

行政院農業委員會林務局新竹林區管理處

臺灣榲欓族群遺傳多樣性分析計畫

結案成果報告



執行機關：國立自然科學博物館

日期：中華民國 111 年 12 月

摘要

槲櫟(*Quercus aliena*)分布於日本、韓國、中國及臺灣，目前臺灣僅有新竹及苗栗兩族群。為了瞭解槲櫟於臺灣以及與其他國家的遺傳分化狀況，此研究藉由基因組略讀的方法，建構臺灣兩個族群各 8 個個體的完整葉綠體基因組序列，並與中國及日本槲櫟葉綠體基因組進行比對。結果顯示臺灣新竹及苗栗的槲櫟葉綠體基因組序列長度分別為 161,263 bp 及 161,267 bp，在族群內並無變異。

與中國及日本的差異上，以葉綠體 79 個蛋白質編碼區序列的資訊進行比對，臺灣的槲櫟在 *rps16* 及 *rpoC2* 蛋白質編碼區有獨特的非同義突變；而其單核苷酸多型性總計有 73 個位點，臺灣族群與中國及日本間有 8 個以上的單核苷酸多型性差異；加上在內含子及基因間多樣的變異，都支持臺灣的槲櫟為自然分布族群，非近代人為由中國或日本引進栽種。

以臺灣兩族群進行比對，在 *atpF* 內插子及 *ndhJ-ndhK* 間有序列缺失的變異，造成兩基因組序列長度差異；並在 *petA* 蛋白質編碼區有非同義突變及在 *rpoB-petN* 間有單核苷酸多型性。蛋白質編碼區的非同義突變會涉及到基因功能的改變，為相對少有的突變形式，由兩個族群在葉綠體基因組的多個變異，推論為經歷一段時間分化所累積的結果。

此研究結果支持新竹及苗栗槲櫟族群為臺灣原生，且此兩族群與東亞其他地區之槲櫟族群相較已有遺傳特異性，故需要積極保育，並提供相關保育工作策略與建議。

目錄

摘要.....	1
圖目錄.....	4
表目錄.....	5
第一章 前言.....	6
1.1 背景說明.....	6
1.2 計畫目標.....	8
1.3 重要工作項目及執行方法.....	8
1.4 計畫時程.....	12
1.5 執行程序.....	13
1.6 研究人員.....	13
第二章 遺傳變異比較分析.....	14
2.1 DNA 萃取和基因組略讀基因庫(library)製備.....	14
2.2 葉綠體基因組序列組裝.....	19
2.3 核醣體 DNA 序列組裝.....	21
2.4 葉綠體基因組蛋白質編碼區變異.....	21
2.5 葉綠體基因組內插子變異.....	24
2.6 葉綠體基因組基因間變異.....	24
2.7 不同櫟屬物種間葉綠體基因組的序列比對.....	27
2.8 超級條碼與 PCR 引子設計.....	28
2.9 櫟屬與銳齒櫟屬譜系樹.....	28
2.10 結論.....	29

第三章 族群遺傳資訊分析.....	31
3.1 與中國榲欖 5 個葉綠體 DNA 片段單倍型(haplotype)比較	31
3.2 與日本榲欖 89 個個體 4 個葉綠體 DNA 片段單倍型(haplotype)比較	34
3.3 日本與臺灣榲欖單倍型網狀圖與族群遺傳分析.....	37
3.4 結論.....	40
第四章 討論.....	41
第五章 榲欖保育工作策略與建議.....	42
第六章 參考文獻.....	44
附錄一、期初計畫審查會議紀錄.....	46
附錄二、期中計畫審查會議紀錄.....	51
附錄三、期末計畫審查會議紀錄.....	56
附錄四、111 年森林資源永續發展研討會發表.....	65

圖目錄

圖一 櫟屬葉綠體基因組.....	10
圖二 臺灣新竹與苗栗榲欖驗證臘葉標本.....	15
圖三 第一批樣本的 DNA 電泳膠圖.....	18
圖四 第二批樣本的 DNA 電泳膠圖.....	18
圖五 第三批(左圖)和第四批(右圖)樣本的 DNA 電泳膠圖.....	18
圖六 榲欖葉綠體基因組蛋白質編碼區單核苷酸多型性.....	21
圖七 榲欖葉綠體 <i>rps16</i> 編碼區序列之非同義突變.....	22
圖八 榲欖葉綠體 <i>rpoC2</i> 編碼區序列之非同義突變.....	23
圖九 榲欖葉綠體 <i>petA</i> 編碼區序列之非同義突變.....	23
圖十 榲欖葉綠體 <i>atpF</i> 內插子序列變異.....	24
圖十一 榲欖葉綠體 <i>rbcL-accD</i> 間 35 bp 反轉序列.....	24
圖十二 榲欖葉綠體 <i>psaC-ndhE</i> 間 ATAAAT 重覆變異.....	25
圖十三 榲欖葉綠體 <i>matK-rps16</i> 間 ATAAGTAAAA 重覆變異.....	25
圖十四 榲欖葉綠體 <i>rpoB-petN</i> 間單核苷酸多型性.....	26
圖十五 榲欖葉綠體 <i>ndhJ-ndhK</i> 間核苷酸 A 序列長度的變異.....	26
圖十六 櫟屬葉綠體 <i>rbcL-accD</i> 間 35 bp 反轉序列.....	27
圖十七 櫟屬葉綠體 <i>psbZ-rps14</i> 間單核苷酸多型性.....	27
圖十八 榲欖與銳齒榲欖根據葉綠體基因組 79 個蛋白質編碼區所建構的無根源譜系樹.....	29
圖十九 日本及臺灣榲欖單倍型網狀圖.....	39

表目錄

表一 櫟屬物種遺傳分析樣本.....	9
表二 櫟屬物種葉綠體基因組裝參考序列.....	10
表三 日本櫟屬葉綠體 DNA 片段的資訊.....	11
表四 中國櫟屬葉綠體 DNA 片段的資訊.....	12
表五 櫟屬物種樣本的實驗批次.....	16
表六 各批次櫟屬物種的 DNA 濃度與體積.....	17
表七 葉綠體基因組序列組裝資訊量.....	20
表八 葉綠體基因組編碼區序列單核苷酸多型性變異比較.....	22
表九 臺灣櫟屬葉綠體基因間特有的單核苷酸多型性位點.....	26
表十 三組條碼 PCR 引子序列.....	28
表十一 <i>accD-psaI</i> 單倍型.....	31
表十二 <i>rps12-rpl20</i> 單倍型.....	32
表十三 <i>rps16 intron</i> 單倍型.....	32
表十四 <i>trnH-psbA</i> 單倍型.....	33
表十五 <i>trnQ-trnS</i> 單倍型.....	33
表十六 <i>trnT (UGU)-trnL (UAA) 5' exon spacer</i> 單倍型.....	34
表十七 <i>rps16 intron</i> 單倍型.....	35
表十八 <i>rpl32-trnL</i> 單倍型.....	36
表十九 3' to <i>rps2</i> 單倍型.....	37
表二十 結合櫟屬 4 個葉綠體 DNA 片段的單倍型.....	38
表二十一 日本及臺灣櫟屬族群遺傳多樣性.....	38
表二十二 日本及臺灣櫟屬族群間遺傳多樣性.....	38

第一章 前言

1.1 背景說明

櫟屬(*Quercus*)主要分布在北半球的溫帶和(亞)熱帶地區，共約有400種。櫟屬物種豐富、分布廣泛、具悠久的物種演化歷史，特別是在遺傳上具有廣泛雜交(hybridization)和基因漸滲(introgression)的特性，長期以來一直演化研究感興趣分類群。整合形態與分子譜系資訊，Deng *et al.* 2017的分類系統將全世界櫟屬分為8個節：*Q. sect. Protobalanus*，*Q. sect. Ponticae*，*Q. sect. Virentes*，*Q. sect. Quercus*，*Q. sect. Lobatae*，*Q. sect. Cyclobalanopsis*，*Q. sect. Ilex*，*Q. sect. Cerris*。其中，*Q. sect. Cyclobalanopsis*，*Cerris*和*Ilex*構成舊世界演化起源的分支，其餘部分形成新世界演化起源的分支。櫟屬的4個節(*Q. sect. Cyclobalanopsis*，*Cerris*，*Ilex*和*Quercus*)的物種分布於臺灣與中國，但相關的演化研究與北美和歐洲的研究相比要少。過去對東亞的櫟屬植物研究主要集中在形態和花粉研究，以及少數物種的種化歷程；形態及分子譜系學的研究持續有所進展，但基於葉綠體和低拷貝核分子標記(low-copy nuclear markers)的譜系估算的相互矛盾，且在譜系樹基部分支缺乏高分辨率，為建構明確的櫟屬譜系的問題與挑戰(Oh and Manos 2008, Simeone *et al.* 2013)。

近年來族群遺傳研究，主要是同時採用用雙親遺傳的(bi-parentally inherited)核微衛星(nuclear microsatellites)與母系遺傳的(maternally inherited)的葉綠體DNA片段來分析，例如運用30個核微衛星與4個葉綠體DNA片段：(1) *trnT* (UGU)-*trnL* (UAA) 5' exon spacer, (2) *rps16* intron, (3) *rpl32-trnL*及(4) 3' to *rps2*，分析日本兩種近緣的原生橡樹：槲櫟(*Q. aliena*)和枹櫟(*Q. serrata*)的遺傳變異的地理模式，共分析槲櫟12個族群和枹櫟44個族群，藉以評估每個物種的遺傳種質資源，提供移植策略的遺傳資訊(San Jose-Maldia *et al.* 2017)。槲櫟的核基因組及其葉綠體單倍型(haplotype)分布的變異，都清楚呈現區分東北和西南族群的地理模式。然而，枹櫟則呈現不一致的結果，其葉綠體單倍型的地理分布，傾向於顯示東北-西南族群的遺傳分化，但其核微衛星遺傳結構並無明確的地理模式。此研究結果將日本東北和西南地區槲櫟及枹櫟，歸類為不同的遺傳種質族群可移植區(genetically distinct transferrable zones) (San Jose-Maldia *et al.* 2017)。

另外，分析中國三種同域分布的原生橡樹：槲櫟(*Q. aliena*)、槲樹(*Q. dentata*)和栓皮櫟(*Q. variabilis*)的物種界線(species boundary)，運用17個核微衛星與5個葉綠體DNA片段：(1) *accD-psaI*, (2) *trnH-psbA*, (3) *rps12-rpl20*, (4) *rps16*和(5) *trnQ-trnS*，共分析包括槲櫟6個族群，槲樹3個族群及栓皮櫟5個族群。槲櫟與槲樹具有共享的葉綠體單倍型，與栓皮櫟有所區別，可能為非常近期的種化和不完全支系演化(incomplete lineage sorting)或基因漸滲(introgression)的結果。核微衛星的分子標記呈現此三種橡樹物種的位點內變異完全固定，並且只在物種內發生

廣泛的基因流動(gene flow)，而在榲欖與榲樹之間僅檢測到有限的基因流動，然而在榲欖與栓皮櫟，及榲樹與栓皮櫟之間幾乎沒有檢測到基因流動，推測可能是合子前隔離(Prezygotic isolation)促成此三種同域橡樹物種的物種界線(Lyu *et al.* 2018)。

近年來基因體學的發展，以更廣泛的分子標記來進行再深入的探討，例如運用基因組方法 RAD-seq，取樣中國 35 種 *Q. sect. Cyclobalanopsis* 和 7 種其他 3 個節的物種，探討東亞地區的 *Q. sect. Cyclobalanopsis* 的遺傳資訊(Deng *et al.* 2018)；運用 RAD-seq 探討的全球殼斗科譜系的研究，共分析 60 種殼斗科樹種(Hipp *et al.* 2019)。但這些研究取樣的 *Q. sect. Quercus* 種類都很少，無法提供對此節物種深入研究的重要資訊。另外，基因組略讀(genome skimming)技術的發展，亦可以由植物標本館大量乾燥保存的臘葉標本，獲得大量的遺傳資訊，即使這些標本內的 DNA 已隨著時間降解成小片段長度，仍可組裝出多數重複的核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA)序列，及葉綠體基因組(chloroplast genome)，例如大規模的取樣涵蓋 21 科 142 屬 530 個物種的 672 個臘葉標本進行基因組略讀，並比較標本年代，DNA 濃度和質量，讀序覆蓋度和片段長度...等資訊，對葉綠體基因組組裝錯誤率的影響；一些具有低 GC 和高重複序列的分類群會有組裝問題，例如草海桐科金鸞花屬(*Goodenia*)及草海桐屬(*Scaevola*)，莎草科莎草屬(*Cyperus*)及球柱草屬(*Bulbostylis*)及飄拂草屬(*Fimbristylis*) (Nevill *et al.* 2020)。整體結果顯示可從 96.1%的樣本中獲得葉綠體基因組的大部份序列資訊，並分別從 96%及 93.3%的樣本中獲得兩個核心 DNA 條碼 *rbcL* 及 *matK* 的序列；從 93.3%的樣本中獲得了完整或接近完整的核糖體基因重複序列，證明此方法具有高成功率及獲得大量 DNA 資訊的效益(Nevill *et al.* 2020)。

藉由葉綠體基因組及 rDNA 所具有的長序列資訊的比對，能夠發掘出有效地正確識別物種和變種的多重變異，可建構超級條碼(super-barcodes)，做為應用於鑑別近緣種的分子標記，例如紅檜(*Chamaecyparis formosensis*)及臺灣扁柏(*C. obtusa* var. *formosana*)，日本扁柏(*C. obtusa* var. *obtuse*)，葉綠體基因 *trnT*-GGU 的缺失可將紅檜與其他兩種扁柏區分。三個具高度變異的片段：3' ETS，ITS1 和 *trnH-psbA*，有潛力開發為應用於鑑別柏樹物種和變種的條碼；加上有物種專一性 > 100 bp 的插入缺失。這些插入缺失與前述的三個短條碼一起構成了一個資訊豐富的條碼系統，特別是應用於鑑別組織碎片或含有降解 DNA 的樣本(Wu *et al.* 2020)。比對 24 種櫟屬植物葉綠體基因組，發現在幾個基因區間序列或是基因內具有高度變異的熱點，包括：(1) *matK-rps16*, (2) *trnR-atpA*, (3) *ndhF* 及(4) *ycf1* (Pang *et al.* 2019)；另外，比較分析 51 種櫟屬植物葉綠體基因組，則發現在(1) *trnH* (GUG)-*psaA*, (2) *trnK* (UUU)-*trnQ* (UUG), (3) *trnT* (GGU)-*psbD*, (4) *rbcL-psaI* 和(5) *ycf1*，具有高度變異(Yang *et al.* 2018)；這些序列變異除了做為

釐清譜系關係的遺傳資訊，並且可做為開發櫟屬物種間及物種內的鑑別的 DNA 條碼重要資訊。

櫟屬分布於日本、韓國、中國及臺灣，目前臺灣僅存的兩族群分布於新竹及苗栗。此計畫同時採用植物標本館臘葉標本取樣(中國與日本樣本)，棲地採集取樣(臺灣新竹與苗栗族群)，及可能雜交的櫟屬物種取樣，包括在新竹與櫟屬同域共生的栓皮櫟及其它櫟屬近緣物種。藉由植物標本館臘葉標本取樣，可補足不同地理區域，不同時間採集的樣本資訊，有助於比較分析，並可由所建構的葉綠體基因組約 160 kbp 的長序列中，發掘新的單倍型變異。運用基因組略讀的方法，以櫟屬及其它櫟屬物種已發表的葉綠體基因組為參考序列(Lu *et al.* 2016, Pang *et al.* 2019, Yang *et al.* 2021)，比對不同個體間葉綠體基因組龐大的 DNA 序列變異，做為後續櫟屬保育的遺傳參考資訊。

1.2 計畫目標

- (1) 如果臺灣的櫟屬是人為引進栽種，是否能由中國及日本族群單倍型，推測其來源？
- (2) 如果臺灣的櫟屬為自然分布族群，此兩族群的單倍型變異為何？及與中國及日本族群遺傳分化的程度為何？
- (3) 以葉綠體基因組建構譜系資訊，探討臺灣、中國及日本櫟屬的演化歷史。
- (4) 雜交及基因漸滲是否影響臺灣的櫟屬的遺傳組成？
- (5) 建立不同族群的超級條碼(super-barcodes)，做為後續鑑定與保育的工具。

