G.....G-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. las G.....G-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. lon G.....G-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. nak G.....G-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. nor G.....G-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. old G.....G-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. rubro G.....G-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. simG-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. taiG-.A......C.....G.....TG.....CC.....
 R. marG-AA......C.....T.....C.....
 R. lamG-.A......C.....T.....CC.....
 R. ovaG-.A......C.....T.....CC.....

R. ellG-.....C.....T.....C.....
R. kawG-.....C.....A.....T.....C.....
G. ito	.C.....A.GA.GG.AT.CCG...C.....C.....-A

	370	380	390	400	410	420	430	440	450
R. for	ACGGTCCCCG	ATGATGGACA	TCACGGCAAG	TGGTGGTTGC	CAAACCGTCG	CGTCATGTCG	TGCATGCCA-	TTCTTTGTCG	CGGG-CTGGC
R. hyp
R. mor
R. pse
R. rub	TT..-
R. breC.....G.....
R. kanC.....G.....
R. lasC.....G.....
R. lonC.....G.....
R. nakC.....T.....G.....
R. norC.....G.....
R. oldC.....G.....
R. rubroC.....G.....
R. simC.....G.....
R. taiC.....G.....
R. marC.....T.....
R. lamC.....G.....
R. ovaC.....G.....
R. ell	..A.....C.....GC.....T.....A.....
R. kawA.....A.....
G. ito	CG.....A.....C.....A.....CG.C.....T.....

	460	470	480	490
R. for	TCATCGACCC	TTAAGTACCA	TCAAC--TG	TGGTACCTCA ACT
R. hyp
R. mor
R. pse
R. rub
R. breAT.....C.....
R. kanAT.....C.....
R. lasAT.....C.....
R. lonAT.....C.....
R. nakT.....AT.....C.....
R. norAT.....C.....
R. oldT.....AT.....C.....
R. rubroAT.....C.....
R. simAT.....C.....
R. taiAT.....C.....
R. marT.....C.....
R. lam
R. ova
R. ellT.....T.....
R. kawG.....AAC.C.....
G. ito	C.....GG..G.....C.C.....

圖 2、比較 20 種台灣原生杜鵑及外群高山白株樹之核糖體核酸內轉錄間隔區(ITS1, 5.8S rRNA 基因, ITS2)之序列，代號見表 1。

Fig. 2. Sequence comparison of ITS1 and ITS2 regions from 20 taxa of genus *Rhododendron* and *G. itoana* in Taiwan. The abbreviations of *Rhododendron* species were shown in Table1. Dots(.) indicate the same nucleotides and gaps(-) are introduced to maximize homology.

將 20 個杜鵑及外群(*Gaultheria itoana*)的 ITS1 及 ITS2 序列進行編排，以 Kimura 2-parameters 方法進行換算，其兩兩樣本間的遺傳距離介於 0-0.204 間，其中 20 種杜鵑間的遺傳距離介於 0-0.062。外群與 20 種杜鵑間的遺傳距離較遠，介於 0.190-0.204(表 2)。根據樹狀圖所呈現之物種間的親緣關係，台灣的原生杜鵑主要可以分成六群，其中埔里杜鵑(*R. lasiostylum*)、紅毛杜鵑(*R. rubropilosum*)、烏來杜鵑(*R. kanehirai*)、南澳杜鵑(*R. breviperulatum*)、金毛杜鵑(*R. oldhamii*)、細葉杜鵑(*R. noriakianum*)、中原氏杜鵑(*R. nakaharai*)、台灣高山杜鵑(*R. taiwanalpinum*)、大屯杜鵑(*R. longiperulatum*)與唐杜鵑(*R. simsii*)歸於第一群；長卵葉馬銀花(*R. lamprophyllum*)與馬銀花(*R. ovatum*)歸在第二群；南湖杜鵑(*R. hyperythrum*)、森氏杜鵑(*R. morri*)、台灣杜鵑(*R. formosanum*)及玉山杜鵑(*R. pseudochrysanthum*)與紅星杜鵑(*R. rubropunctatum*)歸在第三群。此外，西施花(*R. ellipticum*)、黃花杜鵑(*R. kawakamii*)及守城滿山紅(*R. mariesii*)則分別自成一群，其中西施花與第二群較為接近，守城滿山紅與第一群較為接近(圖 3)。根據台灣杜鵑花屬的系統分類，這 20 種杜鵑花分屬於四個亞屬，其中黃花杜鵑為有鱗杜鵑花亞屬(subgenus *Rhododendron*)；長卵葉馬銀花、馬銀花及西施花則屬於杜鵑花亞屬(subgenus *Azaleastrum*)，其中除了西施花為 *Choniastrum* 節外，其它為杜鵑花節(section *Azaleastrum*)。另外，南湖杜鵑、森氏杜鵑、台灣杜鵑、玉山杜鵑與紅星杜鵑屬於無鱗杜鵑花亞屬(subgenus *Hymenanthes*)。埔里杜鵑、紅毛杜鵑、烏來杜鵑、南澳杜鵑、金毛杜鵑、細葉杜鵑、中原氏杜鵑、台灣高山杜鵑、大屯杜鵑、唐杜鵑與守城滿山紅屬於映山紅亞屬(subgenus *Tsutsusi*)，其中除了守城滿山紅為 *Brachycalyx* 節外，其它皆為 *Tsutsusi* 節(section *Tsutsusi*)(Yang *et al.*, 1999; He *et al.*, 1999)。本研究分析 rDNA 之 ITS 區域，支持上述四個杜鵑花屬內亞屬的系統分類，甚至在亞屬內各節(section)間亦頗符合(表 1 及圖 3)。

