

國立台灣師範大學生命科學系博士論文

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨之親緣地理及生殖生物學研究

The study of phytogeography and reproductive biology of  
*Woodwardia harlandii* Hook. and *W. kempii* Copel.

研究生：張和明  
Ho-Ming Chang

指導教授：王震哲 博士  
Jenn-Che Wang

邱文良 博士  
Wen-Liang Chiou

中華民國九十八年七月



國立臺灣師範大學生命科學系博士論文通過簽名表

系所別：生命科學系（研究所）

姓名：張和明 學號：889430022

博士論文題目：哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨之親緣地理及生殖生物學研究

經審查合格，特予證明

論文口試委員

林讚揚 林讚標 博士  
國立臺灣大學植物科學研究所教授

邱文良 邱文良 博士  
農業委員會林業試驗所副研究員

蔣鎮宇 蔣鎮宇 博士  
國立成功大學生命科學系教授

黃士穎 黃士穎 博士  
國立臺灣師範大學生命科學系教授

王震哲 王震哲 博士  
國立臺灣師範大學生命科學系教授  
論文指導教授

系主任（所長）簽章：張永達

中華民國 98 年 7 月 27 日



## 國立臺灣師範大學學位論文授權書

本授權書所授權之論文為授權人在國立臺灣師範大學生命科學系（所）  
97 學年度第二學期取得博士學位之論文。

論文題目：哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨之親緣地理及生殖生物學研究

授權事項：

一、 授權人同意非專屬無償授權本校及國家圖書館將上列論文資料以微縮、數位化或其他方式進行重製，並可上載網路收錄於本校博碩士論文系統、國家圖書館全國博碩士論文資訊網及臺灣師範校院聯合博碩士論文系統，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、瀏覽、下載、傳輸、列印或複印等利用。

二、 論文全文電子檔上載網路公開時間：

自 2011 年 7 月 1 日始公開。

授權人姓名： 張 和 明 (請親筆正楷簽名)

學 號： 889430022

---

註：1. 本授權書須列印並簽署兩份，一份裝訂於紙本論文書名頁，一份繳至圖書館辦理離校手續。  
2. 授權事項未勾選者，分別視同「同意」與「即時公開」。

中 華 民 國 98 年 7 月 27 日



# 目 次

中文摘要	i
英文摘要	iv
第一章 緒言	1
第二章 哈氏狗脊蕨複合種群之系統分類學研究	13
壹、前言	13
貳、研究材料及方法	15
參、結果與討論	23
肆、結論	41
伍、參考文獻	42
第三章 哈氏狗脊蕨複合種群之生殖生物學研究	45
壹、前言	45
貳、研究材料及方法	48
參、結果與討論	50
肆、結論	55
伍、參考文獻	56
第四章 以同功異構？探討哈氏狗脊蕨複合種群族群遺傳變異	60
壹、前言	60
貳、研究材料及方法	62
參、結果與討論	64
肆、結論	76
伍、參考文獻	77
第五章 以葉綠體 DNA 片段序列進行哈氏狗脊蕨複合種群親緣地理學研究	81
壹、前言	81

貳、研究材料及方法	83
參、結果與討論	90
肆 結論	103
伍 參考文獻	105
第六章 總結	110
第七章 未來展望	113
謝誌	114
附錄一、 葉綠體 <i>atpB-rbcL</i> IGS 單套基因型序列原始資料矩陣	115
附錄二、 葉綠體 <i>trnS-rps4</i> IGS 單套基因型序列原始資料矩陣	124
附錄三、 細胞核 <i>pgiC</i> intron 14-15 單套基因型序列原始資料矩陣	129

## 中文摘要

哈氏狗脊蕨 (*Woodwardia harlandii* Hook.) 及細葉狗脊蕨 (*W. kempii* Copel.) 為烏毛蕨科 (Blechnaceae) 狗脊蕨屬 (*Woodwardia*) 植物，兩者除葉片形態特徵不同外，無其他顯著差異，而其生態習性雷同及地育地重疊性高等現象，使得此二物種的分類關係一直具有爭議。因此本研究首先針對地理分布、物候現象、細胞學資料與分子遺傳證據進行系統分類學研究，以釐清其系統演化關係。生物的配育系統會影響物種族群內與族群間的遺傳組成，甚至整個物種的演化，因此在進行族群遺傳多樣性與親緣地理學研究之前，先針對台灣產哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨材料進行生殖生物學觀察與試驗，以明瞭其生殖行為與配育系統。最後以同功異構？電泳分析法與植物葉綠體 DNA 進行族群遺傳多樣性與族群間遺傳變異分布結構之分析，重建種內族群間地理親緣關係與評估族群在地質歷史過程的遷移路線，並檢測不同的地理遷移模式假說。細胞學證據顯示，除了中國大陸廣東省新會地區之哈氏狗脊蕨族群為二倍體外，其餘檢測的哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群皆為四倍體，而根據其核基因片段組成基因型的差異性，推測這些四倍體族群皆為異源四倍體 (allotetraploid)。除了地理分布或生育環境都高度重疊，共域分布的四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨更具有一致的物候現象。細葉狗脊蕨在葉綠體與細胞核基因片段均與共域分布的哈氏狗脊蕨有一致的單套基因型，顯示此二種外型不同的類群在遺傳組成上並無差異，而兩者除了葉片分裂型式差異外，其他證據都顯示其並非獨立的分類群。相對地，二倍體的哈氏狗脊蕨與其他四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨之間在地理分布、染色體倍體性與分子證據都具有明顯區隔，顯示二倍體哈氏狗脊蕨是可與四倍體的哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨區分的不同生物種。因此哈氏狗脊蕨複合種群實包括二倍體的哈氏狗脊蕨與四倍體的哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨。台灣產四倍體哈氏狗脊蕨複合種群配子體發育類型

屬於「三叉蕨型」，成熟配子體以單性配子體為主，雌配子體先熟，雌雄配子體發育成熟時間差距達 3 週，推測四倍體哈氏狗脊蕨複合種群之配子囊個體發生行為有利於異配子體交配，而雌配子體附近小型配子體短時間發育成雄配子體並具有大量藏精器，推測此複合種群具有促精素系統，藉此促進異配子體交配。同功異構？電泳分析結果顯示二倍體哈氏狗脊蕨族群的基因座平均對偶基因數明顯高於四倍體類群，推測可能原因為大陸廣東新會一帶為上次冰期極盛時祺廣大族群退縮之避難所，因此保留較多的遺傳多樣性。此外，二倍體類群同質合子比例偏高，推測應是華倫得效應 (the Wahlund effect) 所造成。四倍體哈氏狗脊蕨複合種群對偶基因頻率多形成固定模式，推測應是此多倍體類群是異源四倍體，而多數基因座上固定之異質配對對偶基因則使得四倍體族群內異質合子比例偏高。利用族群間遺傳相似度進行群叢分析，四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群間 I 值高達 0.919 以上，遠高於蕨類植物種內族群間之最小 I 值，因此推論四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨應為同種，而同地區四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群總是擁有近似的對偶基因頻率，亦支持此推論。哈氏狗脊蕨複合群中二倍體類群的葉綠體 DNA 核? 酸歧異度 ( $p=0.00108$ ) 高於整體四倍體類群 ( $p=0.00072$ )，而二倍體類群單套型歧異度 ( $h=0.797$ ) 亦顯著高於四倍體類群 ( $h=0.294$ )。二倍體類群之 9 種基因型呈現星狀之譜系關係，且具有較高的單套基因型歧異度與較低的核? 酸歧異度，顯示大陸廣東省新會一帶之二倍體族群有近期族群快速成長與分布範圍擴張現象。以  $G_{ST}$  及  $N_{ST}$  檢測族群間遺傳分化，結果顯示哈氏狗脊蕨複合群、四倍體哈氏狗脊蕨複合群、四倍體哈氏狗脊蕨與二倍體哈氏狗脊蕨等四群之群內族群間都具有明顯的遺傳分化，且其  $N_{st}$  與  $G_{st}$  值都具有顯著差異，顯示各群內族群間都具有明顯的親緣地理結構。15 種葉綠體單套基因型中大陸廣東新會一帶之二倍體族群具有 9 種單套基因型，其中 8 種更是侷限分布於此，推測此地

