

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 97-02-8-04

# 97 年度火炎山馬尾松分類研究及族群之 保育初探-馬尾松之遺傳結構初探

Genetic structure study of *Pinus massoniana* of Miaoli Sanyi

Huoyanshan Nature Reserve



委託機關：行政院農業委員會林務局新竹林區管理處

執行機關：台灣植物分類學會

中華民國 97 年 12 月

## 目錄

一、	摘要.....	3
二、	前言.....	5
三、	全程目標.....	9
	(一) 總目標.....	9
	(二) 重要工作項目及實施方法.....	9
四、	材料與方法.....	10
五、	結果.....	14
六、	討論.....	16
七、	結語與建議.....	18
八、	參考文獻.....	19
九、	附錄一.....	30
十、	附錄二.....	32

## 圖目錄

圖一、	葉綠體 DNA 之 Maximum Likelihood 樹狀圖, node 值為 bootstrap.....	21
圖二、	葉綠體 DNA 之網狀樹狀圖.....	22
圖三、	細胞核 DNA 之 Maximum Likelihood 樹狀圖, node 值為 bootstrap.....	23
圖四、	細胞核 DNA 之網狀樹狀圖.....	24

## 表目錄

表一、	馬尾松之採樣點及數量.....	25
表二、	馬尾松之葉綠體 DNA 單型.....	26
表三、	馬尾松之葉綠體 DNA 遺傳歧異度.....	27
表四、	馬尾松之細胞核 DNA 單型.....	28
表五、	馬尾松之細胞核 DNA 遺傳歧異度.....	29

## 摘要

台灣棲地及氣候之多樣性造就了台灣物種多樣性，而冰河時期之氣候改變、陸橋產生，造就了台灣與鄰近大陸物種之基因交流，加上台灣地處低緯度，提供冰河避難之棲地，眾多因素使得台灣保有了許多物種遺傳的多型性及歧異度。分布於苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松(*Pinus massoniana* Lambert)由於受到病蟲害影響，導致其族群數量銳減、趨近滅絕，因此針對馬尾松之保育及復育實為刻不容緩之事，本研究結果顯示，火炎山自然保留區之馬尾松因保有古老祖先基因型顯現族群之高度多樣性，但野外族群數量的減少將威脅馬尾松存活，建議持續進行族群之數量及遺傳多樣性估算，種原的收集將有助未來物種復育。

## Abstract

Diverse habitats and climates promote the high species diversity in Taiwan. During the ice age, land bridge that connect Taiwan and near mainland allowed the gene flow between populations that had been geographically isolated. As a refuge, Taiwan's populations usually maintain high genetic polymorphisms and diversity. In Taiwan, *Pinus massoniana* Lambert is mainly distributed at the Miaoli Sanyi Huoyanshan Nature Reserve. Recently, pathogens have caused the population decline. Because of high extinction risk, a conservation program for *P. massoniana* should be established. In this study, we examined the taxonomic status and conservation genetics of *P. massoniana*. Mergence of major lineages attributes to maintain diverged

alleles in the small-size population in Taiwan. We suggest that the sustained inventory, the evaluation of genetic diversity and seed collection will be helpful for future reservation.

## 前言

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

愈來愈多的分子證據顯示出台灣植物高遺傳歧異度的特質，甚至遠高於整體中國大陸族群遺傳歧異的總和(Chiang& Schaal 2006)。異常的高遺傳歧異度與台灣的冰河歷史有密不可分的關係，根據現今的植物組成以及化石證據，台灣島嶼的生物大多來自於鄰近的亞洲大陸，這一個由歐亞大陸板塊及菲律賓海板塊擠壓隆起的島嶼(Sibuet& Hsu 1997, 2004)，約在距今約500-600萬年前，開始有動植物從大陸移入並拓殖(colonization)，並且歷經多次的冰河週期，其中最後一次冰河擴張距今約10萬年前，一直延續到最近的兩萬年前。在冰河擴張時期，因海水水位明顯下降(約達120公尺)，使得連結台灣及大陸間的陸橋從海中裸露出來，提供了動植物移入台灣的管道，加上台灣地處低緯度，在冰河擴張時期，提供了許多生物避難的棲所，因為此一不平常的冰河及地質歷史，使得台灣島嶼保有了許多遺傳的多型性及歧異度(Chiang& Schaal 2006; Hikida& Ota 1997)。

松樹(*Pinus*)為北半球泛分布物種，其快速生長及高環境耐受性等優勢條件使其在自然環境下能快速擴展其族群，為陽性先驅物種之一，在野外環境下，松樹族群有助於調節棲地微氣候，提供野生生物棲息覓食環境，加上其葉及枝幹所富含之松脂易引起火災發生，造成林相改變，有別於其他植物受到火災的威脅，松樹在火災過後能快速生長並佔據新的生育地，有助於其族群擴張，除此之外，松樹不僅對於生態環境有極大影響，對於人類活動也扮演重大角色，自古人們即受到松樹桀傲不屈之樹型所吸引，以松樹為畫作、詩詞等題材更是層出不窮、歷久不衰，現在更為庭院造景重要觀賞植物之一，顯現松樹對於自然環境及人為活動重要性，因此針對於此屬物種之研究也相對重要。

松樹廣泛分布於北半球，隸屬於松科(Pinaceae)，約有 100 餘種(Richardson 1998)，為針葉樹中物種種類最多、分布最廣泛的物種之一，根據植物誌第二版第一冊(Li& Keng 1994)指出台灣松屬物種共有 4 種原生種，包含台灣華山松(*Pinus armandii* Franchet var. *masteriana* Hayata)、馬尾松 (*P. massoniana* Lambert)、台灣五葉松 (*P. morrisonicola* Hayata) 及台灣二葉松 (*P. taiwanensis* Hayata)，7 種屬於外來栽種，其中台灣華山松及台灣五葉松隸屬於 *Strobos* 組 *Strobi* 亞組，針葉五根一束，葉鞘鱗片在抽芽後脫落，馬尾松及台灣二葉松隸屬於 *Pinus* 組 *Pinus* 亞組，針葉 2 根一束，葉鞘鱗片在抽芽後宿存 (Richardson 1998)。馬尾松主要分布於台灣北部及東部低海拔山區，其中又以苗栗火炎山地區為主要分布地區之一，過去由於當地地形奇特、景觀特殊，加上為全台馬尾松數量最多之分

