

台灣山柳的保育遺傳學研究

受委託者：社團法人台灣植物分類學會

研究主持人：黃生

協同主持人：王震哲

研究人員：吳家進、廖培鈞、鄭杏倩
、劉威廷、郭福麟

內政部營建署雪霸國家公園管理處

保育研究報告

中華民國九十六年十二月

目次

表次	III
圖次	IV
中文摘要	V
英文摘要	VI
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起與背景	1
第二節 目的	2
第二章 材料與方法	3
第三章 結果與討論	5
第一節 結果	5
第二節 討論	6
第四章 結論與建議	7
參考資料	24

表次

表 2-1 台灣山柳族群採集地點	9
表 2-2 表現序列標幟所設計之引子	10
表 3-1 台灣山柳族群的多樣性指數	11
表 3-2 台灣山柳族群的中性假說檢測	14
表 3-3 台灣山柳族群的分化指數測定(核 DNA 部分)	15
表 3-4 台灣山柳族群的分化指數測定(葉綠體部分)	16
表 3-5 台灣山柳及其外群各族群之間核 DNA ITS 片段的 haplotype	17
表 3-6 台灣山柳及其外群各族群之間葉綠體 DNA <i>trnL-trnF</i> 片段的 haplotype	18
表 3-7 台灣山柳及其外群各族群之間葉綠體 DNA <i>rpl16</i> 片段的 haplotype	19
表 3-8 台灣山柳各族群的 EST 片段類型組成	20

圖次

- 圖 3-1 台灣山柳及其外群核 DNA ITS 片段的 Minimum spanning network 21
- 圖 3-2 台灣山柳及其外群葉綠體 DNA *trnL-trnF* 片段的 Minimum spanning network 22
- 圖 3-3 台灣山柳及其外群葉綠體 DNA *rpl16* 片段的 Minimum spanning network 23

台灣山柳的保育遺傳學研究 摘要

一、研究緣起

台灣原生的柳屬植物共有 9 個分類群(5 種 4 變種)，皆為台灣的特有種，其中台灣山柳(*S. taiwanalpina*)類群分佈於雪山、南湖大山以及清水山等高海拔地區，皆呈小族群分佈，且棲地侷限於山頂或稜線附近，生存環境近極端狀態，故受環境之影響更為劇烈。近年來，全球氣候變遷趨勢明顯，分佈於高海拔地區的生物，因受限於其狹窄的棲息地(niche)而可能受生存威脅，先以台灣山柳為標的物種，探討其族群內、族群間的生態遺傳格局，評估其生存策略。

二、研究方法及過程

本次研究主要針對雪山、南湖大山、清水山進行族群採樣，共計 108 個個體。將新鮮材料萃取 DNA 之後，選用非轉譯區域進行研究，設計引子增幅核 DNA 的 ITS 片段；葉綠體 DNA *trnL - trnF* 以及 *rpl16* 片段。另外參照 NCBI 的表現序列標幟(EST)，設計六組微衛星 DNA 片段引子，增幅其片段。計算核苷酸歧異度、單基因型歧異度分析和族群分化指數，瞭解變異程度，評估環境變化對於高山柳的衝擊影響。

三、重要發現

根據目前實驗結果，台灣山柳的族群基因歧異度偏低($h = 0.0011-0.0034$)，族群之間未見明顯分化，顯示台灣山柳族群內均缺乏基因多樣性。然而台灣山柳之形態差異明顯，是否顯示在台灣的特有山柳分類群，在最近的冰河退卻之後，快速擴張而形成。其演變快速而少變異的演化策略，能否因應近代快速的氣候變遷，是個生物多樣性保育上的基礎問題。

四、主要建議事項

根據本研究做出下列建議：1.遺傳方面：應當針對台灣山柳關於環境相關的功能性基因進行研究。2.生態方面：根據本研究結果，可進一步研究其他分佈於高山的物種，是否具有相同的生存壓力，瞭解環境對於物種的威脅。

Conservation and genetic studies of *Salix Taiwanalpin* in Taiwan.

Abstract

The phenomena of global warming will have great impact on the living organisms, especially which live in alpine area. We use *S. taiwanalpina* as a model species to study its impact in terms of genetic diversity. DNA was extracted and primers were selected to amplify nrDNA ITS sequences and cpDNA *trnL-trnF*, *rpl16* sequences. Besides, 6 EST primers were designed from NCBI database, and microsatellite loci were amplified. We use DnaSP to analyze nucleotide diversity, haplotype diversity, and θ . The result showed that there is little genetic diversity between populations and this opposed the result studied from morphology data. We proposed that rapid expansion of this species after the retreat of glacial may be the reason.

Keywords: *S. taiwanalpina* 、 *trnL-trnF* 、 *rpl16* 、 global warming.

