

## 貳、材料與方法

### 一、研究材料

本屬植物營養器官之構造簡單且形態類似，可用以分類特徵不多，因此一般外部形態的分類特徵主要採用生殖構造，然而花部構造特徵常因製作臘葉標本乾燥後變形不易觀察，故本研究在外部形態的觀察及描述以新鮮材料為主。新鮮材料多為作者參考各大標本館之採集紀錄及相關文獻後至各地採集而得，部分為朋友及師長所贈送，除在現場進行觀察、紀錄及拍照外，成熟的花、果以 70% 酒精固定後攜回做進一步觀察及研究，並採集完整植株攜回栽植於師大生命科學系陰棚供長期觀察以及做為 DNA 序列研究分析之材料來源，最後製成證據標本，存放於國立台灣師範大學生命科學系標本館 (TNU)，以備日後查證。

除實地採集外，並檢視國內各大植物標本館館藏之臘葉標本，檢視之標本館及其代號如下：

中央研究院植物所標本館 (HAST)

林業試驗所標本館 (TAIF)

國立台灣大學植物標本館 (TAI)

國立台灣師範大學生命科學系標本館 (TNU)

國立屏東科技大學森林資源系標本館 (PPI)

## 二、研究方法

### (一) 外部形態

於野外觀察紀錄新鮮材料之形態特徵，並以解剖顯微鏡觀察較細微構造，且拍照及繪圖紀錄之；另外與國內各大標本館館藏標本比對，紀錄其標本採集地點及生育環境之資料。對於外部形態之描述以新鮮的成熟器官為主。

### (二) 花粉形態

取保存在 70% 酒精中之花藥置於載玻片上，加一滴醋酸洋紅 (acetocarmine) 後輕搗，除去花藥碎片後蓋上蓋玻片，於光學顯微鏡下觀察，每一採集號逢機選取十粒花粉，經由 Kodak DC420 數位相機照相後，再以 Free Max 軟體分別度量其直徑長度。

本屬植物花粉壁很薄，經由醋酸分解法 (acetolysis) 處理會使得花粉壁皺縮，故本研究不進行醋酸分解法，直接經序列脫水及臨界點乾燥後，以電子顯微鏡 (SEM) 觀察且拍照紀錄，其步驟如下：

1. 取下花藥置於 2.5% 戊二醛溶液 (glutaraldehyde 配於 0.1M phosphate buffer, pH 7.0) 中，在 0-4°C 下固定 1 小時。
2. 在 0-4°C 下，以磷酸緩衝液清洗 2 次，每次 15 分鐘。
3. 改以 1% 鐵酸 (osmium 配於 0.1M phosphate buffer, pH 7.0) 於 4°C 至室溫下處理 1 小時。
4. 在室溫 (25°C) 下，以磷酸緩衝液清洗 2 次，每次 15 分鐘。
5. 漸次以酒精 (50%、70%、85%、95% 及 99.5%) 進行序列脫水。
6. 將上述花藥以臨界點乾燥法 (critical point drying) 處理後，挑開花藥使花粉散出並黏於鋁台上，再經外表鍍金後，以掃描式電子顯微鏡觀察並照相紀錄之。

### (三) 地理分布及生態觀察

在野外發現本屬植物時，先紀錄其地理位置及海拔高度等基本資料，將各類群出現的地點標示於地圖上，再分別觀察生態環境，統整其所處的生態環境資料，並參考各標本館蠟葉標本上的採集資料一併加以分析。

### (四) DNA 序列

依前言所述，決定利用核基因組的 ITS1 與 ITS2 片段，與葉綠體基因組之 *atpB-rbcL*、*trnL-trnF* 及 *psbA-trnH* 三個 spacer 片段，作為本研究之 molecular marker，DNA 的萃取、片段擴增、定序及序列資料的比對及分析之步驟如下：

#### 1. DNA 萃取（以 Viogene Plant Genomic DNA Extraction Kit 萃取）：

- (1) 取約 0.5 g 的植物葉片於研鉢內，加入約 10 mL 之液態氮後研磨，研磨 2-3 次後，將粉末狀材料移至 2 mL 之離心管中。
- (2) 加入 400  $\mu$ L PX1 緩衝液及 10  $\mu$ L RNase 攪勻，置入 65°C 之乾浴機 30 分鐘。
- (3) 將離心管移至冰上，加入 130  $\mu$ L PX2 溶液，緩慢混合均勻後，靜置 5 分鐘。
- (4) 將離心管中之葉片溶液混合物移至過濾管中，下置收集管，以極速 14,000 rpm 離心 2 分鐘，使葉片萃取液過濾至收集管中。
- (5) 加入 0.5 倍之 PX3 溶液（225 mL）和等體積的無水酒精（約 450  $\mu$ L）於收集管內，緩慢混合均勻。
- (6) 將收集管內之混合液吸出 650  $\mu$ L，移至離心管柱內，下置收集管，以轉速 10,000 rpm 離心 1 分鐘，使溶液通過離心管柱，此時葉片之 total DNA 即吸附於離心管柱的濾膜上，將收集管內之液體丟棄。

