



公開

不公開

執行機關識別碼：040102FCR1

# 行政院農業委員會九十二年度科技研究計畫研究報告

資訊庫編號：922309

計畫名稱：**台灣原生杜鵑分子親緣關係與保育**

計畫編號：**92農科-4.1.2-林-R1(7)**

執行期限：**92年1月1日至92年12月31日**

計畫主持人：**黃士穎**

研究人員：**吳淑華、徐瓏綺、蕭逸文、張光毅、陳玉玲**

執行機關：**私立中國文化大學**

# 臺灣原生杜鵑花之分子親緣關係與保育

黃士穎 黃錦源 徐瓏綺

## 摘要

本研究藉由葉綠體 DNA 之 *trnF-trnL*, *petG-trnP* 及 *atpB-rbcL* 三段基因間區間序列比較台灣原生杜鵑之親緣關係，其中 *petG-trnP* 之序列無法由所有樣品中獲得，因此以 *trnF-trnL* 及 *atpB-rbcL* 序列於排序後之全長為 1282 個鹼基對，此區域內有 168 個變異處，其中 45 個可用以判定親緣關係。核酸序列以 PAUP\* 軟體進行 parsimony 及 maximum likelihood 樹狀親緣關係圖的分析，均可得到兩個主要之分群。第一群包含黃花著生杜鵑、台灣杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑。第二群為馬銀花、西施花、守城滿山紅、唐杜鵑、細葉杜鵑、紅毛杜鵑、金毛杜鵑、南澳杜鵑、烏來杜鵑與中原杜鵑。上述第一群為高海拔、葉片為厚革質葉者；第二群為由馬銀花及西施花之薄革質葉演化出包括守城滿山紅、唐杜鵑、細葉杜鵑、紅毛杜鵑、金毛杜鵑、烏來杜鵑與中原杜鵑之紙質葉且為低海拔之原生杜鵑。本研究結果亦顯示唐杜鵑、烏來杜鵑、中原杜鵑及細葉杜鵑之親緣關係非常接近；另外，玉山杜鵑、森氏杜鵑、紅星杜鵑及南湖杜鵑之親緣也極為相近，但也發現玉山杜鵑及森氏杜鵑可能是由紅星杜鵑及南湖杜鵑演化而來。如依 maximum likelihood 之演化樹狀圖而言，很可能玉山杜鵑、森氏杜鵑、紅星杜鵑及南湖杜鵑之生物地理演化是由台灣北部往南遷移。

**關鍵詞：**葉綠體 DNA、分子親緣關係、杜鵑

Molecular phylogeny and conservation of Taiwanese *Rhododendron* species based on  
chloroplast DNA sequences

Shih-Ying Hwang, Hwang Ching-Yuan and Hsu Long-Chi

[Summary]

Phylogenetic relationships among species of *Rhododendron* were derived from sequence comparisons of the chloroplast *trnF-trnL*, *petG-trnP* & *atpB-rbcL* intergenic spacer region. We experienced difficulty in obtaining *petG-trnP* sequences from all species, therefore, the aligned sequences of *trnF-trnL* and *atpB-rbcL* were 1282 base pairs. The region contained 168 variable sites, of which 45 were phylogenetically informative. Neighbor-joining and parsimony analyses were conducted using MEGA and PAUP. Identical topology with two major clades was obtained from parsimony and neighbor-joining trees. Clade 1 consisted of *R. ovatum*, *R. ellipticum*, *R. mariesii*, *R. noriakianum*, *R. nakaharai*, *R. simsii*, *R. kanehirai*, *R. breviperulatum*, *R. rubropilosum*, and *R. oldhamii*. The clade 2 consisted of *R. kawakamii*, *R. formosanum*, *R. moriii*, *R. pseudochrysanthum*, and *R. hyperythrum*. Close phylogenetic relationships among *R. pseudochrysanthum*, *R. morii*, *R. rubropunctatum*, and *R. hyperythrum* based on the cpDNA sequences agreed with morphological characters. However, *R. rubropunctatum*, is ancestral to *R. pseudochrysanthum* and *R. morii*, which migrated south after the invasion of its most recent common ancestor.

