



公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：090107e304

行政院農業委員會林務局九十四年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：942855

計畫名稱：**台灣高山植物基因庫遺傳多樣性研究及保育--高山杜鵑屬 (第1年/全程3年)**

(英文名稱) **The genetic diversity and conservation of alpine plants in Taiwan--Rhododendron**

計畫編號：94農科-9.1.7-務-e3(4)

全程計畫期間：94年1月1日至96年12月29日

本年計畫期間：94年1月1日至94年12月31日

計畫主持人：黃士穎

執行機關：私立中國文化大學

台灣高山植物基因庫遺傳多樣性研究及保育---高山杜鵑屬

研究報告

黃士穎

文化大學生物科技研究所

摘要

已獲得十六種杜鵑葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因。在全部 192 個篩選序列之中有 44 個序列屬於葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因，經分析有 29 個序列是獨立而非重覆出現的序列，因此以此 29 個序列進一步做分析。依據基因序列變化之情況，我們認為在杜鵑屬植物之葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因僅有一種，但屬於厚革質葉之五種杜鵑的演化速率自與最近共同祖先分歧後即有快速演化之趨勢。葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因 ACD 區域屬於台灣杜鵑之特殊突變之胺基酸為 lysine 轉變為 arginine 及 glycine 轉變為 serine。屬於台灣杜鵑、森氏杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑及玉山杜鵑特殊胺基酸突變為 methionine 轉變為 leucine 及由 valine 轉變為 isoleucine。lysine 轉變為 arginine 與低分子量熱休克蛋白之動態變化以維持 molecular chaperone 活性有關。methionine 轉變為 leucine 及由 valine 轉變為 isoleucine 則是由較低之疏水性胺基酸轉變為較高疏水性胺基酸而與提昇與受質鍵結之能力有關。此三個胺基酸之突變經檢測亦發現之正向天擇所造成。

Abstract

We have obtained the chloroplast small heat shock protein gene sequences for 16 Taiwanese *Rhododendron* species. In total 192 sequences were screened, of which 44 were chloroplast small heat shock protein gene sequences. Twenty-nine out of the 44 sequences were unique sequences and therefore were used for subsequent analyses. From the maximum likelihood gene tree, only one type of chloroplast small heat shock protein

gene in *Rhododendron* was inferred. Elevated evolutionary rate of this gene was observed for the coriaceous leaves species in *Rhododendron*. When treating *R. formosanum* as foreground we obtained two sites that are positively selected (lysine to arginine and glycine to serine). Moreover, another two sites were detected as positively selected when *R. formosanum* together with *R. hyperythrum*, *R. morii*, *R. rubropunctatum*, and *R. pseudochrysanthum* were set as foreground branch. These changes in amino acids are related to either increase in the efficiency in dynamic agglutination of small heat shock protein subunits or increase in the hydrophobicity which enhance the molecular chaperone activity of small heat shock proteins.

前言

物種間非同義置換(non-synonymous substitution, K_a)較同義置換(synonymous substitution, K_s)相對少，代表蛋白質胺基酸序列的演化受到功能上的限制，此亦代表某一蛋白質與該物種之適合度有相當緊密之關係，因此該基因之演化或突變受到淨化天擇(purifying selection)的影響。一單緣群內之物種可能會分歧為一系列之支系，而在分歧之過程基因的複製或較為鬆散的淨化天擇會導致orthologous gene在功能上的演變以適應不同環境，以利物種之生存。基因的演化經由排序(alignment)我們可以估算幾個分子演化的參數 (Li, 1997)，這些參數可有(1)同義置換(synonymous substitution, K_s)之比例；(2)非同義置換(non-synonymous substitution, K_a)之比例；(3) K_a/K_s 之比值。 $K_a/K_s=\omega$ ， ω 值的大小可分為三種情況來說明；首先如果 $\omega=1$ ，也就是非同義置換與同義置換之比例相當，如此則胺基酸的取代置換(非同義置換)並沒有因天擇的因素而被清除；如果 $\omega<1$ 則大部份的取代置換都被清除，也就是天擇不容許取代置換，且因為這些取代置換的發生造成個體無法生存而被淘汰；另外如果 $\omega>1$ 則顯示取代置換是被天擇所容許而與個體或物種適應環境有關(Wagner, 2002)。但是以 $\omega>1$ 做為標準，是以所研究之DNA序列全長為基礎，以探討是否有正向天擇(positive selection)存在，來瞭解gene duplication或物種種化之adaptive evolution的情況，如此可能過於嚴苛而導致大部份的研究都無法察覺到有正向天擇之演化。

