

99-03-01

(1214)

PG9903-0287

099—301020200G1—002

玉山國家公園境內愛玉子之保育生物學 研究

Conservation genetics of *Ficus pumila* var.
awkeotsang in Yushan National Park

受委託者：國家公園學會

研究主持人：蔣鎮宇 教授

協同主持人：許再文 副研究員

研究助理：黃啟俊 博士班研究生

玉山國家公園管理處委託研究報告

中華民國 99 年 12 月

目次

表次	III
圖次	V
摘要	VII
英文摘要	IX
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起與背景	1
第二節 研究目的	9
第二章 方法與結果	11
第一節 材料與方法	11
第二節 結果	17
第三節 討論	33
第三章 結論與建議	43
第一節 結論	43
第二節 建議	45
附錄一	47
附錄一	49
參考書目	51

表次

表2-1 愛玉子(*Ficus pumila* var. *awkeotsang*)及薜荔(*Ficus pumila pumila*)之採樣資料。 20

表2-2 愛玉子(*Ficus pumila* var. *awkeotsang*)之微衛星引子資料。 21

表2-3 愛玉子微衛星 DNA 之基因型。NC：楠溪林道族群；OWD：奧萬大族群；FP：薜荔。 23

表2-4 愛玉子及薜荔 DNA 基因歧異度(allele no: 基因座 allele 數目；allele range：allele 範圍；Ho：異型合子平均觀測值；He：異型合子平均期望值；P：Hardy-Weinberg equilibrium 顯著性測試) 26

表2-5 愛玉子楠溪林道(NC)及奧萬大(OWD)族群基因歧異度(allele no.：基因座 allele 數目；allele range：allele 範圍；Ho：異型合子平均觀測值；He：異型合子平均期望值；P：Hardy-Weinberg equilibrium 顯著性測試)。 27

表2-6 愛玉子(FA)族群間(楠溪林道：NC；奧萬大：OWD)及薜荔(FP)間之遺傳分化指數(F_{ST})。*: $P < 0.05$ 。 . . . 28

圖次

圖2-1 愛玉子之採樣地點。 29

圖2-2 以 STRUCTURE 建構愛玉子及薜荔之遺傳組成分
群。A-F 分別代表 $K = 2-7$ 。不同顏色代表不同之遺傳組成。
Y 軸為遺傳組成比例，X 軸依序為 1. 愛玉子楠溪林道族群，
2. 愛玉子奧萬大遊樂區族群，3. 薜荔。 . . . 30

圖2-3 以 STRUCTURE 建構愛玉子及薜荔之 likelihood 值。
A-F : $K = 2-7$ 。 31

圖2-4 以 MIGRATE 建構之愛玉子(FA)族群間(楠溪林道：
NC；奧萬大：OWD)及薜荔(FP)間之基因交流程度(箭頭)
及有效族群數量(圓圈) 。 32

摘要

摘要關鍵詞：分子指紋、保育、微衛星 DNA、愛玉子。

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，愛玉子為台灣特有藤本植物，分布於中低海拔山區之族群由於人為非法盜採，使得野生愛玉族群數量減少，因此本研究主要的目的即在利用微衛星 DNA 建立愛玉子之分子指紋資料庫。

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愛玉子建立分子指紋資料庫以辨別當地和其他地區之差別；並建立其種原資料庫，以利未來進行玉山國家公園境內之族群研究。

三、重要發現

愛玉子及薜荔在多個基因座上均顯著偏離哈溫平衡，可能是在過去遭遇瓶頸效應造成族群數量的減少而成，現今物種及族群間也保有較低之遺傳歧異度，當遺傳歧異度降低常因此降低物種之適存度，面臨環境變遷、棲地改變時，族群容易產生滅絕之危機。愛玉子與薜荔間可能因保有來自於共同祖先之遺傳特徵，使得種間遺傳分化不高，彼此間可能存在著過去基因交流。儘管異型合子觀測值偏低，愛玉子仍保有高度之對偶基因數目(7-24)，顯示愛玉子仍具有多樣之遺傳組

玉山國家公園境內愛玉子之保育生物學研究

成，而族群間遺傳組成也有所不同，推測具有不同來源之個體所造成。

四、主要建議事項

根據本研究結果針對於愛玉子提出下列具體建議，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

愛玉子保有較低之異型合子觀察值，應針對於國家公園境內之愛玉子族群進行保護、避免人為盜採影響其物種生存，為維護其物種存活，維持林相完整、減少人為干擾將有助於維持愛玉子之族群數量，。

長期性建議：

主辦機關：玉山國家公園

現今林道破損，對於人為非法之盜採可能由於成本提高或不易進入等因素影響下進而達到保育之成效，然而楠溪工作站過去為生態研究、觀光遊憩之重點區域，若因道路中斷使得境內學術研究、生態旅遊中止極為可惜，建議可進行重新規劃道路修復及制定園區進入之管制策略，並長期監測愛玉子及鄰近物種之族群數量，並利用分子標記估算其有效族群數量，以了解愛玉子族群之族群數量改變及遺傳結構。

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 *Ficus pumila* var. *pumila* and *Ficus pumila* var. *awkeotsang* were examined. The departures from Hardy-Weinberg equilibrium within populations at most loci are likely associated with the population decline. Low levels of observed heterozygosity were detected within populations of *F. pumila* var. *pumila* and *F. pumila* var. *awkeotsang*. Ancestral polymorphic alleles may prolong the lineage sorting period within species. However, high allele numbers were observed within populations of *F. pumila* var. *awkeotsang*. Multiple origins may attribute to the diverse genetic structure of *F. pumila* var. *awkeotsang*.

Keywords: conservation, fingerprinting, microsatellite DNA, *Ficus pumila* var.

awkeotsang

第一章 緒論

第一節 研究緣起與背景

親緣地理學為生物地理學的分支之一，由 Avise et al.(1987)所提出有關歷史性地理學 (historical biogeography) 的觀念，主要探討物種親緣和地質歷史 (如冰河、高山隆起等) 間的關係，主要受到遷徙 (dispersal) (經由 range expansion 或 jump dispersal 使生物遷徙到原本分離的區域) 和地理隔離事件 (vicariance) (因冰河事件、山脈隆起或河水切割等地質事件使連續分佈的生物產生地理隔離) 造成種間或族群間產生空間上的不連續性分佈(Ronquist, 1997)，和傳統生物地理學最大不同在於親緣地理主要著重於近緣物種 (closed related species) 或種內族群間演化歷史和地質事件間的關係，因此親緣地理學被視為族群遺傳 (又稱為微演化，microevolution) 和種化間的橋樑，利用分子工具瞭解族群遺傳結構和地質歷史事件間的關連。

台灣位於歐亞大陸板塊及太平洋板塊的交接處，約在距今五百萬年前由於歐亞大陸板塊與菲律賓海洋板塊擠壓造成山脈隆起，以每年上升 2.5-4.6 公釐形成現今台灣主要的山脈，是為蓬萊造山運動(Penglai Orogeny, Liu et al., 2000)；在氣候方面，因台灣地處熱帶跟副熱帶交界，加上四面環海，受到海洋季風調節造成全島溫暖且潮濕，以及島上分布許多超過 3000 公尺以上的高山，造成台灣擁有熱帶、副熱帶及溫帶的多樣性氣候類型，

而獨特之地質歷史及氣候造成台灣的植物具有極高之物種多樣性。

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(Chiang and Schaal, 2006)。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)。

由於台灣地質上的特異性，當鄰近大陸物種進入台灣後，不僅保有物種高度的遺傳多樣性，適應新棲地後逐漸累積變異，產生新種或近緣種，此一情形也提供與鄰近大陸近緣物種相互比較的機會，Lu et al. (2001)比較巒大杉(*Cunninghamia konishii* Hayata)及其近緣物種的親緣關係發現特有於台灣島嶼之巒大杉(nucleotide diversity = 0.01181)具有較大陸近緣物種 [*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.] (nucleotide diversity = 0.00741)高