- (7) 再將剩餘的樣本溶液取至離心管柱中，重複上一步驟。
- (8) 加入 700  $\mu$ L 清洗緩衝液於離心管柱中，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將收集管內之液體丟棄。
- (9) 再加入 500  $\mu$ L 清洗緩衝液以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，並將收集管內之液體丟棄。
- (10) 將離心管柱放在新的收集管上，以 13,000 rpm 離心 2 至 3 分鐘，完全去除殘留的清洗液。
- (11) 將離心管柱置於新的有蓋管柱上，加入 200  $\mu$ L (65°C) 二次蒸餾水於離心管柱之濾膜上，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，於微量離心管中所得之溶液即為萃取出之 DNA 溶液。
- (12) 將 DNA 保存於-20°C 中。

## 2. DNA 擴增

### (1) 引子的選擇

參考 Möller & Cronk (1997)，利用其設計的引子 primer ITS 5P (5' GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G 3') 及 primer ITS 8P (CAC GCT TCT CCA GAC TAC A)，進行 ITS region (18S-26S rDNA) 的 DNA 片段擴增。

葉綠體基因組部份，自 NCBI 網站下載相近類群之 *atpB* 及 *rbcL* 序列，以保守之片段設計引子 *atpB* (5' GCC CGG GGG AAA AAC AAC 3') 及 *rbcL* (5' ACT CGG AAT GCT GCC AAG AT 3') 擴增 *atpB-rbcL* spacer；另參考 Taberler *et al.* (1991) 所使用之 primer e (5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3') 與 primer f (5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3') 擴增 *trnL-trnF* spacer 片段序列；及參考 Hamilton (1999) 的 *trnH* (5' ACT GCC TTG ATC CAC TTG GC 3') 及 *psbA* (5' CGA AGC TCC ATC TAC AAA TGG 3') 擴增 *psbA-trnH* spacer 片段序列。

## (2) PCR 反應試藥與濃度

每個 PCR 反應體積為 20  $\mu\text{L}$ ，各試藥之濃度、所需體積及最終之反應試劑濃度如下（參考 Viogene biotek 之濃度配方）：

試藥	體積	反應試劑最終濃度
10 $\times$ PCR buffer (with 15 mM $\text{MgCl}_2$ , Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 50% glycerol)	2 $\mu\text{L}$	1 $\times$
2.5 mM dNTP mixture	2 $\mu\text{L}$	0.25 mM
Primer mix (10 $\mu\text{M}$ each)	1 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$ each
Template DNA	1 $\mu\text{L}$	
VioTag DNA polymerase	0.1 $\mu\text{L}$	2.5 units
Autoclaved distilled water	14.9 $\mu\text{L}$	

## (3) PCR 反應條件及步驟

PCR 反應以溫度循環器進行，採用之溫度週期及流程如下：

- 先以 95 $^{\circ}\text{C}$  處理 5 分鐘，使雙股 DNA 變性。
- 再以 95 $^{\circ}\text{C}$ （變性溫度）1 分鐘、黏合溫度（ITS: 50 $^{\circ}\text{C}$ 、*atpB-rbcL*: 63 $^{\circ}\text{C}$ 、*trnL-trnF*: 58 $^{\circ}\text{C}$ 、*psbA-trnH*: 58 $^{\circ}\text{C}$ ）1 分鐘、72 $^{\circ}\text{C}$ （延長溫度）1 分鐘 30 秒，進行 35 次的擴增循環。
- 最後 72 $^{\circ}\text{C}$  處理 10 分鐘。
- 反應產物溫度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

#### (4) 以電泳檢測 PCR 的結果及濃度

以 1× 的 TBE buffer 所配製之 1% agarose gel (內含 0.25 µg/mL 之 EtBr 染劑) 在 110 V 條件下, 進行電泳約 20 分鐘後, 隨即於紫外燈上觀察及紀錄 PCR 產物的分子量、濃度及產物調帶是否單一。每次電泳並加入分子量參考標記 (molecular weight marker, 100 bp DNA ladder, MDBio Inc.), 以標示 PCR 產物條帶的分子量並當作 PCR 產物之 DNA 濃度的參考。

