

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

核、葉綠體及粒線體微衛星 DNA 應用於青剛櫟  
(*Cyclobalanopsis glauca*) 分類、親緣及生物地理之研究  
(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2621-B-002-010-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生命科學系

計畫主持人：何國傑

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 6 月 8 日

# 行政院國家科學委員會多年期專題研究計畫 92 年度進度報告書

核、葉綠體及粒線體微衛星 DNA 應用於青剛 ( *Cyclobalanops glauca* ) 分類、親緣及生物地理之研究 ( 1/3 )

計畫編號: NSC 92-2621-B-002-010

執行期限: 92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人: 何國傑 教授 國立台灣大學生命科學系

## 一. 摘要:

本研究利用 4 對微衛星基因座(Microsatellite loci)上對偶基因的變異來探討青剛櫟族群在台灣的遺傳結構。總共採樣 10 個青剛櫟族群,分別是陽明山、烏來、北橫(榮華至巴陵)、棲蘭、霧社、太魯閣、玉里(瓦拉米)、紅葉、扇平、大漢山,除了陽明山採樣數為 12 株,其他皆採樣 20 株。之後將所得之 Genotyping 資料作族群遺傳統計分析。結果發現青剛櫟族群在台灣的各族群間,同型合子比例過高,而族群間分化程度不高。族群有 Isolation by distance 的現象,中央山脈兩側族群,顯示中央山脈或許對青剛櫟族群為一種傳播阻隔。但扇平與大漢山自成一群,也顯示與其他族群間有分隔存在。遺傳歧異度較高的族群:霧社、陽明山與大漢山族群也是之前由葉綠體結果所推論的歧異度中心。

## 二. 緣起與目的:

殼斗科 ( Fagaceae ) 植物是溫帶、亞熱帶的重要樹種,科中植物的屬 ( genus ) 之地位因研究者不同而異,自早期日本植物學者如工藤祐舜、正宗巖敬等將青剛櫟屬 ( *Cyclobalanopsis* ) 從麻櫟屬 ( *Quercus* ) 中獨立為一屬以來,意見還是相當紛歧。目前全球最多認為有 9 屬 ( *Castanea*、*Castanopsis*、*Colombobalanus*、*Cyclobalanopsis*、*Fagus*、*Formanodendron*、*Lithocarpus*、*Quercus*、*Trigonobalanus* ), 約有 700 800 種 ( 劉、洪, 1999 )。台灣殼斗科植物曾被認為有 7 屬 50 種 ( 劉等, 1994 ), 廣泛分布在低海拔至高海拔山區,近代台灣維管束植物簡誌 ( 楊等, 1997 ) 一書中,作者接受 Kubitzki ( 1993 ) 之意見將 *Cyclobalanopsis* 併於 *Quercus* 下。

青剛櫟葉長卵形或橢圓形,基部楔形至圓形,長 6 13cm,上半部有鋸齒,鋸齒尖銳或平滑,分布於台灣、日本、印度、韓國、大陸華中、華南、濟州島、琉球等地。台灣地區由低海拔至中高海拔皆可見青剛櫟之分布。本種果實種仁苦澀,不堪食用,木材堅韌,為建築材及農具之用,早期曾為種植香菇之菇材,為良好之園林樹種。由於青剛櫟之葉及果實外型差異甚大,經常發生同物異名之情形。根據 Liao ( 1991 ) 的研究,青剛櫟之學名就有下列數種:

*Quercus glauca* Thunb.

*Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst.

*Quercus sasakii* Kaneh. ex Hayata

*Cyclobalanopsis kanehirai* Nakai.

*Quercus glauca* Thunb. var. *caesia* Blume

*Quercus phullata* Hamilton.

