

台灣產特有種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣  
地理研究計畫

Molecular systematics and conservation genetics  
of *Rhododendron pseudochrysanthum* complex  
of Taiwan

受委託者：國立成功大學

研究主持人：蔣鎮宇

協同主持人：許再文

研究助理員：黃啟俊

內政部營建署玉山國家公園管理處

中華民國九十三年十二月



目次

表次	II
圖次	III
摘要	IV
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起與背景	1
第二節 研究目的	7
第二章 方法與結果	9
第一節 實驗材料與方法	9
第二節 結果	13
第三節 討論	21
第三章 結論與建議	27
第一節 結論	27
第二節 建議	27
附錄一	29
參考書目	33

表次

## 表次

表 2-1	玉山杜鵑複合群取樣資料 · · · · ·	15
表 2-2	玉山杜鵑族群的單型歧異度及核苷酸歧異度 · · · · ·	17
表 2-3	玉山杜鵑族群及地理區間的遺傳分化指數( $F_{ST}$ ) · · · · ·	18

圖次

圖 2-1 玉山杜鵑族群採樣點地圖 · · · · · 19

圖 2-2 玉山杜鵑根據葉綠體 DNA 位於 atpB 及 rbcL 基因之區間片段重建的  
neighbor-joining 演化樹 · · · · · 20

摘要

## 摘要

分子生物學技術的快速發展與廣泛利用帶給系統分類學、生態學以及保育生物學新的生命及研究方向，並逐漸成為演化及生態學研究的主流，其中葉綠體 DNA (chloroplast DNA; cpDNA) 的分子標記廣為系統分類及族群遺傳學者所利用，進行物種親緣系統的分析，而分布於玉山國家公園之玉山杜鵑 (*Rhododendron pseudochrysanthum* Hayata) 的複合群 [包括玉山杜鵑、森氏杜鵑 (*R. morii* Hayata)、紅星杜鵑 (*R. rubropunctatum* Hayata) 及南湖杜鵑 (*R. hyperythrum* Hayata)] 的分類地位及種的界限时時有爭論，本研究即針對分布於玉山國家公園之玉山杜鵑複合群進行研究，藉由分子系統分類學的分析，釐清物種的種間界限，作為保育的參考及依據。

本實驗針對分布於玉山國家公園境內之玉山杜鵑及森氏杜鵑之族群進行取樣，由矽膠固定的葉片中萃取 genomic DNAs，利用分子技術 PCR 及序列 cpDNA *atpB-rbcL* intergenic spacer，並進一步根據序列變異重建物種及族群親緣。

本研究支持玉山杜鵑與森氏杜鵑為同種的分類假說，並建議將兩者處理為玉山杜鵑 (*R. pseudochrysanthum* Hayata) 的變種。玉山杜鵑在中央山脈和玉山山脈具有高度遺傳歧異度及地理區間的遺傳分化，應將主要山脈的族群視

為保育的單位，並保護自然棲地，減少人為干擾，作有效經營管理，以維持兩地理區之玉山杜鵑的遺傳多樣性。

摘要關鍵詞：玉山杜鵑複合群，分子系統分類學，親緣，保育遺傳。

## Abstract

The development of molecular biology has promoted systematics, and conservation biology. In this study, we examined the taxonomic status and conservation genetics of the *Rhododendron pseudochrysanthum* species complex, including *R. pseudochrysanthum* Hayata and *R. morii* Hayata that are distributed in the Yu-shan National Park. Based on the maternally inherited cpDNA variation, the reconstructed phylogeny reveals a conspecific relationship between *R. pseudochrysanthum* and *R. morii*. In addition, populations of the Central Mountain Range and Yushan Mountain Range possess high levels of genetic diversity. Both geographical populations are significantly differentiated and should be recognized as different management units for conservation.

Key words: *Rhododendron pseudochrysanthum* complex, molecular systematics, phylogeny, Conservation genetics.



## 第一章 緒論

### 第一節 研究緣起與背景

分子生物學技術的快速發展與廣泛利用帶給系統分類學、生態學以及保育生物學新的生命及研究方向，許多新的期刊，一如*Conservation Genetics*、*Molecular Ecology*、*Molecular Phylogenetics and Evolution*等因此而陸續問世，並逐漸成為演化及生態學研究的主流；雖然解剖、形態的特徵仍為分類學主要的分類證據，但是這些特徵因經常受到外部環境影響表現可塑的特性(plasticity)，以及常見的平行演化(parallelism)或趨同演化(convergence)造成系統分類上的困難；相對地，分子特徵不但提供了大量足以顯現來自共同祖先(common descent)的資訊，其中演化上趨向中性的分子標記，包括noncoding spacer或intron，因較少受到天擇的影響，更能正確的顯現物種或族群間的演化歷史及親緣；另一方面分歧分類學(cladistics)分析方法的成熟，更提供了測試分類學假說(包括種的界定及測驗)極有效的工具，尤其針對傳統分類難以界定及釐清的複合群(species complex)。

葉綠體 DNA (chloroplast DNA: cpDNA)和細胞核 DNA (nuclear DNA: nrDNA)的分子標記廣為系統分類及族群遺傳學者所利用，進行物種親緣系統的分析(Ouborg et al. 1999)，其中葉綠體 DNA 於植物中大多為母系遺傳 (Cruzan et al. 1993)，遺傳過程中因不經基因重組，使得祖先的基因型在經過多次有性或無性生殖後，仍可保存原有的遺傳變異(Byrne and Moran 1994)，因此可作為顯現物種母系來源及演化歷史的可靠工具。

親緣地理學(phylogeography)是屬於生物地理學的一支，為 Avise et al. (1987)所提出，主要是探討生物歷史與地理分布之間的關係，此觀念強調於物種在演化過程中的遺傳系統與空間上的分布(Avise 1998)，同時亦著重現今的基因交流及過去的演化歷史。而生物地理學 (biogeography)是一門研究生物在地理上分布的學門，主要探討生物相 (biota)在地球上空間分布的模式，以及這些生物相的歧異度(diversity)和分類群(taxa)組成之多樣化等概念 (Futuyma 1986; Barry and Moore 2000)。

親緣地理和傳統生物地理的不同在於傳統生物地理學往往較強調高階分類群地理分布形式，除了利用現今物種的形態特徵及傳播或遷移方式外，往往由化石來當推論的證據。但親緣地理卻是從一物種遺傳變異的分布反映

