

PG9607-0007

095-301020200G1-002

玉山國家公園植物微衛星 DNA 之分析及資料庫
之建立(2/3)

**Construction of a microsatellite fingerprint database
of vascular plants in Yushan National Park(2/3)**

受委託者：中華民國國家公園學會

研究主持人：蔣鎮宇 教授

共同主持人：王震哲 教授

邱文良 副研究員

許再文 副研究員

研究助理：黃啟俊

黃鈺雯

政部營建署玉山國家公園管理處委託研究報告

中華民國 96 年 12 月

目次

表次	II
摘要	III
英文摘要	V
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起與背景	1
第二節 研究目的	14
第二章 方法與結果	15
第一節 材料與方法	15
第二節 結果	18
第三節 討論	21
第三章 結論與建議	29
第一節 結論	29
第二節 建議	29
附錄一	51
參考書目	55

表次

表一、玉山阿拉伯芥及台灣雲杉之取樣地點及樣本數	32
表二、台灣雲杉取樣地點及樣本數	33
表三、阿拉伯芥之微衛星 DNA 引子編號、序列、重複序列及條帶長度	34
表四、玉山阿拉伯芥衛星 DNA 不同基因座在個體所顯現之基因型	36
表五、玉山阿拉伯芥之微衛星 DNA 引子編號、序列、重複序列及條帶長度	39
表六、玉山阿拉伯芥不同族群之微衛星 DNA 基因歧異度	41
表七、玉山阿拉伯芥不同族群之微衛星 DNA 之族群分化指數(FST)及族群交流能力(Nm)	42
表八、台灣雲杉微衛星 DNA 之引子序列	43
表九、台灣雲杉微衛星 DNA 不同基因座在個體所顯現之基因型	44
表十、台灣雲杉不同微衛星 DNA 基因座之基因歧異度	45
表十一、台灣雲杉不同族群之微衛星 DNA 基因歧異度	46
表十二、台灣雲杉各族群之遺傳分化指數(FST)	47
表十三、台灣雲杉不同區域之遺傳分化指數(FST)	48
表十四、台灣雲杉分子變方分析(AMOVA)結果	49

中文摘要

摘要關鍵詞：分子指紋、微衛星 DNA、玉山阿拉伯芥、台灣雲杉

一、研究緣起

分子指紋技術已廣泛應用於生物保育，其中基因體中的微衛星 DNA 因具有高解析力及變異性的特性，使得此技術在物種之保育及遺傳多樣性的分析上提供了快速又可靠的工具，玉山阿拉伯芥為模式物種阿拉伯芥之近緣種，藉由比對阿拉伯芥及玉山阿拉伯芥之種間差異將有助於瞭解物種種化歷史。

二、研究方法及過程

利用微衛星序列的研究為玉山國家公園地區的玉山阿拉伯芥及台灣雲杉建立識別碼以辨別當地和其他地區之差別；並建立其種源資料庫，以利未來進行玉山國家公園境內之族群研究或是種間的分類研究。

三、重要發現

在遺傳結構方面，玉山阿拉伯芥之異型合子的平均觀測值(0.52)低於期望值(0.79)，推測可能是玉山阿拉伯芥在進入台灣時，可能受到遺傳漂變、瓶頸效應等因素影響其族群動態，進而造成其遺傳歧異度的降低，而族群間受到 vicariance 影響造成分化；台灣雲杉為台灣特有種，研究結果顯示台灣雲杉種內以及各族群內的異型合子平均觀測值皆較期望值低。而演替

速度慢，族群呈現零星點狀分布、基因交流困難，則造成台灣雲杉遺傳歧異度偏低且個體間的遺傳歧異度變異較大。

四、主要建議事項

在玉山阿拉伯芥的保育策略上，建議玉山國家公園管理處進行野外族群數量之維持，減少人為干擾，除草、道路維護等人為破壞應避免在其開花結果時期進行，以維持物種之遺傳歧異度。

台灣雲杉在楠溪林道族群保留高度遺傳歧異度，且為台灣雲杉少數重要純林分布地，因此建議玉山國家公園管理處將此族群認定為台灣雲杉保護區之首選，維護此一族群之棲地完整及進行種原之收集。而其他如南湖、雪山族群，其遺傳結構與玉山族群已有分化，因此建議協同雪霸及太魯閣國家公園管理處等進行族群數量維護及保育策略制定。

Abstract

DNA fingerprinting has been widely applied to examine the genetic variation for the purpose of biological conservation. DNA microsatellites with short sequence repeats provide high variability and high resolution in assessing population genetic structure. In this study, microsatellite polymorphisms and genetic structure of *Arabibopsis lyrata* subsp. *kamchatica* and *Picea morrisonicola* Hayata were examined. Genetic diversity within populations of *Arabibopsis lyrata* subsp. *kamchatica* and *P. morrisonicola* were both low. In *Arabibopsis lyrata* subsp. *kamchatica*, it posses medium levels of population differentiation mediated with some levels of gene flow. In contrast, human disturbances reduced the genetic diversity of the populations of *P. morrisonicola*, which should be protected based on its low genetic diversity and habitat fragmentation.

Keywords: fingerprinting, microsatellite DNA, *Arabibopsis lyrata* subsp. *kamchatica* , *Picea morrisonicola* Hayata

第一章 緒論

第一節 研究緣起與背景

遺傳多樣性意指生物的種或族群所保有的基因型(genotypes)及對偶基因(alleles)的歧異程度，不同的基因型常會表現出不同的外表型(phenotypes)，一如人類眼睛、毛髮及皮膚的顏色及植物花瓣的顏色和不同的花型。新的遺傳突變常會造成外表性狀及特徵的改變，因此種間及族群間所呈現之外部形態的異同，常受到古老的遺傳祖先型及新的遺傳變異影響。

在 DNA 序列上所呈現的個體間或族群間的差異即代表著不同程度的遺傳變異，DNA 序列的改變如果是在不轉譯的基因區間(intergenic spacer)或同義的(synonymous)的置換位置，並不會引起胺基酸序列的改變，但可能影響基因體(genome)的穩定以及基因的表現程度；相對地，非同義(nonsynonymous)的置換則會改變胺基酸的序列以及蛋白質的結構，並造成生化上或是形態上功能的變異，因而影響生物的存活、適應或生殖。

遺傳多樣性的估算，可藉由對多型性(polymorphism)的多寡，異型基因合子(heterozygosity)的高低，對偶基因歧異度(allelic diversity)，或是基因單型歧異度(haplotype diversity)加以評估。有些基因可能因為受到強烈的天擇，抑或遺傳漂度(genetic drift)影響，趨於固定(fixed)而缺乏變異；有的物種或族群則因有較高程度的異交(outcrossing)，或是大的族群，較高程度的基因交流，而在基因座中

保有較高的遺傳歧異程度。因此遺傳歧異度的高低、變異量在族群間的分布、以及分子序列中不同位置的置換模式，常被用來估算天擇的模式，以及族群遺傳的結構和「健康」的程度(即適應與否)，並提供了保育工作在遺傳學上不可或缺的資訊。

遺傳多樣性(genetic diversity)是國際最主要的保育組織世界自然保育聯盟(Conservation Union, IUCN)所認定的三大多樣性的保育階層之一，早在西元 1970 年澳洲的保育學者 Otto Frankel 即提出生物遺傳因子在保育生物學上的重要性；Frankel 與美國的 Michael Soulé 更在公元 1981 年出版的第一本保育書籍中，揭櫫生物遺傳因子對保育生物學中的顯著影響(Frankel, Soulé, 1981)。

保育工作的進行在確保野外族群及物種的存活及適應，所端賴的即是族群中遺傳歧異度的高低以及多型性的多寡。達爾文在界定天擇的定義時，即提到族群中個體間因遺傳上的差異(genetic variation)，而有不同的性狀表現，並在外在環境的選擇下，呈現出不同的存活(survivorship)，以及不同程度的孕性(fertility)和生殖率(fecundity)，亦即不同的適應度(fitness)。愈來愈多的分子證據都支持達爾文的看法，亦即遺傳多樣性的高低決定了物種生存的品質，易言之，缺乏遺傳變異的族群或種類，常有較高的滅絕危機。因此，透過對遺傳歧異度的估算，有助於對亟待保育的物種及族群之現況的了解，更有助於厘清保育單位(conservation units)的界定，提高保育工作的效率。

近年來，分子生物學技術的神速發展，使得探索野外生物族群的遺傳歧異程

第一章 緒論

度及結構變得不但可行而且快速，其中針對特定基因的分子定序，提供了演化學者在基因分子演化及可能的適應機制的了解上了不可或缺的資訊。一如 Chiang 等人於 *Molecular Ecology* 所發表關於東亞紅樹林的親緣地理，該研究不但顯示出水筆仔族群間藉由洋流攜帶頻繁的種子傳播，更提供了分類學者認定台灣的水筆仔為新種的佐證(Chiang *et al.*, 2001)。

愈來愈多的分子證據顯示出台灣植物高遺傳歧異度的特質，甚至遠高於整體中國大陸族群遺傳歧異的總和。異常的高遺傳歧異度與台灣的冰河歷史有密不可分的關係，根據現今的植物組成以及化石證據，台灣島嶼的生物大多來自於鄰近的亞洲大陸，這一個由歐亞大陸板塊及菲律賓海板塊擠壓隆起的島嶼(Sibuet, Hsu, 1997; Sibuet, Hsu, 2004)，約在距今約 200-300 萬年前，開始有動植物從大陸移入並拓殖(colonization)，並且歷經多次的冰河週期，其中最後一次冰河擴張距今約 10 萬年前，一直延續到最近的兩萬年前。在冰河擴張時期，因海水水位明顯下降(約達 120 公尺)，使得連結台灣及大陸間的陸橋從海中裸露出來，提供了動植物移入台灣的管道，加上台灣地處低緯度，在冰河擴張時期，提供了許多生物避難的棲所，因為此一不平常的冰河及地質歷史，使得台灣島嶼保有了許多遺傳的多型性及歧異度(Chiang, Schaal, 2006; Chiang *et al.*, 2006; Hikida, Ota, 1997)。

然而，在這樣的冰河時期生物大量移入避難所的歷史之下，加上後冰河時期族群的大量擴張，使得多數現今的植物族群間擁有極低的遺傳分化。在保育工作的推展中，如若採取 Moritz(1994a)的定義，亦即所有的保育單位都必須是單源群

(monophyletic)，勢必造成界定及執行上的困難，因為多數的台灣植物族群是多源群(polyphyletic)或側系群(paraphyletic)，另一方面，雖然單一基因的分序列的確提供了不少族群及種演化的訊息，但是對於 genome 上其他多數的基因座卻被大大的忽略，基於上述理由，如何慎選適用的分子標記作為保育遺傳學的參考是當務之急。

分子指紋(fingerprinting)技術中微衛星指紋(microsatellite)提供了幾近於中性(neutral)，且代表整個基因組的分子標記(molecular marker)，其對偶基因的特性更提供了估算族群中異型基因合子和遺傳變異以及族群間遺傳分化程度的可能，因此，分離及利用微衛星指紋基因已成為保育遺傳學的研究主流之一。微衛星指紋的高變異性特性，使得不同種類及族群間存在著特殊的電泳條帶型式，對於特有生物的保育、確定造林種源以及遏止林木被盜採上極有應用性，也非常具有學術性，也因此建構本土的微衛星指紋資料庫對特有生物的保育有其必要性及迫切性。

近年來分子生物學蓬勃發展，提供了學者生物學的嶄新視野，並解決過往許多困擾生物學者的棘手問題，在物種親緣的研究上，系統分類學者以分子序列如 DNA、蛋白質等遺傳物質，因源來自於共同祖先之同源特徵，重建物種親緣並顯現物種演化的歷史(Graur, Li., 2000)，另外在分子技術的快速發展如聚合酵素連鎖反應(PCR)技術、基因選殖(cloning)及分子定序技術(sequencing)的成熟等，也使得分子生物學成為生物學的主流之一，而分子技術如隨機擴增多型性

