

# 應用 ISSR 分析蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*) 物種之遺傳歧異度<sup>1</sup>

沈雅鈞<sup>2</sup>、胡澤寬<sup>3</sup>、古新梅<sup>3</sup>

## 摘 要

本研究旨在探討蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*) 物種間之遺傳歧異度，針對 43 個蝴蝶蘭屬物種，以及外群臺灣香蘭 (*Haraella retrocalla* (Hayata) Kudô) 和名護蘭 (*Sedirea japonica* (L. Linden & Rchb. f.) Garay & H.R. Sweet) 為材料，以 12 個 ISSR (inter-simple sequent repeat) 分子標誌進行分析。結果共增幅出 270 個清晰且再現性良好之條帶，多型性比例占 100%，其中以 UBC834 產生 29 個條帶為最多。PIC (polymorphism information content) 與 Rp (resolving power) 的平均值分別為 0.3053 及 9.8060。Dice's coefficient 估算其遺傳相似度，再以 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 進行群聚分析，在相似度約 0.42 處可將物種區分成兩大群，約 0.44 處再分成第一與二類群，約 0.46 處再分為第三與四類群。本研究以 ISSR 分子標誌分析結果顯示蝴蝶蘭屬內物種間具有相當之遺傳歧異度，分群結果可說明物種間的親緣關係遠近，可提供蝴蝶蘭育種者在分子遺傳與輔助育種等相關工作之參考。

關鍵字：蝴蝶蘭屬、ISSR 分子標誌、遺傳歧異度

## 前 言

蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*，縮寫為 *Phal.*) 在植物學分類學上的地位為被子植物門 (Angiospermae)、單子葉植物綱 (Monocotyledoneae)、雌雄合蕊植物目 (Gynandreae)、蘭科 (Orchidaceae)、樹蘭亞科 (Epidendroideae)、萬代蘭族 (Vandae)、指甲蘭亞

---

<sup>1</sup> 行政院農業委員會桃園區農業改良場研究報告第 465 號。

<sup>2</sup> 桃園區農業改良場助理研究員。

<sup>3</sup> 國立中興大學農藝學系教授及教授(通訊作者，hmku@email.nchu.edu.tw)。

族 (*Aeridinae*) 之物種，其他同屬於萬代蘭族的物種尚有名護蘭屬 (*Sedirea*) 與香蘭屬 (*Haraella*) 等 (Dressler, 1993; Huang, 2014)。蝴蝶蘭屬原生物種約有 60 多個 (Sweet, 1980; Chritenson, 2001)，各具特色，花朵外觀因似蝴蝶而得名，是世界廣受歡迎的花卉種類之一，具有龐大的市場價值。但蝴蝶蘭屬物種幼年期長，如利用傳統型態特徵鑑定品種將會非常費時，且形態易受生理發育、環境因素及其複雜的交感作用影響，應用分子標誌於分類鑑定與遺傳變異分析較不受上述因子影響 (Jiang *et al.*, 2007; Chiou and Chiang, 2013)。理想的分子標誌應該要有足夠辨識遺傳變異、不需生物體基因組資訊、容易操作、低成本、高效率、且能產生大量清晰、具多型性及再現性的條帶，並最好能與外表型性狀有相關性 (Agarwal *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009)。ISSR 分子標誌為一種以微衛星序列 (microsatellite sequence) 進行 PCR 增幅的技術 (Zietkiewicz *et al.*, 1994)，由於微衛星序列廣泛分布在各種生物體基因組中，無需事先知道欲分析的物種基因組即可直接應用，且不同生物體間數量、重複次數、拷貝數及染色體分佈位置均有變異。因此，具有豐富之遺傳資訊，又因操作過程簡單、快速且高效率而被認為是研究遺傳歧異度、建立遺傳圖譜、基因定位等之良好工具 (Reddy *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2007)。Wang 等人 (2009) 以 ISSR 分子標誌分析 50 個不同春蘭 (*Cymbidium goeringii* Rchb.f.) 栽培種之分子歧異度及遺傳關係，認為其可作為品種鑑定之工具；Xie 等人 (2010) 應用在研究 24 個蝴蝶蘭屬栽培種之遺傳多樣性，獲得了豐富的多型性條帶；Pinheiro 等人 (2012) 應用於研究嘉德麗雅蘭屬 (*Cattleya*) 種間與種內的遺傳歧異度與族群結構；Feng *et al.* (2013) 應用在金釵石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 與細莖石斛 (*Dendrobium moniliforme* (L.) Swartz.) 初級遺傳圖譜建立等，顯示 ISSR 分子標誌可廣泛應用於各種蘭科植物遺傳方面之研究。

本試驗研究目的為利用 ISSR 分子標誌進行現有蝴蝶蘭屬原生物種遺傳歧異度之研究，以瞭解其遺傳變異情形，並評估 ISSR 分子標誌對蝴蝶蘭屬物種遺傳研究之能力，期能提供育種者在蝴蝶蘭屬種質資源蒐集、分子輔助選育、親緣關係及品種鑑定等遺傳研究方面之參考資訊。

## 材料與方法

### 一、植株材料

本研究使用 43 種蝴蝶蘭屬之物種，並以臺灣香蘭與名護蘭為外群，共計 101 株植株（表 1），分別由桃園區農業改良場、種苗繁殖改良場及自然科學博物館蒐集與提供。

