

PG9702-0238

097-301020200G1-002

玉山國家公園植物微衛星 DNA 之分析 及資料庫之建立 (3/3)

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

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

邱其德

玉山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	II
圖次	III
摘要	IV
英文摘要	VI
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起與背景	1
第二節 研究目的	11
第二章 方法與結果	13
第一節 材料與方法	13
第二節 結果	16
第三節 討論	19
第三章 結論與建議	37
第一節 結論	37
第二節 建議	39
附錄一	43
附錄二	45
附錄三	47
參考書目	51

表次

表 2-1、玉山圓柏之採樣地點及樣本數	25
表 2-2、圓柏之微衛星 DNA 引子編號(Locus)、序列(primer sequence)、重複序列(motif)、黏合溫度(Tm)及條帶長度(PCR product)	26
表 2-3、玉山圓柏之微衛星 DNA 基因歧異度(Number of allele: 基因座平均 allele 數目; Ho: heterozygosity 平均觀測值; He: heterozygosity 平均期望值; allelic range: allele 範圍)	28
表 2-4、玉山圓柏不同族群之微衛星 DNA 基因歧異度(Number of allele: 基因座平均 allele 數目; Ho: 異型合子觀測值; He: 異型合子期望值; allelic range: allele 範圍)	29
表 2-5、玉山圓柏之分子變方分析(AMOVA)	31
表 2-6、玉山圓柏族群之遺傳分化指數(F_{ST})	32

圖次

圖 1-1、(A)玉山圓柏、(B)清水圓柏及(C)刺柏之圖片	12
圖 2-1、玉山圓柏之採樣地點	33
圖 2-2、以遺傳距離建構之玉山圓柏親緣樹狀圖(UPGMA)	34
圖 2-3、以 STRUCTURE 軟體進行玉山圓柏之組成分析(K=4)	35

摘要

摘要關鍵詞：分子指紋、微衛星 DNA、玉山圓柏

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，玉山圓柏為高山物種，而高山物種之分子指紋資料庫建立及遺傳多樣性熱點鑑定為現今首要工作之一。

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圓柏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

玉山圓柏在親緣樹狀圖上可分成四群，分別為秀姑巒山群，合歡山及塔關山群，三叉山及玉山群，向陽山及嘉明湖群，其中四群間可能因缺乏基因交流或適應當地微棲地而彼此分化，然而大部分變異仍保留在族群內個體間，加上玉山圓柏其野外族群並未受到嚴重威脅，因此未來在執行有限經費之保育計畫時，針對特定少數族群，如合歡山、三叉山或向陽山等族群將能有效保留物種之遺傳歧異度。

四、主要建議事項

根據本研究結果針對於玉山圓柏提出下列具體建議，以下分別從立即可行的建議、及長期性建議加以列舉。

立即可行建議：

主辦機關：玉山國家公園

玉山圓柏之野外族群保有較高之遺傳多樣性，在無遭遇人為嚴重干擾情況下將能維持其遺傳歧異度，應維持其棲地之完整性，減少人為干擾將有助於玉山圓柏族群之維護。

長期性建議：

主辦機關：玉山國家公園

然而全球氣候變遷的影響將可能對其分布造成影響，建議持續針對於玉山圓柏之族群數量、分布及遺傳歧異度進行調查，以了解氣候變遷對於玉山圓柏之影響。

英文摘要

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 *Juniperus squamata* were examined. Genetic diversity within populations of *J. squamata* were high. In *J. squamata*, it possesses high levels of population differentiation mediated with the limit of gene flow and adaptation of local environmental conditions. However, 87.81% of the genetic variation is harboured within populations. It may be sufficient to maintain a few populations across the whole distribution range to ensure that the genetic diversity is represented.

Keywords: fingerprinting, microsatellite DNA, *Juniperus squamata*

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型式，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 and 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度及結構變得不但可行而且快速，其中針對特定基因的分定序，

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 and Hsu, 1997, 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(Hikida and Ota, 1997; Chiang and Schaal, 2006; Chiang et al., 2006)。

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 and 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 DNA (RAPD)、限制性片段長度多形性 DNA (RFLP)、擴增片段長度多形性 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 and 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(Weising et al., 1991; Beyermann et al., 1992)，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, Hanafey, and Powell, 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 and Weber, 1992; Jurka and Pethiyagoda, 1995)，在植物基因體中則為(A)_n、(AT)_n、(GA)_n 及(GAA)_n(Cardle et al., 2000; Toth, Gaspari, and Jurka, 2000; Morgante, Hanafey, and Powell, 2002)，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 and 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, 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助於台灣特有物種保育策略的建立。

柏屬 (*Juniperus* L.) 隸屬於柏科 (Cupressaceae)，約有 75-80 種，為松柏類中種類僅次於松屬 (*Pinus* L.) 之物種，此屬在形態特徵上或是棲地分布上均具有高度多樣性，在棲地分布方面，由森林線以上 (*Juniperus monticola*

Mart.)到海平面(*Juniperus lucayana* Britton)均有其分布，在形態特徵上，植株大小由匍匐植株(*Juniperus horizontalis* Moench)到 50-60 公尺巨木(*Juniperus deppeana* var. *robusta* Mart.)均可發現，顯現此屬具有高度之物種多樣性(Adams and Demeke, 1993)。

柏屬在過去的分類處理中曾被處理為三個屬，分別為 *Arceuthos* Antoine & Kotschy, *Juniperus* s. str.及 *Sabina* Mill, 現今則將其處理為同屬不同組(section)：sect. *Caryocedrus* Endl., sect. *Juniperus*, 及 sect. *Sabina* (Mill.) Gaussen (Zanoni, 1978; Adams and Demeke, 1993), 其中 *Juniperus drupacea* Labill. (*Arceuthos drupacea* (Labiil.) Ant. & Kotschy) 被認為此屬中最原始之物種，並與 *Juniperus* 組最為近緣，而 *Sabina* 組則因葉形及雌毬果特徵被認為是特化之物種(Adams and Demeke, 1993)。此屬在全球分布上共有三個多樣性中心，分別為墨西哥的中央高地、中國的西部高地及地中海東亞地區(Adams and Demeke, 1993)。

在過去的分類處理中，分布於台灣之柏屬植物共有四個分類群，分別為清水圓柏(*J. chinensis* var. *tsukuiensis* Masamune)、刺柏(*J. formosana* Hayata)、綠刺柏(*J. formosana* Hayata var. *concolor* Hayata), 及玉山圓柏(*J. squamata* Buch.-Ham.) (Li and Keng, 1954), 但在第二版植物誌中則處理三個分類群，分別為清水圓柏，刺柏，及玉山圓柏 (圖 1-1) (Li and Keng, 1994), 而在 Adams et al.(2002)利用 RAPD 引子進行東亞地區柏屬之分類研究，則將分布於台灣之清水圓柏訂正為 *J. chinensis* var. *taiwanensis* R. P. Adams and C-F. Hsieh nov. var., 玉山圓柏則訂正為 *J. morrisonicola*