近年來Yang (1997)所發展出之一套分析軟體PAML (Phylogenetic analysis using maximum likelihood) 利用codon substitution evolution的模式可以檢測出個別密碼的取代是否與正向天擇有關。PAML 的分析方法被許多的研究人員應用以瞭解gene duplication與adaptive evolution的關係。有關這一方面的研究除了植物方面以外，也被應用於豬口蹄疫 (Haydon et al., 2001)及登格熱 (Bennett et al., 2003)病毒快速演化的研究以瞭解相關病毒演化過程有那些密碼或胺基酸是受正向天擇的影響，以應用於疫苗之設計開發。在植物方面有一很明顯的例子：Bishop et al. (2000)利用 PAML 的分析方法尋得植物幾丁酶(chitinase)在與真菌共同演化的過程中，酵素蛋白質結構上有特殊的胺基酸是受正向天擇所選汰。阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)的R2R3-AtMYB 基因家族為轉錄因子，其主要之binding domain (R2 domain and R3 domain)有明顯之取代置換發生，而與辨識新的基因表現調控目標序列有關 (Jia et al., 2003)。因此利用PAML的分析方法可檢驗蛋白質或其某一個domain有適應性演化的改變，進而瞭解基因功能之演化。

大部份熱休克蛋白質的功能均是扮演著分子伴護蛋白 (molecular chaperone)的功能。熱休克蛋白基因是一大群分子伴護蛋白基因中之一小群。分子伴護蛋白之主要功能在於使其他蛋白質能免於發生不適當的聚集 (inappropriate aggregations)，除此之外分子伴護蛋白尚與蛋白質的轉運 (translocation)、結構皺摺(folding)、組合 (assembly)、多結構單位及不適當皺摺蛋白的分解等功能有關。這些功能對於正常的細胞是相當重要的，然而在逆境下這些功能更形重要(Sun et al., 2002)。低分子量熱休克蛋白是在高溫逆境可被誘導的一群蛋白質，其分子量通常小於30 KDas。據 Vierling (1991)至少20 種以上的高等植物可有多至40種不同之低分子量熱休克蛋白。植物低分子量熱休克蛋白的歧化性 (diversification)是在與動物分歧之後才演化出。如此多的植物低分子量熱休克蛋白的歧化性代表著植物因應環境之差異即適應環境而衍生的遺傳變異。植物低分子量熱休克蛋白基因為多基因家族。目前已知至少六種不同之基因家族，這些基因家族均為核基因。他們依DNA序列之相似性及在細胞內之位置可區分為六種不同之類型。有一個葉綠體低分子量熱休克蛋白；一

個內質網低分子量熱休克蛋白；三種細胞質低分子量熱休克蛋白；及一個粒線體低分子量熱休克蛋白 (Waters, 1995; Sun et al., 2002)。

近年來熱休克蛋白在物種演化與生態上的角色也愈來愈受重視 (Sorensen et al., 2003)。低分子量熱休克蛋白基因的蛋白質結構上主要有一個 α -crystallin Domain (ACD)，這個ACD可用以判斷是否為低分子量熱休克蛋白之依據。同時低分子量熱休克蛋白之不同基因家族如葉綠體型式另有一個methionine-rich domain在ACD之前，其它如class I及class II cytosolic型式及粒線體型式的低分子量熱休克蛋白基因在基因序列上也可與葉綠體型式區別，而容許我們去選殖。最近葉綠體型式的低分子量熱休克蛋白被報導與保護光合作用系統的完整性及植物在含高量重金屬污染的環境下與保護光合系統不受重金屬危害的能力有關(Barua et al., 2003; Heckathorn et al., 2004)。

