

金門稀有植物遺傳多樣性調查

金門國家公園管理處委託研究報告（九十七年度）

# 金門稀有植物遺傳多樣性調查

金門國家公園管理處委託研究報告

中華民國 97 年 12 月

國科會 GRB 計畫編號：PG9703-0176

內政部計畫編號：097301020600G1006

# 金門稀有植物遺傳多樣性調查

受委託者：國立台灣大學

研究主持人：徐源泰 台灣大學園藝學系教授兼

台灣大學生物多樣性研究中心主任

協同主持人：曾文聖 台灣大學園藝學系兼任助理教授

研 究 生：陳彥惠

## 金門國家公園管理處委託研究報告

中華民國 97 年 12 月



## 目次

表次.....	III
圖次.....	V
摘要.....	VII
第一章 緒論.....	1
第一節 研究緣起與背景.....	1
第二節 研究目標.....	2
第三節 相關研究與計畫回顧.....	3
第二章 研究方法.....	9
第三章 結果與討論.....	23
第一節 金門地區水韭棲地觀察及樣本採集.....	23
第二節 孢子保存與萌芽試驗.....	30
第三節 水韭小分子熱休克蛋白基因之比較.....	38
第四節 以RAPD方法進行水韭親源關係之分析.....	47
第五節 金門地區水韭小分子熱休克蛋白SHSP21 mRNA 對熱刺激之表達.....	51
第四章 結論與建議.....	55
第一節 結論.....	55
第二節 建議.....	57
參考書目.....	59



表次

表 1-1 金門地區水韭與台灣水韭兩者主要之差異特徵比較 .....	7
表 2-1 不同類小分子熱休克蛋白胺基酸序列保守區域所設計之引子 .....	12
表 2-2 以sHSP21 保守區域設計引子對 .....	17
表 2-3 八組 10-mer之RAPD逢機擴增引子 .....	18
表 3-1 台灣水韭、金門地區水韭及寬葉水韭sHSP21 序列間遺傳相似度矩陣 .....	46
表 3-2 根據三種水韭之RAPD分析之DNA多形性片段製程之遺傳相似矩陣表 .....	49





## 圖次

圖 2-1 不同植物之chloroplast sHSP 胺基酸序列。 .....	13
圖 2-2 不同植物之 ER sHSP 胺基酸序列。 .....	14
圖 2-3 不同植物之 cytosolic classI sHSP 胺基酸序列。 .....	15
圖 2-4 不同植物之 mitochondrion sHSP 胺基酸序列。 .....	16
圖 3-1 金門太武山水韭棲地位置圖 .....	24
圖 3-2 金門地區月平均降雨量 .....	25
圖 3-3 金門太武山之水韭棲地 2007 年 7 月之情況，水域 範圍雖小(A)，但植株成熟(B)。 .....	26
圖 3-4 金門太武山之水韭棲地 2007 年 12 月之情況，水域 幾乎乾涸(A)，植株已乾枯(B)。 .....	27
圖 3-5 金門太武山之水韭棲地 2008 年 3 月之情況，水域 範圍增廣，水位升高，植株仍矮小。 .....	28
圖 3-6 金門太武山之水韭棲地 2008 年 7 月之情況，颱風 過後，水域範圍增廣，水位升高(A)，植株成熟(B)。 .....	29
圖 3-7 解剖顯微鏡下，(A)自土壤中篩選出之金門地區水 韭大孢子；(B)乾燥後之金門地區水韭大孢子 .....	32
圖 3-8 解剖顯微鏡下，金門地區水韭之(A-1)小孢子囊； (A-2) 大孢子囊；(B-1)小孢子囊內部；(B-2)大孢子 囊內部。 .....	33
圖 3-9 2007 年(A)陽明山月平均溫度(B)金門月平均溫度。 .....	34
圖 3-10 解剖顯微鏡下，金門地區水韭之大孢子萌發情況。 .....	35
圖 3-11 金門地區水韭經過不同溫度處理後，第六周大孢 子之萌發數量。 .....	36

圖 3-12 台灣水韭經過不同溫度處理後，第五周大孢子之萌發數量。.....	37
圖 3-13 以番茄之小分子熱休克蛋白sHSP21引子對擴增出台灣水韭及金門產水韭之sHSP21基因片段。.....	40
圖 3-14 以番茄之小分子熱休克蛋白sHSP21引子對擴增台灣水韭及金門地區水韭之sHSP21基因片段序列比較。.....	41
圖 3-15 以非專一性引子對sHSP21-F1/sHSP21-R1對水韭屬植物進行聚合酶連鎖反應。.....	42
圖 3-16 以專一性引子對sHSP21-F2/sHSP21-R2對水韭屬植物進行聚合酶連鎖反應。.....	44
圖 3-17 將台灣水韭 (T)、金門地區水韭 (K)、寬葉水韭 (J) 之小分子熱休克蛋白sHSP21部分序列進行alignment之結果.....	45
圖 3-18 台灣水韭、金門地區水韭及寬葉水韭進行RAPD隨機引子擴增反應之電泳圖。.....	48
圖 3-19 三種水韭之RAPD分析結果，經UPGMA方法進行演算之樹狀圖。.....	50
圖 3-20 經 45°C熱刺激 10 小時，於 25°C回復 1 小時、2.5 小時、4 小時、12 小時及 24 小時後，sHSP21 mRNA之相對表現量。.....	53

## 摘要

關鍵詞：水韭、小分子熱休克蛋白、分子標誌、保育

### 一、研究緣起

金門國家公園為我國第六座國家公園，所處之金門縣於地理位置上和福建省廈門約距 10 公里，和台灣本島距離約 277 公里，因此其所分佈的植物種類多與中國大陸相似。於過去所調查的維管束植物中有八屬並無在台灣分佈，此外還有三十五種植物並未見於台灣，其植被具有相當的獨特性。其中金門地區所產之水韭更為特殊，金門地區之水韭生於太武山區，其生長環境範圍狹小且生態環境變異極大，受當地氣候之影響甚巨；由於金門產水韭棲地狹小，生長區域之水位不穩定，至夏季往往因為過度乾旱而枯死，因此亟需對其生理機制與遺傳特性和其他水韭植物進行比較，以作為金門國家公園未來對金門產水韭棲地保育和管理之策略擬定基礎。

### 二、研究方法及過程

本研究將以建立水韭屬植物小分子熱休克蛋白之分子標誌，配合 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 方法，並分析水韭屬植物之基因序列等方法，比較金門地區水韭與鄰近區域產水韭之遺傳變異及親緣關係，以釐清其分類地位；並萃取金門地區水韭植物體中 RNA，試驗觀察其小分子熱休克蛋白之表現，探討其於該棲地之生長作用機制；同時進行孢子萌發試驗，試驗於不同溫度環境下對其萌芽之影響，以做為日後金門產水韭之保育以及金門國家公園管理之參考。

### 三、重要發現

在分類地位方面：以聚合酶連鎖反應擴增台灣水韭、金門地區水韭之小分子熱休克蛋白 *sHSP21* 基因保守序列部分片段，其長度為 410 bp，結果發現金門地區水韭與台灣水韭兩者基因序列相似度達 96.7%，與寬葉水韭相似度則為 90.9%；但以 RAPD 方法分析所得結果，金門地區水韭與台灣水韭之相似度僅 31.42%，與寬葉水韭相似度為 34.32%。此結果為首次以嚴謹分子證據，闡釋金門水韭應與台灣水韭有所差異。在復育研究方面：以 5°C 處理過之金門地區水韭孢子，其萌發速率較其他溫度處理快，但台灣水韭則是以 35°C 處理過之孢子有最高之萌發率。綜合以上各點，可發現金門地區水韭與台灣水韭在分子序列及生理表現上均確實有差異。也因此，前人建議以金門水韭 (*Isoetes kinmenensis*) 命名，以區別台灣水韭確實可考慮。而針對金門地區水韭所做之小分子熱休克蛋白 *sHSP21* mRNA 表現量測定實驗，更可做為金門水韭能夠適應金門狹小且嚴苛的生長棲地之理論。

### 四、主要建議事項

根據研究發現，本研究針對金門產水韭的保育策略，提出下列具體建議。以下分別從立即可行的建議及中、長期性建議加以列舉。

#### 1. 立即可行之建議—種源保存

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處

協辦機關：國立台灣大學園藝系

每年冬季枯水期，原棲地中水韭會因乾涸而死亡；建議在此時期植株死亡前採取孢子囊，其中含大量之大小孢子，且具有萌發之活力。其他季節對原棲地與土壤則避免過度干擾與採集。

2. 立即可行之建議－命名發表

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處

協辦機關：國立台灣大學園藝系

以本研究所得之嚴謹分子證據，佐以熱休克蛋白表現差異闡釋棲地適應理論，於 SCI 期刊發表並以金門水韭命名(*Isoetes kinmenensis*)，以彰顯金門地區生物多樣性價值及國家公園努力之成果。

3. 中期性建議－棲地保存與移地保存

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處

協辦機關：國立台灣大學園藝學系

進一步更完整建立金門產水韭孢子萌發所需最適條件，做為人工培育之基礎資訊，以進行棲地保存與移地保存及異地備份復育。於此同時，可立即於原棲地附近地形與環境相似之廢棄碉堡工事頂，金門國家公園內，及台灣大學園藝分場，分別建立小型異地備份繁殖區。

4. 長期性建議－長期監控並研究金門水韭演化之變異性

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處

可藉由此研究之模式建立金門水韭生長環境與其表現型相關性之資料庫，藉以監控金門國家公園內水韭植物之演化變異，作為園內管理、復育及解說教育之依據。

5. 長期性建議－研究比較鄰近國家區域內水韭，提出物種演替理論模型

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處或其他管理單位

由於金門與鄰近區域國家，兼有獨特且唯一的地理與政治上

## 金門稀有植物遺傳多樣性調查

的截然不同距離與分隔，極適合做為基因漂移與物種播遷及演化的模式研究基地；藉由古老孑遺活化石水韭之研究，可建立極佳之物種演替播遷的模型理論，將顯著提升我國家公園的管理與研究之國際競爭力。

## ABSTRACT

Keywords: Isoetes, small heat shock protein, molecular marker, conservation

Kinmen National Park located off the southeastern coast of Fujian Province in Xiamen Bay at the outlet to the Jiulong River. Due to the close proximity of Kinmen to mainland China, Kinmen's flora is closely related to mainland China's. There are 8 genus vascular plants and 35 species of plants have not found in Taiwan. Among these distinctive plants, the quillwort in Kinmen is more special. This quillwort is grown on Tai-Wu Mountain. The growing condition compared with Taiwan's is not well owing to the huge dynamic variation of weather and its nature vegetation. The habitat of the quillwort in Kinmen is narrow and small. In summer, the water level of the growth region is unstable leading to the death of quillwort. Therefore, based on the concern for wildlife conservation and the natural environment, we need to investigate and compare the physiological mechanism and the hereditary property of the quillwort in Kinmen with other species.

The aim of the study is to establish the specific molecular sequence and analyzing the sequence of small heat shock protein. In this way we can compare the hereditary variations and reconstruct phylogeny of *Isoetes*. Furthermore, optimal spore germination will be studied.

By amplifying the *sHSP21* partial conserved sequence of *I. taiwanensis* and the quillwort in Kinmen with Polymerase Chain Reaction, we found sequence variation among these two quillworts. Besides, this primer could amplify a unique sequence in the quillwort in

## 金門稀有植物遺傳多樣性調查

Kinmen which is not found in *I. taiwanensis*. The RAPD analysis also showed only 31.42% similarity between them. In addition, the spore germination as well as temperature response varies between these two samples. All of the data of this research indicated that a new species called *Isoetes kinmenensis* might be the right name for Kinmen quillworts.



## 第一章 緒論

### 第一節 研究緣起與背景

金門國家公園為我國第六座國家公園，其範圍包含了金門本島的太武山區、古寧頭區、古崗區、馬山區以及烈嶼（小金門）等五個區域，金門國家公園所處的金門縣於地理位置上和福建省廈門約距 10 公里，和台灣本島距離約 277 公里，因此其所分佈的植物種類多與中國大陸相似，於過去所調查的維管束植物中有八屬並無在台灣分佈，此外還有三十五種植物並未見於台灣，其植被具有相當的獨特性。其中金門地區所產之水韭更為特殊，金門產水韭生於太武山區，其生長環境範圍狹小且生態環境變異極大，受當地氣候之影響甚巨；由於金門產水韭棲地狹小，生長區域之水位不穩定，至夏季往往因為過度乾旱而枯死，因此亟需對其生理機制與遺傳特性和其他水韭植物進行比較，以作為金門國家公園未來對金門產水韭棲地保育和管理之策略擬定基礎。

## 第二節 研究目標

本計畫擬針對金門國家公園區內之水韭進行其小分子熱休克蛋白 (small heat shock proteins, sHSPs) 基因家族之研究，並和台灣水韭以及其他品系之水韭屬植物進行比對，研究不同區域水韭之遺傳變異和其親緣關係，以釐清其分類地位；並萃取金門地區水韭植物體中 RNA，試驗觀察其小分子熱休克蛋白之表現，探討其於該棲地之生長作用機制；同時進行孢子萌發試驗，試驗於不同溫度環境下對其萌芽之影響，以做為日後金門產水韭之保育以及金門國家公園管理之參考。

### 第三節 相關研究與計畫回顧

水韭 (*Isoetes* sp.) 起源於泥盆紀晚期和石炭紀早期之間 (Pigg, 1992)，其分類地位為蕨類植物門 (Pteridophyta)，石松綱 (Lycopsida)，水韭目 (Isoetales)，水韭科 (Isoetaceae)，水韭屬 (*Isoetes*) (George, 1955)，後來則歸類於 Pteropsida 這綱 (Clapham et al., 1987)。在三疊紀早中期，水韭目植物之組成相當複雜，但經漫長的演化，多數植物已先後滅絕，至今僅殘存水韭科之水韭屬 (Meng, 1999)。

