

中文摘要

台灣五葉松 (*Pinus morrisonicola* Hayata) 為台灣特有的針葉樹種。本研究利用 RAPD 分子標誌來估算台灣五葉松天然族群之遺傳變異及遺傳結構，以 10 個隨機引子分析 169 個樣本，其中包括華山松與台灣二葉松兩個近源物種。台灣五葉松平均族群遺傳歧異度 (H_s) 為 0.20，AMOVA 分析得到 F_{st} 值為 0.146，說明台灣五葉松族群有適度的分化現象。在族群遺傳結構方面，AMOVA 分析顯示出遺傳歧異度主要是存在族群內，而非族群間，族群間遺傳歧異度佔總遺傳歧異度的比例為 14.61 %。

分析台灣五葉松北、中、南地區共十一個族群，所得之遺傳距離樹狀圖顯示出族群的群叢現象與地理位置有關聯性存在，主要可劃分成兩個類群，惠蓀林場、秀巒、谷關與大坑頭崙山、南橫、多納、鳳崗山、扇平族群之間的遺傳距離近，劃為第一類群。第二類群為三峽五寮尖、石碇皇帝殿及筆架山族群。

在 AFLP 部分，四對引子組合共獲得 119 個標誌，只有 9 個多型性標誌，根據這些多型性標誌估算台灣五葉松九個天然族群之平均歧異度 (H_s) 為 0.088。台灣五葉松族群歧異度低，表示其基因組的相似度高，許多引子組合無法獲得多型性的 AFLP 標誌，如果能使用更多的引子組合做篩選，或許能有機會找到更大量的多型性。

Abstract

Pinus morrisonicola Hayata. is a eudenic specie of conifers in Taiwan. Present study was to estimate the genetic variance and genetic structure of this specie's natural populations using RAPD markers. To analyze the diversity among 163 plants of *P. morrisonicola*, 10 random primers were used to obtain RAPD markers. The mean populations diversity values of *P. morrisonicola* was 0.20. The F_{st} values observed using AMOVA was 0.146. The values for *P. morriisonicola* indicated moderate differentiation between populations. In other words, the levels of genetic variability found in the nine populations of *P. morrisonicola* were considerable and most of the genetic variation was found between individuals within populations, rather than among populations. The component among population accounted for 14.94% of the genetic variation, according to AMOVA. According to the tree of genetic distance, the plants were clustered into two groups. The correlations were seen between clustering results and gengraphical locations. Group one includes Hui- Sun Forest Farm, Xiu- Luan, Gu- Guan, Da- Keng, Nan- Heng, Duo-Na, Shan-Ping and Feng-Gang-Shan. There was the closest distance between these populations. Group two include Wu- Liao- Jian, Huang- Di- Dian and Bi- Jia- Shan.

目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
目錄	III
表目錄	V
圖目錄	VI
第一章 前言	1
第二章 前人研究	4
2.1 松屬植物之起源與分佈	4
2.2 台灣五葉松之形態與起源	5
2.3 遺傳變異 (genetic variation)	6
2.4 估算遺傳變異之 DNA 分子標誌	8
2.4.1 遺傳標誌之類型	8
2.4.2 常用之 DNA 分子標誌	8
2.5 RAPD 與 AFLP 在松屬植物遺傳變異之研究	11
第三章 材料與方法	16

3.1	植物材料.....	16
3.2	基因組 DNA 萃取.....	22
3.3	DNA 品質檢定及定量	22
3.4	RAPD (Radom Amplified Polymorphic DNA).....	23
3.1.1	逢機引子篩選.....	23
3.1.2	基因組核酸的複製.....	23
3.5	AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	24
3.5.1	限制酵素試切.....	24
3.5.2	前擴增反應(Pre-selective amplification)	25
3.5.3	選擇性擴增反應(Selective Amplication)	25
3.5.4	電泳.....	26
3.6	遺傳歧異度分析	26
3.7	AMOVA 分析.....	28
第四章	結果.....	30
4.1	RAPD 分子標誌.....	30
4.1.1	引子篩選與條帶生成.....	30

4.1.2 台灣五葉松與近緣物種之遺傳距離分析	30
4.1.3 台灣五葉松之遺傳歧異度分析	31
4.1.4 歧異度與族群分佈緯度之關係	33
4.1.5 AMOVA 分析	33
4.2 AFLP 分子標誌	33
4.2.1 引子篩選與條帶生成	33
4.2.2 台灣五葉松之遺傳歧異度分析	34
第五章 討論	46
第六章 結論	53
參考文獻	55
附錄	62

表目錄

表 3.1 台灣五葉松、華山松、台灣二葉松之採集地點、行政區域、 海拔、經緯度資料及 RAPD、AFLP 參試樣本數	17
表 3.2 RAPD 分析使用之引子資料.....	29
表 3.3 AFLP 分析使用之引子組合.....	29
表 4.1 RAPD 分析所用之逢機引子與擴增條帶數、多型性條帶數與 多型性比例.....	35
表 4.2 台灣五葉松、華山松、台灣二葉松共十三個族群依 Nei's unbiased (1978) distance 運算結果	36
表 4.3 台灣五葉松九個天然族群的 Nei's unbiased (1978) distance 運 算結果及兩兩族群間的地理距離	37
表 4.4 台灣五葉松九個天然族群樣本依 Nei's unbiased heterozygosity 估算每個引子在各個族群所偵測到的歧異度、族群內的歧異度、族群 平均歧異度與 151 個樣本的總歧異度.....	38
表 4.5 以 RAPD 分析台灣五葉松九個天然族群之歧異度值與緯度資 料.....	39
表 4.6 利用 75 個 RAPD 標誌對九個台灣五葉松族群共 151 個單株 進行 AMOVA 分析.....	39
表 4.7 AFLP 分析所用之引子組合與擴增條帶數、多型性條帶數與 多型性比例.....	40

圖目錄

圖 2.1	松屬植物分佈遍及歐洲、北美洲、中美洲、亞洲.....	4
圖 2.2	RAPD 反應之模式.....	14
圖 2.3	AFLP 反應之模式圖.....	15
圖 3.1	台灣五葉松天然族群採集點.....	18
圖 3.2	台灣五葉松 (<i>Pinus morrisonicola</i>)	19
圖 3.3	華山松 (<i>Pinus armandi</i>)	20
圖 3.4	台灣二葉松 (<i>Pinus taiwanensis</i>)	21
圖 4.1	台灣五葉松、華山松與台灣二葉松族群樣本依 Nei's unbiased distance 運算，利用 UPGMA 進行群叢分析之樹狀圖.....	41
圖 4.2	台灣五葉松、華山松及台灣二葉松族群樣本 PCO 分析，依前二個主成分繪製平面圖.....	42
圖 4.3	十一個台灣五葉松族群樣本依 Nei's unbiased distance 運算，利用 UPGMA 進行群叢分析之樹狀圖.....	43
圖 4.4	十一個台灣五葉松族群樣本 PCO 分析，依前二個主成分繪製平面圖.....	44
圖 4.5	台灣五葉松兩兩族群間之遺傳距離與地理距離之關係圖...	45
圖 4.6	九個台灣五葉松族群之歧異度值與緯度之曲線圖.....	45

第一章 前言

台灣五葉松 (*Pinus morrisonicola* Hayata) 為台灣特有的針葉樹種，在分類上歸屬松科 (Pinaceae) 松屬 (*Pinus*) 之軟木松類 (*Strobus*)，針葉五根一束，種子有翅。天然分佈於北、中、南海拔 300- 2300 公尺之山區，多生長於峰崖峭壁之上，蒼勁挺拔，長年蔥鬱 (劉等，1994)。

自古以來，中國人視松樹為長壽、吉祥、堅毅不饒的象徵，其樹姿岡巒蒼勁，被廣泛使用於庭園景觀及盆栽觀賞上，除觀賞價值外，松樹也是藥用植物，根據神農本草經記載：「松葉藥效，促進毛髮生長，定五臟、止饑、延壽，以水及麵飲服之或搗屑丸服，可治惡疾」。台灣民間療法常使用台灣五葉松針葉加檸檬及蜂蜜製成果汁飲用，國外許多研究已經證明松樹具有抗氧化、清除自由基、抑制腫瘤細胞轉移、調節免疫系統的功能，近幾年國內也以台灣五葉松進行相關研究 (盧，2001；徐，2001；黃，2001)，結果顯示其確實具有多種藥性，開發價值高。

台灣原生松樹僅有四種，包括台灣五葉松、華山松、馬尾松及台灣二葉松，而現存五葉松類的族群數量較少，尤其在低海拔山區因生長環境條件佳，受到闊葉樹競爭的結果已很難見到台灣五葉松的蹤影，松樹喜生長於向陽坡地，耐乾瘠土壤，在鬱閉的森林中難有天然更新，台灣五葉松不具萌蘖能力，需完全靠種子進行繁衍及更新，但其毬果無延遲開裂 (serotiny) 的現象，種子成熟後隨即飄散，因此種子易遭星鴉、松鴉啄食或台灣獼猴剝食，多數種子在飄散之前即被吃食 (梁，1998)，這令其繁衍備受阻礙。

長久以來，由於人類對木材的需求，或為了獲得土地以供農業、工業及都市建設之需，對森林進行大面積伐採，過度開發利用的結果

使得許多樹種之生存繁衍受到嚴重的威脅，根據最近的調查顯示，全球 600 個針葉樹種中超過半數都面臨絕滅的危機 (Newton *et al.* 1999)，這令人觸目驚心的統計也讓許多森林樹種逐漸成為保育上關心的焦點，進而推動了遺傳變異研究的快速發展。針對物種層次而言，種內遺傳變異的程度及分配情形決定了物種生存的機會，此為物種極重要之演化潛能 (Holsinger *et al.* 1991)，物種的遺傳歧異度會直接影響其適應環境變遷的能力及永續生存的可能性，而遺傳變異的估算可作為保育策略擬定之重要依據 (Moritz & Faith, 1998)。

在分子技術還未發展之前，有關遺傳歧異度方面之研究僅能從個體間表現型的差異來識別，隨著科技不斷進步，遂發展出一系列的分子標誌技術，這些方法有助於遺傳變異之估算。過去 30 年來同功酵素標誌 (Isozyme) 是常被使用的研究工具，近年來則發展出能夠直接偵測 DNA 變異之分子技術，根據個體間基因型、DNA 序列層次上的差異來估算遺傳變異。DNA 分析的範圍不僅限於譯碼區，亦可觀察到非譯碼區的變異，由 DNA 變異中可判斷出突變的差異，如點突變、插入、缺失或重組 (Wagner, 1992)。

當一個基因座存在兩個以上的對偶基因者，即表示此基因具有多型性 (polymorphic)。族群內所有的基因構成一個基因池 (gene pool)，長久以來，族群遺傳學家致力研究基因池中的遺傳變異，如果基因池中存在愈多具有多型性的基因，也就表示此族群有比較高的遺傳多樣性，這是物種維持永續生存，適應外在環境變動的重要資本，就人類觀點而言，自然界物種的遺傳多樣性潛藏了無限醫藥、農業、畜產等價值。為了維持物種遺傳的多樣性，對自然界中族群遺傳變異勢必要有所瞭解。分子技術已經提供了快速而準確的方法，選擇適合的技術則可獲得許多有用的資訊，並進一步作為其他相關研究之依據。

本研究主要利用 RAPD 與 AFLP 兩種 DNA 分子標誌來估算台灣五葉松天然族群之遺傳變異及遺傳結構，由於台灣五葉松的遺傳學相關研究之闕如，所以選用不需任何序列資料的分子標誌技術，目的是針對台灣五葉松進行初步的遺傳歧異度偵測，期能對台灣本土松樹有所瞭解，建立基本的遺傳資料以供將來天然林經營、保育策略擬定或人工種植栽培之參考依據。

第二章 前人研究

2.1 松屬植物之起源與分佈

松屬植物 (*Pinus*) 廣泛地分佈在北半球陸地 (如圖 2.1), 緯度範圍介於北緯 15°與北緯 66°間, 涵蓋了溫帶、冷溫帶、亞熱帶及熱帶四大氣候類型, 種類多達百種, 是松科 (*Pinaceae*) 裡最大的一屬 (Farjon, 1996)。根據 Millar (1998) 研究推斷松樹最早起源於中生代 (Mesozoic) 初期, 當時曾有個盤古大陸存在, 現代地球上所分布的大陸在那個時候都是相連的, 在侏儸紀 (Jurassic) 時盤古大陸開始分裂向四方移動。由現今松樹廣泛分佈在北半球的情形推測, 當時分佈於中緯度地區之松樹在盤古大陸分裂時也跟著往東、西方移動。松樹為二倍體物種 ($2n=24$), 根據化石證據推測在白堊紀時 (約一億三千六百萬年前), 松屬已經分化為兩個亞屬, 第一類為 *Strobus*, 稱軟木松類或單維管束亞屬; 第二類為 *Pinus*, 稱硬木松類或複維管束亞屬 (Axelrod, 1986; Klaus, 1989; Millar, 1993; Miller, 1977)

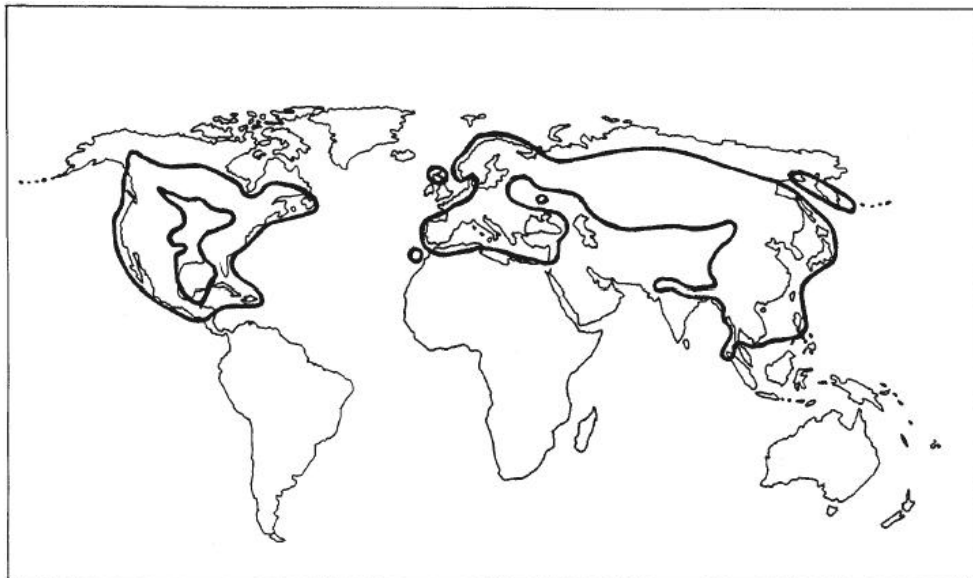


圖 2.1 松屬植物(*Pinus*)分佈遍及歐洲、北美洲、中美洲、亞洲粗黑線標示其分佈的區域 (取自 Farjon, 1996)。

2.2 台灣五葉松之形態與起源

台灣五葉松 (*Pinus morrisonicola* Hayata) 為台灣特有的針葉樹種，在分類上歸屬松科，松屬之軟木松類，針葉五根一束，葉長 6-8 公分；橫斷面為三角形，有二個樹脂溝；樹皮呈灰褐色，幼木樹皮光滑，在樹齡屆二十二年後開始出現龜甲狀之裂紋；雌雄同株；毬果卵狀橢圓形，可達 10 公分長，徑約 4 公分；種子具長翅。天然分佈於北、中、南海拔 300 - 2300 公尺之山區，成熟木的高度約 15 - 25 公尺，胸徑 120 公分，多生長於峰崖峭壁之上（劉等，1994）。

台灣約二十到四十萬年前與大陸分離，從第四紀的冰河期後，又數度間歇性的與大陸相連，冰河期造成台灣與大陸間形成陸橋，歐亞大陸的各種溫帶、寒帶動植物則可經由陸橋南移而到達台灣，隨著冰河消退，大多數生物若不是隨著北移，留在台灣者也因氣候因素而往高處遷移。Tsukada 學者（1967）曾以台灣中部的地質層內花粉化石，研究台灣在更新世（Pleistocene）冰河期時之植物變遷史，在更新世初期（約六萬年前）有許多北方物種與松樹出現在台灣山區，如鐵杉、台灣冷杉、台灣雲杉、台灣五葉松、華山松等，當時氣溫可能較今下降 5 - 9 度。根據花粉證據顯示，台灣五葉松在當時的數量非常多，四萬年前因氣溫逐漸回暖，針葉樹遂移往高海拔地區，直到一萬年前冰河撤退，冷溫帶植物族群日益退縮、消失，暖溫帶植物進而取代之。

早期台灣五葉松被認為與日本產的日本白松 (*P. parviflora*) 為同種，後來日本植物學家早田文藏 (Hayata) 以其間相異點甚多而定為獨立種，而產於中國大陸之五葉松類如紅松 (*P. koraiensis*)、偃松 (*P. pumila*)、海南五針松 (*P. fenzeliana*)、華山松 (*P. armandi*) 就形態而言與本種皆無極相近之關係，台灣植物學家柳椹認為這或許是台

灣五葉松分化較早之故（柳，1966）。近期 Liston 等人（1999）利用核糖體 DNA 的 ITS 序列來探討松屬物種之種系發生學（Phylogenetics），結果指出日本白松與中國大陸的華南五針松（*P. kwangtungensis*）之間的親源關係很近，同屬 *Strobi* 小組（subsection），與 *Cembrae* 小組的偃松關係較遠。Wang 等人（1999）利用葉綠體 DNA 的 *rbcL*、*matK* 序列來研究歐亞大陸松樹之親源關係，顯示了紅松、偃松、華山松與日本白松之間的親源關係很近，雖然台灣五葉松並不在研究項目內，但仍可從這些結果中獲得一些有用的資訊。