Hayata，兩者均隸屬於 *Sabina* 組，而分布於中國大陸之刺柏則處理為 *J. formosana* var. *mairei* (Lemee and Lev.) R. P. Adams and C-F Hsieh *com. nov.*，與刺柏同樣隸屬於 *Juniperus* 組。根據 Farjon (2005)則依然將其處理為 *J. squamata*，本研究則以 Farjon (2005)之分類處理為依據。

根據 Li and Keng (1994)之分類處理，玉山圓柏在台灣主要分布於海拔 3000 公尺以上山區，中央山脈、雪山山脈及玉山山脈為其主要分布區域，而玉山圓柏樹型常受限於環境因子影響而有所不同，在森林界限以下之玉山圓柏多形成巨大喬木，如雪山翠池、秀姑巒山等地之玉山圓柏多形成喬木純林，但在玉山主峰、雪山圈谷及南湖圈谷等森林界限以上之區域則多為矮小灌叢，並常與玉山杜鵑、玉山小蘗及玉山薔薇等混生，過去的研究 (蘇鴻傑, 1974)則是認為環境因子，如土壤肥沃度、水分及風力等因素共同影響，造成玉山圓柏在體型上有如此極端的改變。

玉山圓柏生育棲地多分布於國家公園境內(玉山國家公園、雪霸國家公園及太魯閣國家公園)，且分布多為 3000 公尺以上山區，較不易直接受到人為干擾所影響，但自工業革命後之二氧化碳、甲烷等溫室氣體劇增，造成氣候變遷、全球暖化等，而這些氣候改變將有可能對於高海拔物種存活造成影響，尤其是高山寒原植物其侷限分布更是首當其衝，因此高山物種之分子指紋資料庫建立及遺傳多樣性熱點鑑定為首要工作之一，藉由了解物種之族群遺傳結構，判定遺傳多樣性熱點，為物種保育提供合適之保育策略，並進行種原資料庫之建立，以保有具有高度遺傳歧異度之種原。

第二節 研究目的

1. 利用分子生物學技術，將依據 Hsu et al. (2004)方式分離及鑑定玉山圓柏不同的微衛星 DNA 基因座。
2. 利用微衛星 DNA 基因座之引子估算玉山圓柏之族群遺傳結構，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，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圓柏建立識別碼；並建立其分子指紋資料庫，以利未來進行玉山地區玉山圓柏族群遺傳結構比較。

圖 1-1、(A)玉山圓柏、(B)清水圓柏及(C)刺柏之圖片

(A)



(B)



(C)



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圓柏族群進行採樣(圖2-2)，在玉山圓柏採樣方面主要為玉山、秀姑巒山、塔關山、向陽山、三叉山及嘉明湖等地以每10公尺為最小間距進行族群隨機採樣，每一族群取5-15個樣本，每一個體取3-5嫩枝條以矽膠固定，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

1. DNA 萃取

幼嫩的枝條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 and Doyle, 1987)將在液態氮下磨成粉末的植物組織分離出genomic DNA。

2. 微衛星DNA之增幅

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 $^{\circ}$ C，45秒，將DNA的雙股變性打開(denaturation)；49 $^{\circ}$ C，1分15秒，使DNA與引子結合(annealing)；72 $^{\circ}$ 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。

3. 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。

4. 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(Ho)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(He)則是根據

哈溫定所估算之期望值，定義如下(Hamrick and Allard, 1972)：

$$m \quad n_i$$

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

$$I = 1/j = 1$$

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 各對偶基因頻率；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。利用 Phylip(Felsenstein, 1989)套裝軟體以遺傳距離進行物種親緣樹狀圖之建構。

以 STRUCTURE 軟體從個體層面上分析樣本之遺傳組成，並依照遺傳上的差異進行模擬分群，推估可能之物種分群。以 MCMC 方法(Markov chain Monte Carlo)計算個體遺傳組成，設定族群數量($K=1-10$)並進行 10000 次模擬，取最高可信值(likelihood)之 K 值為最適之族群分群。

第二節 結果

本研究針對中央山脈及玉山山脈的玉山圓柏(圖 2-1, 表 2-1)族群進行灌木採樣, 野外族群則取 5-10 個個體, 並進行採樣及定位, 每一個體取 3-5 嫩枝條以矽膠固定, 並進行 DNA 萃取。

一、玉山圓柏之遺傳歧異度

根據 Michalczyk et al. (2006) 及 Zhang et al. (2008) 設計柏屬之微衛星 DNA 引子共 14 組(表 2-1), 進行玉山圓柏之族群測試, 其中 6 組可成功增幅之微衛星 DNA 片段(表 2-3), 其中對偶基因數目(Number of allele)為 5-30 個(平均對偶基因數目為 17.333)。在計算異型合子比例時, 平均觀測值(H_o)為 0.65328 (0.00000-1.00000), 平均期望值 (H_e) 為 0.88501 (0.69131-0.96779), 顯示平均觀測值小於平均期望值, 在 JC31, JP03, JP07 觀測值均大於期望值, JC35, JP09, JP02 則其觀測值小於期望值, 顯示不同基因座均保有其各自之遺傳歧異度。在對偶基因長度差異上平均為 35.5bp (4-66)。

在玉山圓柏之族群比較方面(表 2-4), 各族群之平均觀測值 (0.61906-1.00000)均略小於平均期望值(0.76667-1.00000), 其中 JC31, JC35, JP03 及 JP07 均保有較高之異型合子比例(觀測值: 0.71429-1.00000, 期望值: 0.62121-1.00000), 在 JP09 及 JO02 則多為同型合子(觀測值: 0-0.16667, 期望值: 0.42857-0.80000), 顯示各族群中不同基因座保有不同之遺傳歧異度, 而同一基因座在不同族群間之歧異度均有一致性。

利用遺傳距離建構玉山圓柏之親緣樹狀圖(UPGMA, Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic averages)(圖 2-2),可將玉山圓柏分成四群,分別為秀姑巒山群,合歡山及塔關山群,三叉山及玉山群,向陽山及嘉明湖群,其中秀姑巒山群和合歡山及塔關山群相互近緣,三叉山及玉山群和向陽山及嘉明湖群相互近緣。

以 STRUCTURE 軟體分析個體組成結果顯示,當 $K=4$ 其可能性(likelihood)值最高,並以 $K=4$ 進行個體組成分圖之建構(圖 2-3),以四種顏色(紅、綠、紫、藍)代表不同之族群成分,結果顯示秀姑巒山群和合歡山及塔關山群由綠色、紅色以及紫色三種組成,其中又以紅及紫兩種顏色為主,在三叉山及玉山群和向陽山及嘉明湖群則由藍色、綠色及紅色組成,其中以綠及藍色為主要組成。