第一章 緒論

DNA(RAPD)、限制性片段長度多形性 DNA(RFLP)、增擴片段長度多形性 DNA(AFLP)、同功酵素(isozyme)和微衛星 DNA (microsatellite DNA)等多被用於研究物種親緣或族群遺傳研究(Goldstein, C.Schlötterer, 1999)，其中根據 DNA 序列之片段多型性所發展出來之分子指紋技術(DNA fingerprinting)更被廣泛利用及重視，一如國際性期刊 *Molecular Ecology Notes* 即專門刊登分子指紋相關的文章，雖然 DNA 在生物體內皆由四個核苷酸所組成，但由於核苷酸排列組合的不同造就了變化萬千的遺傳多樣性，而分子指紋就是依據核苷酸序列不同排列而發展出來的技術。分子指紋最早是由 Jeffreys et al. (1985)所提出，主要是以重複序列作為探針(probe)，用以和 DNA 序列雜合並顯現其多型性，由於物種、族群及個體所帶有之遺傳訊息均具有其多樣性及獨特性，藉由分子指紋技術將可顯現物種族群間的差異，更進一步瞭解其演化歷史及族群動態。

總和來說，分子指紋技術包含了 RAPDs、RFLP、AFLPs 以及 microsatellites，隨機擴增多型性 DNA(RAPDs)利用聚合酵素連鎖反應原理以 *Taq* polymerase 在溫度循環器隨機擴增基因座間片段，相較於傳統 PCR 技術中使用高度專一性的引子及較高的黏合溫度(45-60°C)，RAPD 以由 10 個隨機組成的鹼基組成專一性低的單一引子，在較低的溫度下進行黏合，因此具有相當高的敏感性，而其多型性的產生主要是因為(1)在兩端引子黏合複製區中插入長片段 DNA 序列，因片段過長無法複製造成此一複製區缺失；(2)在兩端引子黏合複製區中插入或缺失短片段 DNA 序列，因而造成增幅片段長度的改變；(3)在引子黏合區產生缺失情形，

造成無法增幅或增幅較長片段；(4)在引子黏合區產生核苷酸取代使得 PCR 增幅時改變片段長度或無片段產生。隨機擴增多型性 DNA 技術在 1990 產生，因技術簡單、可大量顯現 DNA 訊息等優點，到 1996 年短短 6 年就已經產生約 3000 篇相關文獻，即便現今仍受到學者重視；限制性片段長度多形性 DNA(RFLP)利用來自於原核生物之限制核酸內切酶(endonuclease)作用於生物基因組，限制核酸內切酶由 4-6 鹼基所組成 且具有專一性，可辨識並切下特定 DNA 區段，當 DNA 發生插入或刪除情況時會改變 DNA 片段長度，進而以此推算彼此的差異，可用於建構基因圖譜、重建物種親緣以及親子鑑定等；增擴片段長度多形性 DNA(AFLP)主要是由 Zabeau and Vos(1993)及 Vos et al.(1995)所提出，藉由整合 RFLP 及 PCR 技術所形成之分子指紋技術，原理在於利用兩種不同之限制核酸內切酶切下 DNA 片段，利用已知序列之 adaptor 接上 DNA 片段後，在第一次 PCR 時根據 adaptor 設計引子，在 5'端為互補之序列，在 3'端則為延長 1 鹼基以篩選特定 DNA 片段，每當引子增加 1 個鹼基時將會增幅較高專一性之 DNA 片段，以原先 PCR 產物進行第二次 PCR 時以 3'端延長 3 個鹼基及具有螢光標定之引子將可篩選出較高專一性之片段，而 AFLP 除了擁有 RFLP 的優點外，更可瞭解在限制核酸內切酶切點鄰近之核苷酸序列及差異，在應用上可用於探討分子分類、族群遺傳結構、建構基因圖譜等方面，雖然 AFLP 功能強大，但因需要較好之 DNA 品質及易產生特定片段等限制造成其實際應用仍具有困難；微衛星 DNA (microsatellite DNA)，又稱為 simple sequence repeats(SSRs)，早在 1970 年即被發

第一章 緒論

現並因普遍存在於各類生物體遺傳訊息中而隨即受到重視，而在 1991 年第一次從植物基因體中篩選出微衛星 DNA(Beyermann *et al.*, 1992; Weising *et al.*, 1991)，在研究初期，一般認為和動物基因組相比較，其在植物體基因組中豐富度較低，但近年來隨著研究技術成熟、相關資料豐富，證實在植物基因組之豐富度較原先預測來的高(Cardle *et al.*, 2000; Morgante *et al.*, 2002)，微衛星 DNA 是由 1-6 個核苷酸組成之重複序列，在動物基因體中最常見之重複序列主要為(A)_n、(CA)_n 及其互補股(Aitman *et al.*, 1991; Beckmann, Weber, 1992; Jurka, Pethiyagoda, 1995)，在植物基因體中則為(A)_n、(AT)_n、(GA)_n 及(GAA)_n(Cardle *et al.*, 2000; Morgante *et al.*, 2002; Toth *et al.*, 2000)，而在植物葉綠體基因組中則常見(A)_n 或 (T)_n 單一重複序列(Powell *et al.*, 1995a; Powell *et al.*, 1995b)；除了重複序列不同外，微衛星 DNA 可分成(1)完美重複(perfect repeats)，也就是單一核苷酸序列重複所形成之微衛星 DNA，重複序列並無被打斷的情形；(2)不完美重複(imperfect repeats)，重複序列中有被一或多個非重複之核苷酸打斷，造成序列呈不連續重複；(3)複合型重複(compound repeats)，由多個不同完美或不完美之重複序列之核苷酸所組成(Weber, 1990)。

台灣的植物具有極高的特有種比例，許多的特有植物甚至有極狹窄的棲地選擇，加上近年來人類對自然棲地的大肆開發，造成這些種類面臨生存上的危機。遺傳多樣性是否因為人為的干擾以及棲地的消失而大量流失一直是保育工作者最關心的議題之一，微衛星指紋技術不但提供了高度敏感的工具，更提供了物種

間相互比對的齊一標準。因此最好的策略是針對亟待保育物種以及其他近緣(同屬)物種一併研究，並建立一有系統屬於台灣專有的資料庫。

近年來因生物多樣性觀念的漸趨成熟，學者開始重視遺傳多樣性熱點(hotspot)的研究。以保育觀點來說，此需先探尋保有高度族群遺傳歧異度的地區，瞭解當地物種遺傳結構的組成，進一步給予這些地區採取必要的保育措施及經營管理(Morton, Clegg, 1993)。而這些熱點該如何選擇？首先必須建立物種分布與族群大小、數量的相關資料庫，之後利用各種不同的分子標記(尤其是分子指紋)來鑑定遺傳歧異度的保留點。

由於資訊科技的發達與進步，使得數位化生物資源資料庫的建構和利用更為便利(Morin, 1991; Morin, 1992; Raven, 1992)。其中 NCBI (National Center for Biotechnology Information)等數位化資料庫的建立，整合大量生物資訊及基因體序列等資料，對於生物學的進展有極大貢獻，加上近幾年來網路普及和資料庫發展，使得建構數位化生物資源資料庫成了重要且必須的議題。玉山國家公園境內由於生態棲地保育完整、生物種類繁多，為生態保育良好典範之一，但也由於物種種類繁多、管理不易，更需加強數位化生物資源資料庫的建立，以提供生態保育方面有用之資訊與建議。

台灣由於生態環境及氣候類型多樣化，孕育出許多生物特有種；但特有種在空間分佈上較廣泛分佈種狹隘，相對地較易受到危害而影響其族群適存度，因此針對特有種的研究及保育更為重要，也因此瞭解台灣特有種的族群演化歷史將有

第一章 緒論

助於台灣特有物種保育策略的建立。

本研究中主要的實驗對象為分布於玉山國家公園境內之物種，分別為：

玉山阿拉伯芥(*Arabidopsis lyrata* subsp. *kamchatica* (Fisch. ex DC.) O’Kane & Al-Shehbaz)

在被子植物的系統演化上，十字花科(Brassicaceae)隸屬於真雙子葉植物的核心真雙子葉植物(core eudicots)，屬於十字花目植物，全球約有25族338屬3,709種(Warwick *et al.*, 2006)，泛分布於全球各地，北半球的溫帶地區為其主要分布中心，局部分布於南半球某些區域，熱帶地區除高山外非常稀少。阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynhold)是十字花科的一個種，也是植物界的模式生物，是一種小型的野草，卻是國際上第一個完成基因組定序的植物，也迅速成為全球科學家最廣泛應用的模式植物，相關的阿拉伯芥屬物種目前也在全球各國掀起研究熱潮。

現今阿拉伯芥基因組的定序完成及對它的廣泛研究，使它成為研究DNA變異的極佳材料。然而要更詳盡的瞭解物種的演化機制，通常需要相關物種的比較分析。經由與其他近緣物種的比較有可能同時顯現分子和生物體兩個層面，也才能比較是該物種所特有或者是共有的特徵。因此進行演化研究時常需擴展研究到其他近緣物種進行比較分析(Kawabe, Miyashita, 2002)。

阿拉伯芥為阿拉伯芥屬植物，此屬是Heynhold在1842年將*Arabidopsis*獨立為一新屬，並將*Arabidopsis thaliana*劃分為其中唯一成員(Heynhold, 1842)，之

後陸續有分類學者將與阿拉伯芥形態相似的物種分類至此屬。阿拉伯芥屬在過去紀錄有近五十種物種，當時以傳統分類方式尚無法確認物種間彼此的親緣關係，直到分子技術成熟後，才開始有學者利用基因上的遺傳訊息來分析阿拉伯芥屬物種親緣關係(O’Kane Jr, Al-Shehbaz, 2003)。但自 Hedge 在 1968 年提出，筷子芥屬(*Arabis*)與阿拉伯芥屬兩屬最大差異只有子葉上的些微差別，其他特徵均十分相似(Hedge, 1968)。An(1987)與 Jafri (1973)便依據 Hedge 的觀點，將阿拉伯芥屬中的部份物種重新劃分為 *Arabis* 屬植物。根據前人研究結果發現以親緣遺傳的觀點來看，全世界阿拉伯芥屬的成員應該只有 11 個物種(Warwick *et al.*, 2006)。

Koch 等人分別在 1999，2000 年(Koch *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 2000)進行 ribosomal DNA、chalcone synthase 和 alcohol dehydrogenase 基因序列分析 30 個與阿拉伯芥相關的分類群以瞭解彼此間的親緣關係，結果顯示 *Arabidopsis halleri* 是與阿拉伯芥最近的近緣種之一。進一步探討阿拉伯芥屬中所有物種之間的親緣關係，發現若以無苞芥屬(*Olimarabidopsis*)作為外群，阿拉伯芥屬所有物種是一單系群。但是若以親緣較接近的物種作為外群，如：亞麻薺屬(*Camelina*)或廣義的筷子芥屬(*Arabis sensu lato*)等物種進行親緣關係分析，卻會因為阿拉伯芥屬是一高度分化的物種，而無法呈現出與阿拉伯芥屬最為近緣的物種。

分布於玉山國家公園境內之玉山阿拉伯芥(*A. lyrata* subsp. *kamchatica*)，為多年生草本植物，在台灣地區分佈十分廣泛，棲地可從 1500 公尺至海拔 3800 公尺的高山地區，生長環境十分多樣，如：碎石坡、森林中、低窪濕地、甚至道路旁