將 20 個原種杜鵑之 ITS 的序列進行比較，其中南湖杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑的序列完全一樣，且與紅星杜鵑極為相似。此結果支持呂及楊(1989)的研究，將上述四種處理為玉山杜鵑一種。黃及徐(2001)應用葉綠體 *trnF-trnL* 基因間的核酸序列分析八種台灣原生杜鵑，亦支持南湖杜鵑、森氏杜鵑、紅星杜鵑及玉山杜鵑極為相近。本研究也發現大葉喬木型的杜鵑以台灣杜鵑的變異最大，此也與黃及徐(2001)的研究相符。此外，細葉杜鵑與大屯杜鵑序列一樣；紅毛杜鵑與南澳杜鵑序列一樣；細葉杜鵑、大屯杜鵑及烏來杜鵑序列也完全一樣。由樹狀圖顯示，埔里杜鵑、紅毛杜鵑、烏來杜鵑、南澳杜鵑、金毛杜鵑、細葉杜鵑、中原氏杜鵑、台灣高山杜鵑、大屯杜鵑、

表2. 20種台灣原生杜鵑兩兩間的遺傳距離

Table 2. Genetic distances of ITS sequence among 20 species of genus *Rhododendron*.

	<i>R. for</i>	<i>R. hyp</i>	<i>R. mor</i>	<i>R. pse</i>	<i>R. rub</i>	<i>R. bre</i>	<i>R. kan</i>	<i>R. las</i>	<i>R. lon</i>	<i>R. nak</i>	<i>R. nor</i>	<i>R. old</i>	<i>R. rubro</i>	<i>R. sim</i>	<i>R. tai</i>	<i>R. mar</i>	<i>R. lam</i>	<i>R. ova</i>	<i>R. ell</i>	<i>R. kaw</i>	
<i>R. for</i>																					
<i>R. hyp</i>	0.013																				
<i>R. mor</i>	0.013	0.000																			
<i>R. pse</i>	0.013	0.000	0.000																		
<i>R. rub</i>	0.017	0.004	0.004	0.004																	
<i>R. bre</i>	0.059	0.050	0.050	0.050	0.054																
<i>R. kan</i>	0.057	0.048	0.048	0.048	0.052	0.002															
<i>R. las</i>	0.054	0.046	0.046	0.046	0.050	0.004	0.002														
<i>R. lon</i>	0.057	0.048	0.048	0.048	0.052	0.002	0.000	0.002													
<i>R. nak</i>	0.061	0.052	0.052	0.052	0.057	0.006	0.004	0.006	0.004												
<i>R. nor</i>	0.057	0.048	0.048	0.048	0.052	0.002	0.000	0.002	0.000	0.004											
<i>R. old</i>	0.059	0.050	0.050	0.050	0.055	0.004	0.002	0.004	0.002	0.002	0.002										
<i>R. rubro</i>	0.059	0.050	0.050	0.050	0.054	0.000	0.002	0.004	0.002	0.006	0.002	0.004									
<i>R. sim</i>	0.057	0.048	0.048	0.048	0.052	0.006	0.004	0.006	0.004	0.008	0.004	0.006	0.006								
<i>R. tai</i>	0.054	0.046	0.046	0.046	0.050	0.004	0.002	0.004	0.002	0.006	0.002	0.004	0.004	0.002							
<i>R. mar</i>	0.046	0.041	0.041	0.041	0.046	0.039	0.037	0.034	0.037	0.037	0.037	0.039	0.039	0.036	0.034						
<i>R. lam</i>	0.048	0.041	0.041	0.041	0.046	0.045	0.043	0.041	0.043	0.048	0.043	0.045	0.045	0.043	0.041	0.043					
<i>R. ova</i>	0.052	0.046	0.046	0.046	0.050	0.050	0.048	0.045	0.048	0.052	0.048	0.050	0.050	0.048	0.045	0.041	0.006				
<i>R. ell</i>	0.048	0.043	0.043	0.043	0.048	0.059	0.057	0.055	0.057	0.062	0.057	0.059	0.059	0.057	0.055	0.050	0.043	0.048			
<i>R. kaw</i>	0.043	0.039	0.039	0.039	0.043	0.052	0.050	0.048	0.050	0.054	0.050	0.052	0.052	0.050	0.048	0.045	0.043	0.047	0.050		
<i>G. ito</i>	0.193	0.196	0.196	0.196	0.201	0.195	0.193	0.196	0.193	0.198	0.193	0.196	0.195	0.192	0.190	0.195	0.201	0.204	0.202	0.203	