布區域，因而將火炎山規劃為自然保留區，以維護當地特殊地形景觀及馬尾松族群，馬尾松更新為生育地的崩塌，形成開闊的生育環境，毬果掉落於石礫中，加上陽光照射提高了石礫的溫度，使得掉落於石礫中的毬果因溫度曾該而爆裂出來並萌芽更新，然而一嚴重危害馬尾松之問題為松材線蟲感染，早在 1958 年在台北縣石門、金山一帶即曾紀錄松材線蟲感染琉球松 (*P. luchuensis* Mayr)、黑松 (*P. thunbergii* Parlatore) 等記錄，原先被認為只會啃食琉球松、黑松之松材線蟲，近年來卻被發現於台灣原生種松樹也有感染情況，感染範圍也由原本侷限於台灣北部逐漸往中南部擴大，甚至於高海拔之台灣二葉松及台灣五葉松也無一倖免，而位於苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松更是首當其衝，根據野外調查結果顯示，苗栗三義火炎山自然保留區內之馬尾松族群多數已遭感染或死亡，造成當地族群數量銳減，顯示松材線蟲對於馬尾松族群影響極為嚴重，因此針對於馬尾松之保育實為刻不容緩，亟需進行野外保育及復育工作。

親緣地理學為生物地理學的分支之一，由 Avise et al. (1987) 所提出有關歷史性地理學 (historical biogeography) 的觀念，主要探討物種親緣和地質歷史 (如冰河、高山隆起等) 間的關係，主要受到遷徙 (dispersal) (經由 range expansion 或 jump dispersal 使生物遷徙到原本分離的區域) 和地理隔離事件 (vicariance) (因冰河事件、山脈隆起或河水切割等地質事件使連續分佈的生物產生地理隔離) 造成種間或族群間產生空間上的不連續性分佈 (Ronquist 1997)，和傳統生物地理學最大不同在於親緣地理主要著重於近緣物種 (closed related species) 或種

內族群間演化歷史和地質事件間的關係，因此親緣地理學被視為族群遺傳（又稱為微演化，microevolution）和種化間的橋樑，利用分子工具瞭解族群遺傳結構和地質歷史事件間的關連。

分子工具的應用在於研究基因遺傳變異並瞭解物種族群遺傳結構，配合其生物在空間上的分布可重建物種親緣關係及釐清分類地位，物種在其演化歷史過程中，受到地質歷史及物種遷徙機制的影響，造成種間或族群間之遺傳結構的不同，而基因體中之非轉錄區域因較不受天擇所影響及演化速率較快等特性，根據其遺傳結構將可瞭解物種族群間遭受到的演化歷史，分子序列如 DNA、蛋白質等遺傳物質因來自於共同祖先之同源特徵，可較準確重建物種親緣並顯現物種演化歷史(Graur& Li 2000)，另外在分子技術的快速發展如聚合酵素連鎖反應(PCR)技術、基因選殖 (cloning) 及分子定序技術 (sequencing) 的成熟等，也使得分子生物學成為生物學的主流之一，而分子技術如隨機擴增多型性 DNA (RAPD)、限制性片段長度多形性 (RFLP)、擴增片段長度多形性 (AFLP)、同功酵素 (isozyme) 和微衛星 DNA (microsatellite DNA) 等多被用於研究物種親緣或族群遺傳研究(Goldstein& Schlötterer 1999)，其中最常被利用的分子標記為胞器 DNA、細胞核 DNA 及微衛星 DNA。本研究將利用來自於雙系之細胞核 DNA intron 片段 ADHC2 intron 4 - 8 及父系之葉綠體 DNA noncoding spacer *atpB-rbcL* intergenic spacer(Demesure *et al.* 1995)互相配合，用以釐清馬尾松之物種親緣及族群演化歷史。

## 全程目標

### 總目標

本研究主要的目的即在利用分子工具釐清分布於苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松親緣關係，以分子標記根據遺傳的變異，重建出彼此之物種親緣，並估算其遺傳歧異度，提供可行之保育策略。

### 重要工作項目及實施方法

1. 以細胞核 DNA ADHC2 intron 及葉綠體 DNA noncoding spacer *atpB-rbcL* intergenic spacer 互相配合，重建苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松的物種親緣及瞭解族群遺傳結構。
2. 依據遺傳距離估算物種遺傳歧異度及重建物種親緣。
3. 建構苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松的遺傳資料庫，提供物種鑑定之依據。

## 材料與方法

一、以 CTAB (Doyle & Doyle, 1987) 方法進行 DNA 萃取，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 $\mu$ l 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)

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 定序是以雙去氧核糖鏈停止法(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 W(Larkin *et al.* 2007)程式完成比對及排列 (alignment)。比較彼此間鹼基對替換(transition；兩個嘌呤或嘧啶間的突變，A/G 或 T/C 突變)及鹼基對顛換(transversion；嘌呤與嘧啶間的突變，T.C/A.G 突變)的發生頻率及比值，來計算馬尾松複合群彼此的序列變化。利用 MEGA 4.0 (Molecular evolutionary Genetics Analysis Version 2.0)(Tamura *et al.* 2007)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，並用 Phylip 以 Maximum-likelihood 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。並利用 MINSPNET(Excoffier& Smouse 1994)建構 network。

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

以 DnaSP (Version 5.0,(Librado& Rozas 2009) )計算族群內、族群間及地理區間的 genetic diversity。以 haplotype diversity (h) (Nei& Tajima 1983)，及以 nucleotide divergence (d<sub>ij</sub>)(Jukes& 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 中是表示族群中個體的有效族群量，