的遺傳歧異度，台灣的巒大杉可能來自於大陸不同族群經由長距離種子傳播進入台灣，使得台灣的族群具有高度異質性，並與大陸族群呈現低度分化($\phi_{ST} = 0.012, P = 0.454$)。比較分布於大陸的黃山松 (*Pinus luchuensis* ssp. *hwangshanensis*)、琉球群島的琉球松 (*Pinus luchuensis* ssp. *luchuensis*)及台灣的二葉松 (*Pinus luchuensis* ssp. *taiwanensis*) 的琉球松複合群 (*Pinus luchuensis* complex)顯示，在葉綠體 DNA 中(*atpB-rbcL* intergenic spacer)島嶼族群相較於大陸的族群較有較高之遺傳歧異度，可能來自於大陸族群多次進入島嶼族群導致島嶼保有較高之異質性，推估這些分類群在親緣樹上呈現旁系群 (paraphyly)可能來自於近代分化所造成。除了與鄰近大陸有曾有高度之基因交流的物種外，有些台灣特有之物種因此保有高度遺傳多樣性，台東蘇鐵(*Cycas taitungensis* Shen et al.)儘管屬於稀有植物，仍因基因重組 (intramolecular recombination) 保有高度遺傳多樣性，台灣柯 [*Lithocarpus formosanus* (Hayata) Hayata] 及柳葉柯 [*Lithocarpus dodonaeifolius* (Hayata) Kudo] 為近代分化，屬於 incomplete lineage sorting 階段，因而保有高度遺傳多樣性。這些結果均顯示台灣的物種因複雜的地質及演化歷史使得具有高度遺傳異質性。

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。

在進行保育工作之前，首先必須要先釐清種間界線，形態多型性之同種分成不同分類群或不同物種全部歸併於同一種，都將造成保育資源管理上的浪費及執行上的困難，並可能因錯誤的認知及不當的保育策略大大地影響物種生存，最後甚至造成物種絕滅的危機。此外，保育單位必須為保有遺傳多樣性及獨特性，以作為有效之保育單位並節省有限保育資源。

分子工具的應用在於研究基因遺傳變異並瞭解物種族群遺傳結構，配合其生物在空間上的分布可重建物種親緣關係及釐清分類地位，物種在其演化歷史過程中，受到地質歷史及物種遷徙機制的影響，造成種間或族群間之遺傳結構的不同，而基因體中之非轉錄區域因較不受天擇所影響及演化速率較快等特性，根據其遺傳結構將可瞭解物種族群間遭受到的演化歷史，分子序列如 DNA、蛋白質等遺傳物質因來自於共同祖先之同源特徵，可較準確重建物種親緣並顯現物種演化歷史 (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 (RFLP)、擴增片段長度多形性 (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 Schlötterer, 1999)，其中最常被利用的分子標記為胞器 DNA、細胞核 DNA 及微衛星 DNA，其中利用微衛星 DNA 建構其分子指紋資料庫將提供物種鑑定及種原之依據。

然而，在冰河時期生物大量移入避難所以及後冰河時期族群的大量擴張等因素影響之下，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，因為台灣植物多為多源群 (polyphyletic) 或側系群 (paraphyletic)，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，另一方面，雖然單一基因的分分子序列的確提供了不少族群及種演化的訊息，但是卻忽略基因體上其他多數的基因座所能提供之遺傳訊息，基於上述理由，如何慎選適用的分子標記作為保育遺傳學之依據為當今重要課題之一。

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，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具有應用價值。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 (Afzal-Rafii and Dodd, 2007)。

愛玉子 [*Ficus pumila* var. *awkeotsang* (Makino) Corner] 隸屬於桑科 (Moraceae) 榕屬 (*Ficus*) 植物，主要分布於海拔 1200-1900 公尺之中低海拔地區，為台灣特有藤本植物，常纏繞於岩石或樹木上 (Liao, 1996)，愛玉子為人熟知的功能即是具有果膠酯酶引發化學作用形成果凍，並有許多相關之生化研究 (Kuo-Huang et al., 2002)。其與薜荔 (*Ficus pumila* L. var. *pumila* L.) 在葉部形態具有些微差異，愛玉葉形大而葉尖銳尖，薜荔則是葉形小而葉尖鈍；在隱花果大小具有明顯差異，愛玉隱花果長寬可達 10 x 5 公分，薜荔隱花果則是 6.5 x 6.5 公分。除了形態上的差異，其生化性質也有所差異，林等人 (1990) 指出愛玉子含有二型的果膠酯酶，而在薜荔則只具有單型之果膠酯酶，顯示愛玉與薜荔不只在形態上，細胞分化方化也有所不同。

愛玉之應用與人為活動息息相關，在飲食方面，早在清朝時期早已得知愛玉之特性，並因其富含果膠質而廣泛應用於飲食方面 (連, 1921)，在園藝方面可依其攀爬特性做為綠籬植物、盆栽等，甚至以其葉、莖及隱花果做為民俗藥用植物，顯現其用途之廣泛。雖已有相關研究單位進行愛玉之

栽培研究，希望能夠將愛玉於低海拔種植並大量生產等目標，儘管如此，其野外族群依然受到人為干擾，其分布之中低海拔山區之族群可能因人為非法盜採嚴重，使得野生愛玉族群數量減少，因此本研究主要的目的即在利用微衛星 DNA 建立愛玉子之分子資料庫，建立玉山國家公園境內愛玉子之分子指紋以嚇阻非法盜採。另一方面，利用遺傳變異的空間分布，進一步探討地理區間及族群間的遺傳分化的程度，並以此推估現今族群間的基因交流程度，根據遺傳歧異度的空間分布鑑定出多樣性的熱點，並依上述分析鑑定出可行的保育單位(conservation units)。

第二節 研究目的

- 一、 設計愛玉子之微衛星 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。
- 二、 估算遺傳距離重建物種親緣，並藉此提出保育經營單位。
- 三、 建構分子指紋資料庫，提供物種鑑定及種原採樣之依據。

第二章 方法與結果

第一節 材料與方法

一、 野外採樣工作

本研究分別針對於分布於南投縣信義鄉楠溪林道及南投縣仁愛鄉奧萬大森林遊樂區之愛玉子進行採樣以每10公尺為最小間距進行族群隨機採樣，每一族群取10-28個樣本，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

1. DNA 萃取

將樣本葉片在液態氮下磨成粉末狀，採用修改自 Doyle and Doyle (1987)所提出的 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)方法將磨碎之植物組織進行 genomic DNA 萃取，並以 DNA marker (吉恩馬克公司)進行定量，以 TE 溶液稀釋為 2ng/ μ l 後，存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱以備用。其步驟如下：

- (1). 取植物葉片約 100 mg 置於研鉢內，加入液態氮研磨至粉末狀，再倒入 50 ml 離心管中以備用。
- (2). 加入 10 ml 預熱於 65 $^{\circ}$ C 之 CTAB 溶液與 40 μ l 0.4% β - mercaptoethanol 將粉末與緩衝液混合均勻，並置於 65 $^{\circ}$ C 水浴中反應 60-90 分鐘，在反應過程中應搖晃離心管數次，使反應完全。
- (3). 將萃取液倒入新的 50 ml 離心管中，加入 10 ml chloroform / isoamyl alcohol (24:1)，上下倒轉多次，充分混合以去除脂質及蛋白質。

- (4). 在室溫下，以 8,000 rpm，離心 10 分鐘，將植物殘渣與脂質、蛋白質，離心至離心管底部。
- (5). 取上清液至一新的 50 ml 離心管。
- (6). 重複(3)至(5)步驟，共兩次。
- (7). 加 10 ml isopropanol 均勻混合後，置於-20°C 冰箱靜置 2 小時（此步驟可放至次日），使 DNA 沉降。
- (8). 在 4°C 下，以 8,000 rpm，離心 10 分鐘後，倒掉上清液，將離心管倒扣於鐵架使 isopropanol 完全揮發。
- (9). 將沉降之 DNA 溶解於 500 μ l TE buffer，並加入 2 μ l RNase，在 37°C 下輕度搖晃約 60 分鐘後，轉置於 1.5 ml 離心管中。
- (10). 加入 500 μ l isopropanol 同(7)，沉降析出 DNA。
- (11). 4°C 下，以 13,000 rpm，離心 10 分鐘，倒掉上清液。
- (12). 加入 500 μ l 70%酒精，輕彈離心管使沉澱物飄起後，再以 13,000 rpm 4°C 下、離心 10 分鐘，將鹽類洗去。去除上清液後，倒置於鐵架上等酒精揮發。
- (13). 加入 200 μ l TE buffer，溶解 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 $^{\circ}$ 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%瓊酯凝膠(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 3.11(Excoffier et al., 2005) 估算族群間及種間的遺傳歧異度；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 and 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 中是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。

5. 族群分化估算

利用 Arlequin 3.11(Excoffier et al., 2005)估算山脈及族群間之族群分化指數(F_{ST})，並比較以單一族群與其他族群之平均分化指數。以 A analysis of molecular variance (AMOVA)進行 10,000 次比較，估算之遺傳變異與族群結構。利用 Mantel test 估算遺傳距離與地理距離間的關聯性，重複 10,000 次數推算彼此關聯性。以 STRUCTURE(Hubisz et al., 2009)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($K=1-3$)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。利用 MIGRATE-N