出族群間歷史親緣及基因交流或隔離的過程，區分來自共同祖先的遺傳特徵，或是族群間基因交流的結果，因此，親緣地理學的研究被視為是族群遺傳(或稱微演化，microevolution)及種化(speciation)之間的橋樑(Moritz and Bermingham 1998)。親緣地理學是一複合的學門，必須從多層面來探討，要解釋分析系統的分布通常須藉由分子遺傳、族群遺傳、系統分類、行為生態學及歷史地質等面向切入，因此親緣地理學被認為是一整合性學門(Avise et al. 1987; Avise 1998)。其中利用分子遺傳物質變異來研究是重建物種、分析遺傳結構及族群演化歷史的有力工具，藉由了解遺傳變異在族群間及族群內的分布，也可以幫助我們在研究瀕危物種時提供有效的訊息，進一步了解整個族群面臨之狀況，來確立適用的保育政策，使得保育更有效率。

島嶼生物研究受到演化生物學家重視(Stuessy 1998)，因為島嶼的生態環境往往不同於大陸，物種長期在一隔離狀態下，生物在生活適應上及演化過程也不同。而島嶼面積大小，地形的複雜性、距大陸塊的遠近、空間、地理環境都會影響其生物相，一般島嶼生物被認為有較低的遺傳歧異度及較高的族群間分化程度(Crawford et al. 2001)，以及比生存於大陸的植物有較高滅絕的危險性(Case et al. 1992; Smith et al. 1993)。在島嶼生物所顯現的生態特色，有生物相的不平衡、較多特有物種以及物種易受害現象(vulnerability)(Byrne

1980)，島嶼生物因生活在隔絕的環境，生物相的組成受限於物種之傳播能力，通常較缺乏完整的分類群，大多數海洋島嶼缺乏大型哺乳動物，加拉巴哥群島即為一個例子。另外，島嶼生物一般有較高比例的特有種，島嶼生物往往由大族群分支出來，原有族群在遷移過程中經瓶頸效應(bottleneck)容易喪失部分基因，使得族群原有生物特性無法顯現，在長期演化之族群其特徵也只能由最初的少數個體決定，某些生物在長期隔離後，因島嶼環境型態特殊，生物演化出的形態及功能便不同於大陸近緣種，甚至同一物種有了種化或生殖隔離的現象(Frankham 1997)。而島嶼生物易受害之特質是因島嶼生物族群數量小，且活動面積不如大陸，一但棲地受到侵佔、改變或破壞，生物常無棲地移轉空間，易造成滅絕。

島嶼的型式分為海洋性島嶼及大陸性島嶼。海洋性島嶼座落在海上並未曾有和大陸相連結的歷史，海洋性島嶼如夏威夷諸島、加那利群島等，其島上生物來源多來自鄰近大陸地區或其他大島；而大陸性島嶼則是在形成過程中曾與大陸板塊相連(Whittaker 1998)，例如台灣、日本及琉球群島，於最近一次冰河時期(距今約一萬八千年前)曾有陸橋與大陸塊相連，而大陸型島嶼中的生物大多來自過去曾連結的大陸塊，也有冰河時期所遺留下來的特有物種。曾提出島嶼生物理論者 MacArthur 比較大陸型島嶼與海洋性島嶼，指出

大陸型島嶼保有較多大陸種源地區原有物種，其物種數量下降較緩慢；而海洋性島嶼形成時島上並無生物，但因物種移入而量漸增，經一段時間後，大陸型島與海洋島嶼可同時達到平衡點，但物種來源與組成卻可能不同 (MacArthur and Wilson 1972)。

島嶼生物除了受島嶼環境及物種來源影響，此外天然以及人為干擾事件，例如颱風、火山活動、外來種入侵、人為活動破壞等。島嶼之面積小，對於外來的干擾較無緩衝作用，劇烈反應環境的波動，物種滅絕及替換率亦隨之提高 (Bush and Whittaker 1993)，島嶼脆弱且特殊之生態特性，在島嶼上的生物多樣化已被視為受外界干擾時保持穩定的重要條件之一。

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

近年來台灣在親緣地理學的研究蓬勃發展 (王 2002; 潘 2003; 陳 2004)，有助於瞭解台灣物種的族群演化歷史，過去高山植物由於採樣困

## 台灣產特有種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣地理研究計畫

難、材料保存不易及 DNA 萃取困難等不利因素導致極少進行親緣地理方面的研究，但高山植物多為台灣特有物種，故針對高山植物進行親緣地理學的研究是必要且有助於瞭解台灣特有種的演化歷史，其中杜鵑花植物在台灣高海拔植被扮演著極重要的角色，每年積雪初融，伴隨著滿山遍野盛開的杜鵑，不但是植物學者重要的研究素材，更啟迪民眾對於大自然的觀察與關懷，其中分布於高海拔地區台灣特有的玉山杜鵑(*Rhododendron pseudochrysanthum* Hayata)更是玉山國家公園的代表性植物，然而，玉山杜鵑的複合群[包括玉山杜鵑、森氏杜鵑(*R. morii* Hayata)、紅星杜鵑(*R. rubropunctatum* Hayata)及南湖杜鵑(*R. hyperythrum* Hayata)]的分類地位及種的界限卻時有爭論(cf. Hsu 1973; Ying 1976; Li 1978; Pan 1988; Lu and Yang 1989)，Huang and Hsu (2001)及 Tsai et al. (2003)初步的分子研究亦支持這些種類的近緣性；形態的多變，一如葉緣的反捲程度、葉背絨毛顏色及密度、花期與海拔變化的關係、腺點的有無等 (cf. Huang and Hsu 2001)，與中間型的存在造成分類研究上以及保育策略制定上的困難，同種物種因為形態的多型而被認定成不同的種類，固然會造成保育上資源的浪費，將不同的種類集為一種更會造成對某些物種的忽視，更何況玉山杜鵑複合群的種類皆為台灣特有植物，在自然界上的有效族群必定比廣分布的種類為低，較易受到基因漂變(genetic drift)的影響，

而失去其遺傳歧異度，更進而影響族群及種的適應及生存，有鑑於此，本研究將針對分布於玉山國家公園境內之玉山杜鵑複合群(其中南湖杜鵑及紅星分布於園區外，故暫無列入處理)，藉由分子系統分類學的分析，釐清物種的種間界限，作為保育的參考及依據。

### 第二節 研究目的

本研究主要的目的即在利用分子工具釐清玉山杜鵑及森氏杜鵑的親緣及分類地位，藉由 PCR 位於葉綠體 DNA 中 *atpB-rbcL* 的一段 noncoding spacer，根據遺傳的變異，重建出兩者的分子親緣。另一方面，利用遺傳變異的空間分布，進一步探討地理區間及族群間的遺傳分化的程度，並以此推估現今族群間的基因交流程度，根據遺傳歧異度的空間分布鑑定出多樣性的熱點，並依上述分析鑑定出可行的保育單位(conservation units)。