表 1. 試驗使用之蝴蝶蘭屬與其他屬物種（分類參考 Christenson (2001) 所著）

Table 1. Species of *Phalaenopsis* and allied genera used in this study. (The classification was according to Christenson (2001))

Species	Code of collection	Numbers of sample	Institute of plant
<b>Subgenus <i>Proboscidioides</i></b>			
<i>Phalaenopsis lowii</i> Rchb. f.	49	1	D
<b>Subgenus <i>Aphyllae</i></b>			
<i>Phalaenopsis braceana</i> (J. D. Hook.) E. A. Christ.	16-18	3	A
<i>Phalaenopsis finleyi</i> (Seidenf.) E. A. Christ.	97	1	D
<b>Subgenus <i>Parishianae</i></b>			
<i>Phalaenopsis appendiculata</i> C. E. Carr	10	1	D
<i>Phalaenopsis lobbii</i> (Rchb.f.) Sweet	46-48	3	D
<i>Phalaenopsis malipoensis</i> Z.J.Liu & S.C.Chen	52-54	3	A
<i>Phalaenopsis parishii</i> Rchb. f.	67-69	3	D
<b>Subgenus <i>Polychilos</i></b>			
<b>Section <i>Polychilos</i></b>			
<i>Phalaenopsis borneënsis</i> Garay	96	1	D
<i>Phalaenopsis cornu-cervi</i> (Breda)Bl. & Rchb. f.	19-20	2	D
<i>Phalaenopsis cornu-cervi</i> var. <i>flava</i> Braem	21-23	3	B
<i>Phalaenopsis mannii</i> Rchb. f.	55-57	3	D
<i>Phalaenopsis pantherina</i> Rchb. f.	98	1	A
<b>Section <i>Fuscatae</i></b>			
<i>Phalaenopsis fuscata</i> Rchb. f.	31-33	3	B
<i>Phalaenopsis kunstleri</i> J. D. Hook.	42	1	D

Species	Code of collection	Numbers of sample	Institute of plant
<b>Section <i>Amboinensis</i></b>			
<i>Phalaenopsis amboinensis</i> J.J. Sm.	4-6	3	D
<i>Phalaenopsis bastianii</i> Gruss & Röhlke	11-13	3	D
<i>Phalaenopsis bellina</i> (Rchb.f.) E. A. Christ.	14-15	2	D
<i>Phalaenopsis fasciata</i> Rchb. f.	28-30	3	B
<i>Phalaenopsis gigantea</i> J.J. Sm.	34-36	3	D
<i>Phalaenopsis hieroglyphica</i> (Rchb.f.) Sweet	37	1	B
<i>Phalaenopsis javanica</i> J.J. Sm.	40	1	D
<i>Phalaenopsis lueddemanniana</i> Rchb.f.	50-51	2	D
<i>Phalaenopsis mariea</i> Burb. ex Warn. & B.S. Wms.	58-60	3	D
<i>Phalaenopsis modesta</i> J.J. Sm.	61-63	3	D
<i>Phalaenopsis pallens</i> (Lindl.) Rchb. f.	64-66	3	D
<i>Phalaenopsis pulchra</i> (Rchb.f.) Sweet	73-75	3	D
<i>Phalaenopsis venosa</i> Shim & Fowlie	76-77	2	D
<i>Phalaenopsis violacea</i> Witte	78-80	3	D
<b>Section <i>Zebrinae</i></b>			
<i>Phalaenopsis corningiana</i> Rchb.f.	24	1	D
<i>Phalaenopsis inscriptiosinensis</i> Fowlie	38-39	2	A
<i>Phalaenopsis sumatrana</i> Korth & Rchb. f.	88-90	3	D
<i>Phalaenopsis tetraspis</i> Rchb. f.	91-92	2	C
<i>Phalaenopsis zebrina</i> Witte (synonym of <i>Phalaenopsis sumatrana</i> )	93-95	3	D
<b>Subgenus <i>Phalaenopsis</i></b>			
<b>Section <i>Phalaenopsis</i></b>			
<i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl.	1-3	3	D
<i>Phalaenopsis aphrodite</i> Rchb.f.	7-9	3	D
<i>Phalaenopsis philippinensis</i> Golamco ex Fowlie & Tan	70-72	3	D
<i>Phalaenopsis sanderiana</i> Rchb. f.	81	1	D
<i>Phalaenopsis schilleriana</i> Rchb. f.	82-84	3	D
<i>Phalaenopsis stuartiana</i> Rchb. f.	85-87	3	D

Species	Code of collection	Numbers of sample	Institute of plant
<b>Section <i>Deliciosae</i></b>			
<i>Phalaenopsis deliciosa</i> Rchb.f.	41	1	D
<b>Section <i>Esmeralda</i></b>			
<i>Phalaenopsis pulcherrima</i> (Lindl.) J.J. Sm	99	1	D
<b>Section <i>Stauroglottis</i></b>			
<i>Phalaenopsis equestris</i> (Schauer) Rchb.f.	25-27	3	D
<i>Phalaenopsis lindenii</i> Loher	43-45	3	D
<b>Outgroup</b>			
<i>Haraella retrocalla</i> (Hayata) Kudô	100	1	D
<i>Sedirea japonica</i> (L. Linden & Rchb. f.) Garay & H.R. Sweet	101	1	D

A: the plants from National Museum of Natural Science;

B: the plants from Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, COA, Executive Yuan;

C: the plants from both A and B;

D: from Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station, COA, Executive Yuan.