**Key words:** chloroplast DNA, molecular phylogenetics, *Rhododendron*, systematics, *trnF*(GAA)-*trnL*(UAA).

## 緒言

杜鵑花隸屬於杜鵑花科 (Ericaceae)、杜鵑花屬 (*Rhododendron*)，為顯花植物中相當大的一個屬，由於其花色鮮豔、花期長又容易栽種，而被廣泛運用於造景及盆栽上。全世界杜鵑花估計約在 600-1000 種之間，其分佈範圍幾遍及全球，除了非洲及南美洲外都可以見到其蹤跡。分佈北界可至俄國的西伯利亞地區，南界則達澳洲昆士蘭 (Feng 1988)，其中約有 50% 的品種生長於東亞及東南亞等熱帶地區。

台灣地區杜鵑花從平地到近 4000 公尺的高山皆可見其蹤影，分佈範圍廣泛、遍及全省。傳統上，植物的分類多是依照外部形態上的特徵，如葉形、葉質、花色、及花序等，但植物外部形態容易受環境影響而產生變異，在鑑定時常會因此發生誤判的情形 (Iqbal et al. 1995)。在台灣地區杜鵑花的分類中，紅星杜鵑 (*R. rubropunctatum* Hayata)、玉山杜鵑 (*R. pseudochrysanthum* Hayata)、及森氏杜鵑 (*R. morii* Hayata) 是否為同一種，一直是學者間爭議的焦點，究其原因即在彼此之間的外表形態十分相似。在外觀上玉山杜鵑、森氏杜鵑及紅星杜鵑均為厚革質葉，且三者葉緣均有反捲現象；玉山杜鵑與森氏杜鵑葉背有柔質的細絨毛，紅星杜鵑卻無；另外玉山杜鵑與森氏杜鵑分佈於台灣北部及中部超過 1600 公尺的高山上，而紅星杜鵑僅零星分佈於北部低海拔山區。這些是紅星杜鵑、玉山杜鵑與森氏杜鵑三者較具差異的地方。另外，文獻常有提及所謂北降現象，暗示紅星杜鵑是由玉山杜鵑及森氏杜鵑演化而來，然而並無科學證據可以支持此種描述。

玉山杜鵑與森氏杜鵑一直為人所爭議的部份在於兩者在形態上、地理分佈上的雷同，在外表形態上曾有針對下列各特徵進行過研究，包括葉緣反捲程度、葉背絨毛顏色、花期、及海拔分佈。Pan (1988)及 Lu and Yang (1989)等人觀察隨著

由高海拔往低海拔移動，玉山杜鵑及森氏杜鵑葉緣反捲程度會逐漸降低、葉背絨毛顏色則由白色漸為白褐色，再為褐色、而花期則隨海拔高度降低而逐漸提早，兩者差異隨海拔高度呈連續性的變化，基於上述結果故主張將森氏杜鵑合併於玉山杜鵑之下。紅星杜鵑則以其葉片背面有暗紅色腺點的特徵而被多數分類學家獨立於玉山杜鵑及森氏杜鵑之外(Hsu 1973, Ying 1976, Li 1978)，但 Lu and Yang (1989) 針對玉山杜鵑、森氏杜鵑葉片細部觀察後才發現其葉背亦具有同樣之腺點，甚至將台灣杜鵑、南湖杜鵑葉背的絨毛清除後也可以發現相同的腺點，因此認為此暗紅色腺點不足為重要的分類依據，而主張將紅星杜鵑亦合併於玉山杜鵑。