台灣產特有種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣地理研究計畫



## 第二章 方法與結果

### 第一節 實驗材料與方法

(一)、野外取樣: 本研究針對中央山脈及玉山山脈的玉山杜鵑及森氏杜鵑進行採樣，分別於塔塔加鞍部至玉山主峰(玉山山脈)以及南橫庫哈諾辛山登山口至關山以及三叉向陽山等主峰，以截線方式針對玉山杜鵑複合群取樣(圖 2-1，表2-1)，以矽膠固定植物嫩葉，以利DNA萃取。

(二)、實驗室工作：

#### 一、DNA 萃取(DNA extraction)

利用 CTAB 的方法(Doyle and Doyle 1987)從在液態氮下磨成粉末狀植物組織分離出 genomic DNA。

#### 二、聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)及定序(sequencing)

##### 1. Polymerase chain reaction

利用萬用引子，以 *Taq* polymerase 在溫度循環器擴增出 cpDNA *atpB-rbcL* intergenic spacer (Chiang et al. 1998)複製出各基因片段。在總體積

100 $\mu$ l 的反應液中加入 5 $\mu$ 聚合酵素(Taq polymerase), 10 $\mu$ L 10X 緩衝液, 10 $\mu$ L 的 dNTP, 濃度 2 pmole 的引子各 10 $\mu$ l, 最後加入 20ng DNA, 以無菌水補足 100 $\mu$ l。聚合酵素反應在溫度循環機(Thermal cycler)進行, 共進行 31 個循環, 每個循環流程為: 92 $^{\circ}$ C, 45 秒, 將 DNA 的雙股變性打開(denaturation); 49 $^{\circ}$ C, 1 分 15 秒, 使 DNA 與引子結合(annealing); 72 $^{\circ}$ C, 1 分 30 秒, 進行 DNA 延伸反應(extension), 最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘。PCR 結束後, 取 5 $\mu$ l 的 PCR 產物加上 1 $\mu$ l 6 倍的染色溶液, 在 1% 瓊脂凝膠(agarose gel)中以 100 伏特電壓跑電泳約 30 分鐘, 經過溴化乙啶螢光染劑(EtBr)處理後, 配合所選用的 DNA ladder 當分子大小的標記, 並在紫外線燈下顯色及拍照。

## 2. 純化

DNA 聚合酵素反應(PCR)的產物有時所含的片段並不單一, 而且有許多離子、dNTP、引子的存在, 將影響後續分子反應, 所以必須經過純化。先將 PCR 所得的產物於 1% 瓊脂凝膠上, 以 1X TAE 的緩衝液, 以 100 伏特電壓進行電泳, 經溴化乙啶螢光染劑染色後, 在紫外光燈下將含有所要 DNA 的膠切下, 以 Agarose Gel DNA Extraction Kit 純化。

## 3. 基因 cloning

### (1) DNA 分子的連接(ligation)

## 第二章 方法與結果

將純化後之 PCR 產物 3 $\mu$ l 中加 5 $\mu$ l ligation buffer, 1 $\mu$ l ATP, 1 $\mu$ l ligase, 1 $\mu$ l T4 載體(vector), 在 4 $^{\circ}$ C 水域中反應過夜, 使 PCR 產物連結至載體上。

### (2)轉形作用(transformation)

將大腸桿菌以氯化鈣活化後, 將與 PCR 產物連接好之載體加入活化之菌液, 放入 42 $^{\circ}$ C 水浴 1 分 20 秒, 迅速投入冰水中, 使載體進入大腸桿菌中。

### 4. 質體 DNA(plasmid DNA)的萃取

將轉形作用完成的大腸桿菌大量培養後, 以 lysis buffer 將細菌打破, 加入 RNAase 分解 RNA, 再以 phenol 及 chloroform / isoamyl (24:1)將質體 DNA 萃取出。最後以 isopropanol 沈降, 酒精洗去鹽類, 風乾, 加入 TE 溶解, 以進行 DNA 定序。

### 5. DNA 定序

DNA 定序是以雙去氧核甘鏈停止法(dideoxynucleotide chain termination, Sanger et al. 1977), 定序出 cpDNA *atpB-rbcL* intergenic spacer。核酸序列自動定序利用 ABI PRISM 337 DNA Sequencer (Perkin-Elmer; ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin-Elmer)進行分子定序。

### 三、序列分析

DNA 分子序列的資料以 Clustal V (Higgins et al. 1992)程式完成比對及

排列( alignment)。比較彼此間鹼基對替換( transition；兩個嘍呤或嘍啶間的突變，A/G 或 T/C 突變)及鹼基對顛換( transversion；嘍呤與嘍啶間的突變，T/C/A.G 突變)的發生頻率及比值，來計算玉山杜鵑複合群彼此的序列變化。利用 MEGA 2.0 (Molecular evolutionary Genetics Analysis Vision 2.0)計算全部鹼基對取代數目(K, total nucleotide substitutions)，及每個位置鹼基對替換及顛換的發生頻率。以 Kimura 雙參數模式(two-parameter model)方式(Kimura 1980)計算鹼基替代率及遺傳距離，並以聚類分析法(neighbor-joining method)原理建構其親緣樹狀圖，並以重複 1000 次之 bootstrap (Felsenstein 1985)分析演化樹種 clades 的可信度。

#### 四、族群遺傳分析(Population genetic analysis)

以 DnaSP(Version 2.0, Rozas and Rozas 1997)計算族群內、族群間及地理區間的 genetic diversity。以 haplotype diversity (h)(Nei and Tajima 1983)，及以 nucleotide divergence (dij)(Jukes and Cantor 1969)估算族群內、族群間及地理區間的 genetic diversity。估算族群間及地理區間的遺傳分化，並根據  $F_{ST}=1/(1+2Nm)$  的公式，估計族群間可能的基因交流，其中 N 中是表示族群中雌個體的有效族群量，m 表示雌個體的遷徙能力，當  $F_{ST}$  值愈高，族群間的遺傳分化程度就愈大。

### 第三節 結果

本研究的採集資料條列於表 2-1 及圖 2-1，利用 PCR 成功地擴增 cpDNA *atpB-rbcL* intergenic spacer 片段，其序列經比對(alignment)長度為 805 鹼基對，其中有 41 變異位置，總共有 17 個 haplotypes，haplotype diversity (h) 為 0.814，依分子序列計算不同的族群的 nucleotide diversity( $\theta$ ，表 2-2)得知，玉山山脈族群的 nucleotide diversity ( $\theta = 0.002$ )較中央山脈( $\theta = 0.012$ )低，其中以中央金礦具有最高的 nucleotide diversity ( $\theta = 0.022$ )。