3.2.1(<http://popgen.sc.fsu.edu/Migrate/Migrate-n.html>)估算族群間之基因交流程度(M)及有效族群數量(theta, θ)，以 Bayesian 方式在 coalescent model 下推估族群間遷徙(Beerli, 2006)，其中 M 為 m/μ (m 為 migrate rate, μ 為 mutation rate)， θ 為 $4 N_e \mu$ 。

第二節 結果

一、野外採樣：

採樣列於表 2-1，分別針對於分布於南投縣信義鄉楠溪林道及南投縣仁愛鄉奧萬大森林遊樂區之愛玉子進行採樣，並以分布於宜蘭縣大同鄉台 7 甲 9K 處之薜荔做為對照進行比較(表 2-1，圖 2-1)，分別取 28、10 及 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。

二、實驗室工作

根據 Bandelj et al. (2007)及 Vignes et al.(2006) 設計之微衛星 DNA 引子(表 2-2)，並進行研究物種之測試。其中 FinsQ5, FinsA1, FCUP016-6, FCUP45-6, FCUP066-7, FCUP068-1 及 FCUP069-6 共 7 組在愛玉子及薜荔中增幅出正確片段，其對偶基因列於表 2-3，其中愛玉子中對偶基因數目(Number of allele)為 9-24 個(平均對偶基因數目為 17.333)，計算異型合子比例時(表 2-4)，平均觀測值(H_o)為 0.364 (0.000-1.000)，平均期望值(H_e)為 0.862 (0.790-0.951)，顯示平均觀測值小於平均期望值，在 FCUP068-1 及 FCUP016-6 觀測值均大於期望值，FinsQ5，FinsA1，FCUP45-6，FCUP066-7 及 FCUP069-6 觀測值小於期望值，顯示不同基因均保有其各自之遺傳歧異度。測試是否符合哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)時，所有基因均顯著偏離($P < 0.05$)。

在對偶基因長度差異上平均為 25.43bp (12-48)。

薛荔中(表 2-4)對偶基因數目(Number of allele)為 2-11 個(平均對偶基因數目為 6.143)，計算異型合子比例時，平均觀測值(H_o)為 0.364 (0.000-1.000)，平均期望值(H_e)為 0.744 (0.400-0.947)，顯示平均觀測值小於平均期望值，在 FCUP068-1 及 FCUP016-6 觀測值均大於期望值，FinsQ5，FinsA1，FCUP45-6，FCUP066-7 及 FCUP069-6 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，測試是否符合哈溫平衡時，除了 FCUP68-1，所有基因均顯著偏離($P < 0.05$)。在對偶基因長度差異上平均為 16.14bp (2-30)。

愛玉子之族群比較方面(表 2-5)，楠溪林道族群之平均觀測值(0.386，0-1.000)均略小於平均期望值(0.857，0.740-0.958)，其中 FCUP068-1 及 FCUP016-6 觀測值均大於期望值，FinsQ5，FinsA1，FCUP45-6，FCUP066-7 及 FCUP069-6 觀測值小於期望值，測試是否符合哈溫平衡時，所有基因均顯著偏離($P < 0.05$)。奧萬大族群之平均觀測值(0.452，0-1.000)均略小於平均期望值(0.713，0.358-0.895)，其中 FCUP068-1 及 FCUP016-6 觀測值均大於期望值，FinsQ5，FinsA1，FCUP45-6，FCUP066-7 及 FCUP069-6 觀測值小於期望值，測試是否符合哈溫平衡時，除了 FCUP68-1、FCUP16-6 及 FinsA1，所有基因均顯著偏離($P < 0.05$)。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。

遺傳分化指數方面(F_{ST})(表 2-6)，愛玉子與薜荔間的遺傳分化指數為 0.079，屬於中度分化，愛玉子種內族群間，楠溪林道族群與奧萬大族群遺傳分化指數為 0.135，屬於中度分化，薜荔與愛玉子楠溪林道族群及奧萬大族群遺傳分化分別為 0.111 及 0.097，屬於中度分化。利用 Arlequin 以 Mantel test 計算遺傳分化與地理距離之關係，結果顯示遺傳距離與地理距離不成顯著性相關($P > 0.05$)。

以 STRUCTURE 分析物種之遺傳組成結果顯示愛玉子之複雜的遺傳組成，測試 $K=2-7$ 時， $K=6$ 時其 likelihood 值最高(圖 2-2，圖 2-3)，顯現其最適之遺傳組成為 $K=6$ ，其中楠溪林道的族群具有較多且獨特之遺傳組成，奧萬大族群相對其遺傳組成較單調，薜荔與愛玉子奧萬大族群具有相似之遺傳組成。

以 MIGRATE 軟體估算族群間基因交流程度(圖 2-4)，結果顯示薜荔族群 (FP) θ 為 9.90， $M_{FP \rightarrow NC}$ 為 4.63， $M_{FP \rightarrow OWD}$ 為 1.27，愛玉子楠溪林道族群(NC) θ 為 9.94， $M_{NC \rightarrow FP}$ 為 8.92， $M_{NC \rightarrow OWD}$ 為 5.44，愛玉子奧萬大族群(OWD) θ 為 9.91， $M_{OWD \rightarrow FP}$ 為 1.53， $M_{OWD \rightarrow NC}$ 為 3.95。

利用 Mantel test 估算愛玉子及薜荔地理距離與遺傳距離之相關性($r = -0.0001$ ， $P = 0.641$)，顯示遺傳變異與地理距離無顯著相關。

玉山國家公園境內愛玉子之保育生物學研究

表2-1 愛玉子(*Ficus pumila* var. *awkeotsang*)及薜荔(*Ficus pumila pumila*)之採樣資料。

物種	採樣點	代號	經緯度	海拔(公尺)	樣本數
<i>Ficus pumila</i> var. <i>awkeotsang</i>					
	南投縣信義鄉楠溪林道	NC	23°27'78.2"N 120°54'41.9"E	1,970	28
	南投縣仁愛鄉奧萬大森林遊樂區	OWD	23°57'11.8"N 121°10'53.6"E	1,270	10
<i>Ficus pumila pumila</i>	宜蘭縣大同鄉台7甲9K	FP	24°38'20.0"N 121°33'20.0"E	274	10

表2-2 愛玉子(*Ficus pumila* var. *awkeotsang*)之微衛星引子資料。

基因座	重複序列	引子序列	片段長度
FinsI12	(TC)5(CT)11	GAACCTTCAACCTCAATCAA CTCCCCTTTCCTAGTCCTTA	144–157
FinsJ10	(TC)11	AGGTGGAATGAGGAGAGAGT AAACATCCTTCTGGACTTG	163–170
FinsK9	(CT)13	ACGCACTTAACCCTTTCAG TTCGAGTCAACGAAACAAA	99–118
FinsM5	(TC)13	ATGAATGGTGAAATCCTGAA CATGGCCTCAACTTAGAAAC	176–182
FinsN1	(TA)2(CA)10(TA)7CATA(TG)2	AGGGCTGAGATAGGTTGATT TAAGTTGGTGTGTGGCATC	150–160
FinsN3	(GA)10	AAAACCTTCTCCTCTGCTATTTT TTTGCTTCTTCTCTGTTTGAC	165
FinsP8	(CA)8	TGAAGAAAACGGAGCTTG CTAAATCTGACGGTTCAAAA	157–160
FinsQ5	(GA)12	CATGTCAGGAGGTGTCTAGG CTCCAAATGGGTATGTCAAG	149–156
FinsQ6	(TG)7AG(TG)5	TTCTCCAATTAAACCTCCAA CATGAAATCACCTTCCTCAT	98–107
FinsT7	(TA)11(TG)16	GAATCTGGAGGTGGAATAAAC AAAGATCGCTCGTCAACC	193–210
FinsU9	(AG)16	CGTGTATTGATGTGTGTGTG TCACCTCCTCCTTCTTTTG	148–156
FinsA1	(CT)12	AATCCCCGTA CT TCACTTG AGA ACTTATTGCACGGACAG	194–222
FinsH5	(AT)5GTAT(GT)11	GACCGTATAGATGATTTGGG CATCCTGTGAACGACACTT	262–272
FCUP008-2	(TG)22	CATACACTTTCATGGAGCACAAA CCCAGATGTTTGGTGAAGG	158–184
FCUP013-7	(GT)6AT(GT)6AT(TG)7	ACACCATGCTTCCATTTGGT CCAGTTTGGTATCGTGTGTG	196–212
FCUP015-3	(TG)18	CCACCGGAGATACTCGACAT TTTGCCGAGTAGAGCTTTGAA	185–204
FCUP016-6	(TG)14	CTTCTGGAATTCAAGCTACGA CGACCAAGCACAAACACAT	162–174