有別於傳統以外部形態從事分類的方式，近年來分子層面進行分類相關的研究工作已不若過去困難。多種以聚合連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 為基礎的研究方法，如 PCR/RFLP、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 皆適合於相關的研究工作。特別是核酸序列應用在分類研究也十分適合，DNA 序列上鹼基的差異可以用來測量各個種間的遺傳距離 (Korn 1996)，進而推估相互間的親緣關係。因此，許多長久以來困擾分類學者的爭議物種陸續被以各種分子技術的研究方法解決 (Cros et al. 1998)。

葉綠體 DNA 為一環狀結構存在於植物葉綠體中，其基因組大小約在 120-150 kb 間，由於其序列組成突變頻率低，序列的演化相當保守，故在植物物種間差異小 (Palmer and Stein 1986, Clegg and Zurawski 1992)。絕大多數被子植物的葉綠體基因組是由母系單親遺傳 (Reboud and Zeyl 1994)，僅由種子進行傳播，並沒有涉及花粉的傳遞，相較於核基因組，是比較容易追溯遺傳訊息的流向。而且葉綠體 DNA 的基因組沒有經過重組 (recombination)，僅會因偶發的突變造成序列上些許的改變，因此一旦發生變異很容易被察覺，故常被應用在分類方面的相關研究 (Wang et al. 1999)。本研究室在先前發表以葉綠體 DNA *trnF-trnL* 之基因間區間序

列進行試驗，其結果對於紅星杜鵑、玉山杜鵑及森氏杜鵑三者之關係無法釐清，目前研究以十六種台灣原生杜鵑並利用變異度較高的 *atpB-rbcL* 基因序列發現三者之親緣演化關係。

## 材料與方法

### 一、植物材料、DNA 萃取與定量

各杜鵑花品種樣品分別採自臺灣北部及中部山區，共計有黃花著生杜鵑、台灣杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑、玉山杜鵑、馬銀花、西施花、守城滿山紅、唐杜鵑、細葉杜鵑、紅毛杜鵑、金毛杜鵑、烏來杜鵑與中原杜鵑。DNA 萃取根據 Doyle and Doyle (1990) 的 CTAB 方法。於 5 mL 萃取液(2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0], 0.2 M EDTA, 1.4 M NaCl, 1% N-lauroylsarcosine, 1% SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) 中，加入經海沙與液態氮研磨之 0.3 g 葉片粉末，以萃取 DNA。萃取所得 DNA 以酒精沉澱，再以 70% 酒精清洗後溶解於 200  $\mu$ L TE buffer (pH 8.0)，並以 GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia) 定量。

### 二、葉綠體 *trnF-trnL* 基因間區間序列擴增、純化與定序

聚合酶連鎖反應所使用之葉綠體 DNA 引子對為 *trnF-trnL* 及 *atpB-rbcL* 兩段基因間區間序列。PCR 反應是以 Robocycler Gradient 96 (Stratagene) 進行溫度梯度之聚合連鎖反應，以尋得最適當之黏合溫度 (annealing temperature)，然後再以該黏合溫度進行各不同樣本之 PCR 擴增反應。PCR 反應過程為先於 94°C 進行 4 分鐘之解離 DNA 的步驟，然後進行 42 個循環的解離、黏合及聚合作用，解離步驟為 92°C 45 秒，黏合溫度 55°C，其黏合時間為 45 秒，最後之聚合作用為 72°C 2 分鐘 15 秒，在此 42 個循環後再經 10 分鐘於 72°C 聚合反應。PCR 反應液含有下列各成份：500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1 mM dNTPs, 2  $\mu$ M

primer, 20 ng template DNA, 1  $\mu$ g RNase, 及 0.5 unit *Taq* polymerase (Amersham Pharmacia)。反應總體積為50  $\mu$ L, 反應產物以1.75% (w/v) Nusieve 3:1 agarose (from FMC BioProducts)於0.5 X TBE電泳液進行分離, 並以ETBr染色並於紫外燈照射觀看結果, 依 $\phi$ X 174/*Hae*III分子量標記(Stratagene)以判斷PCR產物之大小, 並藉由CCD相機由影像抓取軟體取得影像並以TIF檔案存檔。以E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Omega Biotek)純化PCR產物, 並依照該純化組提供之方法進行PCR產物的純化, 定序之方法為利用*Taq* Dye Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem)之方法進行並以ABI373A 自動定序儀獲得DNA序列。