## 二、試驗方法

採集植株葉片或花朵之組織約 0.1 g，以 QIAGEN®核酸純化試藥組 (DNeasy® Plant Mini Kit) 依其建議流程進行 DNA 萃取，再以 NanoDrop 測定 260 nm 及 280 nm 吸光值檢測，並調整濃度  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。試驗委由基隆米克斯合成 The University of British Columbia 所公布 SET#9 序列引子，篩選其中 12 個作為試驗使用之引子 (表 2) 進行 PCR 反應，總體積 25  $\mu\text{L}$  中內含 2X 緩衝液、4 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.4 mM dNTPs、0.4  $\mu\text{M}$  引子、40 ng 模板 DNA 及 1.25U KAPATaq® HotStart 聚合酶，PCR 條件首先以 95°C 反應 3 分鐘，再以 95°C 反應 1 分鐘、55°C 反應 1 分鐘及 72°C 反應 1 分鐘共 40 個循環，最後以 72°C 反應 10 分鐘再降溫至 4°C，2 重複。反應產物以總量 70  $\mu\text{L}$  的 0.5% TBE 緩衝液，調配 2% Agarose (Amresco®) 再加入 SYBR® Safe DNA gel stain 染劑 7  $\mu\text{L}$  進行電泳分析，並以影像顯影系統紀錄，選擇條帶清晰且具再現性者進行紀錄與分析。

表 2. ISSR 引子分析結果與資訊

Table 2. The primer information and analysis result of ISSR markers.

Primer	Sequence(5'-3')	NTL <sup>z</sup>	P% <sup>y</sup>	PIC <sup>x</sup>	Rp <sup>w</sup>
UBC810	(AT) <sub>8</sub> T	19	100%	0.1410	3.5049
UBC812	(GA) <sub>8</sub> A	20	100%	0.3702	9.0594
UBC817	(CA) <sub>8</sub> A	16	100%	0.3507	8.1386
UBC826	(AC) <sub>8</sub> C	23	100%	0.3508	12.4750
UBC828	(TG) <sub>8</sub> A	22	100%	0.2840	8.6732
UBC834	(AG) <sub>8</sub> YT	29	100%	0.3092	12.5941
UBC840	(GA) <sub>8</sub> YT	23	100%	0.2475	7.8811
UBC844	(CT) <sub>8</sub> RC	23	100%	0.3140	10.5347
UBC850	(GT) <sub>8</sub> YC	21	100%	0.3736	11.9208
UBC861	(ACC) <sub>6</sub>	23	100%	0.3048	10.1386
UBC864	(ATG) <sub>6</sub>	27	100%	0.2715	10.3760
UBC873	(GAC) <sub>5</sub> A	24	100%	0.3534	12.3762
total		270	-	-	-
average		22.5	100%	0.3053	9.8060

z: number of total loci (NTL)

y: polymorphic ratio (P%)

x: polymorphic information content (PIC)

w: resolving power (Rp)

### 三、統計分析

電泳結果以 BioNumerics® 軟體協助分析，標記清晰且具再現性之條帶，將增幅出現者以“1”表示，未出現者以“0”表示，紀錄 300~1600 bp 間之條帶，以 Dice's coefficient 估算遺傳距離，相似係數 (simple matching coefficient) 的計算方式為  $F=2N_{ij}/(N_i+N_j)$ ，其中  $N_i$  及  $N_j$  分別代表  $i$  及  $j$  樣品出現的所有條帶， $N_{ij}$  則表示  $i$  及  $j$  樣品間共同出現的條帶 (Dice, 1945)，並使用 UPGMA 進行群聚分析，並繪製成樹狀圖 (dendrogram) 以研究物種間關係。P% 表示條帶在測試樣品中的多型性比率。PIC 計算公式為  $PIC_i=2f_i(1-f_i)$ ，以表示第  $i$  個片段上的多型性資訊，其中  $f_i$  指第  $i$  個 locus 上條帶出現的頻度， $1-f_i$  指第  $i$  個 locus 上無條帶出現的頻度，由上述公式得知數值範圍 0~0.5，若數值越高表示分子標誌區分不同樣本的能力越佳 (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000)。Rp 用來評估分子標誌區別能力，其計算公式為  $R_p=\sum I_b$ ， $I_b$  (band information) 表示每個片段上多型性資訊，其中  $I_b=1-2|(0.5-p)|$ ， $p$  指  $I$  條帶在所有物種中出現的比例， $R_p$  值為一個大於零且沒有上限的數值，當分子標誌可增幅越多片段時數值也會越高 (Prevost and Wilkinson, 1990)。