$m$  表示個體的遷徙能力，當  $F_{ST}$  值愈高，族群間的遺傳分化程度就愈大。以 Arlequin 軟體 (Excoffier *et al.* 2005) 計算 AMOVA，估算遺傳變異在地理區間、地理區內族群間及族群內之分布。以 Isolation with migration (IM) (Nielsen & Wakeley 2001) 利用 Markov chain Monte Carlo (MCMC) 方式估算有效族群數量及基因交流程度。以 BEAST v. 1.3 (Drummond & Rambaut 2007) 估算族群最近共祖 (The most recent common ancestor, TMRCA)。

## 結果

### 一、 馬尾松之遺傳變異

本研究比較台灣與中國之馬尾松族群之葉綠體 DNA *atpB-rbcL* intergenic spacer 及細胞核 DNA *AdhC2* introns (表一)。

在葉綠體 DNA 中共有 14 單型 (I - XIV)(表二)，而 III，VIII，X，及 XII 為族群間所共有，其他則各自立屬於單一族群。在遺傳歧異度方面(nucleotide diversity,  $\theta$ )(表三)，馬尾松之歧異度為 0.00596，台灣的族群則為 0.00488。

在細胞核 DNA 中共有 51 單型 (表四)，可以分成  $\alpha$ ， $\beta$ ， $\gamma$  及  $\delta$  四群。在遺傳歧異度方面 (表五)，馬尾松之遺傳歧異度為 0.01142，台灣的族群則為 0.00369。

### 二、 馬尾松之基因支系及網狀樹狀圖分析

利用 Maximum likelihood 方法建構葉綠體 DNA 之親緣樹狀圖 (圖一)，可分成三群 A，B 及 C，這三群並無明顯之地理分群，其中在 cluster C 中，XI 單型僅分布於台灣。根據溯祖理論建構葉綠體 DNA 之 minimum spanning network (圖二)，cluster B 位於 interior node，分別連接 cluster A 及 C。

利用 Maximum likelihood 方法建構細胞核 DNA 之親緣樹狀圖 (圖三)，可分成  $\alpha$ ， $\beta$ ， $\gamma$  及  $\delta$  四群，在 cluster  $\gamma$  及  $\delta$  中，分布台灣之 *pmt4* 及 *pmt6* 則位於 basal 位置。在 minimum spanning network 中 (圖四)， $\beta$  位於 interior node。

### 三、 馬尾松之遺傳結構及族群動態

以 AMOVA 分析葉綠體 DNA 結果顯示只有 3.42% 變異存在於族群內 ( $\Phi_{sc} =$

0.028), 大部分變異存在於地理區內族群間 (38.48%,  $\Phi_{ST}=0.560$ )及地理區間族群 (58.78,  $\Phi_{CT}=0.420$ )(P 均小 0.01), 而在細胞核 DNA 也有相似結果 ( $\Phi_{SC}=0.080$ ,  $\Phi_{ST}=0.467$ ,  $\Phi_{CT}=0.420$ ) (P 均小 0.01)。以葉綠體 DNA 比較族群分化指數顯示, 台灣族群與大陸族群呈現顯著高度分化 ( $F_{ST}=0.639-0.687$ ), 但大陸彼此間族群則不明顯分化。以細胞核 DNA 比較族群分化指數顯示, 不僅台灣族群與大陸族群呈現分化, 大陸彼此間族群均呈現分化情形。

利用 IM 估算台灣與大陸族群間之基因交流, 葉綠體 DNA 及細胞核 DNA 估算之雙向基因交流值 (m) 分別為 0.025 vs. 0.035 及 0.020 vs. 0.028, 而大陸族群之有效族群數量約為台灣族群之 21-31 倍。

利用 mismatch distribution analyses 分析馬尾松之族群動態, 在葉綠體 DNA 中大多族群呈現雙峰或多峰的情況, 而 Tajima's D, Fu and Li's D 及 Fu's Fs 分析多呈現不顯著負值。在細胞核 DNA 中也呈現相似的情況。

#### 四、 分子時鐘估算

利用 BEAST v. 1.3 估算葉綠體 DNA 及細胞核 DNA 之最近共同祖先(the most recent common ancestor, TMRCA), 在葉綠體 DNA 中所有單型之共同祖先為 16.0MYA, 而 cluster A 及 B 分化為 5.3 MYA, cluster C 分化為 2.13 MYA。而在細胞核 DNA 中所有對偶基因之共同祖先為 1.26 – 1.58 MYA, 而 lineage  $\delta$  分化為 0.89 – 1.11 MYA, lineage  $\gamma$  和 lineage  $\alpha+\beta$  分化為 1.24 – 1.42 MYA。

## 討論

分布於苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松其外型與台灣二葉松相近，然而比較其毬果及樹脂溝顯示，台灣二葉松之毬果較大、鱗臍先端具刺，內生樹脂溝 2 條，苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松毬果較小、種鱗的鱗臍稍凹，樹脂溝內生混合外生，3-6 條，而這些形態差異可將兩分類群區分，因此本研究也沿用 Li & Keng (1994) 分類處理進行馬尾松族群之分析。

馬尾松為廣泛分布於中國中部、南部及台灣之物種，不同於原本預期應具有高度遺傳歧異度，在葉綠體 DNA 中 8 個族群 320 個個體中僅有 14 個單型，其遺傳歧異度 ( $\theta$ ) 僅為 0.00596，低於台灣二葉松及琉球松，但與黃山松相近，而在細胞核 DNA 中也偏低，此一結果可能來自於族群數量的減少，造成歧異度的喪失。如同黃山松受冰河影響具有較低之遺傳歧異度，第四紀冰河同樣造成馬尾松族群之歧異度喪失 (Chiang *et al.* 2006)，在中國南部具有較高之單型及遺傳歧異度也支持冰河確實對馬尾松造成影響。

馬尾松在物種分布上呈現不連續性，儘管近代人為干擾確實會造成族群之破碎化，但仍需長時間隔離才會造成遺傳歧異度大量喪失，而 AMOVA 結果支持顯著地理區高度分化，推測可能是冰河時期造成長期分隔，使得族群呈現不連續分布及喪失歧異度，而近代族群數量的減少更加速其歧異度之降低。