台灣山柳的保育遺傳學研究 期末報告

第一章 緒論

第一節 研究緣起與背景

全球暖化對於地處寒帶或在高海拔的生物影響極大，原本生長於寒帶的生物會因為棲地受到溫度升高的影響而有逐漸往北移的現象，而高海拔的生物則會有棲地壓縮化的現象(Danby and Hik, 2007a; Danby and Hik, 2007b; Fosaa *et al.*, 2004)。尤其是分佈在山頂、稜線上的高海拔物種所受到的影響更加嚴重(Danby *et al.*, 2003)，也可能增加外來種植物入侵的機會(Mcdougall *et al.*, 2005)。分佈在高緯度的柳屬植物(*Salix*)對於氣候暖化的反應亦為明顯(Danby and Hik, 2007b; Fosaa *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1999)，且前人研究(Jump, *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2003)也指出溫度變化的確會使在不同棲地的同種生物，具有明顯的遺傳分化而可能進一步造成地區性適應的現象(local adaptation)。

在台灣高山林立，許多物種常呈侷限分佈，例如南湖柳葉菜(*Epiolbium nankotaizanense*)為台灣特有種，且僅分佈於雪山、南湖圈谷以及少數分佈於關山，這樣的物種受到的環境壓力會因為溫度提高而增大；近期媒體報導冷杉林面積有向上擴張的趨勢(2007. 12 報導)，不論是否因溫度變化所致，高山生態系組成之變化已然顯現分佈在森林線上與稜線之灌叢與草原。

台灣原生的柳屬植物共有 9 個分類群(5 種 4 變種)，皆為台灣的特有種，其中分佈於高海拔的分類群，大多生長在山頂或稜線附近，形成匍匐或低矮的小灌木。高海拔的分類群可以分成台灣山柳(*S. taiwanalpina*)以及關山嶺柳(*S. okamotoana*)兩大群，其中關山嶺柳僅侷限分佈於關山嶺山一帶，而台灣山柳又可以分成三個變種，分別為台灣山柳(var. *taiwanalpina*)、高山柳(var. *takasagoalpina*)與玉山柳(var. *morrisonicola*)，其中台灣山柳僅分佈於台灣北部山區，以雪山主峰至北峰稜線的族群為最大的族群，其次為南湖大山以及中央尖山一帶，清水山山頂的族群則相對較小。此三大族群分佈均在高海拔的稜線之上，在全球暖化的影響之下，族群可能遭受強烈的壓力而造成族群退縮。然而棲地有限，除非已有適應策略，否則將難以適應棲地而滅絕，故需先就其基因多樣性進行研究，明白其基因組成。本團隊近年研

究之工作偏重此領域如關於蠅子草屬(*Silene*)基因庫遺傳多樣性保育研究(林, 2006)。在前人研究(Shih, *et al.* 2007)結果顯示分佈於雪山的物種存在著較高的遺傳多樣性，故判斷此地區可能為冰河時期生物的避難所，有利當極端環境下，保存物種不受到滅絕，本研究即針對分佈於雪山的台灣山柳族群，作基因多樣性的探討。

第二節 目的

有關亞熱帶地區高山植物受到氣候暖化影響的研究甚少，尤其對於遺傳組成變化的研究更加缺乏，台灣位處亞熱帶且島上高山林立，且高山特有物種繁多(Peng *et al.*, 1994)，是適合研究氣候變遷對於物種影響的地區。根據前人研究(Agisdottir, 2007；林, 2006；陳, 2002)侷限分佈於高山的物種，均有基因歧異度偏低的情況，本研究推估台灣山柳在族群之內或族群之間可能變異偏低，此現象可能為冰河退卻，族群經過瓶頸效應(Agisdottir, 2007；徐, 2006)，快速擴張而形成。

本研究之目標(1)以分佈在雪山、南湖大山以及清水山的台灣山柳為對象，檢測其族群遺傳組成，並找出核心族群。(2)依據基因多樣性之檢測結果，評估其族群內、族群間的基因變異度大小，及其族群之動態。(3)評估台灣山柳的保育重點。

第二章 材料與方法

1. 採樣

本研究根據各大標本館之採集記錄，針對台灣山柳三大族群進行採樣。根據族群大小採取 20 株(清水山族群)至 50 株左右(雪山及南湖大山族群)個體的新鮮葉片，並分別在不同地點挑選數株關山嶺柳與其他台灣產柳屬植物當作外群。自野外採集之後隨即以矽膠快速乾燥，帶回實驗室進行後續遺傳實驗。本次採集樣本總計 109 個個體，採集地點如表 2 - 1。

2. DNA 萃取

將材料利用液態氮磨碎之後，利用 Plant Genomic DNA mini Prep Kit (VioGene) 萃取 DNA，將 DNA 溶於 ddH₂O，以 1% agarose gel 電泳檢查其完整性。

3. 遺傳多樣性檢測以及分析

本次研究根據前人對於柳屬植物的親緣關係研究(Baker, 2000)，以及針對不同葉綠體 DNA 片段變異位點多寡的差異比較(Shaw, 2005; Shaw, 2007)。挑選核 DNA 的 ITS 片段，參考 White *et al.* (1990) 的意見，利用其設定之引子 ITS-4 (5' TCCTC CGCTTATTGATATGC3') 與 Sang *et al.* (1995) 所修改的引子 ITS-5m

(5' GGAAGGAAGAAGTCGTAACAAGG3')，將 ITS 片段增幅；在葉綠體 *trnL-trnF* 片段，參照 Taberlet *et al.* (1991) 所選用引子以 primer c (5' GGTTCA AGTCCCTCTATCCC 3') 與 primer d (5' ATTTGAACTGGTGACACGAG 3') 放大 *trnL-trnF* 片段；另外 *rpl16* 片段，則參照 Steven (2007) 所設計的引子，*rpl16-int-f-2* (5'-AATAATCGCCCGCGAAGATTTT 3') 和 *rpl16-1516R* (5'- CCC TTCATTCTT CCTCTATGTG 3') 增幅其片段。