1.3 重要工作項目及執行方法

(1) 取樣物種清單

臺灣的兩族群各取 8 個個體，以利後續族群遺傳比較分析。中國及日本各取 3 個個體，以涵蓋不同地理分布取樣，利於比較釐清臺灣的櫟屬來源，及與此兩地區櫟屬的遺傳距離。與櫟屬同域共存的栓皮櫟取 1 個個體，其它櫟屬物種各取 1-2 個個體代表，以探討不同物種間雜交及基因漸滲的問題。整體取樣物種及數量如表一。

表一 櫟屬物種遺傳分析樣本

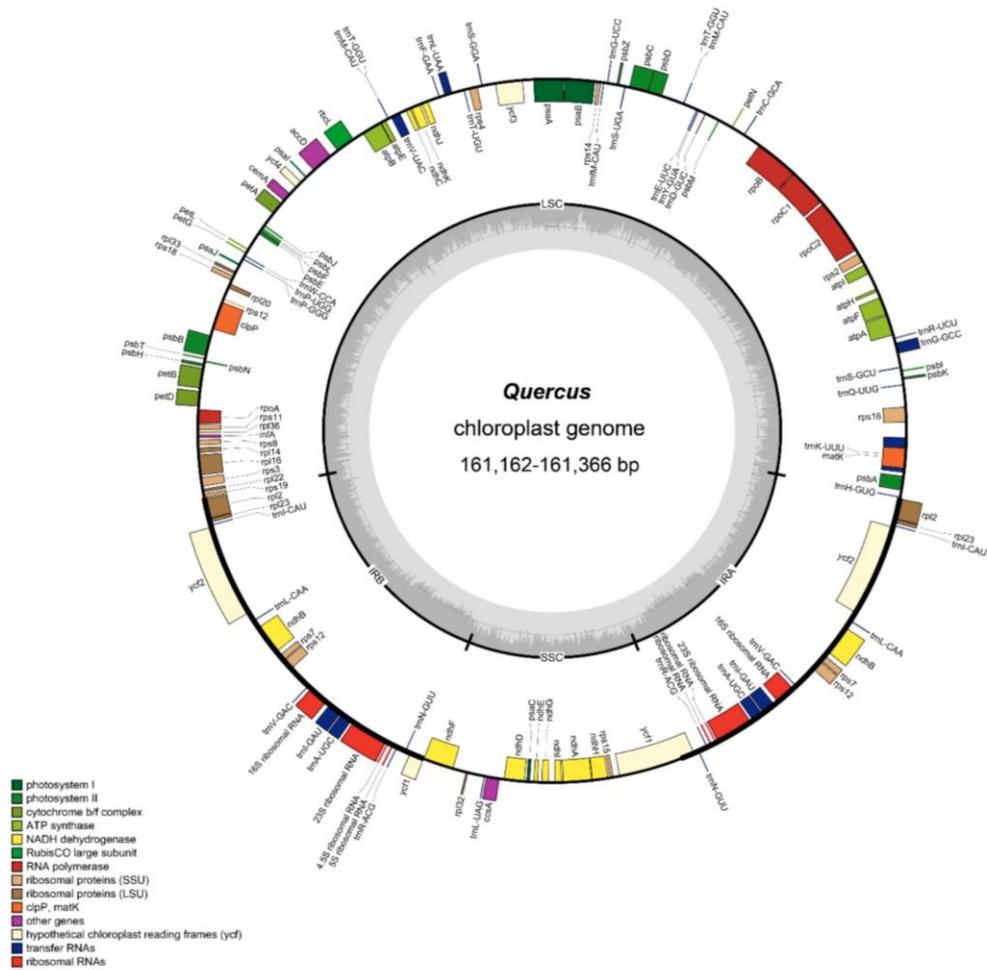
物種	個體數	地理區域
<i>Q. aliena</i> (榲欖)	8	臺灣(新竹)
<i>Q. aliena</i> (榲欖)	8	臺灣(苗栗)
<i>Q. aliena</i> (榲欖)	3	中國
<i>Q. aliena</i> (榲欖)	3	日本
<i>Q. aliena</i> var. <i>acutiserrata</i> (銳齒榲欖)	1	中國
<i>Q. serrata</i> var. <i>brevipetiolata</i> (短柄枹欖)	1	臺灣
<i>Q. dentata</i> (榲樹)	2	臺灣
<i>Q. spinosa</i> (高山櫟)	1	臺灣
<i>Q. tarokoensis</i> (太魯閣櫟)	1	臺灣
<i>Q. tatakaensis</i> (塔塔加櫟)	1	臺灣
<i>Q. variabilis</i> (栓皮櫟)	1	臺灣
總數	30	

(2) DNA 萃取和基因組略讀基因庫(library)製備

從採集並經矽膠(silica gel)乾燥的樣本及植物標本館標本取樣，採用自動DNA/RNA萃取系統LABTURBO 48C (TAIGEN Co, Taipei, Taiwan)和Labturbo DNA Mini Kit 480進行，或以DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)進行DNA萃取。使用 QuantiFluor dsDNA System (Promega) kit和NuGen Celero DNA-Seq library kit (Tecan Genomics, San Carlos, CA, USA)定量總基因組DNA，用於後續基因組略讀基因庫製備，採2×150 bp的配置於Illumina NovaSeq 6000平台上進行定序。

(3) 葉綠體基因組及核糖體 DNA 序列組裝

原始讀序(reads)導入 Geneious Prime (Biomatters, Auckland, New Zealand) (Kearse *et al.* 2012)，配對讀序設定預期插入大小為 300 bp，使用 BBMap 計算及 BBDuk 去除兩端的低質量 (< Phred 20)讀數和長度小於 50 bp 的序列讀數(Bushnell 2016)。運用 Geneious Prime 以榲欖及其它櫟屬物種已發表的葉綠體基因組(Lu *et al.* 2016, Pang *et al.* 2019, Yang *et al.* 2021) (圖一)(表二)，及核糖體 DNA (MT227755, FM244054)為參考序列進行組裝(Zerbino and Birney 2008)。



圖一 櫟屬葉綠體基因組(Pang *et al.* 2019)

表二 櫟屬物種葉綠體基因組裝參考序列

物種	GenBank Accession No.
<i>Q. aliena</i> (槲櫟)	KP301144, KU240007
<i>Q. aliena</i> var. <i>acutiserrata</i> (銳齒槲櫟)	MK105452, KU240008
<i>Q. serrata</i> var. <i>brevipetiolata</i> (短柄枹櫟)	MK105458, MG678032
<i>Q. dentata</i> (槲樹)	MG678030
<i>Q. spinosa</i> (高山櫟)	MG678038
<i>Q. tarokoensis</i> (太魯閣櫟)	MF135621
<i>Q. tatakaensis</i> (塔塔加櫟)	MG678036
<i>Q. variabilis</i> (栓皮櫟)	KU240009

(4) DNA 條碼設計及建構譜系樹

運用 Mauve (Darling *et al.* 2004) 進行葉綠體基因組序列比對，篩選出臺灣槲欏獨特的變異位點，並以 Prime3 (Untergasser *et al.* 2012) 設計相關的聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 引子。

我們擷取槲欏及銳齒槲欏蛋白質編碼區 (coding sequence, CDS)，以 RAxML 8.2 (Stamatakis 2014) 進行最大似然法分析 (maximum likelihood) 建構譜系樹，條件設定為 GTR-GAMMA 模式，並進行 1,000 次重複 (bootstrap)。

(5) 遺傳多樣性資訊分析

將臺灣的新竹及苗栗兩個族群的遺傳資訊，分別整合日本的槲欏 89 個個體 12 個族群，4 個葉綠體 DNA 片段的資訊 (表三) (San Jose-Maldia *et al.* 2017)，及中國的槲欏 207 個個體 6 個族群，5 個葉綠體 DNA 片段的資訊進行分析 (表四) (Lyu *et al.* 2018)。運用 DnaSP 5.10 (Librado and Rozas 2009) 分析族群內的單倍型數量 (number of haplotypes)，單倍型多樣性 (haplotype diversities)，及核苷酸多樣性 (nucleotide diversity)；與族群間之核苷酸歧異度 (average number of nucleotide substitutions per site, Dxy)，及族群間之遺傳分化指數 (fixation index, Fst)。運用 PEGAS 1.1 (Paradis 2010) 計算最小跨度 (minimum spanning networks) 網絡，建構單倍型網狀圖 (haplotype network)。

藉由註解核糖體 DNA 18S-ITS1-5.8S-ITS1-26S，比對不同槲屬物種間的遺傳變異，探討來自父系及母系遺傳的資訊。

表三 日本槲欏葉綠體 DNA 片段的資訊

DNA 片段	GenBank Accession No.
<i>trnT</i> (UGU)- <i>trnL</i> (UAA) 5' exon spacer	AB768625-AB768845
<i>rps16</i> intron	AB767747-AB767967
<i>rpL32-trnL</i>	AB767308-AB767528
3' to <i>rps2</i>	AB768186-AB768406

表四 中國榲欖葉綠體 DNA 片段的資訊

DNA 片段	GenBank Accession No.
<i>accD-psaI</i>	KY751544
<i>trnH-psbA</i>	KY751555
<i>rps12- rpl20</i>	KY751547
<i>rps16 intron</i>	KY751552
<i>trnQ-trnS</i>	KY751558

1.4 計畫時程

計畫各時程分配如下，新竹林管處得以書面或會議形式辦理各管控點之審查作業，另雙方得視實際需求調整審查方式，並適時召開工作會議。

- (1) 111 年 7 月 7 日前提出本案計畫書，包含計畫執行內容架構，取樣植物物種清單及來源，並訂定細部實驗規劃，及各階段期程之說明。
- (2) 111 年 9 月 15 日前繳交期中報告，內容包含資料分析成果及評估初稿擬定。
- (3) 111 年 11 月 30 日前繳交期末報告，應就實驗結果修正期中報告之評估初稿，並撰寫保育策略與建議。
- (4) 期末審查會議後 14 日曆天內，依審查意見修正繳交結案成果報告。

1.5 執行程序

重要工作項目	工作比重% 及 查核項目	預 定 進 度			
		111 年度			
		1-5 月	6-7 月	8-9 月	10-11 月
族群遺傳材料篩選	查核項目	-	分子材料採集 與取樣	-	-
	15	-	-	-	-
遺傳多樣性探討	查核項目	-	各材料DNA抽 取與分析	族群遺傳資訊 分析	族群遺傳資訊 分析
	70	-	-	-	-
資料匯整與報告撰寫	查核項目	-	資料匯整與第 一次報告	提交期中報告	完成期末報告
	15	-	-	-	-
合 計	累計 百分比	-	20	70	100

1.6 研究人員

序號	機 關 名 稱	單 位 名 稱	研 究 人 員	職 稱
1.	國立自然科學博物館	生物學組	黃俊霖	副研究員
2.	國立嘉義大學	森林暨自然資源學系	趙偉村	助理教授

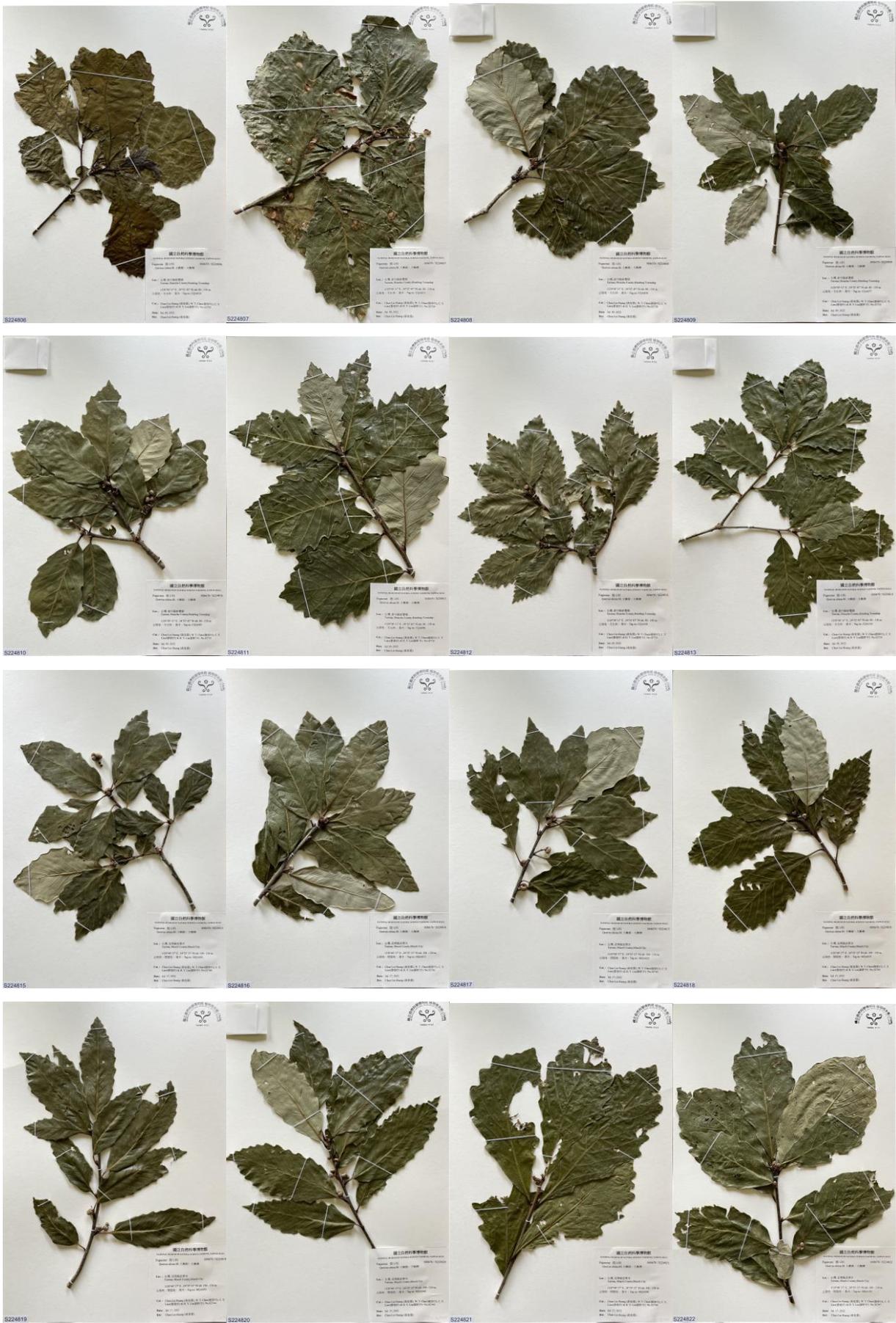
第二章 遺傳變異比較分析

藉由組裝完成的櫟屬植物葉綠體基因組，全基因組可提供大數據的 DNA 序列資訊比對，以釐清臺灣櫟屬遺傳變異的特性。葉綠體基因組中，有不同的類別的序列組成，包括(1)蛋白質編碼區(coding sequence, CDS)，(2)內插子(intron)，及(3)基因間(intergenic region)的序列。蛋白質編碼區為轉譯為胺基酸的 DNA 序列，因為序列的變異可能會影響到表現出的蛋白質所執行的功能，通常保留性較高，或需較長的分歧時間累積變異；而內插子及基因間的序列，因不涉及轉譯為胺基酸，相對地隨機性的變異出現的頻率就會較高，也是常用來做物種內的族群遺傳分析的 DNA 序列。2.1-2.3 整理以新鮮採集及植物標本館取樣，在葉綠體基因組及核糖體 DNA 序列組裝的成功率；2.4-2.6 先以櫟屬分別比對葉綠體基因組中，三個類別的序列差異；2.7-2.8 再擴展以不同的櫟屬植物加以比對，並設計臺灣櫟屬特有序列變異的 DNA 條碼組合；2.9 以葉綠體基因組建構譜系樹，呈現演化相關資訊。