利用 Arlequin 軟體中分子序列變方分析(AMOVA, Analysis of Molecular Variance)進行玉山圓柏之種內族群分析(表 2-5),計算其種內族群遺傳結構,分別計算族群間變異(among populations)及族群內變異(within populations),結果顯示玉山圓柏之變異主要累積在族群內(87.81%),少數卻顯著累積在族群間(12.19%)。將其根據親緣樹狀圖分成四群,結果顯示部分變異顯著累積在四群間(10.82%),少部分變異累積於四群內族群間(5.28%),大部分變異顯著累積於族群內(83.89%)。

在遺傳分化指數方面(F_{ST})(表 2-6),族群間平均之分化指數為 0.14687,屬於中度分化,秀姑巒山群和合歡山及塔關山群間分化指數為 0.09552-0.15369,屬於中度分化,在三叉山及玉山群和向陽山及嘉明湖群

間分化指數為 0.03979-0.00868，屬於低度分化。秀姑巒山群、合歡山及塔關山群與三叉山、玉山群、向陽山及嘉明湖群間之分化指數為 0.12140-0.30061，屬於高度分化。

第三節 討論

一、玉山圓柏之遺傳組成探討

Michalczyk et al. (2006)及 Zhang et al. (2008)分別利用 *J. communis* L. 及 *J. przewalskii* Kom 設計五組及十組微衛星 DNA 引子用來估算物種之遺傳歧異度，*J. communis* 為世界泛分布之物種，由於其棲地破碎化及林相缺乏更新，可能導致其歧異度降低，而 *J. przewalskii* 為青康藏高原之高山物種，然而因人為過度開發導致其族群數量減少，此受威脅之 *J. communis* 及 *J. przewalskii* 之異型合子觀測值分別為 0.292-0.692 及 0.39-0.50，均低於異型合子期望值(0.693-0.948 及 0.58-0.70)，而 Zhang et al. (2008)利用 Michalczyk et al.(2006)五組引子進行 *J. przewalskii* 測試，結果只有 JC32 具有多型性，其他四組中有兩組無法增幅出片段，另外兩組則僅呈現單型，而以十四組引子進行其他柏屬物種結果顯示，在 *J. saltuaria* Rehder & E.H.Wilson 可增幅四組，*J. microsperma*(W. C. Cheng & L. K. Fu) R. P. Adams 可增幅七組，*J. tibetica* Kom.可增幅五組，*J. convallium* Rehder & Wilson 則可增幅六組。而本研究利用同屬不同種之十五四微衛星引子也僅能順利增幅六組引子，雖然平均之異型合子觀測值小於平均之異型合子期望值，但平均之異型合子觀測值(0.65328)大於 *J. communis* 及 *J. przewalskii*，相較於兩受威脅之物種，玉山圓柏族群仍保有較高之遺傳歧異度 (0.61905-0.67063)，推測為台灣之玉山圓柏族群多分布海拔 3000 公尺以上之山區，其棲地較不受到人為干擾，因而仍較其他柏屬物種維持較

高之遺傳歧異度。儘管玉山圓柏仍保有較高之歧異度，但值得注意的是其中四組引子 JC31、JC35、JP03 及 JP07 四組有極高之異型合子觀測值，但其他兩組引子 JP09 及 JP02 兩組引子異型合子觀測值極低，推測可能是強烈的連鎖效應等造成歧異度差異。

利用遺傳距離建構之親緣樹狀圖顯示(圖 2-2)，玉山圓柏可分成四大群，分別為秀姑巒山群，合歡山及塔關山群，三叉山及玉山群，向陽山及嘉明湖群，其中秀姑巒山群和合歡山及塔關山群相近緣，三叉山及玉山群和向陽山及嘉明湖群近緣。利用 STRUCTURE 軟體分析個體間組成顯示(圖 2-3)，K=4 可信度最高，推測玉山圓柏主要可分成四個族群，此一結果與親緣樹狀圖結果一致，比較不同個體之遺傳組成顯示秀姑巒山群和合歡山及塔關山群組成較多樣化(主要由綠、紅、紫三種顏色組成)，而三叉山及玉山群和向陽山及嘉明湖群則較單調(綠、藍兩種顏色組成)，推測秀姑巒山群和合歡山及塔關山群南北橫跨中央山脈，彼此間可能保有較高之遺傳多樣性，推測可能是玉山圓柏進入台灣各棲地後，在演化過程中由於適應當地環境而彼此趨向分化，但不同之族群仍有共祖之多樣性，導致地理距離分隔很遠之族群彼此在遺傳距離上仍相近，值得注意的是塔關山族群為這些地區中遺傳歧異度最低，推測可能是塔關山族群受限於棲地影響，造成歧異度的降低。而三叉山和向陽山及嘉明湖群則主要是分布於玉山山脈及中央山脈南段，可能受到過去演化歷史，如過去冰河造成之族群隔離或是近代火災造成族群減少，產生瓶頸效應等影響，導致與較北之中央山脈之族群產生差異，而玉山群雖然和三叉山和向陽山及嘉明湖群相近，但由

於個體數過少，未能確實地顯示此一族群之演化歷史，需增加玉山族群之個體數量較能正確顯現其演化歷史與族群動態。

利用分子變方分析(AMOVA)分析玉山圓柏之遺傳變異(表 2-5)，結果顯示，少部分卻顯著($P < 0.05$)累積在族群間(12.19258%)，顯示族群間具有遺傳變異，將其分成四群進行比較時，顯示在四群間具有顯著之遺傳變異(10.82%)，比較遺傳分化指數(F_{ST})顯示(表 2-6)，族群間平均之分化指數為 0.14687，顯示族群間屬於中度分化，在松柏類中屬於分化程度較高之物種($F_{ST}=0.052$)(Lagercrantz and Ryman, 1990)，而約略大於 *J. phoenicea* L. ($F_{ST}=0.12$)(Meloni *et al.*, 2006)，當一個世代中有超過四個以上個體在族群間產生交流，將有效避免族群因基因漂變所造成之族群分化(Slatkin, 1987)。而玉山圓柏之高度分化推測可能是族群間無基因交流導致分化。除了有限的基因交流之外，族群不同的分布環境也可能導致其分化，*J. phoenicea* L. 因受當地環境影響，使得族群因遺傳漂變及自交(inbreeding)等影響造成族群分化(Meloni *et al.*, 2006)。

二、玉山圓柏之保育策略探討

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, Ballou, and Briscoe, 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 and 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 (Westemeier et al., 1998; Madsen et al., 1999)，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。

一般來說，隔離之族群將有機會形成新種或是適應當地環境形成生態型，玉山圓柏雖然產生族群分化，但大部分變異仍保留在族群內個體間 (表五)，加上玉山圓柏其野外族群並未受到嚴重威脅，因此未來在執行有限經