本研究利用葉綠體 DNA 之變異重建玉山杜鵑及森氏杜鵑之親緣，利用 neighbor-joining 的分析法依據遺傳距離得到一樹狀圖(圖 2-2)，以台灣杜鵑及紅毛杜鵑為外群，NJ tree 顯現玉山杜鵑及森氏杜鵑形成一 monophyletic group，但是各種皆不是單一起源群，也就是玉山杜鵑及森氏杜鵑的序列在 NJ tree 中彼此混合，並沒有任何對應於各種明顯的分群，此一結果支持前人 Lu and Yang (1989) 認為玉山杜鵑及森氏杜鵑為同一種的假說。

雖然玉山杜鵑及森氏杜鵑在親緣上無明顯分化，在 cpDNA 的 NJ tree 中明顯可分離出兩個 clades，這兩大群更與地理分布呼應，其一為塔塔加經玉山往秀姑坪的玉山山脈杜鵑族群，另一則分布在中央金礦、關山嶺及向

陽三叉山的中央山脈族群，顯現出杜鵑族群在高山地區地理上的隔絕及分化。雖然如此，在玉山山脈的 clade 中包含了 3 中央山脈的序列，而中央山脈的 clade 也包含了玉山山脈的序列，顯現兩地區的族群雖然已有地區分化，但彼此間仍偶有基因交流。根據分子序列計算出不同地區內的族群分化指數( $F_{ST}$ ，表 2-3)得知，在地理區內，分布在玉山山脈的玉山杜鵑及森氏杜鵑族群僅具極低的分化( $F_{ST}=0$ )，同樣地分布在中央山脈的族群間( $F_{ST}=0.036-0.226$ )其分化程度亦不顯著，相對地，玉山山脈及中央山脈間的杜鵑族群間則有  $F_{ST}=0.252$  顯著分化。

根據分子時鐘(molecular clock)假說(Zuckerkandl and Pauling 1965)，DNA 在不受到天擇或其他演化力量影響之下，會以固定速率累積遺傳變異，故分子時鐘假說可推測親緣樹狀圖中不同支系的分化時間，而不同子代支系會累積相同數目的鹼基對取代(nucleotide substitutions)，而利用葉綠體 DNA *atpB-rbcL* spacer 建構之玉山杜鵑親緣樹狀圖中發現分別有玉山山脈及中央山脈兩個支系，利用 MEGA v2.0 軟體算出兩支系間所發生的全部鹼基對取代數目(total nucleotide substitutions; K)為 0.007814，配合 Sall et al. (2003)計算之葉綠體 DNA 演化速率為  $1.0-1.5 \times 10^{-9}$ ，估算玉山杜鵑兩支系的分化時間約在 260 百萬年前左右。

表 2-1 玉山杜鵑複合群取樣資料

	Code	Location	Latitude & Longitude	N
Outgroups				
<i>R. formosanum</i>				
	RFJS	Jinshuiying	22'25"N 120'45"E	7
	RFHP	Heping	24'18"N 121'41"E	4
<i>R. rubropilosum</i>				
		Yushan Mt. Range		
	RRPT	Patungkuan	23'28"N 120'59"E	4
Ingroups				
<i>R. morri</i>				
		Yushan Mt. Range		
	RMTT	Tataka	23'28"N 120'54"E	5
	RMPY	Paiyunshanchunang	23'28"N 120'57"E	2
	RMPT	Patungkuan	23'28"N 120'59"E	6
		Central Mt. Range		
	RMCY	Chungyangchingkuan	23'29"N 121'02"E	3
	RMKS	Kuanshanling	23'16"N 120'58"E	2
	RMHS	Hsiangyangshan	23'17"N 120'59"E	2
	RMSC	Sanchashan	23'18"N 121'01"E	6
<i>R. pseudochrysanthum</i>				
		Yushan Mt. Range		
	RPTT	Tataka	23'28"N 120'54"E	3
	RPPY	Paiyunshanchunang	23'28"N 120'57"E	4
	RPPT	Patungkuan	23'28"N 120'59"E	2

台灣產特有種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣地理研究計畫

Central Mt. Range			
RPCY	Chungyangchingkuan	23'29"N 121'02"E	2
RPKS	Kuanshanling	23'16"N 120'58"E	2
RPHS	Hsiangyangshan	23'17"N 120'59"E	6
RPSC	Sanchashan	23'18"N 121'01"E	2

---



表 2-2 玉山杜鵑族群的單型歧異度及核苷酸歧異度

Geographical regions	Population	Haplotypes	Haplotype diversity (h)	Nucleotide diversity
Yushan Mt. Range		5	0.338	0.002
	Tataka	3	0.464	0.003
	Paiyunshanchunang	1	0	0
	Patungkuan	4	0.786	0.003
Central Mt. Range		14	0.907	0.012
	Chungyangchingkuan	3	0.7	0.022
	Kuanshanling	4	1	0.021
	Hsiangyangshan	7	0.096	0.017
	Sanchashan	8	1	0.015
Overall		17	0.814	0.016

表 2-3 玉山杜鵑族群及地理區間的遺傳分化指數(F<sub>ST</sub>)

F <sub>ST</sub>	Yushan Mt.			Central Mt.				
	Range	Tataka	Paiyunshanchunang	Patungkuan	Chungyangchingkuan	Kuanshanling	Hsiangyangshan	Sanchashan
Yushan Mt.								
Range	-							
Tataka		-						
Paiyunshanchunang		0	-					
Patungkuan		0	0	-				
Central Mt.								
Range	0.252							
Chungyangchingkuan		0.074	0.079	0.076	-			
Kuanshanling		0.571	0.667	0.615	0.091	-		
Hsiangyangshan		0.271	0.303	0.286	0.051	0.226	-	
Sanchashan		0.422	0.463	0.442	0.127	0.195	0.036	-

