

太魯閣國家公園杜鵑花屬植物小分子熱 休克蛋白與其地理分佈之研究

研究主持人：國立台灣大學園藝學系教授兼系主任 徐源泰

內政部營建署太魯閣國家公園管理處

中華民國九十四年十二月

目次

表次	3
圖次	4
摘要	6
第壹章、緒論	9
第貳章、材料與方法	12
第參章、結果與討論	15
一、樣品採集	15
二、小分子熱休克蛋白之資料庫搜尋與引子對設計	16
三、杜鵑屬植物親源關係之鑑定	18
四、杜鵑屬植物小分子熱休克蛋白及其地理分布之關係	18
第肆章、謝誌	20
參考文獻	43

表 次

表一 本實驗所使用之杜鵑屬品系.....	24
表二 以不同植物 chloroplast sHSP 胺基酸序列之保守區域所 設計之引子對.....	30
表三 以不同植物 ER sHSP 胺基酸序列之保守區域所設計之 引子對.....	31
表四 以不同植物 cytosolic classI sHSP 胺基酸序列之保守區 域所設計之引子對.....	32
表五 以不同植物 mitochondrion sHSP 胺基酸序列之保守區 域所設計之引子對.....	33
表六 以小分子熱休克蛋白胺基酸序列之 C 端保守性區域設 計之引子對.....	35

圖 次

圖一	台灣原生杜鵑屬植物海拔分布圖.....	21
圖二	於合歡山區採樣之杜鵑屬植物 (A) 埔里杜鵑;(B) 紅毛杜鵑;(C) 金毛杜鵑.....	22
圖三	於合歡山區採樣之杜鵑屬植物 (A) 台灣高山杜鵑;(B) 森氏杜鵑;(C) 玉山杜鵑;(D) 南湖杜鵑.....	23
圖四	不同植物之 chloroplast sHSP 胺基酸序列.....	26
圖五	不同植物之 ER sHSP 胺基酸序列.....	27
圖六	不同植物之 cytosolic classI sHSP 胺基酸序列.....	28
圖七	不同植物之 mitochondrion sHSP 胺基酸序列.....	29
圖八	以小分子熱休克蛋白 C 端區域, α -crystallins, <i>S. mansoni</i> egg antigen p40 以及 mycobacterial 14K 和 18K 表面抗原之序列進行排序.....	34
圖九	小分子熱休克蛋白胺基酸序列之 C 端保守性區域之胺基酸序列轉為核酸序列.....	35
圖十	以非專一性引子對 C terminal-1/C terminal-2 對杜鵑屬植物進行聚合酵素連鎖反應.....	36
圖十一	以專一性引子對 C terminal-3/ C terminal-4 對不同杜鵑樣本進行聚合酵素連鎖反應.....	36
圖十二	將二十五個樣本的小分子熱休克蛋白部份序列進行 alignment 之結果.....	37

圖十三	二十五個杜鵑收集品系間遺傳相似度矩陣.....	38
圖十四	不同樣品之小分子熱休克蛋白核苷酸序列以 NJ 進行 分析所得之親緣關係圖.....	39
圖十五	不同樣品之小分子熱休克蛋白核苷酸序列以 ML 進行分析所得之親緣關係圖.....	40
圖十六	不同樣品之小分子熱休克蛋白核苷酸序列以 PA 進行 分析所得之親緣關係圖.....	41
圖十七	不同樣品之小分子熱休克蛋白核苷酸序列以軟體進 行轉譯後所得胺基酸序列之 alignment 結果.....	42

摘要

關鍵字：杜鵑花屬、小分子熱休克蛋白、海拔高度

一、緣起及重要性

太物種與遺傳多樣性資源，厥為國家公園之重要資產。為求有效之規劃及經營管理之實務需求，對國家公園於園區內所有之遺傳多樣性的了解，是為極重要工作項目。伴隨生物科技之發展，結合分子標誌、分子分類等新方法，與古典形態分類之結合，已被多數先進國家之國家公園管理單位所採用並證實其優異之成果；不但可了解過往未知的物種與遺傳多樣性，且可同時解釋演化分佈之緣由，甚至可進一步預測變遷。

本研究於是即以太魯閣國家公園管理區內之杜鵑為遺傳多樣性之研究目標，其理由在於：

1. 太魯閣國家公園管理區所轄全區範圍海拔落差遠達三千七百餘公尺，統括台灣全島各垂直植被帶之分布為國內之最，而杜鵑花恰亦為我國垂直海拔分布最廣且種類最多的本土重要及兼具景觀園藝價值的植物；

2. 杜鵑在國內已有充足的傳統形態分類調查研究，在開發新生物技術引進分子標誌與分子分類研究時，可有較明確之比較依據；

3. 杜鵑一般多受遊客喜愛，可藉由自發之親近，導入遺傳多樣性觀念於解說中，達到國家公園的教育目的。

4. 藉由小分子熱休克蛋白基因做為分子標誌之研究，建立分子分類與分布模式理論(先前學者之觀察認為台灣杜鵑與南湖杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑外觀相似，且葉綠體及核糖體 DNA 序列相近，因而可將此四者歸為同一類群。但本年研究成果發現：以小分子熱休克蛋白之序列比較，台灣杜鵑與另外三者差異較大，應被歸為不同類群，亦可初步解釋外觀相似之杜鵑為何具有不同之環境適應分布性)，使國家公園在物種經營管理方面，得有分區管理及變遷預測等之規劃參考依據；