## 結果與討論

將 12 個 ISSR 引子所擴增之條帶選取介於 300~1600 bp 之間、清晰且具再現性者 (圖 1) 並紀錄之，結果共獲得 270 個條帶，其中多型性比率 (P%) 為 100%，單一引子所增幅之多型性條帶以 UBC834 能增幅出 29 個條帶最多，UBC817 擴增出 16 個條帶最少，平均 22.5 個條帶。PIC 值以 UBC850 的 0.3736 最大，UBC810 的 0.1410 最小，平均值 0.3053； $R_p$  值以 UBC834 的 12.5941 最大，UBC810 的 3.5049 最小，平均值 9.8060 (表 2)。以 Dice's coefficient 估算之遺傳相似度，結果作為外群的名護蘭與其他物種的差異大於臺灣香蘭，在蝴蝶蘭屬物種中相似度以 *Phal. fuscata* 與 *Phal. fasciata* 最高，而以 *Phal. stuartiana* 與 *Phal. parishii* 相似度最低 (資料未列出)。以 UPGMA 進行群聚分析並繪製成樹狀圖 (圖 2)，名護蘭與蝴蝶蘭屬物種間遺傳相似度 0.36，臺灣香蘭與蝴蝶蘭屬物種間遺傳相似度 0.40，蝴蝶蘭屬物種間的遺傳相似度介於 0.43-0.79 之間 (圖 2)。在平均相似度約 0.42 處可將物種區分成兩大群，約 0.44 處再分成第一與二類群，約 0.46 處再分為第三與四類群，參考 Christenson (2001) 依

唇瓣與瘤狀物所做的分類法，第一群有 *Polychilos* 亞屬 *Amboinensis* 節、*Polychilos* 節、*Fuscata* 節、*Zebrinae* 節、*Phalaenopsis* 亞屬 *Deliciosae* 節、*Esmeralda* 節以及 *Aphyllae* 亞屬之 30 個物種，包括 *Phal. bastianii*、*Phal. fasciata*、*Phal. mariea*、*Phal. pallens*、*Phal. pulchra*、*Phal. lueddemanniana*、*Phal. amboinensis*、*Phal. bellina*、*Phal. venosa*、*Phal. violacea*、*Phal. javanica*、*Phal. modesta*、*Phal. gigantea*、*Phal. hieroglyphica*、*Phal. cornu-cervi* var. *flava*、*Phal. mannii*、*Phal. borneënsis*、*Phal. pantherina*、*Phal. cornu-cervi*、*Phal. fuscata*、*Phal. kunstleri*、*Phal. sumatrana*、*Phal. tetraspis*、*Phal. inscriptiosinensis*、*Phal. corningiana*、*Phal. zebrina*、*Phal. finleyi*、*Phal. braceana*、*Phal. deliciosa* 及 *Phal. pulcherrima*；第二群為 *Parishiana* 亞屬及 *Proboscidioids* 亞屬之 5 個物種，包括 *Phal. appendiculata*、*Phal. parishii*、*Phal. lobbii*、*Phal. malipoensis* 及 *Phal. lowii*；第三群為 *Phalaenopsis* 亞屬 *Phalaenopsis* 節之 6 個物種，包括 *Phal. sanderiana*、*Phal. schilleriana*、*Phal. stuartiana*、*Phal. amabilis*、*Phal. aphrodite* 及 *Phal. philippinensis*；第四群為 *Phalaenopsis* 亞屬 *Stauroglottis* 節之 *Phal. equestris* 及 *Phal. lindenii* 兩個物種，其餘為兩個外群臺灣香蘭 (*Haraella retrocalla*) 與名護蘭 (*Sedirea japonica*) (圖 2)。