由於水韭屬植物起源古生代，因此有極長的時間適應各種生態環境，分布甚廣，如常綠水生的冰湖、有季節性的陸生土壤、間歇性的水流、老舊的田間、路邊的溝渠等 (Taylor and Hickey, 1992; Hoot and Taylor, 2001)。目前已知的品種至少有 70 種，水韭屬植物之分類在屬以上很明確，但在種之界定卻常出現許多問題。其形態因趨同演化及異源多倍體而種化，構造簡單缺乏變異，而較難從形態上界定種間之關係 (Taylor and Hickey, 1992)。由染色體數目及細胞學上之證據雖可推論水韭屬植物之親緣關係，但僅以此及品種之形態特徵、地理分布、雜交實驗等推論，仍可能出現錯誤，因此 DNA 遺傳訊息序列資料則成為系統發生關係、物種界定及雜交起源決定之重要關鍵。

在水韭屬植物分子分類方面，最常研究之片段為核糖體 DNA internal spacers of nuclear ribosomal (ITS)、核糖體 LEAFY 之第二個 intron 及葉綠體 DNA *rbcL*、*atpB-rbcL* 等，以這種片段建立世界各地之水韭親緣關係，主要可分為三大支，舊世界和加州分支來自加州、非洲、歐洲；亞洲分支來自東亞、紐西蘭、澳洲；北美洲分支

則來自美洲 (Hoot et al., 2001; Hoot et al., 2004; Hoot et al., 2006)。

目前亞洲地區已被發表的種類有高寒水韭 (*I. hypsophila*)、雲貴水韭 (*I. yunguiensis*)、中華水韭 (*I. sinensis* var. *sinensis*、*I. sinensis* var. *coreana*)、東亞水韭 (*I. asiatica*)、寬葉水韭 (*I. japonica*)、*I. michinokuana*、假寬葉水韭 (*I. pseudojaponica*)、台灣水韭 (*I. taiwanensis*)、東方水韭 (*I. orientalis*) 等十種，以及台灣金門地區所發現之一個未確定品種。

台灣水韭由徐國士與張珠惠於 1971 年首度在陽明山上發現，經隸慕華博士確定其為台灣特有種，故將其命名為台灣水韭 (*Isoetes taiwanensis* DeVol)，此為台灣目前唯一被命名之水韭；1981 年左右，陳西村則於金門發現疑似禾本科之水生植物，後經張永達博士鑑定其為水韭屬植物，但目前仍未界定其分類地位，無法確定是否為新種。藉由同功異構酶醇素分析、植物形態學、解剖學、孢粉學、雜交實驗、染色體數目等方法 (表 1-1)，可確定於金門發現之水韭與台灣水韭並非同一種，且與亞洲地區其他水韭有差異 (黃, 2002; 郭, 2003; 張, 2003)，但其分類上之地位以及與其他水韭之親緣關係仍須進行 DNA 序列分析比較。

以 ITS 及核糖體 LEAFY homolog 之第二個 intron 這兩個分子遺傳標記片段分析東南亞地區水韭屬植物間之親緣關係，發現 ITS 片段對於東亞地區水韭種類間之關係無法提供良好的解析力，於近緣種間之關係研究並非一個良好的分子遺傳標記；核糖體 LEAFY homolog 之第二個 intron 片段研究顯示東亞地區水韭屬植物並非單一的系群，東亞地區及紐澳地區之水韭屬植物在演化樹上無法獨立分為兩支，而金門地區之水韭與台灣水韭僅在第 133 個鹼基上有不同，目前推論金門

地區之水韭可能是台灣水韭的變種，其傳播途徑可能是由野鳥將台灣水韭之孢子攜至金門之太武山區，而後因陽明山與太武山之環境與氣候之差異，造成其外觀型態以及基因變異的產生（謝, 2004）。

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成有較大的關係。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。其中，葉綠體型 sHSP 有保護葉綠體中光系統 II 之功能，且具 chaperone 功能，可保護細胞避免受到高溫而氧化，抵抗熱傷害（Heckathorn et al., 2002; Wang and Luthe, 2003），而在阿拉伯芥 sHSP21 之研究中指出且在強光照射下，葉綠體型 sHSP 之過度表現較能抵抗伴隨著強光的熱逆境，在弱光的熱逆境則無明顯抵抗能力。

金門國家公園地處台灣與中國大陸之交界區域，其島上生物資源

## 金門稀有植物遺傳多樣性調查

具有獨特性，因而如何對島上之生物資源進行保護並加以開發利用已成為重要課題。此外，全球化亦造成生物多樣性之議題更為重要，故本研究將藉由對金門國家公園內水韭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，以瞭解其於水韭屬植物中之遺傳變異，並將藉由與生長環境之結合，觀察兩者之相關性。

表 1-1 金門地區水韭與台灣水韭兩者主要之差異特徵比較

特徵	金門地區水韭	台灣水韭
葉片長	11±3 cm	變異極大
球莖瓣數	3 or 2 瓣	3 瓣
葉周邊纖維束	0-1	0
球莖寬度	4-10 mm	8-15 mm
大孢子大小	250-300 $\mu\text{m}$ * 270-310 $\mu\text{m}$	300-360 $\mu\text{m}$ * 310-360 $\mu\text{m}$
大孢子花紋	散彎紋	近心面：顆粒紋 側面：粒紋 離心面：棒紋
小孢子大小	23-25 $\mu\text{m}$ *27-33 $\mu\text{m}$ *32-34 $\mu\text{m}$	15-16 $\mu\text{m}$ *23-26 $\mu\text{m}$ *15-18 $\mu\text{m}$
小孢子花紋	刺紋	絲線紋

(黃, 2002 ; 郭, 2003 ; 張, 2003)





## 第二章 研究方法

本計畫於九十七年度，針對金門國家公園區域之水韭屬植物進行其小分子熱休克蛋白基因家族之研究，並與鄰近區域之水韭屬植物進行其親緣關係和遺傳多樣性之探討，此外針對金門產水韭之孢子進行萌芽試驗。主要研究方法與工作項目詳述如下：

### (一) 水韭屬植株樣品收集

1. 金門地區水韭：自行或委託在金門國家公園內採集金門產水韭植株之樣品，記錄採樣地點與其環境。
2. 台灣水韭 (*I. taiwanensis*)：台大園藝系精密溫室（張祖亮副教授）
3. 寬葉水韭 (*I. japonica*)：購買  
將收集所得植株與孢子移植至實驗室培養。

### (二) 金門水韭之孢子萌芽試驗

收集金門水韭成熟的孢子，每組實驗取 100 顆大孢子及 5~6000 顆小孢子置於裝有無菌水之培養皿中；共設 5 個溫度梯度，各為 5°C、15°C、25°C、35°C、45°C，分別於每種溫度梯度下培養 5 天、10 天、15 天後，置於 25°C 培養箱中進行培養。其他生長條件為：溼度 60%、光強 2500lx、光照 10h/d，培養四週後開始統計孢子的萌發率，每隔 7 天統計一次。

### (三) 樣品 DNA 抽取方法與定量

稱取檢體 5 g，加入去離子水 100  $\mu$ 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

## 金門稀有植物遺傳多樣性調查

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  $\mu$ 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。取 1  $\mu$ L 的 DNA sample，溶於 99  $\mu$ L 的去離子水後，於分光光度計下測定 260 之吸光值後，計算濃度（ng / $\mu$ L）後，調整 DNA 濃度為 100ng/ $\mu$ L。

### (四)相近物種 sHSP 序列之比對與引子對設計

由基因庫中搜尋與 sHSP 相關之序列，將各物種之胺基酸序列（圖 1-1-1、圖 1-1-2、圖 1-1-3、圖 1-1-4）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（表 1-1-1、表 1-1-2）。進行聚合酶鏈鎖反應後，再依所得水韭 sHSP 序列進行具專一性之引子對設計。

### (五)以 sHSP21 保守區域設計引子對

自 NCBI 資料庫中搜尋相關物種之小分子熱休克蛋白 sHSP21 核酸序列，共得到阿拉伯芥（*Arabidopsis thalianas*）、荷花（*Nelumbo nucifera*）、番茄（*Lycopersicon esculentum*）、豌豆（*Pisum sativum*）及矮牽牛（*Petunia hybrida*）之小分子熱休克蛋白 sHSP21 核酸序列，依其保守區域設計引子對 sHSP21-F1/sHSP21-R1（表 2-2）。

(六) 以水韭屬植物核苷酸序列設計專一性較高之 sHSP21 引子對

依據 sHSP21-F1/sHSP21-R1 對水韭屬植物擴增出 DNA 片段序列，設計水韭屬植物專屬之 sHSP21 引子 sHSP21-F2/sHSP21-R2 (表 2-2)。

(七) 以水韭屬植物核苷酸序列設計即時定量聚合酶連鎖反應專一性之 sHSP21 引子對

依據 sHSP21-F/sHSP21-R 對水韭屬植物擴增出小片段序列，設計水韭屬植物專屬之即時定量聚合酶連鎖反應 sHSP21 引子 RT-sHSP21-F/RT-sHSP21-R (表 2-2)。

(八) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 之進行

1. 根據 sHSPs 保守區域設計之引子對樣本之 DNA 進行聚合酶連鎖反應，擴增出樣本之 sHSP family 之序列，並將所得 PCR 產物進行 TA cloning 後定序，依定序所得結果作遺傳譜系之分析。

(1) 不同類小分子熱休克蛋白保守區域擴增條件：

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。

(2) sHSP21 保守區域擴增條件：

95 °C 3 分鐘；95 °C 30 秒，56 °C 30 秒，72 °C 30 秒，35 個循環；72 °C 10 分鐘。

2. 以 Operon 之 RAPD 逢機引子(表 2-3)進行 PCR 的擴增反應，其反應條件如下：

以 94 °C 3 分鐘；94 °C 1 分鐘，40 °C 1 分鐘，72 °C 2 分鐘，35 個循環；72 °C 7 分鐘。

表 2-1 不同類小分子熱休克蛋白胺基酸序列保守區域所設計之引子

sHSP 類型	引子對
Chloroplast sHSP	5'-ATGGCTTRCAMPACTCTTACATGTT-3' 3'-CACGAVRWDYAVWGNVAVGGNTTCT-5'
cytosolic classI sHSP	5'-ATCTCWMTVATYCCAAGYWTYTTYG-3' 3'-CTCTTRCCNCAMRTVTGNCAVYRVC-5'
ER sHSP	5'-ATGAKKVWSHWHHBHVWAHDMRYVT-3' 3'-TTYCCTCCWAYYHAMCAVWBRTAAC-5'
mitochondrion sHSP	5'-ATGGCDTCMWBNSTNGYDNYSAAAGM3' 3'-TACTTYTTRCCRCACRASTYYCANY-5'