故此，本年度之研究成果，兼具本土植物遺傳多樣性之探討、新分子生物研發技術之引入、並顧及國家公園教育解說與經營管理之需求。

二、研究方法及過程

以杜鵑花屬中的 cytosolic class I sHSP 的部份核酸序列進行比對分析，所採樣品多分佈於合歡山區、金馬隧道附近、及碧綠區域以及南湖圈谷附近。採樣樣品總計二十五種，其中埔里杜鵑四種、紅毛杜鵑五種、金毛杜鵑兩種、台灣高山杜鵑一種、台灣杜鵑一種、森氏杜鵑兩種、西施花三種、玉山杜鵑三種以及南湖杜鵑四種。

三、重要發現

杜鵑屬小分子熱休克蛋白 C 端核酸序列可明顯區分高山杜鵑與其他分部較廣且分佈海拔較低之杜鵑，其約以海拔 3000 公尺為一分界點，而這些核酸序列上之差異對其轉譯後胺基酸序列之影響並不大，其可能原因係為本研究所使用區域之胺基酸序列會造成小分子熱休克蛋白的構型差異，因此其胺基酸序列之保守性相當高，但由其核酸序列仍可觀測到其演化上之差異。過去學者原本將森氏杜鵑以及玉山杜鵑分為兩品系，但因其外觀相似以及經過分子標誌之確認後發現其葉綠體 DNA 上之 *trnL-trnF* 區域以及核糖體 DNA 上的 ITS 區域序列極為相近，因此將其並為一類，於本實驗亦可發現縱使森氏杜鵑之樣本採集點皆低於 3000 公尺，森氏杜鵑與玉山杜鵑之小分子熱休克蛋白核酸序列相似度仍相當高，由此可證實此兩者雖有外觀上些微之差異，但應為同一品系之杜鵑；由玉山杜鵑及森氏杜鵑之比較結果亦可發現，杜鵑屬植物之遷移應為由高海拔區域遷徙至低海拔地區，此一結果亦呼應過去學者認為杜鵑屬植物係由高山遷移至平地之結論。

四、主要建議事項

本研究之顯著性和建議如下：

1. 本研究之採樣結果可充實太魯閣國家公園內杜鵑花屬植物之分布紀錄，並可對區內不同種杜鵑花之海拔分布有更進一步之了解，藉此更可與過去之調查結果作一比對，監測區內杜鵑花屬植物的變遷。
2. 由此研究可發現，小分子熱休克蛋白確實可作為研究植物海拔分布遷移之標地，因而可以此方式建立一研究模式，對太魯閣國家公園內之其他植物進行相關研究，做為區內植物變遷之紀錄指標。
3. 未來建議以此研究模式為基礎，對太魯閣國家公園區內植物進行樣本收集及其小分子熱休克蛋白之研究，並且藉以長期監控區內植物之變遷，並可作為生長環境及氣候變化對植物分佈影響的指標。

Abstract

Keywords: *Rhododendron*, small heat shock protein, altitude

In this study, there are 25 samples coming from 9 species of rhododendrons used to compared their partial DNA sequences of cytosolic class I small heat shock protein (sHSP). The region used in this study is at the conversed C-terminal domain of sHSP and includes approximately 81 amino acids. The length of the region is about 250 bps. The results found that the DNA sequences of *R. pseudochrysanthum* Hay and *R. morii* Hayata in this region are the same, so it could be inferred that the two species of rhododendron may be the same specie. Neighbor joining (NJ), maximum likelihood (ML) and parsimony analyses (PA) were conducted using PHYLIP program. From NJ, ML and PA trees, it's observed that *R. pseudochrysanthum* Hay, *R. morii* Hayata and *R. hyperythrum* Hay were classified in the same clade. The samples of *R. pseudochrysanthum* Hay, *R. morii* Hayata and *R. hyperythrum* Hay were collected at the altitude range from 3159 to 3750 meters, 2579 to 2683 meters and 3080 to 3517 meters respectively. The topology obtained from ML was found that the samples collected from the altitude over 3000 meters except *R. morii* Hayata were in the same clade. This result inferred that the partial DNA sequence of cytosolic class I sHSP could be used to distinguish the rhododendrons that grow at an altitude over 3000 meters from others.