2.3 遺傳變異（genetic variation）

遺傳變異主要是來自於基因組（genome）裡的突變（mutation），藉著有性繁殖不斷擴展，最後通常以族群內、族群間的遺傳變異來陳述之（Silvertown & Doust, 1993）。林木具有很長的生活史，因此突變累積的速度會遠較其他生物快速（Ledig, 1988）。針對物種層次而言，種內遺傳變異的程度及分配情形決定了物種生存的機會，此為物種極為重要之演化潛能（evolutionary potential），這會直接影響其適應環境變遷的能力及永續生存的可能性。

DNA 複製是相當精確的，但偶爾仍會有錯誤發生，這些錯誤可經細胞分裂由母細胞傳承至子細胞，如果是發生在胚細胞，藉由配子遺傳至後代並成為基因座多型性與遺傳變異的來源。DNA 複製過程中發生的錯誤即為突變，DNA 序列的改變來自於點突變、一段鹼基對（base pairs）的缺失、插入、倒轉或轉移子（transposon）的移動等等。此外，同源染色體間的互換（crossing-over）雖不屬於突變範疇，但亦是造成族群內遺傳變異之影響因子（Silvertown & Doust, 1993；Hoelzel & Dover, 1991）。

在真核生物中，基因組（genome）由譯碼區（coding region）之顯子（exon）及非譯碼區（non-coding region）之隱子（intron）共同組成，非譯碼區內的 DNA 序列雖然被轉錄成 RNA，但並不被轉譯成蛋白質。無論顯子或隱子，兩者皆有可能發生突變，當突變發生在譯碼區上的基因時，基因表現則直接受到影響，然而非譯碼區上的突變仍有可能間接影響基因表現（Brooker, 1999）。非譯碼區的突變基因功能的表現影響較小，對生物生存的影響也小，因此其突變的結果較易被保留下來。一般而言，隱子之突變率遠大於顯子之突變率（Wang *et al.* 1999）。

除了突變以外，遺傳變異與族群的遺傳結構也會受到天擇（selection）、基因流傳（gene flow）、遺傳漂變（genetic drift）及交配體系（mating system）的影響。當不同的族群處於不同的環境時，天擇的作用能使族群保有不同的基因，以便適應自處環境，這可能會導致族群產生分化。而基因流傳卻是防止族群分化的力量，當天擇促使某族群適應地區性的環境時，基因流傳能將利於其他環境特性的基因帶到族群當中（Slatkin, 1987），在基因流傳與天擇同時作用下，有利的基因可快速的散佈至族群間。基因漂變則指對偶基因頻率隨著時間或空間而發生隨機取樣的變化，基因漂變對於小族群的影響非常大，基因型會逐漸趨於同質，最後可能固定一基因，其他對偶基因則遺失。在交配系統方面，異交物種（outbreeding species）通常比自交物種（inbreeding species）維持較高的族群內遺傳變異（Schoen & Brown, 1991）。

2.4 估算遺傳變異之 DNA 分子標誌

早期遺傳變異分析多使用型態上具特殊性之外表型、蛋白質或二次代謝物作為識別的依據，這些經遺傳因子所表現之各類特徵即可被視為遺傳標誌 (genetic marker)，透露出基因型 (genotype) 攜帶之訊息 (Schaal *et al.* 1998)。近年來由於分子技術之發展，分析 DNA 序列的差異性成為辨識個體及族群特徵之有力工具 (Wagner, 1992)。以下會分別描述遺傳標誌的類型及幾種常用之 DNA 分子標誌技術。

2.4.1 遺傳標誌之類型

DNA 分子標誌的特性各不相同，主要的類型包括：顯性標誌 (dominant marker)，這種分子標誌僅可以辨識標誌出現與否 (present or absent)，無法進一步確認同源對偶基因 (homologous alleles) 的異同，即顯性標誌不能夠分辨基因型為 AA 或 Aa；共顯性標誌 (co-dominant marker) 則相對於顯性標誌，其可確認同源對偶基因是屬同型接合體 (AA) 或異型接合體 (Aa)，因此它可用以估算對偶基因頻率 (Mueller & Wolfenbarger, 1999)。多基因座標誌 (multilocus marker)，這類分子標誌可同時篩檢基因組上多數基因座所獲得之標誌，RAPD (Random amplified polymorphic DNA)、AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 所得到的遺傳標誌屬之；單基因座標誌 (single-locus marker)，通常只篩檢基因組上單一基因座所獲得之標誌，RFLP (Restriction fragment length polymorphism)、SSRs (simple sequence repeats or microsatellites) 所得到的遺傳標誌屬之。

2.4.2 常用之 DNA 分子標誌

1.4.2.1 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

RFLP 主要利用限制酵素 (restriction enzyme) 來切割 DNA。限制酵素具有切割雙股 DNA 的活性，能夠辨識一段特定核酸序列並予以切割，產生各種大小的 DNA 片段。由於不同生物個體其染色體上限制酵素切位的數目與位置不同，在限制酵素切割後產生的限制片段會有差異，與此 DNA 片段做雜合 (hybridization)，經自動顯影 (autoradiography) 則可在 X 光底片上看到不同分子量之 DNA 片段，可檢定個體間的遺傳變異 (Newton *et al.* 1999)，RFLP 屬於共顯性標誌，可由 DNA 層次分辨同型結合或異型結合，但需事先建立資料庫，且大多需要使用放射性物質標定的探針，操作費時。

2.4.2.2 SSRs (simple sequence repeats or microsatellites)

SSRs 主要利用微衛星 (短 DNA 片段) 重複的現象來偵測遺傳差異性。在細胞核或胞器之基因組中可以發現一小段核酸序列 (大約 2~6 bases) (例如：CAT) 以頭接尾的方式 (tandem) 不斷地重複出現 (...CATCATCAT...)，重複次數在個體間呈現高度變異。設計與微衛星兩側序列互補的引子，進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction)，再以高解析力之電泳分離微衛星擴增之 PCR 產物 (Tautz, 1989)。其靈敏度高，可獲得許多高度變異之共顯性標誌但需設計出足夠的微衛星引子以供偵測，每個物種適合其基因組序列的引子各異。

2.4.2.3 RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

RAPD 是以 PCR 為基礎的應用方法，所採用的引子 (primer) 通常較短，因此在基因組之 DNA 上可以找到許多互補接合點，經由聚合酵素在相鄰而方向相對之引子接合點間作用，合成 RAPD 產物，由於引子為隨機設計，故複製之 DNA 長度、序列不可預期，當基因組 DNA 中與引子互補的序列愈多時，產生的多型性片段也愈多 (如

圖 2.2) 而多型性產生的原因是由於參試樣本間，引子接合位置上的 DNA 序列有差異，或是兩引子接合點之間的序列有缺失 (deletion)、插入 (insertion) 的情形發生 (Berg *et al.* 1994)，因此獲得不同數量、長度的擴增產物，此多型性的表現可作為遺傳標誌，用來偵測參試樣本間基因組 DNA 並了解其遺傳變異 (Willams *et al.* 1990)。一般而言，高複雜度 (complexity) 的基因組較容易與逢機引子產生互補接合點，反之，低複雜度的基因組則與引子產生互補接合點的機會相對減少，對一個已知複雜度 C (bp) 的基因組而言，能夠與 n -mer 的引子鏈合產生條帶的理論數(b)為： $b = (2000 \times 4^{2n}) \times C$ (Willams *et al.* 1993)。基因組愈大並不表示絕對有愈高的複雜度，因為複雜度的大小尚取決於基因數的多寡及 DNA 的重複性 (repetitive DNA)，當基因組的中度重複性序列 (middle repetitive sequence) 及高度重複性序列 (highly repetitive sequence) 所佔的比例愈高時，基因組的複雜度會愈低。

RAPD 之優點是不需事先得知序列資料，僅需少量 DNA，且逢機偵測基因組內之譯碼區及非譯碼區，範圍遍達整個基因組，但實驗的再現性較低，為了使擴增產物能具有高度的再現性，需給予適當且一致的反應條件，以便獲得較準確可信的結果 (Weising *et al.* 1995)。

2.4.2.4 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

AFLP 主要利用 PCR 反應擴增限制片段 (如圖 2.3) 其步驟有三：(1) 以兩種限制酵素 (例如 *EcoRI* 及 *MseI*) 對基因組之 DNA 進行切割，隨後在這些 DNA 片段的兩端接上一段核酸序列 (稱作 adaptors)；(2) 選擇性擴增限制片段；(3) 電泳分析這些擴增 DNA 片段。adaptors 由一段核心序列及限制酵素專一序列所組成，引子則由三個

部分組成，包括一段核心序列、一段酵素專一序列，再加上 1~3 個可任意變動的含氮鹼基。經由設計之引子使 PCR 反應進行選擇性擴增限制片段 adaptors 及限制酵素切位提供 PCR 反應時引子可配對的互補序列，藉由引子的延伸，進行選擇性擴增限制片段（restriction fragments），惟有引子鏈合上限制片段兩端區域時才有擴增片段產生。被擴增的限制片段先經變性處理（denature）成為單股狀態後進行電泳分離，大量的多型性片段可同時觀察分析之。值得注意的是，基因組的複雜度（genome complexity）決定了擴增片段的數量（Cervera *et al.* 2000）。一般而言，擴增片段的數目與基因組大小兩者間呈線性關係，但有部分高等植物的基因組含有大量的重複性序列，因此會產生多拷貝數的限制片段，這類基因組大小與擴增片段的數目則不具線性關係，通常僅產生少量的 AFLP 片段，但重複的片段會造成強烈的條帶訊號（Vos *et al.* 1995）。

AFLP 優點為不需事先得知序列資料，任何生物之 DNA 皆可產生 AFLP 標誌，藉由 PCR 反應同時擴增大量限制片段，偵測範圍遍達整個基因組，再現性高，且可用自動化設備辨識 AFLP 標誌，但費用較昂貴，且需有高純度 DNA 材料，不可夾帶任何抑制限制酵素作用及 PCR 反應的物質（Mueller *et al.* 1999）。

2.5 RAPD 與 AFLP 在松屬植物遺傳變異之研究

Mosseler 等人（1992）利用 RAPD 研究赤松(*Pinus resinosa*)族群的遺傳歧異度，將紐芬蘭島上的赤松族群與廣泛分布於北美大陸上的族群作比較，共使用 69 個隨機引子，結果皆產生大量的單型性條帶，證實赤松的遺傳變異非常低，且生長於紐芬蘭島與北美兩地之赤松族群並無顯著的差異性。他們推測赤松的低遺傳變異可能是過去冰河期造成遺傳瓶頸（genetic bottleneck）影響的結果，大量族群南遷的

現象導致遺傳瓶頸效應更為顯著，當冰河消退後（8000-12000 年前）紐芬蘭島遂與北美大陸隔離，在小族群中長期近交的情形也是促使赤松族群喪失遺傳變異的原因，北美大陸上的赤松在冰河期後雖有逐漸增加族群數量，並累積突變，但結果證實赤松仍未恢復其遺傳歧異度。根據 Nei (1975) 估計，一物種至少需花一百萬年以上的時間才能夠藉著突變與增加族群數目來恢復其遺傳歧異度。後來，DeVerno & Mosseler (1997) 使用他種聚合酵素 (AmpliTaq Stoffel fragment DNA polymerase) 與高解析度的瓊脂凝膠進行電泳，共篩選 600 個引子，結果有 51 個引子可產生穩定且明顯的條帶，但僅引子 UBC9 可獲得紐芬蘭島族群之特有條帶，片段大小為 1000 bp。

卵果松 (*Pinus oocarpa*) 在墨西哥及南美的分佈很廣，但長年來因木材大量被砍伐利用，加上森林火災與人為開墾，造成族群數量的下降，天然族群的大小及遺傳結構都發生改變。Díaz 等人 (2001) 遂利用 RAPD 與 AFLP 分析尼加拉瓜卵果松族群的遺傳變異，在 RAPD 方面使用 12 個引子共獲得 131 個條帶，其中有 72 條為多型性，10 個族群的平均遺傳歧異度 (H_s) 為 0.358。在 AFLP 方面使用 4 對引子組合，共獲得 392 個條帶，其中 162 條為多型性，10 個族群的平均遺傳歧異度 (H_s) 為 0.342，兩種分析都顯示出大部分的變異是存在族群內，AMOVA 結果分別為 87.77 % 與 91.37 %。

Thomas 等人 (1999) 利用 RAPD 標誌來研究不同造林方式對柱松 (*Pinus contorta*) 遺傳歧異度之影響。以成熟林 (> 100 年)、天然下種林 (20-30 年)、人工栽植林 (20-30 年) 三種林型為對象，每一林型選取四個林分作測試，分析結果顯示三種林型之遺傳異質性相差不大，且天然下種林分的遺傳變異低於人工栽植林分與成熟之未收穫林分。

Mariette 等人 (2001) 利用 122 個 AFLP 標誌分析濱海松 (*Pinus pinaster*) , 包括法國西南部的亞奎丹 (Aquitaine) 與科西嘉島 (Corsican) 共 23 個族群。122 個 AFLP 標誌中多型性比例為 48 % , 亞奎丹族群的歧異度高於科西嘉島族群, 而在科西嘉島族群內, 各次族群間的差異性大。因為科西嘉島族群分佈於遺傳異質度高之山區, 取樣來自不連續分佈的森林, 相較之下, 亞奎丹族群分佈在寬廣且平坦森林, 可能因而有高度的基因流傳, 次族群間的相似度高。科西嘉島上森林火災頻繁、地勢多山、氣候惡劣可能導致濱海松之低歧異度, 且科西嘉島與法國及義大利距離數百公里, 可能被隔離於島上的原始族群數量本已受限, 因此歧異度低於法國西南部的亞奎丹。

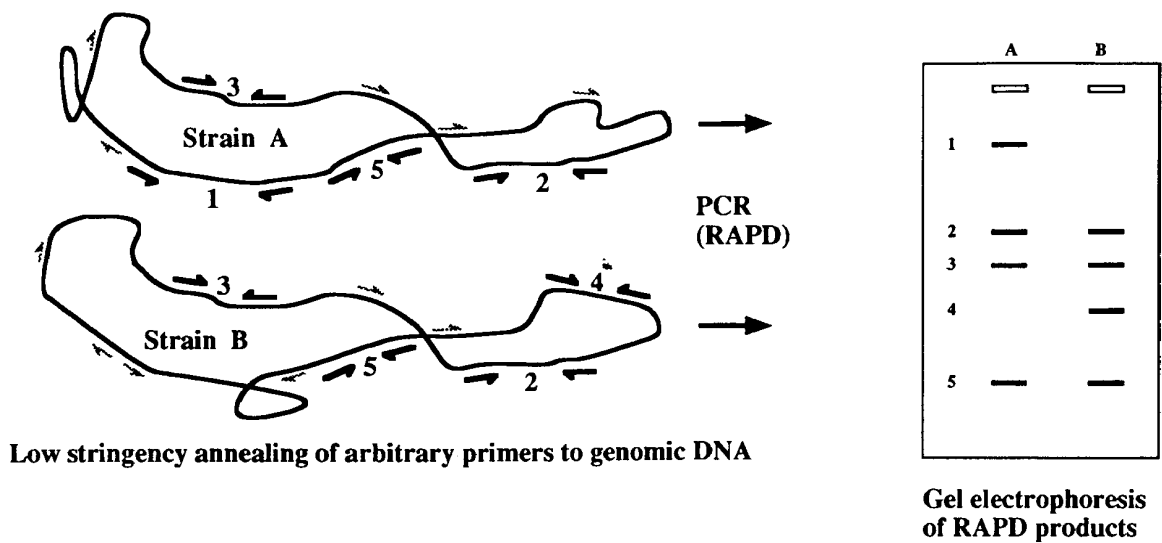


圖 2.2 RAPD 反應之模式圖。反應中引子必須在適當距離內分別與單股 DNA 鏈合才會進行擴增反應。方向相對的黑色箭頭 (→ ←) 表示引子接合位置，能有 RAPD 產物出現；灰色的箭頭表示 (→) 引子接合位置未相對或相隔距離太遠，故未能有 RAPD 產物。電泳後可看到 A 與 B 基因組的差異 (取自 Berg *et al.* 1994)。