費之保育計畫時，建議可針對四大群中各自具有高遺傳歧異度之族群為優先考慮族群，如合歡山、秀姑巒山、三叉山或向陽山等族群將能有效保留物種之遺傳歧異度。儘管如此，全球氣候變遷所引起之相關影響，如二氧化碳增加、氣溫上升及乾旱發生頻繁等均可能對生物造成影響。在墨西哥，1953-1958 間發生嚴重的乾旱，影響松柏類植物之分布，使得其快速往高海拔地區遷徙(Allen and Breshears, 1998)，而乾旱的產生亦會提高物種死亡率，Mueller et al.指出(2005) 在美國亞利桑那州 1996-2002 間發生乾旱，並松柏類植物死亡，並造成林相改變、物種組成變化等。因此儘管玉山圓柏族群仍保有高度遺傳歧異度，但在面臨全球氣候變遷影響下仍可能造成族群大規模改變，因此持續進行玉山圓柏之族群數量及族群分布將有助於瞭解全球氣候變遷對於玉山圓柏不同族群的影響。

表 2-1、玉山圓柏之採樣地點及樣本數

	地點	經緯度	樣本數
<i>J. squamata</i>			
	台中縣 合歡東峰	24°88'04"N 121°16'52"E	9
	南投縣 玉山	23°28'10"N 120°57'28"E	1
	南投縣 秀姑巒山	23°30'02"N 121°03'36"E	3
	高雄縣 塔關山	23°15'40"N 120°56'33"E	7
	台東縣 三叉山	23°17'49"N 121°01'42"E	9
	台東縣 向陽山	23°17'03"N 120°59'33"E	4
	台東縣 嘉明湖	23°17'36"N 121°02'02"E	6

表 2-2、圓柏之微衛星 DNA 引子編號(Locus)、序列(primer sequence)、重複序列(motif)、黏合溫度(Tm)及條帶長度(PCR product)

Locus		Primer sequence (5'-3')	motif	Tm	PCR product (bp)
Jp01	F	AAGGCCTACCTAGCAGAATCAC	(GA)6	50	117-129
	R	ACTCACTATAGGGCGAATTGGG			
Jp02	F	CAACAATGGAAGGACAGTCAC	(AG)9	50	138-155
	R	GGGGGTCCTTTAGAGATTAAG			
Jp03	F	AGGCCAAATCACTTGAGTATAAC	(AG)12	50	140-172
	R	CCTACATGAGTTCCTTCTACACC			
Jp04	F	CTCTCAAGTTCTCTTTCTTCCTC	(CT)5-(TC)6-(CT)5	52	234-251
	R	TAAAACGACGGCCAGTGCC			
Jp05	F	CGGGGATCCTCTAGAGATTTTAAG	(CA)24-(TC)11-(CA)16	54	327-367
	R	CTGCAGGTCGACGATTGTTTAAG			
Jp06	F	CTGGCAGCGTATGCAACAATAC	(GGC)7-(GGT)5	50	236-264
	R	TGCAGGTCGACGATTTTAAGG			
Jp07	F	CATCCTCTTCAGTTAGGGTCC	(AG)5	54	179-208
	R	GATTTAGTGGCACCTACATGAG			
Jp08	F	AGCAGAATCAATTCACGTTTAC	(CT)11	52	164-189
	R	CAATATGTGCTTAGATTTGGC			
Jp09	F	GCTAAATAGGCAATGGCAGG	(AC)16	48	163-176
	R	GTGCTTTCTTATGGATACTTACCCC			

續表 2-2、圓柏之微衛星 DNA 引子編號(Locus)、序列(primer sequence)、重複序列(motif)、黏合溫度(Tm)及條帶長度(PCR product)

Locus		Primer sequence (5'-3')	motif	Tm	PCR product (bp)
Jc032	F	ACATTGCAAATATGGGGTAA	(AC)14-(ATC)8	48	160-183
	R	TTGATGAGTTGTTGAGTTATTAAG			
JC016	F	CAAAATGATGCTTATGATGA	(GT)24	50	160(118-154)
	R	TGAAAATCATTGTTGTTTTCTT			
JC031	F	CCTAATGTTGTAATCACGTATATCT	(CA)15	50	192(174-242)
	R	TGACCTTGGGCGTATAGATT			
JC035	F	TGTGTTTATTCTCCCATCT	(CA)20	50	155(131-167)
	R	CCCCCAGTTATTCTAAACATT			
JC037	F	GGCAATTAGTAAGGCACAAG	(TG)10(AG)20	50	171(176-222)
	R	TAAGGTGGATATCACCAAGG			

表 2-3、玉山圓柏之微衛星 DNA 基因歧異度(Number of allele：基因座平均 allele 數目；Ho：heterozygosity 平均觀測值；He： heterozygosity 平均期望值；allelic range：allele 範圍)

Locus	Number of allele	Ho	He	allelic range
JC31	27	1.00000	0.95736	42
JC35	30	0.89189	0.96779	66
JP03	15	1.00000	0.92105	15
JP07	13	1.00000	0.87313	30
JP09	5	0.00000	0.69131	4
JP02	14	0.02778	0.89945	56
Mean	17.333	0.65328	0.88501	35.5

表 2-4、玉山圓柏不同族群之微衛星 DNA 基因歧異度(Number of allele：基因座平均 allele 數目；Ho：異型合子觀測值；He：異型合子期望值；allelic range：allele 範圍)

Locus	Number of allele	Ho	He	allelic range
合歡山				
JC31	10	1	0.93464	19
JC35	10	1	0.9281	21
JP03	8	1	0.9085	12
JP07	4	1	0.66013	13
JP09	3	0	0.60131	2
JP02	4	0	0.75817	3
Mean	6.5	0.66667	0.79847	11.667
玉山				
JC31	2	1	1	16
JC35	2	1	1	23
JP03	2	1	1	8
JP07	2	1	1	12
JP09	-	-	-	-
JP02	-	-	-	-
Mean	2	1	1	14.75
秀姑巒山				
JC31	5	1	0.93333	16
JC35	3	1	0.73333	21
JP03	3	1	0.73333	8
JP07	4	1	0.86667	11
JP09	2	0	0.53333	1
JP02	3	0	0.8	2
Mean	3.333	0.66667	0.76667	9.833

續表 2-4

	Locus	Number of allele	Ho	He	allelic range
塔關山	JC31	9	1	0.93939	20
	JC35	10	0.71429	0.94505	26
	JP03	5	1	0.76923	9
	JP07	6	1	0.8022	13
	JP09	3	0	0.48352	2
	JP02	4	0	0.74725	3
	Mean	6.167	0.61905	0.78111	12.167
三叉山	JC31	9	1	0.92308	19
	JC35	9	0.85714	0.9011	26
	JP03	7	1	0.88333	10
	JP07	7	1	0.84314	16
	JP09	3	0	0.62745	2
	JP02	4	0.16667	0.74242	14
	Mean	6.5	0.67063	0.82009	14.5
向陽山	JC31	7	1	0.96429	17
	JC35	7	1	0.96429	25
	JP03	4	1	0.78571	8
	JP07	4	1	0.75	14
	JP09	2	0	0.42857	2
	JP02	3	0	0.71429	10
	Mean	4.5	0.66667	0.76786	12.667
嘉明湖	JC31	8	1	0.92424	17
	JC35	7	0.83333	0.83333	26
	JP03	5	1	0.83333	8
	JP07	3	1	0.62121	13
	JP09	4	0	0.78788	4
	JP02	4	0	0.78788	8
	Mean	5.167	0.63889	0.79798	12.667