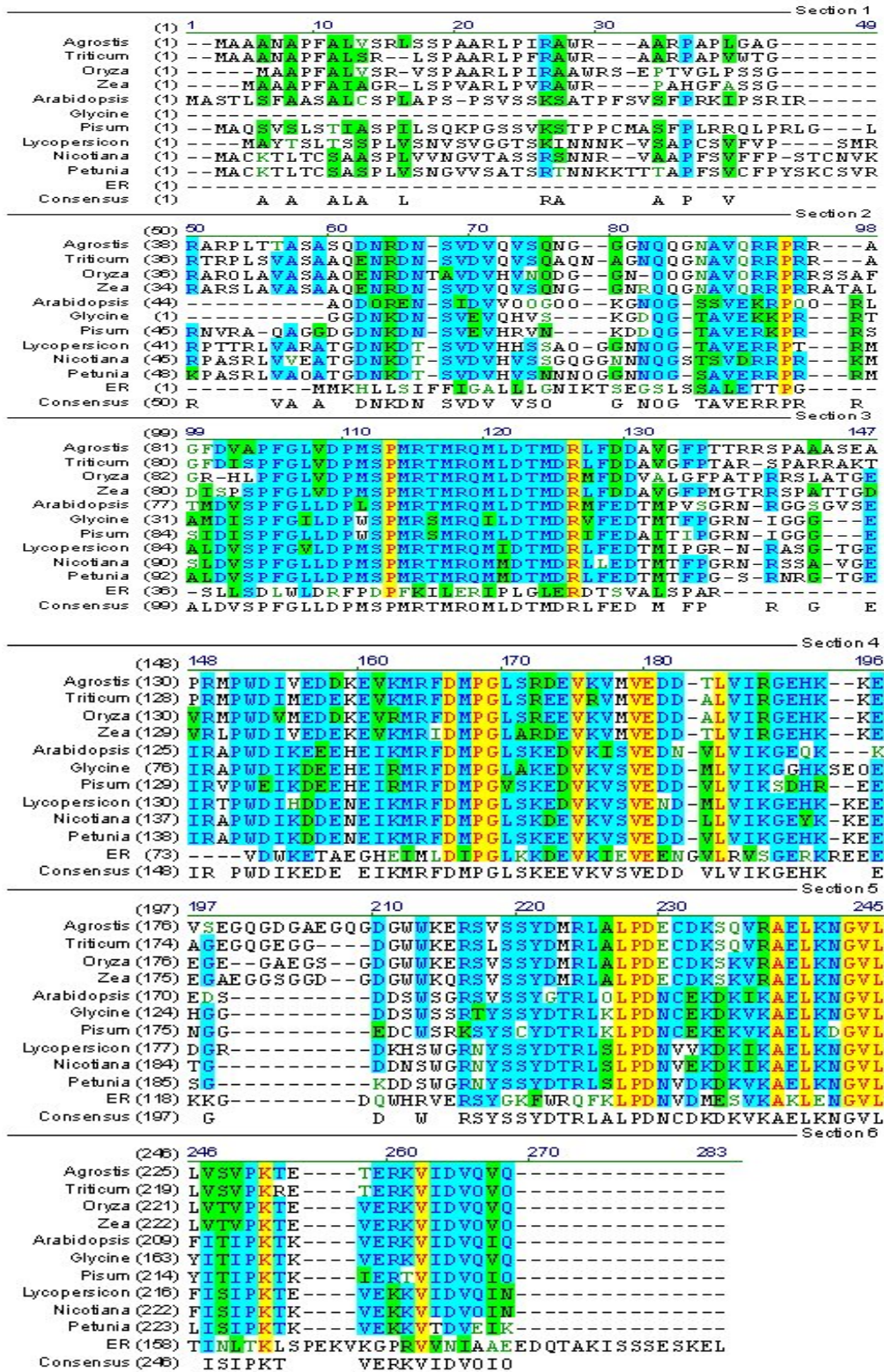


圖 2-1 不同植物之 chloroplast sHSP 胺基酸序列。

金門稀有植物遺傳多樣性調查

		Section 1									
		(1) 1	10	20	30	49					
Arabidopsis	(1)	---	MMKHL	LSIF	FFIGALL	IGNIKTSE	SSIAET---	TPG	SL	SD	LWL
Glycine	(1)	---	MRHFL	VLMPL	ILLV	FAGF	PSKAKG	SL	PFTN---	HPN	TL
Pisum	(1)	M	SLKPL	NMLL	WPF	LLI	LAADF	PLKAK	AS	LI	PFID---
Lycopersicon	(1)	---	MRV	ISK	L	TL	LI	IS	IGC	IFQ	VSS
Solanum	(1)	---	MRV	ISK	L	TL	LI	IS	IGC	IFQ	VSS
Oryza	(1)	-	MAS	MRT	AAAA	AMLAC	AVL	ASTA	ADG	ALL	FW
Consensus	(1)		MRMRS	L	TL	LI	IS	II	LIA	QVSS	AAGASS
		Section 2									
		(50) 50	60	70	80	98					
Arabidopsis	(44)	D	RFP	DP	PK	I	L	E	R	I	P
Glycine	(43)	N	HFP	DP	FR	V	L	E	Q	I	P
Pisum	(47)	D	RFP	DP	FR	V	L	E	Q	I	P
Lycopersicon	(47)	N	T	F	L	D	P	F	K	V	L
Solanum	(45)	N	T	F	L	D	P	F	K	V	L
Oryza	(48)	L	A	A	D	P	F	R	I	L	E
Consensus	(50)	N	F	P	D	P	F	K	V	L	E
		Section 3									
		(99) 99	110	120	130	147					
Arabidopsis	(91)	L	K	K	D	E	V	K	I	E	V
Glycine	(92)	L	K	R	D	E	I	K	I	E	V
Pisum	(95)	L	K	K	D	D	I	K	I	E	V
Lycopersicon	(87)	L	N	K	D	D	I	K	I	E	V
Solanum	(94)	L	K	K	D	D	I	K	I	E	V
Oryza	(96)	M	R	K	E	D	L	R	V	E	V
Consensus	(99)	L	K	K	D	D	I	K	I	E	V
		Section 4									
		(148) 148	160	170	180	196					
Arabidopsis	(138)	Q	F	K	L	P	D	N	V	D	L
Glycine	(137)	Q	F	K	V	P	D	N	V	D	L
Pisum	(140)	Q	F	K	L	P	Q	N	V	D	L
Lycopersicon	(134)	Q	F	R	L	P	E	N	A	D	I
Solanum	(141)	Q	F	R	L	P	E	N	A	D	I
Oryza	(145)	Q	L	R	L	P	D	N	A	D	L
Consensus	(148)	Q	F	K	L	P	D	N	V	D	L
		Section 5									
		(197) 197	218								
Arabidopsis	(183)	O	T	A	K	I	S	S	S	E	S
Glycine	(184)	Q	A	P	K	L	K	G	N	E	D
Pisum	(187)	K	P	S	K	I	V	N	D	E	L
Lycopersicon	(181)	G	K	E	S	S	V	R	E	E	L
Solanum	(188)	G	K	E	S	S	V	R	E	E	L
Oryza	(194)	G	G	K	S	I	G	G	A	G	E
Consensus	(197)	G	K	S	V	E	E	L	K		

圖 2-2 不同植物之 ER sHSP 胺基酸序列。

		Section 1																																																
		(1)	10	20	30	49																																												
Arabidopsis	(1)	MSL	IPS	FF	GM	NR	RIN	NN	IF	DP	PS	LD	V	W	D	P	F	K	E	L	O	F	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S												
Pisum	(1)	MSL	IPS	FF	SG	RR	---	---	SNV	FD	PF	SL	D	W	D	P	L	K	D	F	P	F	S	N	S	S	S	S	P	S	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---										
Lycopersicon	(1)	MSL	IP	R	I	F	G	D	R	---	---	---	SS	M	F	D	P	F	S	L	D	V	F	D	P	F	R	E	L	G	F	P	S	T	N	---	---	---	---	---										
Arabidopsis#2	(1)	MSL	IPS	I	F	G	G	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---										
Brassica	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---										
Brassica#2	(1)	MSL	IPS	FF	G	G	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---										
Codonopsis	(1)	MA	L	I	P	S	I	F	G	G	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---										
Prunus	(1)	---	---	MA	L	S	L	F	G	G	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---									
Helianthus	(1)	MS	L	I	P	S	F	F	T	S	K	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---									
Nicotiana	(1)	MS	L	I	P	S	F	F	D	G	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---								
Arabidopsis#3	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---								
Cuscuta	(1)	MS	L	I	P	S	F	F	E	G	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---							
Oryza	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---						
Zea	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
Censusus	(1)	M	S	L	I	P	S	F	G	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
		Section 2																																																
		(50)	50	60	70	80	98																																											
Arabidopsis	(41)	SA	I	A	N	A	R	V	D	W	K	E	T	A	E	A	H	V	F	K	A	D	L	P	G	M	K	K	E	E	V	K	V	E	I	E	D	S	V	L	K	I	S	G	E	R	H	V		
Pisum	(46)	PA	F	V	S	T	R	V	D	W	K	E	T	P	E	A	H	V	F	K	A	D	L	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	D	R	V	L	O	I	S	G	E	R	S	V	
Lycopersicon	(42)	SA	F	A	N	T	R	I	D	W	K	E	T	P	E	P	H	V	F	K	V	D	L	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	R	V	L	O	I	S	G	E	R	N	V		
Arabidopsis#2	(47)	AA	F	T	N	A	R	V	D	W	K	E	T	P	E	A	H	V	F	K	A	D	L	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	K	N	V	L	O	I	S	G	E	R	S	K	
Brassica	(16)	AA	F	T	N	A	R	V	D	W	K	E	T	P	E	A	H	V	F	K	A	D	L	P	G	L	M	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	K	N	I	L	O	I	S	G	E	R	S	K	
Brassica#2	(45)	AA	F	T	N	A	K	V	D	W	K	E	T	P	E	A	H	V	F	K	A	D	L	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	G	M	I	L	O	I	S	G	E	R	S	S	
Codonopsis	(43)	AA	I	A	N	T	R	I	D	W	K	E	T	P	E	A	H	V	F	K	A	D	L	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	G	R	V	L	O	I	S	G	E	R	S	K	
Prunus	(42)	TA	I	A	N	T	R	I	D	W	K	E	T	P	E	A	H	I	F	I	A	D	L	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	D	D	G	K	V	L	H	I	S	G	E	R	S	R	
Helianthus	(40)	AA	I	V	N	A	R	I	D	W	K	E	T	P	E	A	H	V	L	K	A	D	L	P	G	M	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	G	R	V	L	O	I	S	G	E	R	C	R	
Nicotiana	(47)	AA	F	S	S	A	R	I	D	W	K	E	T	P	E	S	H	V	F	K	V	D	L	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	G	R	V	L	O	I	S	G	E	R	S	R		
Arabidopsis#3	(20)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Cuscuta	(45)	SA	F	A	N	A	R	I	D	W	K	E	T	P	E	A	H	I	F	K	A	D	V	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	E	G	K	V	L	O	I	S	G	E	R	S	K	
Oryza	(37)	AA	F	A	N	A	R	V	D	W	K	E	T	P	E	S	H	V	F	K	A	D	L	P	G	V	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	G	N	V	L	V	I	S	G	Q	R	S	K		
Zea	(40)	AA	F	A	S	A	R	I	D	W	K	E	T	P	E	A	H	V	F	K	A	D	L	P	G	V	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	G	N	V	L	V	I	S	G	O	R	S	R	
Censusus	(50)	AA	F	A	N	A	R	I	D	W	K	E	T	P	E	A	H	V	F	K	A	D	L	P	G	L	K	K	E	E	V	K	V	E	V	E	D	G	R	V	L	O	I	S	G	E	R	S	K	
		Section 3																																																
		(99)	99	110	120	130	147																																											
Arabidopsis	(90)	E	K	E	E	K	O	D	T	W	H	R	V	E	R	S	S	G	---	---	---	---	G	F	S	R	K	F	R	L	P	E	N	V	K	M	D	O	V	K	A	S	M	E	N	G	V	L	T	
Pisum	(95)	E	K	E	D	K	N	D	E	W	H	R	V	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	L	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	M	D	K	V	K	A	S	M	E	N	G	V	L	T		
Lycopersicon	(91)	E	K	E	D	K	N	D	K	W	H	R	M	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	M	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	M	D	O	V	K	A	S	M	E	N	G	V	L	T		
Arabidopsis#2	(96)	E	N	E	E	K	N	D	K	W	H	R	V	E	R	A	S	G	---	---	---	---	F	M	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	M	E	E	V	K	A	T	M	E	N	G	V	L	T		
Brassica	(65)	E	N	E	E	K	N	D	K	W	H	R	E	R	A	S	G	---	---	---	---	F	M	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	M	E	E	V	K	A	T	M	E	N	G	V	L	T			
Brassica#2	(94)	E	N	E	E	K	S	D	E	W	H	R	V	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	M	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	V	D	E	V	K	A	S	M	E	N	G	V	L	S		
Codonopsis	(92)	E	Q	E	E	K	T	D	T	W	H	R	V	E	R	S	V	G	---	---	---	---	F	H	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	V	D	Q	V	T	A	S	M	E	N	G	V	L	T		
Prunus	(91)	E	Q	E	E	K	N	D	K	W	H	R	E	R	S	T	G	---	---	---	---	F	S	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	I	D	O	V	K	A	S	M	E	N	G	V	L	T			
Helianthus	(89)	E	Q	E	E	K	D	D	T	W	H	R	V	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	I	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	M	D	E	V	K	A	M	E	N	G	V	L	T			
Nicotiana	(96)	E	Q	E	E	K	N	D	K	W	H	S	M	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	L	R	R	F	R	L	P	E	N	I	K	M	E	E	L	K	A	T	M	E	N	G	V	L	T		
Arabidopsis#3	(66)	E	E	K	K	E	N	L	V	W	H	V	A	E	R	E	A	F	S	G	G	G	S	E	F	L	R	R	I	F	L	P	E	N	V	K	V	D	O	V	K	A	Y	M	E	N	G	V	L	T
Cuscuta	(94)	E	K	E	E	K	N	D	T	W	H	R	V	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	L	R	S	F	R	L	P	E	N	A	K	V	D	Q	V	K	A	A	M	E	N	G	V	L	T		
Oryza	(86)	E	K	E	D	K	N	D	K	W	H	R	V	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	M	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	V	D	O	V	K	A	S	M	E	N	G	V	L	T		
Zea	(89)	E	K	E	D	K	D	D	K	W	H	R	V	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	I	R	R	F	R	L	P	D	A	K	W	D	Q	V	K	A	G	L	E	N	G	V	L	T			
Censusus	(99)	E	Q	E	E	K	N	D	K	W	H	R	V	E	R	S	S	G	---	---	---	---	F	M	R	R	F	R	L	P	E	N	A	K	M	D	Q	V	K	A	S	M	E	N	G	V	L	T		

圖 2-3 不同植物之 cytosolic class I sHSP 胺基酸序列。

金門稀有植物遺傳多樣性調查

		Section 1												
		(1)	10	20	30	40	50							
Arabidopsis	(1)	-----	MASS	SALALRRL	SSSTVAVPRA	LR	AVRPVAA	---	SRL	FNT				
Euphorbia	(1)	-----	MASS	LAKRLVSSN	--LIPSS	LRVIRPCVAA	QPS	SRL	FNT					
Glycine	(1)	-----	MASS	LAKRFLSSS	---LLSR	SLRPAASA	---	SHR	S	FDT				
Pisum	(1)	-----	MASS	LAKRFLSSG	---LLSS	SFLRPVASS	---	ASR	S	FNT				
Oryza	(1)	MASIVASKR-	IPLFRLVE	QLLAASP	--AQGA	ASALRPVAVAG	---	GSR	A	YNT				
Zea	(1)	MASIVASRR	AVPLVRA	EKLLAASS	--APGT	GSALRPVAVAG	---	GLR	G	YNT				
Triticum	(1)	MASRVVFSNR	IPLVR	AMENLLAAS	-----	SG	SALRPA	AAVAG	---	G	V	R	G	YNA
Consensus	(1)		MASS	LAKRLLSSS		S	SALRPVAAA			GSR	FNT			
		Section 2												
		(51)	51	60	70	80	90	100						
Arabidopsis	(40)	NAAR	NYED	GVDRNHHS	NRHVS	RH-----	GGD	FFSHILD	PFT	PT	RLS			
Euphorbia	(39)	NAV	RVDD	IEDDRRID	GPLYGR	-----	GGD	FLSDV	VNPF	W	PTNLS			
Glycine	(35)	NAM	RQYD	NRADDHSTD	IDRHSER	SFPSTAR	RDDI	FLRC	VGS	IF	SDSEFEP			
Pisum	(35)	NAM	ROYD	OHSDDRNV	VYRHS	SFP---R	TRRDD	LLSD	VDF	PP	SPRS			
Oryza	(47)	GA	QLRR	HERDES	DDSG	RGYD	TRR	PT	R	D	A	T	M	P
Zea	(48)	GAP	LRRY	E	GA	E	S	E	D	D	S	V	R	E
Triticum	(44)	GAP	LSYD	RDEA	V	E	D	T	R	---	V	A	R	E
Consensus	(51)	NA	RQ	DD	E	S	R	H	R		F	V	D	P
		Section 3												
		(101)	101	110	120	130	140	150						
Arabidopsis	(82)	QML	N	F	M	D	Q	V	S	E	I	P	L	V
Euphorbia	(81)	RML	N	V	M	E	P	F	I	E	N	P	F	V
Glycine	(85)	GSE	H	D	G	P	G	H	G	O	S	V	P	L
Pisum	(79)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Oryza	(97)	RLL	S	L	M	D	D	L	A	T	P	A	G	R
Zea	(98)	RLL	N	L	V	D	D	L	A	V	A	A	P	---
Triticum	(90)	RLL	S	L	M	D	D	V	A	A	A	S	P	D
Consensus	(101)	RLL	L	M	D	V	A	L	A	A	A	V	R	R
		Section 4												
		(151)	151	160	170	180	190	200						
Arabidopsis	(132)	EDV	K	L	A	E	O	N	T	L	V	I	R	G
Euphorbia	(128)	KDV	K	V	S	V	E	K	N	T	L	I	I	K
Glycine	(135)	EDV	K	I	S	V	E	O	N	T	L	I	I	K
Pisum	(124)	EDV	K	I	S	V	E	O	N	T	L	I	I	K
Oryza	(142)	EHV	K	V	W	A	E	Q	N	S	L	V	I	K
Zea	(140)	EHV	K	V	W	A	E	Q	N	S	L	V	I	K
Triticum	(137)	EHV	K	V	W	A	E	Q	N	S	L	V	I	K
Consensus	(151)	EDV	K	V	S	V	E	O	N	T	L	V	I	K
		Section 5												
		(201)	201	210	229									
Arabidopsis	(182)	AEM	K	N	G	V	L	K	V	V	V	P	K	V
Euphorbia	(176)	AEM	K	N	G	V	L	K	V	V	V	P	K	V
Glycine	(183)	AEM	K	N	G	V	L	K	V	V	V	P	K	V
Pisum	(174)	AEM	K	N	G	V	L	K	V	V	V	P	K	V
Oryza	(192)	AEM	K	N	G	V	L	K	V	V	V	P	K	V
Zea	(190)	AEM	K	N	G	V	L	K	V	V	V	P	K	V
Triticum	(186)	AEM	K	N	G	V	L	K	V	V	V	P	K	V
Consensus	(201)	AEM	K	N	G	V	L	K	V	V	V	P	K	V