*Quercus laxiflora* Lindley

*Perytis glauca* (Thunb.) Rafin

*Cyclobalanopsis sasakii* (Kanehira ex Hayata) Kudo & Masamune ex Kudo

*Quercus longinux* Hayata var. *kanehirae* (Nakai) Liao

*Cyclobalanopsis longinux* (Hayata) Schottky var. *kanehirai* (Nakai) Liao

*Quercus repandaefolia* auct sensu Yang

*Quercus gracilipes* Hayata

本研究採用台灣樹木誌(劉等, 1994)之分類方法將青剛櫟定位為青剛櫟屬 *Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst.。

由於青剛櫟之歸屬問題複雜而且種內變異甚大, 因此本計畫欲藉由目前最常用於 DNA 指紋分析 (DNA fingerprint analysis) 的微衛星 (microsatellite) DNA marker 來探討青剛櫟的遺傳多樣性 (genetic diversity)。

微衛星 DNA 又稱為 short tandem repeat (STR), simple sequence repeat (SSR) 或 variable-number-of-tandem-repeat (VNTR), 存在於至今所有被研究過的生物之基因體中。其主要特徵為由一段短的 DNA 單位 (通常為 1-6 bp) 作直線排列 (Jeffreys *et al.*, 1985; Winberg *et al.*, 1993; Kumar and Rostad, 1998; Richard *et al.*, 1999), 這類 DNA 在基因體中量非常多。在 1993 年, Morgante 及 Olivieri 對 EMBL 及 GenBank databases 作探索, 發現以 2-3 個核苷酸為單位的 STR, 在植物之基因體中, 每 50 kb 就有一個存在。再加上它具有高度的變異性 (hypervariability)、共同優勢性 (codominance) 及高度之重現性 (high reproducibility), 使微衛星 DNA 成為最有用且廣泛地應用於遺傳作圖及基因體的分析 (Liu *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Ramsay *et al.*, 1999), 基因組成的鑑定及變種的保護 (Smith and Helentjaris, 1996; Rajora *et al.*, 2001), 種子純度的評鑑及生殖體的保存 (Brown *et al.*, 1996; Hahn and Grifo, 1996), 多樣性的研究 (Xiao *et al.*, 1996), 親系的鑑定及譜系的分析 (van de Ven and McNicol, 1996; Ayres *et al.*, 1997; Bowers *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 2000b) 等方面。

本計畫擬為三年型。全程目標為青剛櫟核、葉綠體及粒線體之微衛星 DNA 的研究以建立各胞器之 primers, 並用 SSR 來探討族群遺傳變異。本年度目標為確定青剛櫟核微衛星 DNA 之序列、有應用價值之 primers 的建立, 工作包括 (1) 萃取青剛櫟核 DNA, (2) 構築青剛櫟核的基因體基因庫 (genomic library), (3) 篩選及研究 microsatellite 的組成及特性, 並設計專屬 primer 序列。第二年則分別以葉綠體及粒線體之微衛星 DNA 為對象, 完成上述 (1) (2) (3) 項工作。第三年則利用所設計之 primer 為探針作台灣青剛櫟種間的遺傳分析及台灣不同生育地青剛櫟種內之異同的比較。

整個計畫的完成將可得到下列預期效益: (1) 建立了青剛櫟核的基因體基因庫, (2) 建立青剛櫟的微衛星 DNA 遺傳資料庫, (3) 確立青剛櫟微衛星 DNA primers 及其應用, (4) 台灣不同生育地青剛櫟種內之異同的比較, (5) 提高台灣在國際生態多樣性及基因庫保存之地位。

### 三. 結果與討論:

#### 一、Microsatellite 基因座變異與青剛櫟族群內變異

從表 1 可得到以下結論,

1. 各基因座異質性的預期值與觀測值有相當的差異, 因此各基因座可能不符合哈溫平衡。
2. 異質性觀測值與  $F_{IS}$  顯示同子結合過高, 此可能是因為族群內有高度自交或近親交配的結果。從表 2 得知各個基因座都具有相當的變異, 可以作為分析族群遺傳結構的分子標記。且大漢山, 霧社, 陽明山與紅葉族群有族群間較高的歧異度, 與之前以葉綠體 DNA 所得之的研究結果相符合。