### 三、葉綠體 DNA 序列排序與親緣關係分析

DNA 序列以 CLUSTAL W 軟體排序 (Thompson et al. 1994)。排序後之序列以 PAUP 4.0b, 重建 parsimony 及 maximum likelihood 親緣樹(Swofford, 2001)。

### 結果與討論

本研究結果發現組合排序之 *trnF-trnL* 及 *atpB-rbcL* 兩段基因序列長為 1828 個鹼基, 其中有 168 個變異鹼基位置, 其中 45 個可用於 parsimony 親緣樹重建分析。我們以台灣馬醉木為外群進行各項分析。表一列出所有 45 個可用於 parsimony 親緣樹重建的變異位置。表二則為以 HKY85 鹼基取代模式分析而得之遺傳距離。在 45 個可用於 parsimony 親緣樹重建分析用之變異位置為全長之 3.51%, 其中 16 個為 transition, 29 個為 transversion, transition/transversion 比例為 0.552, 此結果顯示台灣原生杜鵑特別是特有種杜鵑尚處於演化早期, 也就是其種化時間可能相當短, 而未達於飽和之階段。根據 HKY85 鹼基取代模式所計算之遺傳距離(Table 2)顯示杜鵑物種間遺傳距離極短, 其範圍由 0.00000 至 0.05773。外群之台灣馬醉木

與杜鵑之遺傳距離明顯較高。

本研究與前人研究包括 Pan (1988)、Lu and Yang (1989)及 Hwang and Hsu (2001) 之研究均相符。不過我們的分析可提供以下新的觀點，以 parsimony tree 或 maximum likelihood tree 都將十六種杜鵑分成兩群，其中第一群包括馬銀花、西施花、守城滿山紅、唐杜鵑、烏來杜鵑、中原杜鵑、細葉杜鵑、南澳杜鵑、紅毛杜鵑及金毛杜鵑。其中紅毛杜鵑與金毛杜鵑極為相近應為同一種且是由南澳杜鵑演化而來，但是南澳杜鵑有較快之演化速率。再者，唐杜鵑、烏來杜鵑、中原杜鵑、細葉杜鵑也為非常相近之物種，其分歧之時間應相當短暫，可針對這些非常相近的物種研究其種化之機制，將有助於這些物種之保育工作。在分類上台灣原生杜鵑之分子親緣分析的結果顯示是由屬於 subgenus *azaleastrum* section *azaleastrum* 之馬銀花至同一個 subgenus 但為 section *chroniastrum* 之西施花，再演變至 subgenus *tsutsusi* section *tsutsusi* 之中原杜鵑、細葉杜鵑、紅毛杜鵑、烏來杜鵑、唐杜鵑及南澳杜鵑。在另外一群則是由屬於 subgenus *rhododendron* section *vireya* 之著生杜鵑演變至 subgenus *hymenanthes* 之屬於 subsection *argyrophylla* 之台灣杜鵑、屬於 subsection *pontica* 之南湖杜鵑與屬於 subsection *maculifera* 之玉山、紅星及森氏杜鵑。以雄蕊數目而言在第一群除馬銀花及南澳杜鵑為 5 枚外均為 10 枚；然而第二群則全部都是具有 10 枚雄蕊者。

本研究利用葉綠體 DNA 基因間區間序列的分子親緣結果與 Tsai 等(2003)所發表利用核 ITS 之研究分群結果大致是相符，唯馬銀花與西施花在該研究是比較靠近本研究之第二群而非與著生杜鵑等有較近之親緣關係。ITS 序列於親緣演化的研究雖常被採用但若使用於遺傳關係較遠者可因趨同演化(convergent evolution)之效應而不致造成問題，但於親緣關係較近之物種間有時因為 ITS 為重覆次數相當多