續表 2-2 愛玉子(*Ficus pumila* var. *awkeotsang*)之微衛星引子資料。

基因座	重複序列	引子序列	片段長度
FCUP027-4	(AC)19	AACCTTTTAGTATGCCTTTGGAA TCCACCATCAAATCCTTCTG	202–220
FCUP038-6	(TG)23T(AG)11	CAATGTATCATTTTCATCTCACGAA AGTTCCCATGTTTGGTTACTGA	170–193
FCUP042-6	(AC)9(CA)7CG(CA)7CG(CA)7	TGTCCAATGATAAAGATGAAGAGC TGACTCCAACGACTCCAAA	180–200
FCUP044-6	(AC)13	GCTCGCCTTCTAACATGGA AACTTTCATTCATTGCGGAAA	208–219
FCUP045-6	(AC)16	TTCCAAGGCATATTATGTTGAAA GTCCAAGGCAAATGATGAA	135–151
FCUP048-8	(TAAAA)5	GCCTCGTACAAGTGGACCAT AGAGGCTTACGAGGTTGTGG	215–220
FCUP062-2	(TG)20	AACTTGGCGAGATAAACAACC CACTGACCTCGCTGCATT	120–144
FCUP066-7	(CA)14	CCCTCTCGAAGAAGAAGCA CTACAGGAAATGGGCCTCAA	162–182
FCUP068-1	(AG)14(GAGAGAG)4	GGAATTACCGTCCATGGCTA CGCCACTCTCTCTCTCCACT	178–206
FCUP069-6	(CT)17N23(CTTT)5	CCGGAAACACACAAATTCAA CAAAGCGTCGACTCACTGAA	193–202
FCUP070-2	(AG)15	TTCAACTTCAACCTTCACCAA TTTGTCTAAGGAGGCTTATTGTCA	183–195

表2-3 愛玉子及薜荔微衛星 DNA 之基因型。NC：楠溪林道族群；OWD：奧萬大族群；FP：薜荔。

族群代號	個體代號	FCUP68-1	FCUP16-6	FCUP45-6	FCUP66-7	FCUP69-6	FinQ5	FinA1							
NC	1	198	174	170	150	128	128	170	172	188	182	88	86	114	114
NC	2	192	170	170	146	128	128	?	?	178	178	88	88	126	126
NC	3	190	168	162	142	124	124	168	168	176	176	94	82	126	126
NC	4	188	166	160	140	124	124	160	160	176	176	90	90	?	?
NC	5	192	168	158	138	126	126	164	164	176	176	88	88	120	120
NC	6	190	168	156	136	124	124	162	162	176	176	88	88	116	116
NC	7	188	168	156	136	124	124	162	162	174	174	88	88	120	116
NC	8	188	166	152	134	124	124	162	162	174	174	90	90	?	?
NC	9	186	166	152	132	122	122	162	162	174	174	86	86	?	?
NC	10	188	166	150	132	122	122	162	162	174	174	90	90	120	120
NC	11	186	166	150	130	122	122	160	160	176	176	84	84	122	122
NC	12	184	162	152	132	120	120	160	160	174	174	?	?	?	?
NC	13	182	162	146	128	120	120	160	160	172	172	86	86	138	138
NC	14	180	160	148	128	120	120	162	162	172	172	86	86	122	122
NC	15	180	160	146	128	122	122	160	160	170	170	94	88	?	?
NC	16	182	160	146	127	128	128	162	162	172	172	88	88	?	?
NC	17	180	160	146	128	120	120	160	160	172	172	96	86	?	?
NC	18	178	158	146	128	120	120	162	162	172	172	84	84	136	136

玉山國家公園境內愛玉子之保育生物學研究

續表 2-3 愛玉子微衛星 DNA 之基因型。NC：楠溪林道族群；OWD：奧萬大族群；FP：薛荔。

族群代號	個體代號	FCUP68-1	FCUP16-6	FCUP45-6	FCUP66-7	FCUP69-6	FinQ5	FinA1							
NC	19	176	156	146	128	122	122	162	162	172	172	86	86	124	124
NC	20	174	155	146	128	120	120	162	162	172	172	90	86	130	118
NC	21	176	156	148	130	120	120	164	164	170	170	92	92	122	116
NC	22	172	152	150	130	122	122	164	164	172	172	88	88	122	122
NC	23	170	150	150	130	122	122	166	166	172	172	88	88	?	?
NC	24	178	158	150	132	124	124	172	172	178	178	94	94	122	116
NC	25	184	164	164	145	132	132	168	168	184	184	98	88	?	?
NC	26	180	166	160	142	130	130	166	166	180	180	98	86	?	?
NC	27	188	166	160	138	128	128	162	162	182	182	94	92	128	130
NC	28	186	164	158	136	126	126	162	162	178	178	86	82	?	?
OWD	29	180	162	154	134	126	126	160	160	178	178	84	80	126	118
OWD	30	184	162	150	132	124	124	158	158	178	178	?	?	?	?
OWD	31	186	162	152	132	124	124	158	158	178	178	92	92	?	?
OWD	32	182	162	150	130	124	124	158	158	178	178	86	86	126	118
OWD	33	184	164	150	130	124	124	156	156	178	178	98	91	125	126
OWD	34	180	162	150	130	122	122	158	158	176	176	94	86	?	?
OWD	35	186	164	148	130	122	122	158	158	176	176	86	86	122	118
OWD	36	186	163	149	130	124	124	158	158	174	174	86	86	116	118
OWD	37	184	162	148	128	122	122	158	158	172	172	92	92	?	?
OWD	38	188	166	148	129	122	122	158	158	176	176	86	86	120	120

續表 2-3 愛玉子微衛星 DNA 之基因型。NC：楠溪林道族群；OWD：奧萬大族群；FP：蘇荔。

族群代號	個體代號	FCUP68-1	FCUP16-6	FCUP45-6	FCUP66-7	FCUP69-6	FinQ5	FinA1							
FP	39	188	166	148	129	122	122	156	156	176	176	84	84	120	120
FP	40	184	166	148	130	118	110	158	158	176	176	90	90	120	120
FP	41	186	162	148	130	120	120	156	156	176	176	?	?	?	?
FP	42	188	168	148	130	118	118	156	156	176	176	?	?	118	118
FP	43	186	164	148	130	118	118	158	146	176	176	86	88	118	118
FP	44	180	160	150	130	124	124	156	156	178	178	86	82	?	?
FP	45	184	160	152	130	112	112	156	156	178	178	78	78	118	118
FP	46	180	162	148	130	110	110	158	158	178	178	82	82	118	118
FP	47	178	158	148	130	114	114	160	160	180	180	82	82	118	118
FP	48	180	158	152	132	130	130	154	140	182	182	86	86	118	118

玉山國家公園境內愛玉子之保育生物學研究

表2-4 愛玉子及薜荔 DNA 基因歧異度(allele no : 基因座 allele 數目 ; allele range : allele 範圍 ; Ho :

異型合子平均觀測值 ; He : 異型合子平均期望值 ; P : Hardy-Weinberg equilibrium 顯著性

測試)。

Locus	allele no.	allele range	Ho	He	P
<i>Ficus pumila</i> var. <i>awkeotsang</i>					
FCUP68-1	24	150-198	1	0.951	0
FCUP16-6	23	126-170	1	0.937	0
FCUP45-6	7	120-132	0	0.79	0
FCUP66-7	9	154-170	0.027	0.808	0
FCUP69-6	9	170-188	0.026	0.822	0
FinsQ5	11	70-98	0.333	0.829	0
FinsA1	12	114-138	0.435	0.896	0
mean	13.571		0.403	0.862	
<i>Ficus pumila</i> var. <i>pumila</i>					
FCUP68-1	11	158-188	1	0.947	1
FCUP16-6	6	128-152	1	0.737	0.05
FCUP45-6	8	110-130	0.1	0.9	0
FCUP66-7	6	140-160	0.2	0.705	0
FCUP69-6	4	176-180	0	0.674	0
FinsQ5	6	78-90	0.25	0.842	0
FinsA1	2	118-120	0	0.4	0.02
mean	6.143		0.364	0.744	