圖 2-4 不同植物之 mitochondrion sHSP 胺基酸序列。



表 2-2 以 sHSP21 保守區域設計引子對

primer name	引子對	產物大小(bp)
sHSP21-F	5'- GGT ATC TGC ACC TTG CTC -3'	110
sHSP21-R	3'- CCT TGG TTG TTT CCT CCT -5'	
sHSP21-F1	5'- GAT CCT TTG TCA CCA ATG -3'	410
sHSP21-R1	3'- CTG TTC TAG TTT CGA CTC -5'	
sHSP21-F2	5'- CTA GGA AAC AGT GGT TAC-3'	410
sHSP21-R2	3'- CTG TTC TAG TTT CGA CTC -5'	
RT-sHSP21-F	5'- GAT CCT TTG TCA CCA ATG -3'	110
RT-sHSP21-R	3'- CTG TTC TAG TTT CGA CTC -5'	

表 2-3 八組 10-mer 之 RAPD 隨機擴增引子

primer name	引子對(5'→3')	來源
OPA	GGG TAA CGC C	Parkash <i>et al.</i>
OPY19	TGA GGG TCC C	Parkash <i>et al.</i>
OPY18	GTG GAG TCA G	Parkash <i>et al.</i>
OPY17	GAC GTG GTG A	Parkash <i>et al.</i>
OPY10	GTG ATC GCA G	Parkash <i>et al.</i>
OPA17	GAC CGC TTG T	Parkash <i>et al.</i>
OPY20	AGC CGT GGA A	Parkash <i>et al.</i>
OPY14	GGT CGA TCT G	Parkash <i>et al.</i>

(九) TA cloning

將聚合酶連鎖反應所得 DNA 片段產物進行純化，以市售之 TA cloning 套組進行 cloning，而後轉入大腸桿菌勝任細胞 (*Escherichia coli* competent cell) 中，並將菌液培養於含 X-gal 和 IPTG 的培養基上進行隔夜培養。隔日挑出白色菌落，並以 sHSP 引子對進行聚合酶連鎖反應，確認轉入之片段實為目標片段，即可進行核酸序列定序分析。

(十) 樣品 RNA 抽取方法

本實驗以 RNeasy plant total RNA mini kit (Qiagen, CA, USA) 進行總 RNA 萃取。首先秤取 0.1 g 的植物樣本於研鉢中，加入液態氮，將樣本研磨成粉末狀，趁尚有液態氮殘留時，將凍乾粉末裝入微量離心管中，待液態氮揮發，迅速加入 450  $\mu$ l 之 Buffer RLT 並震盪均勻，於 56°C 下反應 1~3 分鐘，將溶解之產物移至 QIAshredder spin column 中，以全速 12,000 rpm 離心 2 分鐘後，取過濾下之澄清液，加入 0.5 倍體積之 96~100 % 乙醇，並快速地以微量吸管混勻後轉置入已放於液體收及管上之 RNeasy spin column 中，以 10,000 rpm 離心 15 秒後，丟棄離心出之液體，加入 700  $\mu$ l 之 Buffer RW1，再以 10,000 rpm 離心 15 秒後，丟棄離心出之液體，最後加入 500  $\mu$ l 之 Buffer RPE，以 10,000 rpm 離心 2 分鐘後，丟棄離心出之液體，並將 RNeasy spin column 放回收集管中，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘後，將 RNeasy spin column 放至於新的微量離心管中，加入 30~50  $\mu$ l 的 RNase-free water 至 column 的膜上，再以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，微量離心管中所收集之產物即為樣本之總 RNA。

(十一) 反轉錄聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse transcription PCR, RT-PCR)

以SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR kit (Invitrogen) 進行反轉錄反應。操作前先將試劑與RNA樣品短暫離心，取 3  $\mu\text{l}$ 之總RNA、1  $\mu\text{l}$ 之oligo (dT)<sub>20</sub> primer及 1  $\mu\text{l}$ 之 10 mM dNTP mix，置入聚合酶連鎖反應專用之微量離心管中，再以DEPC處理過之水添加至總體積為 10  $\mu\text{l}$ ，於 65°C下反應 5 分鐘後，冰浴至少 1 分鐘。另取新的微量離心管，加入 2  $\mu\text{l}$ 之 10X RT buffer、4  $\mu\text{l}$ 之 25 mM MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu\text{l}$ 之 0.1 M DTT、1  $\mu\text{l}$ 之RNaseOUT (40U/ $\mu\text{l}$ )及 1  $\mu\text{l}$ 之Superscript III RT，並將此配好之溶液與先前已反應過之溶液混合，置於 50°C下反應 50 分鐘，再以 85°C加熱 5 分鐘以終止反應，並冰浴至少 1 分鐘，最後加入 1  $\mu\text{l}$ 之RNase H，於 37°C下反應 20 分鐘，即得cDNA產物。

(十二) 即時定量聚合酶連鎖反應

即時定量聚合酶連鎖反應試劑：0.5  $\mu\text{M}$  primer (each)，4mM MgCl<sub>2</sub>，cDNA template 2  $\mu\text{l}$  (含各不同之稀釋濃度)，LightCycler-DNA Master SYBER Green I 1X，總體積為 20  $\mu\text{l}$ 。LightCycler PCR反應條件如下：95°C 30 秒；97°C 0 秒，51°C 0 秒，72°C 10 秒，40 個循環之DNA增殖反應，並於每次反應完時(即 72°C 10 秒後)及偵測各反應之螢光變化量，所得結果近一步藉由儀器之電腦分析以進行定量之計算。

(十三) 遺傳譜系分析

定序後的序列經由和基因庫的資料進行alignment後，利用 PHYLIP program 分析遺傳譜系樹狀圖 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phylip-uk.html>)。樹狀圖所依據的algorithms為UPGMA。



## 第三章 結果與討論

### 第一節 金門地區水韭棲地觀察及樣本採集

金門所產之水韭棲地為一位於太武山西南側之小水窪，以 GPS 衛星定位器測得該棲地之經緯度為 N24°27'28.656''、E118°23'41.2368'' (圖 3-1)，海拔 94.1 公尺。

金門地區水韭之生長棲地狹小，生態環境改變受氣候影響甚巨。金門地區降雨量以五、六、八、九月較大，平均雨量約 200 mm，而冬季雨量少，平均降雨量不超過 50 mm (圖 3-2)，造成狹小之生長區域水位不穩定，具觀察，2007 年夏季時，水韭植株成熟，但水位漸漸降低 (圖 3-3)，至 2007 年冬季往往因水域過渡乾旱造成植株枯死 (圖 3-4)，隔年 3 月水域漸擴增，但植株仍矮小 (圖 3-5)，2008 年 7 月因颱風剛過，其水位較前一年高 (圖 3-6)。而根據本實驗之實地記錄金門之水韭棲地一天內之水溫變化，2007 年 12 月溫度範圍為 7~21°C，2008 年 3 月為 13~32°C，2008 年 7 月則為 28~44°C，顯示一日之間氣溫變化甚大。



圖 3-1 金門太武山水韭棲地位置圖



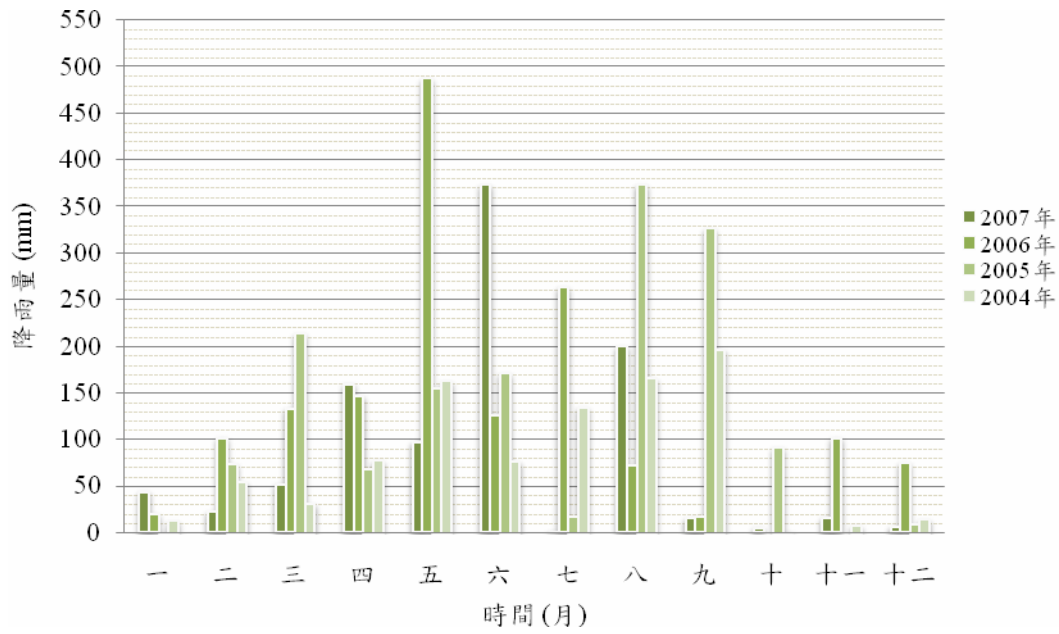


圖 3-2 金門地區月平均降雨量

(資料來源：中央氣象局)

金門稀有植物遺傳多樣性調查

(A)



(B)



圖 3-3 金門太武山之水韭棲地 2007 年 7 月之情況，水域範圍雖小(A)，但植株成熟(B)。

(A)



(B)



圖 3-4 金門太武山之水韭棲地 2007 年 12 月之情況，水域幾乎乾涸(A)，植株已乾枯(B)。

(A)



(B)



圖 3-5 金門太武山之水韭棲地 2008 年 3 月之情況，水域範圍增廣，水位升高，植株仍矮小。

(A)



(B)



圖 3-6 金門太武山之水韭棲地 2008 年 7 月之情況，颱風過後，水域範圍增廣，水位升高(A)，植株成熟(B)。

## 第二節 孢子保存與萌芽試驗

自金門之水韭棲地取回土壤，置入 250 $\mu\text{m}$  孔徑大小之篩網，放置水中搖動，可篩掉細微的土壤顆粒，篩網上即可得到大部分的孢子（圖 3-7）。將自土壤中取得之孢子及自孢子囊（圖 3-8）取出之成熟孢子乾燥後可密封收藏，做為種源之保存。

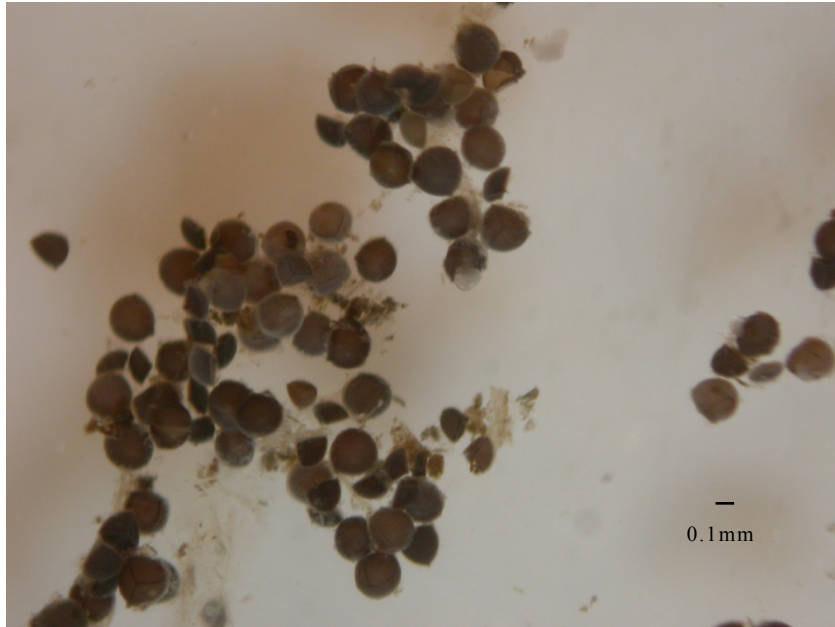
依據採樣後觀察金門地區水韭之型態，其葉片呈螺旋狀排列叢生，孢子囊位於葉片基部，可分為大孢子囊及小孢子囊（圖 3-8），大孢子囊內約有 100~300 粒之大孢子，呈褐色，大小約 250~300 $\mu\text{m}$ ，小孢子囊內則有上萬顆小孢子，其大小約為 20~30 $\mu\text{m}$ （圖 3-8）。