第壹章、緒論

物種與遺傳多樣性資源，厥為國家公園之重要資產。為求有效之規劃及經營管理之實務需求，對國家公園於園區內所有之遺傳多樣性的了解，是為極重要工作項目。伴隨生物科技之發展，結合分子標誌、分子分類等新方法，與古典形態分類之結合，已被多數先進國家之國家公園管理單位所採用並證實其優異之成果；不但可了解過往未知的物種與遺傳多樣性，且可同時解釋演化分佈之緣由，甚至可進一步預測變遷。

本研究於是即以太魯閣國家公園管理區內之杜鵑為遺傳多樣性之研究目標，其理由在於：

1. 太魯閣國家公園管理區所轄全區範圍海拔落差遠達三千七百餘公尺，統括台灣全島各垂直植被帶之分布為國內之最，而杜鵑花恰亦為我國垂直海拔分布最廣且種類最多的本土重要及兼具景觀園藝價值的植物；
2. 杜鵑在國內已有充足的傳統形態分類調查研究，在開發新生物技術引進分子標誌與分子分類研究時，可有較明確之比較依據；
3. 杜鵑一般多受遊客喜愛，可藉由自發之親近，導入遺傳多樣性觀念於解說中，達到國家公園的教育目的。
4. 藉由小分子熱休克蛋白基因做為分子標誌之研究，建立分子分類與分布模式理論(先前學者之觀察認為台灣杜鵑與南湖杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑外觀相似，且葉綠體及核糖體 DNA 序列相近，因而可將此四者歸為同一類群。但本年研究成果發現：以小分子熱休克蛋白之序列比較，台灣杜鵑與另外三者差異較大，應被歸為不同類群，亦可初步解釋外觀相似之杜鵑為何具有不同之環境適應分布性)，使國家公園在物種經營管理方面，得有分區管理及變遷預測等之規劃參考依據；
5. 故此，本年度之研究成果，兼具本土植物遺傳多樣性之探討、新分子生物研發技術之引入、並顧及國家公園教育解說與經營管理之需求。

杜鵑花屬 (*Rhododendron*) 為杜鵑花科 (*Ericaceae*) 植物，本屬全球約有 900 種，主要分佈於北半球寒帶及溫帶，台灣本島則有約 15 種原生種，包括南澳杜鵑 (*R. breviperulatum* Hayata)、西施花 (*R. ellipticum* Maxim.)、台灣杜鵑 (*R. formosanum* Hemsl.)、南湖杜鵑 (*R. hyperythrum* Hay.)、烏來杜鵑 (*R. kanehirai* Wilson)、著生杜鵑 (*R. kawakamii* Hayata)、守城滿山紅 (*R. mariesii* Hemsl.& Wilson)、細葉杜鵑 (*R. noriakianumi* T.Suzuki)、金毛杜鵑

(*R. oldhamii* Maxim.)、馬銀花 (*R. ovatum* Planch)、長卵葉馬銀花(*R. ovatum* Planch var.*lamprophyllum* (Hayata) Y.C.Liu, F.Y.Lu, & C.H.Ou)、玉山杜鵑 (*R. pseudochrysanthum* Hay.)、紅毛杜鵑(*R. rubropilosum* Hayata)、台灣高山杜鵑 (*R. rubropilosum* Hay. var. *taiwanalpinum* (Ohwi) S.Y.Lu, Y.P.Yang & Y.H.Tseng)、唐杜鵑(*R. simsii* Planch)，其中 11 種為台灣特有種；太魯閣國家公園園區內有南澳杜鵑、西施花、台灣杜鵑、南湖杜鵑、著生杜鵑、金毛杜鵑、玉山杜鵑、紅毛杜鵑與台灣高山杜鵑等九種原生杜鵑，除西施花外，其餘八種皆為台灣特有種。

過去有眾多學者已對台灣原生種杜鵑屬進行分子標誌的建立，黃與徐 (2001) 曾以葉綠體 DNA 之 *trnF-trnL* 基因間區間 (intergenic spacer region) 對金毛杜鵑、烏來杜鵑、西施花、南湖杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑、台灣杜鵑、紅星杜鵑等八種杜鵑進行序列分析，發現其共可分為三個族群，第一群包含南湖杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑、台灣杜鵑、紅星杜鵑，其中台灣杜鵑可由此群中單獨分出，第二群為金毛杜鵑與烏來杜鵑，西施花則獨立為第三群。高雄區農業改良場以核糖體核酸 (ribosomal DNA, rDNA) 內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 之序列對 19 種台灣原生杜鵑進行分析，將 19 種杜鵑分成 6 群，其中台灣杜鵑、玉山杜鵑、南湖杜鵑、森氏杜鵑 (已併到玉山杜鵑)、紅星杜鵑(已併到玉山杜鵑) 為一群；紅毛杜鵑、金毛杜鵑、烏來杜鵑、細葉杜鵑、唐杜鵑、中原氏杜鵑 (已併到唐杜鵑)、大屯杜鵑 (已併到唐杜鵑)、埔里杜鵑、南澳杜鵑 (已併到埔里杜鵑) 為一群；馬銀花、長卵葉馬銀花為一群；另外，守城滿山紅、西施花、著生杜鵑分別自成一類；若以外觀觀察，西施花、台灣杜鵑、南湖杜鵑、玉山杜鵑這三類高山杜鵑皆為大葉型品種，其他則屬小葉型。

杜鵑花是著名的觀賞花卉，但在臺灣一般平地所見之杜鵑花多為外來種，但台灣原生之杜鵑花卉如烏來杜鵑、金毛杜鵑、唐杜鵑、南澳杜鵑(埔里杜鵑)、西施花及馬銀花等顏色鮮豔、花型大且環境適應性及抗病蟲害的能力方面皆比園藝栽培品種佳，將原生種杜鵑花引入環境維護與美化中，在管理上可降低維護的成本，在生態上可以保存台灣本土的生物資源，因此相當值得推行，但有些高山品種如台灣高山杜鵑、玉山杜鵑、南湖杜鵑在平地栽種不易，其可能為溫度等因素改變所造成，故對此些高山種杜鵑逆境蛋白之研究其平地化甚為重要。