第一章 緒論

等處都可見蹤跡，顯現玉山阿拉伯芥生存棲地之多樣性。玉山阿拉伯芥之形態多形性及棲地多樣化也造成分類上的困難，在野外觀察中常發現同一棲地中具有不同外表型之植株，另一值得注意的是在過去研究認為阿拉伯芥開花時期主要在春季及夏季(summer-annual 及 winter-annual)(Napp-Zinn, 1985)，而在台灣卻發現在冬季開花之玉山阿拉伯芥，這些不同於過去研究結果，更能顯現玉山阿拉伯芥之獨特性，因此利用微衛星 DNA 指紋技術瞭解玉山阿拉伯芥之遺傳結構、種間差異及建立遺傳資料庫將有助於釐清玉山阿拉伯芥之分類地位及族群演化歷史。

玉山阿拉伯芥為模式物種阿拉伯芥之近緣種，藉由比對阿拉伯芥及玉山阿拉伯芥之種間差異將有助於瞭解物種種化歷史，加上台灣為其分布之最南界，顯現其在物種演化歷史極為重要，生長於高海拔之玉山阿拉伯芥屬於冰河孑遺物種，過去在冰河時期、氣候變動下，玉山阿拉伯芥進入台灣後因冰河退卻，逐漸和中國、日本族群產生隔離，進而演化出現今具有獨特且特有之物種，由於玉山阿拉伯芥多分布於高山地區，其分布棲地範圍極為多樣，而適應各自棲地之族群更能保有其獨特之表型、基因型，現今由於全球暖化、氣溫上升等因素，將有可能壓縮高海拔物種之生育環境，進而造成物種、族群滅絕，在此一迫切危機之下，玉山阿拉伯芥之特有基因型更可能因而消失，因此針對於玉山阿拉伯芥之遺傳多樣性研究將有助於瞭解其族群遺傳結構，研究成果不僅能瞭解物種演化歷史，更能提供未來研究生物學各領域之重要資訊。

台灣雲杉(*Picea morrisonicola* Hayata)

台灣雲杉為松科(Pinaceae)、雲杉屬，種名*morrisonicola*，意指產自玉山，模式標本為Torii 1900年採自玉山。本種為常綠大喬木，樹幹通直，徑可達1.5公尺，高可達50公尺以上，枝條輪生，樹皮灰色或灰紅褐色，葉線形，橫切面為四角形或不等邊多邊形，毬果為長倒卵形，垂生在小枝先端。台灣雲杉為台灣特有种，主要分布於中央山脈海拔2,300~3,200 m間(柳楮，1966)，如丹大溪上流、楠梓仙溪、大甲溪上游等處，常群生成林，或與紅檜、鐵杉、華山松及其他闊葉樹混生。玉山國家公園之沙里仙溪、楠梓仙溪以及南橫檜谷一帶擁有大面積之雲杉林，為台灣此種植物最重要的分布區之一。

雲杉屬植物全世界約有40種，主要分布於北溫帶(Li and Keng, 1994)。台灣雲杉是全世界此屬植物分佈最南的一種，甚至跨越了北回歸線進入熱帶，在植物地理學上有其獨特的意義，研究顯示對於地理氣候上屬於反應比較敏感的樹種(詹明勳，1999)。此外，依據邱文良及呂勝由(1996)編著之台灣稀有及瀕危植物之分級彩色圖鑑，本種植物屬於易受害級(Vulnerable)，並推論在10年或三世代內，族群數量會減少超過20%，因此在目前面臨全球暖化威脅下，亟需採取適當之保育措施。唯目前有關本種之研究，多偏於森林動態及族群結構(曾彥學，1991)或物候學方面之研究(楊金昌等，1999；詹明勳，1999；詹明勳等，2005)，有關遺傳多樣性或族群演化歷史方面的研究則相當欠缺。本研究將利用微衛星DNA指紋技術研究台灣雲杉之遺傳結構及建立遺傳資料庫，結果將有助於了解台灣雲

第一章 緒論

杉之族群遺傳變異及族群演化歷史，並提供保育上的應用。

第二節 研究目的

1. 利用分子生物學技術，本研究將根據 Hsu et al.(2004)方式分離及鑑定各類植物不同的微衛星 DNA 基因座。
2. 設計各物種之微衛星 DNA 基因座的專用引子，因物種族群在其演化歷史中受到歷史事件及生態因子等影響造成族群分化，並會影響其遺傳結構，因此根據物種族群之遺傳變異將可推估其演化歷史。
3. 利用微衛星序列的研究為玉山國家公園地區的玉山阿拉伯芥及台灣雲杉建立識別碼以辨別當地和其他地區之差別；並建立其種源資料庫，以利未來進行玉山國家公園境內之族群研究或是種間的分類研究。

第二章 方法與結果

第一節 材料與方法

一、野外採樣工作

本研究針對中央山脈及玉山山脈的玉山阿拉伯芥及台灣雲杉族群進行採樣，每一族群採 5-10 個個體，以每 10 公尺為最小間距進行族群隨機採樣，每一個體取 3-5 片嫩葉以矽膠固定，以利 DNA 萃取，並利用 GPS 記錄每一個體之經緯度位置及加以編號。

二、實驗室工作

DNA 萃取：

幼嫩的葉組織以矽膠乾燥處理，回到實驗室並以液態氮將葉組織研磨成粉狀。利用 CTAB 方式(Doyle, Doyle, 1987)將在液態氮下磨成粉末的植物組織分離出 genomic DNA。

利用微衛星 DNA 引子以聚合酵素(*Taq polymerase*)在溫度循環器擴增出微衛星 DNA，在總體積 100 μ l 的反應液中加入 5U 聚合酵素，10 μ L 10X 緩衝液，10 μ L 的 dNTP，濃度 2 pmole 的引子各 10 μ l，最後加入 20ng DNA，以無菌水補足 100 μ l。聚合酵素反應在溫度循環機(Thermal cycler)進行，共進行 31 個循環，每個循環流程為：92°C，45 秒，將 DNA 的雙股變性打

開(denaturation); 49°C, 1 分 15 秒, 使 DNA 與引子結合(annealing); 72°C, 1 分 30 秒, 進行 DNA 延伸反應(extension), 最後在 72°C 作用 10 分鐘。PCR 結束後, 取 5 μ l 的 PCR 產物加上 1 μ l 6 倍的染色溶液, 在 1%瓊脂凝膠(agarose gel)中以 100 伏特電壓跑電泳約 30 分鐘, 經過溴化乙啶螢光染劑(EtBr)處理後, 配合所選用的 DNA ladder 當分子大小的標記, 並在紫外線燈下顯色及拍照。

Polyacrylamide gel 電泳判斷 PCR 產物片段長度及 band 條數

取一大(33.3 \times 41.9 cm²)一小(33.3 \times 39.4 cm²)玻璃, 在小片玻璃上塗上 γ -methacryloxypropyl-trimethoxysilane, 可使膠片可附著其上, 在大片玻璃上塗上 dimethyldichlorosilane solution, 可使膠片和玻璃分離, 將兩片玻璃重疊並插入梳子以及用膠布封住四周空隙, 配置 6% acrylamide stock solution (acrylamide : N,N'-methylene bisacrylamide = 29:1), 10% Ammonium persulfate 以及 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine), 以 3:24:1 比例混合均勻後利用針筒注入兩片玻璃之間並清除氣泡, 水平靜置等待其凝固即可拔除梳子及膠布, 利用 pipette 清洗 well 後加入 PCR 產物, 將垂直電泳槽注入 1X TBE buffer 跑膠, 在室溫下以 150V 電壓進行電泳, 經過溴化乙啶螢光染劑(EtBr)處理後判別 DNA 片段長度及條帶數。

分子指紋的變異分析, 主要利用 Arlequin Version 2.0(Schneider *et al.*,

2000) 估算族群間及種間的遺傳分化；平均觀測異質度(H_o)是每個基因座中所包含之異型合子個體(heterozygosity)在族群中實際所佔之比率。平均期望異質度(H_e)則是根據哈溫定所估算之期望值，定義如下(Hamrick, Allard, 1972)：

$$H_e = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (P_{ij})^2$$

其中 m 為基因座總數， n 為各基因座對偶基因數， P_{ij} 為第 i 個基因座的第 j 各偶基因頻率；並根據 $F_{ST} = 1/(1+4Nm)$ 的公式，估計族群間可能的基因交流，其中 N 中表示族群中個體的有效族群量， m 表示個體的遷徙能力。當族群分化程度 $F_{ST} < 0.05$ ，表示族群間幾乎沒有遺傳分化，若 $0.05 < F_{ST} < 0.15$ ，表示族群間的分化程度低等，若 $0.15 < F_{ST} < 0.25$ ，表示族群間屬於中度分化，若 $F_{ST} > 0.25$ ，表示族群間屬於高度分化。

第二節 結果

本研究針對中央山脈及玉山山脈的玉山阿拉伯芥及台灣雲杉(表一、表二)族群進行採樣，野外族群則取 3-10 個個體，並進行採樣及定位，每一個體取 3-5 片嫩葉以矽膠固定，以利 DNA 萃取。

(一)玉山阿拉伯芥的遺傳歧異度：

根據 Clauss et al. (2002)、Stift et al. (2006)設計微衛星 DNA 之引子共 21 組(表三)，其中 12 組可成功增幅出玉山阿拉伯芥之微衛星 DNA，每個族群選 3-10 個個體進行測試，結果顯示不同族群之個體均擁有其獨特之基因型(表四)。在對偶基因數目為 12-29，在計算異型合子(heterozygosity, 表五)時發現平均觀測值(H_e : 0.51)多小於平均預測值(H_o : 0.91)，顯示玉山阿拉伯芥保有較低之遺傳歧異度；其中 ICE04 及 F21M12 為同型合子(H_o : 0)，AthZFPG, ATTS0392, ICE14, RS10 及 ICE05 觀測值均小於預測值，而 Ca72, Ra01, nga129, ICE10 及 ICE13 觀測值均大於預測值，顯示不同基因座保有不同之遺傳歧異度。

在玉山阿拉伯芥各族群的比較(表六)，各族群之平均觀測值(0.52)小於平均預測值(0.79)，顯示各族群間均保有較低之遺傳歧異度，其中在玉山國家公園境內之族群除了觀高族群略小於平均觀測值外，其他族群多保有較高之歧異度(0.52-0.62)，在玉山國家公園境外之族群以雪山黑森林、雪山東峰到 369 山莊、南湖主峰到東峰以及昆陽之族群小於平均觀測值，其他族群則保有較高之歧異度。

在遺傳分化指數上(F_{ST} ，表七)，族群間之平均分化指數為 0.17，屬於中度分化，其中在玉山國家公園境內之族群其分化指數為 0.07-0.19，屬於低度至中度分化；在玉山國家公園境外之族群其分化指數為 0.11-0.38，屬於中度至高度分化。

在族群交流能力上(N_m ，表七)，族群間平均交流能力為 1.43，其中在玉山國家公園境內之族群其族群交流能力為 1.66，在玉山國家公園境外之族群其族群交流能力為 1.19。

(二)台灣雲杉的遺傳歧異度：

根據 Rajora et al. (2001)以及 van de Ven and McNicol (1996)設計雲杉之微衛星 DNA 引子(表七)測驗本研究物種台灣雲杉，結果顯現共有 9 個引子(SStg4c, SStg3a, PGL6, PGL8, PGL91R, PGL92R, SStg4, SStg3 and PGL14)在研究物種中具有多型性條帶(表九)，其他引子則皆為 homozygosity。進一步計算其異型合子(表十)，發現其異型合子平均觀測值($H_o=0.14941$)遠小於平均期望值($H_e=0.51698$)，顯示出台灣雲杉種內的遺傳歧異度很低。而在各基因座中，僅有 SStg4 具有較高的遺傳歧異度，其異型合子觀測值為($H_o=0.62727$)，其他 8 個基因座的遺傳歧異度皆偏低($H_o=0.00000-0.39316$)。再觀測園區內各族群的遺傳歧異度(表十一)，可看到所有族群的異型合子觀測值($H_o= 0.08313- 0.20635$)皆小於期望值($H_e= 0.25397- 0.54161$)，顯現各族群的遺傳歧異度皆偏低。在這之中，可觀察到南橫天池到埡口段的族群異型合子觀測值為最低($H_o= 0.08313$)，而雪山登山口族群異型合子觀測值為最高($H_o= 0.20635$)，可知雪山族群尚具有較高的遺傳