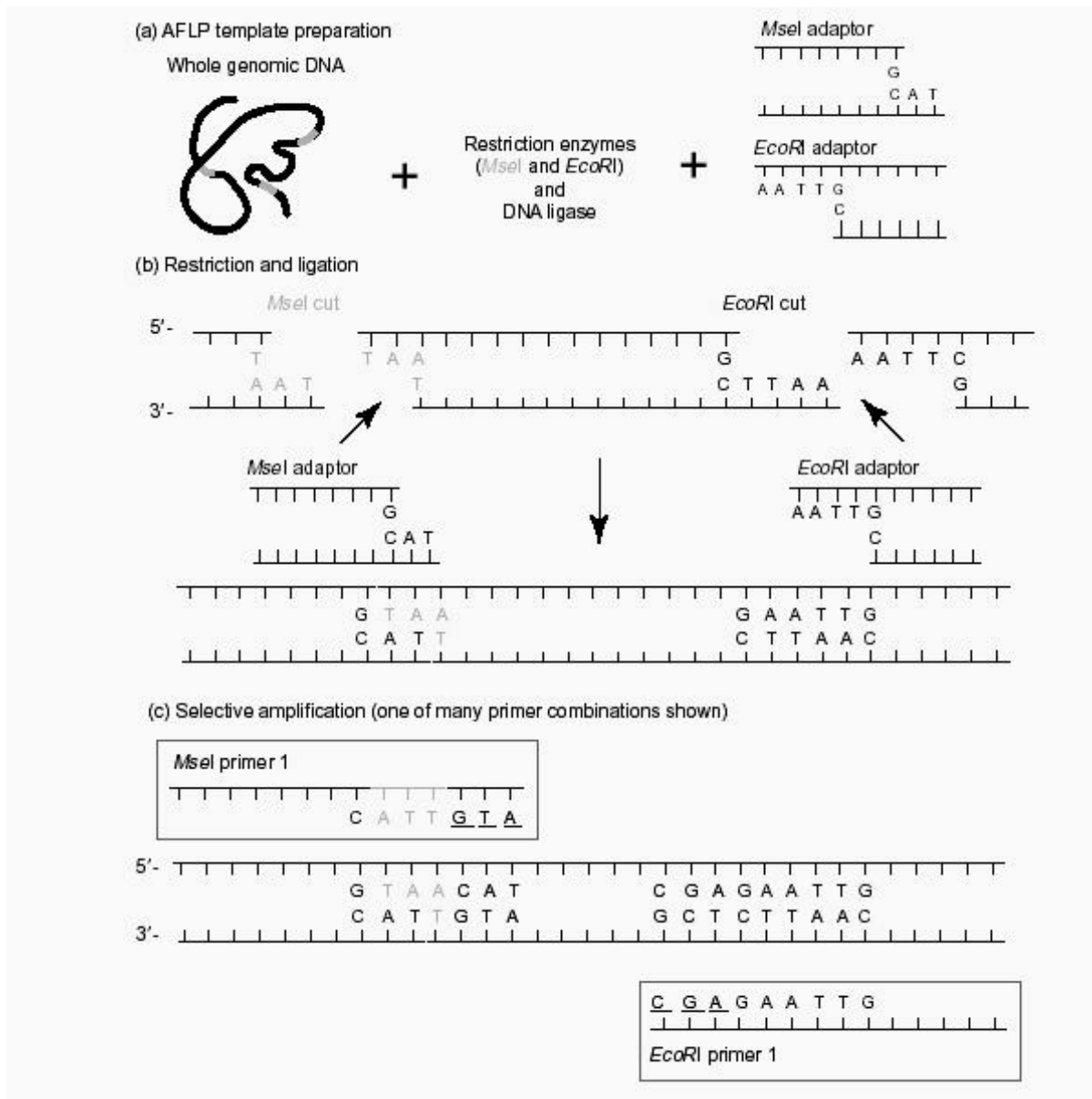


圖 2.3 AFLP 反應之模式圖。基因組經 *EcoRI* 及 *MseI* 限制酵素切割後，接上 *EcoRI* adaptor 及 *MseI* adaptor (a, b)，再以 *EcoRI* primer 及 *MseI* primer 進行選擇性擴增，引子包含了一至三個選擇性核酸 (c) (取自 Muller & Wolfneberger, 1999)。

第三章 材料與方法

3.1 植物材料

參試材料包括台灣五葉松、華山松及台灣二葉松共三種（如圖 3.2、3.3、3.4），台灣五葉松採集自全台十一個分佈點，除了鳳崗山苗圃及扇平工作站兩地點為人工栽植木外，其餘樣本皆採集自天然林（如圖 3.1），華山松及台灣二葉松是作為試驗對照用之近緣物種，分別採集自花蓮關原及台東利稻。在 RAPD 分析上，參試樣本包括 11 個族群共 163 個台灣五葉松樣本、3 個華山松樣本及 3 個台灣二葉松樣本，總計 169 個樣本。在 AFLP 分析上，人工栽植木不列入試驗，參試樣本包括 9 個族群共 44 個台灣五葉松樣本、2 個華山松樣本及 2 個台灣二葉松樣本，總計 48 個樣本（詳如表 3.1），葉片採集後以無菌水清洗、拭乾，經液態氮冷凍後保存於-80 冰箱中。

表 3.1 台灣五葉松、華山松、台灣二葉松之採集地點、行政區域、海拔、經緯度資料及 RAPD、AFLP 參試樣本數

採集地點	RAPD 樣本數	AFLP 樣本數	行政區域	海拔 (m)	經緯度
台灣五葉松					
鳳崗山苗圃	10	-	高雄縣桃源鄉	1625	23°00' N, 120°42' E
多納林道	10	6	高雄縣茂林鄉	600	22°54' N, 120°43' E
南橫(向陽-利稻)	44	6	台東縣海端鄉	1700	23°14' N, 120°59' E
扇平工作站	2	-	高雄縣茂林鄉	700	22°58' N, 120°41' E
谷關	12	5	台中縣和平鄉	800	24°12' N, 121°00' E
惠蓀林場	33	6	南投縣仁愛鄉	880	24°05' N, 121°01' E
大坑頭料山	8	6	台中縣新社鄉	800	24°10' N, 120°47' E
五寮尖	5	5	台北縣三峽鄉	300	24°51' N, 121°21' E
筆架山	2	2	台北縣石碇鄉	500	24°58' N, 121°37' E
皇帝殿	2	2	台北縣石碇鄉	300	25°00' N, 121°41' E
秀巒	35	6	新竹縣尖石鄉	900	24°37' N, 121°17' E
華山松					
關原	3	2	花蓮縣秀林鄉	2400	24°11' N, 121°20' E
台灣二葉松					
利稻	3	2	台東縣海端鄉	1200	23°11' N, 121°01' E
總計	169	48			

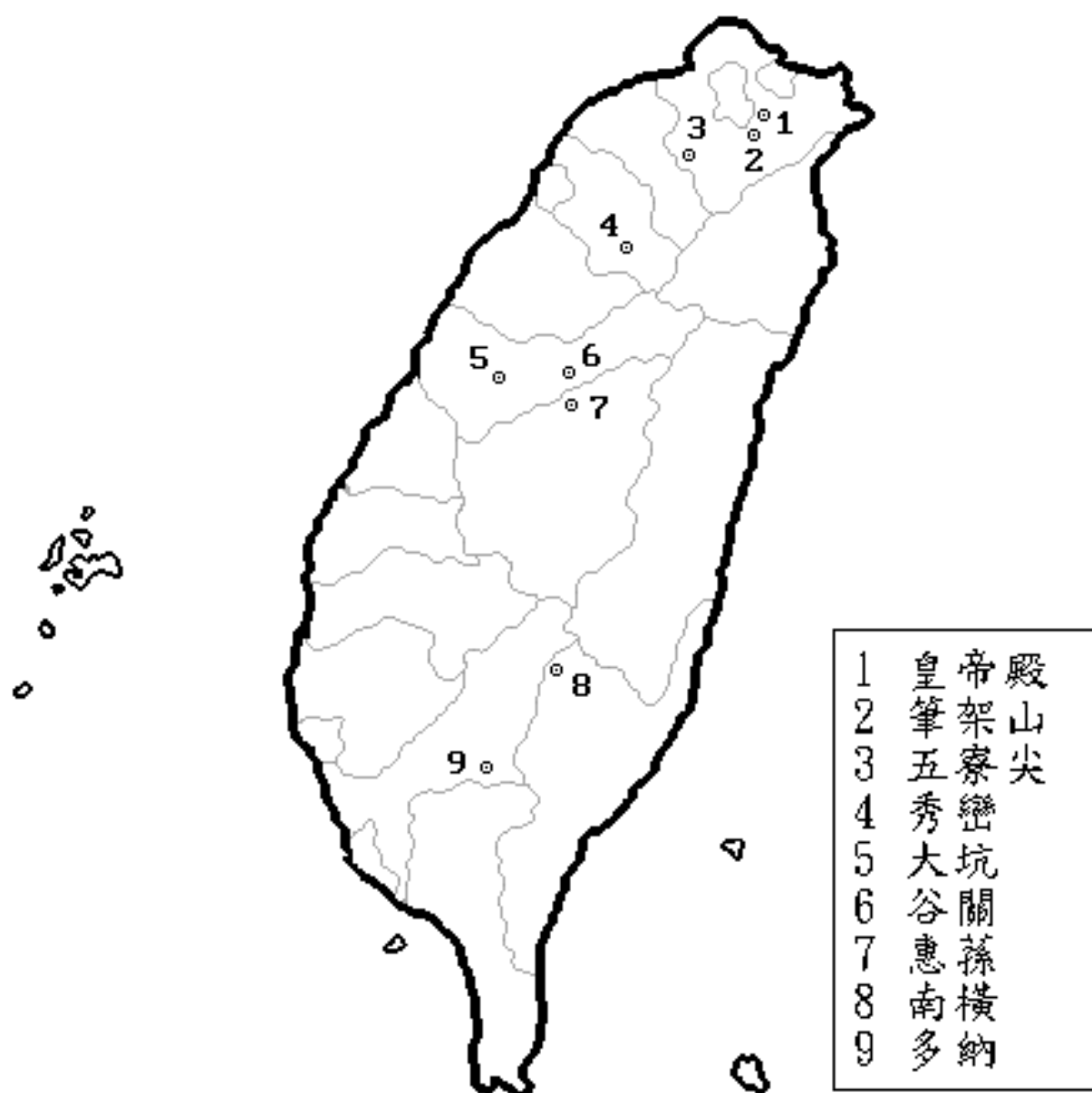


圖 3.1 台灣五葉松天然族群之採集點

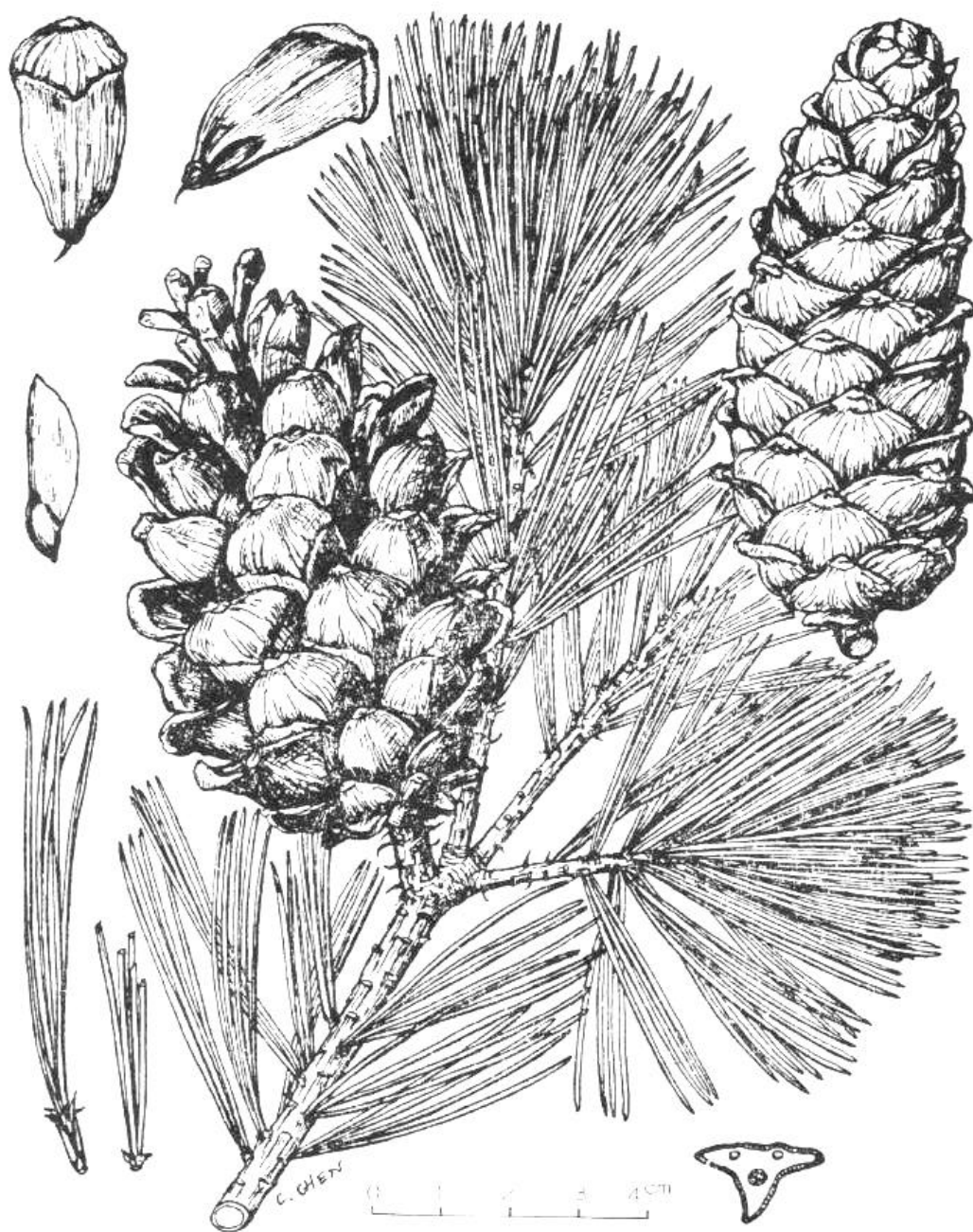


圖 3.2 台灣五葉松 (*Pinus morrisonicola*)
(取自 Flora of Taiwan, 2th ed.)



圖 3.3 華山松 (*Pinus armandi*)
(取自 Flora of Taiwan, 2th ed.)



圖 3.4 台灣二葉松 (*Pinus taiwanensis*)
(取自 Flora of Taiwan, 2th ed.)

3.2 基因組 DNA 萃取

台灣五葉松、華山松及台灣二葉松之基因組 DNA 的萃取是修改自 Doyle and Doyle (1990) 之 CTAB 萃取法，步驟如下：

將-80℃ 冷凍保存的植物組織取出（約 0.1g），置於研鉢中，加入液態氮，以杵快速研磨成粉末後，立即加入 1.6 ml CTAB-PVP 緩衝液（2% CTAB，1.4M NaCl，20mM EDTA，100mM Tris-HCl, pH8，1% PVP，0.2% β -mercaptoethanol），使萃取液與植物粉末充分混合後平均分裝至二個 1.5 ml 離心管，並置於 60℃ 乾浴槽中震盪 30 分鐘，其間每隔 10 分鐘必須取出反轉搖晃一次。接著加入 500 μ l chloroform / isoamyl alcohol (24:1) 混合液，快速搖晃使其充分混合後以 13,000 rpm 的轉速在 4℃ 離心 5 分鐘，將上清液置入新的離心管中，再加入 500 μ l chloroform / isoamyl alcohol (24:1) 混合液，重複一次離心步驟。將上清液置入新的離心管中，再加入 800 μ l 無水乙醇(anhydrous, denat, with up to 5% MEK and MeOH / EtOAc) 輕晃之，靜置-20℃ 中約 20 分鐘後以 13,000 rpm 的轉速在 4℃ 離心 5 分鐘，倒掉上清液，留下的沉澱物以 800 μ l 的 70%酒精潤洗，在 4℃ 離心 3 分鐘，倒掉上清液。將離心管置於真空抽器設備中乾燥約 30 分鐘。最後加入 50 μ l TE 溶液（1mM EDTA，10mM Tris-HCl, pH8）以溶解沈澱物，再將相同樣本之兩管 DNA 溶液合併，放置在-20℃ 冰箱保存供用。

3.3 DNA 品質檢定及定量

取 2 μ l DNA 樣品與 1 μ l 6 $\times$ stop dye 混合後注入 1% Agarose 膠片樣本槽中，以 80 V 進行電泳約 2 小時，電泳結束後以 0.5 μ l / ml EtBr 染色約 15 分鐘，再以蒸餾水退染 15 分鐘後置於 UV 燈上觀察，DNA 產物若集中在膠片上方的高分子量區，則為理想的 DNA 樣品，若呈

模糊帶狀(即樣品中含有各種不同片段大小的 DNA)表示 DNA 已裂解,需重新抽取。通過品質檢定的樣本則各取 10 μ l DNA 溶液,加入 90 μ l TE 溶液(稀釋 10 倍),充分混合後以分光光度計(Amersham-pharmacia biotech)測定 260nm 及 280nm 的吸光值,並計算 OD_{260}/OD_{280} 比值,將比值大於 1.8 之樣品的 OD_{260} 值乘以 50,再乘以稀釋倍數 10 後即為樣本 DNA 溶液的濃度(ng/μ l)。依照各個樣本 DNA 溶液之濃度,分別取適量 TE 溶液將 DNA 濃度調整至 10 ng/μ l。

3.4 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

3.4.1 隨機引子篩選

實驗所用的核酸引子是由美國 Operon 公司(Operon Technologies, Alameda, Calif),所生產的引子(primer)。這些隨機引子皆由 10 個核酸組成(10-mer),其中 G + C 的比例為 60-70%。本試驗先由每個族群內隨機選取 1 個樣本,共 11 個樣本作引子篩選,使用 OPA01-20、OPB01-20、OPP01-20、OPQ01-20 共 80 個引子,如果能擴增 DNA 片段且在 11 個樣本間具有多型性者,就選為可用引子。經篩選後,選出 32 個有效隨機引子,選取其中多型性明顯、條帶生成較多者共 10 個(表 3.2)進行全樣本的 RAPD 分析。

3.4.2 基因組核酸的複製

基因組核酸片段擴增的方法是根據 Williams 等人(1990)的方法加以修改而得,PCR (Polymerase Chain Reaction)反應液的內容物包括 2.0mM $MgCl_2$, dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 0.2mM, 0.4 μ M 引子, 20ng 基因組 DNA 及 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Biotools, B&M Labs, S.A.), 總體積為 10 μ l。以 Perkin Elmer Amp 9700 型熱循環反