#### 二、青剛櫟族群間的關係

從表 3 的分化數值  $F_{ST}$  約百分之五來看, 青剛櫟族群在台灣地理區域內基因交流相當頻繁。在利用地理距離與族群間遺傳距離的關係圖中(圖 1)發現兩者成正相關, 表示青剛櫟族群間有 Isolation by distance 的現象。再利用 SGS (Degen, B. 2000) 分析三種地理區域範圍內族群與地理距

離的關係,發現在三種地理區域範圍內,族群間遺傳距離與地理距離相關性不顯著(圖 2),但在 Mantel's test(表 4)中,兩種遺傳距離與地理距離成顯著相關,所以以 SGS 所得到之結果可能因為其將地區間隔區分太細,而採樣族群並不多,因此造成分析結果不顯著。利用 Nei's D 採 UPGMA 方式所得之關係樹狀圖得知,有三群關係較緊密的大族群,分別是 1.霧社、烏來、北橫與陽明山;2.太魯閣、玉里、棲蘭與紅葉;3.扇平與大漢山。

### 三、討論

從上述結果可得到下面四項結論,

1. 青剛櫟族群在台灣的各族群間,同型合子比例過高,顯示族群內有近親交配現象發生,而族群間分化程度不高,或許也是族群有相當的基因交流。
2. 在地理距離與遺傳距離的相關性分析中,青剛櫟族群在分析中有顯著的空間遺傳結構,可以瞭解族群有 Isolation by distance 的現象。
3. 在關係樹狀圖中(圖 3),族群的分群恰好也是中央山脈兩側族群,顯示中央山脈或許對青剛櫟族群為一種傳播阻隔。而扇平與大漢山自成一群,也顯示與其他族群間有分隔存在。
4. 遺傳歧異度較高的族群中,霧社、陽明山與大漢山族群也是之前由葉綠體結果所推論的歧異度中心 (Huang *et al.*, 2002),顯示這幾個族群或許有造成高歧異度產生的環境因素。

表 1 為基因座在全部族群中的對偶基因大小範圍與數目,  $H_e$  為異質性預期值,  $H_o$  為異質性觀測值,  $F_{IS}$  為 fixation index。

Locus	Size Range(bp)	Allele number	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
Mic57	220-262	18	0.5615	0.7317	0.2326
Mic67	145-166	9	0.5857	0.6111	0.0416
Mic51	250-268	8	0.3324	0.6721	0.5054
Mic50	260-314	20	0.4652	0.8410	0.4688
Mean	--	--	0.4862	0.7139	0.3188

表 2 為每個基因座在各族群中的對偶基因歧異度。

Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mic57	0.834	0.839	0.719	0.654	0.662	0.734	0.788	0.846	0.700	0.795
Mic67	0.682	0.580	0.737	0.670	0.739	0.555	0.559	0.688	0.489	0.591
Mic51	0.713	0.633	0.677	0.611	0.692	0.775	0.846	0.629	0.695	0.742
Mic50	0.828	0.872	0.899	0.871	0.901	0.900	0.888	0.864	0.832	0.898
Mean	0.765	0.731	0.758	0.702	0.749	0.741	0.770	0.756	0.679	0.757

表 3 為各基因座的分化指數及  $N_m$  值。I for individual, S for sub-population, T for total population,  $N_m$  (number of migrant per generation)。

Locus	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$N_m$
Mic57	0.2326	0.2662	0.0438	5.4632
Mic67	0.0416	0.0745	0.0343	7.0385
Mic51	0.5054	0.5407	0.0715	3.2485
Mic50	0.4469	0.4719	0.0452	5.2853
Mean	0.3188	0.3521	0.0488	4.8686