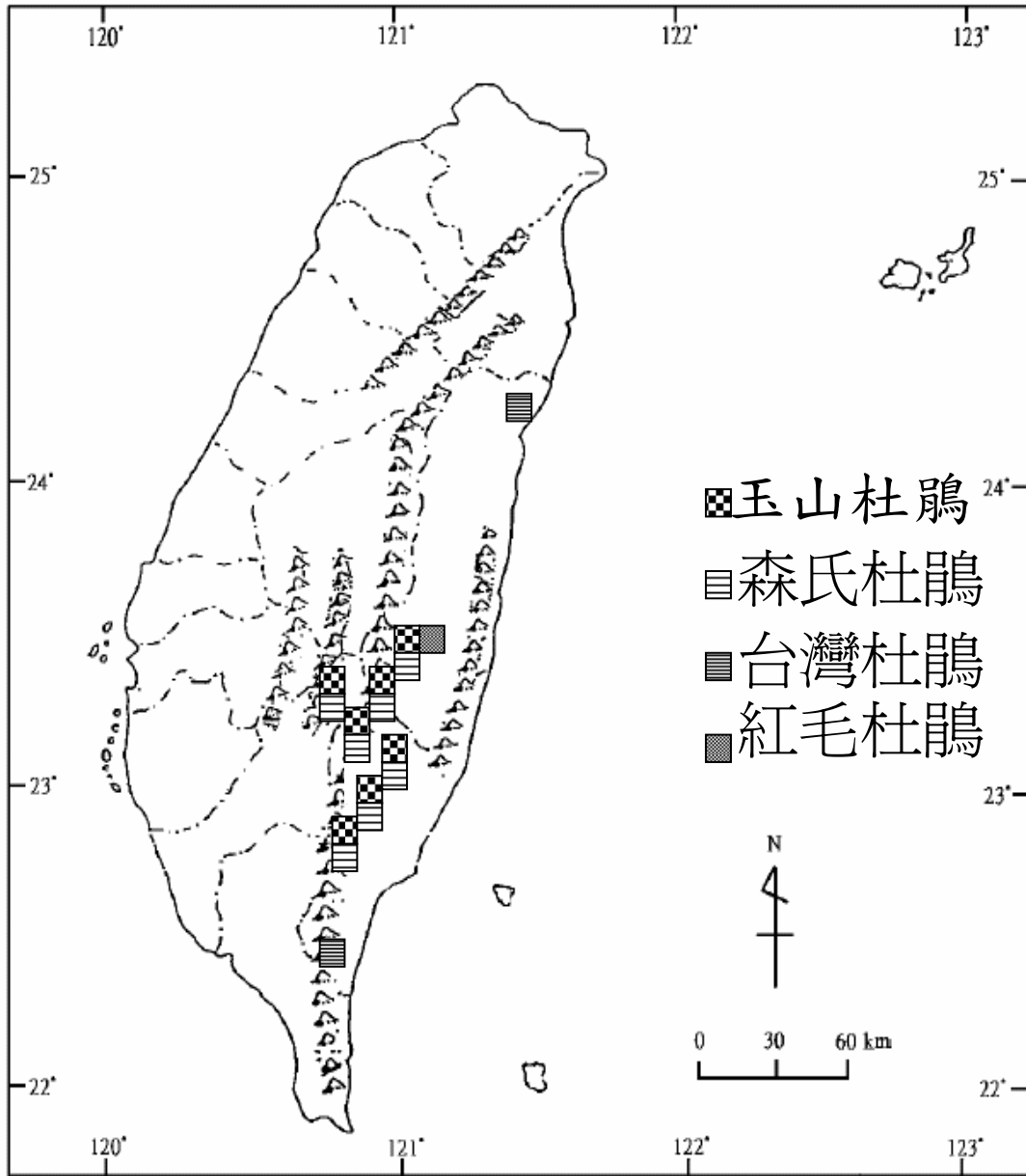


圖 2-1 玉山杜鵑族群採樣點地圖

台灣產特種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣地理研究計畫

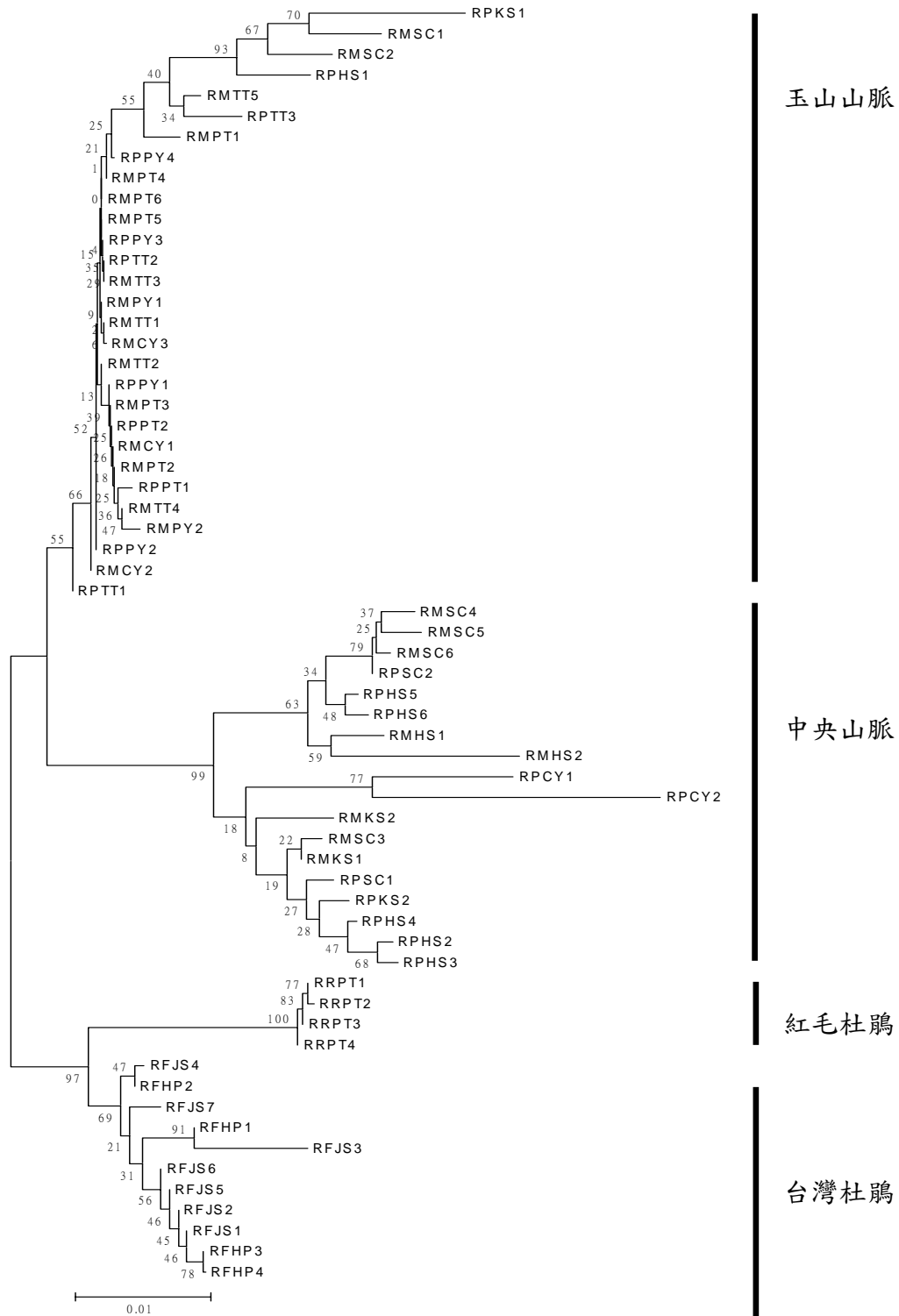


圖 2-2 玉山杜鵑根據葉綠體 DNA 位於 *atpB* 及 *rbcL* 基因之區間片段重建的 neighbor-joining 演化樹

### 第三節 討論

玉山杜鵑、森氏杜鵑、紅星杜鵑及南湖杜鵑的分類界定一直存在著爭議，本研究主要著重於玉山杜鵑及森氏杜鵑兩者分類地位的釐清，之前在台灣植物誌第一版中玉山杜鵑及森氏杜鵑被處理成不同種，而山崎敬氏(Yamazaki 1981)將森氏杜鵑處理為玉山杜鵑的亞種，不過 Pan (1988)則對於山崎敬氏的分類處理則提出質疑，指出典型玉山杜鵑其葉緣反捲，具白毛，葉長短於5公分，分布於海拔 3000-3950 公尺之高山，而典型的森氏杜鵑其葉緣不反捲，具褐毛，葉長大於6公分，分布海拔為 1650-3500 公尺之間，但兩者分布海拔重疊處常具有中間型，Pan (1988)因而主張兩者應為環境差異導致形態上之差異，而且這些變異屬於連續性變異，而 Lu and Yang (1989)則比較形態特徵如葉長、葉緣反捲程度、葉背中肋絨毛顏色、葉背腺點分布、葉脈透明片、花粉及花期與海拔分布等，這些特徵均未顯現種間發現分化，亦即其變異均為連續性改變，認為這些變異不足以用來區分玉山杜鵑跟森氏杜鵑，支持前人將兩者合併成玉山杜鵑的看法(劉和廖 1981; Pan 1988)，而 Huang and Hsu (2001) 亦提出相同的假說;本研究利用在 *atpB-rbcL* intergenic spacer 的遺傳變異所建構出的親緣樹狀圖(圖 2-2)，亦顯示玉山杜鵑跟森氏杜鵑無法區分，兩者序列均混雜在同一 clade 中，依據 cladistics，種的概念為來自於共同祖

先的所有族群後代，具有共同的進化特徵足以區分進緣的種類，而在演化親緣樹上是必須滿足 monophyly，亦即包含共同祖先及所有的後代的群，所以良好的分類群(well defined taxon)應該是 monophyletic，相對地，當分類群為 paraphyletic 時，或代表種間可能仍處在不同的 lineage sorting 階段，或逐漸趨向分化，在本研究中，玉山杜鵑及森氏杜鵑在親緣樹狀圖中均為 paraphyletic group，加上形態及生態特徵的重疊，顯示玉山杜鵑及森氏杜鵑尚未明顯分化，其變異程度仍為同種的範圍，但是形態變異為演化的產物，在保育上有其不容忽略的價值，因此我們建議應認定兩種為玉山杜鵑不同的變種，亦即玉山杜鵑(*R. pseudochrysanthum* var. *pseudochrysanthum*)及森氏杜鵑(*R. pseudochrysanthum* var. *morri*)。