### 3. PCR 產物純化

利用 Viogene Gel Extraction System Kit 純化, 步驟如下:

- (1) 將所有 PCR 反應溶液取出, 加入 1/10 體積的 loading dye, 以 1.2% agarose gel 進行電泳約 30 分鐘, 於紫外燈上觀察並將膠片上的 PCR 產物切下(約 100 mg) 放入 1.5 mL 的離心管中。
- (2) 加入 0.5 mL 的 GEX buffer, 以 60°C 水浴至少 10 分鐘直至 gel 完全溶解並使其與 buffer 均勻混合及反應。
- (3) 先將 Kits 內附之 Gel extraction column 置入於收集管之上方, 再以吸量管將反應完全之溶液 (約 600 µL) 吸取入 Gel extraction column 內。
- (4) 以 13,000 rpm 離心 30 秒, DNA 留滯於 Gel extraction column 之濾膜上, 將濾液丟棄。
- (5) 加入 0.5 mL 之 Wash I buffer 沖洗濾膜上的 DNA, 再以 13,000 rpm 離心 30 秒後將濾出之沖洗液丟棄。
- (6) 加入 0.7 mL 之 Wash II buffer 沖洗濾膜上的 DNA, 以 13,000 rpm 離心 30 秒後將濾出之沖洗液丟棄。
- (7) 額外以 13,000 rpm 離心 3 分鐘, 去除殘餘之沖洗液及酒精。

(8) 將 Gel extraction column 置於新的 1.5 ml 離心管上，加入 20  $\mu$ L (預熱 60°C) 的二次水於濾膜上，靜置約 30 秒後以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，所得即為純化之 DNA 溶液。

(9) 取 2  $\mu$ L 純化之 DNA 溶液，混合 1/10 體積的 loading dye，以 1 $\times$ 的 TBE buffer 所配製之 1% agarose gel (內含 0.25  $\mu$ g/mL 之 EtBr 染劑) 進行電泳，觀察回收效果並估算純化 DNA 的濃度。

#### 4. DNA 轉殖

以 yT&A cloning Kits 進行轉殖，步驟如下：

(1) 取 1  $\mu$ L 純化的 DNA 溶液，加入 1  $\mu$ L T<sub>4</sub> DNA Ligase、1  $\mu$ L T<sub>4</sub> DNA Ligase Buffer A、1  $\mu$ L T<sub>4</sub> DNA Ligase Buffer B 及 1  $\mu$ L yT&A 選殖載體，加水至 10  $\mu$ L 後置於 4°C 下反應 24 小時。

(2) 取出 5  $\mu$ L 反應液，加入大腸桿菌勝任細胞 (*E. coli* competent cell) 後，置於 42°C 水浴 45 秒，再移至 4°C 下反應 2 分鐘。

(3) 取出步驟 (2) 之 50  $\mu$ L 勝任細胞，以玻棒塗勻於 LB 固體培養基上，於 37°C 下培養 11-16 小時。

(4) 以牙籤挑出白色菌落，畫在另一 LB 固體培養基上，於 37°C 下培養 5-7 小時。

(5) 挑出步驟 (4) 之白色菌落，以 primer M13F 及 M13R 進行 colony PCR，篩選出轉殖有正確 DNA 片段之菌落。

(6) 將該菌落送定序，並取得序列資料以備後續分析。

## 5. DNA 序列分析

### (1) 序列比對

將定序所得到的檔案以 Sequencher 4.2 軟體進行人工判讀及確認，並至 National center of biotechnology information (NCBI) 網站進行序列比對，確認屬於同一類群生物之序列。

### (2) 序列排列

利用 Sequencher 4.2 軟體進行序列比對排序，最後將排序結果存成 PAUP 軟體可讀取之格式 (NEXUS files)。

### (3) 資料分析

利用 PAUP v. 4.0 (Swofford, 1998) 進行演算所有 OTUs (operational taxonomic units) 兩兩序列之間的遺傳距離矩陣及建構 Neighbor-joining 系統樹，在計算演化距離時根據 Kimura's 2-parameter (1980) 的方法進行演算，並以 1000 次重複取樣確定系統樹上分枝的可信度。

由於本研究結果之 ITS 片段擁有多個變異度高的 copies，而葉綠體基因組 *trnL-trnF* 及 *psbA-trnH* 兩個 spacer 各只有一個變異位點，且變異點屬於單一族群之點突變，並無法提供足夠之訊息，因此未進行最後之資料分析。