此外，本實驗參照金門及陽明山之每月氣溫變化（圖 3-9），以及本實驗室實際測量氣溫變化之結果，將金門地區水韭與台灣水韭大、小孢子施以不同溫度處理不同天數，觀察溫度變化對於孢子萌發之情形。由於金門地區夏季土溫可達 45 $^{\circ}\text{C}$ ，而冬季氣溫則可降至 5 $^{\circ}\text{C}$ ，故將金門地區水韭大、小孢子置於 5 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$  各 5 天、10 天、15 天後移置 25 $^{\circ}\text{C}$  培養；陽明山地區其夏季高溫為 35 $^{\circ}\text{C}$ ，冬季氣溫則可降至約 0 $^{\circ}\text{C}$ ，故將台灣水韭大、小孢子置於 5 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$  各 5 天、10 天、15 天後移置 25 $^{\circ}\text{C}$  培養。

結果發現，金門地區水韭之大、小孢子於不同溫度處理後五周，大孢子萌發率均為 0，而至第六周時，以 5 $^{\circ}\text{C}$  處理 5 天之 100 顆大孢子中有 4 顆萌發，以 5 $^{\circ}\text{C}$  處理 10 天之 100 顆大孢子中僅一顆萌發（圖 3-10），其餘處理均未有孢子萌發情形（圖 3-11），結果符合前人研究中，利用低溫打破孢子休眠，使孢子萌發較高溫下來得早，但本實驗亦發現，較長時間之低溫處理，反而會降低孢子萌發之速度。

而台灣水韭大、小孢子以不同溫度處理後五周時，各處理幾乎都有孢子萌發，5°C處理能夠促使大孢子較快萌發，但實驗結果發現，以35°C處理5天及10天後之大孢子萌發率甚至較5°C處理來的高（圖3-12），此為金門地區水韭所沒有之現象，也說明金門地區水韭與台灣水韭孢子之生理狀況不同。

(A)



(B)

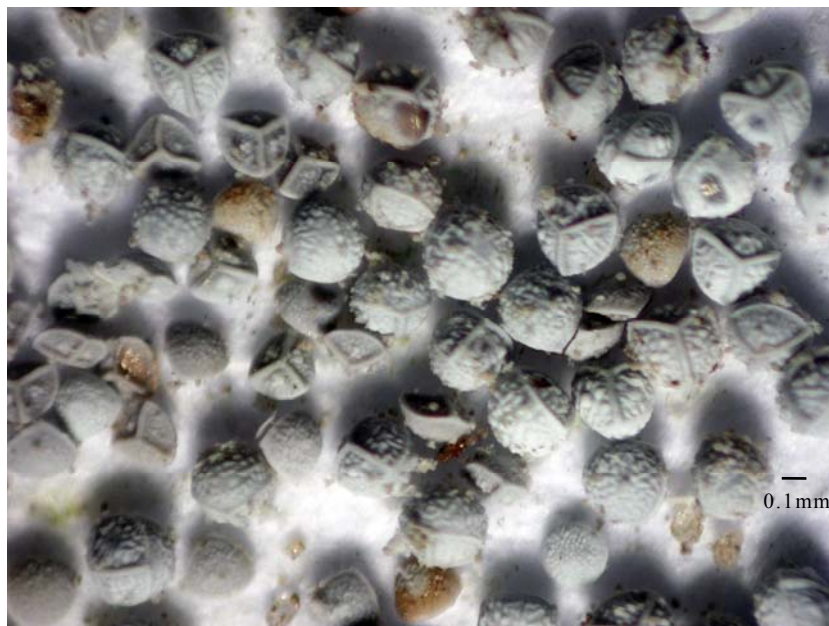


圖 3-7 解剖顯微鏡下，(A)自土壤中篩選出之金門地區水韭大孢子；(B)乾燥後之金門地區水韭大孢子



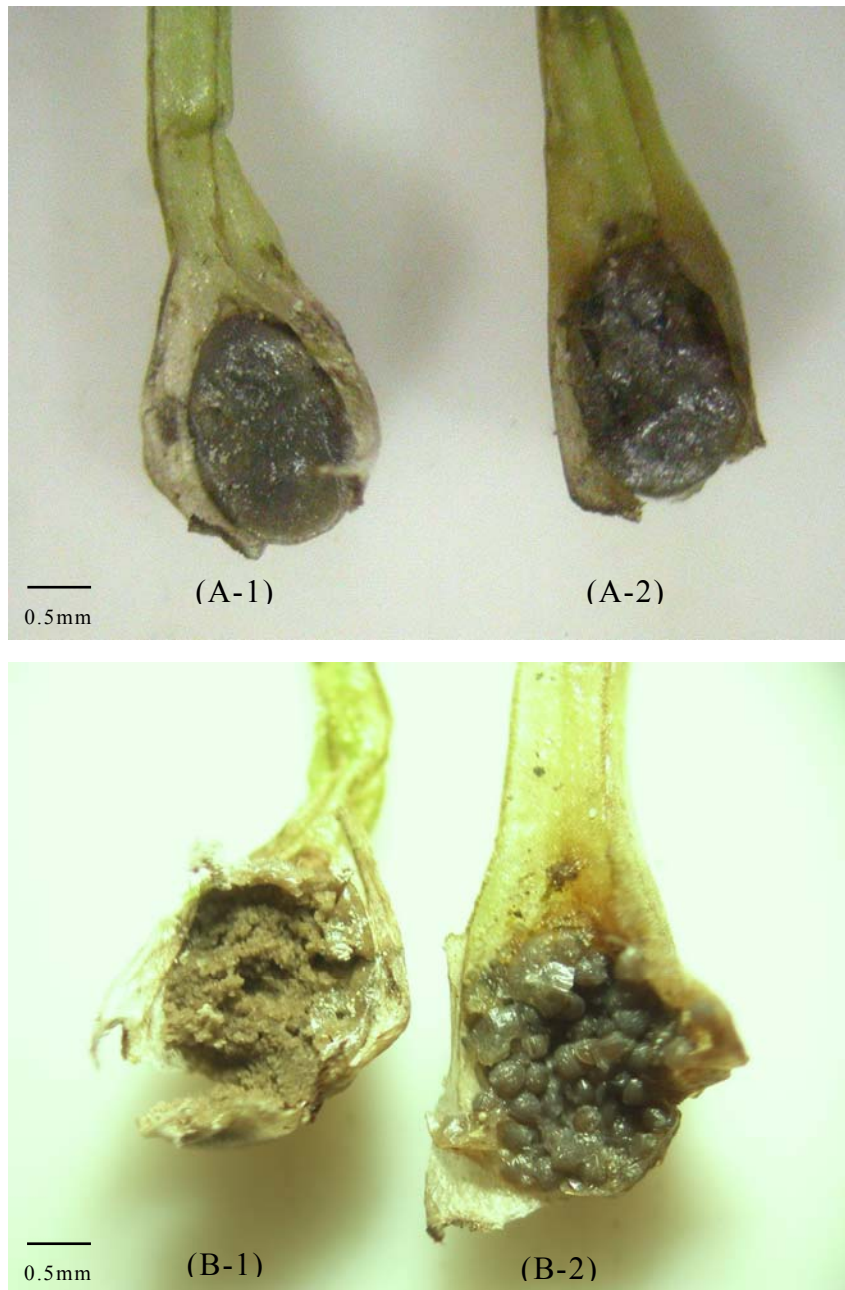
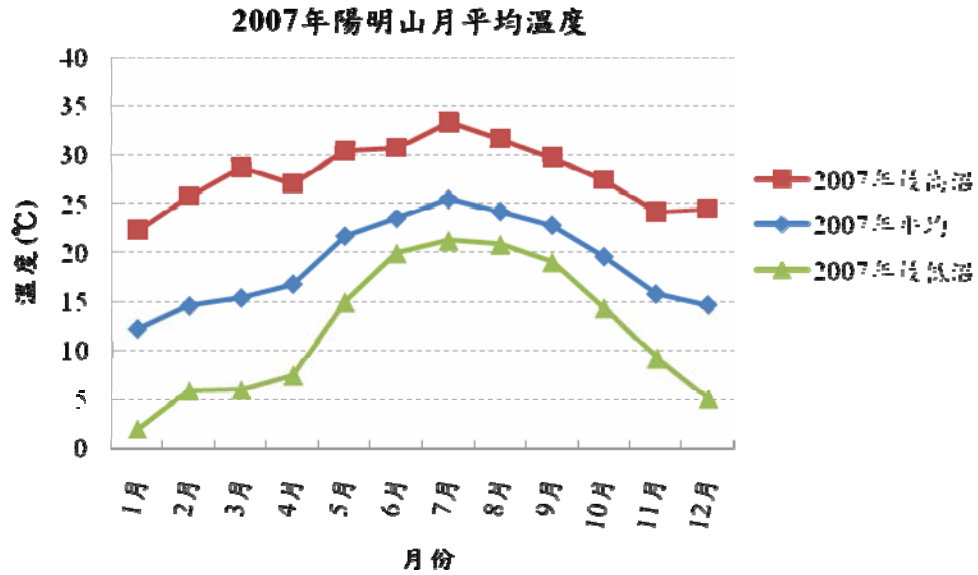


圖 3-8 解剖顯微鏡下，金門地區水韭之(A-1)小孢子囊；(A-2)大孢子囊；(B-1)小孢子囊內部；(B-2)大孢子囊內部。

(A)



(B)

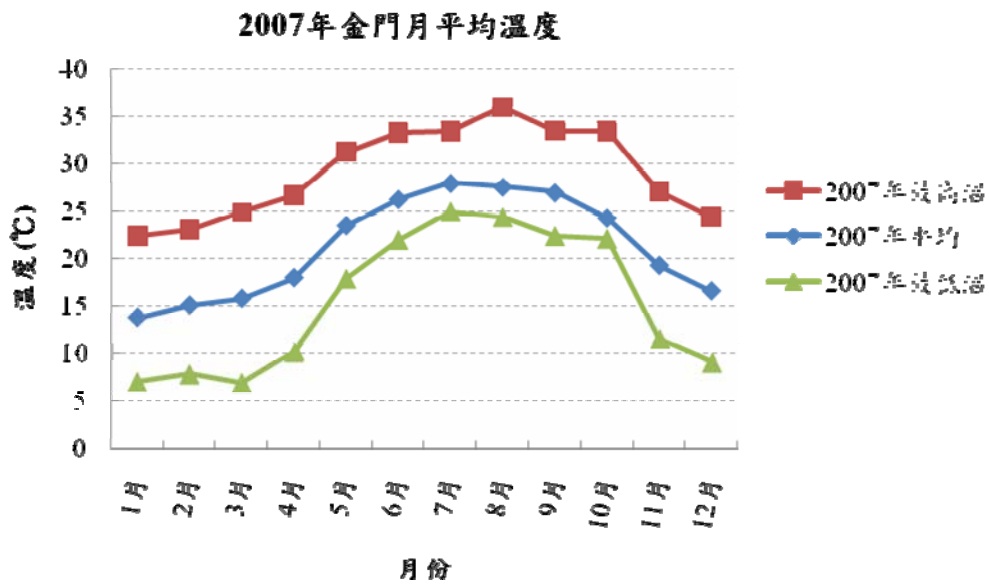


圖 3-9 2007 年(A)陽明山月平均溫度(B)金門月平均溫度。  
(資料來源：中央氣象局)

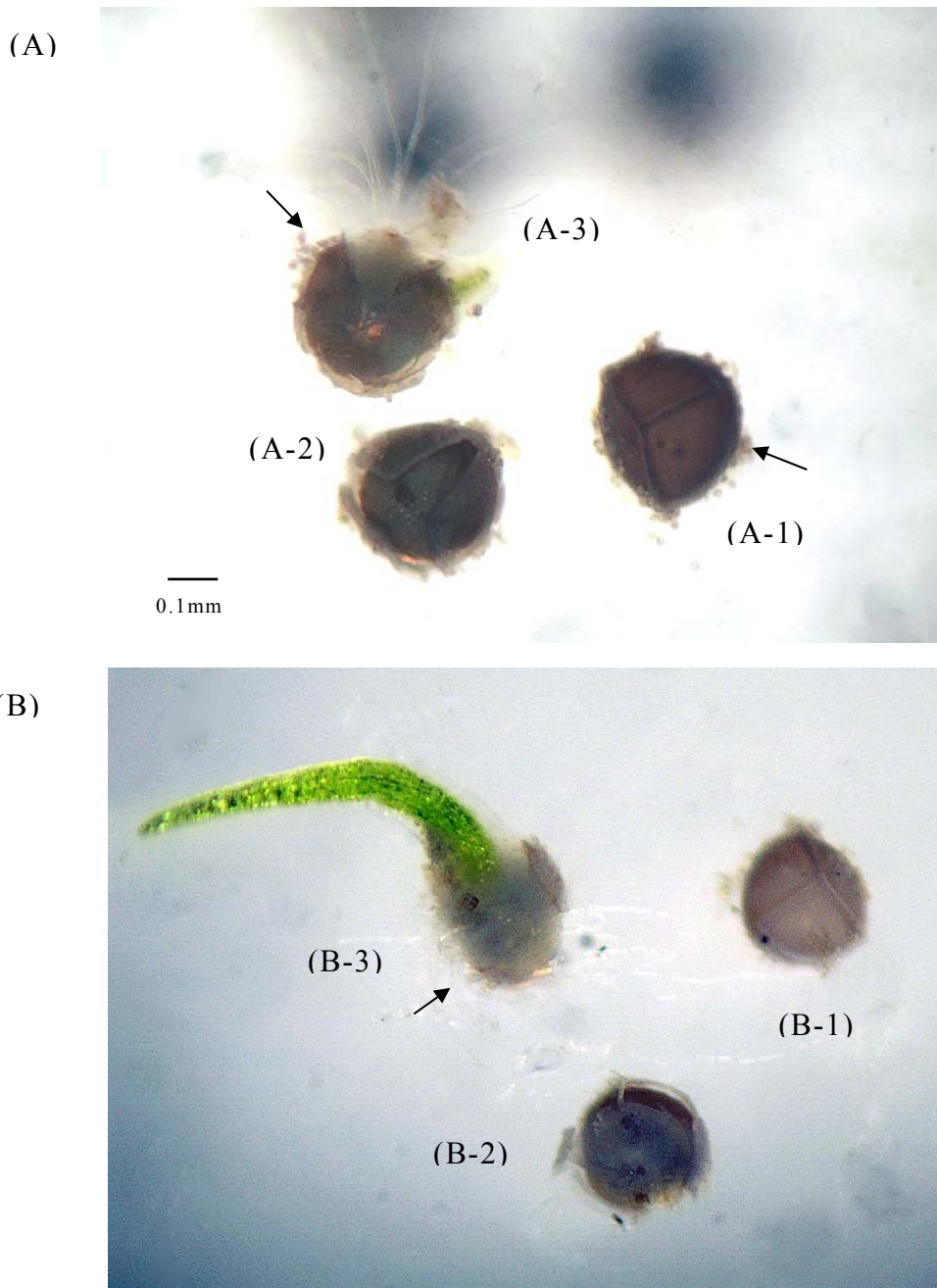


圖 3-10 解剖顯微鏡下，金門地區水韭之大孢子萌發情況。  
(A) 大孢子尚未萌發(A-1)；(A-2)已萌發；(A-3)大孢子打開後三天，剛冒出小苗。(B)為(A)觀察兩天後之情況；(B-1) 大孢子尚未萌發；(B-2)已萌發；(B-3)大孢子打開後五天，剛冒出小苗；→：小孢子。

