

知識天地

針葉樹葉綠體基因體之研究與應用

吳宗賢博士、趙淑妙特聘研究員（生物多樣性研究中心）

松柏類植物俗稱針葉樹（Conifers），是裸子植物（Gymnosperms）內的最大一類群。裸子植物除松柏類外，尚有蘇鐵類（Cycads）、銀杏（Ginkgo）及買麻藤類（Gnetophytes）。裸子植物相對於其姊妹群—被子植物（Angiosperms），其特徵為裸子植物的種子裸露在外，沒有果皮及果肉包覆，我們吃的松子及銀杏果，其實是除去種皮後的種子。傳統上，裸子植物被認為是一群古老的物種，因此有「活化石」之稱，例如，針葉樹中的水杉（*Metasequoia glyptostroboides*）及瓦勒邁杉（*Wollemia nobilis*）等，其形態特徵從中生代（Mesozoic Era, 約252至66百萬年前）迄今都沒有改變；它們都是化石標本先被發掘出後，現生活體族群才被發現。然而近期的分子研究卻顯示，現今的裸子植物物種，在地球上存在的時間，可能比現生的被子植物還短。現生裸子植物僅約1,000種，但被子植物有250,000多種，這可能是裸子植物曾遭遇過物種大滅絕事件，使其原本佔優勢的地位被被子植物取代，導致現今裸子植物的物種多樣性遠低於被子植物（Crisp and Cook, 2011）。

雖然針葉樹的物種多樣性遠低於被子植物，但它們對維持整個地球生態圈的穩定性卻不容忽視。以臺灣為例，臺灣森林面積約有210萬公頃，其中含有針葉樹的森林約有31.7%。在臺灣的高海拔常可看到大面積針葉樹純林，如鐵杉、雲杉及冷杉林等。針葉樹具有很高的經濟價值，松樹類（*Pinus*）是造紙工業的紙漿來源之一；南洋杉（*Araucaria spp.*）、羅漢松（*Podocarpus macrophyllus*）、蘭嶼羅漢松（*P. costalis*）與傘松（又名日本金松；*Sciadopitys verticillata*）為常見的庭院景觀樹種；紅豆杉的心材可製作高級傢俱、其樹皮和枝葉可提煉昂貴的抗癌藥物，紫杉醇；而柏樹類（圖一）的檜木、杉木更是高貴的建築及傢俱用材。由於針葉樹具廣泛的應用性及高經濟價值，其物種的生存常遭受人類需求的迫害。現今全球的針葉樹約有615種，卻有96種被國際自然保護聯盟（IUCN）列為瀕危（Endangered）物種（<http://www.iucnredlist.org/>）。以臺灣為例，有三種特有針葉樹種，受文化資產保存法保護，分別為臺灣穗花杉（*Amentotaxus formosana*）、臺灣油杉（*Keteleeria davidiana*）及清水圓柏（*Juniperus chinensis*）。而臺灣紅豆杉因生長緩慢，天然更新能力差，已列為國家一級保護植物，並於1990年立法禁止標售盜伐。最近新聞亦常報導臺灣珍貴的檜木受到山老鼠盜伐，或被冒充成漂流木不當買賣的消息，可見對針葉樹的保育推廣及研究之迫切。

葉綠體（Chloroplast）為植物的食物工廠。太陽光、水及二氧化碳在葉綠體內經由光合作用轉換成碳水化合物，儲存在植物體內。許多證據已證明，葉綠體是由內共生藍綠菌（Endosymbiotic cyanobacteria）演化而來，例如，葉綠體具有雙層膜環繞、使用細菌的系統進行基因轉譯、擁有自己的基因體，而在模式植物—阿拉伯芥（*Arabidopsis thaliana*）—的核基因體內，約有18%的譯解蛋白質基因是來自葉綠體，此亦明示葉綠體為內共生藍綠菌所轉化而來（Martin et al., 2002）。有意思的是，此種單方向的DNA遺傳物質輸送（葉綠體輸送至細胞核）仍為現在進行式（Hsu et al., 2014）。

由於次世代定序（Next generation sequencing）技術的發展迅速，使基因體研究科學獲得爆炸性的進展。在葉綠體基因的定序方面，2010年約有100種種子植物的葉綠體基因體被完整解序，至2014年底，已增加至430餘種，其中僅9%為裸子植物，其他皆為被子植物（GOBASE: <http://gobase.bcm.umontreal.ca/>）。