的序列，而這些重覆又經常發現有因 paralogous 演化而形成之變異，因此可能造成錯誤之分析結果(Buckler et al., 1997)。

在我們的研究結果中，由馬銀花一路演化至金毛杜鵑，其葉片形態質地是由半革質至紙質之演化趨勢。但極為值得注意的是，在此十六種台灣原生杜鵑中之另一群則是由半革質之黃花著生杜鵑一路演化成厚革質之台灣杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑。

根據本研究結果，我們推論台灣原生杜鵑的演生應有兩個支系。第一支系以黃花著生杜鵑可能由中國大陸或由日本經由琉球群島遷移至台灣則目前之數據無法判斷，且其祖先種已無法尋得，然而著生杜鵑到達台灣之地點應於台灣之北部，其後再往南遷移並且種化而為台灣杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑，因葉片質地為厚革質而可生長於高海拔。而另一支系則為由馬銀花以降之烏來杜鵑、中原杜鵑、細葉杜鵑、南澳杜鵑、紅毛杜鵑及金毛杜鵑，此一支系大都集中於北部而可能與其葉片為紙質質地較不耐寒之故而傾向只生長於較低海拔。

未來研究方向應以兩大分群內之特有種以族群為主體進行研究以確定這些特有種杜鵑之演化，如對紅星杜鵑、玉山杜鵑及森氏杜鵑之族群基因序列之演化進行研究以瞭解其演化之方向，以確立保育策略之正確，否則誤以為紅星杜鵑為森氏或玉山杜鵑之變種而有不同之保育策略。

## 引用文献

- Buckler ES, Ippolito A, Holtsford TP. 1997.** The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145:821-32.
- Clegg MT, Zurawski G. 1992.** Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. In: Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ, editors. *Molecular systematics of plants*. New York: Chapman and Hall. p 1-13.
- Cros JM, Combes C, Trouslot P, Anthony F, Hamon S, Charrier A, Lashermes P. 1998.** Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. *Mol Phylogenet Evol* 9 (1):109-17.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-5.
- Feng KM. 1988.** Chinese *Rhododendron*. Science Publisher. Beijing. [in Chinese]
- Hsu CC. 1973.** Biosystematic investigation on the *Rhododendron* of Taiwan. *Proc Natl Sci Coun* 6:13-50.
- Hwang SY, Hsu KK. 2001.** Molecular phylogeny and conservation of Taiwanese *Rhododendron* species based on chloroplast DNA sequences. *Taiwan J For Sci* 6: 153-60. [in Chinese with English summary]
- Iqbal JM, Paden DW, Rayburn AL. 1995.** Clonal stability of RAPD markers in three *Rhododendron* species. *J Environ Hort* 13:43-6.
- Korn KA. 1996.** Phylogenetic relationships of Empetraceae, Epacridaceae, Ericaceae, Monotropaceae, and Pyrolaceae: evidence from nuclear ribosomal 18S sequence data. *Ann Bot* 77:293-303.

- Li HL.** 1978. *Ericaceae*. In: Li HL, Liu TS, Huang TC, Koyama T, DeVol CE, editors. Flora of Taiwan. 1st edn., Vol 4, p 21-38.
- Lu SY, Yang YP.** 1989. A revision of *Rhododendron* (Ericaceae) of Taiwan. Taiwan For Res Ins New Ser 4:155-66. [in Chinese with English summary].
- Palmer JD, Stein DB.** 1986. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. *Curr Genet* 10:823-33.
- Pan FJ.** 1988. Altitudinal variation of *Rhododendron pseudochrysanthum* and *R. morii*. *Q J Chin For* 21:99-102. [in Chinese with English summary]
- Reboud X, Zeyl C.** 1994. Organelle inheritance in plants. *Heredity* 72:132-40.
- Swofford DL.** 2001. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony, PAUP\*4.0b8*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673-80.
- Tsai CC, Huang SC, Chen CH, Tseng YH, Huang PL, Tsai SH, Chou CH.** 2003. Genetic relationships of *Rhododendron* (Ericaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *J Hort Sci Biotech* 78: 234-40.
- Wang XR, Tsumura Y, Yoshimaru H, Nagasaka K, Szmidt AE.** 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. *Amer J Bot* 86:1742-53.
- Ying SS.** 1976. The Ericales of Taiwan. *Q J Chin For* 9:107-37.