金門稀有植物遺傳多樣性調查

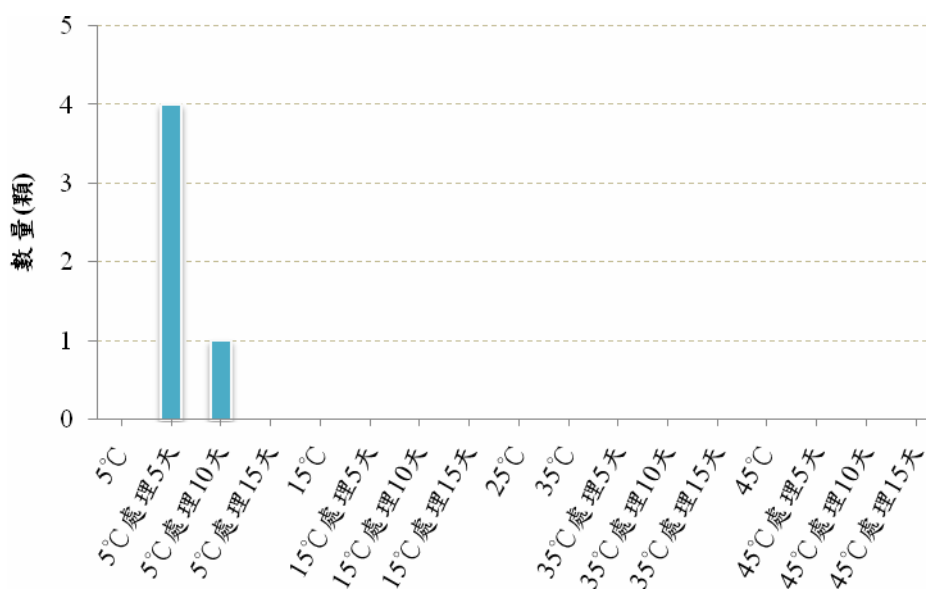


圖 3-11 金門地區水韭經過不同溫度處理後，第六周大孢子之萌發數量。

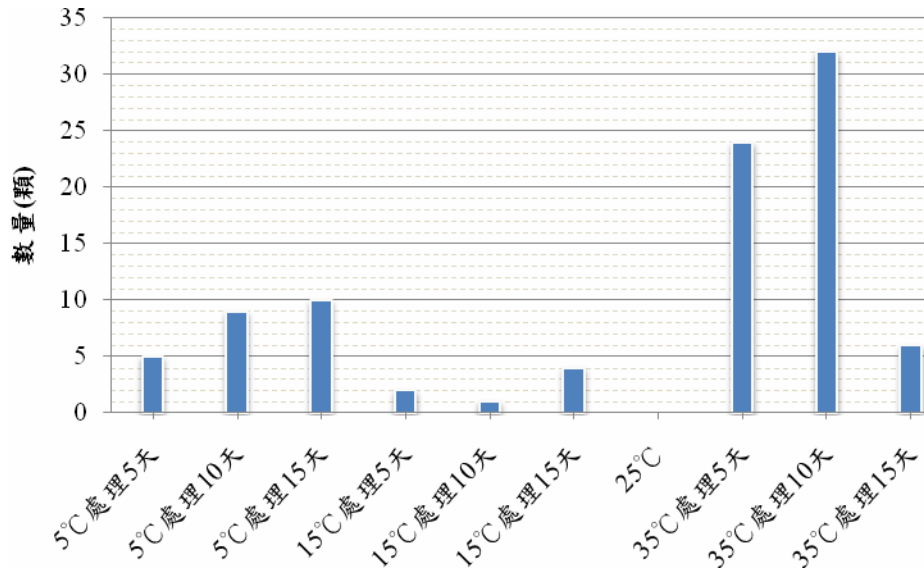


圖 3-12 台灣水韭經過不同溫度處理後，第五周大孢子之萌發數量。

### 第三節 水韭小分子熱休克蛋白基因之比較

#### 一、 相近物種之小分子熱休克蛋白核酸序列設計引子對擴增水韭基因片段

前人研究發現小分子熱休克蛋白依其分布位置可分為 cytosolic classI、cytosolic classII、ER、chloroplast 以及 mitochondrion 共五類，這五類小分子熱休克蛋白間之序列不相似，但不同植物之同一類小分子熱休克蛋白間之序列相似度則較高。由於過去無前人對水韭屬植物之小分子熱休克蛋白進行研究，因此利用其他物種已知小分子熱休克蛋白之胺基酸序列所設計的引子對（表 2-1）進行聚合酶連鎖反應，但結果發現並無法擴增出特定片段，其可能為過往這些高等植物物種與水韭屬植物親緣差異較大，而無法有效的擴增小分子熱休克蛋白核酸片段，因此改以其他方式擴增小分子熱休克蛋白。

#### 二、 以 sHSP21 保守區域設計之引子對擴增水韭基因片段

根據前人研究，利用 DNA internal spacers of nuclear ribosomal (ITS) 及核糖體 LEAFY 之第二個 intron 這兩個分子標誌，在分類上並無法將台灣水韭及金門產水韭做一個區分，因而認為金門產水韭可能為台灣水韭之變種。

而自基因庫中搜尋，發現其他許多小分子熱休克蛋白之區域，如 sHSP16、sHSP18、sHSP21、sHSP22、sHSP26 等，可提供更明確之判定。因此，本計畫首先利用一番茄之小分子熱休克蛋白 *sHSP21* 引子對（表 2-1），對台灣水韭及金門地區之水韭進行聚合酶連鎖反應。結果確如預期，發現以此引子對均可對兩種產地水韭擴增出一大小約 110bp 的片段（圖 3-13），經純化、進行 TA cloning 後定序，並與

NCBI 基因資料庫比對，確定該片段為 sHSP21 之序列，證實水韭體內含有小分子熱休克蛋白 sHSP21，且兩者間序列確有部份差異（圖 3-14）。

由於此片段較短，對於親緣關係鑑定可能較無法提供一有力證據，但藉此片段可再設計一專一性引子對 RT-sHSP21-F / RT-sHSP21-R(表 2-2)，應用於後續以即時定量聚合酶連鎖反應觀察 sHSP21 mRNA 表現量之試驗。

另外以 NCBI 資料庫中阿拉伯芥 (*Arabidopsis thalianas*)、荷花 (*Nelumbo nucifera*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、豌豆 (*Pisum sativum*)、矮牽牛 (*Petunia hybrida*) 之小分子熱休克蛋白 sHSP21 核酸序列保守區域設計引子對(表 2-2)，擴增出較長之 sHSP21 核酸序列，進行水韭之親緣關係分析(圖 3-15)。以此引子對水韭屬植物進行聚合酶連鎖反應後可得到數個產物，而本研究目標產物大小應約 410 bp，因此將長度約為 410 bp 處之產物膠體切割，進行 DNA 純化，並以 TA cloning 進行實驗，得到一水韭屬植物之小分子熱休克蛋白 sHSP21 核酸序列。

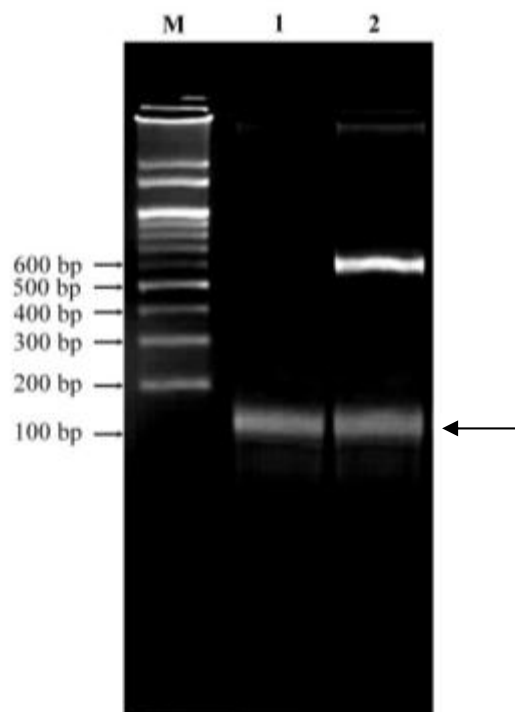


圖 3-13 以番茄之小分子熱休克蛋白 sHSP21 引子對擴增出台灣水韭及金門產水韭之 sHSP21 基因片段。

M : 100 bp ladder DNA marker ; Lane 1 : 台灣水韭 ; Lane 2 : 金門地區水韭。



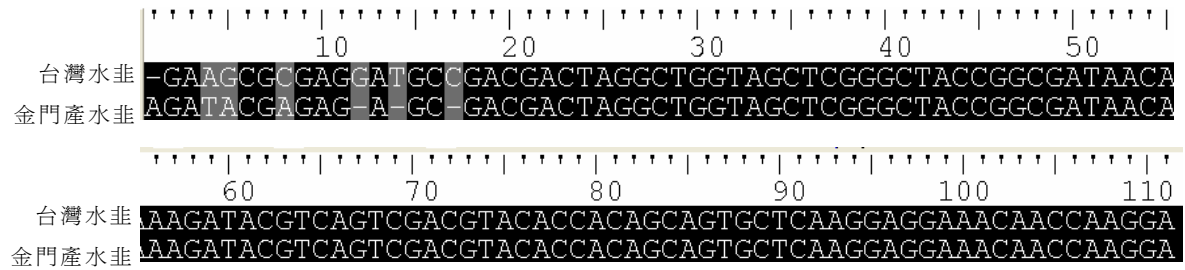
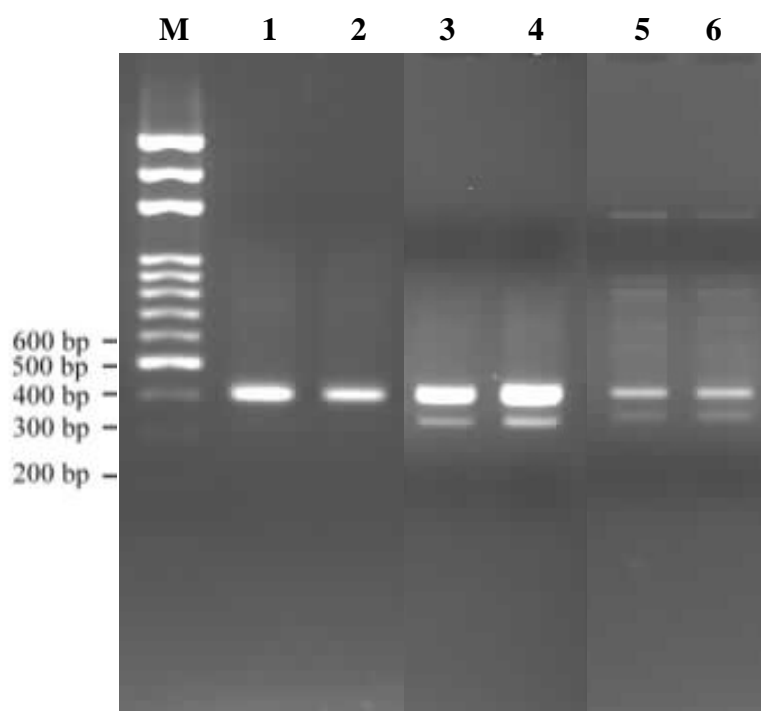


圖 3-14 以番茄之小分子熱休克蛋白 sHSP21 引子對擴增台灣水韭及金門地區水韭之 sHSP21 基因片段序列比較。



**圖 3-15 以非專一性引子對 sHSP21-F1/sHSP21-R1 對水韭屬植物進行聚合酶連鎖反應。**

M : 100 bp marker ladder ; Lane1 : 台灣水韭樣品 1 ; Lane2 : 台灣水韭樣品 2 ; Lane3 : 金門地區水韭樣品 1 ; Lane4 : 金門地區水韭樣品 2 ; Lane5 : 寬葉水韭樣品 1 ; Lane6 : 寬葉水韭樣品 2 。

### 三、以水韭屬植物核苷酸序列設計專一性較高之 sHSP21 引子對

根據非專一性小分子熱休克蛋白引子對 sHSP21-F1/sHSP21-R1 所擴增出片段，在進行 TA cloning 後定序所得之水韭屬植物核苷酸序列，設計一專一性引子對 sHSP21-F2/sHSP21-R2 (表 2-2)，以此組引子對台灣水韭、金門地區水韭及寬葉水韭 DNA 樣本進行聚合酶連鎖反應，皆可得到一長度約為 410 bp 之產物 (圖 3-16)，將此產物進行純化及 TA cloning 後定序以進行分析。

以定序所得之水韭屬植物小分子熱休克蛋白 sHSP21 之部分序列進行 alignment (圖 3-17)，並依此結果進行相似矩陣之運算後 (表 3-1)，發現金門地區水韭與台灣水韭之小分子熱休克蛋白 sHSP21 核酸序列遺傳相似度達 96.7%，與寬葉水韭之相似度則為 90.9%，而台灣水韭與寬葉水韭之相似度則為 90.6%，此結果發現金門水韭與台灣水韭之基因序列確實有差異。