經由 BioEdit (ver. 7.0) (Hall, 1999) 進行序列排序之後，以 DnaSP (ver. 4.10.9) (Razas *et al.*, 1995) 計算族群內、種內的多樣性指數，主要計算核苷酸歧異度 (nucleotide diversity, π)、單基因型歧異度 (haplotype diversity, h) 分析和核苷酸歧異度的 θ 值。將序列檔案利用 DnaSP 轉檔為 Arlequin 格式，利用 Arlequin (ver. 3.1) (Schneider *et al.*, 2000) 計算族群分化指數 (F_{st})，當 $F_{st} < 0.05$ 代表幾乎無分化； $0.05 < F_{st} < 0.25$

代表低度到中度分化； $F_{st} > 0.25$ 代表高度分化(蔣, 2004)。

另外藉由中性假說測定(neutral hypothesis test)，檢測族群變異的存在與否只受到基因漂流影響(genetic drift)，不受到天擇或族群大小影響，藉由DnaSP 軟體中的Fu&Li (1993) D^* test以及 F^* test，和Tajima (1989)的 D test，檢測中性假說，當上述的三個檢測其值為負值代表族群偏離中性假說，顯示族群遭受環境因子影響。並藉由MEGA軟體(Ver. 3.0)將特徵差異轉換成距離矩陣，再使用MINSPNET軟體進行最小關聯網狀圖的建構。

在微衛星DNA(microsatellite)方面，參照NCBI的表現序列標幟(Expressed sequence tag, EST)，EST為具有功能性的區域，是先將物種的mRNA萃取之後，利用隨機引子進行RT-PCR，再以限制酵素切割，進行選殖；選殖之後將菌落進行單一次自動化定序，所得的序列稱為EST。本研究設計六組引子(表2 - 2)增幅其片段，利用Arlequin 估算族群間及種間的遺傳分化。

瞭解各族群之間的基因交流情況。以瞭解三大族群的遺傳變異程度，並推估族群歷史以及有效族群大小，評估近百年來溫度上升對於高山柳的衝擊影響。

第三章 結果與討論

第一節 結果

本次研究成功增幅了台灣山柳的 5 個族群，以及白毛柳和褐毛柳 2 個族群，共計 7 個族群，在核 DNA 的 ITS 部分成功增幅 73 條序列，長度約為 785 bp，葉綠體 DNA *trnL-trnF* 部分成功增幅 95 條序列，長度約為 407bp 以及 *rpl16* 部分成功增幅 95 條序列，長度約為 460bp。

分析序列顯台灣山柳的多樣性指數偏低(表 3 - 1)，在 ITS 片段方面 $h = 0.0031$, $\pi = 0.0015$, $\theta = 0.0035$ ；*trnL-trnF* 片段 $h = 0.0034$, $\pi = 0.0010$, $\theta = 0.0036$ 以及 *rpl16* 片段 $h = 0.0011$, $\pi = 0.0027$, $\theta = 0.0034$ 。中性假說檢測方面(neutral hypothesis test)，Tajima's D、Fu & Li D*、Fu & Li F*檢測結果顯示(表 3 - 2)，大部分均為負值，尤其以 ITS 片段最為明顯，顯示均偏離中性假說。在族群分化指數(Fst)，方面，ITS 片段大部分介於 0.05-0.25 之間(表 3 - 3)，屬於低度到中度分化之間；能高族群(STNK)對於清水山(STCS)、雪山(STH)、南湖大山(STNF)族群具有高度分化情況(0.253 - 0.295)；另外清水山族群也對其他族群具有中到高度分化(0.104 - 0.253)。葉綠體部分 *trnL-trnF* 片段和 *rpl16* 片段幾乎均在 0.05 以下(表 3 - 4)，代表葉綠體 DNA 在各族群之間幾乎無分化情況。基因型歧異度方面，ITS 片段和葉綠體 *trnL-trnF* 片段分別具有各族群之間均共同擁有的基因型(表 3 - 5，表 3 - 6)，但各族群之內並無明顯存在獨特之基因型；*rpl16* 片段則含有三個主要的基因型(表 3 - 7)，在各族群之內也無明顯存在獨特之基因型。檢視 Minimum spanning network，ITS 片段(圖 3 - 1)具有各族群共同擁有之基因型 Hap-2 占 54%，族群之間並無明顯獨特基因型，差異僅有一步，僅在 Hap2 & Hap 6 之間具有較大差異，步數為 3 步；葉綠體 *trnL-trnF* 片段，則以 Hap-1 占 88% 為各族群之間共同擁有之基因型；*rpl16* 片段則呈現出三個主要基因型，分別是 Hap-2 占 42%，Hap-3 占 13%，Hap-4 占 26%，但此三個基因型之間僅差一步，且均為各族群共同擁有之基因型，故並無族群的特有基因型。

另外在微衛星 DNA 方面，利用本研究所設計的引子，共得出三段區域(表 3 - 8)，分別是 EST - C 共成功增幅 70 個樣本，長度為 293 bp，均為 type I；EST - D 共成功增幅 81 個樣本，長度均為 357 bp，均為 type I 和 EST - F 共成功增幅 81 個樣本，長度為 198-204 之間，分成 type I = 198 bp、II = 201 bp、III = 204 bp。EST-F

片段，清水山族群同時具有 type I、II、III，且 type III 為清水山族群(STCS)所獨立擁有，在雪山(STH)族群具有 type I 和 type II，其他族群則均為 type I。