中國南方及台灣在冰河時期時可能為馬尾松之冰河避難所，過去在冰河時期時其溫度比現今溫度低 2 - 6°C，海平面的降低造成大陸與台灣間陸橋的形成，而

陸橋的形成更提供北方物種向南遷徙的路徑並形成冰河避難所，使得台灣的物種具有高度之遺傳歧異度，而隨後冰河時期結束、陸橋消失，使得台灣的物種與大陸的物種產生地理隔離，隨著分隔時間增加而分化，台灣二葉松即為其中一例，相對於泛分布於大陸之黃山松低歧異度，處於台灣的台灣二葉松仍保有古老之基因型，具有較高之遺傳歧異度，而馬尾松在台灣的單型分別存在於不同之支系(葉綠體 DNA：B 及 C，細胞核 DNA： $\gamma$  及  $\delta$ )，顯示台灣族群具有高度的遺傳歧異度，而台灣海峽所造成之地理隔離更促使台灣的族群與大陸的族群遺傳分化。

根據 IM 結果顯示，在葉綠體 DNA 方面，台灣的族群與大陸的族群分化約為 2.177 (1.131 – 3.543) 百萬年，支持馬尾松在更新世時期的拓殖。而在細胞核 DNA 方面分化則較近 (約為 1.305MYA)，推測不一致的原因主要來自於不同之基因重組速率(genetic recombination)所造成。估算馬尾松之有效族群數量顯示，分布於台灣之族群估算約為 500 – 700 株，但野外族群不到 100 株，相較於共同祖先之有效族群數量極低，推測為近代之族群收縮 (demographic shrinking) 造成。而在台灣與大陸的族群間具有較低之  $m$ ，顯示島嶼與大陸間因台灣海峽造成地理隔離，彼此間基因交流程度低，進而彼此分化。

## 結語與建議

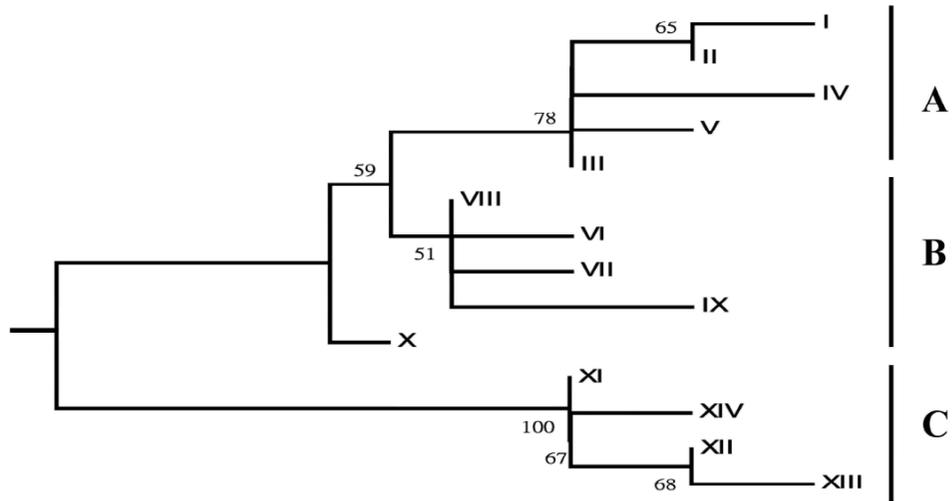
分布於台灣之馬尾松受到過去冰河歷史及地質影響，儘管族群數量遠小於大陸之族群，因保有古老祖先基因型顯現族群之高度多樣性，然而有效族群數量偏低，加上近年來野外族群的大量死亡可能為其一大隱憂，當物種野外族群數量偏低，將嚴重影響物種適存度，為避免此一狀況發生，對於瀕危物種進行保育及復育將有助於維護其適存度，在進行保育計劃時，針對一個具遺傳多樣性，且為 Evolutionary Significant Units (ESUs) (Moritz 1994) 的物種之有效管理單位將有效保有物種之遺傳歧異度，而研究顯示馬尾松在台灣之單型分別存在於不同之支系 (葉綠體 DNA: B 及 C, 細胞核 DNA:  $\gamma$  及  $\delta$ )，顯示在進行馬尾松保育及復育時，應針對分布於苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松族群進行單型之鑑定，同時將不同之單型進行植株復育及種子保存、維持其遺傳多樣性，以供未來復育所需之種原。針對於野生族群方面，建議未來持續進行苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松族群數量、環境監測及遺傳多樣性估算，以瞭解馬尾松族群之族群動態。針對於復育方面，建議在區外進行不同單型之馬尾松個體種植，並持續收集種子以完善保有物種之種原及遺傳歧異度。

## 參考文獻

- Avise JC, J. Arnold, R. M. Ball, *et al.* (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.
- Chiang TY, Schaal BA (2006) Phylogeography of plants in Taiwan and the Ryukyu archipelago. *Taxon* **55**, 31-41.
- Chiang TY, Schaal BA, Peng CI (1998) Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **39**, 245-250.
- Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, *et al.* (2006) Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Molecular Ecology* **15**, 765-779.
- Demesure B, Sodji N, Petit RJ (1995) A Set of Universal Primers for Amplification of Polymorphic Noncoding Regions of Mitochondrial and Chloroplast DNA in Plants. *Molecular Ecology* **4**, 129-131.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-15.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *Bmc Evolutionary Biology* **7**, -.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Excoffier L, Smouse PE (1994) Using Allele Frequencies and Geographic Subdivision to Reconstruct Gene Trees within a Species - Molecular Variance Parsimony. *Genetics* **136**, 343-359.
- Felsenstein J (1985) Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Goldstein DB, Schlotterer C (1999) Microsatellites: Evolution and Applications. *Oxford University Press, Oxford*.
- Graur D, Li WH (2000) Fundamentals of Molecular Evolution 2nd. *Sinauer Associates, USA*.
- Hikida T, Ota H (1997) Biogeography of reptiles in the subtropical East Asian Islands. *In: The Symposium on the Phylogeny, Biogeography and Conservation of Fauna and Flora of East Region, National Taiwan Normal University, Taipei, Taiwan.*, 11-18.
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. *In: Mammalian Protein Metabolism* (ed. Munroled HN), pp. 31-132. Academic Press, New York.