歧異度，而南橫天池到埡口段族群遺傳歧異度較令人擔憂。在族群分化指數 (F_{st})(表十二)方面，楠溪林道族群與其他玉山族群及雪山南湖族群皆呈現顯著分化；沙里仙溪族群與所有玉山族群以及雪山族群顯著分化，但與南湖族群僅呈現不顯著分化情形；而南湖族群中，雲稜到多加屯段族群與雪山族群也僅呈現不顯著分化。由區域的族群分化指數來看(表十三)，僅南湖大山族群與雪山族群具有顯著分化，而玉山與雪山、南湖族群的分化並不顯著。

根據 AMOVA 分析的結果(表十四)，台灣雲杉的變方成分有高達 89.81% 的比例落在族群內的變異，可見台灣雲杉的個體間的累積的遺傳歧異度遠大於族群間。

另外，定序 DNA 條帶呈現 homozygosity 的引子 PGL7 部分樣本，發現其微衛星 DNA 序列長度雖然相同，無法在電泳膠上判斷出差別，但其序列內部則具有部分點突變的變異產生。

第三節 討論

一、分子指紋在保育工作的可行性

本研究主要是以微衛星 DNA 做為分子標記，建構玉山阿拉伯芥及台灣雲杉的分子指紋，在玉山阿拉伯芥中，被分離及鑑定的微衛星 DNA 中兩個核苷酸序列重複以(AG)、(AC)為主，三個核苷酸序列重複為(AAG)以及(GAT)，四個核苷酸序列重複為(GTTT)以及(GAAA)，不同的基因座所保有之遺傳歧異度不同，可能是受到族群動態或 Wahlund effect 影響造成，進一步分析顯示，玉山阿拉伯芥不同之個體在 12 個不同之基因座條帶組合下，呈現彼此間的差異性，其中每一個體均擁有獨特之基因型，證實分子指紋實際應用的可行性，藉由微衛星 DNA 所建構之分子指紋資料將可分辨不同個體以及族群(表四)。

二、玉山阿拉伯芥的遺傳組成探討

玉山阿拉伯芥為阿拉伯芥屬中分布之最南界，為泛分布於 1500-3800 公尺之冰河孑遺物種，在過去冰河時期中，隨著海近海退、氣候變遷，進入台灣後和鄰近地區之族群如中國、日本等地產生隔離，在野外觀察中，玉山阿拉伯芥在生育地及形態上具有極大變異，顯現其在棲地及形態上之多樣化，在遺傳結構方面，玉山阿拉伯芥之異型合子的平均觀測值(0.52)低於期望值(0.79)(表五)，推測可能是玉山阿拉伯芥在進入台灣時，可能受到遺傳漂變、瓶頸效應等自然因素影響其族群動態，進而造成其遺傳歧異度的降低，但相較於分布於歐洲之阿拉伯芥物種

(*A. lyrata* subsp. *petraea*; $H_o=0.48$)(Clauss, Mitchell-Olds, 2006)遺傳歧異度高，顯示玉山阿拉伯芥相對於近緣種仍保有較高之遺傳歧異度，推測和玉山阿拉伯芥生育棲地之多樣性有關，在物種演化過程中，由適應多樣性的棲地，以保有遺傳歧異度；此外，本實驗採樣區域除了昆陽、南橫埡口屬於主要道路之區域外，其他族群多分布於人為干擾較低、自然環境完整之區域，顯示此一物種遺傳歧異度降低並非人為因素干擾造成，而是受到族群動態所影響，但在昆陽之族群其遺傳歧異度(0.47)卻低於平均值，而南橫埡口之族群歧異度(0.53)雖然仍高於平均值，但相較於南橫向陽(0.61)及關山(0.62)之族群仍偏低，顯示人為干擾如人工除草、道路維修等可能造成此二族群歧異度降低(表六)。實驗結果顯示分布於南湖大山之族群其遺傳歧異度為玉山阿拉伯芥中最低之族群(0.3)，推測可能受到較強之遺傳漂變效應，造成此一族群之遺傳歧異度的降低。分布於玉山國家公園境內之族群其遺傳歧異度大多高於平均值，顯示國家公園的設立確實有助於維持物種遺傳多樣性。

族群分化指數的分析(表七)，玉山阿拉伯芥族群間分化指數為 0.08-0.30，平均分化指數為 0.17，呈現中度分化，阿拉伯芥物種種子屬於蒴果開裂傳播，花粉經由昆蟲傳粉，受限於傳播能力隨著族群分隔距離越遠彼此分化程度越高(Clauss, Mitchell-Olds, 2006)，但在本實驗研究之族群分化指數並無顯著隨著距離增加而分化程度增加，而其族群交流能力為 1.43，顯示族群間仍有基因交流產生，推測玉山阿拉伯芥進入台灣後受到 vicariance 效應(地質歷史事件造成物種族群分隔)

如山脈隆起等地質事件影響，分別進入不同區域並特化以適應不同之棲地，造成族群間分化，若分隔時間越長，族群分化程度將越高，甚至於可到達種化階段，但藉由 Nm 值判定玉山阿拉伯芥族群間仍有基因交流，顯示族群間雖然處於分隔的環境，但仍能藉由種子或花粉產生基因交流降低族群間分化程度；但部分族群則可能受限於環境或人為干擾，造成族群間高度分化，在南湖主峰到東峰及昆陽的族群和其他族群間分化程度最高(0.15-0.38)，加上這兩個族群之異型合子觀測值偏低，推測可能是此兩地區族群受到較強遺傳漂變效應，造成歧異度喪失及喪失來自於共同祖先之單型而造成分化。南湖主峰往東峰的族群可能受限於圈谷的形成等地質因素，造成和鄰近族群間不易產生基因交流，進而產生分化，而昆陽的族群可能遭受較強烈之人為干擾，造成其遺傳歧異度喪失，並喪失來自於共同祖先之單型，而與其他族群產生高度分化。

三、台灣雲杉的遺傳組成探討

根據微衛星 DNA 結果顯示，台灣雲杉種內以及各族群內的異型合子平均觀測值皆較期望值低。可見目前台灣雲杉族群間的遺傳歧異度偏低，但根據 AMOVA 分析結果顯示(表十四)，台灣雲杉的遺傳歧異度大部分落在族群內的個體間。推測可能是因為台灣雲杉為古老孑遺物種，且台灣為雲杉屬植物分佈的最南界，過去在冰河時期雲杉族群擴張到台灣後，保留部分族群在台灣高山，經過時間的演變，逐漸演化成台灣特有種雲杉。而台灣雲杉演替速度慢，可能是造成其族群間遺傳歧異度低的主要原因。且族群分布於高海拔山區，各族群呈現零星

點狀分布，更少有雲杉純林的形成，多散生於鐵杉及冷杉林中，因此可能產生個體間基因交流困難，而造成台灣雲杉個體間的遺傳歧異度變異較大。

再由遺傳分化指數來看(表十二、十三)，雪山及南湖兩區域各族群間並無顯著分化，可見其基因交流仍在。玉山區域的族群，楠溪林道族群與其它玉山、雪山及南湖族群皆呈現顯著分化，可見楠溪林道族群已逐漸分化出來。而沙里仙溪族群則是與南湖族群呈現不顯著分化，可見沙里仙溪族群可能與南湖族群過去曾有基因交流。雪山登山口族群則與南湖族群中審馬陣山族群呈現不顯著分化，可能雪山族群與部分南湖族群過去曾有基因交流，而現在族群則逐漸分化。再看到各區域間的遺傳分化指數，僅南湖族群與雪山族群呈現顯著分化，而玉山與南湖、雪山族群則分化不顯著。推測可能玉山區域族群的祖先為南湖、雪山族群。而玉山區域族群仍保留過去古老祖先型的高遺傳歧異度，而目前族群的地理隔離以及基因交流隔離尚在進行，地理隔離的時間還不夠長，導致區域的分化指數結果尚不顯著。且沙里仙溪族群與南湖族群分化不顯著，可推測沙里仙溪族群與南湖族群可能來自共同祖先，但其基因交流仍然存在或是地理隔離效應尚不明顯。但，可推測若基因交流與地理隔離現狀不變，未來這些區域以及各族群間的分化會越趨明顯。

玉山國家公園之沙里仙溪、楠梓仙溪以及南橫檜谷一帶擁有大面積之雲杉純林，為台灣此種植物最重要的分布區之一。研究顯示，楠溪林道族群的確具有較高的遺傳歧異度($H_o=0.20635$ ， $H_e=0.25397$)(表十一)，且楠溪林道與其它研究族

群的遺傳分化指數具顯著意義，顯現楠溪林道族群除了具有龐大數量的雲杉純林外，其族群的遺傳歧異度也保留了高度變異，對整體遺傳歧異度偏低的台灣雲杉物種來說，楠溪林道這個族群可說是其遺傳歧異度保存庫。在制定保育策略時，楠溪林道應為一特別重要的保護區。而同樣為重要雲杉純林分布區的沙里仙溪一帶，研究顯示，其遺傳歧異度頗低($H_o = 0.14451 \ll H_e = 0.44125$)。可見，並非族群數量較大，遺傳歧異度的保存即可提高。

四、玉山阿拉伯芥及台灣雲杉之保育策略探討

物種以下層次的遺傳多樣性，可分為個體、族群內及族群間三個不同的層次，而一物種的遺傳結構即為對偶基因(alleles)其異型合子(heterozygote)比例在個體、族群內及族群間的分佈，針對族群遺傳結構的研究，就保育物種而言乃十分重要；除此之外，利用分子遺傳親緣分析可解決分類上尚有問題的類群，瀕危野生族群有效的管理確認物種在分類上的地位為首要，有助於物種保育管理單位的制定，在進行保育計劃時，針對一個具遺傳多樣性，且為 Evolutionary Significant Units (ESUs) (Moritz, 1994b)的物種之有效管理單位可節省不少資源。因此，在進行保育工作之前，除了必須努力將物種目前的情況忠實呈現之外，必須將根據遺傳結構研究及生態調查結果結合在一起，並且落實在管理策略的擬定上，這樣不但能讓物種保育工作達到預定的目的，而且也能夠減少因嘗試錯誤所造成人力及物力方面的浪費。

保育目的在於維護生物多樣性，減少人為或自然因素造成物種或族群滅絕，而保育遺傳學主要以分子層面探討物種保育，維持物種遺傳歧異度以適應環境的改變，包含對於族群有效的經營管理、釐清物種分類地位、定義有效保育單位以及利用分子技術瞭解物種遺傳結構。維持物種遺傳歧異度是重要且必須的，維持遺傳歧異度才能物種在環境變動下能有較高機會存活，族群數量的維持是相當重要的，由於每一世代均會損失 $1/2N$ 遺傳歧異度（ N 代表族群數目）(Frankham *et al.*, 2002)，所以一物種必須要維持其最小有效族群數量才能避免滅絕，保育的觀念隨著分子技術的進步而有所改變，傳統的保育觀念是以物種數量為主，單純地認為物種數量越多對於物種存活越有利，可能利用近親繁殖出大量後代或是只保育特定地區的物種，如明尼蘇達灰狼在 1949 年被重新引進安大略湖，現有的族群均只來自同一對親代，導致近親交配十分嚴重，雖然其族群數量在 1980 年曾增加至 50 隻個體，但因近親繁殖衰退 (inbreeding depression)，導致其適存度降低、族群數量小且繁殖率低(Laikre, Ryman, 1991)，此種保育方法雖然能產生並保有大量的個體，但由於近親交配結果，造成同型合子 (homozygote) 比例增高，造成遺傳歧異度喪失，易發生遺傳疾病或無法適應環境改變而滅絕，若要避免近親交配過於嚴重，可引進外來族群來增加其遺傳歧異度，引進外來族群雖然會短暫地影響族群數量(Madsen *et al.*, 1999; Westemeier *et al.*, 1998)，但會減少其近親交配機率，將有效增加物種遺傳歧異度、提高適存度，對於族群的延續是必要的，如墨西哥所羅門的 topminnow fish 上游族群在 1978 年因河床乾枯而滅絕，新族