第二節 討論

根據結果，台灣山柳族群的基因歧異度偏低，且在 ITS、*trnL-trnF* 和 *rpl16* 片段均偏離中性假說，尤其以 ITS 最為顯著。根據前人研究(Agisdottir, 2007; 徐, 2006)，第四紀冰河時期對於全球動植物的分佈以及種化過程均有重大的影響，由 240 萬年前開始到 1 萬至 2 萬年前的間冰期(Comes & Kadereit, 1998)，隨著氣候變化物種的分佈會有擴張與退縮的情況，冰河時期時物種可能會由北向南或由高海拔向低海拔播遷，間冰期則相反。在台灣許多高山物種會因冰河反覆作用，在最近一次冰河退去形成地理區隔而種化，造成台灣特有種種類繁多情況(Peng *et. al.*, 1994)，而這樣的形成原因往往是因為高山的地理區隔而造成族群的分化(*ex. Albach et. al.*, 2006; Chung *et. al.*, 2006; Hajime and Hiroaki, 2007)，進一步種化形成。但台灣山柳族群在形態上雖具有明顯差異(楊, 1996)，族群之間的基因歧異度卻偏低，偏離中性假說，以及經由族群分化指數測定(*Fst*)在不同族群幾乎並無分化，顯示自然的基因突變受到限制。推斷現今分佈於雪山、南湖大山、清水山的台灣山柳族群可能為近代受到瓶頸效應影響，由一個小族群擴張而形成，導致在三大族群之間大部分的樣本會享有共同的基因型(圖 3-1, 3-2, 3-3)，造成多樣性指數與族群分化指數均偏低情況。

(1) 三大族群(雪山、南湖大山、清水山)的基因多樣性比較

清水山區族群雖具有較高的基因歧異度($ITS\pi=0.0021$, $trnL-trnF\pi=0.0007$, $rpl16=0.0029$)，但族群數量稀少，位處台灣山柳族群的邊陲地帶，雖然具有較高變異，但海拔高度(alt. 2400)遠低於其他族群，環境與其他族群並不相似，故無法有效利用於其他族群之保育工作。然而高山族群的基因歧異度，以能高越嶺族群為最高($ITS\pi=0.0020$, $trnL-trnF\pi=0.0028$, $rpl16=0.0032$)，不過樣本數偏低($N=3$)，故不足以代表此族群。雪山族群的基因歧異度高於其他高山族群($ITS\pi=0.0013$, $trnL-trnF\pi=0.0012$, $rpl16=0.0028$)，且族群數量最多，推斷為台灣山柳之核心族群，故保育工作應當著重於此。

(2) 族群內、族群間的基因變異度大小，及其族群之動態

根據族群分化指數(Fst)，能高越嶺和清水山族群的 Fst 相對於其他族群高，但能高越嶺的樣本數偏低(N=3)，並無法代表此族群。在清水山族群方面，由族群分化指數和 Minimum spanning network 與結合地理資訊顯示各族群之間的分化程度與距離並無明顯相關，顯示清水山族群的變異與距離無關；加上微衛星 DNA 證據，清水山族群具有獨特的基因型，可能與清水山地區為石灰岩地形造成物種適應環境而演化出不同的基因型有關。

(3) 評估台灣山柳保育重點

台灣山柳可分佈於較低海拔的清水山區，代表其對於溫度升高具有環境適應之能力，但清水山族群的基因歧異度是因為溫度而產生，還是石灰岩地形因素而產生變異，或與兩者均無關係，必須進一步進行研究。雖然此族群具有明顯變異，但其環境條件與其他族群並不相同，故當溫度升高時，假若較低海拔物種入侵時，其他高山的族群或是特有草本植物是否具有能力去因應，是值得深入探討的，必須建立其生態資料監測其族群變動，才能瞭解溫度變化對於高山族群的影響。

第四章 結論與建議

台灣山柳在台灣分佈僅侷限在高海拔山區，且生長於稜線之上，族群數量不多，這樣的物種更容易受到環境變化而影響。根據本研究結果，得到以下結論：(1)根據基因歧異度與族群數量，推估雪山族群應為核心族群，必須著重此地區的保育工作。(2)清水山族群雖具有明顯分化，但族群數量稀少，且分佈海拔低於其他族群，無法利用於其他族群的保育工作，當環境遭受改變時，高山物種仍然會受到滅絕威脅。(3)台灣山柳在族群內的基因歧異度偏低，且在各族群之間也幾乎無分化。當環境受到改變時，台灣山柳族群是否具有充足的基因庫(gene pool)以因應環境變化，是值得密切注意。

建議在生態方面，可建立台灣山柳或其他高山物種的族群分佈，並監測其族群擴張或退縮情況；並調查其族群數量的消長情形。在遺傳學方面，可進一步探討台灣山柳在溫度相關的基因是否存在的多樣性，以因應環境變化，或以本研究為案例，進一步研究其他分佈於高山的物種是否均具有基因歧異度偏低情況，是否具有相同的生存壓力，瞭解環境對於物種的威脅。