表 2-5、玉山圓柏之分子變方分析(AMOVA)，*表示 $P < 0.05$

	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage variation
玉山圓柏	Among populations	6	34.741	0.33043*	12.19
	Within populations	71	161.27	2.37964	87.81
	Total	77	196.011	2.71007	
玉山圓柏四群	Among groups	3	13.008	0.13762*	10.82
	Among populations within groups	3	5.145	0.06718	5.28
	Within populaitons	71	75.732	1.06665*	83.89
	Total	77			

表 2-6、玉山圓柏族群之遺傳分化指數(F_{ST})

	合歡山	玉山	秀姑巒山	塔關山	三叉山	向陽山	嘉明湖
合歡山	0						
玉山	0.12887	0					
秀姑巒山	0.15369	0.30061	0				
塔關山	0.08153	0.28488	0.09552	0			
三叉山	0.12140	0.00868	0.21234	0.12367	0		
向陽山	0.24250	0.12272	0.25733	0.17969	0.06986	0	
嘉明湖	0.23230	0.09774	0.1767	0.20758	0.06586	0.03979	0

圖 2-1、玉山圓柏之採樣地點

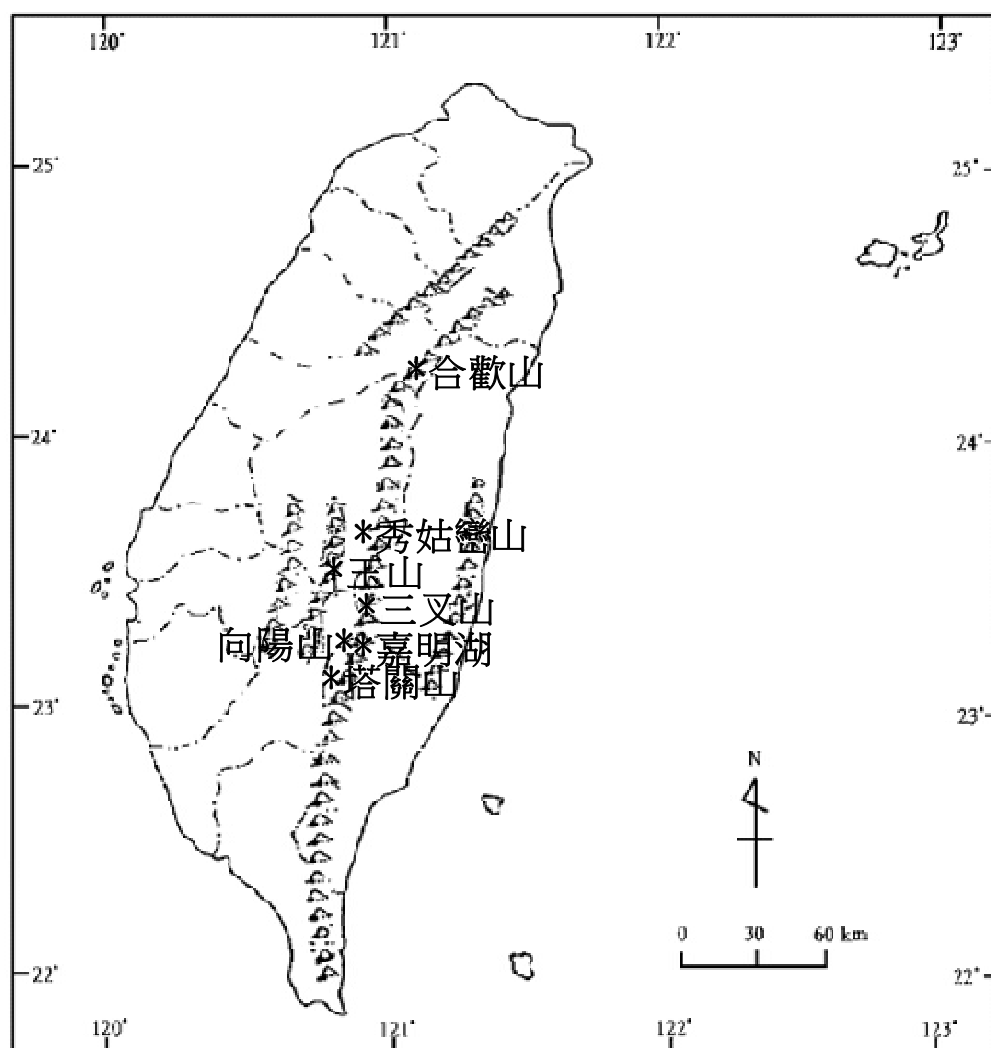


圖 2-2、以遺傳距離建構之玉山圓柏親緣樹狀圖(UPGMA)