一些研究顯示ACD的功能與低分子量熱休克蛋白次單位的交互作用及保護其它蛋白質有關 (Ganea, 2001)。ACD的胺基酸疏水性(hydrophobicity)又與低分子量熱休克蛋白的molecular chaperone能力有關，在高溫或高UV逆境下疏水性胺基酸會曝露出而與unfolded protein的疏水性胺基酸產生鍵結以保護之(Sharma et al., 1998)。在*Mycobacterium tuberculosis*如果將sHSP16.3之ACD的疏水性胺基酸leucine置換為低疏水性的alanine或valine導致molecular chaperone功能減弱 (Mao and Chang 2001)。因此低分子量熱休克蛋白之ACD疏水性胺基酸對低分子量熱休克蛋白之chaperone功能相當重要(Schroff et al., 2001; Srinivas et al., 1997; Chowdary et al., 2004)。

目前我們研究室有關原生杜鵑的研究藉由葉綠體DNA之兩段基因間區間序列比較已知十六種杜鵑之親緣關係，這兩段基因間區間序列包括trnF-trnL 及rbcL-atpB。杜鵑兩段基因間區間序列經排序後之全長分別為401、841個鹼基對。核酸序列以PAUP*軟體進行parsimony與maximum likelihood樹狀親緣關係圖分析，發現台灣原生杜鵑可分為兩大群：第一群依演化路徑為黃花著生杜鵑、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。基本上高山杜鵑與低海拔杜鵑各自為單緣群，因此台灣原生杜鵑的分佈由低海拔往高海拔延伸。以高山杜鵑之森氏杜鵑及玉山杜鵑而言經族群基因譜系(genealogy)研究分析發現這兩種度高山杜鵑是源自紅星杜鵑。基於上述研究之結果發現台灣原生杜鵑之兩大分群最大的差異在於葉片為革質及紙質之差別。以葉綠體低分子量熱休克蛋白基因之ACD (α -crystallin domain)而言，我們已發現台灣原生杜鵑之紙質種與革質種間有基因密碼之變異，而可能與杜鵑適應高山氣候有關。

材料與方法

1. 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南部山區之杜鵑包括有南湖杜鵑、台灣杜鵑、紅星杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑、中原杜鵑、細葉杜鵑、紅毛杜鵑、烏來杜鵑、唐杜鵑、黃花著生杜鵑、馬銀花、守城滿山紅、金毛杜鵑及南澳杜鵑，並以台灣馬醉木做為外群。DNA萃取根據Doyle and Doyle (1990)的CTAB方法。於5mL萃取液中，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 μ L TE buffer(pH 8.0)，並加以定量。

2. 葉綠體低分子量熱休克蛋白基因選殖

利用目前已知之被子植物葉綠體 DNA 熱休克蛋白基因中保守之區域設計 PCR 引子 對 (MGNCARATGYTNGAYACNATGGAY 及 NARNACNCCRTTYTTNARYTCNGC)以擴增葉綠體 DNA 熱休克蛋白基因之 ACD 序列，並經由 PCR 產物之 TA-cloning 方法進行選殖工作。然後經由定序的工作以確定所選殖者為葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因。PCR 成式依一般正常之方法執行。PCR 產物再以 yT&A 選殖載體試劑組選殖，並以藍白篩選選出可能之 clones 以進行 colony PCR 以確定 clone 的大小，然後以原 colony 進行定序，定序後以 NCBI 之 Open reading frame (ORF) 確定是否為葉綠體型之低分子量熱休克蛋白之基因序列。

3. 親緣演化分析

台灣原生杜鵑之親緣演化關係先以 PAUP* 之 incongruence length difference 測試葉綠體基因序列及核基因之葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因中 ACD 序列是否吻合。然後以 ModelTest (Posada and Crandall 1998) 檢測基因序列最適之鹼基取代模式並以 PAUP* 分析 maximum likelihood 親緣演化樹。台灣原生杜鵑葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因之 ACD 序列之演化支系演化速率之異同以 likelihood ratio test (LRT) 分析。並利用 PAML (Yang, 1997) 檢測是否有 positive selection 或淨化天擇之情形發生。