依玉山杜鵑的地理分布來看，根據圖2-2明顯分成兩個地理區，分別為分布在玉山山脈(塔塔加、排雲山莊及八通關)的族群和分布在中央山脈(中央金礦、關山嶺、向陽山及三叉山)的族群，在估算玉山山脈及中央山脈族群的分化程度( $F_{ST}=0.252$ ) (表2-3)支持兩地區之地理分化，推論會造成此種現象主要是由於長時間地理隔絕所造成，而在同一地區內的族群間的分化程度則顯著較低( $F_{ST}<0.25$ )，代表杜鵑可以在高低海拔間仍相互傳播遷徙，彼此之間存在

著基因交流(gene flow)，而在親緣樹狀圖中可以看到在玉山山脈的分群中插

入有少數中央山脈的杜鵑序列，同樣地在中央山脈的分群中也插入有少數玉山山脈的杜鵑序列，顯示兩個地區彼此之間具有偶發的基因交流。

根據分子時鐘假說(K)所估算估算玉山山脈跟中央山脈的族群分化時間約為260萬年前，推測可能由於板塊擠壓導致山脈隆起造成兩個地理區族群的隔離，進而開始分化，而Dechaine and Martin (2004)認為冰河時期造成溫度下降而使高山物種往低海拔遷徙並造成原本因地理隔離之物種接觸產生基因交流，而隨著冰期結束會造成其向高海拔移動並再度分隔，因玉山杜鵑為高山植物，推測可能在冰河期間溫度下降，杜鵑族群向低海拔處遷徙，造成原本生長於不同地理區間的高海拔族群可能在低海拔地區產生基因交流，而隨著冰期結束使得杜鵑族群向高海拔遷徙造成族群再度分隔。

Grant and Bowen (1998)指出核苷酸歧異度( $\theta$ )和基因型歧異度(Hd)大小之不同組合，可解釋物種或族群譜系在歷史上的歷程。根據表 2-2，其中在玉山山脈的族群為具低的 $\theta$ 及 Hd，代表族群近期曾經歷長期或嚴重的瓶頸效應，由少數先驅者之祖先族群快速成長而來，造成核苷酸歧異度和基因型歧異度均低，相對地，在中央山脈為具有高的 $\theta$ 及 Hd，顯示此族群為具有久遠歷史之穩定族群，或由兩個具有高度分歧之族群二次接觸後譜系混雜所造成之現象，亦即中央山脈的杜鵑族群應被視為遺傳多樣性的熱點。

長期以來，由於自然或人為因素，使得許多具有學術或經濟價值的生物遭受嚴重的破壞，族群數量急遽減少，許多原生種的野外生物，處於受威脅或瀕臨絕滅的危機之中，然而，一個物種的消失，往往又會導致另外一些生物的生存危機，有鑑於此，將稀有生物的保育列為重點研究項目，踏實施行保育工作。