致謝

本研究承蒙內政部營建署雪霸國家公園管理處提供研究經費，受到雪霸國家公園管理處的人員協助，以及實驗室同仁在野外採集的幫忙與實驗研究的熱心指導，僅此感謝。

表 2 - 1 台灣山柳族群採集地點

分類群	採樣地點	代號	海拔	數量
台灣山柳	台中縣 雪山	STH	3000-3500	66
台灣山柳	花蓮縣 清水山	STCS	2400	12
台灣山柳	宜蘭縣 南湖大山	STNF	3000-3400	12
台灣山柳	苗栗縣 大壩尖山	STDB	3000-3300	4
台灣山柳	南投縣 能高越嶺古道	STNK	2500-2600	3
白毛柳	台中縣 多加屯山	SWDG	2700	6
褐毛柳	南投縣 合歡山	SFHH	3000	6

表 2-2 表現序列標幟所設計之引子

名稱	序列片段
EST-A	F : 5' CAATGTAGCCAATTGGGTCAGC R : 5' GTTACTGAAGAAGATACCGATCCG
EST-B	F : 5' AGTTGCAGTCTATCAGCGCCATTC R : 5' AGACTTTGTTTCGAAGCGAACCAG
EST-C	F : 5' TTCCCTCCACGCACCTTTGC R : 5' CGTACAGGCACATATCCAGGGTCT
EST-D	F : 5' AGTTGCAGTCTATCAGCGCCATTC R : 5' GAGCTGCCTGTCTGCTCCTTGC
EST-E	F : 5' AAAGCGCTTTTATCTTCTCTCC R : 5' TGCATTCCAGTTTAACCCTGGCAC
EST-F	F : 5' AACAATGTAGCCAATTGGGTCAGC R : 5' CCGATCCGATTATCAAACAGGG

表 3 - 1 台灣山柳族群的多樣性指數

region 為 DNA 片段區域，n 為取樣數，haplotype 為該族群已發現之基因型數，h 為基因型歧異度， π 為核苷酸歧異度， θ 為核苷酸歧異度的修正值。結果顯示，清水山族群(STCS)具有最高的核苷酸歧異度。

regions	species	Pop.	n	haplotype	h	π	θ
ITS	<i>S. taiwanalpina</i>	all	66	12	0.0031	0.0015	0.0035
		STCS	10	5	0.0094	0.0021	0.0021
		STH-all	43	6	0.0047	0.0013	0.0027
		STHA	12	4	0.0289	0.0017	0.0030
		STHB	11	3	0.0261	0.0007	0.0010
		STHC	20	4	0.0037	0.0013	0.0012
		STNF	7	3	0.0435	0.0008	0.0012
		STNK	3	3	0.0741	0.0020	0.0020
		STDB	3	2	0.0987	0.0010	0.0010

表 3 - 1 台灣山柳族群的多樣性指數(續)

region 為 DNA 片段區域，n 為取樣數，haplotype 為該族群已發現之基因型數，h 為基因型歧異度， π 為核苷酸歧異度， θ 為核苷酸歧異度的修正值。結果顯示能高族群(STNK)具有最高的核苷酸歧異度。

regions	species	Pop.	n	haplotype	h	π	θ
<i>trnL-trnF</i>	<i>S. taiwanalpina</i>	all	83	5	0.0034	0.0010	0.0036
		STCS	12	2	0.0180	0.0007	0.0014
		STH-all	49	4	0.0054	0.0010	0.0038
		STHA	14	3	0.0220	0.0018	0.0040
		STHB	13	1	0	0	0
		STHC	22	3	0.0134	0.0011	0.0023
		STNF	13	2	0.0200	0.0012	0.0014
		STNK	3	3	0.0009	0.0028	0.0033
		STDB	4	1	0	0	0

表 3 - 1 台灣山柳族群的多樣性指數(續)

region 為 DNA 片段區域，n 為取樣數，haplotype 為該族群已發現之基因型數，h 為基因型歧異度， π 為核苷酸歧異度， θ 為核苷酸歧異度的修正值。結果顯示雪山族群(STHC)和南湖族群(STNF)具有最高的核苷酸歧異度。

regions	species	Pop.	n	haplotype	h	π	θ
rpl16	<i>S. taiwanalpina</i>	all	83	8	0.0011	0.0027	0.0034
		STCS	12	5	0.013	0.0029	0.0040
		STH-all	62	8	0.0016	0.0027	0.0036
		STHA	14	5	0.0068	0.0026	0.0030
		STHB	15	4	0.0101	0.0022	0.0022
		STHC	23	7	0.0035	0.0033	0.0039
		STNF	12	5	0.0081	0.0033	0.0040
		STNK	4	3	0.0494	0.0024	0.0026
		STDB	3	3	0.0741	0.0032	0.0032

表 3 - 2 台灣山柳族群的中性假說檢測

all 代表全部類群，ingroup 代表台灣山柳族群，outgroup 代表白毛柳以及褐毛柳族群。結果顯示在 Tajima's D、Fu & Li D*、Fu & Li F* 檢驗中，其值大部分均為負值，尤其以 ITS 片段最為顯著，代表偏離中性假說，顯示台灣山柳的 DNA 變異受到環境力量抑制。

regions	sample	Tajima's D	Fu & Li D*	Fu & Li F*
ITS	all	-1.840*	-3.227*	-3.253**
	STCS	0.023	-0.338	-0.280
	STH-all	-1.471	-2.146	-2.267
	STNF	-1.237	-1.295	-1.374
	STNK	X	X	X
	STDB	X	X	X
<i>trnL - trnF</i>	all	-1.426	-0.254	-0.740
	STCS	-1.426	-0.254	-0.740
	STH-all	-1.140	-1.329	-1.443
	STNF	-1.140	-1.208	-1.543
	STNK	-0.274	0.732	0.543
	STDB	X	X	X
<i>rpl16</i>	all	-0.362	0.329	0.114
	STCS	-0.987	-0.833	-0.988
	STH-all	-0.376	-0.559	-0.588
	STNF	-0.616	0.562	0.296
	STNK	X	X	X
	STDB	-0.709	-0.709	-0.604