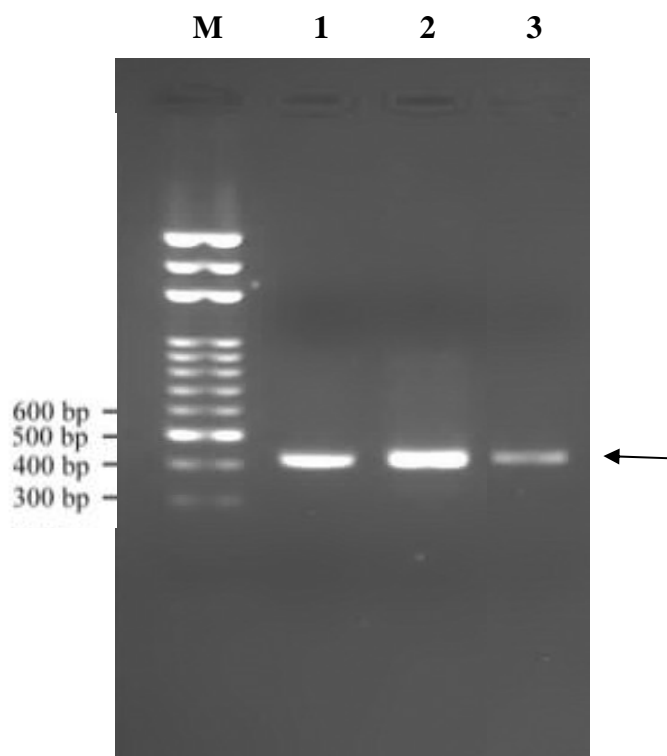


圖 3-16 以專一性引子對 sHSP21-F2/sHSP21-R2 對水韭屬植物進行聚合酶連鎖反應。

M : 100 bp marker ladder ; Lane1 : 台灣水韭 ; Lane2 : 金門地區水韭 ; Lane3 : 寬葉水韭。

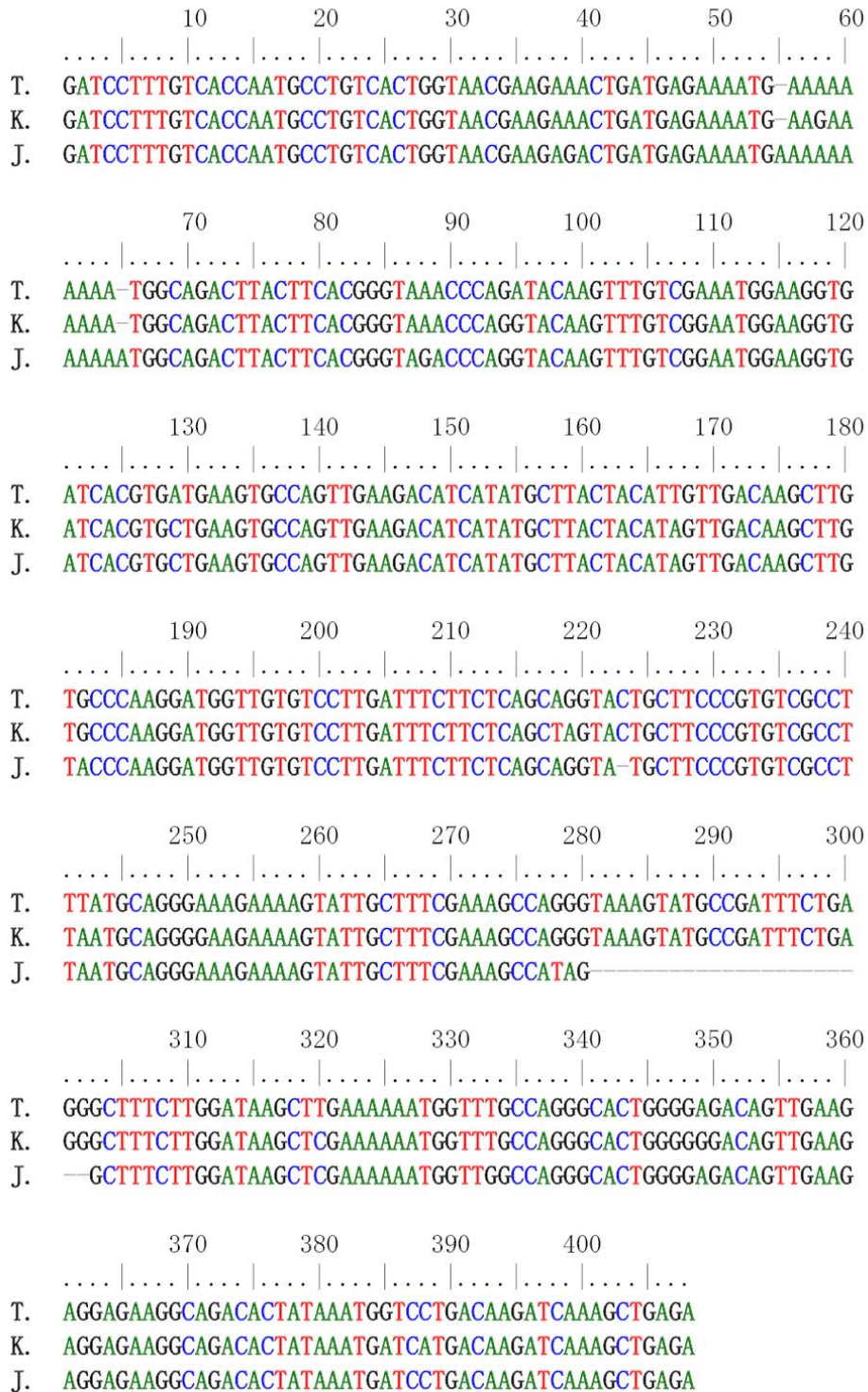


圖 3-17 將台灣水韭 (T)、金門地區水韭 (K)、寬葉水韭 (J) 之小分子熱休克蛋白 sHSP21 部分序列進行 alignment 之結果

表 3-1 台灣水韭、金門地區水韭及寬葉水韭 sHSP21 序列間遺傳相似度矩陣

	台灣水韭	金門地區水韭	寬葉水韭
台灣水韭	1.000		
金門地區水韭	0.967	1.000	
寬葉水韭	0.906	0.909	1.000

#### 第四節 以 RAPD 方法進行水韭親源關係之分析

為求進一步確認金門地區水韭與台灣水韭之親緣關係，本研究採一較快速簡便之方法—以 RAPD 進行水韭屬植物親緣關係之研究。此部份之實驗以美國 Operon 公司所設計之 RAPD 專屬隨機引子進行 PCR 的擴增反應，將八組長度為 10 mer 的引子 OPA、OPA10、OPA17、OPY14、OPY17、OPY18、OPY19 及 OPY20（表 2-3）對台灣水韭、金門地區水韭及寬葉水韭各三樣品之 DNA 進行擴增反應，將該樣品所出現的條帶紀錄為 1，未出現者則紀錄為 0。所選之八組引子中，其中三組引子 OPA、OPA10 及 OPY18 對九樣品擴增之片段經電泳分析後發現其再現性較其他五組引子高，擴增所得多型性之特徵條帶共有 42 個（圖 3-18），依據電泳分析圖中出現之 DNA 多型性條帶製成矩陣資料，並使用 NTSYS-pc 程式進行遺傳相似矩陣，並繪製 UPGMA 演化樹狀圖。

結果發現，同一品種間相似度達平均達 93%，而金門地區水韭與台灣水韭之相似度僅 31.42%，而與寬葉水韭之相似度為 34.32%，台灣水韭與寬葉水韭之相似度則為 47.32%（表 3-2）；以 UPGMA 樹狀圖分析九個樣品，可明顯區三種水韭（圖 3-19）。

雖然前人研究中以 DNA internal spacers of nuclear ribosomal (ITS) 及核糖體 LEAFY 之第二個 intron 這兩個分子標誌，在分類上並無法將台灣水韭及金門地區之水韭做一個區分，但本實驗中以小分子熱休克蛋白 sHSP21 序列及 RAPD 分類法之結果卻顯示，金門地區水韭之基因實際上與台灣水韭差異極大，因此認為金門水韭與台灣水韭並非同一品種。

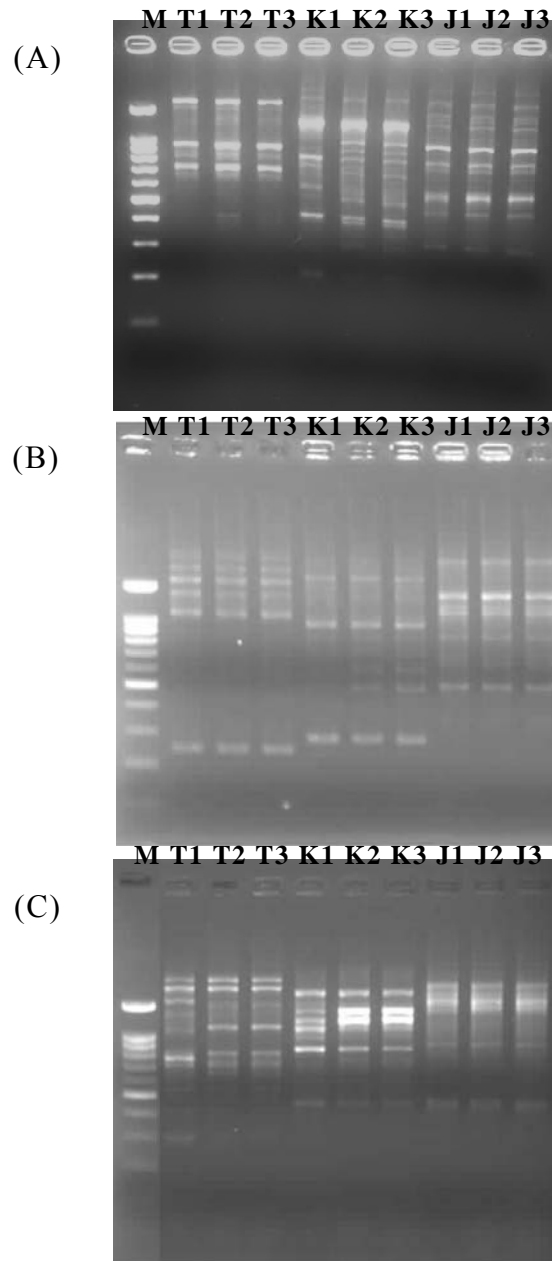


圖 3-18 台灣水韭、金門地區水韭及寬葉水韭進行 RAPD 逢機引子擴增反應之電泳圖。

(A)OPA10；(B)OPA；(C)OPY18；M：100 bp marker ladder；T1：台灣水韭之樣品 1；T2：台灣水韭之樣品 2；T3：台灣水韭之樣品 3；K1：金門地區水韭之樣品 1；K2 金門地區水韭之樣品 2；K3：金門地區水韭之樣品 3；J1：寬葉水韭之樣品 1；J2：寬葉水韭之樣品 2；J3：水韭之樣品 3。



表 3-2 根據三種水韭之 RAPD 分析之 DNA 多形性片段製程之遺傳相似矩陣表

	T1	T2	T3	K1	K2	K3	J1	J2	J3
T1	-								
T2	0.880	-							
T3	0.904	0.976	-						
K1	0.380	0.357	0.333	-					
K2	0.285	0.309	0.285	0.857	-				
K3	0.285	0.309	0.285	0.857	1.000	-			
J1	0.476	0.452	0.476	0.285	0.380	0.380	-		
J2	0.476	0.452	0.476	0.285	0.380	0.380	1.000	-	
J3	0.523	0.452	0.476	0.333	0.333	0.333	0.952	0.952	-

T1：台灣水韭之樣品 1；T2：台灣水韭之樣品 2；T3：台灣水韭之樣品 3；K1：金門地區水韭之樣品 1；K2 金門地區水韭之樣品 2；K3：金門地區水韭之樣品 3；J1：寬葉水韭之樣品 1；J2：寬葉水韭之樣品 2；J3：水韭之樣品 3。

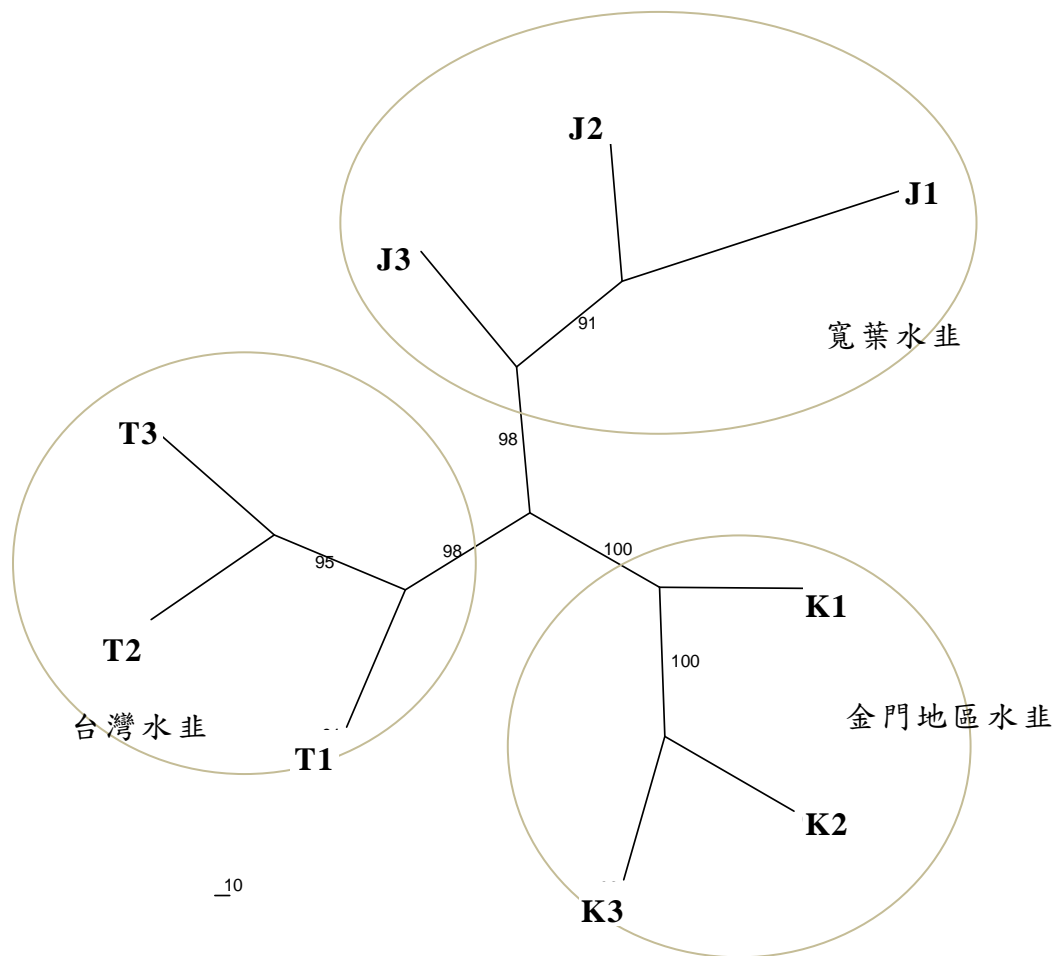


圖 3-19 三種水韭之 RAPD 分析結果，經 UPGMA 方法進行演算之樹狀圖。

圖上數字為 bootstarp 值 (1000 次重複)