2.1 DNA 萃取和基因組略讀基因庫(library)製備

樣本來源為新鮮葉片經矽膠(silica gel)乾燥或植物標本館的標本葉片，臺灣新竹與苗栗櫟屬製作為驗證臘葉標本保存(圖二)。第一(6 個)和二(24 個)批的樣本(表五，表六)，採用自動 DNA/RNA 萃取系統 LabTurbo 48C 和 LabTurbo DNA Mini Kit 480 (LabTurbo, Taiwan)進行 DNA 萃取，結果樣本含有醣類物質，造成 DNA 萃取的管柱塞管，部分樣本萃取失敗；第三和四批樣本(表五，表六)，使用 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)進行 DNA 萃取，所有的樣本皆順利地萃取出 DNA。DNA 使用 QuantiFluor dsDNA System kit (Promega, USA)進行濃度測定(表六)，DNA 濃度高於 2 ng/ μ L，取 10 ng DNA；低於 2 ng/ μ L，各取 5 μ L 於 1.2% Agarose Gel 跑膠確認(圖三-圖五)。

由新鮮葉片經矽膠乾燥的葉子，大多可萃取出長度完整及較高濃度的 DNA，但在一些樣本中因含有醣類物質，只能得到較低濃度的 DNA；由標本館取樣的葉子，得到的 DNA 濃度較低，且呈現片段化。這些樣本 DNA 運用 NuGen Celero DNA-Seq library kit (NuGen, USA)進行後續基因組略讀基因庫製備，採 2 \times 150 bp 的配置於 Illumina NovaSeq 6000 平台上進行定序。



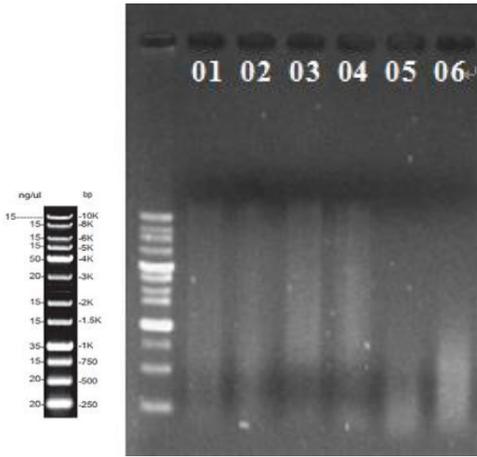
圖二 臺灣新竹與苗栗樹櫟驗證臘葉標本

表五 櫟屬物種樣本的實驗批次

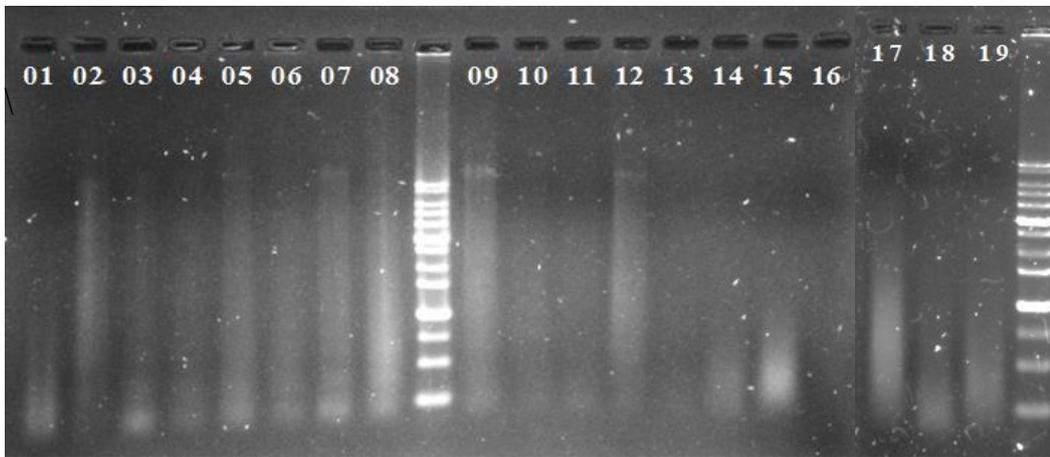
物種	個體數	地理區域	DNA 萃取與解序數量			
			1 st	2 nd	3 rd	4 th
<i>Q. aliena</i> (榭櫟)	8	臺灣(新竹)	2	6		
<i>Q. aliena</i> (榭櫟)	8	臺灣(苗栗)	2	5	1	
<i>Q. aliena</i> (榭櫟)	3	中國(湖北、湖南、江西)	1	1	1	
<i>Q. aliena</i> (榭櫟)	3	日本(北海道、伊豆半島、西國)	1		1	1
<i>Q. aliena</i> var. <i>acutiserrata</i> (銳齒榭櫟)	1	中國(貴州)		1		
<i>Q. serrata</i> var. <i>brevipetiolata</i> (短柄枹櫟)	1	臺灣(臺中)		1		
<i>Q. dentata</i> (榭樹)	2	臺灣(臺中、屏東)		1	1	
<i>Q. spinosa</i> (高山櫟)	1	臺灣(花蓮)			1	
<i>Q. tarokoensis</i> (太魯閣櫟)	1	臺灣(花蓮)		1		
<i>Q. tatakaensis</i> (塔塔加櫟)	1	臺灣(嘉義)		1		
<i>Q. variabilis</i> (栓皮櫟)	1	臺灣(新竹)			1	
總數	30		6	17	6	1

表六 各批次櫟屬物種的 DNA 濃度與體積

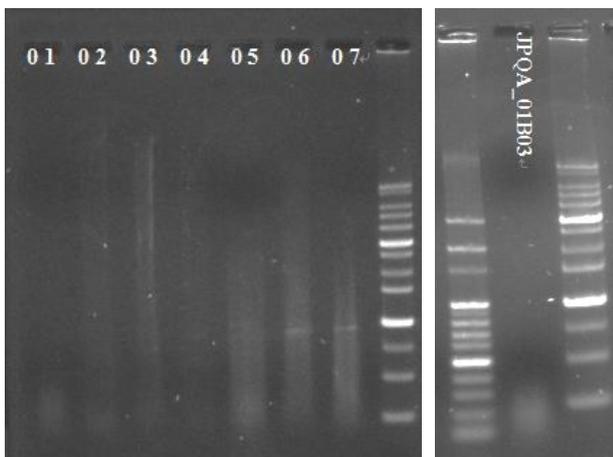
編號	物種	地理區域	DNA 濃度 (ng/μL)	DNA 體積 (μL)	樣本號
1-01	槲櫟	臺灣(新竹)	2.24	90	S224810 (TNM)
1-02	槲櫟	臺灣(新竹)	4.42	90	S224812 (TNM)
1-03	槲櫟	臺灣(苗栗)	8.0	90	S224821 (TNM)
1-04	槲櫟	臺灣(苗栗)	7.38	90	S224818 (TNM)
1-05	槲櫟	中國(湖北)	0.886	90	323976 (TAIF)
1-06	槲櫟	日本(四國)	1.81	90	503490 (TAIF)
2-01	槲櫟	中國(江西)	0.692	30	234944 (TAIF)
2-02	槲櫟	臺灣(新竹)	17.7	30	S224806 (TNM)
2-03	槲櫟	臺灣(新竹)	2.6	30	S224807 (TNM)
2-04	槲櫟	臺灣(新竹)	1.07	30	S224808 (TNM)
2-05	槲櫟	臺灣(新竹)	2.02	30	S224809 (TNM)
2-06	槲櫟	臺灣(新竹)	1.27	30	S224811 (TNM)
2-07	槲櫟	臺灣(新竹)	3.27	30	S224813 (TNM)
2-08	槲櫟	臺灣(苗栗)	2.6	30	S224815 (TNM)
2-09	槲櫟	臺灣(苗栗)	9.08	30	S224816 (TNM)
2-10	槲櫟	臺灣(苗栗)	0.978	30	S224817 (TNM)
2-11	槲櫟	臺灣(苗栗)	1.6	30	S224819 (TNM)
2-12	槲櫟	臺灣(苗栗)	7.98	30	S224820 (TNM)
2-14	塔塔加櫟	臺灣(嘉義)	1.19	30	S156432 (TNM)
2-15	太魯閣櫟	臺灣(花蓮)	9.66	30	S109047 (TNM)
2-17	短柄枹櫟	臺灣(臺中)	2.92	30	S184259 (TNM)
2-18	槲樹	臺灣(屏東)	1.37	30	S088512 (TNM)
2-19	銳齒槲櫟	中國(貴州)	11.0	30	S122287 (TNM)
3-01	槲櫟	中國(湖南)	0.436	85	354374 (TAIF)
3-02	栓皮櫟	臺灣(新竹)	1.33	85	S224814 (TNM)
3-04	槲櫟	臺灣(苗栗)	1.06	100	S224822 (TNM)
3-05	高山櫟	臺灣(花蓮)	8.6	85	S131499 (TNM)
3-06	槲樹	臺灣(臺中)	6.98	85	S126356 (TNM)
3-07	槲櫟	日本(北海道)	4.26	85	S143467 (TNM)
4-01	槲櫟	日本(伊豆半島)	0.726	90	249116 (TAIF)



圖三 第一批樣本的 DNA 電泳膠圖



圖四 第二批樣本的 DNA 電泳膠圖



圖五 第三批(左圖)和第四批(右圖)樣本的 DNA 電泳膠圖

2.2 葉綠體基因組序列組裝

以葉綠體基因組為參考序列進行組裝，由植物標本館取樣的日本-四國 DNA 濃度較低且 DNA 片段化，但仍有約 3% 超過 70 萬的讀序量，以平均覆蓋率為 670 的組裝量，得到序列長度為 161,258 bp 的完整葉綠體基因組；臺灣新竹及苗栗族群的各 8 個樣本，同一族群內葉綠體基因組序列完全相同，長度分別為 161,263 bp 及 161,267 bp；栓皮櫟有相對較短的序列長度，為 161,066 bp (表七)。由標本館取樣的日本伊豆半島的榭櫟及臺灣的短柄枹櫟，由於 DNA 過於片段化，無法組裝出完整的葉綠體基因組，未能用於後續的分析。

表七 葉綠體基因組序列組裝資訊量

樣本	總讀序量	組裝讀序量	組裝讀序比例	平均覆蓋率	序列長度(bp)
櫟					
臺灣-新竹-CQA085	21,701,927	920,304	0.042	862	161,263
臺灣-新竹-CQA104	23,273,403	1,327,615	0.057	1,246	161,263
臺灣-新竹-CQA010	38,850,157	1,520,042	0.039	1,434	161,263
臺灣-新竹-CQA015	35,123,114	1,277,236	0.036	1,208	161,263
臺灣-新竹-CQA056	35,735,272	3,037,157	0.085	2,872	161,263
臺灣-新竹-CQA077	34,791,682	2,678,748	0.077	2,529	161,263
臺灣-新竹-CQA096	29,710,550	1,473,350	0.050	1,393	161,263
臺灣-新竹-CQA136	43,881,493	1,374,100	0.031	1,294	161,263
臺灣-苗栗-MQA025	20,762,057	1,632,251	0.079	1,532	161,267
臺灣-苗栗-MQA046	24,486,185	1,396,242	0.057	1,312	161,267
臺灣-苗栗-MQA001	31,576,612	1,877,169	0.059	1,772	161,267
臺灣-苗栗-MQA011	43,880,221	3,616,122	0.082	3,403	161,267
臺灣-苗栗-MQA022	34,061,516	3,792,266	0.111	3,592	161,267
臺灣-苗栗-MQA033	42,985,973	2,866,279	0.067	2,709	161,267
臺灣-苗栗-MQA044	52,679,609	3,513,446	0.067	3,313	161,267
臺灣-苗栗-MQA101	29,286,337	959,342	0.033	903	161,267
日本-四國	23,210,245	714,502	0.031	670	161,258
日本-北海道	40,275,473	510,168	0.013	479	161,276
中國-湖北	22,790,822	1,339,211	0.059	1,269	161,223
中國-湖南	23,118,299	323,530	0.014	306	161,255
中國-江西	36,483,699	302,709	0.008	286	161,249
銳齒櫟	35,544,555	290,886	0.008	277	161,180
櫟樹(臺中)	53,777,746	181,078	0.003	170	161,186
櫟樹(屏東)	31,399,781	378,818	0.012	363	161,163
高山櫟	40,172,271	383,053	0.010	362	161,418
太魯閣櫟	32,067,362	1,419,888	0.044	1,353	161,366
塔塔加櫟	29,111,991	250,236	0.009	239	161,304
栓皮櫟	49,629,265	1,222,680	0.025	1,152	161,066

2.3 核醣體 DNA 序列組裝

以核醣體 DNA (MT227755, FM244054) 為參考序列進行組裝，但由於這些取樣的物種在核醣體 DNA，都具有多套序列組合的形式，由此實驗次世代定序採用的短 DNA 片段(150 bp)組裝方式的局限性，無法完成確認各單倍型 (haplotype) 的組合，運用於後續相關的遺傳資訊比對分析。

2.4 葉綠體基因組蛋白質編碼區變異

結合新組裝的葉綠體基因組與已發表的兩個中國槲櫟葉綠體基因組進行比較，KU240007 驗證標本採集自陝西，以中國-陝西為代號；KP301144 無驗證標本資訊，以中國-KP301144 為代號。由 79 個蛋白質編碼區 68,606 bp 序列的資訊比對，單核苷酸多型性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)總計有 73 個位點(圖六)。

各樣本序列相互比對，日本-四國與中國-陝西有最大(35)的單核苷酸多型性差異；中國及日本的樣本中，中國-湖北及湖南與臺灣-苗栗有最小(8)的單核苷酸多型性差異；新竹及苗栗之間有 1 個單核苷酸多型性差異(表八)。

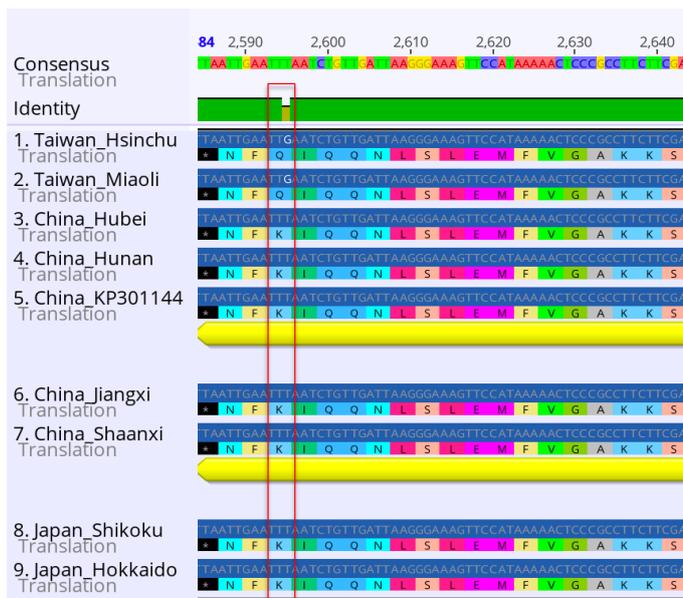


圖六 槲櫟葉綠體基因組蛋白質編碼區單核苷酸多型性

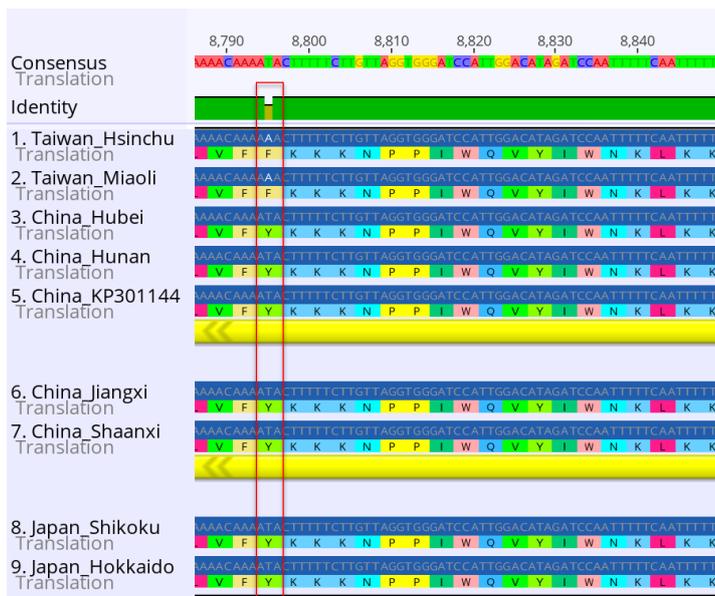
表八 葉綠體基因組編碼區序列單核苷酸多型性變異比較

	臺灣 -新竹	臺灣 -苗栗	中國 -湖北	中國 -湖南	中國- KP301144	中國 -江西	中國 -陝西	日本 -四國	日本- 北海道
臺灣-新竹		1	9	9	12	14	30	27	22
臺灣-苗栗			8	8	11	13	29	26	21
中國-湖北				2	15	9	27	24	19
中國-湖南					15	9	27	24	19
中國-KP301144						20	34	33	28
中國-江西							32	29	24
中國-陝西								35	28
日本-四國									23
日本-北海道									