小分子熱休克蛋白 (small heat shock protein, sHSP) 為一種真核生物與原核生物皆會產生的蛋白，其可分為五類，即細胞質第一型 (cytosolic class I sHSP)、細胞質第二型 (cytosolic class II sHSP)、葉綠體型 (chloroplast-localized sHSP)、粒線體型 (mitochondrial-localized sHSP) 與內質網型 (ER-localized sHSP)。在適當的生長環境下

sHSP 於營養體中並不會被偵測到，但在逆境下生物體則會產生此類蛋白以啟動自體保護的機制，而此類蛋白亦可能造成植物外觀的改變，以適應其生長環境。小分子熱休克蛋白多為基因家族 (gene family) 組成，Waters (1995) 研究發現不同類的小分子熱休克蛋白基因家族其胺基酸序列間有極大的差異性，但不同基因家族間的 C 端序列則很相近，因此 Waters (2003) 認為 C 端的序列與植物在高溫環境下所產生的保護機制有較大的相關性，而差異較大的 N 端序列則與植物的發育過程有較大的關係。Lee 等人 (2000) 研究發現 sHSPs 在逆境下的作用並非直接對被高溫變性的蛋白進行重新摺疊，而是 sHSPs 先對這些已變性之蛋白進行保護，而後才經由其它熱休克蛋白系統使其重新摺疊，以回復其原有之功能與作用。

生物多樣性已成二十一世紀重要議題之一，台灣地處亞熱帶區域，且島上包含各種地型，生物資源因而相當豐富，如何保護本土生物資源並加以開發利用已然成為重要課題。本研究將藉由對太魯閣國家公園內杜鵑花屬之小分子熱休克蛋白基因家族核酸序列進行選殖與定序，與其它已知相近物種之 sHSP 進行比較與分析，以瞭解其於杜鵑花屬中可能之作用基制，並將藉由與生長環境之結合，觀察兩者之相關性，並期望由此研究之模式建立一植物生長環境與其表現型相關性之資料庫，以監控太魯閣國家公園內植物之分佈變遷，作為園內管理之依據，並可作為後續相關 sHSP 研究之基石；除此之外對於一些過去易造成混淆之杜鵑品系，以及杜鵑屬植物之遷移方向等問題，亦可藉由此研究之進行獲得解答。

第貳章、材料與方法

一、太魯閣國家公園內杜鵑花屬植株樣品收集

自行或委託在太魯閣國家公園內採集杜鵑屬植株之樣品，記錄採樣地點海拔高度與地點，將樣品貯存於 0°C 降溫後，再貯藏於 -70°C 中待用。

由於本研究所使用之杜鵑其海拔高度分布不同 (圖一)，且有些為不易到達之區域，因此本研究之樣品係委託熟知杜鵑花屬品系之研究人員進行採樣，所採樣品多分布於合歡山區、金馬隧道附近、及碧綠區域以及南湖圈谷附近。採樣樣品總計二十五種，其中埔里杜鵑 (*R. breviperulatum* Hayata) 四種 (圖二(A))、紅毛杜鵑 (*R. rubropilosum* Hayata) 五種 (圖二(B))、金毛杜鵑 (*R. oldhamii* Maxim.) 兩種 (圖二(C))、台灣高山杜鵑 (*R. taiwanalpinum* Ohwi) 一種 (圖三(A))、台灣杜鵑 (*R. taiwanianum* Ying) 一種、森氏杜鵑 (*R. morii* Hayata) 兩種、西施花 (*R. ellipticum* Maxim.) 三種 (圖三(B))、玉山杜鵑 (*R. pseudochrysanthum* Hay) 三種 (圖三(C)) 以及南湖杜鵑 (*R. hyperythrum* Hay) 四種 (圖三(D))。其中埔里杜鵑之海拔分布於 1333 公尺至 2376 公尺之間，紅毛杜鵑分布於 2376 公尺至 3130 公尺之間，金毛杜鵑為 2376 公尺至 2520 公尺之間，台灣高山杜鵑為 2967 公尺，森氏杜鵑為 2579 至 2683 公尺之間，西施花分布於 1966 公尺至 2188 公尺之間，玉山杜鵑分布於 3159 至 3750 公尺之間，而南湖杜鵑分布於 3080 公尺至 3517 公尺之間 (表一)。

二、相近物種 sHSP 序列之比對與引子對設計

由基因庫中搜尋相近物種 sHSP 之序列，將各物種之胺基酸或核苷酸序列進行 alignment 之後，根據其保守區域之序列設計引子對，引子對之設計可分為兩部分。

(一) 以相近物種之小分子熱休克蛋白核酸序列設計引子對

於基因庫中搜尋與杜鵑屬植物相近之物種，將其依照不同類之小分子熱休克蛋白進行分類，並且以軟體進行 alignment (圖四、圖五、圖六、圖七)，根據其 5' 端與 3' 端之保守區域設計引子對 (表二、表三、表四、表五)。