T1：台灣水韭之樣品 1；T2：台灣水韭之樣品 2；T3：台灣水韭之樣品 3；K1：金門地區水韭之樣品 1；K2 金門地區水韭之樣品 2；K3：金門地區水韭之樣品 3；J1：寬葉水韭之樣品 1；J2：寬葉水韭之樣品 2；J3：水韭之樣品 3。

## 第五節 金門地區水韭小分子熱休克蛋白 sHSP21 mRNA 對熱刺激之表達

由於前人研究已知，葉綠體型 sHSP 有保護葉綠體中光系統 II 之功能，且具 chaperone 功能，可保護細胞避免受到高溫而氧化，抵抗熱傷害 (Heckathorn et al., 2002; Wang and Luthe, 2003)，而在阿拉伯芥 sHSP21 之研究中指出，在強光照射下，葉綠體型 sHSP 之過度表現較能抵抗伴隨著強光的熱逆境，在弱光的熱逆境則無明顯抵抗能力。根據前人研究觀察，金門地區八月份時白天土溫可達 45°C、氣溫 30°C，且光強度可達 1800~1200 $\mu$ -mole/m<sup>2</sup>sec，而夜溫土溫則降至 30°C、氣溫 25°C，本實驗模擬金門地區水韭一天中可能遇到之溫度變化，觀察水韭屬植物白天經過高溫刺激後，當傍晚後氣溫降低時，體內葉綠體型小分子熱休克蛋白 sHSP21 mRNA 表現量之變化。

在此，利用專一性 sHSP21 引子 RT-sHSP21-F / RT-sHSP21-R (表 2-2) 進行即時定量聚合酶連鎖反應擴增 sHSP21 mRNA 之 cDNA，並以未經熱刺激之水韭 sHSP21 mRNA 濃度做為相對比較，觀察經 45°C 熱刺激 10 小時，再回復於 25°C 數小時後 mRNA 之表現量。

由本試驗結果發現 (圖 3-20)，經過 10 小時之 45°C 熱刺激，於 25°C 回復 1 小時，其小分子熱休克蛋白 sHSP21 mRNA 表現量相對於沒有經過熱刺激之水韭，並沒有顯著增加，但回復 2.5 小時後，sHSP21 mRNA 表現量則顯著增加 119%，回復 4 小時後 mRNA 表現量則漸漸降低，回復 12 小時後 mRNA 表現量則明顯下降，與沒有經過熱刺激之水韭 sHSP mRNA 表現量沒有差別，而回復 24 小時後 mRNA 表現量仍沒有增加或減少。

## 金門稀有植物遺傳多樣性調查

結果顯示，小分子熱休克蛋白 sHSP21 在未經熱刺激時，會以低濃度存在於水韭屬植物體內，而經熱刺激，回復至正常生長溫度 2 小時候，會大量累積於體內，4 小時後則漸漸降低，12 小時後又回復到基本含量，且若水韭無再遇到高溫刺激，其 mRNA 表現量亦不會再增加。也顯示小分子熱休克蛋白 sHSP21 表現是一快速反應的，當受到熱刺激後回復於較低溫度下 4 小時後，基因表現將開始受到抑制，而小分子熱休克蛋白 sHSP21 也隨之降解。

由觀察得知，金門地區水韭能生長在夏季日溫達 45°C 之高溫及冬季降至 5°C 之低溫，且日夜溫差極大之棲地，生長環境比台灣水韭更為嚴苛，而金門地區水韭能夠適應此環境之可能原因，於實驗結果推論，因金門地區水韭具葉綠體型小分子熱休克蛋白 sHSP21，可能幫助金門地區水韭抵抗強光下之高溫逆境。

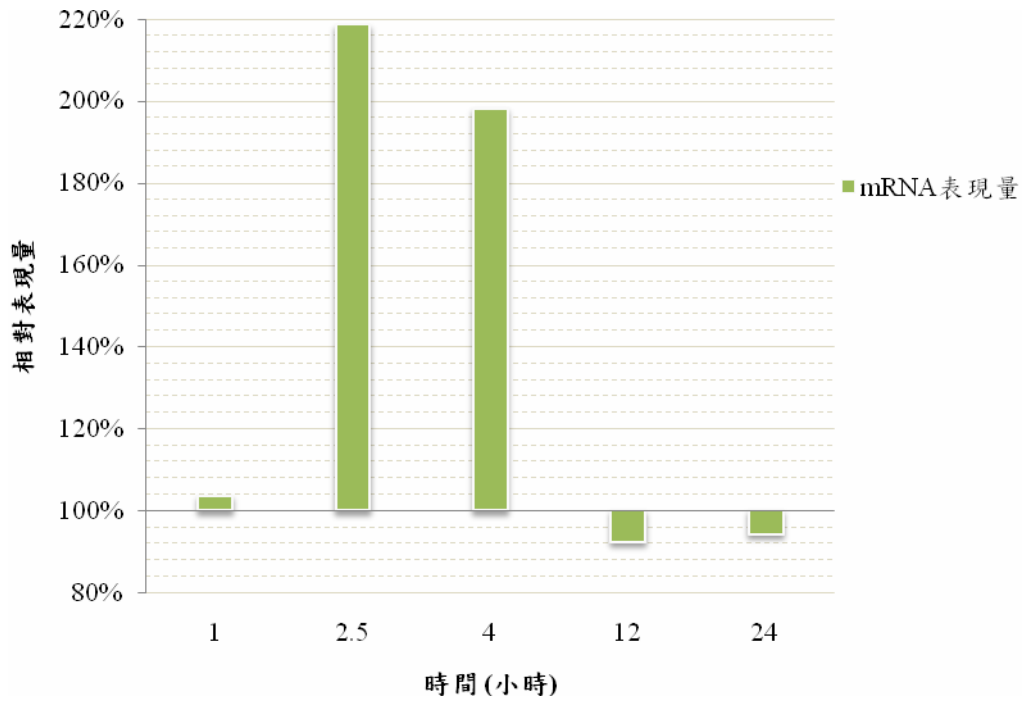


圖 3-20 經 45°C 熱刺激 10 小時，於 25°C 回復 1 小時、2.5 小時、4 小時、12 小時及 24 小時後，sHSP21 mRNA 之相對表現



## 第四章 結論與建議

### 第一節 結論

- 一、金門地區水韭之生長棲地狹小，其水域水位不穩定，且一日之內溫差甚大，棲地環境容易受氣候影響而改變。
- 二、自金門之水韭棲地取出之土壤，以篩網篩選，可得到大部分的孢子，將其乾燥後密封收藏，可做為種源之保存。
- 三、將金門地區水韭與台灣水韭大、小孢子施以不同溫度處理不同天數，觀察溫度變化對於孢子萌發之情形，實驗結果發現金門地區水韭以 5°C 處理 5 天再回復至 25°C 培養之孢子，萌發率較其他溫度處理高，符合前人研究中利用低溫打破孢子休眠之理論，但研究發現較長時間之低溫處理，反而會降低孢子萌發之速度。而台灣水韭孢子以不同溫度處理後回復至 25°C，其萌發率均較金門水韭高，而 5°C 處理能夠促使大孢子較快萌發，但以 35°C 處理 5 天及 10 天後之大孢子萌發率甚至較 5°C 處理來的高，顯示金門地區水韭與台灣水韭孢子萌發之生理狀況甚異。
- 四、經專一性小分子熱休克蛋白 sHSP21 引子對所擴增出大小為 410 bp 之片段，經定序後進行相似矩陣之運算，結果發現金門地區水韭與台灣水韭之 sHSP21 核酸序列遺傳相似度達 96.7%，與寬葉水韭之相似度則為 90.9%，而台灣水韭與寬葉水韭之相似度則為 90.6%，此結果顯示金門水韭與台灣水韭之基因序列確實有差異。
- 五、以三組較具再現性之 RAPD 10 mer 隨機引子對水韭屬植物進行 DNA 隨機擴增實驗，經電泳分析後計算其 DNA 多型性條帶製成矩陣資料，結果顯示同一品種間相似度達平均達 93%，而金門

地區水韭與台灣水韭之相似度僅 31.42%，而與寬葉水韭之相似度為 34.32%，台灣水韭與寬葉水韭之相似度則為 47.32% (表 3-2)。

六、 本實驗模擬金門水韭一天中可能遇到之溫度變化，觀察水韭屬植物白天經過高溫刺激後，當傍晚後氣溫降低時，體內葉綠體型小分子熱休克蛋白 sHSP21 mRNA 表現量之變化。試驗結果發現，小分子熱休克蛋白 sHSP21 在未經熱刺激時，會以低濃度存在於水韭屬植物體內，經過 10 小時之 45°C 熱刺激，於 25°C 回復 1 小時後 sHSP21 可持續表達，4 小時後漸漸降低，12 小時後又回復到基本含量，且若水韭並無再遇到高溫刺激，其 mRNA 表現量亦不會再增加。

根據前人研究，金門地區水韭與台灣水韭雖有部份差異，但可能仍為同一品種。本研究以更嚴謹的分子證據，佐以生理與熱休克蛋白 sHSP21 基因序列與表現差異等數據，顯示金門產水韭與台灣水韭應為不同或至少可能為其之亞種。



## 第二節 建議

根據研究發現，本研究針對金門產水韭的保育策略，提出下列具體建議。以下分別從立即可行的建議及中、長期性建議加以列舉。

### 1. 立即可行之建議－種源保存

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處

協辦機關：國立台灣大學園藝系

每年冬季枯水期，原棲地中水韭會因乾涸而死亡；建議在此時期植株死亡前採取孢子囊，其中含大量之大小孢子，且具有萌發之活力。其他季節對原棲地與土壤則避免過度干擾與採集。

### 2. 立即可行之建議－命名發表

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處

協辦機關：國立台灣大學園藝系

以本研究所得之嚴謹分子證據，佐以熱休克蛋白表現差異闡釋棲地適應理論，於SCI期刊發表並以金門水韭命名(*Isoetes kinmenensis*)，以彰顯金門地區生物多樣性價值及國家公園努力之成果。

### 3. 中期性建議－棲地保存與移地保存

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處

協辦機關：國立台灣大學園藝學系

進一步更完整建立金門產水韭孢子萌發所需最適條件，做為人工培育之基礎資訊，以進行棲地保存與移地保存及異地備份復育。於此同時，可立即於原棲地附近地形與環境相似之廢棄碉堡工事頂，金門國家公園內，及台灣大學園藝分場，分別建立小型異地備份繁殖區。

## 金門稀有植物遺傳多樣性調查

### 4. 長期性建議－長期監控並研究金門水韭演化之變異性

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處

可藉由此研究之模式建立金門水韭生長環境與其表現型相關性之資料庫，藉以監控金門國家公園內水韭植物之演化變異，作為園內管理、復育及解說教育之依據。

### 5. 長期性建議－研究比較鄰近國家區域內水韭，提出物種演替理論模型

主辦機關：內政部營建署金門國家公園管理處或其他管理單位

由於金門與鄰近區域國家，兼有獨特且唯一的地理與政治上的截然不同距離與分隔，極適合做為基因漂移與物種播遷及演化的模式研究基地；藉由古老孑遺活化石水韭之研究，可建立極佳之物種演替播遷的模型理論，將顯著提升我國家公園的管理與研究之國際競爭力。

## 參考書目

1. 徐源泰。2005。杜鵑花屬植物小分子熱休克蛋白與其地理分佈之研究。內政部營建署太魯閣國家公園管理處委託研究報告。
2. 張永達。2003。金門濕地及水韭之分類與生態調查研究。內政部營建署金門國家公園管理處。
3. 郭章儀。2003。金門地區水韭之形態與生態調查研究。國立台灣師範大學碩士論文。
4. 黃鈞蕙。2002。台灣水韭棲地之生態因子及其族群遺傳之研究。國立台灣師範大學碩士論文。
5. 謝育慈。2004。東亞地區水韭屬植物親緣關係研究。國立台灣師範大學碩士論文。
6. Clapham, A. R., T. G. Tutin and D. M. Moore, 1987. Flora of the British Isles, Cambridge. p.3.
7. George, H. M., 1955. Taxonomy of vascular plants. The Macmillan Company, New York. p.335, p.340
8. Hoot, S. B. and W. C. Taylor, 2001. The utility of nuclear ITS, a LEAFY homolog intron, and chloroplast atpB-rbcL spacer region data in phylogenetic analyses and species delimitation in Isoetes. American Fern Journal 91(3): 166-177.
9. Hoot, S. B., N. S. Napier and W. C. Taylor, 2004. Revealing unknown or extinct lineages within Isoetes using DNA sequences from hybrids. American Journal of Botany 91: 899-904.
10. Hoot, S. B., W. C. Taylor, and N. S. Napier. 2006. Phylogeny and Biogeography of Isoetes (Isoetaceae) Based on Nuclear and Chloroplast DNA Sequence Data. Syst. Botany 31:449-460.
11. Koot, L. S., and D. M. Britton. 1982. A Comparative Study of Spore Germination of Some *Isoete* Species of Northeastern North America. Can. J. Bot. 60:1679-1687.

12. 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.
13. Meng Fansong. 1999. Studies on *Pleuromeia* from Middle Triassic Along the Yangtze River Valley and Systematics of Isoetes. *ACTA GEOSCIENTIA SINICA-Bulletin of the Chinese Academy of Geological Sciences*. 20:215
14. Taylor, W. C. and R. J. Hickey, 1992. Habitat, evolution, and speciation in Isoetes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 613-622.
15. Waters, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat shock protein in plants. *Genetics*. 141: 785-795.
16. Waters, E. R. 2003. Molecular adaptation and the origin of land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 456-463.