區是二倍體類群長期之避難所。大陸南嶺及海南島地區族群同時都具有兩群序列差異頗大的基因型，其可能為最後一次冰期以來其他地區族群擴散之溶匯點 (melting point)，因此都具有較高之核 DNA 歧異度。台灣烏來地區為另一可能之避難所，根據所擁有之 2 單套基因型與葉綠體非編碼區突變率推算，此地區族群可能在最近一次冰期開始前即已存在。本研究所使用之 DNA 序列證據並不支持 Cranfill 之異地種化再共域分布之族群遷徙假說，而核 DNA 單套基因型部分地區的地理變異則對本研究所主張之由北向南多路線族群遷徙假說提供部分的支持。

## 英文摘要

*Woodwardia harlandii* Hook. and *W. kempii* Copel. are two *Woodwardia* species of Blechnaceae. They have no distinct difference in morphology excepting the division of fronds. The systematic relationship between them is a controversial issue until now because of their similar ecology and sympatric distribution. We first implement the systematic study, by distribution pattern, phenological observation, cytological data and molecular evidences, to find their phylogenetic relationship. Mating systems would determine the infraspecific genetic contents and evolutionary process of a species. Therefore, the reproduction study of these two species was conducted, before the population genetic and phylogeographic studies proceeding, to have insight into the reproductive mode and mating system. Finally, genetic diversity and genetic structure of populations are studied by allozyme analysis and chloroplast DNA sequence to find the genetic relationship among populations, to infer the migration route in the geological history, and to test the different hypotheses of geographic distribution and transition of population. Cytological results show that all populations detected are tetraploid but the two ones, which are diploid, at Hsinhui in Guangtung Province of China. According to the distinction between the nuclear haplotypes, these polyploidy taxa are determined as allotetraploid. Addition to sympatric distribution and similar habitats, the phenology is identical for the tetraploidy *W. harlandii* and *W. kempii* living in the same habitat. Although having different division of fronds, these two species living sympatrically show the same genetic contents in both nuclear and chloroplast genes. All characters excepting morphology indicate that, without essential difference, they are not 'good' species. On the other hand, the results of distribution information, cytological data and molecular evidences indicate that diploidy *W. harlandii* and tetraploidy *W. harlandii* and *W. kempii* belong to two different biological species. Therefore, the *W. harlandii* species complex

comprises diploidy *W. harlandii* and tetraploidy *W. harlandii* and *W. kempii*. The prothallial development is *Aspidium* type. Almost all the gametophytes are unisexual, in which the female ones reach mature 3-week earlier than the males. The sexual progression of the gametophytes promotes the intergametophytic mating in tetraploidy *W. harlandii* complex. The observation that lots of small-size gametophytes nearby the female one become male and bear numerous antheridia in a short period indicates this complex producing antherridiogen to favor cross-fertilization. The results of allozyme analysis show that the diploidy *W. harlandii* complex has much higher mean number of alleles per locus than the tetraploids. The interpretation for this high value is that the population maintains significantly high genetic diversity because it was a refugium at Hsinhui in the last glacial period. The population there, however, has relatively high proportion of homozygotes. It might be the outcome of the Wahlund effect. Allele frequencies for the populations of tetraploid *W. harlandii* complex usually become fixed pattern. These taxa should be allotetraploids and have high proportion of heterozygotes within the populations because high percentage of fixed- and heterozygous-allele loci. The genetic identity of I is less than 0.919 between the populations of the tetraploidy *W. harlandii* and *W. kempii*, which is much higher than the mean genetic identity among the populations of the same species. The result of this UPGMA analysis consists with the argument that the tetraploidy *W. harlandii* and *W. kempii* should be the same species. Additionally, the fact that sympatric populations of these two tetraploids always have similar allele frequencies at most loci also supports the above argument. In *W. harlandii* species complex, diploidy taxon have higher nucleotide and haplotype diversities ( $p=0.00108$ ,  $h=0.979$ ) of chloroplast DNA than those of tetraploidy taxa ( $p=0.00072$ ,  $h=0.294$ ). In the diploidy taxon, the lineage relationship of its nine haplotypes shows a star-like pattern. In addition, this taxon has high haplotype diversity but low nucleotide diversity. These results indicate the populations at Hsinhui grow rapidly and experience a recent range expansion.

The  $G_{ST}$  and  $N_{ST}$  indices of genetic differentiation indicate the populations of four groups of diploidy *W. harlandii*, tetraploidy *W. harlandii*, tetraploidy *W. harlandii* complex, and *W. harlandii* complex all show significantly genetic differentiation. The  $G_{ST}$  significantly higher than  $N_{ST}$  in all four groups indicates the populations of these four groups all show obviously phylogeographic structure. The diploidy populations at Hsinhui have nine ones, in which eight are endemic, of total 15 cpDNA haplotypes. Therefore, it is proposed that Hsinhui is a long-term refugium for diploidy taxon. The cpDNA haplotypes of the populations in Nanling Mountain Ridge and Hainan Island both include two groups of highly variant sequences. It may be the effect of melting point after the last maximum glacial period that there are high nucleotide diversities in both areas. According to the mutation rate at the noncoding region of cpDNA, Urai in Taiwan might be another candidate for refugium. The Urai populations having two haplotypes might exist before the last maximum glacial period. The hypothesis of Cranfill about migration pattern of historical populations is rejected by the molecular evidences in this study. However, the hypothesis of multiple migration routes directly from the north to the south proposed in this study is partially supported by nuclear DNA.

## 第一章 緒言

台灣島垂直海拔落差大，地形地貌複雜，加以位處熱帶與溫帶交會的亞熱帶，因而孕育了多樣的生物種類。台灣島因菲律賓海板塊碰撞歐亞大陸板塊而產生，至今仍持續隆起長高。目前台灣與亞洲大陸間雖有台灣海峽阻隔，然而在第四紀以來重複發生的冰期—間冰期循環中，台灣島時而與大陸相連結(冰期)，時而因海平面上升而與亞洲大陸分隔(間冰期)。冰期時，台灣島西部常是全面地與大陸相連接，甚至以陸橋方式串連至琉球群島，因此冰期時生物可以自由地遷徙於此擴張的亞洲大陸地區。最後一次冰期冰河開始撤退後(大約距今二萬年前)，全球氣溫逐漸回升，海平面上升造成這些與大陸相連接的島嶼再次各自獨立，而成為今日所見的地理樣式，生物族群亦因為海洋水位上升而隔離。台灣屬於大陸性島嶼，島內多數生物與亞洲大陸都具有密切的關係，或為同種，或為關係極為密切的近緣種，因此探討台灣與亞洲大陸生物的關係，特別是同時分布於台灣、大陸及其他鄰近亞洲地區的物種或近緣種的族群關係，有助於釐清過往地質歷史對於物種演化與地理族群播遷過程的影響。

生物的地理分布模式是由許多因子相互作用所建立的，這些因子一般可歸類為生態與歷史兩大部分(Barrington, 1993)，其中歷史因素包括兩種不同的作用機制：散播(dispersal)與片段化(vicariance) (Kato, 1993; Avise, 2000)，這兩者在物種演化歷史上具有不同權重的影響。植物生育地範圍的拓殖需靠種子或孢子的散播，而隔離機制(isolating mechanism)的形成則阻隔基因流傳，並產生遺傳分化，進一步可能發生種化作用(Avise, 2000; Coyne & Orr, 2004)。因此欲測試某一特定分布模式究為上述二機制中何者所造成，或其發生先後順序，可藉由分析近緣種或同種不同地理族群的遺傳變異、基因型差異與族群分化程度推估 (Crawford et al., 1992; Cain et al., 2000)，而根據溯祖理論 (coalescent theory) 仔細探究基因型在譜系關係樹