X:代表族群數量低於 4 個，或均無變異，無法計算。

表 3 - 3 台灣山柳族群的分化指數測定 (ITS 片段)

結果顯示在不同的族群之間，Fst 值大部分 0.05-0.25 之間，代表在台灣山柳及其外群的 ITS 片段，介於低度到中度分化之間。

Fst	STCS	STH	STNF	STNK	STDB
STCS					
STH	0.162				
STNF	0.104	-0.082			
STNK	0.253	0.257	0.295		
STDB	0.130	0.015	0.016	0.250	

表 3 - 4 台灣山柳族群的分化指數測定(葉綠體部分)

表左下方代表 *trnL-trnF* 片段的族群分化指數；右上方代表 *rpl16* 片段的族群分化指數。結果顯示 F_{st} 值大部分 < 0.05 ，在葉綠體 DNA 上呈現幾乎沒有分化。

Fst	STCS	STH	STNF	STNK	STDB
STCS		-0.095	-0.157	-0.387	-0.091
STH	-0.014		-0.169	-0.245	-0.014
STNF	0.007	0.070		-0.227	-0.121
STNK	-0.189	-0.183	-0.179		-0.139
STDB	-0.128	-0.127	-0.119	0	

表 3 - 5 台灣山柳及其外群各族群之間核 DNA ITS 片段的 haplotype

all 代表全部類群，ingroup 代表台灣山柳族群，outgroup 代表白毛柳以及褐毛柳族群。由表顯示 Hap 2 占最高比例，且在各族群之間，並無明顯的獨特基因型。

n	All	In	Out	STCS	STH	STNF	STN K	STD B	SW	SFH H
Hap	73	66	7	10	43	7	3	3	5	2
1	11	11	0	4	6	1	0	0	0	0
2	40	36	4	2	26	5	1	2	3	1
3	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
5	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0
6	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
7	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
8	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0
9	8	8	0	0	7	1	0	0	0	0
10	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
11	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
12	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
13	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
14	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
15	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1

表 3 - 6 台灣山柳及其外群各族群之間葉綠體 DNA *trnL-trnF* 片段的 haplotype

all 代表全部類群，ingroup 代表台灣山柳族群，outgroup 代表白毛柳以及褐毛柳族群。由表顯示 Hap 1 占最高比例，且在各族群之間，並無明顯的獨特基因型。

n	All	In	Out	STCS	STH	STNF	STN K	STD B	SW	SFH H
Hap	95	83	12	12	49	13	3	4	6	6
1	84	73	11	11	44	10	3	4	6	5
2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
3	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0
4	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
5	5	5	1	0	3	2	0	0	0	1
6	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0

表 3 - 7 台灣山柳及其外群各族群之間葉綠體 DNA *rpl16* 片段的 haplotype

all 代表全部類群，ingroup 代表台灣山柳族群，outgroup 代表白毛柳以及褐毛柳族群。由表顯示 Hap 2 占最高比例，且在各族群之間，並無明顯的獨特基因型。

n	All	In	Out	STCS	STH	STNF	STN K	STD B	SW	SFH H
Hap	95	83	12	12	52	12	3	4	6	6
1	8	7	1	1	4	2	0	0	0	1
2	40	36	4	6	22	5	1	2	2	2
3	13	12	1	2	8	0	1	1	1	0
4	25	20	5	2	14	2	1	1	3	2
5	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0
6	4	4	0	0	2	2	0	0	0	0
7	2	1	1	0	1	0	0	0	0	1
8	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0

表 3 - 8 台灣山柳各族群的 EST 片段類型組成

all 代表全部類群。本研究利用 EST-C、EST-D、EST-F，三組引子成功增幅其片段，由 EST-C 無變化，長度均為 293 bp；EST-D 則無變化，長度均為 357 bp；EST-F 可分成三類型，I :198 bp, II :201 bp III:204 bp。(No.代表數量)

region	type	all	STCS	STH	STNF	STNK	STDB
EST-C	No.	66	9	42	8	3	4
	type I (%)	100	100	100	100	100	100
EST-D	No.	70	9	42	12	3	4
	type I (%)	100	100	100	100	100	100
EST-F	No.	70	9	42	12	3	4
	type I (%)	92.8	78	92.9	100	100	100
	type II (%)	5.7	11	7.1	0	0	0
	type III (%)	1.4	11	0	0	0	0