保育的目的，即藉由人類的規劃及努力，來挽救瀕危物種免於因外在人為因子干擾而滅絕，最重要課題為保持物種的野外原棲地及穩定族群量，因為要維持一物種的延續，理論上有一最低族群數的要求，即族群遺傳學上的最低族群存活數(minimal viable population)，這意謂著對個體的數量而言，存在某種臨界，以便在某種可以接受風險下使族群在特定的時間範圍內維繫生存。早期研究對於最低存活族群之問題研究強調族群普查之統計方法，晚期的研究工作則著重於從遺傳的觀點討論族群滅絕的問題，這些研究結果支持族群量和族群結構都存有關鍵因數的論點，族群一旦低於這些關鍵因數，近親交配和遺傳漂變兩者皆是失去遺傳多樣性的主要原因(Frankham and Briscoe 2002)。因此維持最小存活族群，便成爲一個對保育瀕危生物的重要課題，小族群在數量上除了要面臨生態上的威脅，在遺傳上，當族群數量愈小或密度太低，族群內近親交配(inbreeding)機率愈高，導致同型合子



(homozygote)比例高，基因漂變(genetic drift)亦會使小族群的遺傳因子變異喪失，進而族群的適應度下降，亦降低維持生存、繁衍後代的能力，因此，保有物種遺傳歧異度來增加對環境改變的適應力相形之下格外重要(Malcolm and Hunter 2002)。

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

### 台灣產特有種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣地理研究計畫

其獨特的遺傳多樣性，造成兩地區可區分為不同的 clade，也因為這種分化的結果，造成兩地區之杜鵑兩個均具有高度且相異遺傳多樣性，在執行保育工作時應將兩地區同時納入考慮，同時保留兩個地區的遺傳多樣性，以因應天然或人為因素對杜鵑造成危害時，杜鵑族群依然能夠保有遺傳多樣性。

## 第三章 結論與建議

### 第一節 結論

由本研究結果顯示，由於玉山杜鵑及森氏杜鵑在親緣樹狀圖中呈現不分化，未能 nophyly 的條件，兩者應為同種，即玉山杜鵑(*Rhododendron pseudochrysanthum* Hayata)。玉山杜鵑因為地理隔絕關係可區分為玉山山脈跟中央山脈地區兩群，地理區間鮮少有基因交流相對地在同一地區內之族群因較不受地理隔絕影響彼此之間仍有種子的傳播。杜鵑在玉山山脈跟中央山脈是屬於顯著分化，分別代表不同的保育單位。

### 第二節 建議

由於玉山杜鵑多分布在 1650-3950 公尺高海拔以上，所受到人為干擾較平地或低海拔物種低，加上分布於玉山國家公園的物種受到較完善保育，以其為研究物種可提供研究學者完整且詳盡的資訊，對於研究台灣特有物種有莫大的幫助。就玉山杜鵑而言，其現今族群量大且分布範圍廣，不易受到

物種絕滅等危害，這並不代表就不需去經營管理以保持其遺傳多樣性，玉山杜鵑等台灣特有種，相較於世界廣泛分布的種類，侷限的分布降低了有效的族群大小，遺傳變異本來就較易流失，若未能受到適當的保育作為，將加速遺傳漂變(genetic drift)的影響，導致其基因歧異度急速降低，對物種造成不可回復的傷害，為了避免此種狀況發生，明確釐清種與種的界限將是根本而必要的工作。玉山杜鵑在玉山山脈跟中央山脈均保有高度遺傳歧異度，應將兩地區的族群作有效經營管理，維持兩地區玉山杜鵑的遺傳多樣性，避免錯誤保育策略如不當開發、砍伐等使其產生遺傳漂變，嚴重影響其遺傳多樣性，目前主要工作應維持兩地區棲地的完整，避免造成棲地破碎化等不利因素，保持物種遺傳多樣性符合國家公園永續經營的原則。此外，台灣高山植物多為特有物種，相較於其他廣泛分布物種更值得深入研究，有助於瞭解台灣高山特有物種之演化歷史，藉此瞭解具有多樣性的熱點，另一方面，由於複合種群在受限於形態、棲地等相似度高而不易判定種，故利用分子技術來瞭解其遺傳歧異度能夠有效地界定並釐清複合種群。為了落實保育工作，應加強玉山國家公園境內之台灣特有種的研究，利用遺傳歧異度分析，瞭解物種族群分化及基因交流程度，依此建立可供管理之保育單位，並提供有效的保育策略及建議。

附錄一

	委員意見	回應情形
期中簡報	研究材料應包含南湖杜鵑，以利確立分類地位。	南湖杜鵑及七星杜鵑分布在玉山國家公園境外，暫不列入處理。
	基於保育目的，請根據分子資料提出分類處理之建議。	參閱 P.22 第三節 討論，建議玉山杜鵑及森氏杜鵑為同種不同變種。
	Hot spot 之評估需有足夠樣本。	取樣數列於表 2-1，P. 15
	請於期末簡報或報告中簡述玉山地區植物遺傳多樣性研究整體架構與方向及研究重點，俾供管理處經營管理之參考。	依照辦理，參閱 P. 27 第二節 建議。
	報告中所引用資料，部分未列參考文獻，請補充。	已補充。

台灣產特有種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣地理研究計畫

<p>期末簡報</p>	<p>本研究利用分子技術釐清玉山杜鵑和森氏杜鵑的關係並提出遺傳多樣性最高的熱點深具重要性。</p>	<p>略</p>
	<p>地理區應以自然地理區為準;採樣點請以地圖呈現。</p>	<p>依照辦理，參閱 P. 19 圖 2-1。</p>
	<p>研究分析方法與結果使用的方法應一致。</p>	<p>已修正。</p>
	<p>文中提及玉山杜鵑複合群（玉山杜鵑、森氏杜鵑、紅星杜鵑、南湖杜鵑），但僅討論玉山杜鵑及森氏杜鵑，是否加註園區內無其他二者分佈之說明。</p>	<p>南湖杜鵑及七星杜鵑分布在玉山國家公園境外，暫不列入處理。</p>
	<p>學名之屬名連續時，第二個以後之屬名要縮寫（p6、p7）。</p>	<p>依照辦理。</p>

	<p>有關「變種」之分類群，若數據支持，則結論可明確提出。</p>	<p>參閱 P. 22，第三節 討論 建議玉山杜鵑及森氏杜鵑 為同種不同變種。</p>
	<p>本研究之成果豐碩，請提供相關資料 圖片，以利發佈新聞稿；並提供採樣 點之座標，以利建置資料庫。</p>	<p>略</p>