群的建立均來自於同一個體，因此近親交配比例高，導致其抵抗傳染病及惡劣環境的能力極差，在 1983 年至下游引進 30 隻母魚並成功提高其適存度，減低近親繁殖衰退對於族群的影響(Vrijenhoek, 1994)。

根據分子層面的保育則必須要考慮到族群遺傳結構，由於近親交配跟遺傳漂變均會造成遺傳歧異度的下降，執行保育計畫時則更須注重維持異型合子比例及有效族群數量，以提供物種在面對環境改變時能具有較高的適存度。近年來台灣生態保育觀念抬頭，保護區的設立、瀕危物種的保育等對於自然環境的保護將有助於維持生物多樣性，其中物種遺傳多樣性與物種生存與否更是息息相關，已有許多研究顯示一旦物種喪失其遺傳多樣性，其物種或族群均存在著高度滅絕的危險性，因此著重於物種遺傳多樣性的保育、訂定具有遺傳歧異度的保育單位將有助於物種族群的延續。

在玉山阿拉伯芥的保育上，由於玉山阿拉伯芥在野外族群數量大，分布範圍廣，雖然其遺傳歧異度偏低，但推測為其處於 lineage sorting 階段，造成不同之族群趨向分化，但在人為干擾較嚴重之族群(昆陽及南橫埡口)其遺傳歧異度偏低，由於玉山阿拉伯芥多為一年生草本植物，在結果時期若遭受干擾，極易造成族群子代數量減少，但不定期之人為干擾如除草、道路維修等對於周遭植物均可能造成影響，而在昆陽及南橫埡口等易受人為干擾區域之族群歧異度較其他族群低，顯示人為干擾確實會造成遺傳歧異度的喪失，因此降低人為干擾對於自然環境的影響將有助於維持物種之遺傳歧異度，建議在道路維修及人為除草時應避

免在其開花結果時期進行，以利玉山阿拉伯芥物種族群之延續。

由於台灣雲杉為台灣特有種，且台灣為雲杉屬植物分佈的南界，因此對於台灣雲杉的保育應加以重視。研究顯示台灣雲杉的遺傳歧異度低，顯示其族群遺傳結構已逐漸趨於單純，由於台灣雲杉屬於多年生木本植物，其世代輪替較久，而其種子庫將決定其物種之遺傳歧異度，因此維持具有高遺傳歧異度之族群，即能保有較高歧異度之種原。族群遺傳結構的單純化，短期內或許不會造成族群數量上的影響，但對於一個物種而言過於單純的遺傳結構，可能會導致未來對環境的適應困難，以及與其它物種競爭上的弱勢，因而導致滅絕的危機。因此，應依照遺傳結構的不同，來制定保育策略的緩急輕重。如：楠溪林道族群保留高度遺傳歧異度，且為台灣雲杉少數重要純林分布地，因此此族群在保育策略的制定上應為保護區之首選，維護此一族群之棲地完整，並進行種原之收集，而其他族群如南湖、雪山族群，其遺傳結構與玉山族群已有分化，因此也應於保育策略中重視其重要性。

第三章 結論與建議

第一節 結論

玉山阿拉伯芥在野外族群仍保有較大之族群數量，儘管遺傳歧異度偏低，仍高於分布於歐洲之阿拉伯芥物種，加上其形態及生育地之多樣性，顯示玉山阿拉伯芥正處於 lineage sorting 階段，族群逐漸趨向分化，但在人為干擾較嚴重之族群(昆陽及南橫垵口)其遺傳歧異度偏低，顯示人為干擾確實會造成遺傳歧異度的喪失，因此維持棲地完整性及減少人為干擾將有助於維持玉山阿拉伯芥之遺傳歧異度。

台灣雲杉為台灣特有種，且台灣為雲杉屬植物分佈的南界，因此對於台灣雲杉的保育應加以重視。研究顯示台灣雲杉的遺傳歧異度低，顯示其族群遺傳結構已逐漸趨於單純。因此，應依照遺傳結構的不同，來制定保育策略的緩急輕重。如：楠溪林道族群保留的高度的遺傳歧異度，且為台灣雲杉少數重要純林分布地，因此此族群在保育策略的制定上應為保護區之首選，而其他如南湖、雪山族群，其遺傳結構與玉山族群已有分化，因此也應於保育策略中重視其重要性。

第二節 建議

傳統的保育觀念在於維持物種族群數量，純粹以數量來決定物種是否

可以延續下去，因此常利用近親交配或無性繁殖等方法以增加族群數量，而這種情形雖然會增加族群數量，但極有可能導致族群發生近親衰退，造成族群數量減少、物種滅絕等情況，以保育遺傳的角度來談，維持物種遺傳多樣性是極為重要的，具有較高遺傳歧異度的物種在面臨外在環境改變情況下能具有較高的適存度，能夠適應環境的改變而存活並成功留下子代，一旦物種之遺傳歧異度降低，極有可能受到遺傳漂變等因素造成數量減少、物種滅絕等，因此保持物種遺傳歧異度將有助於物種延續。

國家公園的設立對於物種的保育是極為重要的，不僅可以減低人為干擾，更可以針對園區內之物種進行研究及保育工作，過去人為干擾對於其野外數量、族群分布及遺傳組成均造成影響，不同物種受威脅程度也有所不同，因此針對各物種進行研究以瞭解不同物種現今之數量、分布及遺傳組成將有助於為各物種提供合適保育策略。

玉山阿拉伯芥為模式物種阿拉伯芥之近緣種，藉由比對阿拉伯芥及玉山阿拉伯芥之種間差異將有助於瞭解物種種化歷史，維持物種之物種數量及遺傳多型性是物種生存之重要法則之一，因此藉由了解物種之遺傳結構將有助於提供合適之保育策略，在玉山阿拉伯芥的保育策略上，建議玉山國家公園管理處維持其野外族群數量，減少人為干擾，此外道路維修及人為除草應避免在其開花結果時期進行，以利玉山阿拉伯芥物種族群之延續，並維

持物種之遺傳歧異度。

台灣雲杉的遺傳歧異度低，顯示其族群遺傳結構已逐漸趨於單純。楠溪林道族群保留的高度的遺傳歧異度，且為台灣雲杉少數重要純林分布地，建議玉山國家公園管理處以此族群為保護區之首選，進行棲地保育及種原收集等，而其他如南湖、雪山族群，其遺傳結構與玉山族群已有分化，建議協同雪霸及太魯閣國家公園管理處等進行族群數量維護及保育策略制定。

。

表一、玉山阿拉伯芥及台灣雲杉之取樣地點及樣本數

地點	經緯度	樣本數
<i>A. lyrata</i> subsp. <i>kamchatica</i>		78
玉山國家公園境外		
台中縣 雪山翠池	24'17"N 121'12E	5
台中縣 雪山主峰	24'23"N 121'14"E	5
台中縣 雪山黑森林	24'29"N 121'16E	5
台中縣 雪山東峰到 369 山莊	24'29"N 121'15E	5
台中縣 南湖主峰到東峰	23'23"N 121'26"E	3
台中縣 南湖五岩峰	23'23"N 121'25"E	5
南投縣 昆陽	24'07"N 121'16"E	3
南投縣 合歡山	24'08"N 121'16"E	5
玉山國家公園境內		
南投縣 玉山主峰	23'28"N 120'57"E	5
南投縣 排雲山莊	23'28"N 120'56"E	4
南投縣 觀高	23'30"N 120'59"E	5
南投縣 大水窟山	23'28"N 121'02"E	5
南投縣 秀姑巒山	23'30"N 121'30"E	10
高雄縣 南橫向陽	23'17"N 120'59"E	3
高雄縣 南橫埡口	23'16"N 120'57"E	5
高雄縣 關山	23'14"N 120'54"E	5

表二、台灣雲杉取樣地點及樣本數

	地點	經緯度	樣本編號	樣本數
<i>Picea morrisonicola</i>	塔塔加鞍部	23'29"N 120'53"E	Ta	14
	南橫 天池到埡口	23'16"N 120'55"E	Tian	14
	楠溪林道	23'27"N 120'53"E	Nan	7
	沙里仙溪	23'32"N 120'55"E	Sali	27
	雪山登山口 0-1K	24'23"N 121'18"E	Shiua	11
	池有到桃山瀑布	24'25"N 121'18"E	San	11
	雲稜到多加屯	24'22"N 121'22"E	To	18
	審馬陣山到雲稜	24'23"N 121'25"E	Shen	15

表三、阿拉伯芥之微衛星 DNA 引子編號、序列、重複序列及條帶長度

Locus		Primer sequence (5'-3')	motif	PCR product (bp)
ICE3	F	GACTAATCATCACCGACTCAGCCAC	CT	96-148
	R	ATTCTTCTTCACTTTTCTTGATCCCG		
ICE14	F	TCGAGGTGCTTTCTGAGGTT	GAT	222-231
	R	TACCTCACCCCTTTTGACCCA		
F20D22	F	CCCAAGTGACGTCTGGTTTC	GTTT	170-192
	R	AACAAAATGAGTTTCTCTGCATG		
AthZFPG	F	TTGCGTTTCCACATTTGTTT	CT	141-154
	R	TGGGTCAATTCACATGTAGAGA		
ca72	F	AATCCCAGTAACCAAACACACA	CT	198
	R	CCCAGTCTAACCCACGACCAC		
ATTS0392	F	TTTGGAGTTAGACACGGATCTG	AAG	140-151
	R	GTTGATCGCAGCTTGATAAGC		
F19K23-483	F	GGTCTAATTGCCGTTGTTGC	TTC	187-194
	R	GAATTCTGTAACATCCCATTTC		
ADH1	F	ACCACCGGACAGATTATTCG	CA	302
	R	CCCAGAAGTAAACATCGGTGTG		
ICE12	F	CTCATGGCAAAGAGGGAAA4	CT	228-230
	R	GCTCTCTCACCTCGAACGTC		
ICE11	F	TTTCAAGTTGAGAAGTGGAGTG	GA	80
	R	AAGAATTAGGCAAGAGTTTAGTGG		
nga112	F	TAATCACGTGTATGCAGCTGC	CT	237-239
	R	CTCTCCACCTCCTCCAGTACC		
ICE6	F	ACTGTCGGCCATCACCAC	CCA	141-154
	R	GAAGTGTTGGTGATCGGTGTG		
ICE5	F	CTTGCAACCGCCAACCTCAATCG	GTTT	166-178
	R	CCTGTCTCGCTCCCGCACG3		
nga129	F	TCAGGAGGAACTAAAGTGAGGG	GA	159-161
	R	CACACTGAAGATGGTCTTGAGG3		
ICE4	F	CACGAGGAATCTGGCATGGTCG	CT	181-182
	R	AGCGATTGCAAGCGGCTCAAG		
F21M12	F	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC	GAAA	125-135
	R	TTACTTTTGCCTCTTGTCATTG		