的分布，即可推估形成族群現今結構或分布模式可能的過往演化事件或過程（Page and Holmes, 1998）。

親緣地理學為 Avise 等( 1987 )所提出有關歷史性生物地理學( historical biogeography ) 的觀念，主要在探討物種的演化與地質歷史之間的關係。親緣地理學與傳統地理學的差異在於後者通常重視較高分類群的地理分布，但親緣地理學的研究雖不排除高階分類群的探討，但主要的研究對象則是來自共同歷史起源的近緣物種及種內族群間的關係，並藉由不同族群間的遺傳變異，分析探討現今物種分布模式的形成機制。因此親緣地理學的研究被視為族群遺傳（或稱微演化（microevolution））與種化（或稱巨演化（macroevolution））之間的橋樑（Bermingham and Martin, 1998; Avise, 2000）。近年累積的研究結果顯示，分子生物學技術提供了研究物種親緣關係與生物地理分布的定量分析方法（Lee et al., 1996; Huang and Chen, 2000; Chiang et al., 2001; Huang et al., 2001; Lin et al., 2002; Liu et al., 2002），其中具有保守特性的同功異構？雖然會造成所獲得遺傳變異偏低（Bossart and Prowell, 1998），但其電泳分析結果可以提供基因體規模的遺傳資訊，以了解植物遺傳結構與配育系統（Paris and Windham, 1988; Soltis and Soltis, 1990），並可探究多倍體物種的起源過程（Hauk and Haufler, 1999）。越來越多基因體 DNA 的非轉錄區（noncoding region）序列在近幾年被廣泛應用在獲得族群遺傳變異及系統發育訊息（Clegg et al., 1994; Demesure et al., 1996; Huang et al., 2001），一般認為此類 DNA 區域因無功能限制，具有自由變異與快速演化特性，可提供足夠演化訊息，因而適合於評估物種傳播能力，及在地質歷史過程的遷移路線（Ferris et al., 1995; Small et al., 2005）。

蕨類植物藉由孢子進行長距離的傳播，由於其孢子體與配子體彼此皆可獨立存活，所以生活史中此兩種不同階段的生物學性質與蕨類植物的地理分布都有關連（Kato, 1993）。蕨類植物擁有不同於裸子植物與被子植物

獨特的散播與配育系統 ( mating systems ), 使其遺傳系統與演化潛力不易全面地瞭解, 造成在物種遺傳與演化理論基礎的發展遭遇較多的困境 ( Haufler, 2002 ), 但如此獨特的生物學特性卻也使得蕨類植物成為親緣地理學研究上極佳之題材。蕨類植物配子體階段不同的配育系統除了影響族群遺傳組成的變異度外, 對於物種族群的分布與擴散更扮演關鍵性角色, 因此有關蕨類植物的生殖生物學 ( reproductive biology ) 研究, 是探討不同蕨類植物族群遺傳組成模式差異的重要基礎資料。此外, 蕨類植物的配育系統亦與染色體倍體性 ( ploidy ) 有關, 近年來的研究結果顯示, 二倍體物種傾向於異配子體交配, 且具有較高的遺傳負荷, 多倍體物種則傾向於同配子體自交, 並具有較低的遺傳負荷( Masuyama, 1979; Hedrick, 1987; Masuyama et al., 1987; Masuyama and Watano, 1990; Chiou et al, 2000 ), 因此傾向於同配子體自交的多倍體孢子似乎遠比二倍體孢子有利於長距離散播並建立新族群 ( Ranker et al., 1994; Haufler, 2002 ), 這也為海洋性島嶼具有較高比例蕨類植物 ( Smith, 1972 ) 提供一合理解釋。

台灣位於亞洲大陸東緣的樞紐位置, 常為植物播遷的中途站, 因此匯集了不同地理區的植物種類, 此為台灣島內蕨類植物物種密度與種歧異度均甚高的因素之一 ( 郭城孟, 1998 )。烏毛蕨科 ( Blechnaceae ) 分布在台灣的種類數雖然僅 11 種, 然卻包含了 5 個屬 ( Chiou et al., 1994 ), 其中以狗脊蕨屬 ( *Woodwardia* ) 物種數最多 ( 5 種 )。化石記錄顯示烏毛蕨科狗脊蕨屬植物具有典型的第三紀泛北極區系分布模式( Arcto-Tertiary pattern; Cranfill, 2001; Collinson, 2001 ), 最早的狗脊蕨屬化石記錄可回推至第三紀之古新世 ( Paleocene; Collinson, 1996; 2001 )( 圖 1-1 ), 甚至中生代白堊紀 ( Cretaceous ) 晚期 ( 陶君容, 1992 ), 分布地點皆於環北極地區 ( circum-Arctic paleolatitudes ), 當時之氣候狀態為平穩的溫暖潮溼氣候, 而自第四紀漸新世 ( Oligocene ) 及中新世 ( Miocene ) 後之氣候變動( Comes