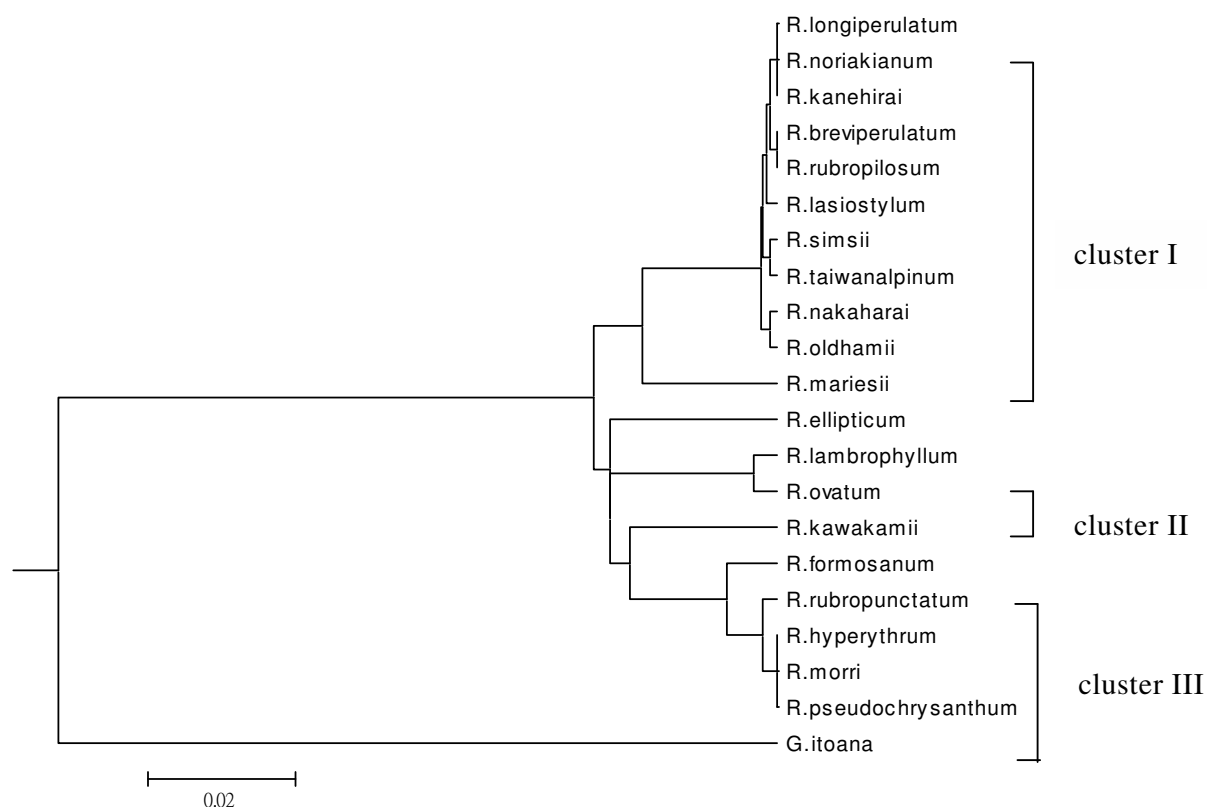


圖 3、20 種台灣原生杜鵑及外群高山白株樹的親緣關係樹狀圖。物種代號見表 1。
Fig. 3. A dendrogram of 20 species of genus *Rhododendron* in Taiwan obtained from sequence comparison of ITS region of rDNA. The abbreviations of *Rhododendron* species were shown in Table1.