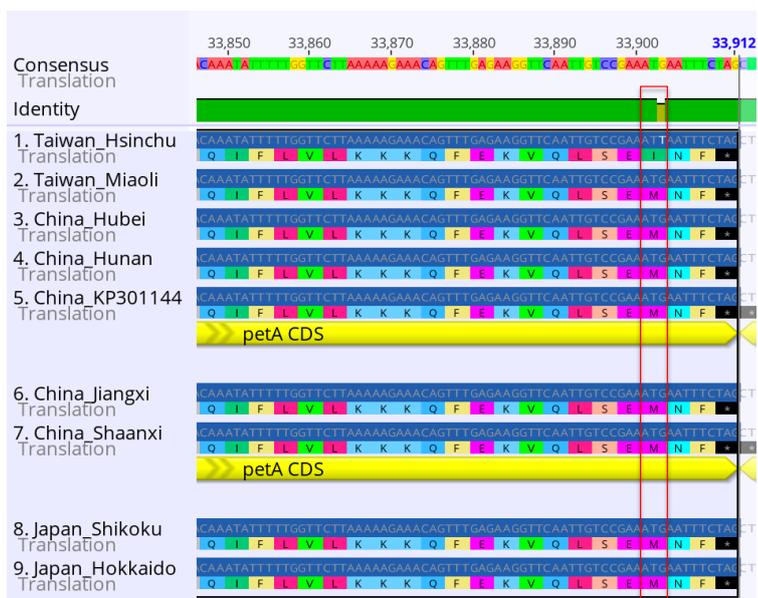
對比中國及日本的樣本，有 2 個單核苷酸多型性位點為臺灣族群特有變異，分別位於 *rps16* 及 *rpoC2*，都為非同義突變(non-synonymous mutation)，可能造成基因功能的變化。在 *rps16* 為離胺酸(Lysine，縮寫符號 K)改變為麩醯胺酸(Glutamine，縮寫符號 Q) (圖七)。在 *rpoC2* 為酪氨酸(Tyrosine，縮寫符號 Y)改變為苯丙氨酸(Phenylalanine，縮寫符號 F) (圖八)。此外，有 1 個單核苷酸多型性位點為新竹樣本特有變異，位於 *petA* 亦為非同義突變，為甲硫胺酸(methionine，縮寫符號 M)改變為異白胺酸(Isoleucine，縮寫符號 I) (圖九)。



圖七 榭櫟葉綠體 *rps16* 編碼區序列之非同義突變



圖八 榭櫟葉綠體 *rpoC2* 編碼區序列之非同義突變



圖九 榭櫟葉綠體 *petA* 編碼區序列之非同義突變

2.5 葉綠體基因組內插子變異

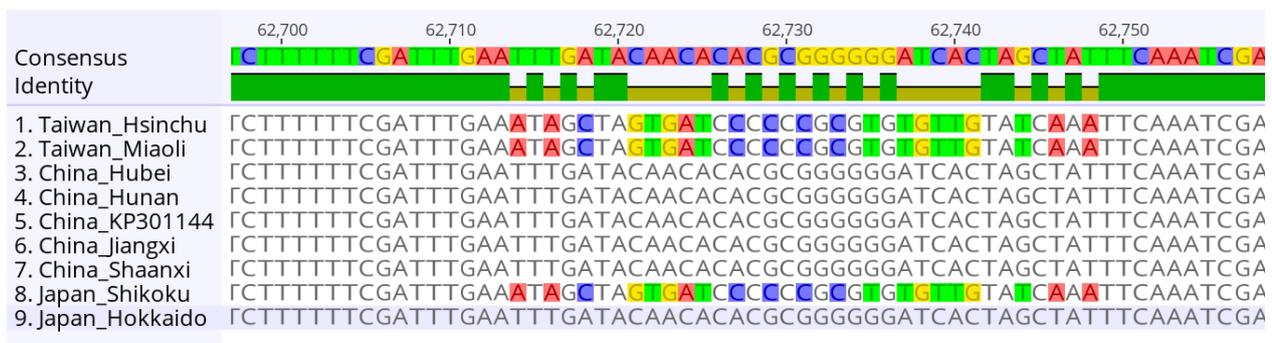
在 *atpF* 內插子內有較多的變異，可以用於區別臺灣的兩族群，但新竹與日本-四國及北海道序列相同(圖十)。



圖十 檫櫟葉綠體 *atpF* 內插子序列變異

2.6 葉綠體基因組基因間變異

在 *rbcL-accD* 間有一段 35 bp 反轉序列(TTTGATACAACACACGCGGGGGGATCAC TAGCTAT)，可將臺灣與中國區別，但日本的檫櫟兩種形式兼具(圖十一)。

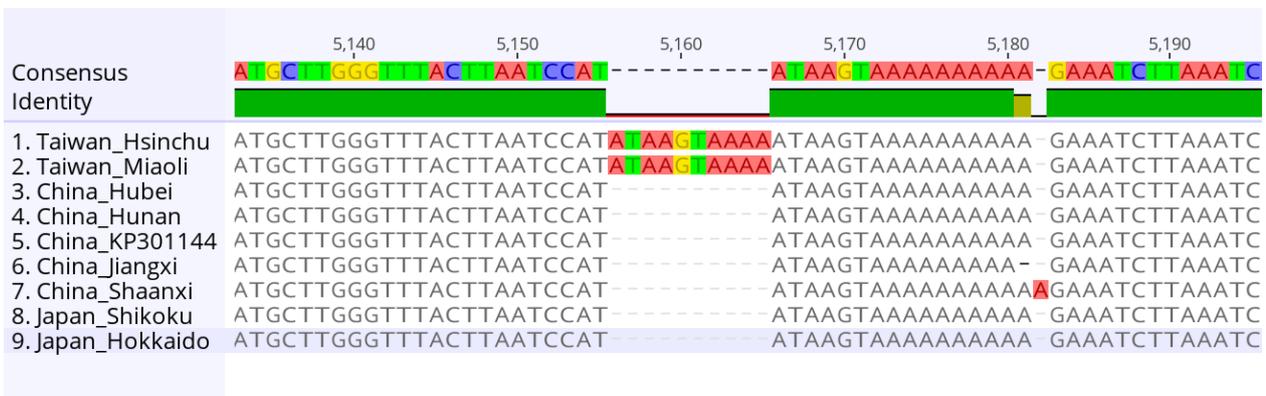


圖十一 檫櫟葉綠體 *rbcL-accD* 間 35 bp 反轉序列

在 *psaC-ndhE* 間臺灣族群共 3 組(ATAAAT)，比中國及日本，多一組重覆序列(圖十二)。在 *matK-rps16* 間臺灣族群則是多一組(ATAAGTAAAA)(圖十三)。

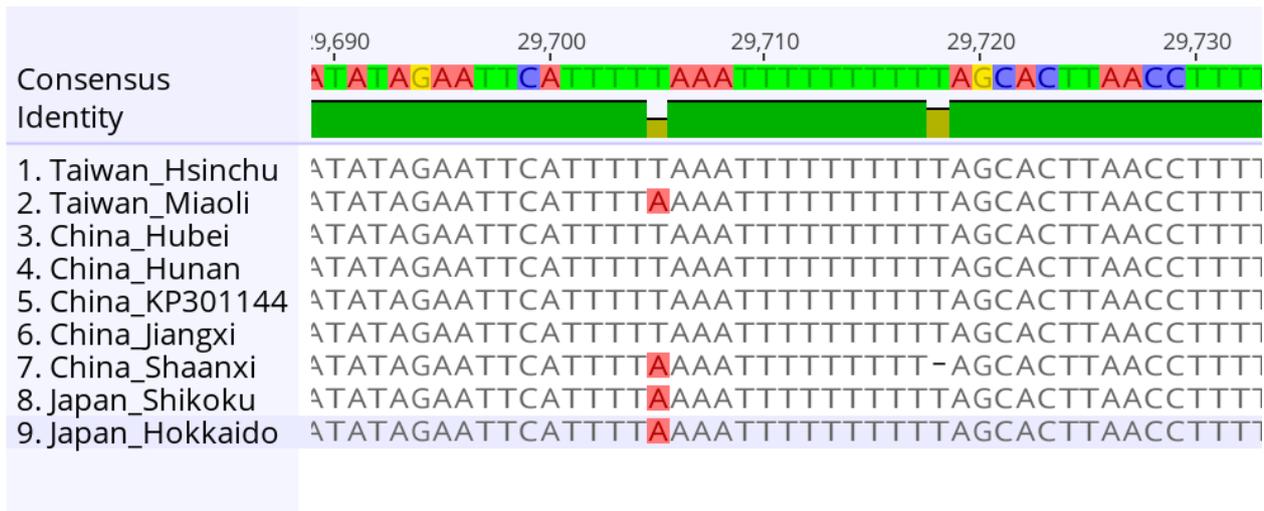


圖十二 榭櫟葉綠體 *psaC-ndhE* 間 ATAAAT 重覆變異



圖十三 榭櫟葉綠體 *matK-rps16* 間 ATAAGTAAA 重覆變異

在 *rpoB-petN* 間有可以區別臺灣兩個族群的單核苷酸多型性，但新竹與中國-湖北，湖南，江西，及 KP301144 同為 T；苗栗與中國-陝西，日本-四國及北海道同為 A (圖十四)。此外，在 *ndhJ-ndhK* 間，苗栗相對於新竹有一個 A 的缺失，但新竹與中國及日本多個樣本有同樣的 14 個核苷酸 A 序列(圖十五)。臺灣新竹與苗栗榭櫟在 *atpF* 內插子與 *ndhJ-ndhK* 間的插入/缺失的差異，造成兩者序列上有 4 bp 長度差別。



圖十四 槲櫟葉綠體 *rpoB-petN* 間單核苷酸多型性



圖十五 槲櫟葉綠體 *ndhJ-ndhK* 間核苷酸 A 序列長度的變異

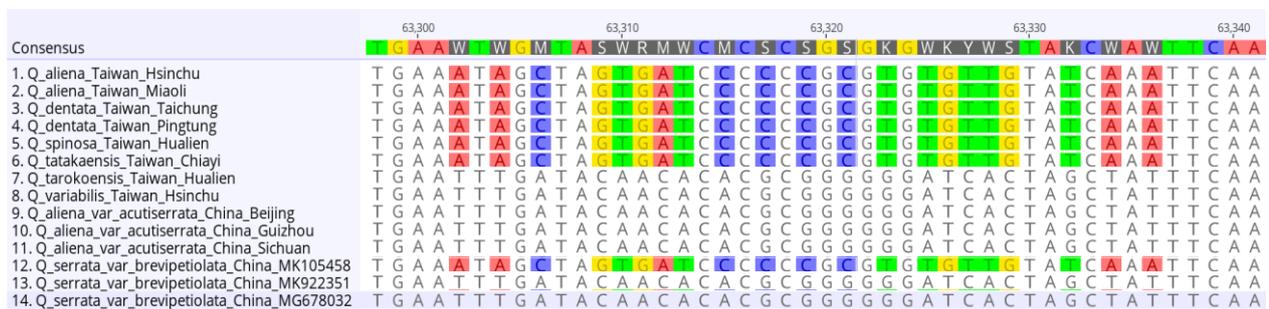
不同基因間尚有 7 個臺灣族群特有的單核苷酸多型性位點，可以與中國及日本的樣本有所區別(表九)。

表九 臺灣槲櫟葉綠體基因間特有的單核苷酸多型性位點

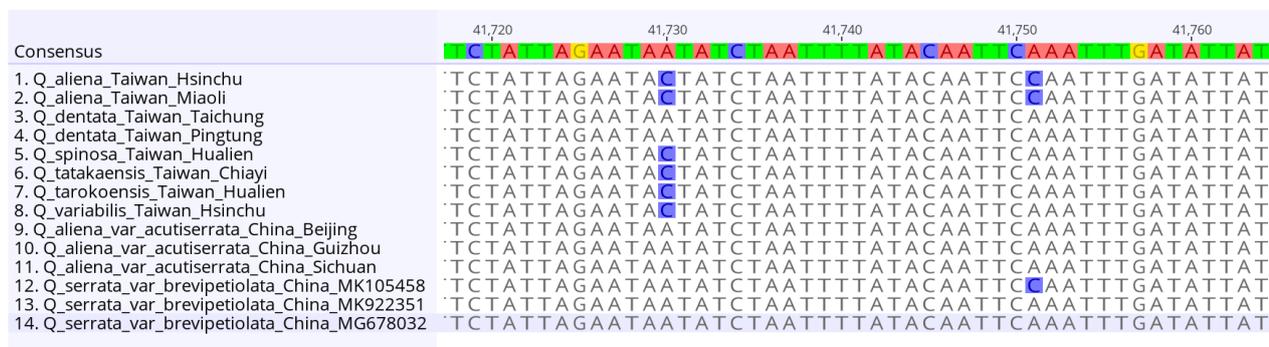
基因區間	單核苷酸多型性
<i>ndhG-ndhI</i>	T/A
<i>ndhF-rpl32</i>	C/A
<i>psbL-psbF</i>	C/A
<i>rps4-ndhJ</i>	T/A & C/T
<i>psbZ-rps14</i>	C/A & C/A

2.7 不同櫟屬物種間葉綠體基因組的序列比對

以此計畫完成的臺灣櫟屬葉綠體基因組，及加上由基因庫下載的中國櫟屬葉綠體基因組，進一步擴充資料，再對之前臺灣櫟屬特有的變異進行比對。例如在 *rbcL-accD* 間 35 bp 反轉序列，之前的比對臺灣櫟屬只與日本-四國櫟屬有相同方向的序列(圖十一)，但在臺灣櫟屬、高山櫟、塔塔加櫟及中國短柄枹櫟(MK105458)，亦有相同方向的序列(圖十六)；在 *psbZ-rps14* 間兩個單核苷酸多型性，臺灣櫟屬在第一個位點與臺灣高山櫟、塔塔加櫟、太魯閣櫟及栓皮櫟有相同的 C，但在第二個位點與中國短柄枹櫟(MK105458)有相同的 C (圖十七)。藉由與不同櫟屬物種比對，以確認臺灣櫟屬在同種及不同種間都兼具的獨特變異，做為超級條碼選擇的依據。