結果與討論

一、基因選殖及序列變異分析及其可能之功能演化

經最初之引子設計並得到兩個引子序列 MGNCARATGYTNGAYACNATGGAY 及 NARNACNCCRTTYTTNARYTCNGC 可擴增台灣原生杜鵑之葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因之 ACD 序列，ACD 區域為低分子量熱休克蛋白保守之區域，若天擇的立量伴演某種適應性演化的力量，則應是在此區域，其它 N-terminal 及 C-terminal 區域變化一般為逢機而適應性演化無關，因此集中對此區域進行研究盼能在研究期限內對十六種台灣原生杜鵑均能探討出一明顯的演化模式，以得可利用之基因多樣性。目前已針對台灣原生之十六種杜鵑之台灣杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑、烏來杜鵑、中原杜鵑、紅毛杜鵑、細葉杜鵑及唐杜鵑等十種杜鵑獲得 ACD 基因序列。表一列出十種杜鵑之樣品數、選殖 colony 數、序列種類。

每一種杜鵑經由序列仔細之比較發現除僅有一種序列出現在一個已上的 clone，有變異的點平均僅佔序列之 1% 以下且均為 singleton，因此應是歸因於 Taq error 所造成，因此以出現超過一次以上的序列進行後續分析之用。在全部 192 個篩選序列之中有 44 個序列屬於葉綠體型低分子量熱休克蛋白基因，經分析有 29 個序列是獨立而非重覆出現的序列，因此以此 29 個序列進一步做分析。

圖一顯示十六種原生杜鵑 29 個不同葉綠體型低分子量熱休克蛋白 ACD 序列之變

異位點。圖二顯示十種杜鵑之 ACD 胺基酸之序列比較。很明顯的可看到在 ACD 之保守區域 II 內屬於厚革質葉片之台灣杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑均有相對於其它之紙質或薄革質葉杜鵑之由 methionine 轉變為 leucine 及由 valine 轉變為 isoleucine 之胺基酸之序列的變化。在生化上的研究有證據顯示增加疏水性胺基酸可增強 ACD 之 chaperone 的活性，因此屬厚革質葉片之台灣杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑的 ACD 的演化可能與其適應溫差大、高紫外光及高光照之環境而與較能舒解葉綠體光合作用系統遭受氧化逆境之影響有關。屬於台灣杜鵑之特殊突變之胺基酸為 lysine 轉變為 arginine 及 glycine 轉變為 serine。此二種胺基酸之序列的變化都是增加疏水性胺基酸的情況。lysine 轉變為 arginine 與低分子量熱休克蛋白之動態變化以維持 molecular chaperone 活性有關

二、杜鵑 ACD 基因變化與天擇之關係

表二顯示藉由 PAML(Phylogenetic analysis using maximum likelihood)軟體之 branch-site model A 與 positive selective site model 模式分析之結果。以 branch-site model A 檢測當以台灣杜鵑作為 foreground branch 可發現在胺基酸位點 71 及 75 之突變是受到正向天擇的影響。然而此一模式無法檢測出其他之高山杜鵑如玉山、森氏、南湖及紅星杜鵑有任何正向天擇影響之胺基酸突變位點。因此再以另一檢測模式並設定包括台灣、玉山、森氏、南湖及紅星杜鵑為 foreground 時發現胺基酸突變位點 47 及 59 為 positively selected sites。上述胺基酸突變位點之非同意置換與同意置換核苷酸之比值不是等於 1 就是大於 1。但是它們為 positive selected site 的 posterior probability 都未達 0.95 以上，機率值低顯與序列相似性高有關。但我們可推論屬於 *Hymenanthes* 亞屬之台灣杜鵑、南湖杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑與其它亞屬杜鵑在與他們的最近共同祖先分歧之後有 relaxed purifying selection 的演化力量發生，造成胺基酸突變，以增強 chaperone 活性可能使得 *Hymenanthes* 亞屬的杜鵑能適應日夜溫差大、高紫外光及高光照環境所造成之葉綠體內的氧化逆境。此一研究結果提供基因轉殖研究可能提升植物抗逆境研究之切入點。此一研究結果提供基因轉殖研究可能提升植物抗逆境研究之切入點。