續表三、阿拉伯芥之微衛星 DNA 引子編號、序列、重複序列及條帶長度

Locus		Primer sequence (5'-3')	motif	PCR product (bp)
ICE10	F	AACATCCACAAGTTTCTAAAACAATC	GA	133-135
	R	GACTCTTATGGGTAAGCTCCTTG		
ICE13	F	GATCCTTCACCGGGTCTTG	ATC	234-249
	R	GTGGTGGAGACTCTTCGAGC		
Ra 01	F	CACACAAAGCACAAAAtGAGAG	(CTT) ₇	192-201
	R	GCTACAGTCGGTGAAGAGGAG		
Rs 10	F	GCTCCATACGTCACATTCAC	(AC) ₁₀	186-192
	R	GCACATTGATCCCATCTTTC		
Rs 89	F	ATTACAACAAATCTTCCACCAC	(TC) ₁₃	171-177
	R	GCTTGATCTCACATTACATTATTC		

表四、玉山阿拉伯芥衛星 DNA 不同基因座在個體所顯現之基因型 (01-31 表示同一基因座之不同對偶基因)

	Ca72	AthZfPG	Ra01	ATTs0392	ICE14	RS10	ICE05	nga129	ICE10	ICE13	ICE04	F21M12
雪山翠池-1	2416	1004	1912	1111	3023	0909	0606	2307	2211	2409	0909	0606
雪山翠池-2	2517	0903	1912	1010	3123	1111	0404	2406	2109	1606	0909	1010
雪山翠池-3	2617	1001	1812	1313	3023	1212	0404	2103	2109	1607	0909	1010
雪山翠池-4	2720	1002	1510	1515	3123	1212	0606	2002	2008	1506	1111	1010
雪山翠池-5	2821	1002	1407	1616	2424	1212	0606	1702	1905	1505	1010	1212
雪山主峰-1	2111	1515	2114	1010	2309	1818	1010	2009	2309	2212	1212	0606
雪山主峰-2	1510	1313	1918	1010	2309	1414	1010	1111	2309	2212	1111	0606
雪山主峰-3	1911	1205	2014	1210	2106	1616	0707	2009	2613	2114	1111	1010
雪山主峰-4	1506	1205	1914	1207	2106	1414	0101	1706	2513	2010	0808	1010
雪山主峰-5	1506	1205	1813	0707	1805	1414	0606	1707	2613	1606	0909	1818
雪山黑森林-1	2617	0909	1005	0808	1212	1616	1111	1909	2108	1404	0808	0202
雪山黑森林-2	2617	0909	1005	1313	1616	1919	1202	1908	2108	1101	1111	0202
雪山黑森林-3	2617	1010	1308	0909	1818	1919	1111	1807	1704	2525	0808	0303
雪山黑森林-4	2926	1212	1107	2121	2716	2020	0404	1607	1804	1909	1010	1515
雪山黑森林-5	2722	1212	1511	1919	1414	1919	0404	1709	2208	2010	1111	1414
雪山東峰到 369 山莊-1	1507	1212	1307	0606	1616	1212	0606	1807	1704	1809	0303	0505
雪山東峰到 369 山莊-2	1105	1212	1310	0606	1616	1010	0505	1908	2207	2111	0404	0606
雪山東峰到 369 山莊-3	1204	1212	1106	0707	2615	0909	0404	1908	2005	2313	0303	0606
雪山東峰到 369 山莊-4	1103	1010	1004	0707	1010	0808	0404	1707	1804	1911	0505	0505
雪山東峰到 369 山莊-5	0901	0909	0803	0808	1414	0704	0303	1806	1703	1708	0808	0707
南湖主峰到東峰-1	2121	1010	2020	1111	1414	1717	0707	1710	2210	1606	0404	1717
南湖主峰到東峰-2	2020	0909	2121	0909	1414	1515	0707	1710	2311	1607	0404	1616
南湖主峰到東峰-3	1919	0909	2121	0909	1414	1616	0707	1810	2310	1506	0505	1616
南湖五岩峰-1	2313	0909	1310	1010	1212	1212	0707	1810	2210	1606	0909	0606
南湖五岩峰-2	2111	0909	1307	0808	2312	1010	0707	1809	2311	1607	0909	0909
南湖五岩峰-3	2013	0808	1206	0909	1111	1010	0707	1707	2310	1506	0909	1010
南湖五岩峰-4	2111	1010	1206	1010	1111	1010	0707	1606	2208	1606	0909	0606
南湖五岩峰-5	1911	1002	1105	1010	1611	0606	0707	1505	2207	1606	0909	0404

續表四、玉山阿拉伯芥衛星 DNA 不同基因座在個體所顯現之基因型 (01-31 表示同一基因座之不同對偶基因)

	Ca72	AthZfPG	Ra01	ATTS0392	ICE14	RS10	ICE05	nga129	ICE10	ICE13	ICE04	F21M12
昆陽-1	1414	1616	1107	2222	0404	1616	0303	2010	2209	1202	1010	0808
昆陽-2	2313	1414	1107	2020	0909	1616	0606	1908	2512	1404	1010	0808
昆陽-3	2113	1414	1107	1717	1010	1616	0606	1807	2512	1405	1010	0909
合歡山-1	2012	1106	0702	1414	1906	0909	0505	1706	2412	1303	1111	0909
合歡山-2	2113	1107	0702	1414	1405	1010	0606	1706	2209	1303	1010	0606
合歡山-3	2213	1111	0702	1212	1602	0909	0707	1707	2311	1404	1010	0808
合歡山-4	2113	1106	0702	0808	0303	1010	0808	1706	2412	1505	1010	0505
合歡山-5	2012	1106	0802	1010	1201	0902	0808	1707	2512	1506	0909	0808
玉山主峰-1	2011	1005	1410	1010	1401	0808	1010	1807	2311	1507	1111	0808
玉山主峰-2	2112	1010	1008	1313	1403	0707	1010	1706	2411	1707	1111	0808
玉山主峰-3	1910	1005	0803	1313	0909	0601	0707	1505	2109	1708	1010	0202
玉山主峰-4	2011	1010	0803	1111	1606	0702	0707	1807	2211	1808	1111	0202
玉山主峰-5	2113	1111	0904	1111	1606	0707	0707	1708	2211	1808	1111	0101
排雲山莊-1	2112	1010	1206	1010	2414	0909	0909	1505	2211	1708	1010	0202
排雲山莊-2	2112	1010	1005	1111	2414	1003	0808	1908	2212	1606	0808	0303
排雲山莊-3	2112	0909	1004	0909	1212	1313	0808	1909	2311	1506	0808	0404
排雲山莊-4	2011	0808	0903	0802	1010	1003	0909	1908	2008	1404	0808	0303
觀高-1	1304	1010	0802	0505	2714	0606	0303	1405	1805	1708	1010	0707
觀高-2	1002	0909	0701	0404	2712	0505	0404	1404	1906	1708	0909	0606
觀高-3	1607	1010	0803	0707	2716	0606	0505	1303	2007	1809	0808	0606
觀高-4	1712	1111	0904	0808	2817	0606	0404	1404	2007	2110	0909	0707
觀高-5	1712	1111	1105	1008	2612	0707	0505	1504	2209	1909	0909	0606
大水窟山-1	2516	1010	1206	1616	1717	1717	0606	1710	2210	1909	0909	1212
大水窟山-2	2010	1001	1104	1010	1111	0606	0707	1606	2207	1505	0909	0606
大水窟山-3	1910	1001	1206	1010	1111	0606	0303	1706	2207	1506	0505	0808
大水窟山-4	2010	1111	1311	0909	2213	0606	0606	2005	2207	1606	0101	0909
大水窟山-5	2010	1010	1811	1010	2516	0704	0707	2206	2211	1606	0707	0606
秀姑巒山-1	2112	1111	1004	0908	2208	1407	0404	1504	2210	1607	0505	0707
秀姑巒山-2	2314	1111	1003	1313	2308	0903	0505	1705	2210	2110	0202	0606
秀姑巒山-3	2014	1111	0903	2121	2311	0808	0505	1705	2210	1809	0303	0606
秀姑巒山-4	1813	1111	0804	1212	2208	0803	0404	1506	2210	1809	0505	0808
秀姑巒山-5	1709	1111	1004	1212	1111	0808	0202	1706	2007	1707	0606	0909

續表四、玉山阿拉伯芥衛星 DNA 不同基因座在個體所顯現之基因型 (01-31 表示同一基因座之不同對偶基因)

	Ca72	AthZfPG	Ra01	ATTS0392	ICE14	RS10	ICE05	nga129	ICE10	ICE13	ICE04	F21M12
秀姑巒山-6	1913	1010	1105	1010	2212	0707	0404	1706	1704	1808	0606	0707
秀姑巒山-7	2113	1111	1105	0808	2311	0909	0404	1505	1502	2111	0707	0606
秀姑巒山-8	1711	1212	0903	0808	2007	0909	0505	1504	1704	1909	0606	0404
秀姑巒山-9	1812	1212	1206	1818	2207	1010	0606	1304	1604	1809	0303	0303
秀姑巒山-10	2213	1111	1409	1717	2409	1313	0707	1303	1401	1709	0303	0404
南橫向陽-1	1811	1106	1111	0808	2411	1010	0707	2103	2210	1808	0808	0505
南橫向陽-2	1506	1105	1207	1010	2813	1010	0606	1505	2412	2010	0909	0808
南橫向陽-3	1910	1001	1713	1111	2916	1010	0606	1607	2411	2009	0808	0909
南橫啞口-1	1607	1205	1614	0606	2106	1313	0707	1707	2713	1606	0909	0505
南橫啞口-2	1708	1004	1409	0606	2109	1313	0606	1403	2715	1910	0909	0505
南橫啞口-3	1608	1010	1105	0808	2106	1313	0606	1201	2613	1606	0808	0404
南橫啞口-4	1708	0909	1307	0808	2109	1313	0707	1505	2613	1608	0909	0404
南橫啞口-5	1810	1111	1307	0808	2106	1111	0808	1405	2411	1806	0707	0707
關山-1	1010	1509	1103	2916	1212	0606	1707	2411	2009	0707	1010	1010
關山-2	1111	1714	1301	2916	1212	0606	1707	2310	2010	0909	1111	1111
關山-3	1006	1710	1303	2411	1212	0606	2009	2209	2110	0909	1313	1313
關山-4	1111	1713	1301	2411	1414	0808	2109	2007	1910	0909	1010	1010
關山-5	1006	1712	1303	2411	1414	0808	2109	1804	2009	0707	0909	0909

表五、玉山阿拉伯芥之微衛星 DNA 引子編號、序列、重複序列及條帶長度

Locus		Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Size range(bp)	Total number of alleles	T _m (°C)	Ho	H _E
Ca72	F	AATCCCAGTAACCAAACACACA	CT	209-244	29.00	52.00	0.95	0.94
	R	CCCAGTCTAACCACGACCAC						
AthZFPG	F	TTGCGTTTCCACATTTGTTT	CT	132-154	16.00	52.00	0.31	0.84
	R	TGGGTCAATTCACATGTAGAGA						
Ra01	F	TGGGTCAATTCACATGTAGAGA	(CTT) ₇	171-191	21.00	52.00	0.95	0.94
	R	GCTACAGTCGGTGAAGAGGAG						
ATTS0392	F	TTTGGAGTTAGACACGGATCTG	AAG	146-169	22.00	52.00	0.13	0.91
	R	GTTGATCGCAGCTTGATAAGC						
ICE14	F	GTTGATCGCAGCTTGATAAGC	GAT	234-269	31.00	52.00	0.67	0.95
	R	TACCTCACCCCTTTTGACCCA						
RS10	F	GCTCCATACGTCACATTCAC	(AC) ₁₀	125-163	20.00	52.00	0.13	0.93
	R	GCACATTGATCCCATCTTTC						
ICE05	F	CTTGCAACCGCCAACCTCAATCG	GTTT	176-200	12.00	52.00	0.01	0.85
	R	CCTGTCTCGCTCCCGCACG3						
nga129	F	TCAGGAGGAACTAAAGTGAGGG	GA	141-171	24.00	50.00	0.99	0.93
	R	CACACTGAAGATGGTCTTGAGG3						
ICE10	F	AACATCCACAAGTTTCTAAAACAATC	GA	120-147	27.00	50.00	1.00	0.94
	R	GACTCTTATGGGTAAGCTCCTTG						