表2-5 愛玉子楠溪林道(NC)及奧萬大(OWD)族群基因歧異度(allele no. : 基因座 allele 數目 ; allele

range: allele 範圍; Ho: 異型合子平均觀測值; He: 異型合子平均期望值; P: Hardy-Weinberg

equilibrium 顯著性測試)。

	allele no.	allele range	Ho	He	P
NC					
FCUP68-1	23	150-198	1	0.958	0
FCUP16-6	20	128-170	1	0.941	0
FCUP45-6	7	120-132	0	0.816	0
FCUP66-7	7	158-170	0.037	0.74	0
FCUP69-6	9	170-188	0.035	0.825	0
FinsQ5	9	72-98	0.333	0.821	0
FinsA1	11	114-138	0.294	0.895	0
mean	12.286		0.386	0.857	
OWD					
FCUP68-1	9	162-188	1	0.879	0.708
FCUP16-6	10	126-152	1	0.895	0.242
FCUP45-6	3	122-126	0	0.611	0
FCUP66-7	3	156-160	0	0.358	0
FCUP69-6	4	172-178	0	0.674	0
FinsQ5	7	80-98	0.333	0.725	0
FinsA1	6	116-126	0.833	0.848	0.432
mean	6		0.452	0.713	

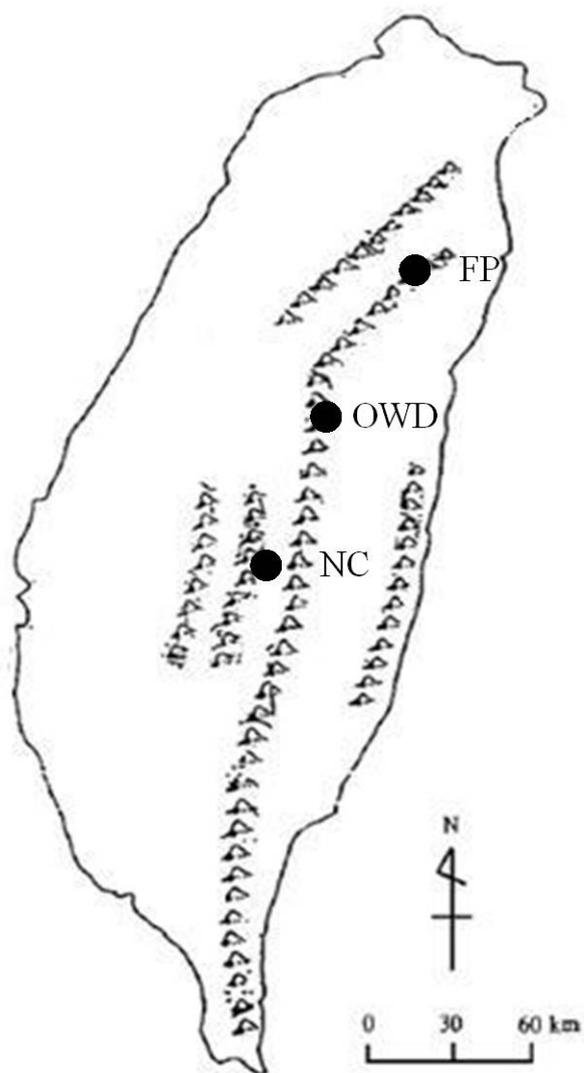
玉山國家公園境內愛玉子之保育生物學研究

表2-6 愛玉子(FA)族群間(楠溪林道：NC；奧萬大：OWD)及薜荔(FP)間之遺傳分化指數(F_{ST})。*：

$P < 0.05$

	FA	NC	OWD	FP
FA	-			
	NC	-		
	OWD	0.135*	-	
FP	0.079*	0.111*	0.097*	-

圖2-1 愛玉子之採樣地點。參考表 2-1 縮寫。



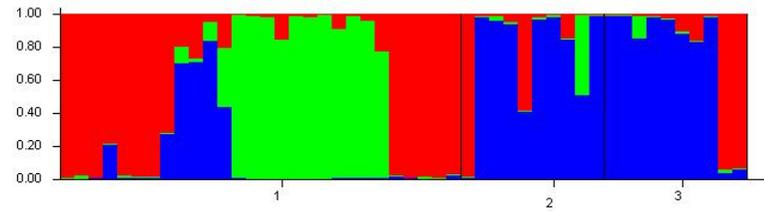
玉山國家公園境內愛玉子之保育生物學研究

圖2-2以 STRUCTURE 建構愛玉子及薜荔之遺傳組成分群。A-F 分別代表 K=2-7。不同顏色代表不同之遺傳組成。Y 軸為遺傳組成比例，X 軸依序為 1. 愛玉子楠溪林道族群，2. 愛玉子奧萬大遊樂區族群，3. 薜荔。