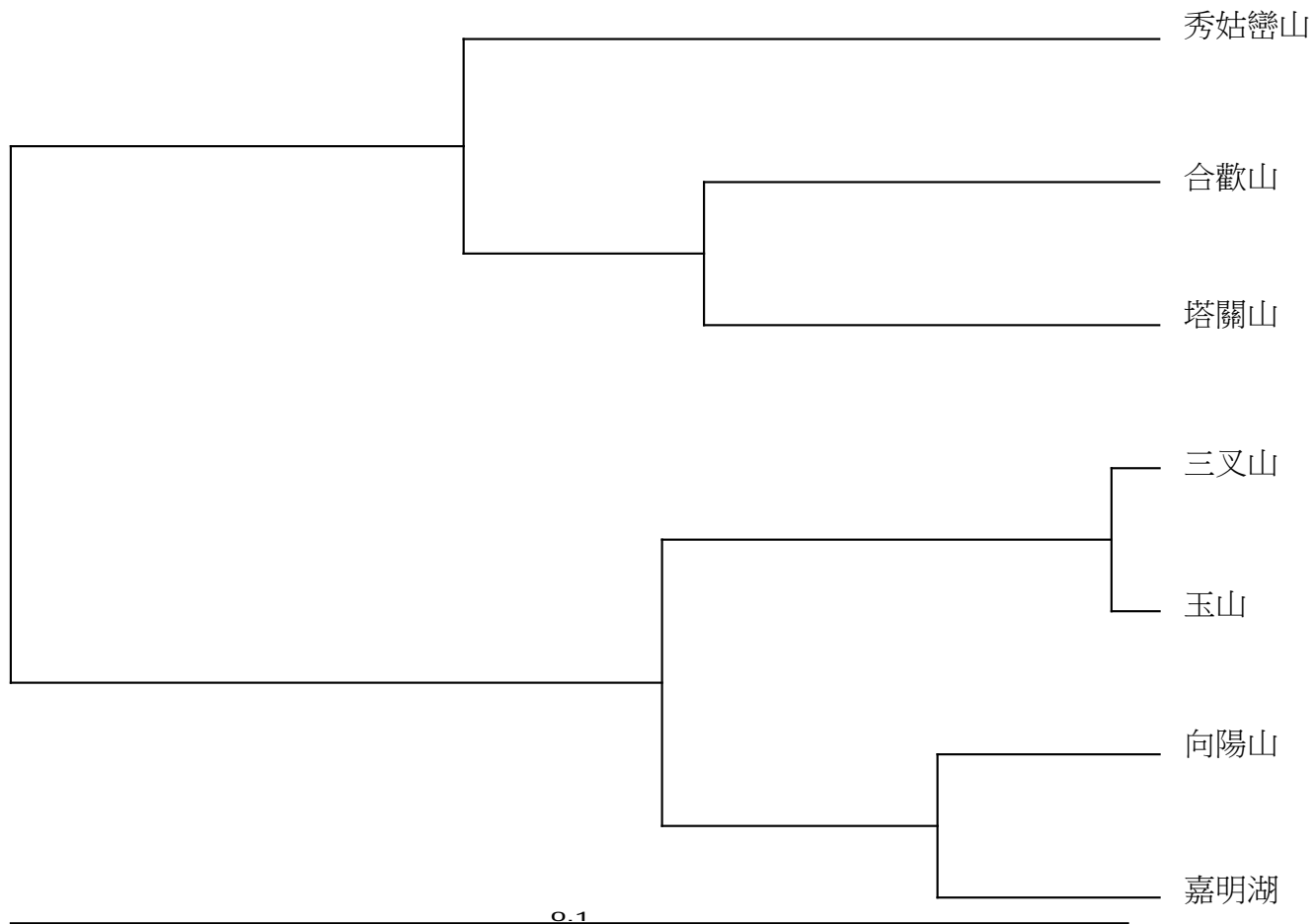
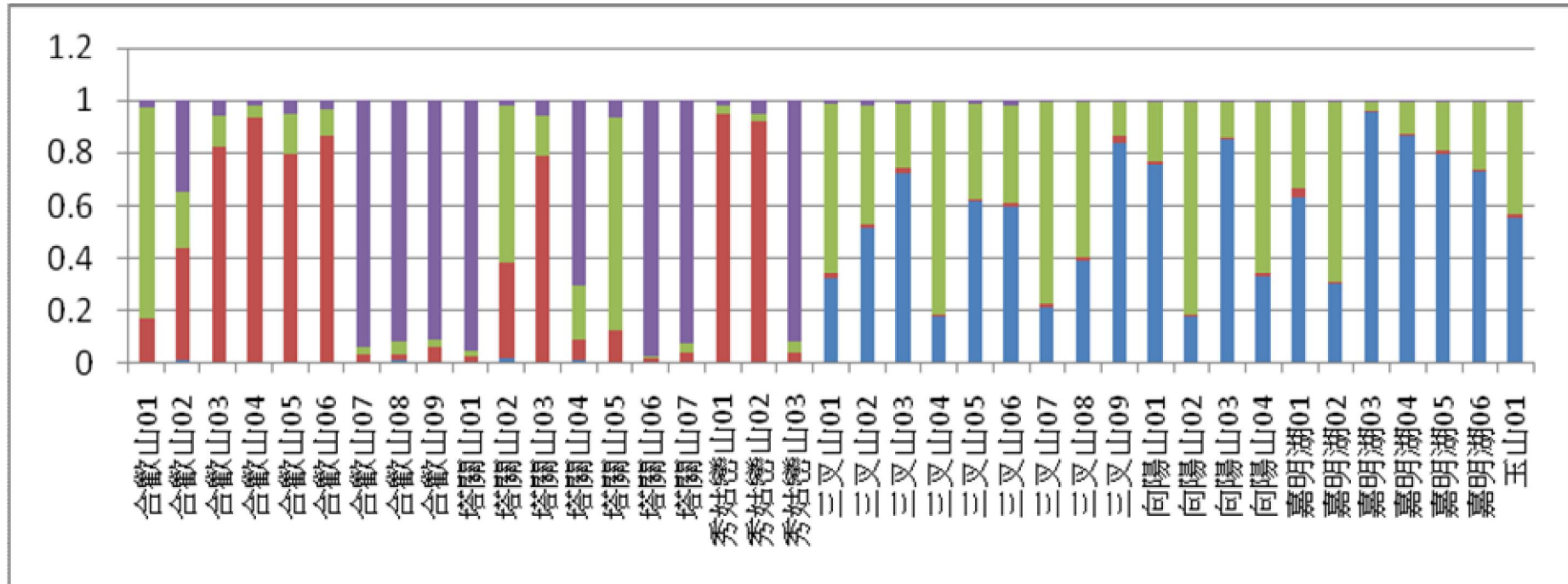


圖 2-3、以 STRUCTURE 軟體進行玉山圓柏之組成分析(K=4)



第三章 結論與建議

第一節 結論

總結三年計劃之結論，紅檜族群在歷經過去伐木事件後仍然保有較高之遺傳歧異度，其中新中橫地區之族群受到早期伐木影響造成遺傳歧異度較低，南橫地區之族群因受到國家公園及檜谷保護區的設立而保有較高遺傳歧異度。紅豆杉族群在野外極為稀少且不易見，加上其遺傳歧異度較低顯示紅豆杉迫切地需要進行保育及復育。鐵杉族群雖然 Heterozygosity 較低，但由於數量龐大、基因型獨特，推測在維持棲地完整性的情形下將不會影響其物種延續。石松族群各種間的遺傳結構皆有變異，因此除了稀少以及特有種外，即使是廣泛分布的物種也應該選擇性的保存，以保持玉山地區石松族群的多樣性。

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(昆陽及南橫埡口)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。

玉山圓柏在親緣樹狀圖上可分成四群，分別為秀姑巒山群，合歡山及塔關山群，三叉山及玉山群，向陽山及嘉明湖群，其中四群間可能因缺乏基因交流或適應當地微棲地而彼此分化，然而大部分變異仍保留在族群內個體間，加上玉山圓柏其野外族群並未受到嚴重威脅，因此未來在執行有限經費之保育計畫時，針對具有獨特基因型之族群，如合歡山、秀姑巒山、三叉山或向陽山等族群將能有效保留物種之遺傳歧異度。

高變異性之微衛星分子指紋，可用於不同種類及族群間之鑑定，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，提供國家公園代表性物種之分子指紋，如塔塔加大鐵杉、紅豆杉等之分子指紋鑑定，不僅提供學術上的應用，更能教育民眾物種保育之觀念，未來將有助於民眾了解國家公園設立之宗旨：以有效的經營管理及保育措施，維護國家公園之自然環境及生物之多樣性，要能夠有效經營管理自然資源及提供物種合適之保育策略，建議須廣泛且持續地進行物種之研究。因此，為了更加完整地建構專屬於國家公園之分子指紋資料庫，持續進行物種及個體之分子指紋建構為必要措施，

微衛星 DNA 技術的改進將有助於快速及精準建立物種之分子指紋資料庫，不同於過往 Polyacrylamide gel，現今全自動 DNA 定序分析儀器於分子指紋的應用，藉由引子加上螢光標記，於短時間內快速及準確鑑定族群