(二) 以小分子熱休克蛋白 C 端胺基酸序列設計引子對

根據前人研究所得知小分子熱休克蛋白 C 端胺基酸序列設計引子對，如圖八所示，不同之小分子熱休克蛋白其 C 端皆有一段與 α -crystallin 蛋白相似之序列，以軟體將此部分之胺基酸轉為核酸序列 (圖九)，利用此段序列設計不具專一性之引子對 (表六)，以擴增小分子熱休克蛋白之核酸序列。

三、樣品 DNA 抽取方法

稱取檢體 5 g，加入去離子水 100 μ L 並置於 65°C 保溫 1 hr，續加入 CTAB 緩衝液 10 mL，於 65°C 反應 30 min，之後以 16000 g 離心 10 min，取上層液，並加入氯仿 4 mL，振盪混合 30 sec，再以 12000 g 離心 10 min，續取上層液，加入二倍體積之 CTAB 沉澱溶液，置於室溫反應 60 min，於 14500 g 離心 10 min，再去除上層液，並加入 1.2 M NaCl 溶液 3.5 mL 及相同體積氯仿，振盪混合 30 sec，再於 12000 g 離心 10 min，取上層液加入 0.6 倍體積異丙醇，並靜置 30 min 以沉澱 DNA，再置於 15000 g 離心 30 min，棄上層液，加入酒精 (70%，v/v) 500 μ L 清洗，再以 15000 g 離心 10 min，棄上層液，沉澱之 DNA 以去離子水溶解。

四、聚合酵素鏈鎖反應 (PCR)

本研究所使用之引子對及其 PCR 條件如下

(一) chloroplast sHSP primer, ER sHSP primer, cytosolic classI sHSP primer 及 mitochondrion sHSP primer

94°C 3 分鐘；94°C 0 秒，40°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘，40 個循環；72°C 10 分鐘

(二) C terminal primer (1 以及 2)

94°C 3 分鐘；94°C 0 秒，40°C 20 秒，72°C 1 分鐘，40 個循環；72°C 10 分鐘

(三) C terminal primer (3 以及 4)

94°C 3 分鐘；94°C 0 秒，54°C 20 秒，72°C 20 秒，35 個循環；72°C 10 分鐘

五、目標 DNA 片段的選殖

將 PCR 所得之產物進行 TA cloning，藉以選殖出小分子熱休克蛋白之序列。PCR 產物經由 TA cloning 後，進行接合反應後以 *E. coli* 進行轉型作用。再針對成功的轉型株中萃取其質體 DNA 進行 PCR 分析和限制酵素確定後進行定序。本研究所使用之 TA cloning 套組為益生生技開發股份有限公司出品之套組。

六、遺傳譜系分析

定序後之序列經由和基因庫的資料進行排列比對後，遺傳譜系樹狀圖利用 PHYLIP program (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phylip-uk.html>) 分析。樹狀圖所依據的 algorithms 為 neighbor joining, maximum parsimony 和 maximum likelihood。

第參章、結果與討論

一、 樣品採集

採集樣品如表一所列。依據前人之調查可知西施花 (*R. ellipticum* Maxim.) 之海拔分布約由 300 公尺至 2500 公尺，而本次採集之樣品分別位於 1966 公尺、2100 公尺以及 2188 公尺，其海拔高度之差距皆約為 100 公尺，採樣涵蓋範圍約為 200 公尺；金毛杜鵑 (*R. rubropilosum* Hayata) 一般分布海拔為小於 2500 公尺，而本次採集只取得兩個樣本，分別分布於 2376 公尺以及 2520 公尺，相差約 150 公尺，且其中 G3 之高度以超過一般分佈之高度；南湖杜鵑 (*R. hyperythrum* Hay) 根據前人記載其分布約由 1400 公尺至 3700 公尺之間，但由採樣時發現其只分佈於南湖圈谷附近，且因其分布區域較為狹窄，因此所採得之樣本分別位於 3080 公尺、3130 公尺、3389 公尺以及 3517 公尺，其海拔差距分別為 50 公尺、260 公尺以及 130 公尺，採樣涵蓋範圍約為 440 公尺；埔里杜鵑 (*R. breviperulatum* Hayata) 於分類上又包含了原本的南澳杜鵑，學者以葉綠體 DNA 上之 *trnL-trnF* 區域以及核糖體核酸內轉錄間隔區序列進行分析，結果發現南澳杜鵑與埔里杜鵑相似，且兩者於外觀等條件皆相近，因此已將此兩種杜鵑植物併為一類，統稱為埔里杜鵑，埔里杜鵑之分布範圍約由 1400 公尺至 2376 公尺，本研究之樣本分別為於 1333 公尺、1966 公尺、2105 公尺以及 2376 公尺，其海拔分布分別相差 633 公尺、139 公尺以及 271 公尺，總涵蓋範圍約為 1043 公尺；紅毛杜鵑 (*R. rubropilosum* Hayata) 根據過去之記載其海拔分布約為 2000 公尺至 3600 公尺之間，本研究之採樣點分別為 2376 公尺、2555 公尺、2687 公尺以及 3130 公尺，其分布分別相差 179 公尺、132 公尺以及 443 公尺，總涵蓋範圍約為 754 公尺。