表 4 為利用 Nei's D 與  $D_{\mu}$  和地理距離做 Mantel's test。

Mantel's test	Correlation	Two-tailed p
Nei's D/distance	0.4536	0.0218
$D_{\mu}$ /distnace	0.6139	0.0080

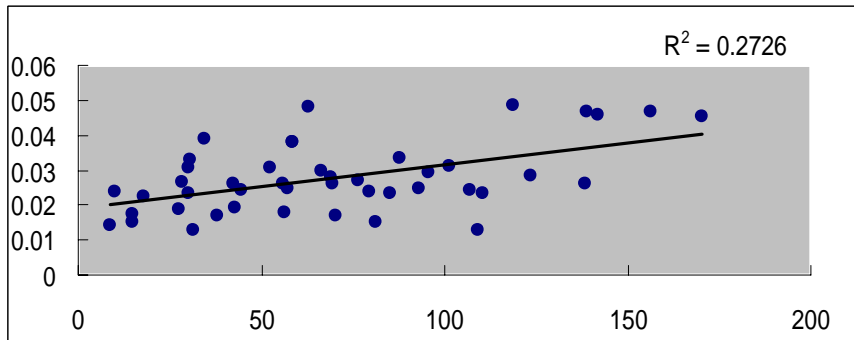
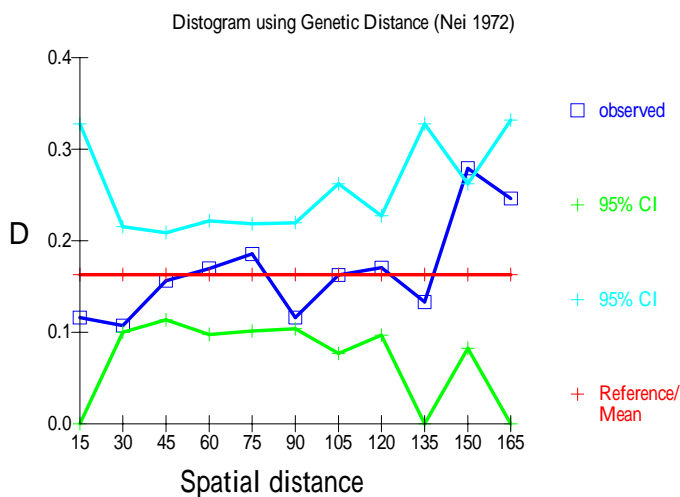
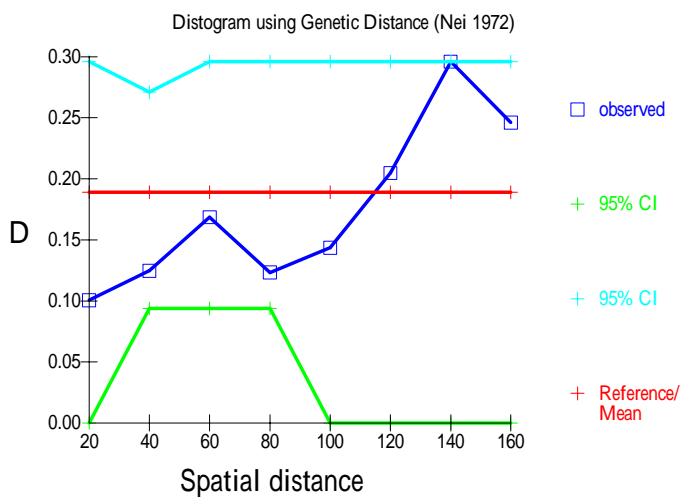


圖 1 為各族群間所得之分化指數(Pairwise  $F_{ST}$ )與各族群間相對之地理距離所得之相關分佈及線性迴歸圖。(X 為 Pairwise  $F_{ST}$ , Y 為地理距離(km))。

a.



b.



c.