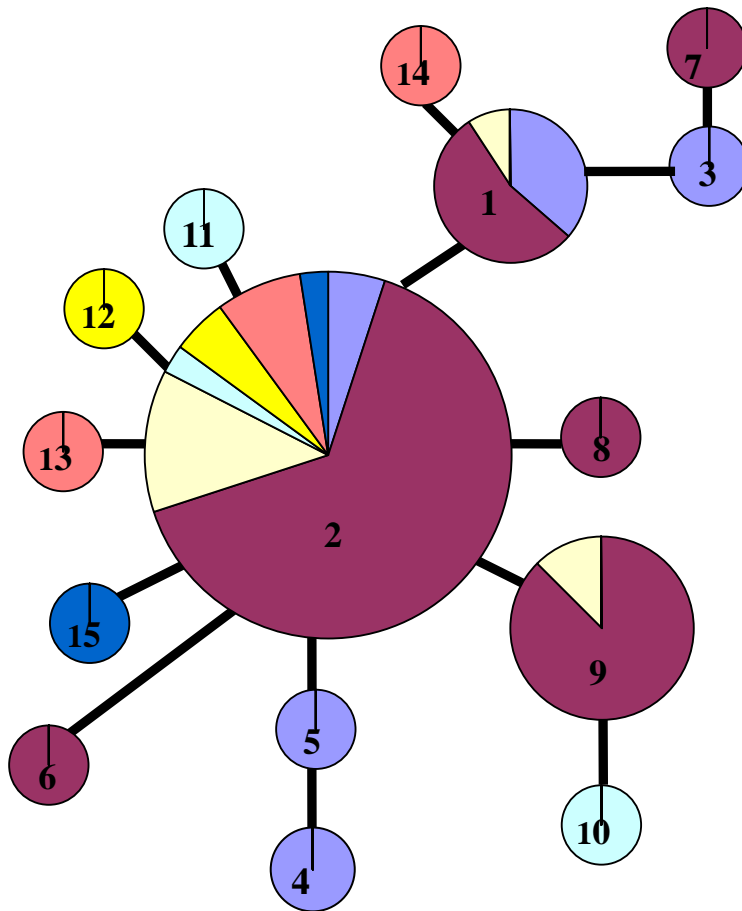









圖 3 - 1 台灣山柳及其外群核 DNA ITS 片段的 Minimum spanning network

由圖顯示，Hap 2 的組成比例最大，具有 40 個樣本，Hap1 具有 11 個樣本，圖中距離沒有顯示代表 1 步的距離，僅 Hap2 & Hap 6 之間的步數為 3 步。