台灣產特有種玉山杜鵑之保育遺傳學及親緣地理研究計畫



參考書目：

- 王唯匡。(2001)。台灣特有水生植物大安水蓑衣的族群分化與親緣地理學之探討。國立成功大學生物學研究所碩士論文。
- 陳怡雁。(2004)。鈴木草屬(唇形科)，台灣及琉球特有屬，之親緣地理學研究。國立成功大學生物學研究所碩士論文。
- 潘志宏。台灣石 主要組織相容性複合體第二型基因 DAB 基因座之分子演化研究。國立成功大學生物學研究所碩士論文。
- 劉崇瑞，廖日京。(1981)。樹木學 (下)。P. 737，台灣商務印書館。
- Avise, J. C., R. M. Arnold, B. E. Bermingham, T. Lamb, E. Neigel, C. A. Reeb and N. C. Saunderson (1987). Intraspecific phylogeography : the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review Ecology Systematic* 18: 489-522.
- Avise, J. C. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.
- Barry, C. C. and P. D. Moore (2000). Biogeography. London, Blackwell Science.
- Bush, M. B. and R. J. Whittaker (1993). Non-equilibration in island theory of Krakatau. *Journal of Biogeography* 20: 453-457.
- Byrne, R. (1980). Man and the variable vulnerability of island life-A study of recent vegetation change in the Bahamas. Washington D. C., Smithsonian Institution.
- Byrne, M. and G. F. Moran (1994). Population divergence in chloroplast genome of *Eucalyptus nitens*. *Heredity* 73: 18-28.
- Case, T. J., D. T. Bolger and A. D. Richman (1992). Reptilian extinctions: the last ten thousand years, Chapman and Hall, New York.
- Chiang T. Y., B. A. Schaal, C. I. Peng (1998) Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between atpB and rbcL genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 245-250.
- Crawford, D., E. Ruiz, T. Tepe, P. Aqueveque and F. Gonzalez (2001). Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *American Journal of Botany* 88: 2156-2203.

- Cruzan, M. B., M. L. Arnold, S. E. Carney, K. R. Wollenberg, M. L. Arnold, S. E. Carney and K. R. Wollenberg (1993). CpDNA inheritance in interspecific crosses and its effect on evolutionary inference in Louisiana irises. *American Journal of Botany* 80: 344.
- Dechaine, E. G., and A. P. Martin (2004) Historic cycles of fragmentation and expansion in *Parnassius smintheus* (Papilionidae) inferred using mitochondrial DNA. *Evolution* 58: 119-127.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Frankham, R. (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland populations. *Heredity* 78: 311-327.
- Frankham, R. and D. A. Briscoe (2002). Introduction to conservation genetics. New York, Cambridge.
- Futuyma, D. J. (1986). Evolutionary Biology. Sunderland, Sinauer.
- Grant, W. A. S. and B. W. Bowen (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 89: 415-426.
- Higgins D. G., A. J. Bleasby and R. Fuchs. (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS* 8: 189-191.
- Hsu C. C. (1973) Biosystematics investigation on the *Rhododendron* of Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Coun.* 6: 13-50.
- Huang S. Y. and K. K. Hsu (2001) Molecular phylogeny of eight Taiwanese *Rhododendron* species based on chloroplast trnF-trnL DNA sequences. *Taiwan J. For. Sci.* 16: 153-160.
- Jukes, T. H. and C.R. Cantor. (1969). Evolution of protein molecules. In: Mammalian Protein Metabolism (ed Munro H.N.), pp. 31-132. Academic Press, New York.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol. Evo.*, 16: 111-120.

- Li, H. L. (1978) Ericaceae. In Li HL et al. (eds.) Flora of Taiwan. 1<sup>st</sup> ed. Vol. 4, pp. 21-38.
- Liu, T. K., Y. G. Chen, W. S. Chen, and S. H. Jiang (2000). Rates of cooling and denudation of the Early Penglai Orogeny, Taiwan, as assessed by fission-track constraints. *Tectonophysics* 320; 69-82.
- Lu S. Y., Y. P. Yang (1989). A revision of *Rhododendron* (Ericaceae) of Taiwan. *Tainwan For Res Inst New Ser* 4: 155-166.
- MacArthur, R. H. and E. O. Wilson (1972). Geographical Ecology-Pattern in the distribution of species., Princeton University Press.
- Malcolm, L. and J. Hunter (2002). Fundamentals of Conservation Biology. Orono, Blackwell.
- Moritz, C. (1994). Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends of Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Moritz, C. and P. Bermingham (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-370.
- Nei, M. and F. Tajima. (1983). Maximum likelihood estimation of number of nucleotide substitution from restriction site data. *Genetica* 105: 207-217.
- Ouborg, N. J., Y. Piquot and J. M. V. Groenendael (1999). Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87: 551-568.
- Pan, F.J. (1988). Altitudinal variation of *Rhododendron pseudochrysanthum* and *R. morii*. *Q J Chin For* 21: 99-102.
- Rozas, J. and R. Rozas. (1997). DnaSP versin 2.0: a novel software package for extensive molecular population population genetics analysis. *Comput. Applic. Biosci.* 13: 307-331.
- Sall, T., M. Jakobsson, C. Lind-Hallden and C. Hallden (2003). Chloroplast DNA indicates a single origin of the allotetraploid *Arabidopsis suecica*. *J. Evol. Biol.* 16; 1019-1029.
- Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academia Sciences, USA* 74: 5463-5467.

- Smith, F.D.M., R.M. May, R. Pellow, T.H. Johnson, and K.R. Walter. (1993). How much do we know about the current extinction rate? *Trends in Ecology and Evolution* 8:375-378.
- Stuessy, T. F. (1998). Evolution and Speciation of Island Plants. Cambridge University Press: Cambridge.
- Tsai, C. C., S. C. Huang, C. H. Chen, Y. H. Tseng, P. L. Huang, S. H. Tsai and C. H. Chou (2003) Genetic relationships of *Rhododendron* (*Ericaceae*) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78: 234-240.
- Whittaker, R. J. (1998). Island biogeography : Ecology, Evolution and Conservation. New York, Oxford University Press.
- Yamazaki, T. (1981). Some new taxa of *Rhododendron* from Japan and Taiwan. *Journ. Jap. Bot.* 56: 357-366.
- Ying, S.S. (1976). The Ericales of Taiwan. *Q J Chin For* 9: 107-137.
- Zuckerlandl, E., and L. Pauling. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. *In* Evolving genes and proteins. Edited by Bryson, V., and H. J. Vogel. Academic Press, New York. P. 97-166.