台灣高山杜鵑 (*R. taiwanalpinum* Ohwi) 以及台灣杜鵑 (*R. taiwanianum* Ying) 在太魯閣國家公園區內所覓得之採樣點較少，因此分別只採得一種樣本；於前人研究中可知台灣高山杜鵑之分布範圍為 2800 公尺至 3000 公尺，本研究之採樣點高度為 2967 公尺；台灣杜鵑之分佈由前人研究可知約為 600 公尺至 2500 公尺之間，本次所採集之樣本海拔高度為 1650 公尺。玉山杜鵑 (*R. pseudochrysanthum* Hay) 以及森氏杜鵑 (*R. morii* Hayata) 因其外觀相近且核酸序列分析結果相同，故已被併為一種杜鵑，但其分布仍有些微之差異，本研究之採樣共取得玉山杜鵑三種及森氏杜鵑兩種，森氏杜鵑之採樣點分別位於 2579 公尺及 2683 公尺，玉山杜鵑之採樣點則分別為 3159 公尺、3217 公尺以及 3750 公尺，五個樣本的海拔差距分別為

104 公尺、476 公尺、58 公尺及 533 公尺，過去文獻記載玉山杜鵑之分布約為 3000 公尺至 4000 公尺之間，但若將森氏杜鵑併入玉山杜鵑中，則其分布高度應往下修正。

二、 小分子熱休克蛋白之資料庫搜尋與引子對設計

(一) 以相近物種之小分子熱休克蛋白核酸序列設計引子對

由於過去無前人對杜鵑屬之小分子熱休克蛋白進行研究，因此於 Genebank 中搜尋相關植物之小分子熱休克蛋白胺基酸及核酸序列，以作為研究杜鵑屬小分子熱休克蛋白之基石。因前人研究發現小分子熱休克蛋白可依其位置分為 cytosolic classI, cytosolic classII, ER, chloroplast, mitochondrion 五類，這五類 sHSP 之間序列不相似，但不同植物之同一類 sHSP 之間之序列相似度則較高，因此將其分為五群比對其序列，以找出序列相同之處設計引子對。圖四為不同植物之 chloroplast sHSP 之胺基酸序列，其包含阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)、小麥 (*Triticum aestivum*)、稻米 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、小康草 (*Agrostis stolonifera*)、大豆 (*Glycine max*)、碗豆 (*Pisum sativum*)、蕃茄 (*Lycopersicon esculentum*)、菸草 (*Nicotiana tabacum*) 與矮牽牛 (*Petunia x hybrida hort.*)，序列比對發現其在 3'端具有序列保守度較高之區域，以這些區域進行引子對之設計 (表二)。圖五為不同植物之 ER sHSP 胺基酸序列，其包含阿拉伯芥、大豆、碗豆、蕃茄、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 與稻米，以其保守性區域進行引子對之設計 (表三)。圖六為不同植物之 cytosolic classI sHSP 胺基酸序列，其包含阿拉伯芥兩種 cytosolic classI sHSP 之序列、大豆、碗豆、蕃茄、稻米、菟絲子 (*Cuscuta japonica*)、芥藍 (*Brassica oleracea*)、小白菜 (*Brassica rapa*)、玉米、菸草、向日葵 (*Helianthus annuus*)、羊乳 (*Codonopsis lanceolata*) 與桃 (*Prunus persica*)，以其保守性區域進行引子對之設計 (表四)。圖七為不同植物之 mitochondrion sHSP 胺基酸序列，其包含阿拉伯芥、大豆、稻米、玉米、貓眼草 (*Euphorbia esula*)、小麥與豌豆，以其保守性區域進行引子對之設計 (表五)。因為 cytosolic classII 之相關胺基酸序列較少，無法以其進行引子對的設計，因此在此實驗中將不對 cytosolic classII sHSP 進行試驗。

分別以為 chloroplast sHSP, ER sHSP, cytosolic classI sHSP 以及 mitochondrion sHSP 設計之引子對進行聚合酵素鏈鎖反應，結果發現其截無法擴增出特定片段，或無法擴增出片段，由於現有之研究植物多為單子葉植物，因此可能其小分子熱休

克蛋白之核酸序列與雙子葉植物有較大之差異，因此以其序列設計之引子對無法有效的擴增出杜鵑屬植物之小分子熱休克蛋白核酸片段，因此須以其他方式對杜鵑屬之小分子熱休克蛋白進行引子對設計。

(二) 以小分子熱休克蛋白 C 端胺基酸序列設計引子對

不同類之小分子熱休克蛋白其胺基酸 C 端皆有一段與 crystallin 蛋白相似的序列 (圖八)。由 Jong *et al.* (1993) 對 α -crystallin 以及小分子熱休克蛋白之研究可知，小分子熱休克蛋白之胺基酸 C 端與 crystallin 蛋白序列相近，因此將蕃茄小分子熱休克蛋白 C 端之胺基酸序列以軟體轉為核酸序列 (圖九)，並以此序列設計一具專一性的引子對 C terminal-1/C terminal-2 (表六)。結果如圖十所示，以此非專一性引子對杜鵑屬植物進行聚合酵素鏈鎖反應之後可得到數個產物，由於從圖九之核酸序列可知產物長度約為 250 bp 者才是本研究所要片段，因此將長度約為 250 bp 處的產物進行割膠萃取，並以 TA cloning 進行試驗以得到單一片段。將 TA cloning 所得之單一片段進行定序與比對之後，得到一杜鵑植物 cytosolic classI 的小分子熱休克蛋白之核酸序列。