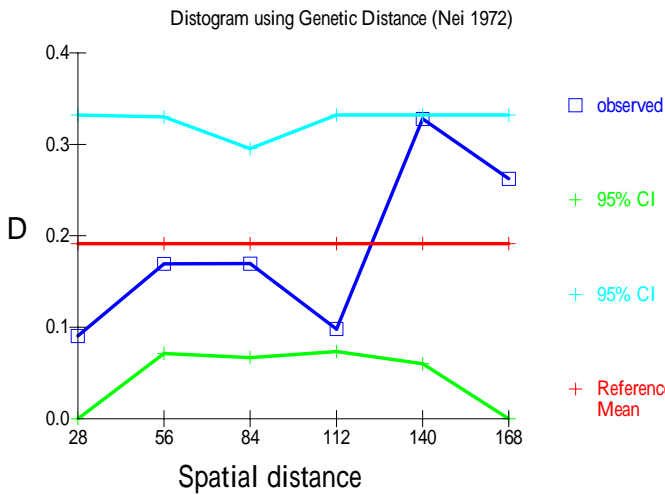


圖 2 為三種地理區域族群間 Nei's D 與地理距離利用 SGS software 所得之相關圖,a 圖為全部族群,b 圖為西部族群,c 圖為東部族群。

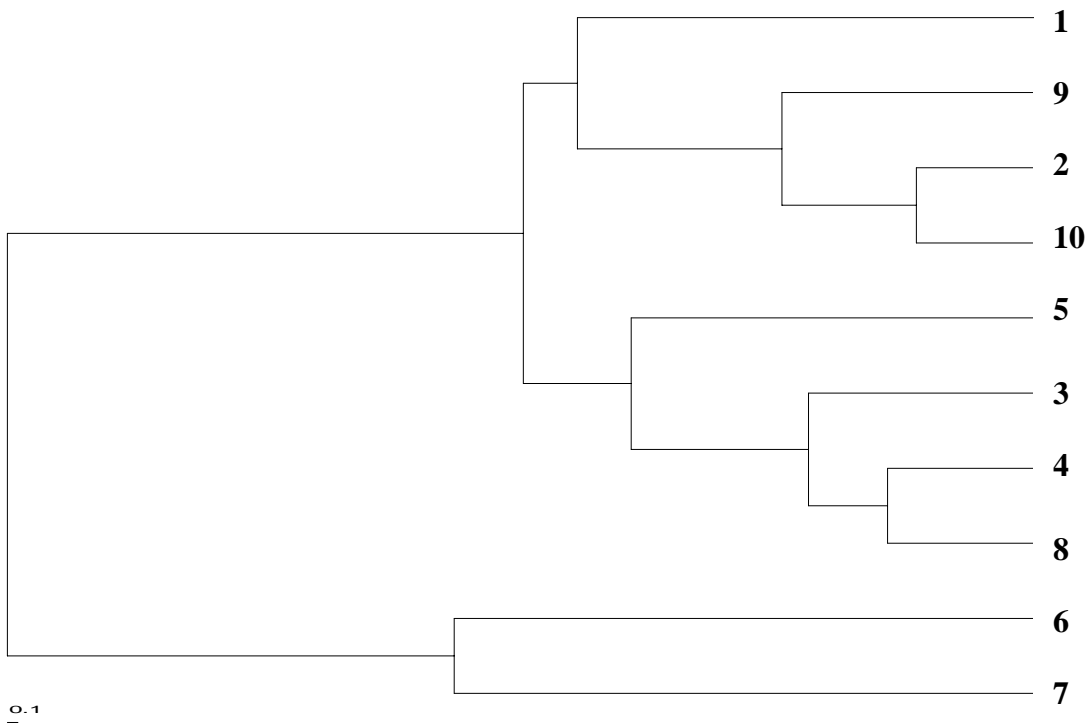


圖 3 為根據各族群間的遺傳距離(Nei's D)利用 UPGMA 的方法所建構出的關係樹狀圖。1. 霧社、2. 北橫、3. 玉里、4. 棲蘭、5. 太魯閣、6. 扇平、7. 大漢山、8. 紅葉、9. 烏來、10. 陽明山。