族群代號	STCS	STH	STNF	STNK	STDB	SW	SFHH
族群數量	10	43	7	3	3	5	2
代表顏色							

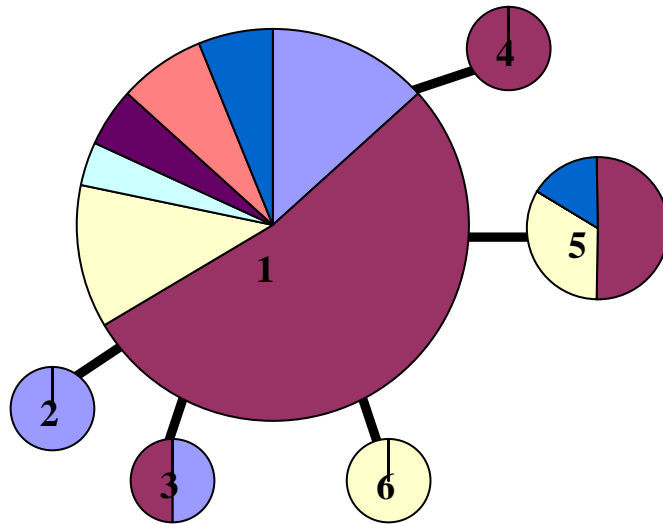









圖 3 - 2 台灣山柳及其外群葉綠體 DNA *trnL-trnF* 片段的 Minimum spanning network

由圖顯示，Hap 1 的組成比例最大，具有 84 個樣本，圖中距離沒有顯示代表 1 步的距離。

族群代號	STCS	STH	STNF	STNK	STDB	SW	SFHH
族群數量	12	49	13	3	4	6	6
代表顏色							

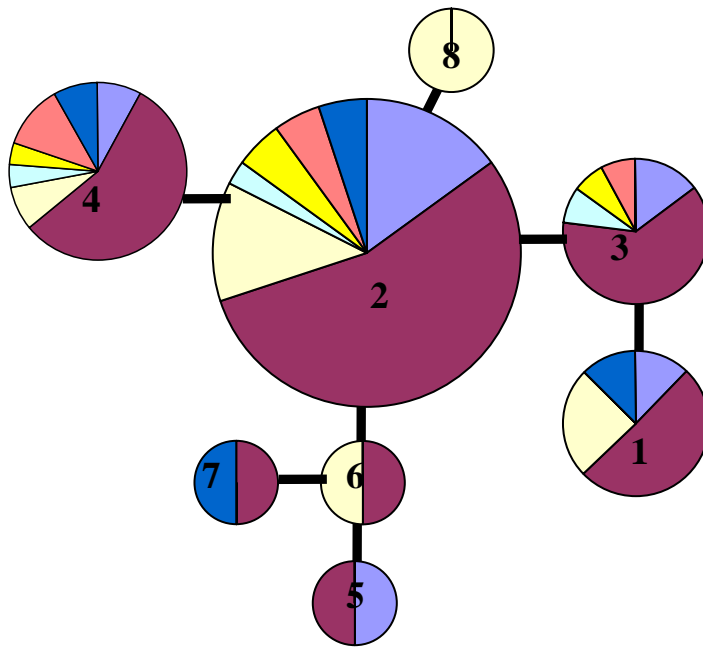









圖 3 - 3 台灣山柳及其外群葉綠體 DNA *rpl16* 片段的 Minimum spanning network

由圖顯示，Hap2 的組成比例最大，具有 40 個樣本；Hap3 具有 13 個樣本；Hap4 具有 25 個樣本，圖中距離沒有顯示代表 1 步的距離。

族群代號	STCS	STH	STNF	STNK	STDB	SW	SFHH
族群數量	12	52	12	3	4	6	6
代表顏色							

參考資料

- 林雅芳 2006 以形態及分子證據探討玉山蠅子草種複合群的分類問題。國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文。
- 徐源泰 2006 太魯閣國家公園杜鵑花屬植物遺傳多樣性調查。內政部營建署太魯閣國家公園管理處。
- 楊國禎 1996 台灣的柳屬植物種間與種內變異之研究 國立台灣大學植物學研究所博士論文。
- 蔣鎮宇 2004 台灣產特有種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣地理學研究計畫。內政部營建署玉山公園管理處研究報告
- Albach, C. D., Schonswetter, C. & Trubsch, A. 2006. Comparative phylogeography of the *Veronica* alpine complex in Europe and North America. *Mol. Eco.* 15: 3269–3286.
- Agisdottir, H. H., Daniela J., Patrick K., and Jurg S. 2007. No inbreeding depression in an outcrossing alpine species: The breeding system of *Campanula thyrsoidea*. *Flora* 202: 218-225.
- Baker, W. J., John D., Terry A. H. 2000. Phylogeny, Character Evolution, and a New Classification of the Calamoid Palms. *Syst. Bot.* 25 (2): 297-322.
- Chung, J. D., T. P. Lin, Y. L. Chen, Y.P. Cheng, S. Y. Hwang. 2006. Phylogeographic study reveals the origin and evolutionary history of a *Rhododendron* species complex in Taiwan. *Mol. Phyl.. Evol*
- Danby, R. K. & Hik, D. S., 2007a. Responses of white spruce (*Picea glauca*) to experimental warming at a subarctic alpine treeline. *Glob. Change Biol.* 13 (2): 437-451.
- Danby, R. K. & Hik, D. S., 2007b. Variability, contingency and rapid change in recent subarctic alpine tree line dynamics. *J. Ecol.* 95 (2): 352-363.
- Danby, R. K., Hik, D. S. Slocombe, D. S. & Williams, A. 2003. Science and the St Elias: an evolving framework for sustainability in North America's highest mountains. *Geographical J.* 169: 191-204.
- Fosaa, A. M., Sykes, M. T., Lawesson, J. E. & Garrd, M. 2004. Potential effects of climate change on plant species in the Faroe Islands. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 13 (5): 427-437.
- Fu, Y.X. and Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:

693-709.

- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.
- Ikeda, H. & Setoguchi, H. 2007. Phylogeography and refugia of the Japanese endemic alpine plant, *Phyllodoce nipponica* Makino (Ericaceae). J. Biogeogr 34: 169-176.
- Jone, M. H., Bay, C. & Nordenhall, U. 1997. Effects of experimental warming on arctic willows (*Salix* spp.): A comparison of responses from the Canadian High Arctic, Alaskan Arctic, and Swedish Subarctic. Glob. Change Biol. 3: 55-60.
- Jone, M. H., Macdonald, S. E. & Henry, G. H. R., 1999. Sex- and habitat-specific responses of a high arctic willow, *Salix arctica*, to experimental climate change. Oikos. 87 (1): 129-138.
- Jump, A. S., Jenny M. H., Jose A. M. & Josep P. 2006. Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*. Mol. Ecol. 15: 3469-3480.
- Kelly, C. K., Mark W. C., Anette de B., Michael F. F. & Woodward F. I. 2003. Temperature-based population segregation in birch. Ecol. Lett. 6: 87-89.
- McDougall, K. L., Morgan, J. W., Walsh, N. G. & Williams, R. J., 2005. Plant invasions in treeless vegetation of the Australian Alps. Plant Syst. Evol. 7: 159-171.
- Peng, C. I. Kuo, C. M. & Yang, Y. P. 1994. Botanical diversity and inventory of Taiwan Pp. 75–85 in: Peng, C. I. & Chou, C. H. (eds.), Biodiversity and Terrestrial Ecosystems. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Ser. 14, Taipei.
- Rozas, J. and C. Rozas. 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. Comput. Applic. Biosci. 11: 621-625.
- Schneider, S., J. Kuffer, D. Rossli, and L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN: A Software for Population Genetic Data Analysis, Version 3.1. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Shih, F. L., Hwang S. Y., Cheng Y. P., Lee P.F., & Lin T.P. 2007. Uniform genetic diversity, low differentiation, and neutral evolution characterize contemporary refuge populations of Taiwan fir. Am. J. Bot. 94: 194-202.
- Shaw, J., Lickey E. B., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W., Miller J., Siripun K. C.,

- Winder C. T., Schilling E. E., & Small R. L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92: 142–166.
- Shaw, J., Lickey E. B., Schilling E. E., Small R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 94 (3): 275-288.
- Steven, J. B., Terry R. M., and Bryan C. C. 2007. Insights into the biogeography of the pacific northwest of north America: evidence from the phylogeography of *Salix melanopsis*. *Sys.bot.* 23 (1):129-139.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. D. Innis et al.(eds.), *PCR protocols:A guide to methods and applications*. pp. 315-322. San Diego, Academic Press
- Taberlet, P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet. J. 1991. Universal primer for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105-1109.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.