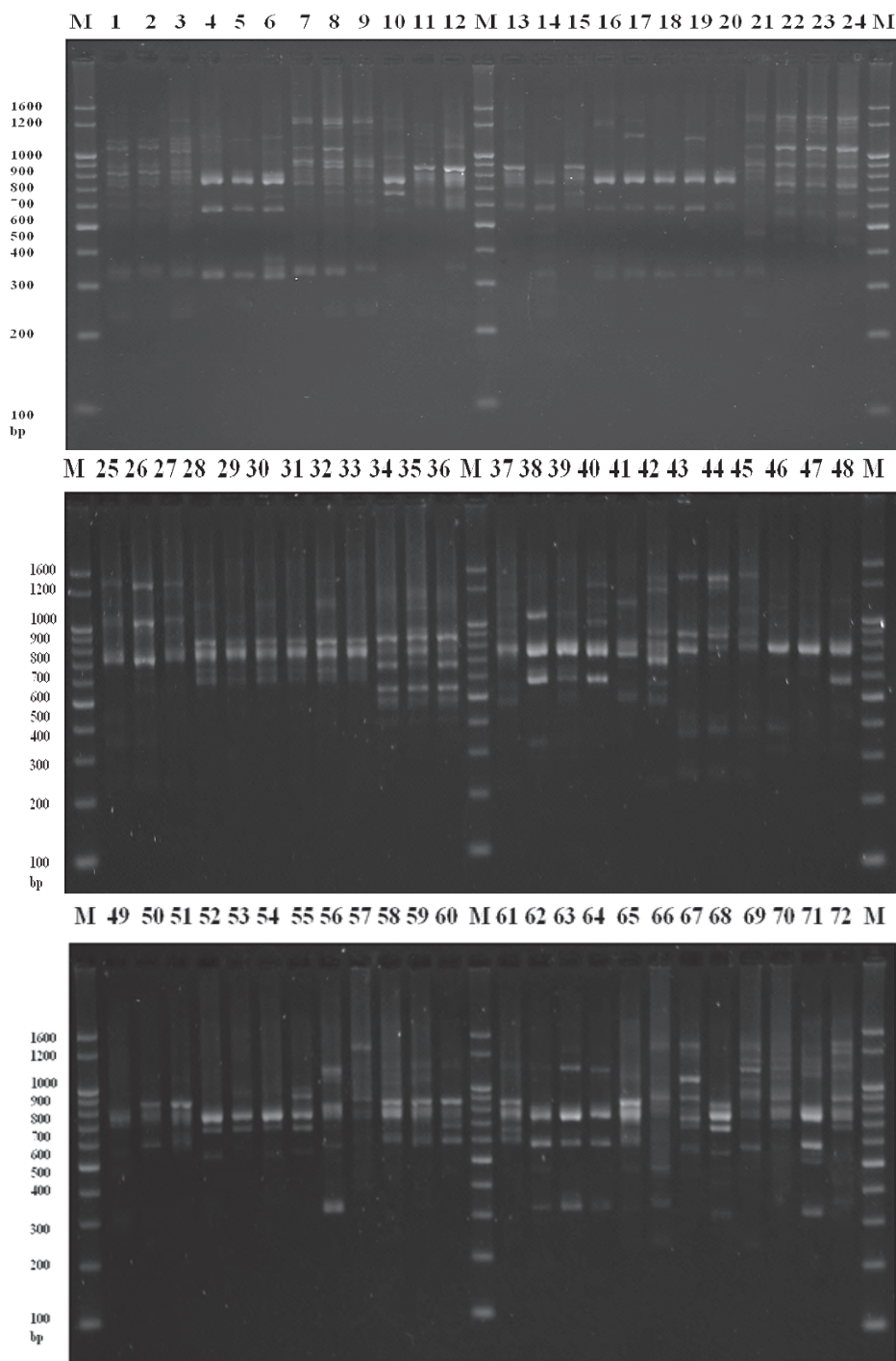


圖 1. 以 ISSR 分子標誌 (UBC840) 對 101 個物種增幅之結果 (樣本標號請見表 1)

Fig. 1. Amplification profile of 101 accessions with the ISSR (UBC840) primer. (Sample codes are as those listed in Table 1.)

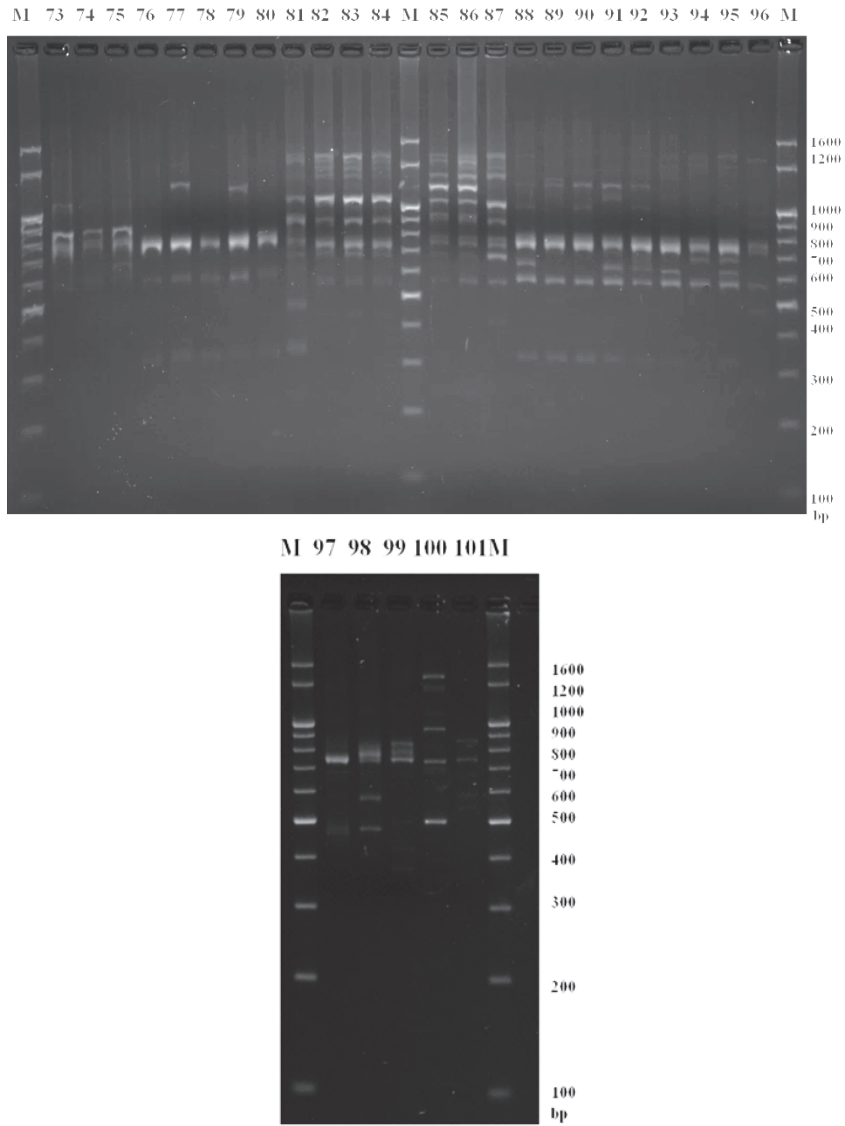


圖 1. 以 ISSR 分子標誌(UBC840)對 101 個物種增幅之結果(樣本標號請見表 1)(續)  
Fig. 1. Amplification profile of 101 accessions with the ISSR (UBC840) primer. (Sample codes are as those listed in Table 1.) (continued)