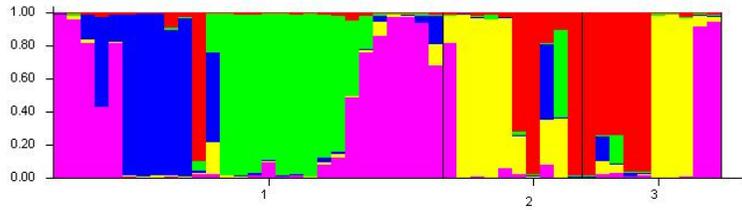
A



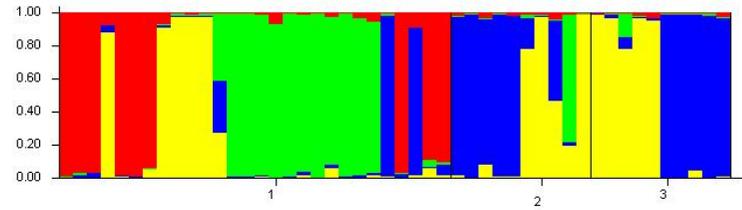
B



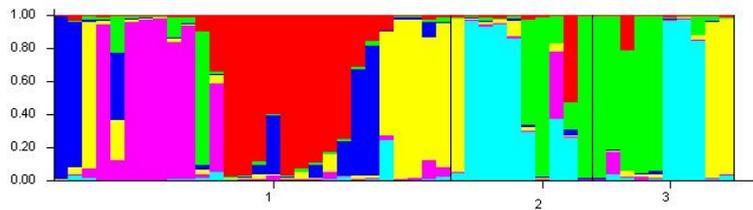
C



D



E



F

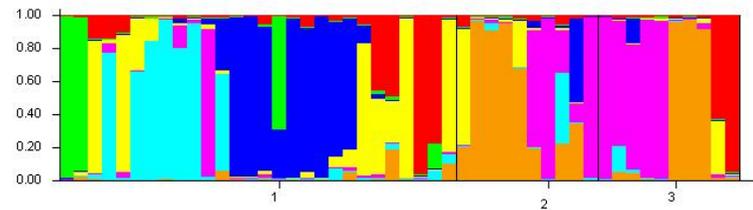


圖2-3以 STRUCTURE 建構愛玉子及薜荔之 likelihood 值。A-F : K = 2-7。

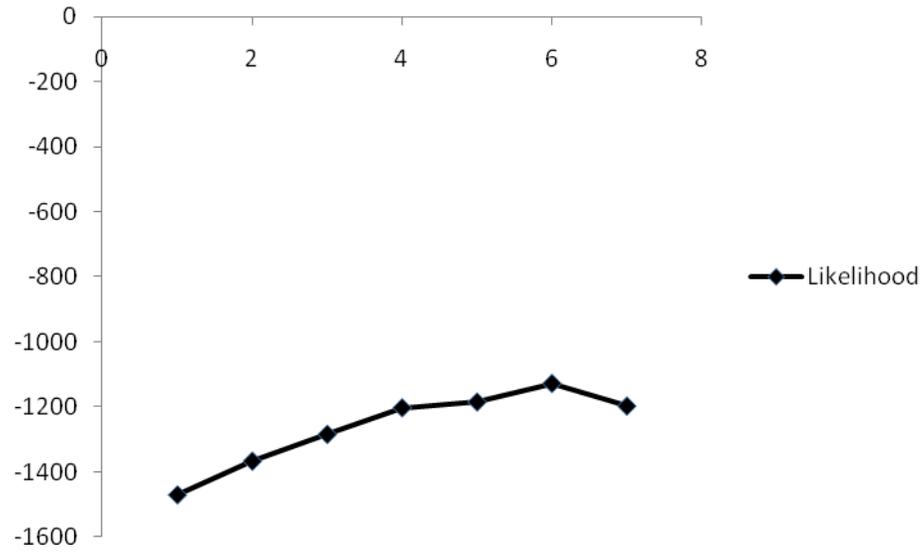
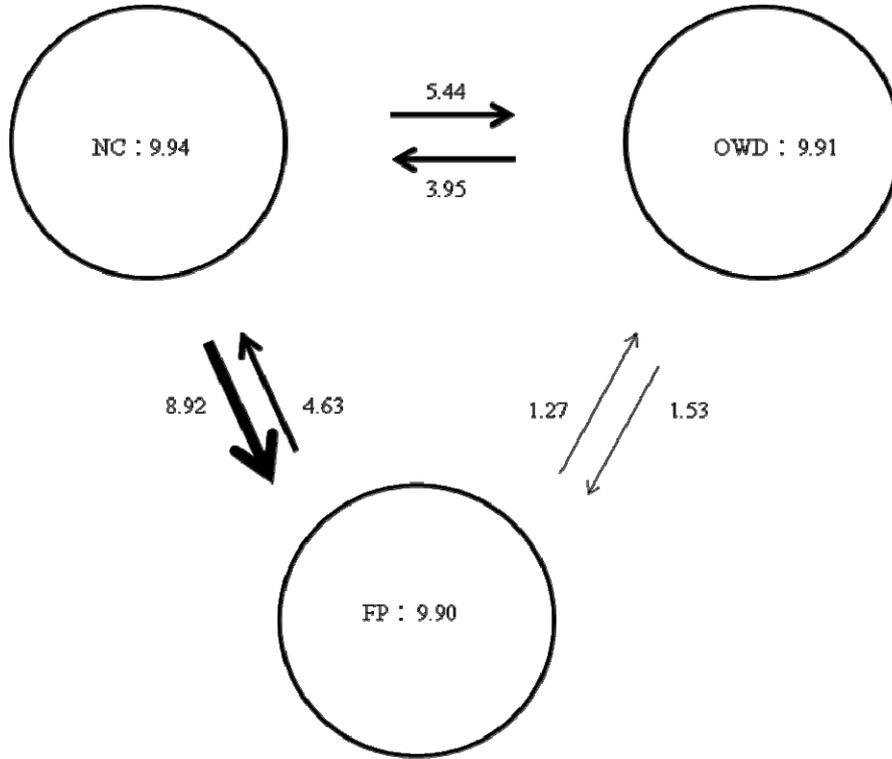


圖2-4以 MIGRATE 建構之愛玉子族群間(楠溪林道：NC；奧萬大：OWD)及薜荔(FP)間之基因交

流程度(箭頭)及有效族群數量(圓圈)。



第三節 討論

一、 愛玉子的遺傳多樣性

本研究利用微衛星 DNA 估算愛玉子之遺傳多樣性(表 2-4)顯示愛玉子的異型合子觀察值為 0.403，低於異型合子期望值(0.862)，薜荔的異型合子觀察值為 0.364，低於異型合子期望值(0.744)，相近於 *Ficus insipid* Willd. ($H_o = 0.249$)(Vignes et al., 2006)，低於 *Ficus carica* L. ($H_o = 0.588$)(Bandelj et al., 2007)，愛玉子之異型合子觀察值偏低，或許可能與有效族群數量較低有關，然而薜荔的異型合子觀察值與愛玉子相似，愛玉子及薜荔在野外族群數量維持穩定，推測兩分類群具有較低之遺傳歧異度可能與愛玉子及薜荔種化後一直維持較低之有效族群數量造成。而 FCUP68-1 及 FCUP16-6 具有較高之異型合子觀察值，但其他五個基因座異型合子觀察值偏低，可能與基因連鎖效應造成。個體間所攜帶之遺傳組成也有所不同，以作為分子指紋之建立。

二、 愛玉子的遺傳結構

愛玉子及薜荔在台灣中低海拔廣泛分布，兩者最大差別在於果實大小，營養器官上僅在葉形上愛玉呈現大而尖，薜荔呈現小而鈍，彼此形態上差異極小，顯示彼此關係相近，本研究利用微衛星 DNA 估算愛玉子及薜荔之遺傳結構(表 2-6)指出愛玉子與薜荔之遺傳分化指數為 0.079，但愛

玉子族群間之遺傳分化指數為 0.135，顯示種間變異小於種內變異，種間分化不明顯，分類群彼此間尚未形成分化可能原因有 incomplete lineage sorting 以及 hybridization (Mirov, 1967)；第一個可能原因為 incomplete lineage sorting，顯示分類群可能屬於近代分化，仍保有來自於共同祖先之遺傳特徵，共有的遺傳特徵因分化時間尚短，遺傳漂變效應影響(genetic drift)不足以顯現兩個分化之分類群，導致分類群在親緣樹狀圖上呈現多系群(polyphyletic group)或旁系群(paraphyletic group)的狀態。第二個可能原因為 hybridization，當分類群因遺傳漂變效應使其形成不同之分類群後，雜交(hybridization)或漸滲雜交(introgression)等經由物種傳播或基因交流交換不同分類群之遺傳組成，進而造成分類群呈現非單系群(monophyletic group)的狀態，這兩種因素均會造成分類群無法形成單系群。在缺乏愛玉子及薜荔之親緣關係研究情況下，無法準確地區分兩種不同演化力量對於愛玉子及薜荔物種分化的影響，由於兩分類群形態相似、遺傳結構差異較低，推測兩個分類群可能屬於近代分化而成，造成兩分類群仍保有來自於共祖之遺傳特徵，然而在缺乏長時間分化情況下，無法顯著呈現兩分類群之分類地位，過去研究顯示在種以下之分類階層如變種或亞種間遺傳組成極為相似(Rieseberg et al., 1987)，Case (1993)處理 *Cypripedium calceolus* var. *pubescens*, *C. calceolus* var. *parviflorum*, and *C. calceolus* var. *planipetalu* 時因變種間差異小於族群間變異而將其合併為同一分類群，本研究中雖然愛

玉子及薜荔間之遺傳變異小於愛玉子族群間變異，未來若能增加更多愛玉子及薜荔族群，進行形態及遺傳組成比較將有助於愛玉子及薜荔之分類地位釐清。此外雜交亦可能造成種間混雜，在愛玉子及薜荔中雜交因素無法排除原因在於榕果小蜂(Fig wasp)，因榕果小蜂為愛玉子及薜荔之主要授粉者，極有可能攜帶不同分類群之花粉進行授粉，導致於愛玉子及薜荔彼此間可能存在的基因交流，然而要能了解這兩種演化力量對於愛玉子及薜荔種化的影響，須針對於愛玉子及薜荔之物候、傳粉者授粉及種間遺傳變異等有更詳細之資料才能釐清。

愛玉子遺傳結構分析中(表 2-6)楠溪林道與奧萬大族群呈現中度分化($F_{ST} = 0.135$)，顯示族群間具有分化，利用 STRUCTURE 軟體分析愛玉子之遺傳組成，當 $K = 6$ 時 likelihood 值最高(圖 2-2，圖 2-3)，顯示愛玉子可能有多樣遺傳組成，其中楠溪林道族群主要包含四種遺傳組成(深藍、粉紅、紅及黃)，奧萬大族群主要包含兩種遺傳組成(淺藍及綠)，不同族群因基因漂變影響隨機喪失遺傳變異將使得族群呈現分化狀態(Lu et al., 2002)，造成族群分化原因可能有 (1) isolation by distance，物種分布範圍取決於其傳播能力，也就是族群間的遺傳分化隨著距離增加而增加(Wright, 1943)，當物種分布範圍越大時，可能受限於物種傳播能力，造成地理距離相近之族群方能產生基因交流，地理距離越遠之族群則無法直接產生基因交流(Kimura, 1953; Kimura and Weiss, 1964; Planes and Fauvelot, 2002)；(2)

vicariance event，物種形成可能因地質事件，如山脈形成、河流貫穿等造成族群分化，使得鄰近之族群因地質事件停止彼此間的基因交流，進而造成分化(Kay, 1990)，本研究利用 Mantel test 估算遺傳距離與地理距離間之關連性顯示兩者並無顯著之關聯($P > 0.05$)，排除 isolation by distance，推測較有可能因 vicariance event 影響造成族群間的分化，利用 STRUCTURE 結果顯示各族群之來自多種遺傳組成($K = 6$)，較採樣之族群數高(表 2-1)，推測為不同族群可能包含來自不同來源之祖先型，造成族群間具有遺傳分化及不同之遺傳組成。