圖十六 櫟屬葉綠體 *rbcL-accD* 間 35 bp 反轉序列



圖十七 櫟屬葉綠體 *psbZ-rps14* 間單核苷酸多型性

2.8 超級條碼與 PCR 引子設計

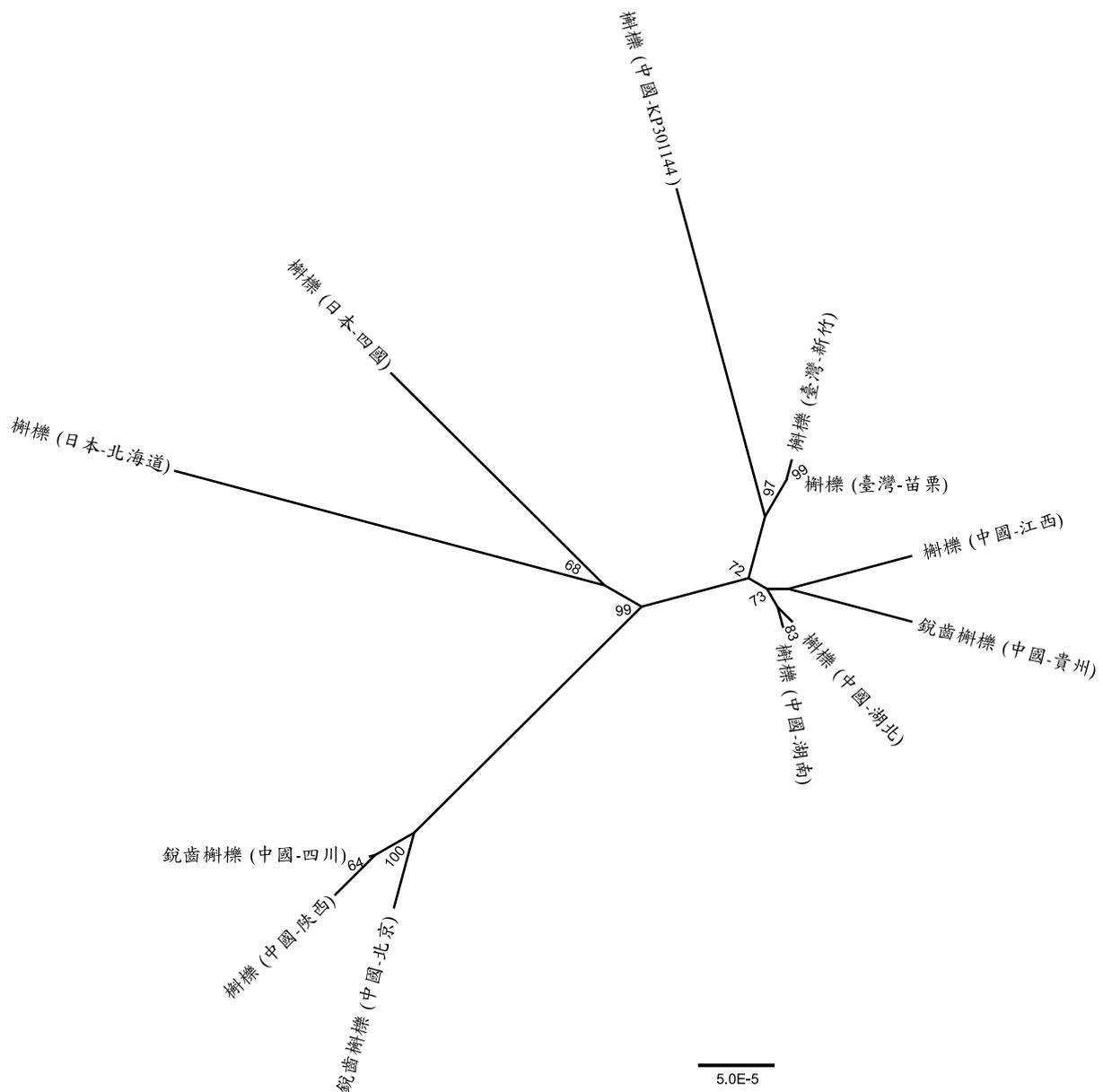
臺灣榲欖三個基因的非同義突變，經與臺灣不同櫟屬植物比對，亦為獨特的變異，適合開發為鑑別臺灣榲欖的超級條碼組合，*rps16* 及 *rpoC2* 的變異可代表臺灣的族群，加上 *petA* 的變異，可區別臺灣新竹及苗栗族群，相關基因 PCR 引子設計如表十。

表十 三組條碼 PCR 引子序列

基因	引子對	序列長度
<i>rps16</i>	TCCAACACTTCGGTTATTCATTTG TTTCCTTGAAAGGGGCGCTC	335 bp
<i>rpoC2</i>	TCCCCGAATTGGTTTGCCAT AATACAAGAAGCCGAGCGGG	384 bp
<i>petA</i>	GGATTTGGTCAGGGGGATGC GTCAAGTGGTCCTCTTCACAA	329 bp

2.9 榲欖與銳齒榲欖譜系樹

整合兩變種葉綠體基因組 79 個蛋白質編碼區的 DNA 序列所建構的譜系樹，中國榲欖 (KP301144) 為臺灣榲欖的姐妹群，但相較於中國湖北及湖南榲欖有較長的分支距離；日本榲欖與中國陝西榲欖為姐妹群，構成另一分群。銳齒榲欖分散其中，與榲欖並無明確分群區隔(圖十八)。



圖十八 榲欖與銳齒榲欖根據葉綠體基因組 79 個蛋白質編碼區所建構的無根源譜系樹

2.10 結論

植物標本館取樣具有高成功率，可以在短期內建立廣泛地理分布物種的遺傳資訊，且可反映在過去採集的時間點，當地物種的遺傳變異，再與現存的加以比較，此為植物標本館蒐藏的價值；我們也藉由此計畫，採集及建立驗證標本，長期保存於國立自然科學博物館植物標本館 (TNM)，以利後續比對及延伸研究。

結合次世代定序及相關櫟屬的葉綠體基因組參考序列，所建構的臺灣，中國及日本的榲欖的葉綠體基因組序列，提供了豐富的 DNA 序列比對基礎。由大數據的 DNA 序列，明確地呈

現出臺灣榲欖的新竹與苗栗族群，在葉綠體基因組中多樣形式且獨特的 DNA 變異，足以做為推論此兩族群為自然分布，而非人為引進移植的結果。

第三章 族群遺傳資訊分析

此計畫完成的臺灣，中國及日本榲欖葉綠體基因組，加上基因庫已經有的參考基因組，雖可進行全基因體的序列比對，但相對取樣的個體較少。為擴大比較的榲欖族群及個體數量，我們擷取葉綠體基因組中特定的 DNA 片段，與已發表的中國榲欖 6 個族群 207 個個體，及日本榲欖 12 個族群 89 個個體，進行單倍型的比對，以獲得更為廣泛的資訊進行比較分析。

3.1 與中國榲欖 5 個葉綠體 DNA 片段單倍型(haplotype)比較

此比對的 DNA 序列(表四)研究取樣自北京，以中國-北京為代號。臺灣樣本在此 5 個 DNA 片段序列都與中國-北京所差別，可以歸類為新的單倍型，但與其他葉綠體基因組樣本仍有相同的單倍型，無法顯現出特異性(表十一-表十五)。

表十一 *accD-psaI* 單倍型

樣本	14	166-167	506	558-582	585	640	單倍型
中國-北京	T	AA	G	il	C	A	1
臺灣-新竹	T	--	T	il	C	C	2
臺灣-苗栗	T	--	T	il	C	C	2
中國-湖北	T	--	T	il	C	C	2
中國-湖南	T	--	T	il	C	C	2
中國-KP301144	T	--	T	-	C	C	3
中國-江西	T	--	T	il	C	C	2
中國-陝西	T	--	T	-	T	A	4
日本-四國	G	--	T	il	C	C	5
日本-北海道	T	--	T	il	C	C	2

插入序列，il：TTTTTATTATATCACATATACTCAC。

表十二 *rps12-rpl20* 單倍型

	155	571	691	單倍型
中國-北京	T	T	-	1
臺灣-新竹	A	-	-	2
臺灣-苗栗	A	-	-	2
中國-湖北	A	-	-	2
中國-湖南	A	T	-	3
中國-KP301144	A	-	A	4
中國-江西	A	-	-	2
中國-陝西	A	T	A	5
日本-四國	A	-	-	2
日本-北海道	A	-	-	2

表十三 *rps16* intron 單倍型

	4	516	552	553-554	592	單倍型
中國-北京	C	A	A	AG	T	1
臺灣-新竹	C	A	A	--	T	2
臺灣-苗栗	C	A	A	--	T	2
中國-湖北	C	A	A	--	T	2
中國-湖南	C	A	A	--	T	2
中國-KP301144	C	A	A	--	T	2
中國-江西	C	A	A	--	T	2
中國-陝西	T	A	A	--	G	3
日本-四國	C	A	A	--	T	2
日本-北海道	C	C	-	--	T	4

表十四 *trnH-psbA* 單倍型

	71	86	107-126	170	175	202-205	209	282	307-309	434	單倍型
中國-北京	A	A	-	T	T	i2	T	A	AAA	A	1
臺灣-新竹	A	C	-	T	T	i2	T	A	-AA	A	2
臺灣-苗栗	A	C	-	T	T	i2	T	A	-AA	A	2
中國-湖北	A	C	-	T	T	i2	T	A	-AA	A	2
中國-湖南	A	C	-	T	T	i2	T	A	-AA	A	2
中國-KP301144	C	C	-	T	T	-	T	C	---	C	3
中國-江西	A	C	-	T	T	i2	T	A	-AA	A	2
中國-陝西	A	A	i1	A	G	i2	T	A	AAA	A	4
日本-四國	A	A	-	T	T	i2	G	A	AAA	A	5
日本-北海道	A	A	-	T	T	i2	T	A	-AA	A	6

插入序列，i1：TTTGTTTCCCTTTCTTATAA；i2：AAAA。

表十五 *trnQ-trnS* 單倍型

	175-176	325	357	單倍型
中國-北京	AA	A	A	1
臺灣-新竹	--	A	-	2
臺灣-苗栗	--	A	-	2
中國-湖北	--	A	-	2
中國-湖南	--	A	-	2
中國-KP301144	--	A	-	2
中國-江西	--	A	-	2
中國-陝西	--	G	-	3
日本-四國	--	A	-	2
日本-北海道	--	A	-	2

3.2 與日本榲欖 89 個個體 4 個葉綠體 DNA 片段單倍型(haplotype)比較

藉由葉綠體基因組完整的序列，可擷取特定的 DNA 片段做單倍型的比較。*trnT* (UGU)-*trnL* (UAA) 5' exon spacer 及 *rps16* intron 相對只有較少的變異，且臺灣樣本都有對應到與日本相同的單倍型(表十六，表十七)。*rpl32-trnL* 及 3' to *rps2* 有較多的變異，除了中國-陝西在 *rpl32-trnL* 有與日本相同的單倍型，其它臺灣及中國樣本都有序列上的變異，可以歸類為新的單倍型(表十八，表十九)。

表十六 *trnT* (UGU)-*trnL* (UAA) 5' exon spacer 單倍型

樣本	44	165	166	192-203	326	457-458	數量	單倍型
日本	T	A	T	-	G	-A	71	1
	T	A	T	-	G	--	7	2
	T	A	G	-	G	-A	10	3
	G	A	T	-	G	-A	1	4
臺灣-新竹	T	A	T	-	G	-A	2	1
臺灣-苗栗	T	A	T	-	G	-A	2	1
中國-湖北	T	A	T	-	G	-A	1	1
中國-湖南	T	A	T	-	G	AA	1	5
中國-KP301144	T	T	T	il	G	-A	1	6
中國-江西	T	A	T	-	G	-A	1	1
中國-陝西	G	A	T	-	G	-A	1	4
日本-四國	T	A	T	-	G	-A	1	1
日本-北海道	T	A	T	-	G	-A	1	1

插入序列，il：AGATAGATTCTA。

表十七 *rps16* intron 單倍型

樣本	470	501	544	614-618	數量	單倍型
	C	-	T	i1	65	1
日本	C	A	T	i1	1	2
	A	A	T	-	7	3
	A	A	T	i1	16	4
臺灣-新竹	C	A	T	i1	2	2
臺灣-苗栗	C	A	T	i1	2	2
中國-湖北	C	A	T	i1	1	2
中國-湖南	C	A	T	i1	1	2
中國-KP301144	C	A	T	i1	1	2
中國-江西	C	A	T	i1	1	2
中國-陝西	C	A	G	i1	1	5
日本-四國	C	A	T	i1	1	2
日本-北海道	C	-	T	i1	1	1

插入序列，i1：ATTTT。

表十八 *rpl32-trnL* 單倍型

樣本	7		89		424		442		486		694		816		911		數量	單倍型
	-	25	69	71	-	134	-	-	-	520	-	-	861	904	-	922		
	8		119		441		459		493		719		820		914			
日本	AA	T	T	T	i1	G	-	i4	i5	C	-	-	A	T	-	T	7	1
	AA	T	T	T	i1	T	-	i4	i5	C	-	-	A	T	-	T	19	2
	AA	G	T	T	i1	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	7	3
	AA	G	T	T	-	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	2	4
	AA	T	T	G	i2	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	36	5
	AA	T	T	G	i2	T	-	i4	-	C	-	-	C	T	-	T	1	6
	AA	T	T	T	i2	T	-	i4	i5	A	-	-	C	T	-	T	1	7
	AA	T	T	T	i1	T	i3	i4	i5	A	-	i7	C	T	-	T	8	8
	AA	T	T	T	i2	T	-	i4	i5	A	-	i7	C	T	-	T	8	9
臺灣-新竹	-A	T	A	T	i2	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	2	10
臺灣-苗栗	-A	T	A	T	i2	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	2	10
中國-湖北	-A	T	T	T	i2	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	1	11
中國-湖南	-A	T	T	T	i2	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	1	11
中國-KP301144	-A	T	A	T	i2	T	-	-	i5	C	i6	-	C	C	i8	A	1	12
中國-江西	-A	T	T	T	i2	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	1	11
中國-陝西	AA	T	T	T	i2	T	-	i4	i5	A	-	-	C	T	-	T	1	7
日本-四國	AA	T	T	T	i2	T	-	i4	i5	C	-	i7	C	T	-	T	1	13
日本-北海道	AA	G	T	T	-	T	-	i4	i5	C	-	-	C	T	-	T	2	4

插入序列, i1 : TTTTGTCTACTTCATTTTTTAAAATGATATTT ; i2 : TTTTGTCTACTTAATTTTTTAAAATGATATTT ; i3 : ATATCTAAATATTAATA ; i4 : ATATCTAAATATTAATA ; i5 : ATGGTGGG ; i6 : TCAACATTTTATTTCTTACTTATGTG ; i7 : CTTTT ; i8 : AAAA。

表十九 3' to *rps2* 單倍型

樣本	248-250	256	279	290-296	329	499	數量	單倍型
	--T	T	G	-	C	C	10	1
	TTT	T	G	-	A	C	37	2
日本	--T	T	G	-	A	C	34	3
	---	T	G	-	A	C	1	4
	-TT	A	A	-	A	C	7	5
臺灣-新竹	---	T	A	-	A	C	2	6
臺灣-苗栗	---	T	A	-	A	C	2	6
中國-湖北	---	T	A	-	A	A	1	7
中國-湖南	---	T	A	-	A	A	1	7
中國-KP301144	---	T	A	il	A	C	1	8
中國-江西	---	T	A	-	A	A	1	7
中國-陝西	--T	T	A	-	A	C	1	9
日本-四國	--T	T	A	-	A	C	1	10
日本-北海道	--T	T	A	-	A	C	1	10

插入序列，il：TAAACT。

3.3 日本與臺灣榭櫟單倍型網狀圖與族群遺傳分析

整合日本 12 個族群 89 個個體及臺灣 2 個族群 16 個個體，將日本榭櫟 4 個葉綠體 DNA 片段結合，共 3,334 bp 序列長度的資訊進行比對。日本族群的單倍型共 10 型，臺灣僅 1 型(表二十)。依遺傳種質族群可移植區，將日本族群整合為東北地區及西南地區，加上臺灣，共三個區域來呈現資訊，日本西南地區有最高的遺傳多樣性(表二十一)；因為臺灣有獨特的變異位點及單倍型，以三地區的族群間相互比較，不論是在族群間之核苷酸歧異度(Dxy)，及族群間之遺傳分化指數(Fst)，都有高於日本東北地區及西南地區的變異(表二十二)。