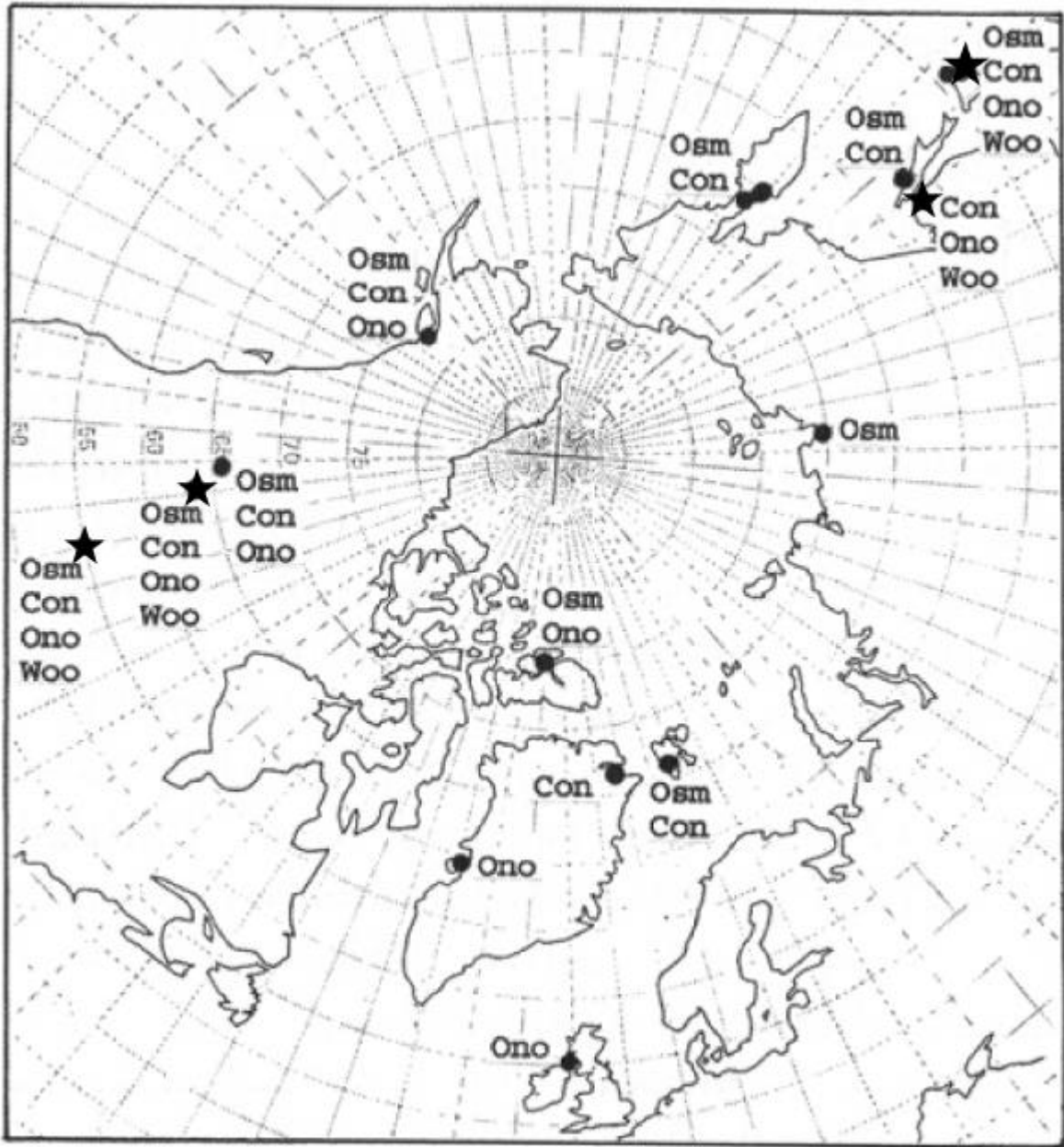


圖 1-1、狗脊蕨屬植物第三紀化石分布（改自 Collinson, 2001）。圖中包括紫萁屬 *Osmunda*(Osm)、冷蕨屬 *Coniopteris*(Con)、球子蕨屬 *Onoclea*(Ono) 及狗脊蕨屬 *Woodwardia*(Woo) 等四屬，其中狗脊蕨屬分布地點以星號標明。

& Kadereit, 1998 )，與中新世晚期之氣候逐漸變冷涼，環北極地區逐漸轉變成乾冷氣候而不再適合狗脊蕨屬植物的生存，促使其逐漸向南遷徙，加上期間所可能發生的物種滅絕事件，而使原有或多或少的連續性分布模式變成片段化。許多東亞-北美間斷分布 (disjunctive distribution) 的屬或種

對都具有類似的形成過程 ( Guo, 1999; Liu *et al.*, 2002 ), 如蕨類植物中的球子蕨屬 ( *Onoclea* ) 紫萁屬 ( *Osmunda* ), 裸子植物中的銀杏屬 ( *Ginkgo* )、落葉松屬 ( *Taxodium* )、長葉世界爺屬 ( *Sequoia* )、水杉屬 ( *Metasequoia* ), 以及被子植物中的木蘭屬 ( *Magnolia* )、鵝掌楸屬 ( *Liriodendron* ) 及檫樹屬 ( *Sassafras* ) 等都具有此類型分布模式 ( 陶君容, 1992; Collinson, 2001 )。現存狗脊蕨屬植物的分布式樣基本上符合東亞-北美間斷分布模式 ( Cranfill & Kato, 2003 ), 其中除了二種 ( *W. auriculata* 及 *W. unigemata* ) 向南分布至南半球舊熱帶地區 ( paleotropical regions ) 外, 其餘均以北半球溫帶及亞熱帶地區為其主要分布範圍, 其中歐洲有 1 種, 北美洲產 4 種, 而東亞及東南亞一帶則有 7 種 ( Cranfill & Kato, 2003 )。東亞及東南亞一帶為現存狗脊蕨屬植物物種密度最高、分布最集中的地區, 故大陸學者裘佩熹 ( 1974 ) 曾主張中國為本屬的分布中心, Cranfill ( 2001 ) 則認為東亞及北美同為多樣性中心, 而造成此種不同地理區域種數的差異應是第四紀以來冰河循環作用, 與板塊上不同山脈走向所造成 ( Guo, 1999 )。

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨是台灣產 5 種狗脊蕨屬蕨類植物之其二, 一度因形態上與北美產的 *Lorinseria areolata* ( L. ) Presl 相似而置於 *Lorinseria* 屬中 ( Smith, 1875 ), 或一起組成狗脊蕨屬內 *Lorinseria* 亞屬 ( Cranfill, 2001 ), 然而綜合形態特徵與葉綠體 DNA 證據深入分析後 ( Cranfill & Kato, 2003 ), 結果證實哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨仍是關係最親近的姊妹群, 而與 *Lorinseria areolata* 系統演化關係則甚遠。哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨分布範圍自日本南部, 經琉球群島、台灣、中國大陸東南沿海省分至越南北部、泰國東北 ( Chiou *et al.*, 1994; Iwatsuki, 1995; Boonkerd & Rossarin, 2004 ), 為東北西南方向的帶狀分布, 兩者的地理分布範圍基本上重疊, 而雖然細葉狗脊蕨分布地點較少, 但其多數生育地都與哈氏狗脊蕨共域分布。Cranfill ( 2001 ) 曾針對具有相同生態需求與近似地理分布模式的哈氏狗脊蕨及細

葉狗脊蕨此一種對，提出了「異地種化再共域分布」的假說，即來自共同祖先種的不同族群分別在大陸地區（*W. harlandii*）與島嶼地區（*W. kempii*）種化，爾後再散佈至彼此生育地，形成今日之分布模式（圖 1-2）。Cranfill 的假說顯與一般所認知大陸性島嶼的生物種類來自鄰近大陸的觀念不同，而若此假說成立，則哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨分別擁有方向相反的族群地理親緣關係。

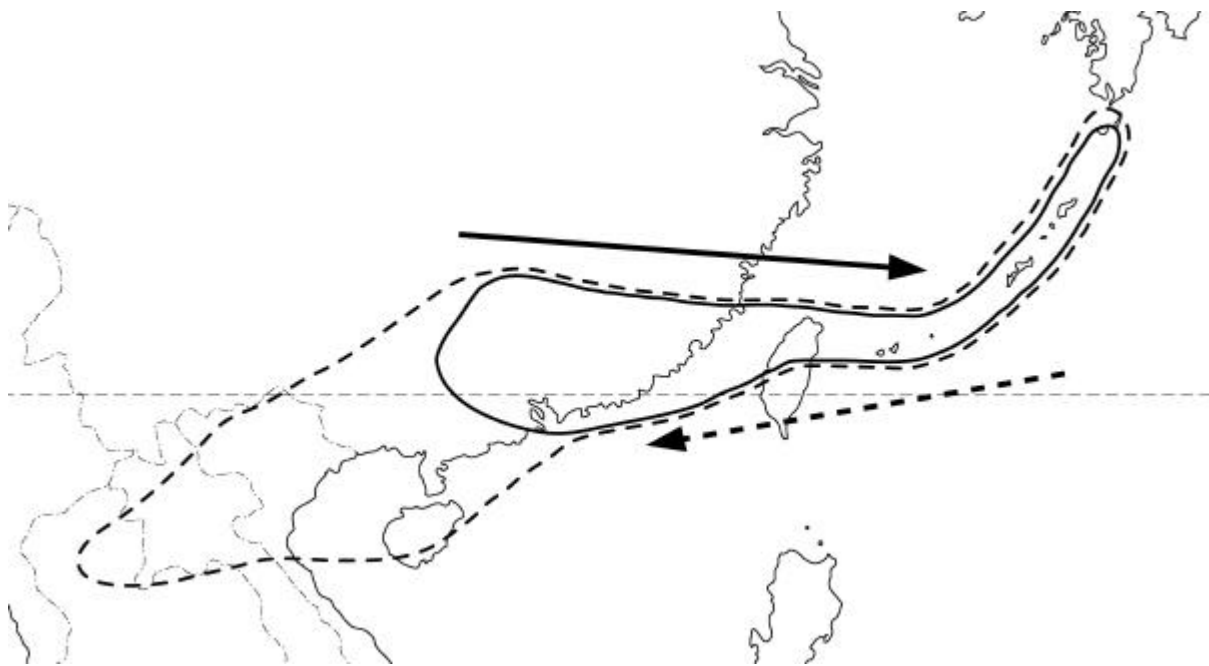


圖 1-2、Cranfill(2001)異地種化再共域分布假說示意圖。實線表示細葉狗脊蕨分布範圍，虛線表示哈氏狗脊蕨分布範圍，實線箭頭表示哈氏狗脊蕨族群的擴散方向，虛線箭頭則表示細葉狗脊蕨族群的擴散方向。