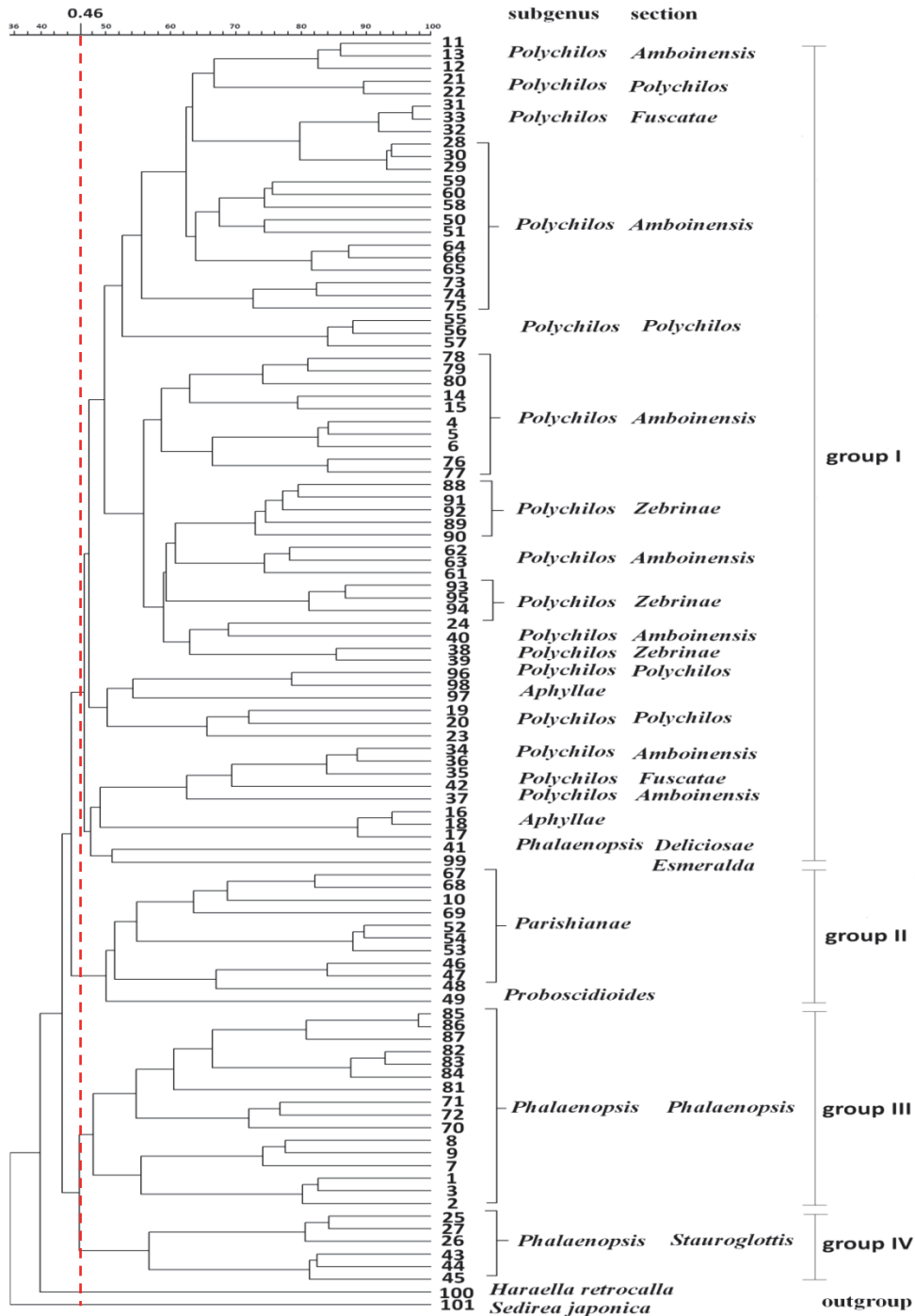


圖 2. ISSR 分子標誌對 101 個物種進行分群分析之樹狀圖 (樣本標號請見表 1)

Fig. 2. The dendrogram of 101 accessions derived from ISSR markers. (Sample codes are as those listed in Table 1.)