Table 2. Genetic distances calculated from variable sites using the Kimura two-parameter model of base substitution (below the diagonal) among *Rhododendron* species and outgroup species in combined chloroplast *trnF-trnL* and *atpB-rbcL* intergenic spacer sequences. The numbers indicate the taxa sequence corresponding to table 2. The numbers indicate the species names as (1) *R. hyperythrum*, (2) *R. rubropunctatum*, (3) *R. morii*, (4) *R. pseudochrysanthum*, (5) *R. formosanum*, (6) *R. kawakamii*, (7) *R. ellipticum*, (8) *R. simsii*, (9) *R. kanehirai*, (10) *R. nakaharai*, (11) *R. noriakiianum*, (12) *R. rubropilosum*, (13) *R. oldhamii*, (14) *R. mariesii*, (15) *R. ovatum*, (16) *R. breviperulatum*, (17) *P. taiwanensis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1																
2	0.00924															
3	0.00505	0.00841														
4	0.00588	0.00924	0.00252													
5	0.01435	0.01685	0.01351	0.01433												
6	0.02546	0.02715	0.02377	0.02461	0.02257											
7	0.03145	0.03395	0.02973	0.03058	0.02751	0.03277										
8	0.02870	0.03122	0.02701	0.02785	0.02409	0.02928	0.01501									
9	0.02616	0.02867	0.02447	0.02531	0.02240	0.02762	0.01500	0.00664								
10	0.02363	0.02615	0.02194	0.02278	0.01991	0.02514	0.01249	0.00416	0.00248							
11	0.02362	0.02612	0.02193	0.02277	0.01989	0.02512	0.01250	0.00416	0.00249	0.00000						
12	0.02703	0.02953	0.02534	0.02617	0.02323	0.02762	0.01585	0.00911	0.00745	0.00580	0.00497					
13	0.02370	0.02623	0.02202	0.02285	0.01998	0.02521	0.01253	0.00664	0.00415	0.00249	0.00166	0.00166				
14	0.03129	0.03381	0.02962	0.03045	0.02744	0.03110	0.02003	0.01664	0.01495	0.01246	0.01246	0.01580	0.01251			
15	0.03295	0.03630	0.03297	0.03380	0.03301	0.03506	0.02914	0.02811	0.02648	0.02384	0.02398	0.02478	0.02234	0.02985		
16	0.05515	0.05773	0.05259	0.05427	0.05004	0.05429	0.04594	0.04056	0.03903	0.03736	0.03654	0.03732	0.03656	0.04673	0.04706	
17	0.08084	0.08716	0.08270	0.08358	0.08351	0.08646	0.08674	0.08268	0.08174	0.07998	0.07993	0.08186	0.07850	0.08387	0.09250	0.10904

Fig. 1. One of the 75 equally parsimonious trees generated by a heuristic search of 16 *Rhododendron* and outgroup species based on combined sequences of *trnF-trnL* and *atpB-rbcL* chloroplast intergenic spacers. Bootstrap values (1000 replicates) are given at the nodes. The computer program used was PAUP\* 4.0.