參考文獻

- Barua D, Downs CA, Heckathorn SA (2003) Variation in chloroplast small heat-shock protein function is a major determinant of variation in thermotolerance of photosynthetic electron transport among ecotypes of *Chenopodium album*. *Functional Plant Biology* 30: 1071-1079.
- Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO (2003) Selection-driven evolution of emergent Dengue virus. *Mol Biol Evol* 20: 1650-1658.
- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T (2000) Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 5322-5327.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Ganea E. 2001. Chaperone-like activity of α -crystallin and other small heat shock proteins. *Current Protein and Peptide Science* 2: 205-225.
- Haydon DT, Bastos AD, Knowles NJ, Samuel AR (2001) Evidence for positive selection in foot-and-mouth disease virus capsid genes from field isolates. *Genetics* 157: 7-15.
- Heckathorn SA, Downs CA, Sharkey TD, Coleman JS (1998) The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol* 116: 439-444.
- Heckathorn S A, Mueller JK, LaGuidice S, Zhu B, Narrerr T, Blair B, Dong Y (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* 91: 1312-1318.
- Jia L, Clegg MT, Jiang T (2003) Excess non-synonymous substitutions suggest that positive selection episodes occurred during the evolution of DNA-binding domains in the *Arabidopsis* R2R3-MYB gene family. *Plant Mol Biol* 52: 627-642.
- Li W H (1997) *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA:
- Lindquist S, Craig EA (1989) The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* 22: 631-677.
- Mao Q and Chang Zengyi (2001) Site-directed mutation on the only universally conserved residue Leu122 of small heat shock protein Hsp16.3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289: 1257-1261.
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Sharma KK, Kaur H, Kumar GS, Kester K 1998. Interaction of 1,1'-Bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-Disulfonic acid with α -crystallin. *J Biological Chemistry* 273: 8965-8970.
- Sorensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* 6: 1025-1037.
- Schroff NP, Bera S, Cherian-Shaw M, Abraham EC (2001) Substituted hydrophobic and hydrophilic residues at methionine-68 influence the chaperone-like function α B-crystallin. *Mol Cell Biochem* 220: 127-133.

- Stapel D, Kruse E, Kloppstech K. 1993. Protective effect of heat shock proteins against photoinhibition under heat shock in barley (*Hordeum vulgare*). *J Photochem Photobiol B* 21, 211-218.
- Sun W, Van Montagu M, Verbruggen N (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica Biophysica Acta* 1577: 1-9.
- Vierling E (1991) The heat shock response in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molecular Biology* 42: 579-620.
- Wagner A (2002) Selection and gene duplication: a view from the genome. *Gen Biol* 3: 1012.1-1012.3.
- Waters ER (1995) The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* 141: 785-795.
- Waters ER and Vierling E (1999) Chloroplast small heat shock proteins: evidence for atypical evolution of an organelle-localized protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14394-14399.
- Yang, Z. 1997. PAML: a program for package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *CABIOS* 15: 555-556.

表一、十種杜鵑之樣品數、選殖 colony 數、序列種類。

杜鵑品種	樣品數	Clone 選殖及定序數目	序列種類
台灣杜鵑	4	12	3
南湖杜鵑	2	12	3
紅星杜鵑	3	12	3
玉山杜鵑	3	12	5
森氏杜鵑	2	12	5
烏來杜鵑	2	12	4
中原杜鵑	2	12	3
細葉杜鵑	2	12	2
唐杜鵑	2	12	1
紅毛杜鵑	2	12	4
南澳杜鵑	2	12	1
西施花	2	12	1
黃花著生杜鵑	2	12	3
馬銀花	2	12	3
唐杜鵑	2	12	1
細葉杜鵑	2	12	2
合計	36	192	44 (29)

Number in parenthesis indicates the number of unique sequences obtained

表二、正向天擇位點檢測

Model	Parameter estimates	Positively selected sites (posterior probability)
Branch-site model A		
正向天擇		
台灣杜鵑	非同意置換/同意置換 =1	71K (0.670), 75G (0.668)
台灣杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑、玉山杜鵑	非同意置換/同意置換 =2.54	None
Positive selective site model		
正向天擇		
台灣杜鵑、紅星杜鵑、森氏杜鵑、玉山杜鵑	非同意置換/同意置換 =2.525	47L (0.806), 59I (0.719)