在單倍型網狀圖，日本西南地區福岡的單倍型(V)為重要的節點，與日本東北地區最多的單倍型(I)，及臺灣的單倍型(XI)，都具有有兩個位點的變異(圖十九)。

表二十 結合榲欖 4 個葉綠體 DNA 片段的單倍型

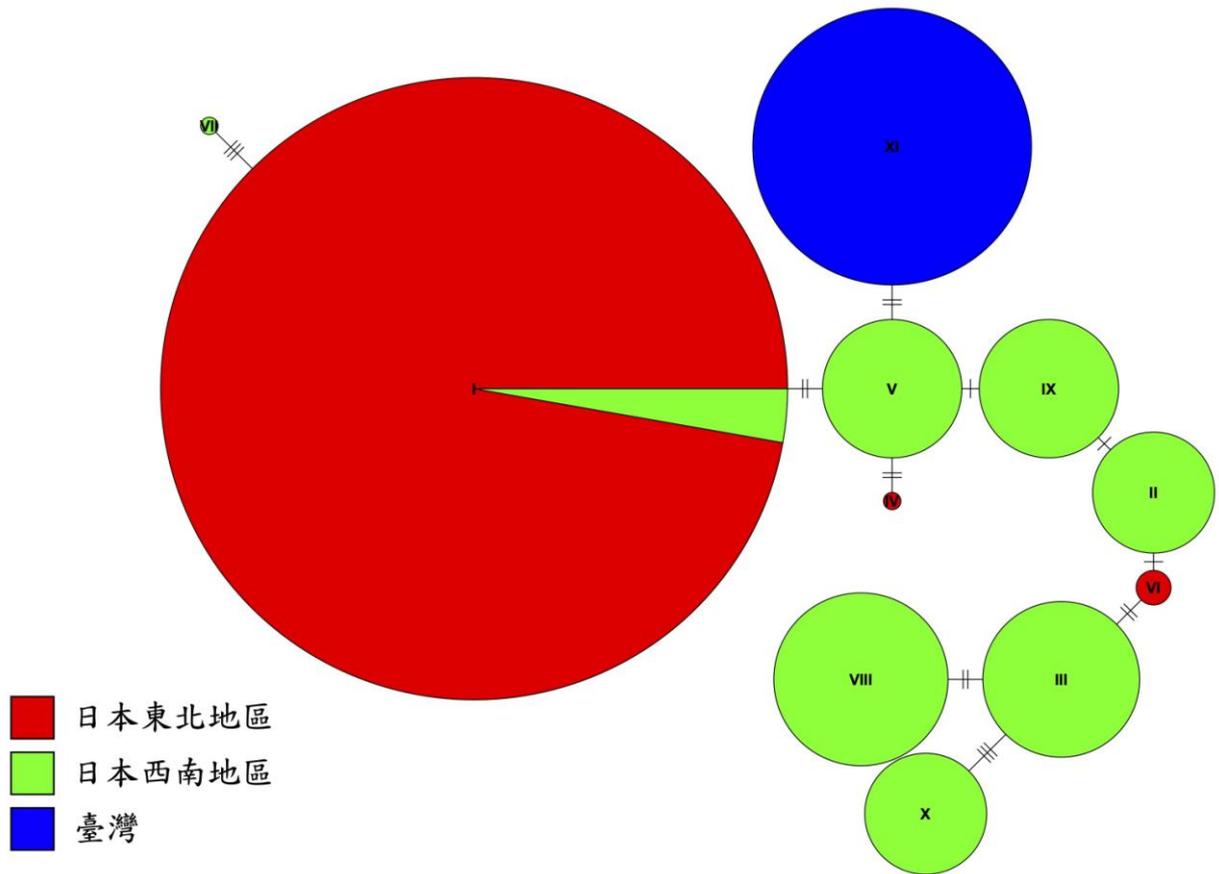
單倍型	日本東北地區					日本西南地區						臺灣		
	秋田	福島	岩手	宮城	新潟	福岡	廣島	熊本	三重	岡山	奈良	滋賀	新竹	苗栗
I	8	6	6	8	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0
II	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	0	1	0	0
VI	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
VIII	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	8	0	0	0
IX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0
XI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8

表二十一 日本及臺灣榲欖族群遺傳多樣性

區域	個體數	單倍型數	單倍型多樣性	核苷酸多樣性
日本東北地區	38	3	0.102	0.00060
日本西南地區	51	8	0.860	0.00093
臺灣	16	1	0	0

表二十二 日本及臺灣榲欖族群間遺傳多樣性，右上部為族群間之核苷酸歧異度(Dxy)，左下部為族群間之遺傳分化指數(Fst)。

	日本東北地區	日本西南地區	臺灣
日本東北地區		0.00089	0.00122
日本西南地區	0.366		0.00139
臺灣	0.771	0.408	



圖十九 日本及臺灣榲欖單倍型網狀圖。各單倍型間的短線代表變異位點的數目

3.4 結論

雖然中國榲欖有 6 個族群 207 個個體的資訊可進行比對，但因取樣的地理範圍只在中國北京鄰近地區，其 5 個葉綠體 DNA 片段單倍型僅具有單一序列，沒有提供足夠的遺傳變異，可以明確區別中國與臺灣榲欖的差異，及進行相關的族群遺傳比較分析。相對地，日本榲欖 12 個族群 89 個個體 4 個葉綠體 DNA 片段，提供足夠的遺傳變異，可以與臺灣 2 個族群 16 個個體進行族群遺傳分析，呈現榲欖在東亞島鏈的族群遺傳分化的資訊；此外，中國陝西榲欖在 *rpl32-trnL* 有與日本榲欖相同的單倍型，與以葉綠體基因組 79 個蛋白質編碼區所建構的譜系樹，中國陝西榲欖與日本榲欖為姐妹群的結果有一致性。

第四章 討論

此研究藉由基因組略讀的方法，建構多數櫟屬樣本完整葉綠體基因組序列，但以標本館取樣的兩個樣本，因 DNA 過於片段化，未能組裝出完整的葉綠體基因組，這可能與標本製作及保存條件有關，能選擇較近期採集的標本有較高的成功率。然而，在核醣體 DNA 的序列，因櫟屬樣本都具有多套的組合，並無法由次世代定序的短讀序片段，成功組裝出各單倍型的組合；核醣體 DNA 代表父系遺傳的資訊，因櫟屬核醣體 DNA 的特性及基因組略讀方法的局限性，無法用來進一步探討雜交及基因漸滲的問題。

藉由完整的葉綠體基因組序列比對，臺灣新竹族群在 *petA* 蛋白質編碼區有與苗栗族群有所差異的非同義突變，在 *atpF* 內插子序列有插入/缺失的變異，在 *rpoB-petN* 間有單核苷酸多型性，及在 *ndhJ-ndhK* 間有一個 A 的缺失變異，其它部份序列完全相同。蛋白質編碼區的非同義突變會涉及到基因功能的改變，為相對少有的突變形式，由兩個族群在葉綠體基因組此兩個變異，已可以確認為非人為移植的結果。

相對於 *rps16* 內插子在櫟屬的單倍型變異，並無法區別臺灣族群與中國及日本樣本的差異，但臺灣族群在 *rps16* 蛋白質編碼區有獨特的非同義突變；另外，臺灣族群在 *rpoC2* 蛋白質編碼區也有獨特的非同義突變。由 79 個蛋白質編碼區 68,606 bp 序列的資訊比對，單核苷酸多型性總計有 73 個位點，臺灣族群與中國樣本間有 8 個以上的單核苷酸多型性差異；加上在內含子及基因間的多樣的變異，都支持臺灣櫟屬為自然分布族群，非近代人為由中國或日本引進栽種。

此研究取樣日本四國及北海道的櫟屬，進行葉綠體基因組的序列比對；但我們也加入日本櫟屬 12 個族群 89 個個體的 4 個葉綠體 DNA 片段結合的單倍型進行比較(表二十)。此兩組取樣地理分布範圍互補，而且與臺灣櫟屬都有序列上差異，可以明確排除由日本引進栽種的可能性。相對地，依中國植物誌，中國櫟屬廣泛分布於安徽、甘肅、廣東、廣西、貴州、河北、河南、湖北、湖南、江蘇、遼寧、陝西、山東、山西、西川、雲南和浙江。目前此研究已取樣陝西、湖北、湖南及江西的櫟屬，進行葉綠體基因組的序列比對，未來期望能增加華南地區的樣本來比較，或是如同日本櫟屬有廣泛地理分布櫟屬的研究可以參考比對，增進我們對臺灣與中國櫟屬的遺傳變異分化程度的資訊，及與中國櫟屬演化分歧時間推估等相關研究。

第五章 榭櫟保育工作策略與建議

榭櫟主要分布於日本、韓國、中國及臺灣，目前臺灣僅發現兩族群分布於新竹及苗栗。此研究以建構臺灣、中國及日本榭櫟的葉綠體基因組序列，做為比對遺傳變異的基礎資訊。

在與其他國家比較上，中國及日本族群與臺灣族群的差異，以葉綠體 79 個蛋白質編碼區序列的資訊進行比對，臺灣的榭櫟在 *rps16* 及 *rpoC2* 蛋白質編碼區有獨特的非同義突變；而其單核苷酸多型性總計有 73 個位點，臺灣族群與中國及日本間有 8 個以上的單核苷酸多型性差異；此外，在內含子及基因間有多樣的遺傳變異。這些都支持臺灣的榭櫟為自然分布族群，非近代人為由中國或日本引進栽種。榭櫟為主要分布於溫帶地區，臺灣的榭櫟為代表此物種適應亞熱帶環境的演化分支，並可進一步探討歷史生物地理、生理生態、遺傳演化相關議題。本研究結果支持新竹及苗栗兩處榭櫟族群為臺灣原生，且此兩族群與東亞其他地區之榭櫟族群相較已有遺傳特異性，故需要積極保育。

針對臺灣新竹及苗栗的榭櫟族群進一步比較，發現其葉綠體基因組序列長度分別為 161,263 bp 及 161,267 bp。以兩處族群內之葉綠體基因組比對，發現已無遺傳變異；野外族群調查則顯示族群內成熟個體數均未達 100 株，推論可能受棲地過度開發、破碎化及病蟲害等因素影響，造成族群數量銳減與瓶頸效應(bottleneck effect)結果。以兩族群間葉綠體基因組比對，新竹族群在 *petA* 蛋白質編碼區有非同義突變，並在數個序列有插入/缺失的變異及單核苷酸多型性，與苗栗族群相比具有明顯的差異。特別是蛋白質編碼區的非同義突變會涉及到基因功能的改變，為相對少有的突變形式，代表兩族群已經歷一段時間分化所累積的遺傳變異，可以確認新竹與苗栗兩族群均非人為移植或種植而來。

依據上述研究結果，建議保育主管機關對新竹、苗栗兩處榭櫟族群可採取保育策略如下：

- 一、因原生育地族群數量有逐漸減少趨勢，但兩族群採種容易，目前對於苗木培育的知識技術亦相對充足。因此建議可優先採行區外復育，經由採種及人工培育方式獲得充足後代個體，再擇原生育地鄰近適當地點進行復育。惟實施區外復育過程中，從採種、育苗至後續復育栽植區域的選定等，建議宜以新竹縣、苗栗縣為界分別推動新竹及苗栗族群復育工作，避免混淆種植造成兩地族群的非自然遺傳交流。後續可以運用生態棲位模擬(ecological niche modeling)，評估於目前棲地之外，潛在的異地復育種植區域。
- 二、由於新竹及苗栗族群間已有遺傳變異存在，可能代表此兩族群適應當地微環境的結果，包括雨量、溫度、土壤及對病害的抗性...等，因此應積極保留此兩個族群的遺傳變異。

三、此外，將外來基因型引入新環境，可能會導致本地適應能力喪失，並導致遠交衰退 (outbreeding depression)；因此，為了避免異地種植的潛在風險，需要仔細考量遺傳種質族群可移植區 (genetically distinct transferrable zones)，在這些區域內種植的種子和幼苗，需對族群平均適應性的不利影響最小。我們建議除了在目前的棲地，維持現有槲櫟族群的健全發展；在後續異地復育的執行上，由新竹族群收集繁殖的種源，能種植於新竹以北的區域；苗栗族群收集繁殖的種源，能種植於苗栗以南的區域，以保有目前兩族群存在的遺傳變異。

槲櫟的區外復育亦可為綠美化樹種進行推廣。國內之綠美化已進步到適地適木的原生樹種，可以在增加為考量遺傳多樣性下，協助保育之栽植推廣，如嘉義大學團隊於新竹槲櫟族群之努力與做法。而目前嘉義大學與新竹縣政府及新竹林區管理處已於新竹縣的山崎國小、鳳岡國小、瑞峰國小、彰化農場與婦幼公園等地點進行推廣栽植，也多次進行活動順利的將此樹種介紹出去，以及打擊市面上私採苗木價格與行為。而在保種上，新竹之槲櫟族群已於新竹縣政府造林地、林管處楊梅造林地與關西造林地進行復育栽植，其內於栽植時選取不同母樹之種子苗栽植以保有多數新竹族群之遺傳多樣性，因此苗栗族群雖在私有林地上，但是可以先做到植株數量清點，編號，然後各個編號採集種子萌芽後，將不同母樹之種子栽植於苗栗卓蘭造林地當中。該地點先前已有評估，為適合苗栗族群保種復育之絕佳地點。

依據現有基礎，我們建議可操作的短、中、長期的保育執行方案：

短期：新竹族群已相對完備；應加強對苗栗族群進行植株清點，編號與採種。

中期：將苗栗族群苗木於數個公有地進行栽植，此栽植最好仍以栽植搭配不同母樹種子，以環境教育及維持區外栽植遺傳多樣性進行。

長期：搭配先前模式，配合槲櫟未來長期氣候變遷可退縮路徑，選擇林地進行較大規模的栽植，此栽植參照關西造林地，需配置不同母樹之種子苗，以最大化保存遺傳多樣性；苗栗卓蘭造林地距離新竹造林地有上百公里，此距離與兩原生地距離相似，因此可避免兩個復育造林地點的遺傳上干擾。兩族群相關的雜交實驗，應先於可隔離的溫室或苗圃進行，以實際結果評估雜交後代的適應不同環境的能力，再擬定後續復育執行方式。

第六章 參考文獻

- Bushnell, B. 2016. BBMap short read aligner, and other bioinformatic tools. <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>.
- Darling, A. C. E., B. Mau, F. R. Blattner, and N. T. Perna 2004. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* 14:1394-1403.
- Deng, M., X.-L. Jiang, A. L. Hipp, P. S. Manos, and M. Hahn. 2018. Phylogeny and biogeography of East Asian evergreen oaks (*Quercus* section *Cyclobalanopsis*; Fagaceae): insights into the Cenozoic history of evergreen broad-leaved forests in subtropical Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 119: 170-181.
- Denk, T., G. W. Grimm, P. S. Manos, M. Deng, and A. L. Hipp. 2017. An updated infrageneric classification of the oaks: review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns. In E. Gil-Pelegrín, J. J. Peguero-Pina, and D. Sancho-Knapik [eds.], Oaks physiological ecology. Exploring the functional diversity of genus *Quercus* L., *Tree Physiology* 7, 13-38.
- Hipp, A. L., P. S. Manos, M. Hahn, M. Avishai, C. Bodénès, J. Cavender-Bares, A. A. Crawl, et al. 2020. Genomic landscape of the global oak phylogeny. *New Phytologist* 226: 1198-1212.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, et al. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Librado P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lu, S., M. Hou, F. K. Du, J. Li, and K. Yin. 2016. Complete chloroplast genome of the Oriental white oak: *Quercus aliena* Blume. *Mitochondrial DNA Part A* 27: 2802-2804.
- Lyu, J., J. Song, Y. Liu, Y. Wang, J. Li, and F. K. Du. 2018. Species boundaries between three sympatric oak species: *Quercus aliena*, *Q. dentata*, and *Q. variabilis* at the northern edge of their distribution in China. *Frontier in Plant Science* 9: 414.
- Nevill, P. G., X. Zhong, J. Tonti-Filippini, M. Byrne, M. Hislop, K. Thiele, S. Van Leeuwen, et al. 2020. Large scale genome skimming from herbarium material for accurate plant identification and phylogenomics. *Plant Methods* 16: 1-8.
- Oh, S.-H., and P. S. Manos. 2008. Molecular phylogenetics and cupule evolution in Fagaceae as inferred from nuclear CRABS CLAW sequences. *Taxon* 57: 434-451.

- Pang, X., H. Liu, S. Wu, Y. Yuan, H. Li, J. Dong, Z. Liu, et al. 2019. Species identification of oaks (*Quercus* L., Fagaceae) from gene to genome. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 5940.
- Paradis, E. 2010 Pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics* 26: 419-420.
- Petit, R.J., A. El Mousadik, and O. Pons. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 4: 844-855.
- San Jose-Maldia, L., A. Matsumoto, S. Ueno, A. Kanazashi, M. Kanno, K. Namikawa, H. Yoshimaru, and Y. Tsumura. 2017. Geographic patterns of genetic variation in nuclear and chloroplast genomes of two related oaks (*Quercus aliena* and *Q. serrata*) in Japan: implications for seed and seedling transfer. *Tree Genetics & Genomes* 13: 121.
- Simeone, M. C., R. Piredda, A. Papini, F. Vessella, and B. Schirone. 2013. Application of plastid and nuclear markers to DNA barcoding of Euro-Mediterranean oaks (*Quercus*, Fagaceae): problems, prospects and phylogenetic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 172: 478-499.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: e115-e115.
- Yang, Y., T. Zhou, Z. Qian, and G. Zhao. 2021. Phylogenetic relationships in Chinese oaks (Fagaceae, *Quercus*): Evidence from plastid genome using low-coverage whole genome sequencing. *Genomics* 113: 1438-1447.
- Wu, C.-S., E. Sudianto, Y.-M. Hung, B.-C. Wang, C. Huang Jr, C.-T. Chen, and S.-M. Chaw. 2020. Genome skimming and exploration of DNA barcodes for Taiwan endemic cypresses. *Scientific Reports* 10: 1-10.
- Zerbino, D. R. and E. Birney. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18: 821-829.