之微衛星 DNA 長度，將可精準地重建物種及族群之演化歷史，因此未來分子技術持續的改進，對於微衛星 DNA 分子指紋的建構將有極大幫助。

第二節 建議

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。

紅檜雖然曾受到過去砍伐影響而降低老樹數量及分布，但仍保有較高之遺傳歧異度顯示針對紅檜進行保育時，主要針對於維持野外族群數量及棲地完整性以降低外在因素干擾；紅豆杉在野外族群數量稀少且遺傳歧異度較低，建議進行族群調查，以進行原地復育及種源保存等工作；鐵杉族群均保有獨特之基因型，建議維持棲地完整性以減少人為破壞，將有助於鐵杉族群的延續。

由於石松族群的種間具有遺傳變異，因此應該進一步去了解其泛分布物種，以及稀少和特有種之族群遺傳結構研究。以了解後續關於玉山地區石松族群之保育策略如何制定。

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。

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。

玉山圓柏之野外族群保有較高之遺傳多樣性，在無遭遇人為嚴重干擾情況下將能維持其遺傳歧異度，然而全球氣候變遷的影響將可能對其分布造成影響，建議持續針對於玉山圓柏之族群數量、分布及遺傳歧異度進行調查，以了解氣候變遷對於玉山圓柏之影響。

附錄一

期初審核意見	處理情形
研究內容具體可行，並對園區珍貴植物基因庫建立與提供經營管理之參考有極大助益。	遵照辦理。
請將此三年所進行物種之研究（至少裸子植物方面）作一資料庫相關或連續比對之建立。	遵照辦理，所有實驗所得資料將完全提供給管理處作為資料庫建立時使用。
玉山園柏有喬木及灌木二型，是否均進行採樣與比對，宜補充說明之。另請就其族群遺傳分化作一探討，並請提供個體辨識。	喬木及灌木均進行採樣，本研究僅就灌木型進行比較。
本案請再將前二年資料作一整合，提出保育措施與解說內容，以利經營管理後續推廣。	遵照辦理，參閱第三章第一節 結論。
本案如獲得標，請依上述評審意見，修正計畫建議書。	遵照辦理。

附錄二

期中審查	處理情形
<p>本計畫依既定目標進行，具有前瞻及可行性。資料庫之建立及遺傳多樣性熱點的確立，可更有助於今後國家公園經營管理與保育之推動，特別是因應全球暖化之效應，採取必要的對策與措施。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>有關表一玉山圓柏學名請修正。除有玉山圓柏之採樣點及樣本數之外，建議增加採樣地點圖及 GPS 座標點，以瞭解玉山圓柏的空間分布。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>請於期末報告增加清水圓柏、刺柏以及玉山圓柏之代表圖，以利說明三物種之特徵。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>有關於微衛星 DNA 之分析及資料庫之建立，玉山國家公園立年已完成 12 種，包括：玉山杜鵑及森氏杜鵑；黃苑、玉山黃苑及台東黃苑和關山千里光；紅檜、鐵杉、紅豆杉、石松屬、玉山阿拉伯芥與台灣雲杉等物種，如何能進行資料推廣，實屬重要課題，若能將研究成</p>	<p>遵照辦理，參閱第三章 第一節 結論。</p>

<p>果轉化為玉山國家公園之解說教材，對於經營管理助益頗大，建議在期末報告提出一個解說方向供管理處參考。</p>	
<p>本報告未將評審會議之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>
<p>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>

附錄三

期末審核意見	處理情形
<p>本計畫如期完成，預定目標亦能如列達到預期成果。針對玉山國家公園植物微衛星 DNA 分析，將能廣泛應用於珍貴稀有之資源經營管理，尤其在未來擬定保育策略方針，將有相當貢獻。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>微衛星 DNA 基因座對於未來保育有一定作用，所以對於一些珍稀經濟物種應該都進行記錄，若其記錄依法可加以重罰，對於國家公園的物種保育（防止盜採），必定可以有一定的嚇阻作用。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>玉山圓柏之學名經修正為 <i>Juniperus morrisonicola</i> (Adams et al., 2002)，應於本報告中予以依循訂正，如表 1 的部分，或是說明有其更新見解。</p>	<p>本研究以 Farjon (2005) 之分類處理為依據。</p>
<p>塔關山在地理上接近南部 4 個樣點，在圓柏親緣上卻顯現較近於合歡山樣本。報告中未予說明解釋或進行討論，請補充之。對此相當有趣的發現，是誤差或有特定的機制，值得進一步探究。</p>	<p>推測可能是玉山圓柏進入台灣各棲地後，在演化過程中由於適應當地環境而彼此趨向分化，但不同之族群仍有共祖之多樣性，導致地理距離分隔很遠之族群彼此在遺傳距離上仍相近，未來將持續進行研究以釐清相關原因。</p>

<p>部分樣點之樣本數仍偏低，未來需補強分析，如表 1 的玉山樣點。請補充提供各取樣點的詳細資料，如 GPS、海拔、當地地形、植群分布以及組成等相關生態資料。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>喬木型的玉山圓柏主要分布於雪山翠池及秀姑巒山，而採樣時秀姑巒山的樣本是否包括喬、灌木？換言之，喬木及灌木型其微衛星 DNA 基因座是否有所不同？</p>	<p>本研究僅就灌木型進行比較，未來將持續針對於喬木及灌木型圓柏進行研究。</p>
<p>報告中玉山圓柏在親緣樹狀圖上分成 4 個族群，其間之關係（演化歷史）可以稍加提及。</p>	<p>向陽山及嘉明湖群，其中秀姑巒山群和合歡山及塔關山群相近緣，三叉山及玉山群和向陽山及嘉明湖群近緣。</p>
<p>在保育建議上，根據各樣點資料顯示，似乎以塔關山樣本及秀姑巒山、向陽山的樣本歧異度較低，值得解釋說明。</p>	<p>塔關山族群受限於棲地影響，造成歧異度的降低。</p>
<p>請以一章節總結本計畫三年來工作重點成果，如珍貴稀有紅豆杉、塔塔加大鐵杉之植株分子身分證，並對於實驗室方法和技術有無差異和可改進之處，作一比較說明其優缺點。另對於玉山國家公園的微衛星 DNA 資料庫提供未來規</p>	<p>遵照辦理，參閱第三章 第一節 結論。</p>

<p>劃方向與建置可行性。再者，對於分子指紋未來如何於玉山國家公園推動和應用，請補充說明。</p>	
<p>本報告未將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