續表五、玉山阿拉伯芥之微衛星 DNA 引子編號、序列、重複序列及條帶長度

Locus		Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Size range(bp)	Total number of alleles	Tm (°C)	Ho	H_E
ICE13	F	GATCCTTCACCGGGTCTTG	ATC	243-301	25.00	50.00	0.99	0.94
	R	GTGGTGGGAGACTCTTCGAGC						
ICE04	F	CACGAGGAATCTGGCATGGTCG	CT	181-194	12.00	50.00	0.00	0.85
	R	AGCGATTGCAAGCGGCTCAAG						
F21M12	F	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC	GAAA	161-192	18.00	50.00	0.00	0.90
	R	TTACTTTTTGCCTCTTGTCATTG						
Mean					21.42		0.51	0.91

表六、玉山阿拉伯芥不同族群之微衛星 DNA 基因歧異度(Mean no.：基因座之平均 allele 數目；Ho：heterozygosity 平均觀測值；He： heterozygosity 平均期望值)

	Mean no. of allele	Mean Ho	Mean He	Mean allelic range
雪山翠池	5.50	0.57	0.81	11.58
雪山主峰	4.83	0.57	0.82	13.58
雪山黑森林	5.08	0.43	0.82	16.75
雪山東峰到 369 山莊	5.67	0.45	0.85	10.17
南湖主峰到東峰	2.70	0.30	0.67	4.90
南湖五岩峰	5.00	0.56	0.80	10.60
昆陽	3.30	0.47	0.75	8.40
合歡山	4.58	0.57	0.77	10.58
玉山主峰	4.50	0.55	0.75	10.92
排雲山莊	4.33	0.52	0.79	9.58
觀高	5.33	0.52	0.81	8.92
大水窟山	4.58	0.50	0.77	12.83
秀姑巒山	7.75	0.53	0.84	12.33
南橫向陽	4.36	0.61	0.85	10.55
南橫埡口	4.58	0.53	0.75	9.42
關山	4.42	0.62	0.76	10.33
Mean	4.78	0.52	0.79	10.72

表七、玉山阿拉伯芥不同族群之微衛星 DNA 之族群分化指數(FST，左下)及族群交流能力(Nm，右上)

	雪山東峰 南湖主峰															
	雪山翠池	雪山主峰	雪山黑森林	到 369 山莊	到東峰	南湖五岩峰	昆陽	合歡山	玉山主峰	排雲山莊	觀高	大水窟山	秀姑巒山	南橫向陽	南橫埡口	關山
雪山翠池	-	2.10	1.62	1.84	0.70	1.43	0.86	1.45	1.35	1.48	1.89	2.13	1.74	1.68	1.48	3.26
雪山主峰	0.11	-	1.55	1.93	0.74	1.21	0.85	1.38	1.59	1.31	1.46	1.57	1.66	1.62	1.44	1.56
雪山黑森林	0.13	0.14	-	2.98	0.78	0.90	0.89	1.24	1.55	2.25	1.72	1.15	1.82	1.43	1.20	1.19
雪山東峰到 369 山莊	0.12	0.11	0.08	-	0.81	1.07	0.89	1.58	1.41	1.93	2.95	1.54	3.72	2.07	1.60	1.40
南湖主峰到東峰	0.26	0.25	0.24	0.24	-	0.80	0.41	0.66	0.84	0.83	0.65	0.84	0.82	0.62	0.65	0.59
南湖五岩峰	0.15	0.17	0.22	0.19	0.24	-	0.50	1.06	1.00	1.12	1.28	2.65	1.21	1.66	1.21	1.06
昆陽	0.22	0.23	0.22	0.22	0.38	0.33	-	1.14	0.72	0.77	0.76	0.78	0.91	0.87	0.67	0.69
合歡山	0.15	0.15	0.17	0.14	0.27	0.19	0.18	-	1.48	1.52	1.56	1.40	2.29	2.17	1.20	1.32
玉山主峰	0.16	0.14	0.14	0.15	0.23	0.20	0.26	0.14	-	1.53	1.33	1.50	1.64	1.37	1.04	1.13
排雲山莊	0.14	0.16	0.10	0.11	0.23	0.18	0.24	0.14	0.14	-	1.54	1.36	1.72	1.92	1.38	1.22
觀高	0.12	0.15	0.13	0.08	0.28	0.16	0.25	0.14	0.16	0.14	-	2.38	3.42	1.57	1.60	1.38
大水窟山	0.11	0.14	0.18	0.14	0.23	0.09	0.24	0.15	0.14	0.16	0.10	-	1.95	2.08	1.33	1.70
秀姑巒山	0.13	0.13	0.12	0.06	0.23	0.17	0.22	0.10	0.13	0.13	0.07	0.11	-	2.02	1.58	1.61
南橫向陽	0.13	0.13	0.15	0.11	0.29	0.13	0.22	0.10	0.15	0.12	0.14	0.11	0.11	-	1.80	1.99
南橫埡口	0.14	0.15	0.17	0.14	0.28	0.17	0.27	0.17	0.19	0.15	0.14	0.16	0.14	0.12	-	1.27
關山	0.07	0.14	0.17	0.15	0.30	0.19	0.27	0.16	0.18	0.17	0.15	0.13	0.13	0.11	0.16	-

表八、台灣雲杉微衛星 DNA 之引子序列

Locus	Primer sequence(5' to 3')	Motif	PCR product (bp)
PGL6	F: TACTTCAGGACTTCAGGATTCAGGG R: TTTGCAAAGGCCTAAAGACCGTTGG	(AG) ₄	118
PGL7	F: TCACTATTTATTTCCCAAATGCTCGTA R: TCTCCNCAAGAAATCCNCCCTC	(AG) ₃₈	150
PGL8	F: CAGCACCCCTTGCAATAGTGG R: GATCATCATAGCAGATAAAAAGAGC	(CTT) ₃	110
PGL9	F: AGCCAATACAATGCCAAGAGATAAC R: AGAGACAAGTTTTGGAGCTGCAGT	(TC) ₂₄ N ₄₀ (TG) ₅	158
PGL12	F: CCATCTCAAATATTTAATTGTCCAGT R: TCATATCTGCATGCAAAGTCTGAAC	(AAG) ₂ (AG) ₃ G ₄ - (AG) ₉ (AG) ₂₁	230
PGL13	F: AAAAATAGTTTATATTTTCTTTATTACTC R: TATAAATCATTTTTCTTATGTTGTG	(AG) ₂₁	115
PGL14	F: AAAAATGATTTATATCTTCTTATTGTCT R: GNGTCATAAACGCCCATCAATAG	(AG) ₂₀	136
PGL15	F: CATACTCTCACACCCACACCCTCTC R: CAAGAACAGAAGAGAGGTCAAGATTG	(CT) ₄ N ₁₆ (CT) ₁₁	176
SStg4a	F: ACAATGTCAGGCATCGCTTA R: GTCCCTTCCCCTTTACAATG	(TA) ₆ TA(TG) ₂ TC- (TG) ₂	122
SScac4	F: TTGGGGAGTAGTTAAAGTAACGAA R: AATGCGAAACCAGTTCAGG	(CAC) ₂ CAA- (CAC) ₃ CCAAC ₄ A ₄	119
SStg3	F: TTCACATGCACCCCTTTTAA R: TCGACTTACAATACACACAACATTC	(TA) ₆ TC(TG) ₂₂ - (TATG) ₅ TATAAATA(TG) ₈ TT(TG) ₂ (TATG) ₅ TATAAATA (TG) ₈	225
SSgata3	F: CTGTGTACTTTTTTCATGGCC R: CTTTGTATCAAACCTCCCCCT	(TA) ₉ (RA) ₁₆ (GATA) ₁₄	346
SStg3a	F: TCAAGCTCTCCAACCCAGAT R: TGTCGAGTTTGACTTGTACCAA	(TG) ₂₇	136
SStg4	F: CTCACCTCCGTTTCCATTA R: CATTGTCCCCCACCATTAC	(TA) ₄ (TG) ₁₁ TA(TG) ₃	207
SStg4c	F: TAACCCCGAGGTACTCAACC R: ATTCGGTAACTTGTTCCGGC	(TG) ₈	139

表九、台灣雲杉微衛星 DNA 不同基因座在個體所顯現之基因型 (I~XVI 表示同一基因座之不同基因型)

	SStg4c	SStg3a	PGL6	PGL8	PGL91R	PGL92R	SStg4	SStg3	PGL14
Ta01	I	II	II	I	II	I	I	I	II
Ta05	II	V	I	I	I	II	I	I	III
Ta07	III	VI	II	I	I	II	X	I	X
Tian05	II	II	IX	I	II	II	XI	I	III
Nan02	VIII	II	II	III	I	II	X	II	III
Nan04	VII	II	I	III	I	II	X	II	III
Nan05	VIII	VII	I	III	I	III	X	II	III
Sali12	I	II	I	I	I	II	III	I	III
Sali17	IV	II	I	II	II	III	XI	I	XII
Sali22	I	II	III	I	II	II	I	I	III
San01	VI	I	II	II	I	II	X	I	XIII
San09	VIII	II	II	I	II	I	X	I	XIV
Shiua07	I	III	II	I	I	II	I	II	III
Shiua09	I	I	I	II	II	I	X	I	XV
Shen06	I	II	VI	I	II	II	I	II	XVI
Shen12	VI	II	VII	III	I	II	IV	II	III
To09	II	II	II	II	I	II	XI	I	X

表十、台灣雲杉不同微衛星 DNA 基因座之基因歧異度(Locus: 基因座; Mean no.:

基因座之 allele 數目; Ho: heterozygosity 觀測值; He: heterozygosity 期望值)

Locus	Mean no.	Ho	He	P-value
SStg4c	5	0.39316	0.69546	0.00000
SStg3a	4	0.06838	0.33293	0.00000
PGL6	5	0.05983	0.52291	0.00000
PGL8	3	0.00000	0.66028	0.00000
PGL91R	3	0.00000	0.51796	0.00000
PGL92R	3	0.00000	0.40351	0.00000
SStg4	5	0.62727	0.78850	0.00000
SStg3	2	0.00000	0.43432	0.00000
PGL14	8	0.19608	0.29692	0.01267
Mean	4.222	0.14941	0.51698	
s.d.	1.685	0.20919	0.15922	

表十一、台灣雲杉不同族群之微衛星 DNA 基因歧異度(Num. alleles：基因座之 allele 數目；Ho：heterozygosity 觀測值；He： heterozygosity 期望值)

Population	Num.alleles	Mean Ho	Mean He
Ta	3.222	0.15642	0.54161
Tian	2.778	0.08313	0.47455
Nan	1.778	0.20635	0.25397
Sali	2.889	0.14451	0.44125
Shiua	3.111	0.12727	0.57731
San	3.000	0.19773	0.47578
To	3.111	0.14924	0.44051
Shen	3.111	0.17566	0.49213

表十二、台灣雲杉各族群之遺傳分化指數(FST)(* : P-value<0.05)

FST	Ta	Tian	Nan	Sali	Shiua	San	To	Shen
Ta	0.00000							
Tian	0.06571	0.00000						
Nan	0.35129*	0.34817*	0.00000					
Sali	0.12040*	0.09614*	0.30091*	0.00000				
Shiua	0.01655	0.05673	0.31167*	0.11083*	0.00000			
San	0.03790	0.08757	0.45284*	0.08922*	0.07788	0.00000		
To	0.09205*	0.07838*	0.29766*	0.02981	0.05734	0.11970*	0.00000	
Shen	0.15157*	0.12656*	0.33612*	0.04816	0.15302*	0.12675*	0.07878*	0.00000