應機進行 PCR 反應，反應條件設定為 94 2 分鐘；94 1 分鐘，* 46 30 秒，72 1 分 30 秒，10 個循環（*每循環一次下降 1 ），再接著 94 20 秒，36 20 秒，72 1 分 30 秒，34 個循環；最後為 72 4 分鐘，反應結束之後保存在 4 。反應完成之 PCR 產物加入 2 μ l stop dye，在 2% 瓊脂凝膠（溶於 0.5 $\times$ TBE 緩衝液）於 0.5 $\times$ TBE 緩衝液中經電泳解析，先以 60V 電壓 10 分鐘，再用 110V 電壓進行電泳分離。於膠片兩側會注入 5 μ l DNA marker (100 bp Ladder) 作分子量對照。電泳結束後膠片以 0.5 μ l/ml EtBr 染色約 20 分鐘，再以蒸餾水退染 15 分鐘後置於 UV 燈上觀察並以數位相機拍照存檔。

3.5 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

3.5.1 限制酵素試切

本試驗使用 ABI PRISM[®] AFLP Plant Mapping Kit（Perkin-Elmer, U. S. A.），首先進行限制酵素試切，限制酵素能夠辨識一段特定的核酸序列並予以切割，*EcoRI* 及 *MseI* 是本試驗 AFLP 分析中主要使用到的限制酵素，此步驟目的是為了測試 DNA 樣本經過 *EcoRI* 及 *MseI* 作用後是否可順利被切割成為 DNA 片段。試切反應的總體積皆為 10 μ l，分別包括 0.5 μ g 基因組 DNA，5U *EcoRI*，1 $\times$ *EcoRI* 緩衝液與 0.5 μ g 基因組 DNA，1U *MseI*，0.5 μ g/ μ l BSA (Bovine serum albumin)，將配製好之混合液置於 37 下作用 2 小時。反應完成後將產物以 1% Agarose 進行電泳約 90 分鐘後觀察結果，確定 DNA 樣品可被限制酵素切割者才可以用來進行限制酵素切割及接合反應 (Restriction-ligation reactions)，這個步驟因考量後續操作的方便性，會先行配製妥酵素混合液，每一反應所需體積 1 μ l，內含 0.033 μ l 之 100 U T4 DNA ligase，1 $\times$ T4 DNA 緩衝液 (已包含 ATP)，1U *MseI*，

5U *Eco*RI, 0.05M NaCl, 0.05 μ g/ μ l BSA。取 1 μ l 酵素混合液 DNA, 加入 0.5 μ g DNA, 1 $\times$ T4 DNA 緩衝液 (已包含 ATP), 0.05M NaCl, 0.05 μ g/ μ l BSA, 1 μ l *Mse*I adaptor, 1 μ l *Eco*RI adaptor, 反應液的總體積為 11 μ l, 混合均勻後在 37 $^{\circ}$ C 下作用 2 小時進行限制酵素切割及接合反應。反應結束後將產物加入 TE 緩衝液稀釋 10 倍後儲存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.5.2 前擴增反應(Pre-selective amplification)

完成限制酵素切割及接合反應後的 DNA 樣品再用來進行前擴增反應, 先取 2 μ l 的 DNA 稀釋液, 加入 7.5 μ l AFLP core mix 溶液 (內含 dNTPs、緩衝液、AmpliTaq[®] DNA polymerase), 0.5 μ l AFLP *Mse*I/ *Eco*RI pre-amplification primers (引子序列包含限制酵素切位、adaptor 序列及一個延伸的核酸序列 *Eco*RI +A / *Mse*I +C), 總體積 10 μ l。以 Perkin Elmer Amp 9700 型熱循環反應機進行 PCR 反應, 反應條件為 72 $^{\circ}$ C 2 分鐘, 接著 94 $^{\circ}$ C 20 秒, 56 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 2 分鐘, 20 個循環; 最後為 60 $^{\circ}$ C 30 秒。取 PCR 反應產物 5 μ l 以 1% Agarose 進行電泳約 90 分鐘後觀察結果, 理想產物之 DNA 片段約為 100 bp ~ 1500 bp, 樣品合格者取剩餘 5 μ l 產物加入 TE buffer 稀釋 10 倍後儲存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.5.3 選擇性擴增反應(Selective Amplification)

完成前擴增反應的 DNA 樣本接著進行選擇性擴增反應, 選擇性擴增反應所使用的引子對序列含有 3 個選擇性延伸的核酸, 先從全部樣本中隨機選取 6 個 DNA 樣本進行引子對的篩選, 選擇擴增產物量較多且具有多型性 DNA 片段的引子組合將用來供作總樣品分析。本試驗共篩選 48 種引子組合, 其中具有多型性的引子組合共有 4 組,

本試驗採用這 4 組進行反應 (表 3.3)。反應總體積 10 μ l, 包含 1.5 μ l 已完成前擴增反應之 DNA 稀釋液、7.5 μ l AFLP core mix (內含 dNTPs、緩衝液、AmpliTaq® DNA polymerase), 0.5 μ l AFLP *Mse*I / *Eco*RI primers (引子序列包含限制酵素切位、adaptor 序列及三個延伸核酸序列 *Eco*RI + ANN / *Mse*I + CNN), 其中 *Eco*RI primers 的 3'端以螢光染劑標定, 利用 Perkin Elmer Amp 9700 型熱循環反應機進行 PCR 反應, 反應條件為 94 2 分鐘, 接著 94 20 秒, * 66 30 秒, 72 2 分鐘, 10 個循環 (* 每循環一次下降 1), 接著 94 20 秒, 56 30 秒, 72 2 分鐘, 20 個循環; 最後 60 30 分鐘, 反應結束之後保存在 4 。

3.5.4 電泳

取 1 μ l 已完成選擇性擴增反應之產物, 加入 24 μ l Deionied Formamide, 0.25 μ l GeneScan- 500 ROX Size Standard (經紅色螢光標定之標準品, 片段大小已知), 將反應液充分混合後置於加熱槽內以 95 加熱 5 分鐘, 再迅速移至冰浴中冷卻, 使 DNA 片段變性 (denature) 後以 Polymer (POP-4) 開始毛細管電泳, 利用 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer 作為核酸電泳分析, 產物偵測採用電泳螢光偵測系統, 於 60 下進行電泳, 每個樣本偵測 24 分鐘, 電腦會自動將螢光訊號紀錄並存成檔案。

3.6 遺傳歧異度分析

根據 RAPD 電泳結果與 AFLP 螢光訊號判讀所獲得之資料, 依條帶之有無以 1/0 紀錄。樣品間遺傳距離的估算採用 Jaccard's coefficient of community, 兩樣品之間的遺傳相似度 (genetic similsrity) 則為 $(1 - GD_{ij})$ 。將遺傳相似度資料以 SAS 軟體進行 PCO 分析 (principal

coordinate analysis) , 並以 Sigmaplot 軟體依前二個主成分繪出樣品分佈圖。兩樣品間的遺傳距離 (genetic distance)公式如下：

$$GD_{ij} = \frac{(N_i + N_j)}{(N_{ij} + N_i + N_j)}$$

N_i : Gel positions in line i not in line j

N_j : Gel positions in line j not in line i

N_{ij} : Gel positions in line i and in line j

利用 TFPGA version 1.3 軟體 (Miller, 1997) 依 Nei's (1978) unbiased heterozygosity , 假定在哈帝 - 溫勃守衡原則(Hardy-Weinberg equilibrium)之情況下求得歧異度值(diversity value) , RAPD 與 AFLP 都屬於顯性標誌 , 無法直接估算對偶基因頻率 , 所以將每個條帶假設為一個基因座 (locus) , 並假設每個基因座上只有兩個對偶基因 (alleles) , 條帶出現則視之為顯性基因型 , 無條帶出現者視之為同型隱性基因型。根據 Lynch & Milligan (1994) 描述之泰勒展開式 (Taylor expansion) 計算方式來估算出基因頻率可避免偏差。

每個分子標誌 (marker) 在各族群的歧異度計算公式如下：

$$h_i = \frac{n(1 - \sum_i p_i^2)}{n - 1}$$

p_i : 第 i 個標誌 (基因座) 在各族群內的頻率

n : 參與分析的樣本數

每個引子或引子組合在各族群的歧異度：

$$H_j = \frac{\sum h_i}{r}$$

r : 每個引子或引子組合的總標誌數

由所有標誌之平均歧異度 (h_i) 可估算出各族群的歧異度 (H) , 各族群的歧異度平均得族群平均歧異度 (H_s)。以總樣本數作運算可得到總歧異度 (H_t)。

利用 TFPGA version 1.3 軟體 , 依據 Nei's unbiased distance 以 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) 進行群叢分析(cluster analysis) , 並繪製樹狀圖。

3.7 AMOVA 分析

將 RAPD 標誌資料儲存成 ASCII 檔案格式 , 利用 AMOVA-PRE version 1.01 軟體運算產生歐幾里德偏距矩陣 (Euclidean distance matrix) , 運算公式如下 :

$$d_{xy}^2 = \sum_{i=1}^S (x_i - y_i)^2$$

S : 標誌數

X 、 Y : 表示兩兩不同樣本

i : 表示第 i 個標誌

再利用得到之矩陣以 AMOVAWIN version 1.55 軟體進行遺傳變異成分分析。求得自由度 (d.f.) 平方和 (SSD) 均方 (MSD) 變異成分估值、各成分佔總變異之比例 (% Total) 與隨機單獨運算獲得極端值的機率 (P -value) 與 F_{st} 值。

$$\Phi_{st} = \frac{s_a^2 + s_b^2}{s_a^2 + s_b^2 + s_c^2}$$

s_a^2 : 群 (group) 變方

s_b^2 : 族群 (subpopulation) 變方

s_c^2 : 個體 (individual) 變方

表 3.2 RAPD 分析使用之引子資料

primer	sequence (5' ~3')	GC %
OPA-04	AATCGGGCTG	60
OPA-09	GGGTAACGCC	70
OPB-03	CATCCCCCTG	70
OPB-14	TCCGCTCTGG	70
OPB-19	ACCCCCGAAG	70
OPP-10	TCCCGCCTAC	70
OPQ-08	CTCCAGCGGA	70
OPQ-09	GGCTAACCGA	60
OPQ-14	GGACGCTTCA	60
OPQ-18	AGGCTGGGTG	70

表 3.3 AFLP 分析使用之引子組合

primer set (5' ~3')
<i>MseI</i> / <i>EcoRI</i>
<i>EcoRI</i> -ACT / <i>MseI</i> -CAA
<i>EcoRI</i> -AGG / <i>MseI</i> -CAA
<i>EcoRI</i> -ACC / <i>MseI</i> -CTC
<i>EcoRI</i> -ACT / <i>MseI</i> -CTA

第四章 結果

4.1 RAPD 分子標誌

4.1.1 引子篩選與條帶生成

本實驗共篩選 80 個隨機引子，其中 32 個具有多型性，比例為 40 %，選取具 10 個條帶生成較清晰明顯且具多型性的隨機引子進行實驗。這 10 個引子在總樣本中共產生 102 個有效條帶，擴增的片段大小介於 250 bp ~ 2000 bp，擴增片段數最多的引子為 OPP-10，獲得 15 個條帶，擴增片段數最少的引子為 OPQ-08，僅得到 5 個條帶，每一個引子平均可獲得 10.2 個條帶。

華山松特有的條帶有 11 個，台灣二葉松特有的條帶有 15 個，華山松及台灣二葉松兩者特有的條帶有 1 個，在扣除近緣種的條帶資料後，台灣五葉松 163 個樣本共得到 75 個有效條帶，其中 63 個條帶具多型性（詳見表 4.1），比例為 84 %，OPB-19、OPP-10、OPQ-14 引子的多型性比例 100 % 為最多，OPA-04 引子的多型性比例 25 % 為最少。

4.1.2 台灣五葉松與近緣物種之遺傳距離分析

全樣本的條帶資料依 Nei's unbiased distance 運算，得到不同族群之遺傳距離（如表 4.2），利用 UPGMA 進行群叢分析並繪製樹狀圖（如圖 4.1）。樹狀圖顯示台灣五葉松與華山松的親源關係很近，而與台灣二葉松的親源關係較遠，在遺傳距離為 0.088 時群叢可分為兩大群，一群為台灣五葉松全部族群，另一群則為華山松及台灣二葉松，遺傳距離為 0.295 時，華山松與台灣五葉松可歸為一群，台灣二葉松則在群外，遺傳距離為 0.598 時，台灣二葉松、華山松與台灣五葉松屬

同一群。華山松族群與台灣五葉松各族群間的遺傳距離約為 0.236 ~ 0.399，而台灣二葉松族群與台灣五葉松各族群間的遺傳距離約為 0.544 ~ 0.757。利用 Jaccard 相似度矩陣完成 PCO 分析，依前二個主成分繪製平面圖（如圖 4.2），樣本的群聚現象與樹狀圖歸群結果相同，在樹狀圖中自成一明顯類群的台灣五葉松族群，在 PCO 中同樣地與華山松、台灣二葉松有明顯的區隔，而台灣五葉松與華山松的分隔距離較近，與台灣二葉松的分隔距離則很遠。

4.1.3 台灣五葉松之遺傳歧異度分析

刪除兩個近緣物種的條帶資料，僅以台灣五葉松樣本進行分析。條帶資料依 Nei's unbiased distance 運算，利用 UPGMA 進行群叢分析並繪製樹狀圖（如圖 4.3）。由樹狀圖可清楚的將所有族群可劃分為兩大類群，第一類群包括鳳崗山、惠蓀林場、秀巒、谷關、大坑頭料山、多納、南橫、扇平共八個族群，遺傳距離為 0.087 時可被歸群；第二類群包括三峽五寮尖、石碇筆架山、石碇皇帝殿共三個族群，遺傳距離為 0.099 時可被歸群。其中第一類群還可再細分為三個小群，第一小群包括惠蓀林場、秀巒、谷關、大坑頭料山共四個族群，遺傳距離為 0.037 時可被歸群；第二小群包括鳳崗山、多納及南橫三個族群，遺傳距離為 0.047 時可被歸群；第三小群僅有扇平一個族群。第二類群可再細分為二個小群，第一小群包括三峽五寮尖、石碇筆架山，遺傳距離為 0.077 時可被歸群；第二小群僅有石碇皇帝殿一個族群。整體而言，惠蓀林場、谷關兩族群間的相似度最高，十一個族群間的遺傳距離皆小於 0.128，其間相似度非常高，相似係數（1-GD）皆大於 0.872。利用 Jaccard 相似度矩陣完成 PCO 分析，依前二個主成分繪製平面圖（如圖 4.4），南部地區的多納及南橫兩族群有群聚現象，可與其他族群分隔，而鳳崗山、惠蓀林場、秀巒、谷關、大坑頭

料山、扇平、五寮尖、筆架山、皇帝殿九個族群間則無明顯的群聚現象，無法區分。

將台灣五葉松九個天然族群的 Nei's unbiased distance 運算結果列製成表（如表 4.3），表內顯示出兩兩族群間的遺傳距離，以谷關與惠蓀林場兩族群之間的遺傳距離最近，為 0.024，而多納與筆架山兩族群之間的遺傳距離最遠，為 0.204。再以兩兩族群間的遺傳距離當作 Y 軸，以兩兩族群間的地理距離當作 X 軸，繪製成 XY 分佈圖（如圖 4.5），迴歸線公式為 $Y=0.00058X+0.03524$ ，由圖可見兩兩族群間的遺傳距離與地理距離約略呈線性關係，當兩族群間的地理距離愈遠，則遺傳距離愈遠。

依據 Nei's unbiased heterozygosity 估算每個引子在各個族群所偵測到的歧異度(H_j)，並將每個引子之 H_j 加總後計算各族群的平均歧異度 (H)，數據資料顯示於表 4.4。就引子能夠偵測到之遺傳歧異度而言，各引子的能力具有相當大的差異性，有些引子如 OPB-19 在各族群中皆可偵測到較高的歧異度（0.135 ~ 0.369），但有的引子在各族群間所偵測到的歧異度變化很大，如 OPQ-18 在多納的遺傳歧異度為 0.243，而在皇帝殿的遺傳歧異度則為 0；OPP-10 在谷關的遺傳歧異度為 0.312，而在筆架山的遺傳歧異度則為 0。在五寮尖族群中，OPQ-09 偵測到的遺傳歧異度為 0.360，OPQ-08 偵測到的遺傳歧異度為 0，差異性最大，由總樣本來看，OPQ-09 偵測到的遺傳歧異度為 0.336 最大，OPQ-08 偵測到的遺傳歧異度為 0.123 最小。將全部的引子歧異度 (H_j) 加總、平均後得到族群內的歧異度 (H)，筆架山的歧異度為 0.073 最低，而惠蓀的歧異度為 0.262 最高，族群平均歧異度 (H_s) 為 0.196。台灣五葉松九個天然族群共 151 個樣本的總歧異度 (H_t) 為 0.276。

4.1.4 歧異度與族群分佈緯度之關係

分別將九個台灣五葉松族群的歧異度值當作 Y 軸，以各族群的緯度資料當作 X 軸（如表 4.5），繪製分佈曲線圖（如圖 4.6），由圖可見歧異度值（ H_e ）最大的兩個族群其緯度範圍介於北緯 23.23°至北緯 24.08°間，分別是南橫與惠蓀林場，歧異度皆為 0.262。歧異度的次高峰介於北緯 24.20°至北緯 24.62°間，分別是谷關與秀巒，歧異度分別為 0.219 與 0.239。

4.1.5 AMOVA 分析

以 AMOVA 進行遺傳變異成分分析結果如表 4.6 所示，族群間的遺傳變異佔總變異的 14.61%，族群內的遺傳變異佔總變異的 85.39%，兩者皆達 0.1% 顯著水準，顯示遺傳變異主要存在族群內，而非族群間。 F_{st} 值為 0.146， F_{st} 值類似於 F_{st} 值，值愈小表示族群間的遺傳相似度愈高，研究中九個台灣五葉松族群（包括惠蓀林場、秀巒、谷關、大坑頭料山、多納、南橫、五寮尖、筆架山、皇帝殿）之間的遺傳相似度高，有適度分化現象。