- ADAMS, R. P., AND T. DEMEKE. 1993. Systematic Relationships in *Juniperus* Based on Random Amplified Polymorphic Dnas (Rapds). *Taxon* 42: 553-571.
- ADAMS, R. P., C. F. HSIEH, J. MURATA, AND R. N. PANDEY. 2002. Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 231-241.
- AITMAN, T. J., C. M. HEARNE, M. A. MCALEER, AND J. A. TODD. 1991. Mononucleotide Repeats Are an Abundant Source of Length Variants in Mouse Genomic DNA. *Mammalian Genome* 1: 206-210.
- ALLEN, C. D., AND D. D. BRESHEARS. 1998. Drought-induced shift of a forest-woodland ecotone: Rapid landscape response to climate variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14839-14842.
- BECKMANN, J. S., AND J. L. WEBER. 1992. Survey of Human and Rat Microsatellites. *Genomics* 12: 627-631.
- BEYERMANN, B., P. NURNBERG, A. WEIHE, M. MEIXNER, J. T. EPPLER, AND T. BORNER. 1992. Fingerprinting Plant Genomes with Oligonucleotide Probes Specific for Simple Repetitive DNA-Sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 691-694.
- CARDLE, L., L. RAMSAY, D. MILBOURNE, M. MACAULAY, D. MARSHALL, AND R. WAUGH. 2000. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* 156: 847-854.
- CHIANG, T. Y., Y. C. CHIANG, Y. J. CHEN, C. H. CHOU, S. HAVANOND, T. N. HONG, AND S. HUANG. 2001. Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Molecular Ecology* 10: 2697-2710.
- CHIANG, T. Y., AND B. A. SCHAAL. 2006. Phylogeography of plants in Taiwan and the Ryukyu archipelago. *Taxon* 55: 31-41.
- CHIANG, Y. C., K. H. HUNG, B. A. SCHAAL, X. J. GEST, T. W. HSU, AND T. Y. CHIANG. 2006. Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Molecular Ecology* 15: 765-779.
- DOYLE, J. J., AND J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- FARJON, A. 2005. A monograph of Cupressaceae and Sciadopitys. Kew Publishing.
- FELSENSTEIN, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- FRANKEL, O. H., AND M. E. SOULÉ. 1981. Conservation and evolution. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, AND D. A. BRISCOE. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, UK.
- GOLDSTEIN, D. B., AND C. SCHLÖTTERER. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press.
- GRAUR, D., AND W. H. LI. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc. USA.
- HAMRICK, J. L., AND R. W. ALLARD. 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.
- HIKIDA, T., AND H. OTA. 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, K. C., J. P. WANG, X. L. CHEN, AND T. Y. CHIANG. 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Acrossocheilus paradoxus* (Cyprinidae) using PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Conservation Genetics* 5: 113-115.
- JEFFREYS, A. J., V. WILSON, AND S. L. THEIN. 1985. Hypervariable Minisatellite Regions in Human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- JURKA, J., AND C. PETHIYAGODA. 1995. Simple Repetitive DNA-Sequences from Primates - Compilation and Analysis. *Journal of Molecular Evolution* 40: 120-126.
- LAGERCRANTZ, U., AND N. RYMAN. 1990. Genetic-Structure of Norway Spruce (*Picea-Abies*) - Concordance of Morphological and Allozymic Variation. *Evolution* 44: 38-53.
- LAIKRE, L., AND N. RYMAN. 1991. Inbreeding Depression in a Captive Wolf (*Canis-Lupus*) Population. *Conservation Biology* 5: 33-40.
- LI, H. L., AND H. KENG. 1954. Icones gymnospermum formosanarum. *Taiwania* 5: 25-83.
- LI, H. L., AND H. KENG. 1994. Cupressaceae. In Editorial Committee of the Flora of Taiwan [ed.], *Flora of Taiwan*, 591-593.
- MADSEN, T., R. SHINE, M. OLSSON, AND H. WITZELL. 1999. Conservation biology - Restoration of an inbred adder population. *Nature* 402: 34-35.
- MELONI, M., D. PERINI, R. FILIGHEDDU, AND G. BINELLI. 2006. Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Annals of Botany* 97: 299-304.
- MICHALCZYK, I. M., F. SEBASTIANI, A. BUONAMICI, E. CREMER, C. MENGEL, B. ZIEGENHAGEN, AND G. G. VENDRAMIN. 2006. Characterization of highly polymorphic nuclear microsatellite loci in *Juniperus communis* L. *Molecular Ecology Notes* 6: 346-348.
- MORGANTE, M., M. HANAFEY, AND W. POWELL. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30: 194-200.
- MORIN, N. R. 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, N. R. 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, B. R., AND M. T. CLEGG. 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.

- MUELLER, R. C., C. M. SCUDDER, M. E. PORTER, R. T. TROTTER, C. A. GEHRING, AND T. G. WHITHAM. 2005. Differential tree mortality in response to severe drought: evidence for long-term vegetation shifts. *Journal of Ecology* 93: 1085-1093.
- POWELL, W., M. MORGANTE, C. ANDRE, J. W. MCNICOL, G. C. MACHRAY, J. J. DOYLE, S. V. TINGEY, AND J. A. RAFALSKI. 1995a. Hypervariable Microsatellites Provide a General Source of Polymorphic DNA Markers for the Chloroplast Genome. *Current Biology* 5: 1023-1029.
- POWELL, W., M. MORGANTE, R. MCDEVITT, G. G. VENDRAMIN, AND J. A. RAFALSKI. 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, P. H. 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., J. KUFFER, D. ROSSLI, AND L. EXCOFFIER. 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, J. C., AND S. K. HSU. 1997. Geodynamics of the Taiwan arc-arc collision. *Tectonophysics* 274: 221-251.
- SIBUET, J. C., AND S. K. HSU. 2004. How was Taiwan created? *Tectonophysics* 379: 159-181.
- SLATKIN, M. 1987. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural-Populations. *Science* 236: 787-792.
- TOTH, G., Z. GASPARI, AND J. JURKA. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VANDELEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER, AND M. ZABEAU. 1995. Aflp - a New Technique for DNA-Fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- VRIJENHOEK, R. C. 1994. Genetic diversity and fitness in small populations. In V. Loeschcke, J. Tomiuk, and S. K. Jain [eds.], *Conservation Genetics*, 38-53. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- WEBER, J. L. 1990. Informativeness of Human (Dc-Da)N.(Dg-Dt)N Polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- WEISING, K., B. BEYERMANN, J. RAMSER, AND G. KAHL. 1991. Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* 12.
- WESTEMEIER, R. L., J. D. BRAWN, S. A. SIMPSON, T. L. ESKER, R. W. JANSEN, J. W. WALK, E. L. KERSHNER, J. L. BOUZAT, AND K. N. PAIGE. 1998. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science* 282: 1695-1698.
- ZABEAU, M., AND P. VOS. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application EP 053485*.
- ZANONI, T. A. 1978. The American junipers of the section *Sabina* (*Juniperus*, Cupressaceae) - a century later. *Phytologia* 38: 433-454.
- ZHANG, Q., Y. Z. YANG, G. L. WU, D. Y. ZHANG, AND J. Q. LIU. 2008. Isolation and characterization of microsatellite DNA primers in *Juniperus przewalskii* Kom

參考書目

(Cupressaceae). *Conservation Genetics* 9: 767-769.

蘇鴻傑. 1974. 台灣高山地區之香柏群落. 台大實驗林報告 113: 101-113.