狗脊蕨屬植物第三紀的化石紀錄分布於環北極區，根據此歷史分布模式與現今地理分布範圍，本研究認為不管哈氏狗脊蕨或細葉狗脊蕨都是在今日更北的地理區域種化形成後，再隨著氣候的改變而多路線地逐漸向南遷移至接近現在的分布範圍（圖 1-3），第四紀以來的冰期循環雖然會造成其分布範圍之波動，然推測其皆屬較短距離之族群擴展與退縮，不致於對此二物種整體分布模式有顯著改變。此假說若成立，則哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨不同地理區族群之遺傳距離遠大於同一地理區內族群之遺傳距離。

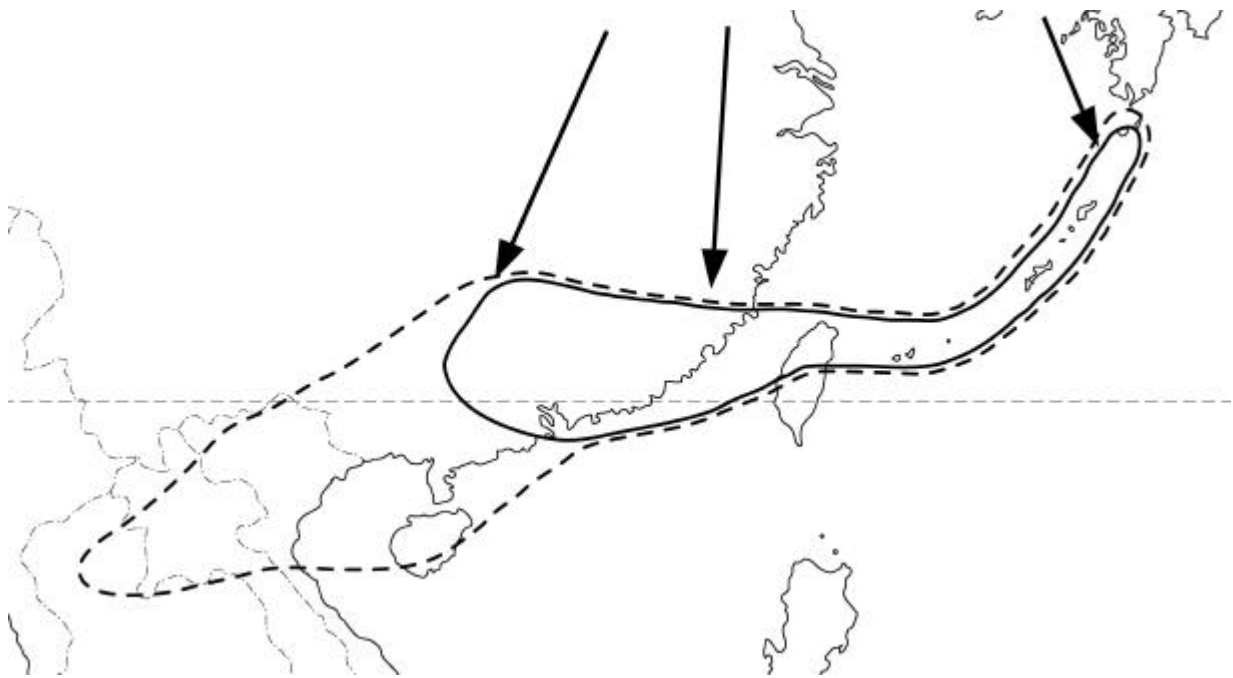


圖 1-3、本研究針對哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨分布所提出由北向南遷移假說示意圖。實線表示細葉狗脊蕨分布範圍，虛線表示哈氏狗脊蕨分布範圍，實線箭頭表示哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群的擴散方向。

根據野外的觀察結果顯示，哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨在台灣僅分布於北部低海拔山區 500 至 700 公尺海拔範圍，其均喜好生長於小稜脊或近稜脊邊坡的林緣地帶，通常出現於山徑兩旁，陰暗的林下地被層偶見其蹤跡，惟生長情形較不佳，生育地林分大多為長尾栲、紅楠及山红柿等優勢的暖溫帶常綠闊葉林。哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨形態特徵除了葉片羽裂方式不同外，並無其他差異，加以其生態習性雷同及地育地重疊性高等現象，此二物種的分類關係一直具有爭議，因此本研究首先針對其形態學以外特徵，即地理分布、物候現象、細胞學資料與分子遺傳證據進行系統分類學研究，希望能釐清此二狗脊蕨之系統演化關係。

許多生物學的特徵會影響物種族群內與族群間的遺傳組成，甚至整個物種的演化，其中生物的配育系統 ( mating system ) 扮演關鍵性的角色 ( Lowe et al., 2004 )，其決定族群內與族群間基因交流的幅度。因此欲探討特定物

種現今的族群分布模式與遺傳組成關係，必須先清楚其生殖行為，也就是必須明瞭配育系統後方能對物種的分布與遺傳組成提出合理之解釋。所以本研究針對台灣產哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨材料進行生殖生物學觀察與試驗，希望能明瞭其生殖行為與配育系統。

同功異構？電泳分析法可以研究種內族群的遺傳多樣性與族群遺傳結構，評估物種的配育系統，也可以探討種間的親緣關係與種的界定。此外這種分析方法可以快速地檢測多倍體複合群的遺傳多樣性，有效地推斷雜交種或多倍體類群的親本。本研究利用同功異構？電泳分析法，分析哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各地區族群的遺傳多樣性，以及族群間遺傳變異分布模式與結構，並探討其配育系統，藉此評估族群遺傳多樣性與地理分布的關係。

植物的胞器 DNA 具有單系遺傳與不具遺傳重組等特性，其中葉綠體的非編碼區（noncoding region）因不具功能限制而有高度的遺傳變異，可提供足夠系統發育與演化訊息，因此適合於建構屬以下分類群的系統演化關係，以及種內族群間地理親緣重建與評估在地質歷史過程的遷移路線。本研究利用哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨葉綠體 DNA 的變異來探討此二物種的親緣關係、族群遺傳多樣性與地理親緣關係，並根據葉綠體基因型的地理分布檢測不同的地理遷移模式假說。

## 參考文獻

- 陶君容 . 1992 . 中國第三紀植被和植物區系歷史及分區 . 植物分類學報 30(1): 25-43.
- 郭城孟 . 1998 . 台灣蕨類植物區系之研究 . 於邱少婷及彭鏡毅 (主編), 海峽兩岸植物多樣性與保育論文集 , pp. 9-19 , 國立自然科學博物館 , 台中 .