(三) 以杜鵑屬植物核苷酸序列設計專一性較高之引子對

根據 TA cloning 所得之小分子熱休克蛋白核酸序列設計一對其具有專一性之引子對 C terminal-3/ C terminal-4 (表六)，以此組引子對二十五個樣本進行聚合酵素鏈鎖反應，皆可得到一長度約為 250 bp 之產物 (圖十一)，將此些產物進行定序以進行分析。

三、杜鵑屬植物親源關係之鑑定

將定序所得之杜鵑屬植物小分子熱休克蛋白的部份序列進行 alignment，其結果如圖十二，並以此結果進行距離矩陣之運算 (圖十三) 以及樹狀圖之分析。本研究所使用之析方法為 neighbor joining method (NJ), maximum likelihood (ML) 及 maximum parsimony (PA)，其中 NJ 係屬 distance matrix method 之一種，此類方法是以兩兩相比所得之相異度作成矩陣，並根據此距離矩陣以加乘性製樹法構築親源樹，此方法構築的樹其樹形與分支長度所代表的距離最近似目前所知序列計算之距離，但此方法只用了總相異度值來製圖，而忽略了個別序列之位置所代表之意義；而 ML 及 PA 皆是以 discrete character method 方法進行運算，此種方式所依據之

原理係認為目前之序列由同一祖先經過最精簡之改變而來，此方法在眾多可能之樹形中，選用最簡單的，尋求以最少之序列改變總和來決定定位點。進行此三種分析所得之結果如圖十四、圖十五及圖十六，由此三個圖中可發現，南湖杜鵑、玉山杜鵑及森氏杜鵑皆被分在同一群中，其他杜鵑屬植物則並無依照品系分群，而是呈現分散分佈的情況，因此以其分析結果來看，小分子熱休克蛋白之 C 端序列並不足以作為其親源關係區分的標準。

四、杜鵑屬植物小分子熱休克蛋白及其地理分布之關係

由 NJ、ML 以及 PA 之分析結果可發現南湖杜鵑、玉山杜鵑及森氏杜鵑接與其他品系之杜鵑明顯區分開，若以其海拔分布來看，南湖杜鵑與玉山杜鵑之分布皆高於海拔 3000 公尺以上，而森氏杜鵑的兩個樣本則皆高於 2500 公尺，而由圖十五可發現，其他品系中唯一採樣點高於 3000 公尺之紅毛杜鵑 R8，其亦與此三種杜鵑歸於同一群中。以圖十二分析可發現，南湖杜鵑、玉山杜鵑及森氏杜鵑於第四十九以及第一百七十四個核苷酸皆為 A，而其他品系之杜鵑為 G，因而造成其分群之差異，若由此段序列之胺基酸序列來看，此兩個核苷酸之差異對其轉譯後之胺基酸序列並無影響。根據 Jong *et al.* (1993) 之研究發現位於第六胺基酸的 E、第三十六的 G、第四十七的 D、第六十六的 P 具有相當高的保守性，因此推論此四個胺基酸殘基對小分子熱休克蛋白構型之產生具有重要的影響，本研究之結果亦與其符合。

黃與徐 (2001) 以葉綠體 DNA 之 *trnF-trnL* 基因間區間序列比較已知八種杜鵑之親緣關係，結果發現此區域內有 16 個變異處，其中 10 個可用以判定親緣關係；以軟體進行 NJ 及 PA 樹狀親緣關係圖的分析，均可得到三個主要之分群。第一群包含玉山杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑、南湖杜鵑及台灣杜鵑，台灣杜鵑可自此群單獨分出為一群。第二群為金毛杜鵑及烏來杜鵑。西施花則單獨獨立為第三群，而與其他七種杜鵑有較遠之親緣關係。且其研究發現玉山杜鵑、森氏杜鵑、紅星杜鵑及南湖杜鵑之間有非常接近的親緣關係，而此結果亦與形態的證據吻合。蔡 (2002) 以 20 種杜鵑進行其核糖體核酸 (ribosome DNA, rDNA) 內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 之序列分析，根據結果將埔里杜鵑、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、大屯杜鵑與唐杜鵑歸於第 1 群；長卵葉馬銀花與馬銀花歸在第 2 群；南湖杜鵑、森氏杜鵑、台灣杜鵑及玉山杜鵑與紅星杜鵑歸在第 3 群。此外，西施花、黃花杜鵑及守城滿山紅則分別