三、 愛玉子的基因交流

MIGRATE 軟體常用於估算種間、族群間之基因交流程度，Scascitelli et al.,(2010)估算 *Helianthus annuus* L，*Helianthus debilis* Nutt. var. *cucumerifolius* (Torr. & Gray) A. Gray 及其雜交種 *Helianthus annuus* ssp. *Texanus* Heiser，利用微衛星 DNA 估算彼此間的基因交流程度，發現 *H. annuus* ssp. *Texanus* 遷入其他兩物種的比例較高，顯示其為兩親本之基因交流橋梁，本研究利用 MIGRATE 軟體估算愛玉子及薜荔彼此物種族群間之基因交流程度(圖 2-3)，結果顯示種間基因交流(1.27-8.92)較種內族群間基因交流程度高(3.95-5.44)，又以薜荔與楠溪林道族群間之基因交流程度

較高，但此地理距離較遠、不易於昆蟲授粉或種子傳播，推測可能是過去之基因交流造成，進而導致種間無高度分化。

四、 愛玉子的保育策略制定

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 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)。一種生活在 south Scandinavia 地區之鷹(*Falco peregrinus*)在 1970 受 DDT 影響造成族群數量大量減少、幾近滅絕，而在 1974 年引入其他地區(northern and southern Scandinavian, Finnish and Scottish)之族群，進而增加其野外族群數量及遺傳歧異度，使得族群數量能在短時間內快速復元，且研究顯示此一引進並無使其原生族群適存度降低，更能使其從過去瓶頸效應影響下快速回復(Frode et al., 2008)。

偏離哈溫平衡原因可能為因瓶頸效應(bottleneck effects)，造成族群數量減少，易受到遺傳漂變(genetic drift)影響，使得族群遺傳歧異度降低，如歐洲野牛 (*Bison bonasus* L.)在二十世紀遭遇極為嚴重之獵殺，造成族群數量嚴重降低，直到 1920 年野外僅存 7 隻個體(Tokarska et al., 2009)，之後進行禁獵及復育使得其族群數量開始大量增加，然而研究顯示其族群之異型合子比例(expected heterozygosity = 0.28)依舊偏低，儘管目前族群數量大量增加，有效族群數量仍偏低($N_e = 7.9-28.4$)，顯示物種一旦遭遇瓶頸效應，即便之後物種數量回復，其有效族群數可能依舊偏低，對於其適存度具有極大影響。愛玉子及薜荔在多個基因座上均顯著偏離哈溫平衡，可能是在過去遭遇瓶頸效應造成族群數量的減少而成，現今物種及族群間也保有較低之遺傳歧異度，當遺傳歧異度降低將可能降低物種之適存度，面臨

環境變遷、棲地改變時，物種族群容易產生滅絕之危機，相對於自然環境改變對於物種的影響，人為干擾對於物種影響範圍相當廣且嚴重，當人為過度開發物種棲息地時，將嚴重影響物種之繁衍。因此針對於國家公園境內之愛玉子族群進行保護、避免人為盜採等干擾影響其物種生存。

楠溪林道因位於玉山國家公園境內，相對於其他相同海拔地區，因人為干擾較低而維持較完整之林相，愛玉子族群數量眾多顯現在降低干擾的情況下有助於其族群數量的穩定，然而在 2009 年莫拉克颱風影響下造成鄰近道路損害、林道中斷，使得採樣困難，須有高底盤四輪傳動之車輛方能進入，沿途多處坍塌、部分路基掏空，車輛約可行進至楠溪工作站後約 12K 即無法通行，顯示當地區域受到颱風影響受創嚴重，可參考八八水災楠溪林道 88 水災災後勘查簡報 (http://www.yshp.gov.tw/tenders_messages.aspx?id=154)，林道損害、中斷等有助於當地物種回復，減少人為干擾以林相自然更新方式恢復其森林組成，此外因林道破損，對於人為非法之盜採可能由於成本提高或不易進入等因素影響下進而達到保育之成效，然而楠溪工作站過去為生態研究、觀光遊憩之重點區域，若因道路中斷使得學術研究、生態旅遊中止極為可惜，建議可進行重新規劃道路修復及制定園區進入之管制策略，並長期監測愛玉子及鄰近物種之族群數量，並利用分子標記估算其有效族群數量，以了解愛玉子族群之族群數量改變及遺傳結構。

針對於愛玉子族群進行保育策略制定時，首要應針對於野生族群數量變動進行了解，評估在現今楠溪林道中斷情形下其野外數量及有效族群之改變，以及周遭林相之變動。以微衛星 DNA 研究結果顯示愛玉子的異型合子觀測值低於期望值，顯示其帶有較低之遺傳歧異度，儘管楠溪林道族群因人為干擾程度較低的情況下能維持其遺傳歧異度，但自然因素如颱風、土石崩塌等均可能影響其族群數量。一旦族群數量減少或遺傳歧異度喪失將造成物種易受環境變動而減少數量，需長時間累積族群數量及遺傳變異方能維持其族群動態之穩定，儘管八八風災破壞楠溪林道周遭之環境，其野外族群仍保有一定之族群數量，在無其他人為外力影響下，愛玉子族群應能維持穩定之族群數量，建議定期進行野外族群數量及遺傳歧異度之評估將有助於了解愛玉子在自然環境下的族群動態。

第三章 結論與建議

第一節 結論

愛玉子及薜荔在多個基因座上均顯著偏離哈溫平衡，可能是在過去遭遇瓶頸效應造成族群數量的減少而成，現今物種及族群間也保有較低之異型合子觀察值，當遺傳歧異度降低將可能降低物種之適存度，面臨環境變遷、棲地改變時，物種族群容易產生滅絕之危機，相對於自然環境改變對於物種的影響，人為干擾對於物種影響範圍相當廣且嚴重，當人為過度開發物種棲息地時，將嚴重影響物種之繁衍。因此針對於國家公園境內之愛玉子族群進行保護、避免人為盜採等干擾影響其物種生存。愛玉子與薜荔間可能因保有來自於共同祖先之遺傳特徵，使得種間無呈現高度分化，彼此間可能存在著基因交流。儘管異型合子觀測值偏低，愛玉子仍保有高度之對偶基因數目(7-24)，顯示愛玉子仍具有多樣之遺傳組成，而族群間遺傳組成也有所不同，推測具有不同來源之個體所造成。

第二節 建議

現今愛玉子族群保有較低之遺傳歧異度，為維護其物種存活，維持林相完整、減少人為干擾將有助於維持愛玉子之族群數量，現今林道破損，對於人為非法之盜採可能由於成本提高或不易進入等因素影響下進而達到保育之成效，然而楠溪工作站過去為生態研究、觀光遊憩之重點區域，若因道路中斷使得境內學術研究、生態旅遊中止極為可惜，建議可進行重新規劃道路修復及制定園區進入之管制策略，並長期監測愛玉子及鄰近物種之族群數量，並利用分子標記估算其有效族群數量，以了解愛玉子族群之族群數量改變及遺傳結構。

過去研究計畫結果顯示不同植物個體間均保有不同之遺傳組成，可作為個體鑑定之分子指紋，在木本植物方面，如紅檜、鐵杉或玉山圓柏等植物因植株較大、個體定位及編號較簡單，建議可製作簡易條碼或指示牌，提供個體分子指紋之資料，以提供解說教育及嚇阻非法盜採等功用。相較之下，愛玉子為蔓性植物，由於植株較小、不易區別不同個體且同一區域中分布廣泛，製作單一個體之分子條碼較不合適，本研究顯示不同族群保有不同之遺傳組成，由不同之遺傳結構可做為區分不同地理區族群之依據，建議可以族群為單位，建立族群間之分子指紋資料庫，建議跨大範圍並針對於台灣不同地區之愛玉子族群進行族群間分子指紋資料庫之建立，以涵蓋愛玉子在台灣之遺傳組成分布。