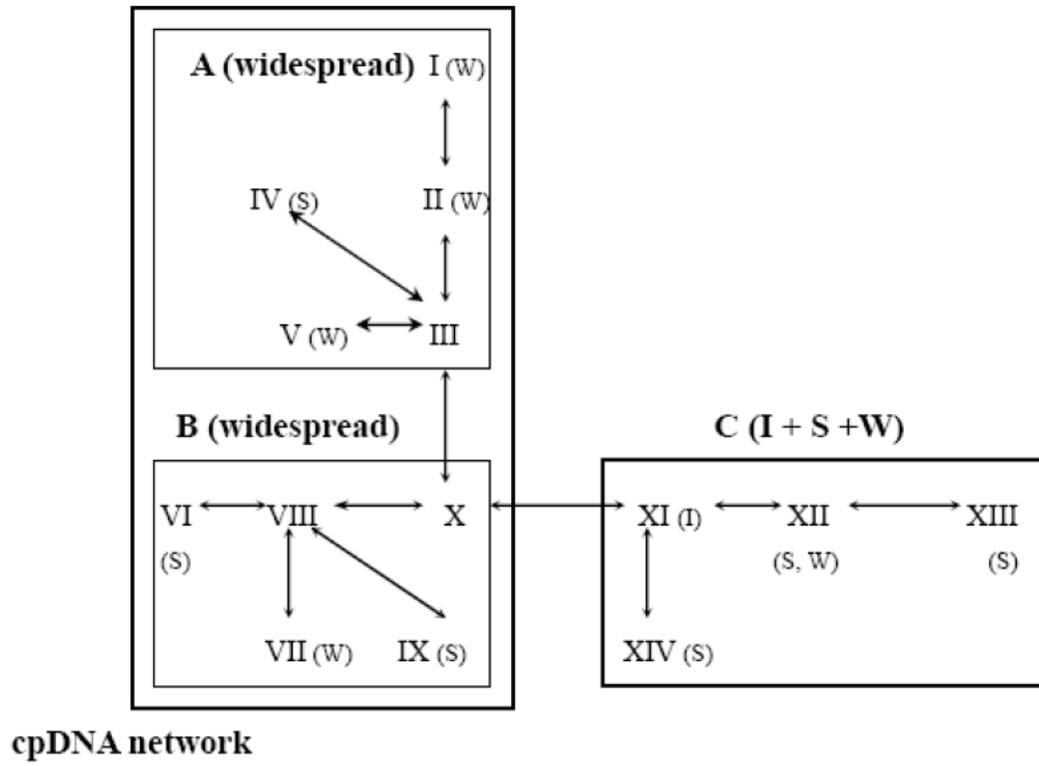
- Kimura M (1980) A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide-Sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, *et al.* (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Li HL, Keng H (1994) Pinaceae. In: *Flora of Taiwan* (ed. Editorial Committee of the Flora of Taiwan), pp. 567-580.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.
- Liu TK, Chen YG, Chen WS, Jiang SH (2000) Rates of cooling and denudation of the Early Penglai Orogeny, Taiwan, as assessed by fission-track constraints. *Tectonophysics* **320**, 69-82.
- Moritz C (1994) Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends of Ecology and Evolution* **9**, 373-375.
- Nei M, Tajima F (1983) Maximum-Likelihood Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions from Restriction Sites Data. *Genetics* **105**, 207-217.
- Nielsen R, Wakeley J (2001) Distinguishing migration from isolation: A Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics* **158**, 885-896.
- Richardson DM (1998) *Ecology and Biogeography of Pinus* Cambridge university, Cambridge, United Kingdom.
- Ronquist F (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* **46**, 193-201.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Sibuet JC, Hsu SK (1997) Geodynamics of the Taiwan arc-arc collision. *Tectonophysics* **274**, 221-251.
- Sibuet JC, Hsu SK (2004) How was Taiwan created? *Tectonophysics* **379**, 159-181.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.