- 裘佩熹 . 1974 . 亞洲大陸狗脊蕨屬的分類研究 . 植物分類學報 12(2):237-248.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography, the history and formation of species. Harvard University, London.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball Jr., E. Bermingham, T. Lamb, E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunder. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- Barrington, D. S. 1993. Ecological and historical factors in fern biogeography. *J. Biogeogr.* 20: 275-280.
- Bermingham, E. and A. P. Martin. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.* 7:499-518.
- Boonkerd, T. and R. Pollawatn. 2004. A revised taxonomic account of the fern genus *Woodwardia* Sm. (Blechnaceae) in Thailand. *Thai For. Bull. (Bot.)* 32: 1-5.
- Bossart, J. L. and D. P. Prowell. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons, and new directions. *Trends Ecol. Evol.* 13(5): 202-206.
- Cain, M. L., B. G. Milligan and A. E. Strand. 2000. Long-distance seed dispersal in plant populations. *Am. J. Bot.* 87(9):1217-1227.
- Chiang, T. Y., Y. C. Chiang, Y. J. Chen, C. H. Chou, S. Havanond, T. N. Hong and S. Huang. 2001. Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Mol. Ecol.* 10:2697-2710.
- Chiou, W.-L., P.-H. Lee, and S.-S. Ying. 2000. Reproductive biology of gametophytes of *Cyathea podophylla* (Hook.) Copel. *Taiwan J. For. Sci.* 15(1):1-12.
- Chiou, W.-L., W.-C. Shieh, and C. E. DeVol. 1994. Blechnaceae. *In* Huang, T.-C. et al (eds.), *Flora of Taiwan*, 2nd ed., Vol. 1, pp. 266-279. Taipei, Taiwan.

- Clegg, M. T., B. S. Gaut, G. H. Learn, Jr. and B. R. Morton. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 91: 567-575.
- Collinson, M. E. 1996. "What use are fossil ferns?"-20 years on: with a review of the fossil history of extant pteridophyte families and genera. in Camus et al. (eds), *Pteridology in perspective*, pp. 349-394. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Collinson, M. E. 2001. Cainozoic ferns and their distribution. *Brittonia* 53(2): 173-235.
- Comes, H. P. and J. W. Kadereit. 1998. The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Pl. Sci.* 3: 432-438.
- Coyne, J. A. and H. A. Orr. 2004, *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Cranfill, R. B. 2001. *Phylogenetic Studies in the Polypodiales (Pteridophyta) with an Emphasis on the Family Blechnaceae*. Ph.D. thesis, Univ. California, Berkeley.
- Cranfill, R. B. and Kato, M. 2003. Phylogenetics, biogeography and classification of the woodwardioid ferns (Blechnaceae). *In* Chandra, S. & Srivastava, M.(eds.), *Pteridology in the New Millennium*, pp. 25–48. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Crawford, D. J., N. S. Lee and T. F. Stuessy. 1992. Plant species disjunctions: perspectives from molecular data. *Aliso* 13: 395-409.
- Demesure B., B. Comps and R. J. Petit. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 50: 2515-2520.
- Ferris, C., R. P. Oliver. A. J. Davy and G. M. Hewitt. 1995. Using chloroplast DNA to trace postglacial migration route of oaks into Britain. *Mol. Ecol.* 4: 731-738.
- Guo, Q. 1999. Ecological comparisons between eastern Asia and North America:

- historical and geographical perspectives. *J. Biogeogr.* 26:199-206.
- Haufler, C. H. 2002. Homospory 2002: an odyssey of progress on pteridophyte genetics and evolutionary biology. *BioScience* 52(12):1081-1093.
- Hauk, W. D. and C. H. Haufler. 1999. Isozyme variation and species relationships within the moonworts (*Botrychium* subgenus *Botrychium*). *Am. J. Bot.* 86(5): 614-633.
- Hedrick, P. W. 1987. Genetic load and the mating system in homosporous ferns. *Evolution* 41:1282-1289.
- Huang, S. and Y. C. Chen. 2000. Patterns of genetic variation of *Kandelia candel* among populations around South China Sea. In Chiang & Hsu(eds.), *Wetland biodiversity: proceedings of symposium of biodiversity in wetlands*. Pp. 59-64. Taiwan Endemic Species Research Institute, Nantou, Taiwan.
- Huang, S., Y. C. Chiang, B. A. Schaal, C. H. Chou and T. Y. Chiang. 2001. Organelle DNA phylogeography of *Cycas taitungensis*, a relict species in Taiwan. *Mol. Ecol.* 10:2669-2681.
- Iwatsuki, K. 1995. Blechnaceae. In Iwatsuki, K. et al. (eds.), *Flora of Japan*, Vol. I: Pteridophyta and Gymnospermae, pp. 112-115., Kodansha Ltd., Tokyo.
- Kato, M. 1993. Biogeography of ferns: dispersal and vicariance. *J. Biogeogr.* 20:265-274.
- Lee, N. S., T. Sang, D. J. Crawford, S. H. Yeu and S.-C. Kim. 1996. Molecular divergence between disjunct taxa in eastern Asia and eastern North America. *Am. J. Bot.* 83(10): 1373-1378.
- Lin, S.-M., C. A. Chen and K.-Y. Lue. 2002. Molecular phylogeny and biogeography of the grass lizards genus *Takydromus* (Reptilia: Lacertidae) of East Asia. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22(2): 276-288.
- Liu, J., Z. Chen and A. Lu. 2002. Molecular evidence for the sister relationship of the eastern Asia-North American intercontinental species pair in the *Podophyllum* group (Berberidaceae). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 147-154.

- Lowe, A., S. Harris and P. Ashton. 2004. Ecological genetics: design, analysis and application. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Masuyama, S. 1979. Reproductive biology of the fern *Phegopteris decursive-pinnata*, the dissimilar mating systems of diploids and tetraploids. Bot. Mag. Tokyo 92:275-289.
- Masuyama, S. and Y. Watano. 1990. Trends for inbreeding in polyploid pteridophytes. Plant Species Biol. 5:13-17.
- Masuyama, S., K. Mitui and N. Nakato. 1987. Studies on intraspecific polyploids of the fern *Lepisorus thunbergianus* (3), mating system and ploidy. J. Jap Bot. 62:321-331.
- Page, R. D. M. and E. C. Holmes. 1998. Molecular evolution: a phylogenetic approach. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Paris, C. A. and M. D. Windham. 1988. A biosystematic investigation of the *Adiantum pedatum* complex in eastern North America. Syst. Bot. 13:240-255.
- Ranker, T. A., S. K. Floyd and P. G. Trapp. 1994. Multiple colonizations of *Asplenium adiantum-nigrum* onto the Hawaiian archipelago. Evolution 48: 1364-1370.
- Small, R. B., E. B. Lickey, J. Shaw and W. D. Hauk. 2005. Amplification of non-coding chloroplast DNA for phylogenetic studies in Lycophytes and Pteridophytes with a comparative example of relative phylogenetic utility from Ophioglossaceae. Mol. Phylogenet. Evol. 36: 509-522.
- Smith, A. R. 1972. Comparison of fern and flowering plant distributions with some evolutionary interpretations for ferns. Biotropica 4: 4-9.
- Smith, A. R. 1985. Historia filicum. MacMillan and Co., London.
- Soltis, P. S. and D. E. Soltis. 1990. Genetic variation within and among populations of ferns. Amer. Fern J. 80(4):161-172.