#### 四. 參考資料

1. 劉茂松、洪必恭 (1999) 中國殼斗科的分佈格局類型分析。 南京林業大學學報 23,18-22。
2. 劉業經、呂福原、歐辰雄 (1994) 台灣樹木誌。國立中興大學。 pp.301-318。
3. 楊遠波、劉和義、呂勝由(1997) 台灣維管束植簡誌 第貳卷。 行政院農業委員會。 pp.26-40。
4. Ayres, N. M., McClung, A. M., Larkin, P. D., Bligh, H. F. J., Jones, C. A. and Park, W. D. (1997) Microsatellite and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an

extended pedigree of US rice germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 94,773-781.

5. Bowers, J., Boursiquot, J., This, P., Chu, K., Johansson, H. and Meredith, C. (1999) Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. *Science* 285,1562-1565.
6. Brown, S. M., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Senior, M. L., Wang, T. Y., Duncan, R. R., Gonzalez-Candelas, F. and Kresovich, S. (1996) Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* Moench (L.)]. *Theor. Appl. Genet.* 93,190-198.
7. Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G. and McCouch, S. R. (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 95,553-567.
8. Hahn, W. J. and Grifo, F. T. (1996) Molecular markers in plant conservation genetics. In *The impact of plant molecular genetics*, Sobral, B.W.S. (ed). Birkhauser, Boston, pp 113-116.
9. Huang, S. S.-F., Hwang, S.-Y. and Lin, T.-P. (2002) Spatial pattern of chloroplast DNA variation of *Cyclobalanopsis glauca* in Taiwan and east asia. *Mole. Ecol.* 11, 2349-2358.
10. Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314,67-73.
11. Kumar, A. and Rogstad, S. H. (1998) A hierarchical analysis of minisatellite DNA diversity in Gambel oak (*Quercus gambelii* Nutt.; Fagaceae). *Mol. Ecology* 7,859-869.
12. Li, C.-D., Rossnagel, B. G. and Scoles, G. J. (2000a) The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101,1259-1268.
13. Li, C.-D., Rossnagel, B. G. and Scoles, G. J. (2000b) Tracing the phylogeny of the hexaploid Oat *Avena sativa* with satellite DNAs. *Crop Sci.* 40,1755-1763.
14. Liao, J. C. (1991) The taxonomic revisions of the family Fagaceae in Taiwan. Department of Forestry. College of Agriculture. Natl. Taiwan Univ., Taipei, Taiwan.
15. Liu, Z. W., Biyashev, R. M., Saghai Maroof, M. A. (1996) Development of simple sequence repeat markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93, 869-876.
16. Rajora, O. P., Rahman, M. H. and Dayanandan, S. (2001) Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species. *Mol. Gen. Genet.* 264,871-882.
17. Ramsay, L., Macaulay, M., Cardle, L., Morgante, M., Ivanissevich, S. D., Maestri, E., Powell, W. and Waugh, R. (1999) Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. *Plant J.* 17,415-425.
18. Richard, G-F., Hennegu, C., Thierry, A. and Dujon, B. (1999) Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts. *Res. Microbiol.* 150,589-602.
19. Simth, S. and Helentjaris, T. (1996) DNA fingerprinting and plant variety protection. In *Genome mapping in plants*, Paterson, A.H., ed, New York, pp 95-110.
20. van de Ven, W.T.G. and McNicol, R. J. (1996) Microdatellites as DNA markers in *Sikta spruce*. *Theor. Appl. Genet.* 93, 613-617.
21. Winberg, B. C., Zhou, Z., Dallas, J. F., McIntype, C. L. and Gustafson, J. P. (1993) Characterization of microsatellite sequences from *Oryza sativa*. *Genome* 36,978-983.

22. Xiao, J., Li, J., Yuan, L., McCouch, S. R. and Tanksley, S. D. (1996) Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 92,637-643.