圖一、葉綠體 DNA 之 Maximum Likelihood 樹狀圖，node 值為 bootstrap。

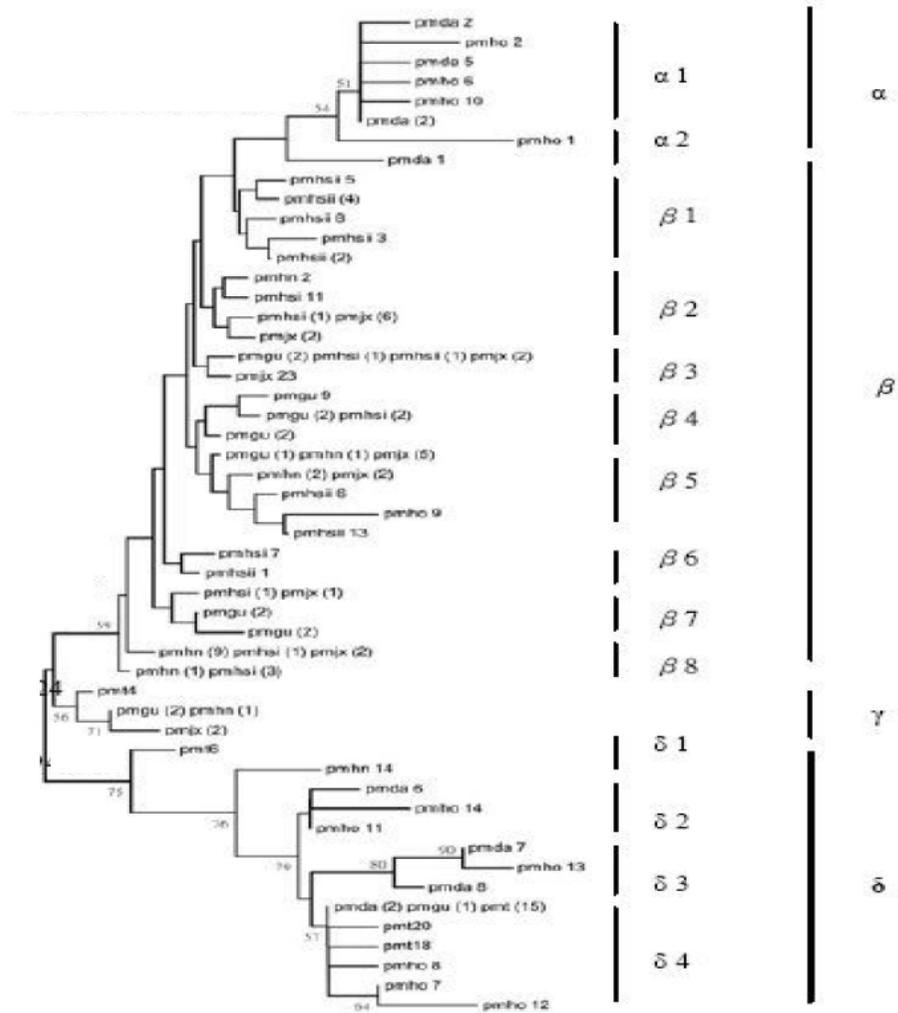


2

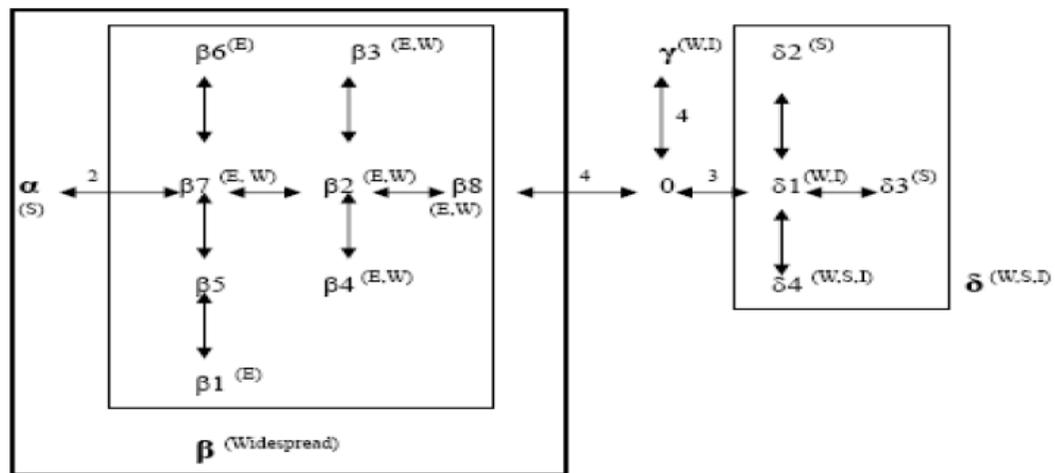
圖二、葉綠體 DNA 之網狀樹狀圖。



圖三、細胞核 DNA 之 Maximum Likelihood 樹狀圖，node 值為 bootstrap。



圖四、細胞核 DNA 之網狀樹狀圖。



表一、馬尾松之採樣點及數量。

Regions	Locations	Coordinate	Symbol	Sample size
<b>East</b>	Huangshan I, Anhui	30°07'N, 118°11'E	HS I	33
	Huangshan II, Anhui	30°07'N, 118°11'E	HS II	40
<b>West</b>	Lushan, Jiangxi	29°33'N, 115°59'E	JX	66
	Zhangjiajie, Hunan	29°20'N, 110°25'E	HN	50
	Fanjingshan, Guizhou	27°54'N, 108°39'E	GU	45
<b>South</b>	Daiyunshan, Fujian	25°39'N, 118°13'E	DA	31
	Yangshan, Guangdong	24°49'N, 112°07'E	HO	33
<b>Island</b>	Miaoli, Taiwan	24°29'N, 120°72'E	TAI	22

表二、馬尾松之葉綠體 DNA 單型。

	A					B					C				Total	No. of cytotypes (no. of private types)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV		
Interior (I) vs. Exterior (E)	E	I	I	E	E	E	E	I	E	I	I	I	E	E		
<b>East</b>																
HSI			2					22		9					33	3 (0)
HSII			8					25		7					40	3 (0)
<b>West</b>																
JX	2	9	28				3	22		2					66	6 (3)
HN			31					16				3			50	3 (0)
GU			28		2			11		4					45	4 (1)
<b>South</b>																
DA			3	2		3		16		3				4	31	6 (3)
HO			3					16	2	6		3	3		33	6 (2)
<b>Island</b>																
TAI								2			20				22	2 (1)
Total	2	9	103	2	2	3	3	130	2	31	20	6	3	4	320	14 (10)

表三、馬尾松之葉綠體 DNA 遺傳歧異度。

	Hap #	polymorphic sites	$\theta$ / bp	$\pi$ / bp	Fu & Li's D	Fu & Li's F	Tajima's D	Fu's Fs
<b>East</b>								
HS I	3	2 (1S+1P)	0.00090	0.00081	-0.33034	-0.35947	-0.28956	0.779
HS II	3	2 (0S+2P)	0.00085	0.00087	0.95275	0.83322	0.09664	0.240
<b>West</b>								
JX	6	6 (4S+2P)	0.00216	0.00155	-1.63654	-1.64220	-0.87383	-1.974
HN	3	13 (12S+1P)	0.00514	0.00262	-2.76648**	-2.90467**	-1.88781*	2.035
GU	4	3 (2S+1P)	0.001210	0.00097	-1.08108	-1.08324	-0.57961	-1.500
<b>South</b>								
DA	6	15 (13S+2P)	0.00696	0.00435	-1.83464	-2.03715	-1.72970	-1.974
HO	6	15 (3S+12P)	0.00672	0.00611	0.70711	0.48060	-0.40404	0.133
<b>Isalnd</b>								
TAI	2	13 (0S+13P)	0.00488	0.00339	1.48091*	0.84973	-1.12149	3.392
<b>Overall</b>	14	24 (9S+15P)	0.00596	0.00622	-1.77173	-1.24552	0.12439	-0.490