4.2 AFLP 分子標誌

4.2.1 引子篩選與條帶生成

本實驗共篩選 48 對引子組，其中 4 對具有多型性，比例為 8.3%，使用這 4 對引子組以全樣本進行實驗。這 4 對引子組在總樣本中共產生 119 個有效條帶，擴增的片段大小介於 44 bp ~ 351 bp，擴增片段數最多的引子組合為 *EcoRI*-ACT / *MseI*-CAA，共獲得 39 個有效條帶，擴增片段數最少的引子組合為 *EcoRI*-ACC / *MseI*-CTC，共得到 16 個有效條帶，每一對引子組平均可獲得 29.75 個有效條帶。

華山松特有的條帶有 2 個，台灣二葉松特有的條帶有 37 個，刪除近緣種的條帶資料後，台灣五葉松 44 個樣本共得到 80 個有效條帶，其中 9 個條帶具多型性（詳見表 4.7），多型性比例為 11.25 %。*EcoRI*-ACT / *MseI*-CAA 引子組的多型性比例為 18.18 % 為最多，*EcoRI*-ACC / *MseI*-CTC 引子組的多型性比例 7.70 % 為最少。

4.2.2 台灣五葉松之遺傳歧異度分析

依據 Nei's unbiased heterozygosity，分析 9 個多型性條帶，得到族群內的歧異度 (H)，皇帝殿的歧異度 0 為最低，而南橫的歧異度 0.167 為最高，族群平均歧異度 (H_s) 為 0.088。台灣五葉松九個天然族群共 44 個樣本的總歧異度 (H_t) 為 0.321。

表 4.1 RAPD 分析所用之逢機引子與擴增條帶數、多型性條帶數與多型性比例

primer	sequence(5'~3')	GC %	No. of total bands	No. of polymorphic bands	% of polymorphism
OPA-04	AATCGGGCTG	60	8	5	62.5
OPA-09	GGGTAACGCC	70	9	8	88.9
OPB-03	CATCCCCCTG	70	6	5	83.3
OPB-14	TCCGCTCTGG	70	8	7	87.5
OPB-19	ACCCCCGAAG	70	11	11	100
OPP-10	TCCCGCCTAC	70	7	7	100
OPQ-08	CTCCAGCGGA	70	4	1	25
OPQ-09	GGCTAACCGA	60	9	8	88.9
OPQ-14	GGACGCTTCA	60	8	8	100
OPQ-18	AGGCTGGGTG	70	5	3	60

表 4.2 台灣五葉松、華山松、台灣二葉松共十三個族群依 Nei's unbiased (1978) distance 運算結果，表內顯示出兩兩族群間的遺傳距離

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 鳳崗山	*****												
2 多納	0.0393	*****											
3 扇平工作站	0.0375	0.0604	*****										
4 南橫公路	0.0272	0.0251	0.0624	*****									
5 惠蓀林場	0.0176	0.0482	0.0612	0.0279	*****								
6 大坑頭料山	0.0462	0.0755	0.0672	0.0709	0.0253	*****							
7 谷關	0.0355	0.0656	0.0686	0.0522	0.0165	0.0179	*****						
8 三峽五寮尖	0.0815	0.1199	0.1044	0.1034	0.0524	0.0702	0.0702	*****					
9 石碇皇帝殿	0.0792	0.1259	0.0988	0.1005	0.0473	0.0508	0.0545	0.0521	*****				
10 石碇筆架山	0.0908	0.1380	0.1131	0.1183	0.0767	0.0947	0.0934	0.0797	0.0500	*****			
11 秀巒	0.0326	0.0609	0.0572	0.0389	0.0185	0.0341	0.0178	0.0625	0.0532	0.0680	*****		
12 華山松	0.3000	0.2909	0.3636	0.2638	0.2461	0.2621	0.2364	0.3635	0.3193	0.3990	0.2520	*****	
13 台灣二葉松	0.5845	0.6191	0.7061	0.5442	0.5447	0.6026	0.5564	0.6807	0.6769	0.7574	0.5452	0.5117	*****

表 4.3 台灣五葉松九個天然族群的 Nei's unbiased (1978) distance 運算結果，表內顯示出兩兩族群間的遺傳距離，星號以上顯示兩兩族群間地理上的直線距離（km）

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 多納	*****	42.35	124.85	128.15	134.20	214.50	230.45	227.15	182.60
2 南橫公路	0.0360	*****	86.90	95.15	97.35	174.90	189.75	185.35	143.00
3 惠蓀林場	0.0699	0.0409	*****	25.30	11.55	90.20	108.35	104.50	58.30
4 大坑頭崙山	0.1095	0.1027	0.0353	*****	20.35	94.05	118.25	112.75	64.90
5 谷關	0.0946	0.0751	0.0235	0.0264	*****	81.40	102.30	97.35	50.05
6 三峽五寮尖	0.1785	0.1527	0.0750	0.0987	0.1023	*****	29.70	23.65	33.55
7 石碇皇帝殿	0.1925	0.1521	0.0716	0.0759	0.0848	0.0773	*****	6.05	52.80
8 石碇筆架山	0.2036	0.1739	0.1128	0.1405	0.1389	0.1175	0.0813	*****	47.30
9 秀巒	0.0896	0.0574	0.0271	0.0483	0.0240	0.0901	0.0803	0.0989	*****

表 4.4 台灣五葉松九個天然族群樣本依 Nei's unbiased heterozygosity 估算每個引子在各個族群所偵測到的歧異度、族群內的歧異度、族群平均歧異度與 151 個樣本的總歧異度

Primer	多納	南橫 公路	惠蓀 林場	大坑 頭料山	谷關	三峽 五寮尖	石碇 皇帝殿	石碇 筆架山	秀巒	總樣本
OPA-04	0.1530	0.1093	0.1278	0.1068	0.0782	0.0964	0.0618	0.0618	0.1407	0.1256
OPA-09	0.2307	0.2302	0.3354	0.2064	0.1402	0.1413	0.0000	0.0000	0.1648	0.3072
OPB-03	0.1610	0.2600	0.2384	0.1549	0.1849	0.1286	0.1648	0.0824	0.2334	0.2670
OPB-14	0.1506	0.2920	0.2687	0.1827	0.2158	0.1555	0.1854	0.1236	0.2267	0.2802
OPB-19	0.3072	0.3194	0.3181	0.3694	0.3186	0.2789	0.2247	0.1348	0.3653	0.3504
OPP-10	0.2991	0.2788	0.3070	0.1847	0.3118	0.2381	0.0706	0.0000	0.2546	0.2968
OPQ-08	0.1294	0.1241	0.1265	0.1079	0.1064	0.0000	0.0000	0.0000	0.1228	0.1233
OPQ-09	0.2353	0.3015	0.3055	0.2490	0.2275	0.3599	0.2746	0.0549	0.2977	0.3360
OPQ-14	0.1558	0.3448	0.2918	0.1122	0.3016	0.1639	0.0618	0.0618	0.2735	0.3019
OPQ-18	0.2432	0.2140	0.1620	0.1314	0.2285	0.0743	0.0000	0.0989	0.2128	0.2368
All markers	0.2152	0.2619	0.2622	0.1918	0.2192	0.1829	0.1186	0.0725	0.2393	0.2755
%polymorphic loci	84.0000	62.6667	81.3333	80.0000	48.0000	64.0000	45.3333	24.0000	14.6670	74.6670

表 4.5 以 RAPD 分析台灣五葉松九個天然族群之歧異度值與緯度資料

族群	歧異度 (H_e)	緯度	行政區域
多納林道	0.2152	N 22.90°	高雄縣
南橫(向陽-利稻)	0.2619	N 23.23°	台東縣
惠蓀林場	0.2622	N 24.08°	南投縣
大坑頭崙山	0.1918	N 24.17°	台中縣
谷關	0.2192	N 24.20°	台中縣
秀巒	0.2393	N 24.62°	新竹縣
五寮尖	0.1829	N 24.85°	台北縣
筆架山	0.0725	N 25.97°	台北縣
皇帝殿	0.1186	N 25.00°	台北縣
平均	0.1960		

表 4.6 利用 75 個 RAPD 標誌對九個台灣五葉松族群共 151 個單株進行 AMOVA 分析。自由度 (d.f.)、平方和 (SSD)、均方 (MSD)、變異成分估值、各成分佔總變異之比例 (% Total) 與隨機單獨運算獲得極端值的機率 (P-value) 顯示於下表

Source of variance	d.f.	SSD	MSD	Variance component	% Total	P-value
Among populations	8	275.576	34.447	1.647	14.61	<0.001
Within populations	142	1366.901	9.626	9.626	85.39	<0.001

表 4.7 AFLP 分析所用之引子組合與擴增條帶數、多型性條帶數與多型性比例

primer set (5' ~3') <i>MseI</i> / <i>EcoRI</i>	No. of total bands	N0. of polymorphic bands	% of polymorphism
<i>EcoRI</i> -ACT / <i>MseI</i> -CAA	22	4	18.2
<i>EcoRI</i> -AGG / <i>MseI</i> -CAA	20	2	10.0
<i>EcoRI</i> -ACC / <i>MseI</i> -CTC	13	1	7.7
<i>EcoRI</i> -ACT / <i>MseI</i> -CTA	25	2	8.0

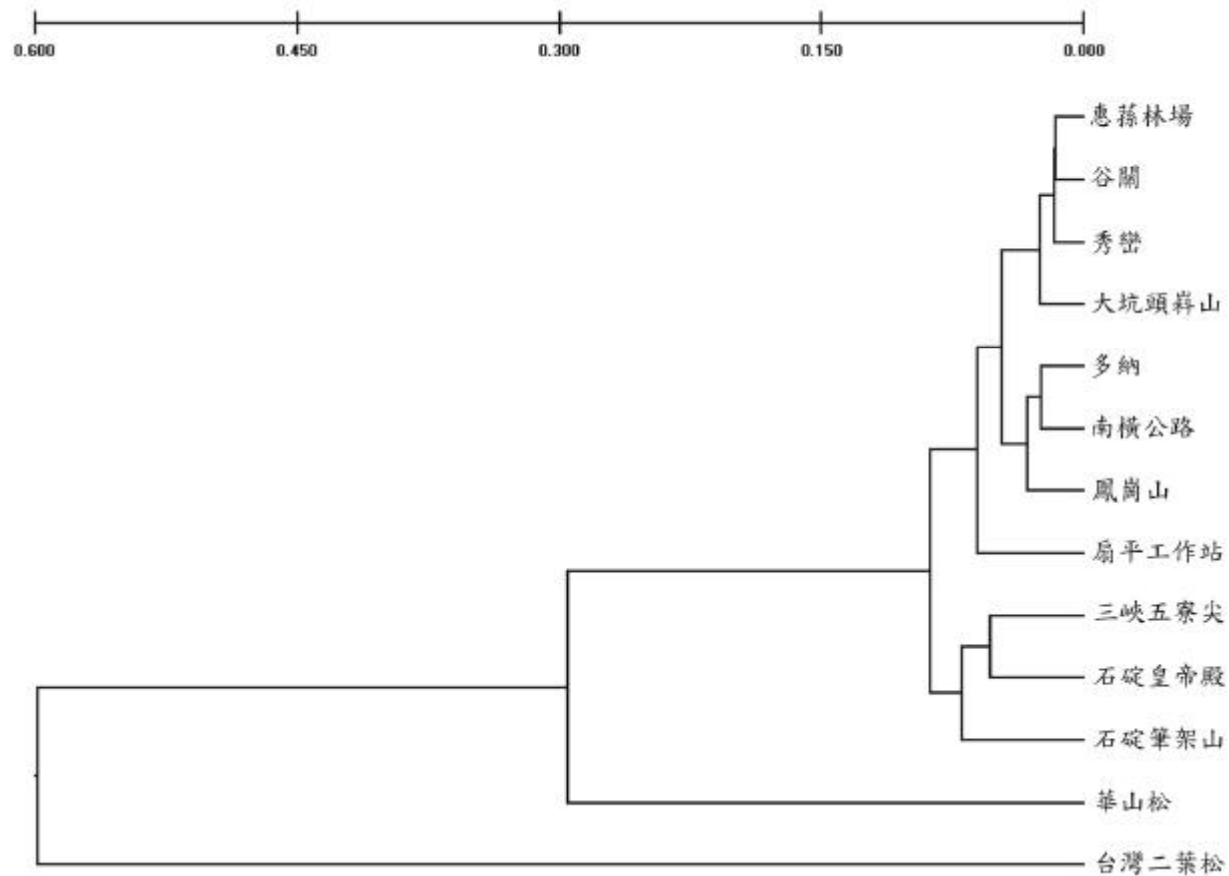


圖 4.1 台灣五葉松、華山松與台灣二葉松族群樣本依 Nei's unbiased distance 運算，利用 UPGMA 進行群叢分析之樹狀圖，軸表示遺傳距離。

- 鳳 崗 山
- ▼ 多 納
- 扇 平
- ▲ 南 橫
- 惠 孫 林 場
- ▼ 大 坑
- △ 大 谷 關
- 五 寮 尖
- ▽ 皇 帝 殿
- 筆 架 山
- ◆ 華 山 松
- 台 灣 二 葉 松