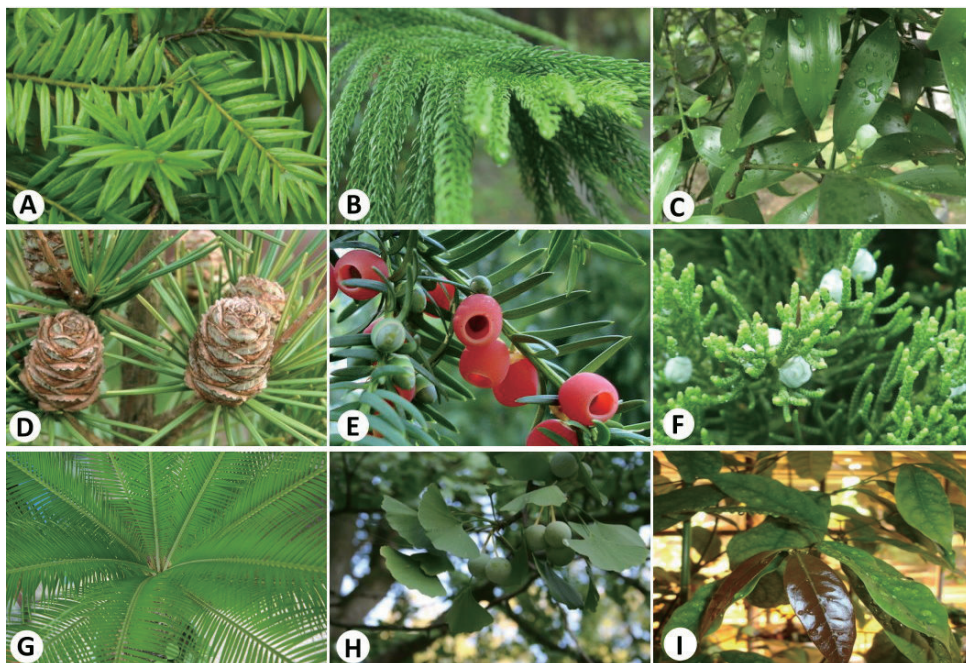
種子植物的葉綠體基因體型態為圓形或線型，大小約在120至160 Kb（Kb:千個核苷酸鹼基對）之間，含有約110個基因，其基因密度約為1 Kb的DNA內含有0.7至0.9個基因，相對於核基因體，葉綠體基因體的基因密度非常高，因此很適合應用在分子親緣演化（Molecular phylogenetics）分析，亦即花費同樣的定序費用，就可獲得相對可觀的基因資料。葉綠體基因體的另外一項特徵為擁有一對大反向重複序列（Large inverted repeat sequence），其單一大小約為20至25 Kb（圖二）。研究發現此大反向重複序列，它們可促使葉綠體基因體進行同源性重組（Homologous recombination），而同源性重組是基因體維持其結構穩定的重要機制（Maréchal and Brisson, 2010）。我們近期的研究發現，在葉綠體基因體內，大反向重複序列的基因突變率約低於其他區域的1/2，此重複序列的核苷酸突變，多偏向突變成鳥嘌呤（G）及胞嘧啶（C），表示葉綠體基因體的大反向重複序列，不但能維持基因體結構的穩定，亦能影響基因體的核苷酸組成（Wu and Chaw, 2015）。

最有趣的是，針葉樹的葉綠體基因體卻丟失了一段大反向重複序列。以臺灣特有針葉樹種臺灣杉 (*Taiwania cryptomerioides*) 為例，因只保留一段原先的大反向重複序列，其葉綠體基因體偏小，約為133.6 Kb (圖二)。而此丟失特性，衍生兩個問題：(1) 在針葉樹演化上，丟失一段大反向重複序列為單一事件或多重事件？(2) 在丟失一段大反向重複序列後，針葉樹的葉綠體基因體結構是否受到影響？而是否有補救的機制衍生？