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.02$

表四、馬尾松之細胞核 DNA 單型。

Region	Population	$\alpha$	$\beta$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$	$\gamma$	$\delta$	$\delta 1$	$\delta 2$	$\delta 3$	$\delta 4$	no. of nucleotypes (no. of private types)	
External vs. Internal nodes		E	I	E	I	E	E	I	E	I	I	E	E	I	E	E	E		
<b>East</b>																			
	HS I		33		5	2	6		3	4	13							6 (0)	
	HS II		40	29		2		4	2	3								5 (1)	
<b>West</b>																			
	JX		59		24	5	3	22			5	7						6 (0)	
	HN		45		4			15			26	3	2	2				5 (0)	
	GU		36			5	13	2		16		7	2				2	6 (0)	
<b>South</b>																			
	DA		16										15		3	7	5	4 (0)	
	HO		12	2				2					19		7	3	9	5 (0)	
<b>Island</b>																			
	TAI											3	19	1			18	3 (0)	
Total			28	215	29	33	14	22	45	5	23	44	20	57	3	10	10	34	320

表五、馬尾松之細胞核 DNA 遺傳歧異度。

	Hap #	polymorphic	$\theta$ / bp	$\pi$ / bp	Fu & Li's D	Fu & Li's F	Tajima's D	Fu's Fs
<b>East</b>								
HS I	8	5 (0S+5P)	0.00266	0.00346	1.27814	1.40390	1.14714	-4.074**
HS II	9	6 (1S+5P)	0.00302	0.00312	0.67857	0.60882	0.12704	-5.269**
<b>West</b>								
JX	9	7 (3S+4P)	0.00317	0.00338	-0.51291	-0.35815	0.21384	-3.364*
HN	7	11 (5S+6P)	0.00517	0.00377	-0.59590	-0.82140	-1.02384	-1.149
GU	9	12 (4S+8P)	0.00564	0.00579	-0.05394	-0.01401	0.09712	-1.799
<b>South</b>								
DA	8	21 (5S+16P)	0.01205	0.01499	0.66778	0.89330	1.20269	-1.126
HO	12	31 (16S+15P)	0.01558	0.01492	-0.76809	-0.70068	-0.18716	-3.695*
<b>Island</b>								
TAI	5	9 (6S+13P)	0.00396	0.00182	-1.71912	-2.03545	-1.85502*	-0.718
<b>Overall</b>	51	39 (21S+18P)	0.01142	0.00919	-4.01321**	-3.18093**	-0.66249	-34.434**

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.02$

附錄一、期中審查意見及回覆

委員意見	回覆
<i>atpB-rbcL</i> marker 可能不適合。	利用來自於雙系之細胞核 DNA intron 片段 ADHC2 intron 4 - 8 及父系之葉綠體 DNA noncoding spacer <i>atpB-rbcL</i> intergenic spacer 互相配合，用以釐清馬尾松之物種親緣及族群演化歷史。
圖一為何不比較火炎山以外的馬尾松之遺傳變異與火炎山的族群的差異與交流情形。	遵照辦理，比較分布於苗栗三義火炎山自然保留區與中國之馬尾松族群，並比較族群差異及基因交流。
圖一的 pl05-05 可能有 DNA 汙染？需重新 check。	遵照辦理。
是否先以形態、解剖、解釋、分類各近緣種的分類差異。	遵照辦理，在形態方面，台灣二葉松之毬果較大、鱗臍先端具刺，內生樹脂溝 2 條，苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松毬果較小、種鱗的鱗臍稍凹，樹脂溝內生混合外生，3-6 條。
火炎山或土質崩落的影響或許需更進一步確認。	遵照辦理。
火炎山馬尾松有滅絕之虞，應立即全面採集種子保存。	遵照辦理。
研究方法在 PCR 之後應立即定序，而本研究方法是 PCR 產物再去 cloning，如此當特別注意 Taq 所發生之錯誤，增加序列之變異。	遵照辦理。
根據表一結果，nucleotide diversity 均大於 0.004，甚至高達 0.0135，此與稀有物種之低變異有很大不同，其中一個可能是因為第 2 點方法上的因素，請再檢討。	遵照辦理，馬尾松族群因保有古老祖先基因型顯現族群之高度多樣性。

<p>Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, GE XJ, Hsu TW, Chiang TY. (2006) Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the <i>Pinus luchuensis</i> complex. <i>Molecular Ecology</i> 15: 765-779. 執行人請參考上述文獻之結果。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>恐有滅絕危機，如何能使其自處更新？ 周邊樹種有無研究交互關係的必要？</p>	<p>持續進行苗栗三義火災山自然保留區的馬尾松族群數量、環境監測及遺傳多樣性估算，以瞭解馬尾松族群之族群動態。</p>
<p>就管理機關實務上確實需要知道此樹種在分類上的地位。</p>	<p>遵照辦理，在形態方面，台灣二葉松之毬果較大、鱗臍先端具刺，內生樹脂溝2條，苗栗三義火災山自然保留區之馬尾松毬果較小、種鱗的鱗臍稍凹，樹脂溝內生混合外生，3-6條。</p>
<p>由於本處大湖站於區內進行天然更新監測工作，對於現場何處有馬尾松可提供適當協助，建議於進入調查研究時會同工作站共同進入。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>對於馬尾松無法更新的問題，希望可以找出無法更新的問題點，並提供合適的復育方法。</p>	<p>遵照辦理，針對於復育方面，建議在區外進行不同單型之馬尾松個體種植，並持續收集種子以完善保有物種之種原及遺傳歧異度。。</p>
<p>以上列入紀錄加強之。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>請委辦單位參酌各委員意見修正並執行後續計畫，本期中簡報審查通過。</p>	<p>遵照辦理。</p>