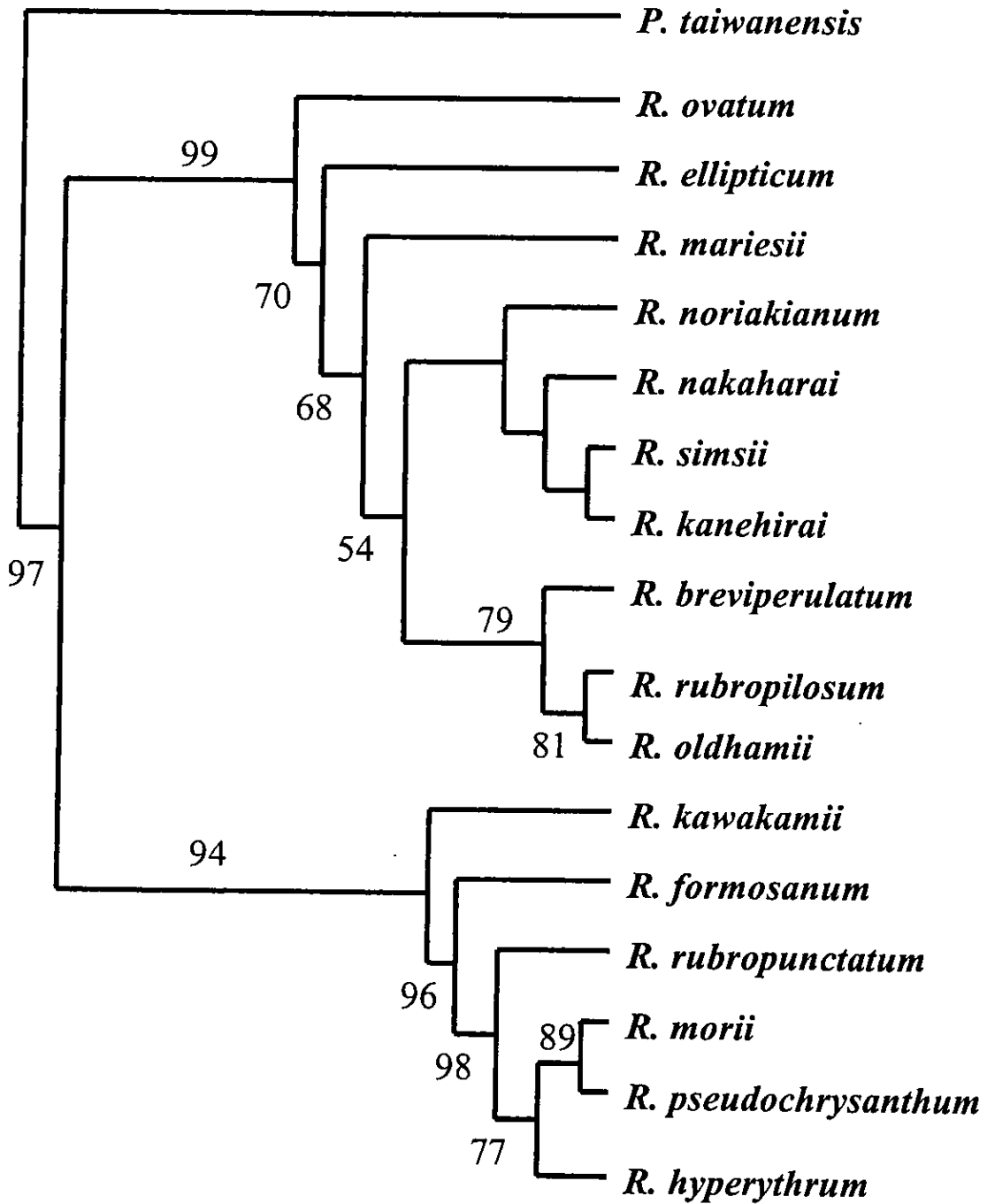


Fig. 2. Maximum likelihood tree reconstructed from combined sequences of *trnF-trnL* and *atpB-rbcL* chloroplast intergenic spacers of 16 *Rhododendron* and outgroup species. Bootstrap values (1000 replicates) are given at the nodes. The computer program used was TREEPUZZLE 5.0.