## 第二章 哈氏狗脊蕨複合種群之系統分類學研究

### 壹、前言

哈氏狗脊蕨(*Woodwardia harlandii*)及細葉狗脊蕨(*W. kempii*)為烏毛蕨科(Blechnaceae)狗脊蕨屬(*Woodwardia*)植物。本屬植物外部形態的主要特點為：沿主脈及羽軸兩側各有一列平行於主脈或羽軸的狹長網狀脈，其外側尚有 1 至 2 列多角形的網眼，網眼內不具小脈，其餘葉脈均為游離，游離脈通常極短，直達葉片邊緣；孢子囊群為線形或橢圓形，呈不連續、單列平行著生於主脈或羽軸兩側的狹長網眼上，並多少陷入葉肉中，成熟時囊群蓋朝主脈或羽軸開裂而宿存(裘佩熹, 1974; Cranfill, 2001)，染色體基數為 31、34 或 35 (Kramer, 1990; Takamiya et al, 1992; Cranfill, 2001)。哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨的形態差異僅在於羽裂方式不同，其中哈氏狗脊蕨葉片為單葉至一回羽狀複葉，細葉狗脊蕨則為二回羽狀裂葉。

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨於近年來多數的分類處理(Kramer, 1990; Chiou et al, 1994; Iwatsuki, 1995; Cranfill, 2001)皆置於狗脊蕨屬(*Woodwardia*)，Smith(1875)曾將哈氏狗脊蕨併入 *Lorinseria* 屬中，而大陸學者秦仁昌(1964)則根據此二物種之根莖長橫走、葉柄極長、葉片簡化(三出至羽狀深裂)、孢子囊群表面生(不陷入葉肉中)及孢子具有明顯的翅狀周壁等特徵，將其處理成獨立一新屬——崇澍蕨屬(*Chieniopteris*，又稱假狗脊蕨屬)(秦仁昌, 1964; 裘佩熹, 1974; 吳兆洪, 1999)。

Cranfill(2001)在進行狗脊蕨屬植物的專論性研究後，共處理為 14 種，並將一些曾被分立的小屬，如 *Anchistea*、*Chieniopteris* 及 *Lorinseria*，皆併入狗脊蕨屬中，而在屬內設立 *Lorinseria* 及 *Woodwardia* 兩個亞屬。根據其處理，哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨與美洲產的 *W. areolata* 共同組成 *Lorinseria* 亞屬，其餘種類則歸屬於為 *Woodwardia* 亞屬，此結果與 Tagawa(1936)的處理一致。Cranfill & Kato(2003)以形態特徵與葉綠體 DNA 序列進行狗

脊蕨屬的親緣關係研究，其結果支持 *Anchistea* 及 *Lorinseria* 為獨立的屬，其他種類則形成單系群之狗脊蕨屬 (*Woodwardia*)，而哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨包含於其中，並被提議單獨組成崇澍蕨組。屬的歸屬及屬內位置雖然已較為明朗，然而哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨彼此的關係一直存在爭議，日本學者 Masamune(1930)曾將細葉狗脊蕨處理為哈氏狗脊蕨的變種(*W. harlandii* var. *takeoi* (Hayata) Masamune)，而 Christensen (1934)及 Tagawa (1936)更直接將 *W. kempii* Copel. 處理為 *W. harlandii* Hook. 的同物異名，然而近十幾年的分類處理普遍接受其為不同的物種(Chiou et al, 1994; Iwatsuki, 1995; Cranfill, 2001; Cranfill & Kato, 2003; 吳兆洪, 1999)。

物種種化的過程主要在於生殖隔離機制的形成，一般常見的生殖交流阻斷方式為地理上的分隔 (Cox & Moore, 2000)，也就是所謂的異域種化 (allopatric speciation)。異域種化常是為適應不同環境的選汰加上基因交流中斷所形成，因此表現在地理分布上，分化的物種常具有不同的分布範圍或不同的分布模式，而即使後來再因族群擴散而共域分布，物種間也會因生態需求不同、生殖週期不同或遺傳分化所形成的內在生殖隔離機制而有所區隔。因此，地理分布資訊可提供物種間關係的基本訊息，當近緣分類群間尚未建立完善的生殖隔離機制時，有效的地理隔離方足以維持其為獨立可區分的物種。同域種化 (sympatric speciation) 的實例較少，在維管束植物達成同域種化最常見的方式為染色體套數的改變，也就是在同區域內形成不同倍體性的群體，而這些不同倍體性物種間常經由雜交後代的不孕性來形成生殖上的隔離。因此多倍體化可以使得植物在短時間內種化，而此分化類群間在遺傳物質上顯現親緣關係接近，然卻有顯著的生殖隔離。生殖週期或生殖行為的差異是另一種隔離機制，然而這樣的差異通常是異域種化的結果。當分隔的族群為了適應當地環境而有固定的生殖週期或生殖行為模式，當已分化的族群個體再共域生長時，這樣固定的生殖週期或

行為會阻礙其基因交流，因而能保持甚至強化其遺傳的分化。

維管束植物的系統分類傳統上是以植物形態特徵為基礎，並廣納其他生物學資訊作為分類處理的佐證（Stuessy, 1990），這其中包括分布資訊、物候學資料、染色體訊息、遺傳學資訊、生殖交配試驗結果及分子生物學證據等。除了形態學資料以外其他資訊的多寡與可獲得性，會影響系統分類學者最後的分類處理，因此各種生物學資訊越充足，越能獲得一充分反應物種系統演化關係的分類結果。為解決哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨長久以來的分類爭議，本研究針對其地理分布資訊、物候現象、染色體資料及分子生物學證據進行資料收集、野外觀察與實驗分析，希望能對於其分類關係有更充足的證據支持。

## 貳、研究材料及方法

### 一、地理分布資訊

參考主要標本館標本記錄與相關文獻，並至各地調查採集，野外發現哈氏狗脊蕨或細葉狗脊蕨族群時，觀察記錄其所在位置的生態環境。將標本館標本記錄及野外調查發現之地點，標示於地圖上。

### 二、物候學資訊

研究區設於台灣北部烏來地區雲仙樂園，海拔高約 450 公尺，生育地為次生闊葉林林緣，本研究調查時間為 2000 年 4 月起至 2003 年 12 月，共計 3 年 9 個月。哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各選定 20 株，共計 40 株，每月 10 日前後進行調查，整理並統計各月之觀測結果，分析比較二物種之物候特性。

本研究將蕨類各葉片發展與孢子囊發育之物候區分如下：

葉片發展：

1. 幼葉捲曲期：新葉完全捲曲，未見葉肉。

2. 幼葉辦捲期：可以明顯地看出葉肉，但尚有部分葉片或羽片捲曲。
3. 幼葉平展期：葉片完全平展，但尚未轉變為成熟葉色。
4. 成熟葉期：葉片平展，具成熟健康葉色。
5. 落葉期：葉片出現黃或褐色斑點或斑紋，至葉片完全掉落止。

孢子囊發育：

1. 孢子囊發育期：孢子囊群凹陷至孢子囊飽滿但為淡黃色之時期。
2. 孢子囊成熟期：孢子囊飽滿且呈現成熟之黃褐色。
3. 孢子釋放期：孢子囊成熟且開始釋放。
4. 孢子囊殘存期：孢子囊內孢子已完全釋放，僅剩殘存之孢子囊殼。

### 三、細胞學證據

#### (一) 染色體直接檢定

以下列步驟進行根尖染色體數目之觀察

1. 根尖取下後，立即置於 18-20 °C，0.002 M 之 8-hydroxyquinone 溶液中靜置處理 3-5 小時，溶液需為根尖之 20 倍體積以上。
2. 將材料取出，置於絕對酒精：冰醋酸（3：1）固定液內固定，過夜，但勿超過 24 小時。
3. 將材料換至 70% 酒精溶液中保存。
4. 壓製前，將材料置於 60 °C，1N HCl 溶液中加熱 8 分鐘，再以 pectinase 溶液解離數分鐘。
5. 以醋酸洋紅壓片法（acetocarmine squash method）製成染色體玻片，於光學顯微鏡下觀察有絲分裂時之染色體數目，並拍照記錄。

#### (二) 流式細胞術（flow cytometry, FCM）分析

材料準備：

1. 取新鮮葉片葉柄部位，切成小段後，加入 1ml PI/Triton X-100（終濃

度 PI= 20ug/ml, Triton-X 100=0.1%, RNase A= 0.2mg/ml) , 再以刀片將材料切碎呈泥狀, 避光染色至少30分鐘。

2. 上機前打散細胞並以 35um 尼龍篩網過濾樣本。
3. 另取煙草葉片進行上述步驟, 做為C value比對之基準值。

上機操作：

1. 儀器設定：選擇設定以下參數：FS Lin、SS Lin、FL Lin、FL Peak、Ratio ( Ratio= FL Peak/ FL Lin ) , 門檻值設定於FL。
2. 分析圖形：先以煙草樣品進行分析, 調整FS、SS 電壓及Gain值, 使細胞群落在FS Lin- SS Lin 圖形中央, 再於FL Lin- FL Peak圖形調整FL 電壓及Gain值設定, 於FL Lin histogram 分析單顆細胞的螢光訊號。