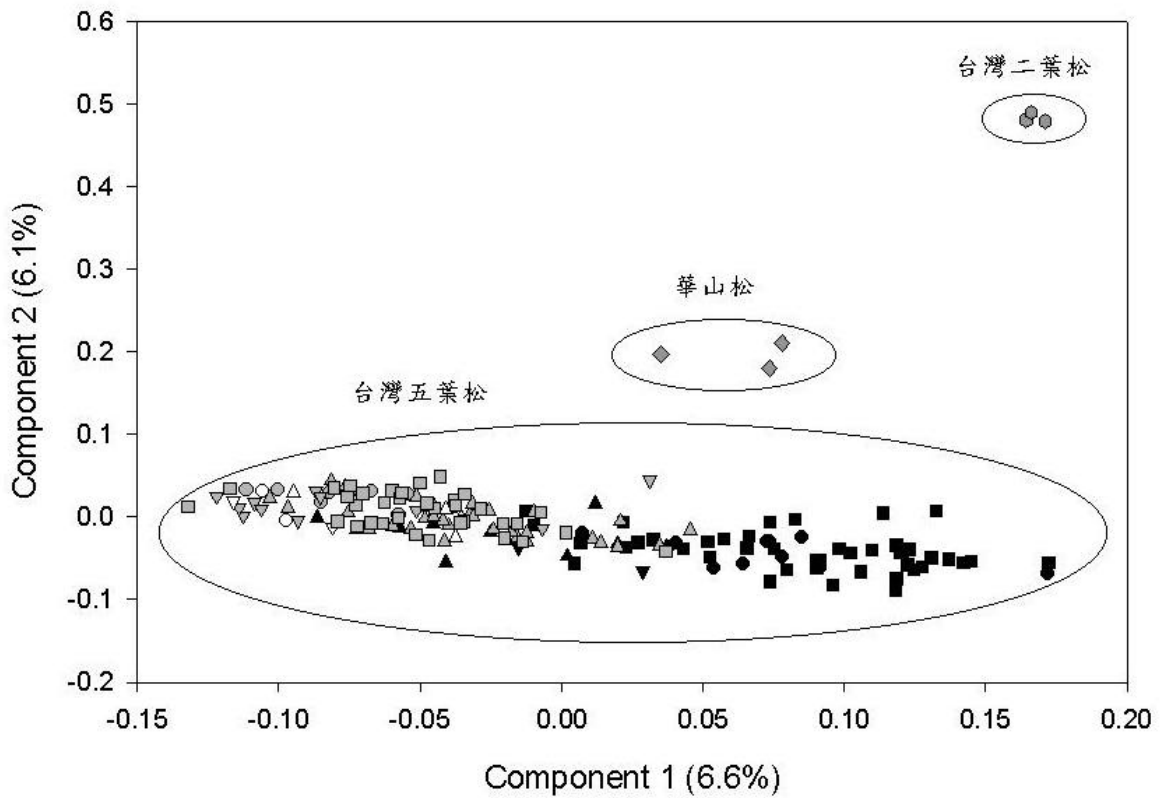


圖 4.2 台灣五葉松、華山松及台灣二葉松族群樣本 PCO 分析，依前二個主成分繪製平面圖，台灣五葉松與華山松的距離近於台灣二葉松，而台灣五葉松聚集成一排。

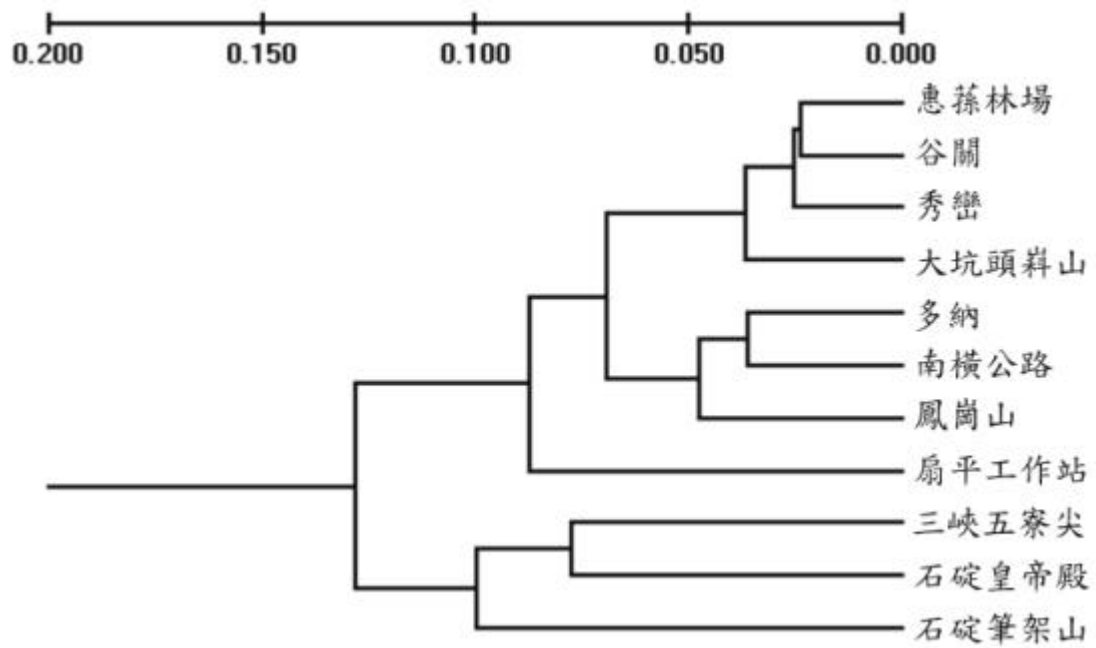


圖 4.3 十一個台灣五葉松族群樣本依 Nei's unbiased distance 運算，利用 UPGMA 進行群叢分析之樹狀圖，橫軸表示遺傳距離。

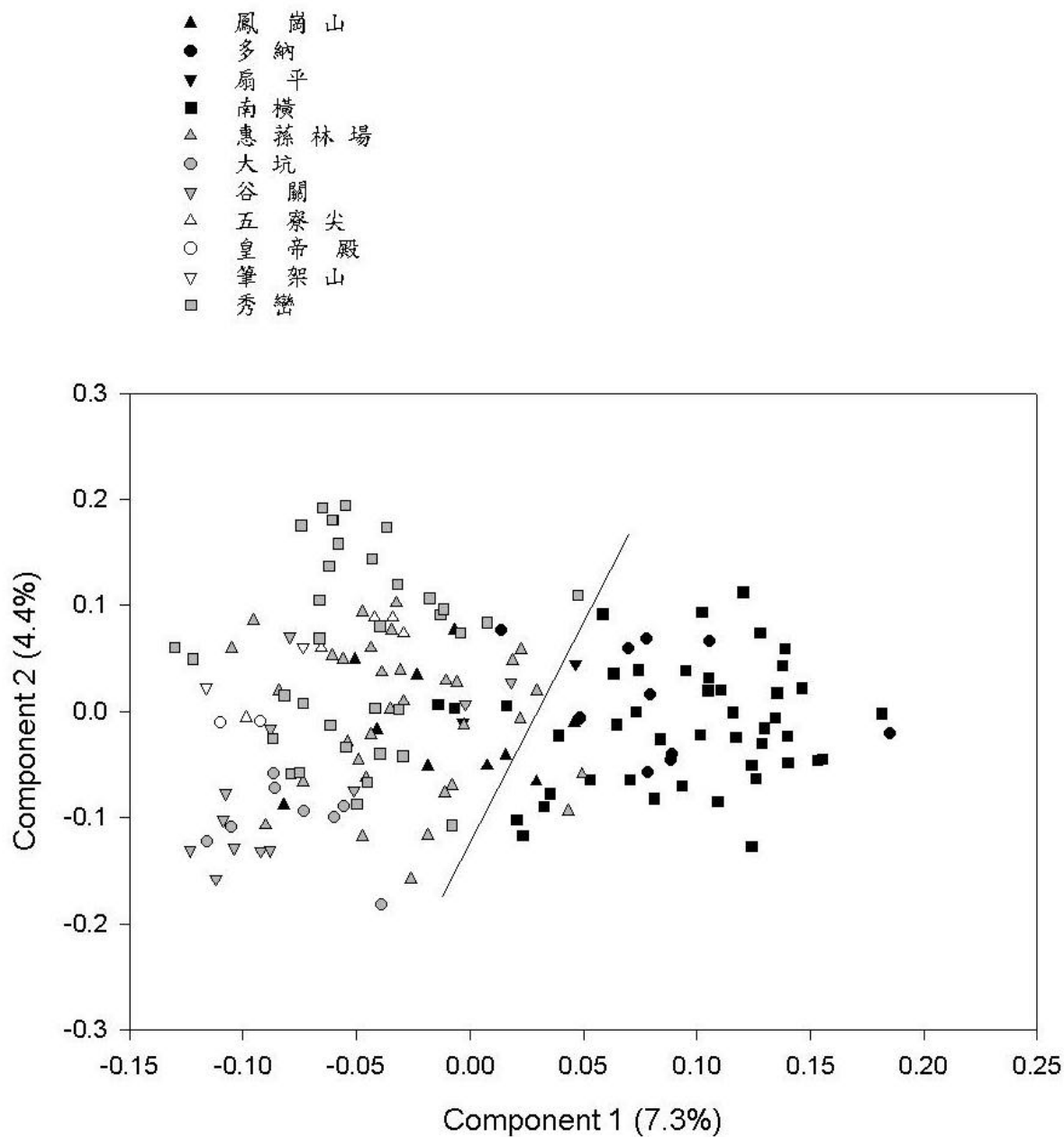


圖 4.4 十一個台灣五葉松族群樣本 PCO 分析，依前二個主成分繪製平面圖，南部地區的多納及南橫兩族群有群聚現象，可與其他族群分隔。

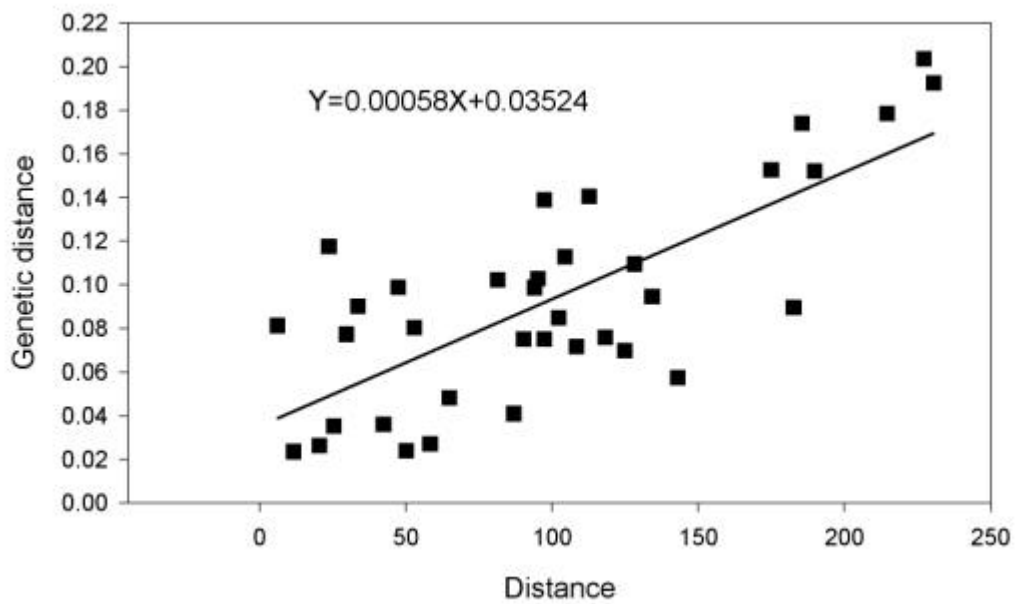


圖 4.5 台灣五葉松兩兩族群間之遺傳距離與地理距離之關係圖。族群包括多納、南橫、惠蓀林場、大坑頭料山、谷關、秀巒、五寮尖、筆架山、皇帝殿。

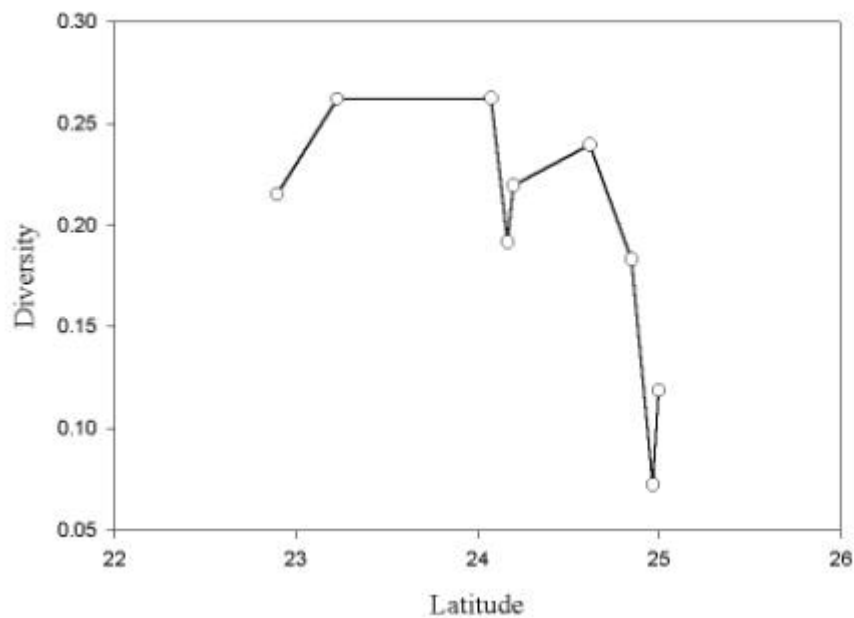


圖 4.6 九個台灣五葉松族群之歧異度值與緯度之曲線圖。由左至右分別為多納、南橫、惠蓀林場、大坑頭料山、谷關、秀巒、五寮尖、筆架山、皇帝殿。

第五章 討論

本研究已經利用 RAPD 估算出台灣五葉松在族群內及族群間的遺傳變異，此外，由於許多研究指出 AFLP 標誌的再現性高 (Powell *et al.* 1996)，因此本研究也採用這項技術來與 RAPD 作比較，但結果僅偵測到少量的多型性，這部分會放在最後討論之。在本研究中共使用 10 個 RAPD 隨機引子，結果發現每個引子偵測遺傳歧異度的能力各不相同，引子間的差異性的確存在，這與其他研究報告有相同的結果 (Díaz *et al.* 2001；Lacerda *et al.* 2001)，由此可知，如果減少引子的使用容易產生不正確的結果，換句話說，當估算遺傳參數時若能使用多數的引子則可避免偏差。

RAPD 與 AFLP 都屬於顯性標誌，無法直接估量對偶基因的頻率，然而許多研究會利用 RAPD 標誌來估算基因的頻率 (p & q)，這通常需要依靠一些假設條件來達成。一般會先假定在哈帝 - 溫勃守衡原則 (Hardy-Weinberg equilibrium) 情況之下，將標誌當成虛無同型結合子 (null homozygotes, p^2 & q^2)，從平方根求得基因頻率。Lynch & Milligan (1994) 運用泰勒展開式加以修正平方根之算法，可減小估值的偏差，本研究即以此種演算形式作為基礎獲得 Nei 無偏統計值。由於統計過程有假設因子的存在，所以在計算遺傳歧異度及族群差異性時仍可能會有所誤差。不過，當試驗物種的交配體系屬異交 (outcrossing) 者，假定哈帝 - 溫勃守衡原則並不會有很大的錯誤發生，但若為自交 (selfing) 或近交 (inbreeding) 交配體系者，就會得到不精確的估值 (Yeh & Boyle, 1997)。根據文獻記載，針葉樹大多是異交交配型 (Loveless & Hamrick, 1984；Fazekas & Yeh, 2001)，故以台灣五葉松為試驗對象所得到的估值有其參考價值。另外，本研究還利用 AMOVA 分析來估算遺傳歧異度與遺傳結構，這個統計方法不需在

哈帝 - 溫勃守衡原則的假設條件下進行運算，因此不受顯性標誌的問題所影響，估值的精確度高 (Fritch & Rieseberg, 1996)。

Hamrick 等人 (1992) 統計 93 篇以 Isozyme 研究松屬植物遺傳歧異度之文獻紀錄後，得到物種內平均的遺傳歧異度 (H_{es}) 為 0.157，族群內平均的遺傳歧異度 (H_{ep}) 為 0.136， G_{st} 為 0.065。相較之下，台灣五葉松族群得到的估值都大於上述的平均值，但這並不表示台灣五葉松的歧異度在標準之上，因為顯性分子標誌與共顯性分子標誌所提供之遺傳資訊不太相同，Isozyme 顯示的是對偶基因的差異，RAPD 偵測的範圍包括譯碼區及非譯碼區的序列，因此會獲得更豐富的變異，一般而言，非譯碼區之突變率遠大於譯碼區 (Wang *et al.* 1999)。

松樹遺傳歧異度的相關研究報告很多，利用 RAPD 估算出的平均族群內遺傳歧異度在歐洲赤松 (*P. sylvestris*) 為 0.37 (Szmids *et al.* 1996)，在柱松 (*P. contorta*) 為 0.46 (Thomas *et al.* 1999)，而在卵果松 (*P. oocarpa*) 為 0.36 (Díaz *et al.* 2001)，而台灣五葉松歧異度值為 0.20，明顯低於上述他種松類。歐洲赤松生長在高緯度地區，廣泛分佈在北歐多個國家，因此能保有高歧異度顯然是很合理的現象。另一方面，柱松與卵果松都是生長於墨西哥的松樹，墨西哥的松屬植物之物種歧異度很高，就松屬而言，北美大陸的物種歧異度及地理分佈範圍都遠大於歐亞大陸 (Farjon A. F.L.S. 1996)。根據 Millar (1998) 研究指出松樹最早起源於中生代初期，分佈在中緯度地區，冰河期則使松樹的分佈延伸至低緯度地區，地球上現存的松樹大多數都為第三紀 (Tertiary) 散佈在各處的冰河避難所 (refugia) 所擴展繁衍的後代。台灣位於北緯 21°~25°間，能夠有松樹存在很可能與最近一次發生的冰河期有關，當時極地的冷氣團可能延伸至低緯度區域，台灣地區的氣溫大約下降 8~11° (Tsukada, 1966)，低溫環境遂使松樹能夠在台灣生長。台灣原生的松樹有四種，早期台灣五葉松被認為與日本白松為同

種，後來早田文藏學者認為兩者差異點甚多而定為獨立種，Liston 等人（1999）的研究則顯示日本白松與中國大陸的華南五針松之親源關係很近，由此可推測台灣五葉松、日本白松與華南五針松三物種間的親源關係應頗近。當冰河期過後台灣與大陸失去相連的陸橋，被孤立在島上的松樹逐漸產生分化，也因而能有台灣特有種出現。經過以上的地理分佈關係與歷史事件的探討後，大致可為台灣五葉松族群的低遺傳歧異度做解釋，由於台灣五葉松生長在面積僅約三萬六千平方公里的小島上，當時在冰河撤退後留存在島上的族群原本就小，此外，這個早在更新世初期就已經存在台灣的物種，六萬年來經歷了氣候變遷也讓族群數量慢慢的縮減（Tsukada, 1967），在這種情況下，遺傳漂變對族群的基因頻率之影響很大，對偶基因較容易被固定甚至遺失，長年累積下來使得遺傳歧異度變低。相較之下，北美與歐洲地區那些分佈廣泛且生機旺盛的松樹所擁有的遺傳歧異度則豐富許多。

已有研究指出，台灣溫帶樹種的族群遺傳歧異度日益萎縮，包括台灣穗花杉（*Amentotaxus formosana*）、台灣扁柏（*Chamaecyparis taiwanensis*）、香杉（*Cunninghamia konishii*）、紅檜（*Chamaecyparis formosensis*）、台灣油杉（*Keteleeria davidana* Bessiner var. *formosana*）等，這些原生的針葉樹族群很可能發生遺傳漂變的現象，就生態觀點推測，過去萬餘年來台灣的氣溫逐漸升高，冷溫帶林往北及高緯度退去，原有族群因不能適應而不斷消失，族群的遺傳歧異度也因天擇而逐漸減小，終至僵化（林，1998）。台灣五葉松的低遺傳歧異度也印證了這項說法，天擇、遺傳漂變或創始者效應都有可能是導致此物種遺傳歧異度減低的自然因素。

在族群遺傳結構方面，AMOVA 分析顯示出台灣五葉松的遺傳歧異度主要是存在族群內，而非族群間。 F_{st} 值可用來估算分析樣本中的變異成分，類似於 F_{st} 值，表示的是族群間分化的程度， F_{st} 值愈小

，則族群間的分化程度低，反之， F_{st} 值大則表示族群間差異度大，分化明顯。台灣五葉松天然族群的 F_{st} 值為 0.146，與卵果松族群的 0.122 (Díaz *et al.* 2001) 很接近，根據 Wright (1978) 對 F_{st} 值闡述可說明台灣五葉松族群有適度的分化現象。在探討植物族群的遺傳結構時，繁殖體系亦是需要納入考慮的重要因子，Hamrick & Godt (1989) 研究顯示，異交型植物的族群間遺傳變異普遍介於 10% 至 20% 之間，如果是自交型物種，族群間遺傳變異平均高達 50%。本研究由 AMOVA 分析估算出族群間的變異量為 14.61%，所以我們可推測台灣五葉松的交配體系應該是以異交為主，與 Loveless & Hamrick (1984) 指出針葉樹大多是異交交配型的理論相符合。

從另一方面來看，台灣五葉松族群間的差異性不高，這可能意味著族群間的基因流傳量大。根據柳樺 (1966) 植物地理研究報告中的描述，台灣五葉松分佈於中央山脈兩側，北起石碇，南至大武山，圍繞中央山脈形成一環帶狀。依照 Wring 所提出的島嶼族群模型假設來推測，台灣五葉松的小族群間分化程度不高的原因可能是移進族群中的遺傳形質大於天擇作用產生的基因變化，加上松樹是風媒傳播，各個族群間、族群內都是逢機生殖配對，基因流傳沒有阻礙 (黃, 1991)。台灣五葉松呈現連續性分佈，因此族群間能有高度的基因流傳，但這樣的族群結構反應的是過去的台灣五葉松族群，現今台灣五葉松族群量日漸縮減，有些文獻上曾記載台灣五葉松分佈的地點如石碇皇帝殿，今也僅殘存少數單株，推測原因或許也與闊葉林的競爭有關，松樹喜生長於向陽坡地，在鬱閉的森林中難有天然更新 (梁, 1998)，當氣候條件轉佳，松類植物耐乾瘠的特性不再是項優勢，因此可能會被闊葉樹取代之。