附錄一、期初計畫審查會議紀錄

行政院農業委員會林務局新竹林區管理處 「臺灣榲欖族群遺傳多樣性分析計畫」案 期初計畫審查會議紀錄

一、會議時間：111年7月27日(星期三)下午2時

二、會議地點：本處二樓會議室

三、主持人：夏處長榮生

四、報告事項：

(一)榲欖是中國大陸及日本廣泛分布的物種，在臺灣僅分布於新竹和苗栗低海拔丘陵，《2017 臺灣維管束植物紅皮書名錄》中被評定為極危等級 (CR)。2019 年以前僅見於新竹縣新豐鄉坑子口一帶丘陵地，係於 1924 年被日本學者島田彌市首次發現，隨後日籍植物學者金平亮三在他 1936 年出版的《臺灣樹木誌》詳實細述其位置與狀態，並提及此物種可能為中國引進栽培，但此論點並未有任何實際證據支持。而苗栗市的榲欖族群係於 2019 年被發現，位於苗栗市西側低矮丘陵的西北坡面，當地榲欖與楓香、相思樹、大葉桉、麻欖等人為栽植樹種混生，難憑野外觀察判定此榲欖族群是否為自然野生。透過林業試驗所執行本處委託轄內受威脅植物之短、中、長程保育行動與策略計畫，發現現存的榲欖成樹在民國 66 年即有明顯樹冠，可判定存活時間至少有 50 年以上。歷史航照顯示，苗栗市南勢坑一帶土地為農林鑲嵌使用，包含梯田、旱作（似茶作）、造林等，但榲欖成樹分布範圍僅有少數祖塔、墳墓等建物，並未觀察到明顯的砍伐後造林行為，推測此處榲欖應非大規模造林種植而來。若此處榲欖為自然生長的野生族群，將具有極高的保育價值。爰此，為獲取更充足的證據，俾利研擬後續生態保育及推廣策略，實有釐清臺灣的榲欖族群來源證明。

(二)計畫目標：

1. 完成榲欖遺傳變異及多樣性分析，以瞭解臺灣的榲欖遺傳變異與各族群之代表性。
2. 分析探討臺灣的榲欖來源、新竹族群與苗栗族群差異，及其與中

- 國大陸及日本族群在不同地理空間之遺傳多樣性差異。
3. 建構譜系資訊，分析探討臺灣、中國大陸及日本槲櫟的演化歷史。
 4. 建立不同族群的條碼資訊，做為後續鑑定與保育的工具。
 5. 就遺傳分析結果，針對新竹林管處轄內槲櫟之保育工作，提出策略與建議。

(三)本案係委託國立自然科學博物館辦理，契約編號：111-031，履約期間自 111 年 6 月 8 日起至 111 年 12 月 20 日止；依契約第 5 條、第 7 條規定，廠商應於 111 年 7 月 7 日以前繳交期初計畫（內容包含計畫執行內容架構，取樣植物物種清單及來源，並訂定細部工作規劃及各階段期程），經機關審查通過後，撥付第 1 期款(新台幣 149,000 元整)。

五、受託單位簡報：略。

六、會議結論：本案期初計畫審查通過，請國立自然科學博物館參照委員及與會人員意見，納入後續規劃及報告論述。

七、散會：111 年 7 月 27 日(星期三)下午 3 時 30 分。

「臺灣榲欓族群遺傳多樣性分析計畫」

期初計畫審查會議紀錄

委員/與會單位	審查意見	回應說明
胡哲明委員	<ol style="list-style-type: none"> 1. 缺乏臺灣榲欓族群的現況描述，包含過往調查結果與取樣策略。另中國、日本樣本之確切點及其代表性為何？ 2. 在 30 個取樣樣本中，為何要加上其他 7 種櫟屬植物(若已知榲欓之最近種為榲樹)？特別在臺灣櫟屬植物，已有多個葉綠體基因組在線可比對。 3. 建議從族群遺傳的角度思考，在植株取樣及分子分析資料選擇上做調整(也許在未來後續研究可考慮)。 4. 中國和日本葉綠體片段不同，如何整合？ 5. 目標序列應更明確寫在方法中。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 臺灣榲欓族群現況於後續報告中補充。另外，中國及日本取樣地點也已加註，以涵蓋榲欓分布範圍的不同地理地域做取樣代表。 2. 後續將以葉綠體基因組序列比對，來設計臺灣榲欓兩個族群獨特的 DNA 遺傳標記，藉由加入其它櫟屬植物的資訊比較，將有助於專一性的 DNA barcode 的設計。 3. 目前設計是一族群取 8 個個體代表，為族群遺傳研究普遍採用的代表數量。未來經實際序列比對後，找出有實際變異的標記，增加個體的數量來分析。 4. 兩研究在 <i>rps16</i> intron 序列有重疊，將做整合比較。 5. 將依實際序列比對的資訊，加註於方法及結果中。
蘇夢淮委員	<ol style="list-style-type: none"> 1. 本計畫引入新技術來進行稀有植物的遺傳多樣性研究，值得發展。 2. 因經費有限，建議林管處與執行單位再研商方向，以達到目前較為迫切的保育議題。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員的肯定。 2. 目前的計畫即先建立遺傳變異的資訊，做為後續保育議題參考的基礎資料。

委員/與會單位	審查意見	回應說明
王志強委員	<ol style="list-style-type: none"> 1. 目前已初步完成文獻探討研究及樣本採樣。 2. 未來報告書可再檢視研究目的和使用方法間的應對。 3. 樣本取樣之標本編號紀錄及分布地點可標明。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員的肯定。 2. 感謝委員的建議，於後續報告調整。 3. 於後續報告加註。
劉景國委員	<ol style="list-style-type: none"> 1. 榲欖在臺灣的原生地僅有榲欖與栓皮櫟，如何得知榲欖與榲樹可能有雜交的問題？ 2. 另建議應釐清榲欖與榲樹的花期，花期重疊始有機會進行基因交流的可能。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 如果此兩物種曾經同域共生，才有機會進行基因交流。探討兩物種雜交，需要再另外設計實驗，如運用核微衛星的資訊來釐清。 2. 此兩種植物都於 2-3 月開花。
夏榮生委員	<ol style="list-style-type: none"> 1. 本案計畫目標應以釐清新竹、苗栗榲欖族群種源差異及探討與中國、日本族群的遺傳距離並評估是否為中國引進為首要。 2. 目前針對中國及日本有無透過學術交流取得相關資訊或採集新鮮樣本的可能？ 3. 簡報針對新竹與苗栗族群樣本進行不同照片編排，建請補充說明其差異及擬傳達之資訊。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 此計畫依此目標規劃，藉由葉綠體基因組資訊，確認臺灣族群與中國、日本的遺傳變異程度，以釐清臺灣族群來源的問題。 2. 目前中國及日本樣本先採用標本館取樣，已可得到完整的基因組資訊。未來如果有需要，可再以學術合作方式取得樣本。 3. 在榲欖的族群內，葉型即有相當的變異，我們的採樣會製作成驗證標本，存放於植物標本館，提供後續比對運用。

委員/與會 單位	審查意見	回應說明
作業課	<ol style="list-style-type: none"> 1. 本案雖具委託研究性質，惟係屬委辦計畫，非委託研究計畫，報告書相關內容建請修正。 2. 本案已進入期初報告，相關格式請再重新調整修正(如預算細目 p9 應刪除、封面亦無須再呈現標案編號、投標廠商，另請補正增加目錄頁)。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 後續報告依此建議修正。 2. 後續報告依此建議修正。

附錄二、期中計畫審查會議紀錄

行政院農業委員會林務局新竹林區管理處

「臺灣榭欒族群遺傳多樣性分析計畫」案

期中報告審查會議紀錄

一、會議時間：111 年 9 月 30 日(星期五)下午 2 時

二、會議地點：本處二樓會議室

三、主持人：吳秘書學平(代理)

紀錄：黃婉如

四、報告事項：

(一)榭欒是中國大陸及日本廣泛分布的物種，在臺灣僅分布於新竹和苗栗低海拔丘陵，
《2017 臺灣維管束植物紅皮書名錄》中被評定為極危等級（CR）。2019 年以前僅見於新竹縣新豐鄉坑子口一帶丘陵地，係於 1924 年被日本學者島田彌市首次發現，隨後日籍植物學者金平亮三在他 1936 年出版的《臺灣樹木誌》詳實細述其位置與狀態，並提及此物種可能為中國引進栽培，但此論點並未有任何實際證據支持。而苗栗市的榭欒族群係於 2019 年被發現，位於苗栗市西側低矮丘陵的西北坡面，當地榭欒與楓香、相思樹、大葉桉、麻欒等人為栽植樹種混生，難憑野外觀察判定此榭欒族群是否為自然野生。透過林業試驗所執行本處委託轄內受威脅植物之短、中、長程保育行動與策略計畫，發現現存的榭欒成樹在民國 66 年即有明顯樹冠，可判定存活時間至少有 50 年以上。歷史航照顯示，苗栗市南勢坑一帶土地為農林鑲嵌使用，包含梯田、旱作（似茶作）、造林等，但榭欒成樹分布範圍僅有少數祖塔、墳墓等建物，並未觀察到明顯的砍伐後造林行為，推測此處榭欒應非大規模造林種植而來。若此處榭欒為自然生長的野生族群，將具有極高的保育價值。爰此，為獲取更充足的證據，俾利研擬後續生態保育及推廣策略，實有釐清臺灣的榭欒族群來源證明。

(二)計畫目標：

1. 完成榭欒遺傳變異及多樣性分析，以瞭解臺灣的榭欒遺傳變異與各族群之代表性。
2. 分析探討臺灣的榭欒來源、新竹族群與苗栗族群差異，及其與中國大陸及日本族群在不同地理空間之遺傳多樣性差異。

3. 建構譜系資訊，分析探討臺灣、中國大陸及日本槲櫟的演化歷史。
4. 建立不同族群的條碼資訊，做為後續鑑定與保育的工具。
5. 就遺傳分析結果，針對新竹林管處轄內槲櫟之保育工作，提出策略與建議。

(三)本案係委託國立自然科學博物館辦理，契約編號：111-031，履約期間自 111 年 6 月 8 日起至 111 年 12 月 20 日止；本案期初報告針對前案計畫執行內容架構，取樣植物物種清單及來源，以及細部工作與各階段期程規劃，業於 111 年 7 月 27 日召開期初報告審查會議通過，並已完成第 1 期款(新台幣 149,000 元整)撥付。

(四)依契約第 5 條及採購說明書第七點規定，廠商應於 111 年 9 月 15 日以前繳交期中報告（內容應包含資料分析成果，並就前項結果評估擬定本處轄內槲櫟保育工作策略與建議之初稿），經機關審查通過後，撥付第 2 期款(新台幣 298,000 元整)。

五、受託單位簡報：(略)

六、委員及與會單位建議事項：如附表。

七、會議結論：本案期中計畫審查通過，請國立自然科學博物館於收到本件會議紀錄 10 日內，針對報告書涉及本處轄內槲櫟保育工作策略與建議之初稿內容再予補充，俟交付後俾憑辦理本案第 2 期款撥付；餘請參照委員及與會人員意見，納入後續規劃及報告論述。

八、散會(下午 3 時 10 分)

「臺灣榲欖族群遺傳多樣性分析計畫」

期中報告審查會議紀錄

委員/與會單位	審查意見	回應說明
胡哲明委員	<p>1.計畫目標的樣本 DNA 均順利完成萃取，並進行基因組序列組裝和初步分析。結果清楚顯示臺灣的族群，包含新竹和苗栗個體，和中國、日本地區的榲欖均有一定差異，應非近代引進栽種，支持報告論點。當然由於中國地區的榲欖族群分布相當廣，是否有其他族群有不一樣，而和臺灣一樣的序列，仍待未來更多的取樣分析。目前報告對於中國榲欖的描述並不多，建議增加榲欖在中國分布狀況，並說明本計畫材料在中國族群中的代表性，以豐富討論的內涵。</p> <p>2.在 rbcL-accD 序列中，(臺灣+日本)的反轉序列，和短柄抱欖(MK105458)的反轉序列不一樣，應被視為兩個獨立的平行演化事件。</p> <p>3.討論時須釐清與先前報導合併分析之脈絡，不同分析應分節說明。</p> <p>4.核基因組分析宜納入，待期末報告一起呈現。</p> <p>5.後續針對各族群間之遺傳距離探討應多進行討論。</p>	<p>1.於期末報告增加榲欖在中國的分布狀況說明，再加以討論。</p> <p>2.經再確認反轉序列一樣，為普遍存在的變異形式。</p> <p>3.依委員建議調整。</p> <p>4.相關結果於期末報告討論說明。</p> <p>5.依委員建議調整。</p>

委員/與會單位	審查意見	回應說明
蘇夢淮委員	<ol style="list-style-type: none"> 1.本研究目前已有初步結果，證明臺灣的族群與中國、日本有遺傳上差異，故臺灣的榲欖應為天然分布，有保育上的價值，結果值得肯定。 2.報告格式請加入摘要，另是否需要按農委會格式撰寫，請與委託單位確認。 3.目標所列之演化譜系，尚未呈現，請於期末詳述。另有關超級條碼之建立部分，是否已有想法？請補充。 4.根據初步結果，建議林管處可開始較為積極保育措施。並請受託單位於期末就遺傳多樣性保育層面提出合適且可實行之建議。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.感謝委員的肯定。 2.依報告相關格式調整，加入摘要。 3.依委員建議於期末報告補充。 4.於期末報告提供榲欖保育工作策略與建議。
王志強委員	<ol style="list-style-type: none"> 1.本案期中報告書內已呈現相關之研究成果，並依期初建議增加了新竹與苗栗之樣本研究，結果顯示與中國、日本之族群有部分之差異。 2.本計畫目標 2「分析探討臺灣的榲欖來源、新竹與苗栗族群差異」，其中了解新竹與苗栗族群是否應視為不同之保育單位，成為經營管理單位之重要參考，再請研究團隊努力費心。 3.期末報告建議可整合期初報告之內容，以臻完善。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.感謝委員的肯定。 2.於期末報告提供榲欖保育工作策略與建議。 3.依委員建議調整。

委員/與會單位	審查意見	回應說明
吳秘書學平	<ol style="list-style-type: none"> 1.本件報告書相關章節多已羅列，請受託單位再補充摘要。 2.本件委辦計畫具專業研究分析性質，惟考量機關以及閱讀受眾對象並非均具遺傳分析等專業背景，請受託單位就部份報告書及簡報內容以更為深入淺出及較通俗淺顯易懂的白話敘事方式表達，以利理解。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.依報告相關格式調整，加入摘要。 2.依委員建議調整，撰寫淺顯易懂內容，應用於保育推廣。
作業課 (黃婉如)	<ol style="list-style-type: none"> 1.本案臺灣族群取樣的樣本數-新竹、苗栗各取 8 個，前於期初報告有部份委員針對取樣數量，有提出擔心不足具代表性之虞慮，惟本次分析已有初步結果，並獲審查委員認可，請受託單位應就前次委員之提問，於報告書內再針對取樣策略及取樣數量之代表性等予以補充說明回應。 2.本件計畫原規劃取樣 3 個日本個體(四國、北海道及伊豆半島)，惟僅四國、北海道樣本成功取樣分析，而就簡報第 16 頁「遺傳種質族群可移植區」內容已蒐集並參考相關文獻，將日本已知的 12 個榊櫟族群分析資料列出，請受託單位結合本次取樣與既有文獻資料進行探討，並就其材料的選擇與代表性進行說明，以論證取樣數之可效性。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.依委員建議於期末報告討論補充。 2.日本 12 個榊櫟族群，加上取樣四國、北海道樣本，可涵蓋日本榊櫟廣泛地理分布範圍，於期末報告討論補充。