表十三、台灣雲杉不同區域之遺傳分化指數(FST)(* : P-value<0.05)

FST	玉山	雪山	南湖
玉山	0.00000		
雪山	0.03208	0.00000	
南湖	0.0216	0.07388*	0.00000

表十四、台灣雲杉分子變方分析(AMOVA)結果

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage variation
among groups	7.589	-0.0402	-1.71663
Among populations			
within groups	58.518	0.27876	11.90419
within populations	465.97	2.10315	89.81244
total	532.076	2.34171	

附錄一、期末審查意見

期末審查意見	回覆意見
<p>一、 本計畫針對玉山阿拉伯芥及台灣雲杉的遺傳歧異度之分析，並建立基因資料庫，提供從遺傳多樣性角度之保育意見及策略，值得肯定。</p>	<p>遵照辦理</p>
<p>二、 本年度成果基本上符合預期，但突顯出一些值得思考的保育問題，如人為干擾，或天然因素影響基因交流？及標示出那些特別值得關注的區域。</p>	<p>遵照辦理</p>
<p>三、 針對兩個物種之歧異度皆偏低，造成此現象的機制應深入探討予以釐清。</p>	<p>遵照辦理</p>
<p>四、 歧異度高或低是否可單一來判斷？而其高或低何項優先保育，宜有說明。</p>	<p>遵照辦理</p>
<p>五、 引用保育生物學上之理論及其實例證，提供具體可行之經營管理方針與策略，供決策單位施行。</p>	<p>遵照辦理</p>
<p>六、 十字花科與松科植物相差頗遠，若還有後續研究，應選擇相關性的科屬為主題，結果或可做更多的比較解釋。</p>	<p>遵照辦理，下年度計畫將以裸子植物 玉山圓柏為研究物種。</p>

續附錄一、期末審查意見

<p>報告第十頁所指台灣雲杉的採集者是 Torii，還是 Mori？ 宜加以說明。</p>	<p>經查證確實為 Torri</p>
<p>報告指出台灣雲杉屬易受害級，並推論在 10 年或三世代內族群數量會減少 20% 以上，似為第一章緒論所引用之文獻，非為本研究之成果，請修正補充。</p>	<p>遵照辦理</p>
<p>第二章第三節討論有關「分子指紋」之描述與運用，建議放至第一章緒論中。其結果與分子指紋之應用宜請詳加討論。</p>	<p>遵照辦理</p>
<p>「遺傳歧異度喪失並高度分化」形容族群分化，請再詳細舉例描述之。</p>	<p>遵照辦理</p>
<p>台灣雲杉族群呈現零星狀分布及玉山阿拉伯芥要維持野外族群數量之建議，應具體化說明保育方向，如台灣雲杉族群因棲地破碎化，呈現零星狀分布、玉山阿拉伯芥由於具有代表性，在進行除草時應注意，以減少人為干擾。</p>	<p>遵照辦理</p>

第三章 結論與建議

續附錄一、期末審查意見

<p>本報告未將評審會議、期中審查會議之審查意見列表納入該報告書之附錄中，建請補充修正之。並請將上述審查意見及辦理情形製表納入期末報告書之附錄中。</p>	<p>遵照辦理</p>
-------------------------------------------------------------------------------	-------------

參考書目

- 邱文良、呂勝由 (1996) 台灣稀有及瀕危植物之分級彩色圖鑑(I) 行政院農委會。
- 柳楮 (1966) 台灣產松柏類植物地理之研究。台灣省林業試驗所報告第 122 號。
- 曾彥學(1991)台灣中部沙里仙溪集水區植群生態之研究 II 台灣雲杉森林動態及族群結構之研究。國立台灣大學碩士論文。
- 楊金昌、王亞男、姜家華、賴玉芳(1999)塔塔加地區台灣雲杉、台灣鐵杉及玉山箭竹物候學之初步研究。中華林學季刊 31(3)：251-263。
- 詹明勳(1999)塔塔加地區天然生台灣雲杉樹輪氣候學之研究。國立台灣大學博士論文。
- 詹明勳、王亞男、葉永廉(2005)台灣中部塔塔加地區台灣雲杉樹輪氣候學研究過去 245 年氣溫與降雨量趨勢。中華林學季刊 38(1)：67—82
- Aitman TJ, Hearne CM, Mcaleer MA, Todd JA (1991) Mononucleotide Repeats Are an Abundant Source of Length Variants in Mouse Genomic DNA. *Mammalian Genome* **1**, 206-210.
- An ZX (1987) Arabidopsis . In T.-Y. Cheo (editor), *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Science Press, Beijing* **33**, 280-288.
- Beckmann JS, Weber JL (1992) Survey of Human and Rat Microsatellites. *Genomics* **12**, 627-631.
- Beyermann B, Nurnberg P, Weihe A, et al. (1992) Fingerprinting Plant Genomes with Oligonucleotide Probes Specific for Simple Repetitive DNA-Sequences. *Theoretical and Applied Genetics* **83**, 691-694.
- Cardle L, Ramsay L, Milbourne D, et al. (2000) Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* **156**, 847-854.
- Chiang TY, Chiang YC, Chen YJ, et al. (2001) Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and

- mitochondrial DNAs. *Molecular Ecology* **10**, 2697-2710.
- Chiang TY, Schaal BA (2006) Phylogeography of plants in Taiwan and the Ryukyu archipelago. *Taxon* **55**, 31-41.
- Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, *et al.* (2006) Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Molecular Ecology* **15**, 765-779.
- Clauss MJ, Cobban H, Mitchell-Olds T (2002) Cross-species microsatellite markers for elucidating population genetic structure in *Arabidopsis* and *Arabis* (Brassicaceae). *Molecular Ecology* **11**, 591-601.
- Clauss MJ, Mitchell-Olds T (2006) Population genetic structure of *Arabidopsis lyrata* in Europe. *Molecular Ecology* **15**, 2753-2766.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities. of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-15.
- Frankel OH, Soulé ME (1981) Conservation and evolution. *Cambridge University Press, Cambridge, UK.*
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics* Cambridge University Press, UK.
- Goldstein DB, C.Schlötterer (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications* Oxford University Press.
- Graur D, Li. WH (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd edn. Sinauer Associates, Inc. USA.
- Hamrick JL, Allard RW (1972) Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 2100-2140.
- Hedge IC (1968) Cruciferae *In Rechinger KH (ed.) Flora Iranica*Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstalt. **57**, 1-372.
- Heynhold G (1842) *Arabidopsis thaliana* (L.). *In: Holl F, Heynhold G, eds. Clav. Gen. Fl. Sachsen* **1**, 538.
- Hikida T, Ota H (1997) Biogeography of reptiles in the subtropical East Asian Islands. *In: The Symposium on the Phylogeny, Biogeography and Conservation of Fauna and Flora of East Region, National Taiwan Normal University, Taipei, Taiwan.*, 11-18.
- Hsu KC, Wang JP, Chen XL, Chiang TY (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Acrossocheilus paradoxus* (Cyprinidae) using PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Conservation Genetics* **5**, 113-115.
- Jafri SMH (1973) Brassicaceae. *In E. Nasir & S. I. Ali (editors), Flora of West Pakistan Ferozsons, Karachi.* **55**, 1-308.

- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable Minisatellite Regions in Human DNA. *Nature* **314**, 67-73.
- Jurka J, Pethiyagoda C (1995) Simple Repetitive DNA-Sequences from Primates - Compilation and Analysis. *Journal of Molecular Evolution* **40**, 120-126.
- Kawabe A, Miyashita NT (2002) DNA variation in the acidic chitinase locus (ChiA) region in *Arabis gemmifera* and its related species. *Genes & Genetic Systems* **77**, 167-175.
- Koch M, Bishop J, Mitchell-Olds T (1999) Molecular systematics and evolution of *Arabidopsis* and *Arabis*. *Plant Biology* **1**, 529-537.
- Koch MA, Haubold B, Mitchell-Olds T (2000) Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1483-1498.
- Laikre L, Ryman N (1991) Inbreeding Depression in a Captive Wolf (*Canis-Lupus*) Population. *Conservation Biology* **5**, 33-40.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittzell H (1999) Conservation biology - Restoration of an inbred adder population. *Nature* **402**, 34-35.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* **30**, 194-200.
- Morin NR (1991) Beyond the hardcopy: databasing Flora of North America information. In *Proceedings of the International Congress for Systematic and Evolutionary Biology IV. (Portland)*, 973-980.
- Morin NR (1992) The Importance of Computerization in National Biological Surveys. In C.-I Peng (ed.), *The Biological Resources of Taiwan: A Status Report. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series* **11**, 13-24.
- Moritz C (1994a) Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends Ecology and Evolution* **9**, 373-375.
- Moritz C (1994b) Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends of Ecology and Evolution* **9**, 373-375.
- Morton BR, Clegg MT (1993) A Chloroplast DNA Mutational Hotspot and Gene Conversion in a Noncoding Region near *Rbcl* in the Grass Family (Poaceae). *Current Genetics* **24**, 357-365.
- Napp-Zinn K (1985) *Arabidopsis thaliana*. In Halevy AH ed. *CRC handbook of flowering. Boca Raton, FL: CRC Press*, 492-503.
- O'Kane Jr SL, Al-Shehbaz IA (2003) Phylogenetic position and generic limits of *Arabidopsis*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **90**, 603-612.

- Powell W, Morgante M, Andre C, *et al.* (1995a) Hypervariable Microsatellites Provide a General Source of Polymorphic DNA Markers for the Chloroplast Genome. *Current Biology* **5**, 1023-1029.
- Powell W, Morgante M, Mcdevitt R, Vendramin GG, Rafalski JA (1995b) Polymorphic Simple Sequence Repeat Regions in Chloroplast Genomes - Applications to the Population-Genetics of Pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7759-7763.
- Raven PH (1992) The importance of national biological inventory. In C.-I Peng (*ed.*), *The Biological Resources of Taiwan: A Status Report. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series* **11**, 1-12.
- Schneider S, Kuffer J, Rosli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN: A Software for Population Genetic Data Analysis, Version 2.000. *Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, Switzerland.*
- Sibuet JC, Hsu SK (1997) Geodynamics of the Taiwan arc-arc collision. *Tectonophysics* **274**, 221-251.
- Sibuet JC, Hsu SK (2004) How was Taiwan created? *Tectonophysics* **379**, 159-181.
- Stift M, Kuperus P, Van Tienderen PH (2006) Development of highly conserved primers for 12 new polymorphic microsatellite loci for the genus *Rorippa* Scop. (Brassicaceae), yellow-cress. *Molecular Ecology Notes* **6**, 1129-1131.
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* **10**, 967-981.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) Aflp - a New Technique for DNA-Fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Vrijenhoek RC (1994) Genetic diversity and fitness in small populations. In: *Conservation Genetics* (eds. Loeschke V, Tomiuk J, Jain SK), pp. 38-53. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Warwick SI, Francis A, Al-Shehbaz IA (2006) Brassicaceae: Species checklist and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution* **259**, 249-258.
- Weber JL (1990) Informativeness of Human (Dc-Da)N.(Dg-Dt)N Polymorphisms. *Genomics* **7**, 524-530.
- Weising K, B. Beyermann, J. Ramser, Kahl G (1991) Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* **12**.
- Westemeier RL, Brawn JD, Simpson SA, *et al.* (1998) Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science* **282**, 1695-1698.
- Zabeau M, Vos. P (1993) Selective restriction fragment amplification: a general

參考書目

method for DNA fingerprinting. *European Patent Application EP 053485*.