附錄二、期末審查意見及回覆

委員意見	回覆
數據的收集與分析非常仔細，但相關的軟體需更新。	遵照辦理。
文獻的引用與討論需稍注意。	遵照辦理。
台灣馬尾松族群的形態須與大陸的族群特徵做深入比較。	遵照辦理，未來將持續收集大陸的馬尾松族群標本以利與台灣之馬尾松族群進行形態上比較。
前言第二段第五行[約在距今 200-300 萬年前]應該是[500-600 萬年前]，請改正。	遵照辦理。
建議將保留區內 100 多棵馬尾松進行編碼並做後續追蹤，此外並收集馬尾松的種子與 DNA 的萃取保存。	遵照辦理，針對於野生族群方面，建議未來持續進行苗栗三義火炎山自然保留區的馬尾松族群數量、環境監測及遺傳多樣性估算，以瞭解馬尾松族群之族群動態。針對於復育方面，建議在區外進行不同單型之馬尾松個體種植，並持續收集種子以完善保有物種之種原及遺傳歧異度。
復育保存應先做生態與生理的研究調查，以利復育工作的進行。	遵照辦理，未來將持續進行馬尾松之生態及生理相關研究。
討論第三段[台灣在冰河時期可能為馬尾松之冰河避難所]，但從表 3 和表 5 的資料看來，應該中國南方才是避難所。	遵照辦理。
馬尾松族群數量的減少其主要消失原因為何?大量死亡?沒有更新?松材線蟲的危害?並請另做區外保育，選 1-2 塊林地進行。	遵照辦理，推測為松材線蟲危害造成族群數量銳減。
既然要保育就必須要有特色，現今在複雜的分類系統及各學者分類觀點不同的情況下，是否可鑑定清楚此物種明顯不同的特徵?以及是否可獨立區別為一特有變種或亞種?本研究報告中未把所有族群區別清楚。	遵照辦理，比較其毬果及樹脂溝顯示，台灣二葉松之毬果較大、鱗臍先端具刺，內生樹脂溝 2 條，苗栗三義火炎山自然保留區之馬尾松毬果較小、種鱗的鱗臍稍凹，樹脂溝內生混合外生，3-6 條，而這些形態差異可將兩分類群區分，因此本研究沿用 Li & Keng (1994) 分類處理進行馬尾松族群之分析。

<p>[苗栗三義火災山自然保留區]馬尾松林期更新方法並非為火災演替,而是由生育地的崩塌來進行演替,建議修改其演替方式。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>既要做馬尾松的保育,可要求於後續的研究計畫中做 DNA 得保存,並請工作站監測實生苗開花結果的狀況以利將來復育工作的進行。</p>	<p>遵照辦理,對於野生族群方面,建議未來持續進行苗栗三義火災山自然保留區的馬尾松族群數量、環境監測及遺傳多樣性估算,以瞭解馬尾松族群之族群動態。針對於復育方面,建議在區外進行不同單型之馬尾松個體種植,並持續收集種子以完善保有物種之種原及遺傳歧異度。</p>
<p>[苗栗三義火災山自然保留區]馬尾松林其更新方法為生育地的崩塌,形成開闊的生育環境,毬果掉落於石礫中,加上太陽照射提高了石礫的溫度,使得掉落於石礫中的毬果因溫度增高而爆裂出來而其萌芽更新,因此應不至於很快滅絕,故應重新評估。</p>	<p>遵照辦理,然而野外族群數量銳減確實可能造成遺傳歧異度的降低,建議未來持續進行苗栗三義火災山自然保留區的馬尾松族群數量、環境監測及遺傳多樣性估算,以瞭解馬尾松族群之族群動態。</p>
<p>馬尾松族群量偏低加上物種鑑定問題,所以應探討復育工作該不該做。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>所附期末報告書之標題[火災山馬尾松族群之保育及復育],與研究報告撰寫內容較無直接關聯,建議應做調整。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>中文摘要第四行所提[火災山自然保留區]建議修改為正式用名[苗栗三義火災山自然保留區],英文摘要第六行將保留區翻譯為[Natural Reserved Park]並非本局自然保留區之英譯用法,請江全名統一更改為[Miaoli Sanyi Huoyanshan Nature Reserve],以資區別。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>[重要工作項目及實施方法]項下之第 2 點重要工作為[藉此提出保育經營單位],為並未於本報告中論及保育經營單位,建議做適度修正,並於討論中論述。</p>	<p>遵照辦理,請參閱結語與建議。</p>

<p>[材料與方法]項下之[三、序列分析]第四行提到[來計算玉山杜鵑複合群彼此的序列變化],其中[玉山杜鵑]顯然並非本研究之標的物種,請改正。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>本研究結果於討論中述及馬尾松台灣族群具有高度之遺傳多樣性,因該原生馬尾松林為[苗栗三義火炎山自然保留區]公告時之主要保護標的之一,本研究是否有符合貴處 96 年 10 月 1 日竹育字第 0962241733 號函說明四所提之短期計畫,足以供保留區經營管理參考,及後續是否應持續辦理族群動態調查,期限有族群數量為何?建請貴處參酌本計畫成果、簡報後各委員意見及自然保留區經營管理需求來持續辦理相關研究。</p>	<p>遵照辦理,請參閱結語與建議。</p>
<p>依現有調查資料是否可分為一亞種,並討論往後是否再繼續追蹤研究。</p>	<p>本研究依型態差異沿用 Li &amp; Keng (1994)分類處理進行馬尾松族群之分析。</p>
<p>可在南庄找 1-2 塊地約 3-5 公頃種植馬尾松,做區外復育。並進行種子採集及保存工作與 DNA 的保存,使得物種的保留更臻完善。</p>	<p>遵照辦理。</p>
<p>請委辦單位參酌各委員意見修正,本期末簡報審查通過。</p>	<p>遵照辦理。</p>