本研究利用 RAPD 標誌分析台灣五葉松北、中、南地區共十一個族群之基因組，所得之遺傳距離樹狀圖 (如圖 4.3) 顯示出族群的群

叢現象與地理位置有關聯性存在，主要可劃分成兩大類群，兩大類群可再細分為五個小群。其中惠蓀林場、秀巒、谷關與大坑頭料山之間的遺傳距離最近，屬同一小群。這四個族群分別位在南投縣、新竹縣與台中縣，皆為鄰近之行政區域，同樣屬於雪山脈系，這可能暗示著這幾個族群來自相同的始祖，當冰河撤退，氣溫上升之後，原始的台灣五葉松族群逐漸移往高海拔山區，並在各個山頭蔓延開來。另外的原因可能是由於這些族群地理位置接近，授粉季節時因為季風的影響，藉由盛行風攜帶花粉，造成這些族群基因流傳量大，因此族群間的分化程度不明顯。南部的兩個族群也同樣有群聚現象，屬同一小群，南橫族群與多納族群皆位於中央山脈南段，兩族群的遺傳距離很近。三峽五寮尖、石碇皇帝殿及筆架山族群屬同一小群，三個族群皆位在台北縣，遺傳歧異度的估值都偏低，分別為 0.183、0.119、0.073，由於這三個地點的台灣五葉松分佈數量很少，獲得的樣本數量相對很少（5, 2, 2），可能因而低估歧異度，但也可能是由於族群的分佈面積及數量小，原有的歧異度即低。此外，我們將兩處人工栽植的台灣五葉松一起做遺傳距離分析的結果發現，鳳崗山苗圃所栽植的台灣五葉松在遺傳距離為 0.047 時可與多納、南橫歸群，推測其種源可能取自南部地區，而扇平工作站前的台灣五葉松老樹在遺傳距離為 0.087 時可與惠蓀林場、秀巒、谷關、大坑、多納、南橫歸為一群，粗略推估其種源可能來自中南部地區。雖然台灣五葉松的族群可由遺傳距離樹狀圖劃分成不同群叢，但其遺傳距離仍非常接近，相似係數皆大於 0.872，而族群的歧異度也不高，這可能正暗示著台灣五葉松族群之基因組相似度頗高。

利用九個台灣五葉松天然族群的歧異度值（ H_e ）與緯度資料來觀察兩者之間的相關性發現（如圖 4.6），族群最大歧異度之緯度範圍介於北緯 23.2°~24.1°間。Lin（2001）彙整七種台灣廣泛分佈的樹種之

歧異度研究結果後提出，族群分佈的緯度與歧異度間有關連性存在，這七個樹種包括楊梅 (*Myrica rubra*)、牛樟 (*Cinnamomum kanehirae*)、香杉 (*Cunninghamia konishii*)、昆欄樹 (*Trochodendron aralioides*)、台灣杉 (*Taiwania cryptomerioides*)、台灣赤楊 (*Alnus formosana*) 與扁柏 (*Chamaecyparis taiwanensis*)，最高歧異度普遍位在北緯 23.6° 至北緯 23.9° 間，次高峰則位在北緯 24.2° 至北緯 24.8° 間，推論出中台灣的南投應該是主要的冰河避難所。本研究在北緯 23.6°~23.9° 間雖無取樣點，但最大歧異度之緯度仍非常接近此一範圍，而族群歧異度最大的惠蓀位在南投縣，與文獻中的結果相當符合。本研究中歧異度的次高峰在北緯 24.2°~24.6° 間，分別是谷關與秀巒族群，結果也符合上述文獻之論述。

根據 Liston 等人 (1999) 利用核糖體 DNA 的 ITS 序列來探討松屬物種之種系發生學 (Phylogenetics) 與 Wang 等人 (1999) 利用葉綠體 DNA 的 *rbcL*、*matK* 序列來研究歐亞大陸松樹之親源關係，都顯示軟木松類 (*strobus*) 與硬木松類 (*pinus*) 明顯可被劃分為兩大群。台灣原生的軟木松類包括華山松與台灣五葉松，硬木松類包括馬尾松與台灣二葉松。本研究以華山松及台灣二葉松作為近緣物種對照，發現華山松與台灣五葉松的遺傳距離很近，而台灣二葉松與華山松、台灣五葉松的遺傳距離則遠 (如圖 4.1) 根據化石證據推測在白堊紀時 (約一億三千六百萬年前)，松屬已經分化為兩個亞屬 (Millar, 1993 ; Miller, 1977)，因此台灣二葉松與軟木松類的親源關係較遠正好符合松屬植物的演化歷程。華山松的外部形態與台灣五葉松非常相似，如果只看葉特徵，實在很難辨識兩物種，主要區分特徵在於華山松灰褐色的樹皮相當光滑，毬果特別大，可達 14 cm，且種子無翅。在 RAPD 分析中我們可以找到華山松的專一性條帶，可作為辨識兩個物種的遺傳標誌。

在 AFLP 部分，研究結果只獲得 9 個多型性標誌，根據這些多型性標誌估算台灣五葉松九個天然族群之平均歧異度 (H_s) 為 0.088。實驗結果得到的多型性比例非常低，根據 Vos (1995) 文獻指出，如果能夠使用一系列不同的引子組合進行試驗，那麼應能有無限的 AFLP 標誌產生，在這些標誌中至少有一些 AFLP 標誌乃擴增自基因組的變異區域。任何物種即使只有少數的遺傳變異亦可被偵測出 (Mueller 1999)。本試驗共篩選了 48 對引子組合，僅四組能獲得少數多型性，由於試驗中的引子分別延伸 3 個選擇性鹼基 (*EcoRI*-NNN / *MseI*-NNN)，因此兩種引子分別有 64 種組合，理論來說可以有 64^2 種引子配對方式，相較之下，本試驗篩選的引子組合太少。由 RAPD 分析得知，台灣五葉松族群歧異度低，表示其基因組的相似度高，因此許多引子組合無法獲得多型性的 AFLP 標誌，如果能使用更多的引子組合做篩選，或許能有機會找到更大量的多型性。除了篩選的引子組合太少之外，針對台灣五葉松這種基因組相似度高的物種，進行 AFLP 分析時可以減少引子所延伸的選擇性鹼基數，例如 2 個或 1 個。國外松屬植物之 AFLP 分析一般會在 *EcoRI* 引子延伸 3 個選擇性核酸，在 *MseI* 引子延伸 3~5 個選擇性核酸以減低 smear 的情形 (Cervera *et al.* 2000)，但台灣五葉松試驗則不適用這種方式，再次證明台灣五葉松的遺傳歧異度明顯低於北美大陸之松類，台灣五葉松的基因組相似度非常高。

台灣五葉松多生長於峰崖峭壁之上，蒼勁挺拔，長年蔥鬱，其樹姿岡巒蒼勁，廣被利用在庭園景觀上，近年來多篇研究更指出台灣五葉松具多種藥性 (盧，2001；徐，2001；黃，2001)，是非常值得開發的醫藥資源，對台灣而言，台灣五葉松實為老天爺賜予的珍寶。

第六章 結論

本研究已經利用 RAPD 估算出台灣五葉松在族群內及族群間的遺傳變異，台灣五葉松平均族群內遺傳歧異度為 0.20，與北美及歐洲地區分佈廣泛，生機旺盛的松樹相比，台灣五葉松的遺傳歧異度較低，原因應與地理分佈與冰河期事件有關。台灣溫帶樹種的族群遺傳歧異度日益萎縮，而台灣五葉松也不例外，天擇、遺傳漂變或創始者效應都有可能是導致此物種遺傳歧異度減低的自然因素。

在族群遺傳結構方面，AMOVA 分析顯示出台灣五葉松的遺傳歧異度主要是存在族群內，而非族群間。台灣五葉松天然族群的 F_{st} 值為 0.146，說明台灣五葉松族群有適度的分化現象。AMOVA 分析估算出族群間的變異量為 14.61 %，推論台灣五葉松的交配體系應該是以異交為主。

台灣五葉松族群間的差異性不高，意味著族群間的基因流傳量大，在數十年前台灣五葉松呈現連續性分佈，因此族群間能有高度的基因流傳，但這樣的族群結構反應的是過去的台灣五葉松族群。

利用 RAPD 標誌分析台灣五葉松北、中、南地區共十一個族群之基因組，所得之遺傳距離樹狀圖顯示出族群的群叢現象與地理位置有關聯性存在，主要可劃分成兩大類群，第一類群包括鳳崗山、惠蓀林場、秀巒、谷關、大坑頭崙山、多納、南橫、扇平共八個族群，遺傳距離為 0.087 時可被歸群；第二類群包括三峽五寮尖、石碇筆架山、石碇皇帝殿共三個族群，遺傳距離為 0.099 時可被歸群。

本研究以華山松及台灣二葉松作為近源物種對照，顯示華山松與台灣五葉松的遺傳距離很近，而台灣二葉松與華山松、台灣五葉松的遺傳距離則遠。

在 AFLP 部分，研究結果只獲得 9 個多型性標誌，根據這些多型性標誌估算台灣五葉松九個天然族群之平均歧異度 (H_s) 為 0.088。台灣五葉松族群歧異度低，表示其基因組的相似度高，許多引子組合無法獲得多型性的 AFLP 標誌，如果能使用更多的引子組合做篩選，或許能有機會找到更大量的多型性。

參考文獻

- 林讚標 (1998) 族群遺傳歧異度不斷流失中的台灣溫帶林 生命科學簡訊 12 (12): 6-8。
- 柳楫 (1966) 台灣省產松柏類植物地理之研究 林業試驗所報告第 122 號。
- 徐德瑞 (2001) 台灣五葉松抗氧化及對血癌細胞 U937 存活之研究屏東科技大學食品科學系碩士論文。
- 梁立明 (1998) 關刀溪森林生態系台灣二葉松與台灣五葉松之物候現象及其在干擾地之天然更新 國立中興大學植物學系碩士論文。
- 黃生 (1991) 基因流傳與族群分化 生命科學 34(2):19-22。
- 黃雯雯 (2001) 松針及蜂膠抽提物抑制人類血癌細胞株生長之研究中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文。
- 劉業經、呂福原、歐辰雄 (1994) 台灣樹木誌 國立中興大學農學院叢書。
- 盧信芳 (2001) 台灣五葉松松針免疫活性之探討 屏東科技大學食品科學系碩士論文。
- Axelrod DI (1986) Cenozoic history of some western American pines. *Ann. Mo. Bot. Gard*, 73: 565-641.
- Berg DE, Natalia SA and Dangeruta K (1994) Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5:13-24.
- Brooker RJ (1999) Population of genetics. In: *Genetics*, pp704-724. Benjamin/Vummings.
- Critchfield (1969) Subdivisions of the genus *Pinus* (pines). *USDA Forest Service Misc. publ.* 1144.

- Cervera MT, Remington D, Frigerio J-M, Storme, Ivens V B, Boerjan W. and Plomion C (2000) Improved AFLP analysis of tree species. *Can. J. For. Res.*, 30:1608-1616.
- Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- DeVerno LL and Mosseler A (1997) Genetic variation in red pine reared by RAPD and RAPD-RFLP analysis. *Canadian Journal of Forest Research*, 27:1316-1320.
- Dí az V, Muñiz M, and Ferrer E (2001) Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology*, 10:2593-2603.
- Farjon AFLS (1996) Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and palaeo-endemism. *Botanical Journal of Linnean Society*, 121:365-384.
- Fritsch P, Rieseberg LH (1996) The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, pp54-73. Oxford University Press, New York.
- Fazekas AJ and Yeh FC (2001) Random amplication polymorphic DNA diversity of marginal and central populations in *Pinus contorta* subsp. *Latifolia*. *Genome*, 44:13-22.
- Hamrick JL, Godt MJW (1989) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*, pp43-63 Sinaauer Associates, Sunderland.
- Hamrick JL, Mary JWG and Susan LS-B (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6:

95-124.

Hoelzel AR and Dover GA (1991) *Molecular Genetic Ecology*. pp1-12. Oxford University Press.

Hoelzel AR and Dover GA (1991) In: *Molecular Genetic Ecology*, pp1-12. Oxford University Press.

Hamrick JJ, Godt MJ, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. *New Forest*, 6:95-124.

Klaus W (1989) Mediterranean pines and their history. *Plant Systematics and Evolution*, 162: 133-163.

Loveless MD and Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 15:65-95.

Ledig FT (1988) The conservation of diversity in forest trees. *BioScience*, 38(7):471-479.

Little, ELJ, and Williams WB, Anne RK, Kenneth JL, Antoni JR and Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22): 6531-6535.

Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3:91-99.

Liston A, Robinson WA, Pinero D, and Alvarez-Buylla, ER (1999) Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 95-109.

Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho, JP and Lovato MB (2001) Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathmenia reticulata* (Mimosoideae), a tropic tree from the Brazilian Cerrado.

- Molecular Ecology*, 10:1143-1152.
- Lin T-P (2001) Allozyme variations in *Michelia formosana* (Kanehira) Masamune (Magnoliaceae), and the inference of a glacial refugium in Taiwan. *Thero Appl Genet*, 102: 450-457.
- Mirov NT (1967) *The genus Pinus*. Ronald Press Co., New York.
- Miller CN (1977) Mesozoic conifers. *Bot. Rev.* 43: 217-280.
- Mosseler A , Egger KN and Hughes, GA (1992) Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA makers. *Can.J.for Res.* 22:1332-1337.
- Millar CI (1993) Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus* L. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 80: 471-498.
- Millar CI (1998) Early evolution of pines In D. M. Richardson, *Ecology and biogeography of Pinus* 69-91 Cambridge University Press, Cambridge.
- Moritz C and Daniel PF (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol. Ecol*, 7:419-429.
- Mueller UG and Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE*.14(10):389-394.
- Mariette S, Chagné D, Lézier C, Pastusazka P, Raffin A, Plomion C and Kremer A (2001) Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, 86: 469-479.
- Nei M, Maruyama T and Chakraborty, R (1975) The bottleneck effect and population variability. *Evolution*, 29:1-10.
- Newton AC , Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ and Ennos RA (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the

- conservation of tree species. *TREE*, 14(4): 140-145.
- Powell W, Morgante M, Andre C (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, SSR (microsatellite) makers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2:225-238.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of populations. *Science*, 236:787-792.
- Strauss, S H and Doerksen , AH (1990) Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution*, 44: 1081-1096.
- Schoen DJ, Brown HD (1991) Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating system in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:4494-4497.
- Silvertown, JW and Doust JL (1993) Variation and its inheritance. In: *Introduction to Plant Population Biology*, pp15-31. Blackwell Scientific Publications.
- Szmidt AE, Wang X, Lu M (1996) Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity*, 76:412-420.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT and Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol. Ecol.* 7:465-474.
- Tsukada M (1966) Late Pleistocene vegetation and climate in Taiwan (Formosa) *PROC*, 55:543-548.
- Tsukada M (1967) Vegetation in subtropical Formosa during the Pleistocene glaciation and the Holocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 3:49-64.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*

17(16):6463-6471.

- Thomas BR, McDonald SE, Hicks M, Adams DL, Hodgetts RB (1999) Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 98:793-801.
- Vos P, Rene H, Marjo B, Martin R, Theo, van de L, Miranda H, Adrie F, Jerina P, Johan P, Martin K and Marc Z (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4407-4414.
- Wright S (1978) Variability Within and Among Natural Populations In: *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago.
- Williams JGK, Anne RK, Kenneth JL, J. Antoni R and Scott V T (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18(22):6531-6535.
- Wang, X-R and Szmidt AE (1993) Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian *Pinus* species (Pinaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 188: 197-211.
- Wagner DB (1992) Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphism as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forest*, 6:373-390.
- William, JGK, Hanaffey M, Rafalski KJA and Tingey, SV (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods. Enzymol*, 218: 704-740.
- Wang X-R, Tsumura Y, Yoshimaru H, Nagasaka K and Szmidt AE (1999) Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based

on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequence. *American Journal of Botany*, 86(12): 1742-1753.

Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1995) DNA Fingerprinting in Plant and Fungi. CRC Press, Boca Raton.

Yeh, FC and Boyle, TJB (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129: 157.