自成一群。

綜合上述兩者之結果可以發現南湖杜鵑、森氏杜鵑、台灣杜鵑及玉山杜鵑四者於葉綠體 DNA 上 *trnF-trnL* 以及 rDNA 上之 ITS 的序列皆非常相似，因而此四種杜鵑以上述兩個區域的核酸序列進行分析時，被區分於同一群中；而本試驗發現南湖杜鵑、玉山杜鵑及森氏杜鵑之小分子熱休克蛋白核酸序列彼此相似，可與其他品系之杜鵑進行區分，台灣杜鵑則和其他生長海拔高度較低的杜鵑品系較為相似，此一結果與先前學者略有差異。由於先前學者之觀察認為台灣杜鵑與南湖杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑外觀相似，且葉綠體及核糖體 DNA 的序列相近，因而可將此四者歸為同一類群，但以小分子熱休克蛋白之序列觀察，台灣杜鵑與另外三者差異較大，且被歸為不同類群，故此一結果不但可作為區分台灣杜鵑與南湖杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑之分子標誌，亦可解釋外觀相似之杜鵑為何具有不同之環境適應性。

綜合上述之結果可知，杜鵑屬小分子熱休克蛋白 C 端核酸序列可明顯區分高山杜鵑與其他分部較廣且分佈海拔較低之杜鵑，其約以海拔 3000 公尺為一分界點，而這些核酸序列上之差異對其轉譯後胺基酸序列之影響並不大，其可能原因係為本研究所使用區域之胺基酸序列會造成小分子熱休克蛋白的構型差異，因此其胺基酸序列之保守性相當高，但由其核酸序列仍可觀測到其演化上之差異。過去學者原本將森氏杜鵑以及玉山杜鵑分為兩品系，但因其外觀相似以及經過分子標誌之確認後發現其葉綠體 DNA 上之 *trnL-trnF* 區域以及核糖體 DNA 上的 ITS 區域序列極為相近，因此將其並為一類，於本實驗亦可發現縱使森氏杜鵑之樣本採集點皆低於 3000 公尺，森氏杜鵑與玉山杜鵑之小分子熱休克蛋白核酸序列相似度仍相當高，由此可證實此兩者雖有外觀上些微之差異，但應為同一品系之杜鵑；由玉山杜鵑及森氏杜鵑之比較結果亦可發現，杜鵑屬植物之遷移應為由高海拔區域遷徙至低海拔地區，此一結果亦呼應過去學者認為杜鵑屬植物係由高山遷移至平地之結論。由於小分子熱休克蛋白對植物之分布有很大的影響，本研究除了提供一套可進行高海拔及中低海拔同屬植物區分的方法外，亦希望藉由此套方法可對其他品系之植物進行研究，以協助太魯閣國家公園內植物之研究，並將其應用於國家公園之經營管理。

第肆章、謝 誌

本計劃承蒙內政部營建署太魯閣國家公園管理處提供研究經費，並得到太魯閣國家公

園管理處人員之協助，僅此致謝。

參考文獻

1. 黃士穎、徐國凱。 2001。 應用葉綠體 *trnF-trnL* 核酸序列探討臺灣八種杜鵑花之分子親緣關係。 台灣林業科學 16 (3) : 153-160。
2. 蔡奇助、黃柄龍。 2002。 高雄區農業改良場百週年專刊。 66-67。
3. Eifert, C., Burgio, M. R., Bennett, P. M., Salerno, J. C., Koretz, J. F. 2005. N- terminal control of small heat shock protein oligomerization: changes in aggregate size and chaperone-like function. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1748: 146-156.
4. Farnsworth, P., Singh, K. 2004. Structure function relationship among α -crystallin related small heat shock proteins. *Experimental Eye Research*. 79: 787-794.
5. Helm, K. W., Lee, G. J., Vierling, E. 1997. Expression and native structure of cytosolic class II small heat-shock proteins. *Plant Physiology*. 114: 1477-1485.
6. Jong, W. W., Leunissen, J. A. M., Voorter, C. E. M. 1993. Evolution of the α -crystallin/small heat shock protein family. *Molecular Biology and Evolution*. 10(1): 103-126.
7. Lee, G. J. and Vierling, E. 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 system to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology*. 122: 189-198.
8. Pasta, S. Y., Raman, B., Ramakrishna, T., Roa, C. M. 2003. Role of the conserved SRLFDQFFG region of α -crystallin, a small heat shock protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(51): 51159-51166.
9. Rampino, M. G. P., Lupotto, E., Marmioli, N., Perrotta, C. 2005. The effect of heat stress and cadmium ions on the expression of a small *hsp* gene in barley and maize. *Journal of Cereal Science*. 42: 25-31.
10. Sun, W., Montagu, M. V., Verbruggen, N. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1577: 1-9.
11. Salerno, J. C., Eifert, C. L., Salerno, K. M., Koretz, J. F. 2003. Structural diversity in the

small heat shock protein superfamily: control of aggregation by the N-terminal region. *Protein Engineering*. 16(11): 847-851.

12. Stamler, R., Kappe, G., Boelens, W., Slingsby, C. 2005. Wrapping the α -crystallin domain fold in a chaperone assembly. *Journal of Molecular Biology*. 353: 68-79.
13. Taylor, R. P. and Benjamin, I. J. 2005. Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*. 38: 433-444.
14. Waters, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat shock protein in plants. *Genetics*. 141: 785-795.
15. Waters, E. R. 2003. Molecular adaptation and the origin of land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 456-463.
16. Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9 (5): 244-252.