唐杜鵑等十種極為相近。呂及楊(1989)將中原氏杜鵑、大屯杜鵑處理為唐杜鵑的同物異名；埔里杜鵑處理為南澳杜鵑的同物異名；台灣高山杜鵑處理為紅毛杜鵑的同物異名。經由本研究對台灣各種杜鵑之 ITS 的分析，並無法將上述 10 種屬於映山紅亞屬的小葉灌木型杜鵑做一明確的區分。可見這一群杜鵑在台灣的歧異度相當低，其在物種的界定尚有待更多的證據進一步分析。

參考文獻

1. 王建波、張文駒、陳家寬. 1999. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系統與進化研究中的應用. 植物分類學報. 37: 407-416.
2. 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.
3. 馮國楣、俞德浚. 1988. 中國杜鵑花第一冊. 科學出版社. pp. 1-8.
4. 黃士穎、徐國凱. 2001. 台灣林業科學. 16: 153-160.
5. 劉業經、呂福原、歐辰雄. 1988. 臺灣樹木誌. 國立中興大學農學院叢書。
6. 蔡奇助、蔡素蕙、黃勝忠. 1999. 台灣原生杜鵑核糖體核酸內轉錄間隔

- 區之選殖及分析. 台中區農業改良場研究彙報. 64: 13-26.
7. 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.
 8. Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 131-156.
 9. Bean, W. J. 1976. Trees and shrubs hardy in the British Isles III(N-Rh), 8th ed. John Murray, London.
 10. 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.
 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. He, M. Y., M. Y Fang, W. K. Hu and L. C. Hu. 1999. Ericaceae(2). In: Hu, L. C. and M. Y. Fang(eds.), *Angiospermae, Dicotyledoneae, Flora Reipublicae Popularis Sinica*. Tomus 57(2). Science Press, Beijing.
 13. Iqbal, J. M., D. W. Paden and A. L. Rayburn. 1995. Clonal stability of RAPD markers in three *Rhododendron* species. *J. Exp. Hort.* 13: 43-46.
 14. 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.
 15. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
 16. Kron, K. A. and M. W. Chase. 1993. Systematics of Ericaceae, Empetraceae, Epacridaceae, and related taxa upon rbcL sequence data. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 80: 735-741.
 17. Kron, K. A., W. S. Judd and D. M. Crayn. 1999. Phylogenetic analysis of Andromedeae(Ericaceae subfam. Vaccinioideae). *Am. J. Bot.* 86: 1290-1300.
 18. Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA 2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe.
 19. Pace, N. R., D. K. Smith, G. J. Olsen and B. D. James. 1989. Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA-a review. *Gene* 82: 65-75.
 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. Scheiber, S. M., R. L. Jarret, C. D. Robacker and M. Newman. 2000. Genetic relationships within *Rhododendron* L. section *Pentanthera* G. Don based on sequences of the internal transcribed spacer(ITS)region. *Sci. Hort.* 85: 123-135.
22. Shure, M., S. Wessler and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-233.
23. 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.
24. Yang, H. B., R. C. Fang and T. L. Chin. 1999. Ericaceae(1). In: Fang, RC(ed.), *Angiospermae, Dicotyledoneae, Flora Reipublicae Popularis Sinica*. Tomus 57(1). Science Press, Beijing.

The Genetic Relationship of *Rhododendron* (Ericaceae) in Taiwan Based on the Sequence of Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA

Chi-Chu Tsai and Ping-Long Huang¹

Abstract

Genetic relationship of 20 *Rhododendron* species in Taiwan was derived based on the sequence analysis of the internal transcribed spacer(ITS) region of ribosomal DNA. Sequences of complete ITS region, including ITS1, 5.8S rDNA, and ITS2, were obtained by direct sequencing of polymerase chain reaction(PCR)amplified fragments. *Gaultheria itoana* was used as outgroup. Aligned sequences of ITS1 and ITS2 from 21 taxa resulted in 493 characters. According to the dendrogram, six main clusters were generated among 20 species of genus *Rhododendron* in Taiwan. *R. hyperythrum*, *R. morri*, *R. formosanum*, and *R. pseudochrysanthum* are grouped with *R. rubropunctatum*; *R. lamprophyllum* are grouped with *R. ovatum*; *R. lasiostylum*, *R. rubropilosum*, *R. kanehirai*, *R. breviperulatum*, *R. oldhamii*, *R. noriakianum*, *R. nakaharai*, *R. taiwanalpinum*, and *R. longiperulatum* are grouped with *R. simsii*. In addition, *R. kawakamii*, *R. ellipticum* and *R. mariesii* are three independent clusters. Molecular data from ITS sequences in the present study is in agreement with traditional systematics of *Rhododendron*.

Key words: *Rhododendron*, genetic relationship, rDNA, ITS, PCR.

¹ Associate Researcher and Assistant Researcher, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, COA.