試驗結果與 Christenson (2001) 所作之蝴蝶蘭屬植物分類結果有些異同之處。以 ISSR 分析之結果顯示，歸類為 *Polychilos* 亞屬各節之物種間有較相近的遺傳距離，但歸類為 *Phalaenopsis* 亞屬者其遺傳距離則不盡相近；其中 *Phalaenopsis* 亞屬中的 *Deliciosae* 節與 *Esmeralda* 節之物種間有較相近的遺傳距離，而不與 *Phalaenopsis* 節與 *Stauroglottis* 節之物種相近；並且 *Aphyllae* 亞屬無法與 *Polychilos* 亞屬之物種區分，且 *Proboscidioids* 亞屬與 *Parishiana* 亞屬之物種有較相近的遺傳距離。

由外形觀之，屬蠟質花的物種如 *Phal. amboinensis*、*Phal. bellina*、*Phal. mariea*、*Phal. venosa*、*Phal. sumatrana* 及 *Phal. mannii* 等物種均歸群到第一類群中，而屬粉質花的物種如 *Phal. amabilis*、*Phal. philippinensis*、*Phal. equestris* 及 *Phal. lindenii* 等物種則分別歸到第三、四類群中。依地理分布觀之，*Aphyllae* 亞屬較集中分布於中國（尤以雲南）一帶；*Proboscidioids* 亞屬的 *Phal. lowii* 分布在越南與泰國；*Parishianae* 亞屬分布於寮國、越南、馬來西亞、印度、不丹及泰國等地；*Polychilos* 亞屬則主要分布在印度尼西亞及馬來西亞一帶；*Phalaenopsis* 亞屬 *Deliciosae* 節及 *Esmeralda* 節多分布於越南、緬甸及馬來西亞等地，*Phalaenopsis* 亞屬 *Stauroglottis* 節與 *Phalaenopsis* 節主要分布在菲律賓及臺灣一帶（Christenson, 2001），因此，*Proboscidioids* 亞屬、*Aphyllae* 亞屬、*Parishianae* 亞屬、*Phalaenopsis* 亞屬 *Deliciosae* 節及 *Esmeralda* 節有較相近的地理分布區域；而 *Polychilos* 亞屬、*Phalaenopsis* 亞屬 *Stauroglottis* 節及 *Phalaenopsis* 節比前述者再往南方發展；與 ISSR 分析之結果對照發現，地理位置較相近者彼此間亦有較相近的遺傳距離，與 Tsai *et al.* (2010) 研究之結果有部分相似。

前人研究發現，原生蝴蝶蘭屬物種之染色體數皆為  $2n=2X=38$ ，但染色體的外形有明顯的不同，大約可分為三種類型，大型者如 *Phal. mannii*、*Phal. violacea* 及 *Phal. pulcherrima*；中型者如 *Phal. lueddemanniana*、*Phal. gigantea* 及 *Phal. amboinensis*；小型者如 *Phal. amabilis*、*Phal. aphrodite* 及 *Phal. equestris*（Shindo and Kamemoto, 1963; Arends, 1970; Lin *et al.*, 2005），對照分析結果發現，該等具有大型或中型染色體者均歸類到第一類群中，小型者則分別歸類到第三、四類群之中。再對照 Chen 等人 (2013) 以流式細胞儀檢測蝴蝶蘭屬物種 DNA 含量之結果，發現平均值最高的 *Parishianae* 亞屬在本次研究中被歸群成為獨立的第二類群；再者平均值依序 *Phalaenopsis* 亞屬 *Esmeralda* 節、*Aphyllae* 亞屬、*Phalaenopsis* 亞屬 *Deliciosae* 節、*Polychilos* 亞屬 *Zebrinae* 節、*Amboinensis* 節、*Polychilos* 節及 *Fuscatae* 節，該等物種也被歸在同一類群；最後一類群是依序含量最低的 *Phalaenopsis* 亞屬 *Stauroglottis* 和 *Phalaenopsis* 節，被分別

歸在第三、四類群中。前人以 RAPD、質體及核基因組序列等分子標誌分析之結果(Goh *et al.*, 2005; Yukawa *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2010)，與本試驗以 ISSR 分析之結果均顯示，*Proboscidioids* 亞屬的 *Phal. lowii* 無法與其他亞屬之物種區分開，推測可能與 *Parishianae* 亞屬或 *Aphyllae* 亞屬有較相近的親緣關係；亦顯示出 *Polychilos* 亞屬各節之物種間有相近的遺傳距離，以及 *Aphyllae* 亞屬與其他分類地位之物種皆有相近的遺傳距離。

因此，藉由研究蝴蝶蘭屬物種之形態、地理位置、染色體、DNA 含量及分子標誌等資訊可以了解物種間的遺傳距離，並可作為研究其親緣關係與演化之工具，期望未來有助於遺傳育種相關工作之進行。

## 致 謝

本研究報告為在職進修碩士論文一部分，特別感謝林順福老師不吝給予建議，李勇毅博士、安志豪助理研究員協助蒐集試驗材料，廖乾華場長、傅仰人副場長、羅秋雄秘書、廖芳心研究員、林孟輝課長等主管對於在職進修之支持與鼓勵，李淑真副研究員、葉志新副研究員、生物技術研究室全體同仁以及在學期間所有學長姐、同學、學弟妹等給予的幫助與建議，真摯感謝曾協助過的所有人。

## 參考文獻

- Agarwal, M., N. Shrivastava, and H. Padh. 2008. Advance in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27:617-631.
- Arends, J.C. 1970. Cytological observation on genome homology in eight interspecific hybrids of *Phalaenopsis*. *Genetica* 41:88-100.
- Chen, W.H., Y.L. Kao, C.Y. Tang, C.C. Tsai, and T.Y. Lin. 2013. Estimating nuclear DNA content within 50 species of the genus *Phalaenopsis* Blume (Orchidaceae). *Sci. Hortic.* 161:70-75.
- Chiou W.L. and T.Y. Chiang. 2013. *Plant systematics*. SMC Publishing, Taipei, Taiwan. 274-296 pp.
- Chritenson, E.A. 2001. *Phalaenopsis* a monograph. Timber Press, Portland, Oregon. USA.

- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 26:297-302.
- Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Timber Press, Portland Oregon. 206-207pp.
- Feng, S., H. Zhao, J.J. Lu, J.J. Liu, B. Shen, and H.Z. Wang. 2013. Preliminary genetic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. moniliforme*. *J. Genetics*. 92:205-212.
- Goh, M.W.K., P.P. Kumar, S.H. Lim, and H.T.W. Tan. 2005. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae). *Euphytica* 141:11-22.
- Huang, T. 2014. Guide to orchid in class II. TOGA, Tainan, Taiwan. 204-268pp.
- Jiang, C., Y. Wang and Y. Sun. 2007. Application advance of molecular marker techniques of SSR and ISSR. *Chin. Tob. Sci.* 28:1-5.
- Kumar, P., V.K. Gupta, A.K. Misra, D.R. Modi, and B.K. Pandey. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*. 2:141-162.
- Lin, C.C., Y.H. Chen, W.H. Chen, C.C. Chen and Y.Y. Kao. 2005. Genomic organization and relationships of *Phalaenopsis* orchids inferred from genomic in situ hybridization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46:339-345.
- Pinheiro, L.R., A.R.C. Rabbani, A.V.C. da Silva, A. da Silva Lédo and L.E.C. Diniz. 2012. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiate* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Syst. Evol.* 298:1815-1825.
- Pridgeon, A.M., P.J. Cribb, M.W. Chase, and F.N. Rasmussen. 2014. *Genera Orchidacearum Volume 6 Epidendroideae (Part 3)*. Oxford University Press. 233-241pp.
- Prevost, A. and M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
- Reddy, M.P., N. Sarla, and E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed.* 6:125-134.

- Shindo, K. and H. Kamemoto. 1963. Karyotype analysis of some species of *Phalaenopsis*. *Cytologia*. 28:390-398.
- Sweet, H. R. 1980. The Genus *Phalaenopsis*. Orchid Digest Crop., Pomona, USA.
- Taywiya, P. 2010. Analysis of Genetic Relationship and Marker of Genus *Phalaenopsis* and Hybrids by Molecular Techniques. PhD. Dissertation Chiang Mai Univ., Thailand.
- Tsai, C.C., Y.C. Chiang, S.C. Huang, C.H. Chen, and C.H. Chou. 2010. Molecular phylogeny of *Phalaenopsis* Blume (Orchidaceae) on the basis of plastid and nuclear DNA. *Plant Syst. Evol.* 288:77-98.
- Wang, H.Z., Z.X. Wu, J.J. Lu, N.N. Shi, Y. Zhao, Z.T. Zhang, and J.J. Liu. 2009. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Genetica* 136:391-399.
- Xie, Q., N.S. Miao, X.M. Song, D.H. Huang, B.G. Li, and P. Zhao. 2010. Genetic diversity analysis of *Phalaenopsis* by ISSR marker. *Acta. Bot. Boreal. -Occident Sin.* 30:1331-1336.
- Yukawa, T., K. Kita, T. Handa, T. Hidayat, and M. Ito. 2005. Molecular phylogenetics of *Phalaenopsis* (Orchidaceae) and allied genera: re-evaluation of generic concepts. *Acta. Phytotax. Geobot.* 56:141-161.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

# The Use of ISSR Marker for Genetic Diversity among *Phalaenopsis* Species<sup>1</sup>

Ya-Jyun Shen<sup>2</sup>, Tzer-Kaun Hu<sup>3</sup>, and Hsin-Mei Ku<sup>3</sup>

## ABSTRACT

The aim of this research is to study the genetic diversity of *Phalaenopsis* species, including 43 *Phalaenopsis* species and the outgroup including *Haraella retrocalla* (Hayata) Kudô and *Sedirea japonica* (L. Linden & Rchb. f.) Garay & H.R. Sweet using 12 ISSR markers. A total of 270 clear and reproducible bands were amplified and 29 clear bands were amplified by ISSR markers of UBC834, which gave the highest number of bands per marker. The percentage of polymorphism (PIC) and resolving power (Rp), on average, were 0.3053 and 9.8060, respectively. A dendrogram based on Dice's coefficient was constructed by UPGMA and *Phalaenopsis* species were clustered into two major groups at the similarity of 0.42, at the similarity of 0.44 distributed group 1 and 2, the similarity of 0.46 distributed group 3 and 4. This study showed certain degree of genetic diversity existed among *Phalaenopsis* species using ISSR marker analysis, the result of clustering may indicate genetic relationship between species distance, provided breeders the references of molecular genetic and marker-assisted breeding.

Key words: *Phalaenopsis*, ISSR, molecular markers, genetic diversity

---

<sup>1</sup> Contribution No.465 from Taoyuan DARES, COA.

<sup>2</sup> Assistant Researcher, Taoyuan DARES, COA.

<sup>3</sup> Professor and Professor (Corresponding author, hmku@email.nchu.edu.tw), respectively, Department of agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.