附錄三、期末計畫審查會議紀錄

行政院農業委員會林務局新竹林區管理處

「臺灣榲欓族群遺傳多樣性分析計畫」

期末報告審查會議紀錄

- 一、 會議時間：111 年 12 月 14 日(星期三)下午 3 時
- 二、 會議地點：本處二樓會議室
- 三、 主持人：夏處長榮生 紀錄：黃婉如
- 四、 出席人員：詳簽到單
- 五、 報告事項：

(五) 榲欓是中國大陸及日本廣泛分布的物種，在臺灣僅分布於新竹和苗栗低海拔丘陵，《2017 臺灣維管束植物紅皮書名錄》中被評定為極危等級(CR)。2019 年以前僅見於新竹縣新豐鄉坑子口一帶丘陵地，係於 1924 年被日本學者島田彌市首次發現，隨後日籍植物學者金平亮三在他 1936 年出版的《臺灣樹木誌》詳實細述其位置與狀態，並提及此物種可能為中國引進栽培，但此論點並未有任何實際證據支持。而苗栗市的榲欓族群係於 2019 年被發現，位於苗栗市西側低矮丘陵的西北坡面，當地榲欓與楓香、相思樹、大葉桉、麻欓等人為栽植樹種混生，難憑野外觀察判定此榲欓族群是否為自然野生。透過林業試驗所執行本處委託轄內受威脅植物之短、中、長程保育行動與策略計畫，發現現存的榲欓成樹在民國 66 年即有明顯樹冠，可判定存活時間至少有 50 年以上。歷史航照顯示，苗栗市南勢坑一帶土地為農林鑲嵌使用，包含梯田、旱作（似茶作）、造林等，但榲欓成樹分布範圍僅有少數祖塔、墳墓等建物，並未觀察到明顯的砍伐後造林行為，推測此處榲欓應非大規模造林種植而來。若此處榲欓為自然生長的野生族群，將具有極高的保育價值。爰此，為獲取更充足的證據，俾利研擬後續生態保育及推廣策略，實有釐清臺灣的榲欓族群來源證明。

(六) 計畫目標及重要工作項目：

6. 完成榭櫟遺傳變異及多樣性分析，以瞭解臺灣的榭櫟遺傳變異與各族群之代表性。
7. 分析探討臺灣的榭櫟來源、新竹族群與苗栗族群差異，及其與中國大陸及日本族群在不同地理空間之遺傳多樣性差異。
8. 建構譜系資訊，分析探討臺灣、中國大陸及日本榭櫟的演化歷史。
9. 建立不同族群的條碼資訊，做為後續鑑定與保育的工具。
10. 就遺傳分析結果，針對本處轄內榭櫟之保育工作，提出策略與建議。

(七) 本案委託國立自然科學博物館辦理，契約編號：111-031，履約期間自 111 年 6 月 8 日起至 111 年 12 月 20 日止；本案業於 111 年 7 月 27 日、111 年 9 月 30 日召開期初、期中審查會議通過，並已完 2 期款項撥付。

(八) 依契約第五條及採購說明書第七點規定，廠商應於 111 年 11 月 30 日前繳交期末報告（內容應就實驗結果修正期中報告之評估初稿，並撰擬保育策略與建議），經機關審查通過後，撥付第 3 期款(新台幣 223,500 元整)。

六、 受託單位簡報：(略)

七、 委員及與會單位建議事項：如附表。

八、 會議結論：

- 甲、 本案期末報告會議審查通過，請國立自然科學博物館依據審查委員及與會單位意見辦理成果報告書修正，並依契約第五條規定於期末報告審查通過後 14 日曆天(111 年 12 月 21 日)內提交結案成果報告。
- 乙、 又本案已完成口頭論文發表(此為第 4 期應檢核事項)，爰於提交結案報告並經本處確認後，一併辦理第 3、4 期款撥付(總計新臺幣 298,000 元整)。

九、 散會(下午 4 時 30 分)

「臺灣榭櫟族群遺傳多樣性分析計畫」

期末報告審查會議紀錄-審查意見(依照發言順序記錄)

委員/與會 單位	審查意見	回應說明
王志強委員	<p>一、本案在有限的經費及時間，已經完成計畫目的及要求，對於各期審查意見亦作相關的回應與處理。</p> <p>二、文末的討論、結論及建議提供了具體的策略與方法，對於該物種之保育有重要的參考依據及價值。</p> <p>三、文內之圖表可適度加以放大，例如 p.16、圖五。</p> <p>四、期初、期中報告書之內容，建議可增加併入結案報告書內，以臻本案結果之脈絡及完整性。</p>	<p>一、感謝委員的肯定。</p> <p>二、感謝委員的肯定。</p> <p>三、結案報告依委員建議調整放大。</p> <p>四、結案報告依委員建議，加入相關內容。</p>
蘇夢淮委員	<p>一、本研究提出非常可信的證據支持臺灣榭櫟族群的原生性，提供林管處未來保育工作的厚實基礎，值得肯定。</p> <p>二、希望能提供林管處可操作的短、中、長期的保育策略建議，以及具體作法，譬如苗栗族群因位於私有地，風險高，短期應立即執行異地保育，且根據遺傳分析結</p>	<p>一、感謝委員的肯定。</p> <p>二、結案報告依委員建議，增列短、中、長期的保育策略建議。</p>

委員/與會單位	審查意見	回應說明
	<p>果，至少應採集多少個體(以上為舉例)。</p> <p>三、各項分析的目的與結果詮釋，需更大眾化，以利保育執行人員解讀。</p>	<p>三、結案報告依委員建議，加入相關的詮釋說明。</p>
胡哲明委員	<p>一、本研究結果清楚顯示臺灣的榭櫟族群在遺傳上和中國、日本的榭櫟族群有獨特之變異，因此有其保育上的價值。計畫最後也提出一些榭櫟之保育建議，希望未來主管單位能據此規劃。</p> <p>二、本計畫之主要分析序列為葉綠體基因組，未來如有機會也希望未來能持續進行細胞核基因組之分析，或是結合其他生態、生理不同領域研究臺灣的榭櫟。同時，希望未來能納入中國華南地區之榭櫟樣本併入分析，以釐清臺灣族群與之親緣關係。在計畫報告寫作上，仍有一點小缺失，希望補正：</p> <p>(一) 報告不少地方缺少或應調整引用文獻位置，如 p. 3 第二段，提及 San-Jose-Maldia et al.</p>	<p>一、感謝委員的肯定。</p> <p>二、結案報告依委員建議補正：</p> <p>(一) 調整及補充相關引用文獻。</p>

委員/與會 單位	審查意見	回應說明
	<p>(2017)的文章，應在第一句（第三至四行）第一次提到時就應引用，而不是到本段中後處。而 p. 4 第二段，提及草海桐科、莎草科研究處也無引用文獻。同頁倒數第二行，引用文獻 Pang et al. (2019) 年代有誤。</p> <p>(二) 圖表說明有時太過簡短，如表八(p. 17)，應改為「葉綠體基因組編碼區序列單核苷酸多型性變異比較」。圖六標題應改為「臺灣榭櫟葉綠體 rps16 編碼區序列之非同義突變」，並應在上方標註清楚位置。圖十七，改為「榭櫟與銳齒榭櫟根據 17 個 cpDNA 編碼區所建構的譜系樹。</p> <p>三、苗栗族群和新竹族群的整個葉綠體基因組的比較並沒有呈現，如苗栗序列多了四個 bp，應不只是圖九所示，似乎其他地方也有</p>	<p>(二) 調整及補充相關圖表說明。</p> <p>三、結案報告依委員建議，於此段落加入相關的詮釋說明。</p>

委員/與會 單位	審查意見	回應說明
	<p>indels。2.4–2.6 節的描述有些片斷，不容易閱讀，應該在 plastome 結果開頭有整體性的描述。</p> <p>四、第 35 頁第二段第二行，改為「在各自族群內已無遺傳變異」。</p> <p>五、圖十七，外群為何？如無外群，應以無根源樹(unrooted tree)表示。</p> <p>六、圖十八，為何未納入中國樣本單倍型網狀圖分析？</p> <p>七、圖一缺少引用文獻（是否為 Pang et al. 2009?）。此外，本計畫結果所得到栓皮櫟葉綠體基因組其實是目前所知殼斗科物種最小的（161,066 bp），此也可以特別提到。</p> <p>八、建議報告有個小結或結論在討論章節之後，方便閱讀者瞭解。</p>	<p>四、結案報告依委員建議修改。</p> <p>五、結案報告依委員建議，以無根源樹呈現及說明。</p> <p>六、中國樣本單倍型已於表十六-十九比對呈現，結案報告依委員建議，再加入說明。</p> <p>七、結案報告依委員建議，加入補充說明。</p> <p>八、結案報告依委員建議，加入章節的結論說明。</p>
劉景國委員	<p>一、從大尺度來看苗栗與新竹其地理位置相近，就葉綠體基因組序列分析結果族群內基因無變異，但族群間有變異，因此在保育對策建議應視為 2 個不同保育單位，</p>	<p>一、物種的天然分布，是經自然環境篩選的結果，將兩族群進行雜交的後代是否更佳的生長優勢？需有相關的實驗結果來推斷；加入此部分說明，列於長期保育建</p>

委員/與會單位	審查意見	回應說明
	<p>但有無可能進行2族群間基因交流，增加基因多樣性，在後續在復育上可更適合臺灣的環境?</p>	<p>議內容。</p>
<p>夏榮生委員</p>	<p>一、 本案報告書 p.34 針對臺灣的榭櫟是否為大陸引進栽種乙節，敘明非近代人為由中國引進栽種，惟於同頁倒數第 3 行又提及無法排除近期由中國引進栽種之可能性，就書面文字易讓人混淆產生爭議，請重新梳理說明。</p> <p>二、 利用不同分析方法進行基因組變異測試，請再用較為淺顯易懂的文字說明，以利解讀；不同分析方法間有無判定基準、原則或容許程度，請再補充。</p> <p>三、 如循本案保育策略建議，在種源地域限制之前提下，倘擇選相對應區位的公有土地推廣栽植是否可行?例如從南部的林管處或學校著手推廣。</p> <p>四、 另，是否建議從景觀園藝推廣角度著手?</p> <p>五、 本案計畫極具科普推廣</p>	<p>一、 結案報告依委員建議，重新整理說明。</p> <p>二、 結案報告依委員建議，進行相關的補充說明。</p> <p>三、 基於趙偉村老師團隊已執行於公有地進行新竹榭櫟的復育推廣的成果，相對應的土地區域選擇說明，增列於結案報告中。</p> <p>四、 榭櫟適合以綠美化及保育兼具樹種進行推廣，相關建議增列於結案報告</p>

委員/與會 單位	審查意見	回應說明
	<p>性，得否請科博館就目前計畫成果整合生態學等面向資料撰擬科普文章，並提供予林管處做為發布新聞稿相關素材？</p>	<p>中。</p> <p>五、依委員建議，後續撰寫科普文章內容，提供推廣運用。</p>
<p>作業課(業務單位)</p>	<p>一、本件目錄表建議可增加表目錄、圖目錄。</p> <p>二、依目前的保育策略建議，新竹種源應種植在新竹以北的區域，苗栗種源應種在苗栗以南的區域，以保有目前兩族群的遺傳變異，因此在有種源地域限制的前提下，榲櫟顯無法當作一般臺灣原生樹種或綠美化樹種進行推廣，因此就目前研究發現，建請提出實際可以應用策略及具體作法，例如保種或建議復育造林的規劃。</p> <p>三、本報告內文請再重新檢視錯漏字等，例如錯字 p.36 「易」地→「異」地、p.41 範「園」→範「圍」；贅字 p.42 「來」來源、「採用對」等。</p> <p>四、本案部分成果於 111 年度中華林學會進行口頭論文</p>	<p>一、依此建議加入表與圖的目錄資訊。</p> <p>二、基於趙偉村老師團隊已執行於公有地進行新竹榲櫟的復育推廣的成果，相對應的土地區域選擇說明，增列於結案報告中。</p> <p>三、依相關建議修正。</p> <p>四、依此建議，於結案報告加入補充資訊。</p>

委員/與會 單位	審查意見	回應說明
	發表，此部執行情形請於 結案報告內補充，及提供 相關資料及報告摘要。	



森林生態組口頭發表程序表

10月28日(星期五)

序號	發表編號	報告時間	題目	作者
1	O12-S3-1	10:00-10:15	森林共生真菌資源：台灣三種松科特有種林木之外生菌根真菌多樣性	劉人丞、汪碧涵
2	O12-S3-2	10:15-10:30	臺東縣東河鄉都蘭地區野溪治理友善工程施作成效追蹤	余思妤、魏浚紘、黃上權
3*	O12-S3-3	10:30-10:45	苗栗新川里槲櫟族群生態研究	楊濟綱、王志強、錢易忻、楊翊
4*	O12-S3-4	10:45-11:00	以地上部植生特性資料精進臺灣天然林淺層崩塌預測模型之可行性	楊建宏、宋國彰、許凱岐、張勵婉
5*	O12-S3-5	11:00-11:15	臺灣槲櫟族群的遺傳多樣性	趙偉村、林奐宇、黃婉如、何佳芳、黃俊霖
6*	O12-S3-6	11:15-11:30	是忘了還是不願想起：草原景觀的最後踏查	范素瑋、鐘詩文、許天銓、林建融
7*	O12-S3-7	11:30-11:45	台灣東北部封閉型森林濕地崙埤池十一年的生態監測	毛俊傑、陳子英
8*	O12-S3-8	11:45-12:00	六龜試驗林義大利蜂與東方蜂生態探究	范義彬
9*	O12-S3-9	12:00-12:15	瑪家鄉森林植群生態多樣性與現況分布	錢易忻、林家榮、高裕閔、葉慶龍、陳建璋
10*	O12-S3-10	12:15-12:30	5種原生地被植物在宜蘭員山內城社區的生長表現	李俊緯、董景生

備註：

1. 每位報告人所使用之時間為 15 分鐘，其中口頭報告 10 分鐘，問題詢答 5 分鐘
- 2.*：教師及研究人員組。

口頭發表-森林生態組(教師、研究人員)

臺灣榲欖族群的遺傳多樣性

趙偉村¹、林奐宇²、黃婉如³、何佳芳⁴、黃俊霖^{4*}

¹ 國立嘉義大學森林暨自然資源學系。600355 嘉義市鹿寮里學府路 300 號。

² 行政院農業委員會林業試驗所。100051 臺北市中正區南海路 53 號。

³ 行政院農業委員會林務局新竹林區管理處。300191 新竹市北區中山路 2 號。

⁴ 國立自然科學博物館生物學組。404023 臺中市北區館前路 1 號。

* 通訊作者，wagtail@mail.nmns.edu.tw

摘要

榲欖(*Quercus aliena*)分布於日本，韓國，中國及臺灣，目前臺灣僅有新竹及苗栗兩族群。為了瞭解榲欖於臺灣以及與其他國家的遺傳分化狀況，本研究藉由基因組略讀的方法，建構臺灣兩個族群各 8 個個體的完整葉綠體基因組序列，並與中國及日本榲欖葉綠體基因組進行比對。結果顯示臺灣新竹及苗栗的榲欖葉綠體基因組序列長度分別為 161,263 bp 及 161,267 bp，在族群內並無變異。以兩族群進行比對，在 *atpF* 內插子及 *ndhJ-ndhK* 間有序列缺失的變異，造成兩基因組序列長度差異；並在 *petA* 蛋白質編碼區有非同義突變及在 *rpoB-petN* 間有單核苷酸多型性。蛋白質編碼區的非同義突變會涉及到基因功能的改變，為相對少有的突變形式，由兩個族群在葉綠體基因組的多個變異，推論為經歷一段時間分化所累積的結果。而在與中國及日本的差異上，以葉綠體 79 個蛋白質編碼區序列的資訊進行比對，臺灣的榲欖在 *rps16* 及 *rpoC2* 蛋白質編碼區有獨特的非同義突變；而其單核苷酸多型性總計有 73 個位點，臺灣族群與中國及日本間有 8 個以上的單核苷酸多型性差異；加上在內含子及基因間多樣的變異，都支持臺灣的榲欖為自然分布族群，非近代人為由中國或日本引進栽種。這些榲欖遺傳變異的資訊，將有助於後續榲欖保育相關策略的擬定。

關鍵字：榲欖，次世代定序，遺傳資源保育