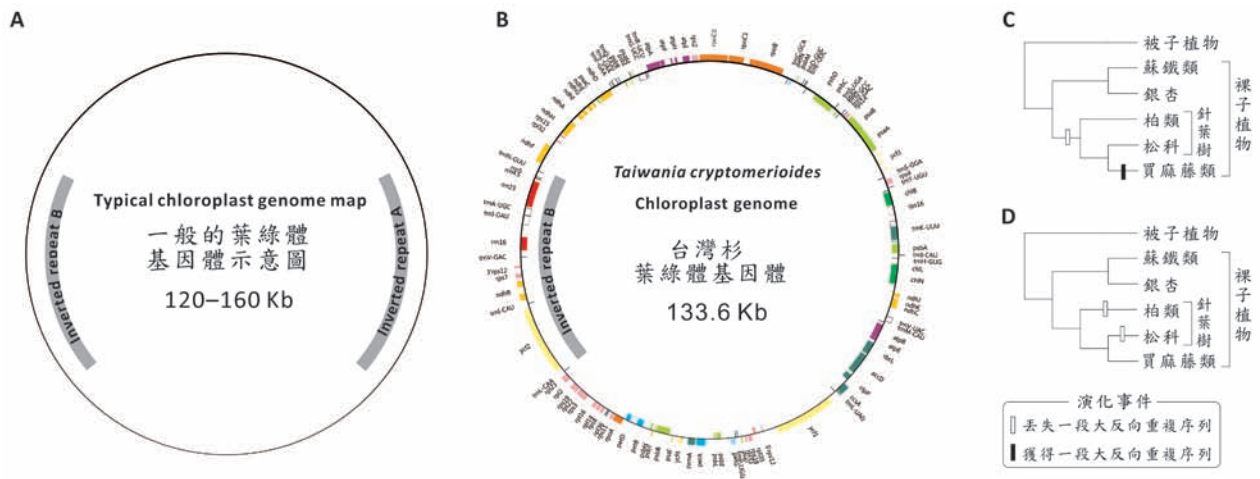
對於上述的問題(1)，根據大反向重複序列相鄰基因的保守性，經由比對多種針葉樹的葉綠體基因體結構，我們認為松科植物與柏類植物所保留的大反向重複序列為非同源，即：松科植物保留大反向重複序列A，而柏類植物則為B (Wu et al., 2011a)。以簡約演算法 (Parsimonious analysis)，模擬過去發生的基因體重組，亦支持松科植物與柏類植物的丟失事件屬個別獨立事件 (Wu and Chaw, 2014)。此研究結果提供有利證據支持松柏類植物並非單系群的親緣假說。若松柏類植物的丟失大反向重複序列為同一事件，則松科植物的姊妹群—買麻藤類植物，其葉綠體基因體需重新獲得一段大反向重複序列。一般而言，在演化上，某一特徵的丟失比獲得容易，且要獲得一段約25 Kb完全相同的序列，機率應該極低。但若丟失事件為松科植物與柏類植物個別獨立發生，則演化的劇本很簡單，即：松、柏及買麻藤類的共同祖先，其葉綠體基因體擁有一對大反向重複序列，隨後，松科植物與柏類植物各自丟失一段大反向重複序列，而買麻藤類植物則保留祖先特徵，擁有一對大反向重複序列 (圖二)。

為研究上述的問題(2)，我們比較針葉樹與其他裸子植物—蘇鐵、銀杏及買麻藤—之葉綠體基因體結構，結果顯示，在葉綠體基因體的結構改變頻率，針葉樹顯著高於其他裸子植物。由於其他裸子植物的葉綠體仍擁有一對大反向重複序列，我們推論針葉樹葉綠體基因體的高結構改變頻率，應為丟失一段大反向重複序列所致。以松科植物為例，我們發現至少有四種不同的葉綠體基因體結構，在結構改變的熱點區域，通常有0.1至1 Kb大小的反向重複序列。我們的基因體比較研究亦顯示，丟失一段大反向重複序列的物種，其葉綠體基因體的演化傾向增加0.1至1 Kb的反向重複序列，而這些較小的反向重複序列，可能用來彌補大反向重複序列的丟失，使葉綠體基因體得以繼續進行同源性重組 (Wu et al., 2011b)。

我們仍持續收集並研究針葉樹葉綠體基因體資料，以全基因體掃描的方法，建立高效能的針葉樹物種DNA條碼辨識系統。針葉樹葉綠體基因體具有高頻率結構改變的特性，因此亦評估以基因體結構改變熱點做為物種辨識基礎的可能性，冀望我們的研究及DNA條碼辨識系統，可應用於針葉樹物種鑑定，成為法庭上的舉證利器，杜絕臺灣珍貴針葉樹被盜採及走私的命運。本研究成果受到科技部研究計畫補助 (MOST 100-2621-B-001-003-MY3)。



圖一、現生的裸子植物。A至F為針葉樹，以科為分類單位，A：臺灣油杉（松科）；B：肯氏南洋杉（南洋杉科）；C：竹柏（羅漢松科）；D：傘松（金松科）；E：臺灣紅豆杉（紅豆杉科）；F：龍柏（柏科）。G：蘇鐵類；H：銀杏；I：買麻藤類。



圖二、葉綠體基因體的結構示意圖及大反向重複序列丟失的演化假說。大反向重複序列的區域以灰色長方形表示；A：一般的葉綠體基因體擁有一對大反向重複序列A及B（inverted repeat A & B）。B：臺灣杉的葉綠體基因體丟失了一段大反向重複序列。C：松科與柏類植物丟失同源的大反向重複序列。D：松科與柏類植物丟失非同源的大反向重複序列。

引用文獻

- Crisp MD, Cook LG. 2011. *New Phytol.* 192: 997–1009.
- Hsu CY, Wu CS, Chaw SM. 2014. *Genome Biol Evol.* 6: 2111–2121.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D. 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 12246–12251.
- Maréchal A, Brisson N. 2010. *New Phytol.* 186: 299–317.
- Wu CS, Wang YN, Hsu CY, Lin CP, Chaw SM. 2011a. *Genome Biol Evol.* 3: 1284–1295.
- Wu CS, Lin CP, Hsu CY, Wang RJ, Chaw SM. 2011b. *Genome Biol Evol.* 3: 309–319.
- Wu CS, Chaw SM. 2014. *Plant Biotechnol J.* 12:344–353.
- Wu CS, Chaw SM. 2015. *Genome Biol Evol.* (Manuscript accepted on May 20).