圖一、十六種原生杜鵑 29 個不同葉綠體型低分子量熱休克蛋白 ACD 序列之變異

位點

```

[
          111111 1111112222 2222222222 233333]
[
    2444556667 7789112233 5778990123 4455666778 80001]
[
    7569150152 3510187929 4456254235 3668346056 83495]
#R_psedo437 UUACCCAAGG GGGGAUGAGCC AAAUCUAAGU GAAUACACUG UUAAG
#R_hyper737 C.....C
#R_morri218 C.....G...C
#R_morri222 C.....G...C
#R_psedo137 C.....CC
#R_psedo221 C.....G.....C
#R_hyper481 C.....GG.....C
#R_morri227 C..U.....G.....C
#R_formos42 C.....A.....U..U..GA..G.....C...C
#R_formos43 C.....A.....U..U..GA..G.....C...C
#R_marie410 C...G.....A.....A..UG.....U...C
#R_ovatum22 C...G.....A.....A..UG.....U...G.C
#R_noria345 C.....A..AC..A..A..UG.....U...C
#R_kaneh401 C.....A..AC.....A..UG.....U...C
#R_noria341 C.....A..A.....A..UG.....U...C
#R_marie413 C.....A..G.....A..UG.....U...C
#R_nakaha16 C.....A..U.....A..UG.....U...C
#R_oldham35 C.....A..A..U.....A..UG.....U...C
#R_rubrop31 C.....A..U.....A..UG.....C..U...C
#R_rubrop51 C.....A..U.....A..UG.....U..A...C
#R_kaneh404 C.....A.....A..UG.....C.....U...C
#R_nakaha12 C.....A.....A..UG.....U...C
#R_kaneh403 C.....A.....A..UG.....U..U...C...C
#R_kaneh406 C.....A.....A..UG.....U..U...C...C
#R_ellipt11 C...G...U..A.....G..U..G..CG...C..U..U...C
#R_kawaka21 CCU.GAG...AA.....A..A..U.....U..U...C...C
#R_kawaka23 C.U.GA...AA.....A..A..GU.....U..U...C...C
#R_kawaka26 C.U.GA...AA.....A..A..U.....U..U...C...C
#R_ovatum11 C...G.....A.....C..GG..U.....AG...U..U...C...C

```

圖二、十六種原生杜鵑 29 個不同葉綠體型低分子量熱休克蛋白 ACD 序列之胺基

酸變異位點

```

[                                                                 1]
[           1112222344 4556777888 990]
[           6791257703 7292159689 262]
#R_psedo437 MPPRSAEDEM LKIDKGSSYD LDK
#R_hyper737 .....
#R_morri218 .....G...
#R_morri222 ...G.....
#R_psedo137 .....
#R_psedo221 .....
#R_hyper481 .....G...
#R_morri227 .S.....
#R_formos42 .....RS... P..
#R_formos43 .....RS...
#R_marie410 .....M.V.....
#R_ovatum22 .....M.V.....E
#R_noria345 .....D.K. M.V.....
#R_kaneh401 .....D... M.V.....
#R_noria341 .....M.V.....
#R_marie413 .....E.. M.V.....
#R_nakaha16 .....M.V.....
#R_oldham35 ....N..... M.V.....
#R_rubrop31 .....M.V.....S. ...
#R_rubrop51 .....M.V.....N.
#R_kaneh404 .....M.V...P...
#R_nakaha12 .....M.V.....
#R_kaneh403 .....M.V.....
#R_kaneh406 .....M.V.....
#R_ellipt11 .....V..E.....
#R_kawaka21 L.T..T...I M.....
#R_kawaka23 L.T..T...I ME.....
#R_kawaka26 L.T..T...I M.....
#R_ovatum11 .....L V.....

```

圖三、十六種杜鵑之 29 個不同葉綠體型低分子量熱休克蛋白 ACD 序列 maximum

likelihood 演化樹