Yeh, FC, Yang R-C, Boyle TBJ, Ye Z-H, and Mao JX (1997) POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

附錄

附錄 1 RAPD 原始資料，共 13 個族群 (column)、102 個標誌 (row)。縱列第一排表示族群，數字 1 至 13 分別為鳳崗山、多納、扇平、南橫、惠蓀、大坑、谷關、五寮尖、皇帝殿、筆架山、秀巒、華山松、台灣二葉松。

```
1 11100101100001110010000000110101111101100111011000001000011001100011100000000001101100000101100011000
1 11000101100001110000000001100001111111000110011000001100011001100010100000000001011100011101000110000
1 110001011000011100101000001100011110010101100110100011100110101000011100000000001101100000100110110000
1 01100101100001110010000000100111111011010110011001010110011000100001100000000001011100000100110011000
1 11100101100001110010000000110100101001010111011001001100011011100001100000000001101100000100100010000
1 01101101100001111010000000100100100101100111011000001110011100100101000000000001101100000100100011000
1 011101110000011101000000001001001001010101100110000011100110101000111000000000001101100000100110101000
1 110001011000011100000000000000100110001010110011000001100011011100101000000000001101100000100110111000
1 1110011111000011101110000011100011010010101110110100011000010101001011100000000001011100001100100110000
1 011001011000011100101000011100011001010101110110000011000110101000111000000000001101100000100100111000
2 11100111100001110000100001100110100011010110011000101100011010100000100000000000011100001101101011000
2 011001111000011100001000001000111101110101110110000101000110101001011000000000001101100011100110001000
2 011101011000011100011000011001111010110001110110001011000110101001011100000000001011100000101101110000
2 011000011000011100000000001000111010110101110110000011000110101001010110000000000101100000101101001000
2 111001011000011100111000011000111001110101100110001011000110101001111000000000001011100001100001010000
2 011001011000011100000000001000111001110101100110001101000110101001010000000000001101100001100100101000
2 11110111100001111010100001100011100111010111011000001100011010100101100000000000101100001100100001000
2 011001111000011101111000001100111001110111110110000011000110101001011000000000001001100001100101101000
2 011011110000011100100000011010011000110101110110100011000010101000010110000000000011100001100111101000
2 0110111110000111000000000001010111100110101110110001011000110001000011000000000000101100000100001011000
3 011001111000011100101000001001011000010101100110000011000110101001011100000000001011100000100110011000
3 010001111000011100100000001000011010111001100110000011000110001001011000000000001101100001100100011000
4 011100111000011100100000001010011001110111110110000011100010001001001001000000000001101100011100111101000
4 111010111000011100101000001000011101010101110110010011000110001000101000000000000101100000100111101000
4 01110110100001110010000000100111101001010111011100001000011000100110101000000000001100001100101011000
4 0110010110000111001000000110100110101101011001100000110001101000001100000000000001100001100110111000
4 11100101100001110010000000100111101001001111011000001000010001000001100000000001001100001101100101000
4 011001011000011100100000001010011000000111100110000011000110001000011000000000001001100001100100101000
4 011001111000011100100000000001001000110101100110010010000110001001010010000000001101100000100100011000
```

4 01100101100001110010000001100100101001011110110000011100110001000111000000000001101100000100111110000
4 11100101100001110010000000010111101111011110111010010100010101001010110000000001001100001100101001000
4 111110101000011100100000000100111010110101110110010100100110001000011010000000001001100001100101101000
4 11101110100001110010100000100111101011010110011000010000011101100000100000000001001100011101100001000
4 111000111000011100100000000100111101001010111011000001100110001001110010000000001001100000100100101000
4 1110101110000111000000000000011110000101011001111000101100110010000010010000000001001100011101101101000
4 111111011000011100000000000000011110001100110011100101110011000100101100000000001011100000100110101000
4 111100111000011100101000000001001000110101100111000101100010011000011000000000001101100000101101001000
4 111011011000011100101000001000001011110101100110100101100110111001111000000000001101100000100110011000
4 111001111000011100001000010000111000010111110110001011000110101001010000000000000001100001100110011000
4 111001101000011100100000000000011011110111100110001011000010101000010000000000000011100000101101001000
4 111101101000011101000000001001111001110101110110100011000110011001011000000000001101100001100100001000
4 111001011000011110001000001001111000110101110111100011100110011000011000000000001011100000100001001000
4 111101111000011100110000001001001000110111110111100101000010001001000000000000000011100000101101011000
4 011101111000011100000000000001111000110111110110001010000110101000011000000000000011100000101110101000
4 011001111000011100000000000001111010110101110111100100100110101000011110000000001001100000101100011000
4 01110110100001110010000000100111101011011110111000001100010001001011000000000001001100000100101010000
4 011001011000011100100000000001110011101011101110000110000101010010110000000000000011100001100101111000
4 011001111000011100100000001001111010010111110111100011100110101000011000000000001111100000100101110000
4 01100111100001110001000000100000100011001111011110001100011000100101101000000001101100001101101011000
4 011001111000011100010000001000001000110011110111100011000110101001111010000000001101100001101101011000
4 011001111000011100100000000001111000110111110110001011000110101001001000000000001001100000101101111000
4 011101101000011100000000000001111010110111110111001011000110101001110000000000000001100000100001011000
4 111011111000011100100000010001111010110101100111100101100110001001011000000000001011100001100101010000
4 0111011110000111001000000111010010101101011001111011101000110101001011000000000000101100000101000011000
4 1110011111000011100000000000001111010110101110111100100100110101000011110000000001111100000101000011000
4 111001111000011100101000001100111100101011111011110001100001010100001100000000000001100000100001011000
4 111011111000011100100000000001111010110101100111100101100110101000011000000000001011100000101001010000
4 110001111000011100101000001010111001110001110111000011000110110000011000000000001111100000101011001000
4 011001101000011110100000000010111001110111110111000011000110101000011001000000001001100000001101000000
4 011001111000011100011000000101111000110011110111000001011000101110000110000000000001100000100101010000
4 010011011000011100100000000001001010110011100110010101100110001000011000000000000101100000100111100000
4 01100101100001110000000000000111101011011111011110001100011000100000101000000000001100010100101100000
4 111000111000011100100000011001111000110111110111101011000110101001111000000000000011100000100011000000
4 011011011000011100100000010110001000010111110111101101000110011000011000000000001011100010101100001000
4 011011111000011100110000001100111000110111100110010001000010111001111010000000001001100000100100001000
5 010100011000011100100000000001001101110101100111100011100110101001011000000000001011100000100100011000
5 010001011000011100100000001100111110011001110111000011000110101000111000000000001011100000100110011000

5 01000001100001111010000000100111101011011110011000001100011010000101100000000001011100000100100101000
5 011101011000011110100000001100111000010101110111100011100110101001111000000000001101100010100110011000
5 111001011000011110100000001101111110110011101111000111001100010010010010000000001011100000100101011000
5 01100101100001110011000000011011111011010110011110001100011011100111100000000001011100000100110001000
5 111101011000011110100000000110111101111001110111100011000110101001111000000000001101100000100100111000
5 0111010010000111000100000001100111100011001110111100010100110111000011000000000001101100000100110000000
5 11110111100001110000000000011001111101110011101110000110001100010010011000000000001101100000101101001000
5 1101011110000111001100000010100111110111001100111000011000110101001010000000000001011100000100110000000
5 01100101100001110000000000001001111101110011101101100111001101010010010000000000001101100010100101100000
5 0110010010000111001100000000100111110011011101101000110001101110011110000000000001101100000101010101000
5 11100100100001110010100000010010010100110011101101000111001101010011110000000000001011100000110010001000
5 01110101100001110110000000010101111100110011101101001010001101010001110000000000001101100000000010101000
5 010000001000011100100000000000111100101000111011010001000011010100011000000000000011011000000000110010000
5 011001011000011110110000000110111111001010111011010001110011010100111100000000000010111000000000110100000
5 11110101100001110010000000001001111010101011101100000110001101010010100000000000001101100000111101100000
5 01011100100001110010000000001001111001100111101101000110001100110010100000000000001101100000100011010000
5 01000100100001110010000000011011110101110111101101001011001101110010110100000000001101100000100010101000
5 010001011000011100000000000110111110110101110111100101000110001001001000000000001011100000101100010000
5 11010101100001110010000000010010011011101011101100000111001100010000100000000000001101100000100111100000
5 010001011000011110100000000010111100111001110011110001110011010100000100000000000001101100000000100011000
5 01010101100001111110100000101001110000010111110110010011100110101001010100000000001101100000100110111000
5 0110000110000111001000000010100111101010001110110000011000010011001111000000000001101100000101110101000
5 0100011000000111101000000001001111100011001110110000011100110101001011000000000001011100000100110001000
5 01110101000001110010000000011000011101110011001110000110001101010011010010000000001011100000100111111000
5 01100101000001110010000000011001111101110011001110000110001100010011010010000000001101100000100111111000
5 110001010000011100100000000110111111011101011101110000110001100010000111000000000001101100000100111110000
5 111101010000011100100000000110011111011101011101110010111001101110001110000000000001101100000001110100000
5 01100101000001110010000000011011111110101111001110000110001100010010010010000000001101100000100101111000
5 110001000000011100101000000110001110001010111011011001000011100000000110000000000001101100000111100101000
5 11110100000001110000000000011000111101101011101101000011100110001001010000000000001101100000111101110000
5 0110000100000111000000000001001011110101011001100100110001100010001000100010000000001011100000100110101000
6 01010111000001110010000000011011111000100011001101000111001101010001110010000000001101100000111100101000
6 01010101000001110010000000010100111110110001110110100011000111101001011000000000001101100010111110101000
6 0111010100000111001000000001100111101101011101101100110001110010010100000000000001101100010100110101000
6 01110101000001111010000000010000111001101011101101000110001111010010110000000000001011100010111110101000
6 01110110000001110010000000010010111101101011001100000110001100010000110000000000001101100011111110101000
6 01010101000001111000000000010001111110010001110110100011000111101001011000000000001101100000110100001000
6 01000011000001111010000000001001111100101011001101000111001101010010110000000000001001100010110100110000
6 0101000100000111001000000000011111100101011001100000110001100010010110000000000001101100000001100001000

7 111001000000011100110000001100111100111001110111100100100110100001001000000000000001100011101100001000
7 01000101000001110010000000110011110110101110110000011000110101001011001000000001101100000110010100000
7 011101110000011100100000001100011111010101110110110011000110101001011000000000001101100000111110010000
7 010001010000011100100000001000011110010101110110000011000110100000011000000000001101100000101110101000
7 01100101000001110010000000010011111001010110011000001100110101001011001000000001101100000100110111000
7 01000101000001110010000000110001111011010110011000001100110001001001000000000001101100000110110111000
7 011000000000011100100000000100011110110101100110000011100110101001001001000000001101100011110110111000
7 011101000000011100100000000100011110110101100110100011000110101001011110000000001101100000101110100000
7 010101111000011100100000000100111101010101100110010011100110110001010101000000001101100000111110011000
7 011001010000011100100000000000011101110101110110111101100110001001011100000000001011100000100100111000
7 0100011100000111000000000000000111110010101110110000011000110001001011001000000001011100000100110101000
7 010001010000011110100000000100011110010101100110101011000110001000011000000000001101100000100110101000
8 010101000000011110110000000101111101010101110110100011100111011000111000000000001111100000100110101000
8 011101011000011110100000001100011101110101110110100011100111101001111100000000001011100000000111011000
8 011001111000011101100000001100011101011001110110100011100110001001101100000000001011100000000101110000
8 011000111000011100100000001101011101010101110110110011100110001001111100000000001111100000000110111000
8 01101011100001110010000000011001110111100111011000001100011000100111110000000001011100000001111101000
9 010001011000011100000000000100011110111001110110000011000111001001111010000000001101100000001110000000
9 01110010100001110010000000010001111001010111011010001100011010100111100000000001101100000100110111000
10 0110010110000111001000000001010111001110011101100000110001110010011111000000000001001100000100110000000
10 01101101100001110110000000010101111001100111011010001100011111010011111000000000001101100000101010101000
11 110111011000011100111000000001011110110101110110010011000111001000011000000000001101100001111100000000
11 111111011000011100101000000000011101010001110110010011000110001000011000000000001011100001000110010000
11 110111010000011100011000000100111100110001110110010011000111001000011000000000001101100000100100011000
11 010101011000011100101000000101111101010101100110010011000111001000011000000000001101100010101110010000
11 111100011000011110100000000001111101010111110110010011000110111001101000000000001101100000101010011000
11 111101011000011100100000000001111101110111110110000011000110111001010000000000001011100000101010011000
11 011101011000011100100000000101111101110001100110000101100110101001011000000000001011100010100100011000
11 011001111000011100101000000100111100111001110110010011000110101000011000000000001001100000100100001000
11 01000101100001110010000000010101110101010110011001001110011011000111100000000001101100010000010101000
11 01100101100001110010000000010101110101001111011001010100011001100101100000000001101100000100010011000
11 010001011000011100110000000001111110011001100110100011100111011001111100000000001101100010100100110000
11 011001111000011100101000000101111101111001110110101011000111101001011000000000001101100010100110011000
11 011000111000011100100000000100011111001000111011010010100011011000101100000000000101100000001110001000
11 110001111000011100100000000100111101010001110110000011000110101001010100000000001101100001100010011000
11 011000111000011100100000000001111101011011110110010011000110001001111000000000001101100000100110101000
11 0100011110000111001100000000010111010110011101101001010001100010010110000000000001011000111100100101000
11 11000101110000111001000000000001111100111011001100101011001100010010110000000000011011000111100100001000
11 01000101110000111000010000000001111100101011101100100011001100000000001101100000100110101000

11 0100011000000111011000000000011110101100111011010001100011010000101110000000000001100000100010011000
11 011001111000011100110000000100111101011001110110100100100110011001011000000000001101100001100010001000
11 011001011000011100111000000100011101010001110110010101100110001001011000000000001001100000100110011000
11 011001111000011100100000000000111101010001110110000011000110101001011000000000001101100001101010011000
11 011001110000011100110000000000011111001100110011000110000011100100111100000000000101100001110100101000
11 01000101100001110010000000010001110111010110011000001010011010100101100000000000101100010111101011000
11 01000111100001111010000000010011111001100110011000110100011100100111100000000001101100001101101101000
11 011001011000011100100000000001011101010101110110000101000110011001111001000000001101100000100101011000
11 010001001000011101111000001000011110010001100110010101000110101000111000000000001101100000100111101000
11 011111001000011100101000000100011110010101110110000101000110101000110001000000001001100000101111111000
11 0101010110000111001000000001101111101111001110110000011000110001001011100000000001001100001100011001000
11 011001111000011100110000001100111110011001100110001100000111101001111000000000001101100001111010101000
11 0100011110000111001000000011000111010110011101100000110001101000010111100000000001001100001100110011000
11 011000111000011100110000000101011110110101100110000100000111001001111000000000001101100001111110111000
11 010001111000011100100000001100011101010001110110000101000110100001011100000000001001100000000010011000
11 010001111000011100100000001110011110111001110110010011100111101000011000000000001001100010111101100000
11 011001011000011100100000001100011101011001100110000011100110101001111000000000001101100010111010111000
12 011110000000110000000110001000111110000101100110000000000100101011000000101001000001100100000000000011
12 111110000000110010000110000000111110000101100110000001000100010001000000100010010000100010000000001011
12 010111000000111000000110001100111110000101100110000001000100010011000000101010011000100110100000001011
13 000000000111000000000001100010100100000000001001000000011000000100000100010100010000011010000000000100
13 000000100111000001000001100000000100000000001000000000011000000100000100010100110000011010000000000100
13 00000000011100000100000110001010010000000000100000000001100000010000010001010011000001100000000000100

附錄 2 AFLP 原始資料，共 11 個族群 (column) 119 個標誌 (row)。縱列第一排表示族群，數字 1 至 11 分別為多納、南橫、惠蓀、大坑、谷關、五寮尖、皇帝殿、筆架山、秀巒、華山松、台灣二葉松。

```
1 00111100000110101011100001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
1 00111100000110101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
1 00111100000110101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
1 00111100000110101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
1 00111100000110101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
1 00111100000100101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
2 00111100000110101001000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000101
2 00111100000110101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
2 0011110000010010101100000111111101110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
2 0011110000011010101100000111111101110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
2 0011110000010010101100000111111101110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
2 0011110000010010101100000111111101110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
3 00111100000110101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
3 00111100000110101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
3 0011110000011010101100000111111101110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
3 0011110000011010101100000111111101110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
3 0011110000011010101100000111111101110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
4 00111100000110101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
4 0011110000011010101100001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
4 0011110000011010101100001111111011110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
4 001111000001001010110000111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
4 0011110000011010101100001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
4 0011110000011010101100000111111101110011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
5 0011110000011010101100001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
5 0011110000011010101100001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
5 00111100000100101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
5 0011110000011010101100001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
5 00111100000100101011000001111111011100011111100101110101001101011111001111111101101111110011010111011111101000100
6 001111000001101010110000011111110111000111111001011101010011001111111001111111101101111110011110111011111101000100
```

6 001111000001101010110000011111101110001111110010111010100110011111110011111111011011111100111101110111111010000100
6 00111100000100101011100001111110111000111111001011101010011001111111001111111110110111111100111101110111111010000100
6 00111100000110101011100001111110111000111111001011101010011001111111001111111110110111111100111101110111111010000100
6 0011110000011010101110000011111110111000111111001011101010011001111111001111111110110111111100111101110111111010000100
7 001111000001101010111000011111110111000111111001011101010011011111110011110111110110111111100110101110111111010000100
7 0011110000011010101110000111111101110001111111001011101010011011111110011110111110110111111100110101110111111010000100
8 00111100000100101011100000111111101110001111111001011101010011011111110011110111110110111111100110101110111111010000100
8 00111100000100101011100000111111101110001111111001011101010011011111110011110111110110111111100111101110111111010000100
9 001111000001001010111000001111111011100011111110010111010100110111111110011110111110110111111100110101110111111010000100
9 0011110000010010101110000011111110111000111111100101110101001101111111110011110111110110111111100110101110111111010000100
9 0011110000011010101110000011111110111000111111100101110101001101111111110011110111110110111111100110101110111111010000100
9 0011110000011010101110000011111110111000111111100101110101001101111111110011110111110110111111100110101110111111010000100
9 001111000001101010111000001111111011100011111110010111010100110111111110011110111110110111111100110101110111111010000100
9 0011110000010010101110000011111110111000111111100101110101001101111111110011110111110110111111100110101110111111010000100
10 00111100000100101011100000111111101111001111111001011101010010011111111001111111110110111111100111111110111111010000111
10 001111000001001010111000001111111011110011111110010111010100100111111110011110111110110111111100110111110111111010000111
11 11000011111001010101011110000000100001111001001101001101011001101000101100000000001111000101011000101001001000101111000
11 11000011111001010101011110000000100001111001001101001101011001100000101100000000001111000101011000101001001000101111000