附錄一、期中審核意見

期中審核意見	處理情形
一、本案目前已經完成 9 組微衛星引子，並測試增幅出正確片段，成果相當良好。	遵照辦理。
二、本案微衛星 DNA 的研究與成果，原則上已經達到學術上之成果，值得肯定。	遵照辦理。
三、應有愛玉子的保育重心（中心）族群之建議，以作為玉山國家公園的未來野生主要族群的保育。	遵照辦理，參閱 P. 43，結論與建議。
四、本案期末成果部分，應可對研究區內之愛玉子遺傳變異進行評估，並應對族群的保育經營提出建議，以供玉管處後續管理及保育之參考依據。	遵照辦理，參閱 P. 43，結論與建議。
五、期中報告僅說明愛玉子分布海拔高度範圍，未有園區愛玉子分布地點，請於期末報告補充園區愛玉子分布地點，並加上採樣點位置圖。	遵照辦理，參閱表 2-1 & 圖 2-1。
六、建議採樣點增加楠溪橋附近數點，以瞭解該區愛玉子狀況。	P. 40，在 2009 年莫拉克颱風影響下造成鄰近道路損害、林道中斷，使得採樣困難，須有高底盤四輪傳動之車輛方能進入，沿途多處坍塌、部分路基掏空，車輛約可行進至楠溪工作站後約 12K 即無法通行，造成採樣之困難。
七、本報告未將評選會議之意見列表納入該報告書之附錄中，建議補充修正之。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。	遵照辦理。

附錄二、期末審核意見

期末審核意見	處理情形
一、特有變種衛星指紋是值得進行，尤其在國家公園範圍內更有一定意義。	遵照辦理。
二、本案有關愛玉子的保育策略及國家公園未來在經營管理方面的建議部分，建議可適度予以補充強化。	遵照辦理，P. 43。
三、對於本國家公園執行相關計畫已有數年，唯其(未來)在國家公園執行保育方面，如何可以更直接、更可行地去有效繼續或進行其未來的工作，不論是已進行過分子指紋的物種或尚未執行的物種或個體，換句話說，有何執行面的建議。	遵照辦理，P. 43。
四、結論與建議部分提到「愛玉子族群遺傳組成複雜」及「現今愛玉子族群保育較低之遺傳歧異度」請補充說明之。	遵照辦理，P. 43。
五、種間與族群間之遺傳問題，請再詳述補充。	遵照辦理，P. 33 第三節 討論。
六、採樣有 28 個樣本，是有多少基因座，宜有說明。	遵照辦理，P. 17 第二節 結果。
七、本報告書有誤繕與錯誤之處，請補正，如：1.英文摘要部分，「 <i>Ficus pumila pumila</i> 」應為「 <i>Ficus pumila</i> var. <i>pumila</i> 」。2.第 2 頁倒數第 1 行「(<i>Cunninghamia lanceolata</i> (Lamb.) Hook.)」改為「[<i>Cunninghamia lanceolata</i> (Lamb.) Hook.]」，而第 3 頁倒數第 7 行、第 6 頁第 5 行亦如同。3.第 17 頁表海拔高度請加上尺度(公尺)。4. 第 36 頁的第 9 行「期有效..」，改為「其有效...」。5.第 37 頁的第 4 行請調整字的間距。6.參考文獻的中文請排在英文文獻之前。	遵照辦理。
八、本報告未將評選會議、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。	遵照辦理。

參考書目

- 林讚標，劉哲政，楊居源，黃瑞祥，李永生，張森永。1990。愛玉與薜荔隱花果形態與其生化特性比較。林業試驗所研究報告季刊 5：37-43。
- 連雅堂。1921。愛玉子 臺灣通史，農業誌，臺灣銀行經濟研究室編印。1962。4670。
- 八八水災楠溪林道 88 水災災後勘查簡報
http://www.ysnp.gov.tw/tenders_messages.aspx?id=154
- AFZAL-RAFII, Z., AND R. S. DODD. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Molecular Ecology* 16: 723-736.
- AVISE, J. C., J. ARNOLD, R. M. BALL, E. BERMINGHAM JR., T. LAMB, J. E. NEIGEL, C. A. REEB, AND N. C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- BANDELJ, D., B. JAVORNIK, AND J. JAKSE. 2007. Development of microsatellite markers in the common fig, *Ficus carica* L. *Molecular Ecology Notes* 7: 1311-1314.
- BEERLI, P. 2006. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22: 341-345.
- CASE, M. A. 1993. High levels of allozyme variation within *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) and low levels of divergence among its varieties. *Systematic Botany* 18: 663-677.
- CHIANG, T. Y., AND B. A. SCHAAL. 2006. Phylogeography of plants in Taiwan and the Ryukyu archipelago. *Taxon* 55: 31-41.
- 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.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47-50.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, AND D. A. BRISCOE. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, UK.
- FRODE, J., M. NESJE, L. BACHMANN, AND J. T. LIFJELD. 2008. Significant genetic admixture after reintroduction of peregrine falcon (*Falco peregrinus*) in Southern Scandinavia. *conservation genetics* 9: 581-591.

- GOLDSTEIN, D. B., AND C. SCHLÖTTERER. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. *Oxford University Press, Oxford*.
- GRAUR, D., AND W. H. LI. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution 2nd. *Sinauer Associates, 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., The Symposium on the Phylogeny, Biogeography and Conservation of Fauna and Flora of East Region, , 11-18. National Taiwan Normal University, Taipei, Taiwan.
- HUBISZ, M. J., D. FALUSH, M. STEPHENS, AND J. K. PRITCHARD. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332.
- KAY, E. A. 1990. Cypraeidae of the Indo-Pacific - Cenozoic Fossil History and Biogeography. *Bulletin of Marine Science* 47: 23-34.
- KIMURA, M. 1953. "Stepping stone" model of population. *Annual Report National Institute of Genetics, Japan* 3.
- KIMURA, M., AND G. H. WIEISS. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561-571.
- KUO-HUANG, L. L., T. B. YEN, AND S. C. CHEN. 2002. Formation of calcium oxalate and calcium carbonate depositions in the leaves of *Ficus pumila* L. var. *awkeotsang* (Makino) Corner. *Taiwania* 47: 1-10.
- LAIKRE, L., AND N. RYMAN. 1991. Inbreeding Depression in a Captive Wolf (Canis-Lupus) Population. *Conservation Biology* 5: 33-40.
- LIAO, J. C. 1996. Moraceae. In Editorial Committee of the Flora of Taiwan [ed.], *Flora of Taiwan*, 136-188.
- LIU, T. K., Y. G. CHEN, W. S. CHEN, AND S. H. JIANG. 2000. Rates of cooling and denudation of the Early Penglai Orogeny, Taiwan, as assessed by fission-track constraints. *Tectonophysics* 320: 69-82.
- LU, S. Y., C. I. PENG, Y. P. CHENG, K. H. HONG, AND T. Y. CHIANG. 2001. Chloroplast DNA phylogeography of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae), an endemic conifer of Taiwan. *Genome* 44: 797-807.
- LU, S. Y., K. H. HONG, S. L. LIU, Y. P. CHENG, W. L. WU, AND T. Y. CHIANG. 2002. Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization. *Journal of Plant Research* 115: 203-216.

- MADSEN, T., R. SHINE, M. OLSSON, AND H. WITZELL. 1999. Conservation biology - Restoration of an inbred adder population. *Nature* 402: 34-35.
- MIROV, N. T. 1967. The Genus Pinus. The Ronald Press, New York.
- 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.
- PLANES, S., AND C. FAUVELOT. 2002. Isolation by distance and vicariance drive genetic structure of a coral reef fish in the Pacific Ocean. *Evolution* 56: 378-399.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RIESEBERG, L. H., P. M. PETERSON, D. E. SOLTIS, AND C. R. ANNABLE. 1987. Genetic divergence and isozyme number variation among four varieties of *Allium douglasii* (Alliaceae). *American Journal of Botany* 74: 1614-1624.
- RONQUIST, F. 1997. Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46: 193-201.
- SCASCITELLI, M., K. D. WHITNEY, R. A. RANDELL, M. KING, C. A. BUERKLE, AND L. H. RIESEBERG. 2010. Genome scan of hybridizing sunflowers from Texas (*Helianthus annuus* and *H. debilis*) reveals asymmetric patterns of introgression and small islands of genomic differentiation. *Molecular Ecology* 19: 521-541.
- 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.
- TOKARSKA, M., A. KAWALKO, J. M. WOJCIK, AND C. PERTOLDI. 2009. Genetic variability in the European bison (*Bison bonasus*) population from Bialowieza forest over 50 years. *Biological Journal of the Linnean Society* 97: 801-809.
- VIGNES, H., M. HOSSAERT-MCKEY, D. BEAUNE, D. FEVRE, M. C. ANSTETT, R. M. BORGES, F. KJELLBERG, AND M. H. CHEVALLIER. 2006. Development and characterization of microsatellite markers for a monoecious *Ficus* species, *Ficus insipida*, and cross-species amplification among different sections of *Ficus*. *Molecular Ecology Notes* 6: 792-795.
- 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.
- 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.

WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.