#### 四、DNA 分子證據

##### (一) 研究材料：

於台灣北部及東亞地區採集哈氏狗脊蕨複合群材料, 共計取得 14 個族群共 364 棵植株樣品(表 5-1), 其中台灣有 3 個族群 120 棵植株樣品, 日本 2 個族群 41 棵植株樣品, 大陸 8 個族群 183 棵植株樣品。取樣時自野外族群採集新鮮健康之新葉, 或於野外即以矽膠進行快速乾燥, 而後置於超低溫冷凍櫃備用。

##### (二) 研究方法：

1. DNA 萃取：以 Viogene®的 Plant Genomic DNA Miniprep System Kit 進行 DNA 萃取。

(1) 取約 100mg 的植物材料, 以液態氮研磨至粉末狀, 並移至一離心管中。

(2) 加 400µl 的 PX1 溶劑及 4µl 的 Rnase (100mg/ml), 經振盪均勻混

- 合後，置 65 水浴 10 分鐘。
- (3) 回室溫後，再加 130 $\mu$ l 的 PX2 溶劑至管中，經振盪均勻後，置冰浴 5 分鐘。
  - (4) 將反應完後之黏稠混合物移至過濾管 ( Shearing tube ) 內，再置於收集管上，經高速離心 (10,000rpm) 後，將液狀物質過濾至收集管中。
  - (5) 加 0.5 體積的 PX3 溶劑與等體積的純酒精，至步驟 4 所收集之回收管內，並以吸管充分混合。
  - (6) 取步驟 5 的混合液 650 $\mu$ l，移至離心柱 ( Spin column ) 內，再置於收集管上，經高速離心 1 分鐘後，將濾出液丟棄。
  - (7) 重複步驟 6，至步驟 5 的樣品全部處理完。

表 2-1 Codes and sample size for populations of *Woodwardia harlandii* complex in this study. Shaded rows indicating the diploid populations while the others being tetraploid.

Population (Code)	Sample size
<b>台灣</b>	<b>142</b>
烏來(TY)**	100
陽明山(TS)**	22
貢寮(TT)**	20
<b>日本</b>	<b>39</b>
九州屋久島(JY)***	20
琉球沖繩島(JO)*	19
<b>中國大陸</b>	<b>183</b>
香港(HK)**	33
福建南靖(CF)*	10
海南島(CH)*	15
廣東從化(CC)**	17
湖南南嶺莽山(CN1)*	10
廣東南嶺連州(CN2)*	11
廣東南嶺乳源(CN3)*	4
廣東新會古兜山(CG1)*	39
廣東新會大圓嶺(CG2)*	44

\* 表示僅發現哈氏狗脊蕨之地點

\*\* 表示哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨共域分布之地點

\*\*\* 表示僅發現細葉狗脊蕨之地點

- (8) 用 0.7ml 的清洗劑，以 30 秒高速離心的方式清洗離心柱 2 次，將濾出液丟棄。
- (9) 高速離心 2 分鐘，去除殘留的清洗劑。
- (10) 將過濾管 (2) 移至新的離心管 (1.5ml) 中，加 200 $\mu$ l 的 0.1 $\times$ TE 緩衝液( 事先預熱至 65 )，以高速離心的方式將 DNA 溶至離心管中。
- (11) 將 DNA 保存於 -20 。

將以上兩種萃取方法所得之 DNA 溶液，以 1 $\times$ TBE buffer 所配製的 1% agarose gel( 內含 0.25  $\mu$ g/ml 之 Ethidium Bromide 染劑 )，進行電泳約 30-50 分鐘後，利用已知濃度的 DNA Marker 比對所萃取的 DNA 之品質及濃度後，再將 DNA 濃度稀釋成 10 ng/ $\mu$ l，保存於 4 $^{\circ}$ C 備用。

## 2. PCR 反應：

### (1)引子的選擇：

選用的 DNA 片段為 *atpB-rbcL* 及 *trnS-rps4* 等 2 基因區間片段，其中 *atpB-rbcL* 片段參考 Chiang et al.(1998)設計的引子( *atpB*-1 及 *rbcL*-1)，再重新設計更專一性之引子( *atpB*-F: 5'-CCRAGAGTAGT TTCACCAA-3 及 *rbcL*-W: 5'-TCGGTATCTTTGGTCTTGTAT-3' )，進行 *atpB-rbcL* 基因區間片段的擴增。*trnS-rps4* 片段則參考 Smith and Cranfill (2002)之引子 ( *trnS* R 及 *rps4* R1 )，再重新設計更具專一性之引子 ( *tSr4*-W-f : 5'-CCGAGGGTTCGAATCCCTCC-3' 及 *tSr4*-W-r : 5'-GCCAATCGAGAATCCGTCAATTT-3' ) 核 DNA 部分選用單一拷貝的 *pgiC* 基因片段，擴增放大的範圍包括 intron 14、15 及 exon 15，引子則是參考 Ishikawa 等( 2002 )設計之引子序列，再重新設計專一性更高的引子( *pgiC*-14fA : 5'-GTG CTT CTG GGT

CTT TTG AG-3'及 pgiC-16rA : 5'-GTT GTC CAT TAG TTC CAG  
GT-3' )

(2)PCR 反應試藥與濃度：

每個 PCR 反應試劑體積為 50 $\mu$ l, 各試藥之濃度、所需體積及最終之反應試劑濃度如下 ( 參考 Viogene Biotek<sup>®</sup> 之濃度配方 ):

試藥	所需體積	反應試劑最終濃度
10 $\times$ PCR buffer (with 15mM MgCl <sub>2</sub> , Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1% Triton X-100, 50% glycerol)	5 $\mu$ l	1 $\times$
10mM dNTP mixture	1 $\mu$ l	0.2 mM each
Primer mix(10 $\mu$ M each)	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M each
Template DNA	1-10 $\mu$ l	
VioTag DNA polymerase	0.5 $\mu$ l	2.5 units
Autoclaved distilled water to	50 $\mu$ l	

(3) PCR 反應條件：

PCR 反應採用之溫度週期及流程如下：

- 先以 94 °C 處理 5 分鐘，使雙股 DNA 變性。
- 再以 94 °C ( 變性溫度 ) 一分鐘、53 °C ( 鏈合溫度 ) 一分鐘、72 °C ( 延長溫度 ) 兩分鐘，進行 35~40 次的擴增循環。
- 最後保持 72 °C 處理 8 分鐘。
- 反應產物溫度降至室溫或 5°C 保存。

(4) PCR 結果檢測：

以 1 $\times$  TBE buffer 所配製成之 1% agarose gel ( 內含 0.25  $\mu$ g/ml 之 EtBr 染劑 ) 在 110mA 條件下，進行電泳約 30 分鐘後，隨即於紫外燈上

觀察及記錄 PCR 產物的分子量、濃度及產物條帶是否單一。每次電泳中並加入分子量參考標記 ( molecular weight marker, 100 bp DNA ladder, Violet), 以標示 PCR 產物條帶的分子量並當作 PCR 產物之 DNA 濃度的參考。

### 3. PCR 產物之純化回收：

利用 Viogene® Gel Extraction System Kit 純化回收，步驟如下：

- (1) 將所有 PCR 反應溶液取出，加入 1/10 體積的 loading dye，以 1.2% agarose gel 進行電泳約 100 分鐘，於紫外燈上觀察並將膠片上的 PCR 產物切下 ( 約 100 mg ) 放入 1.5ml 的離心管中。
- (2) 加入 0.5 ml 的 GEX buffer，以 60 °C 水浴至少 10 分鐘直至 gel 完全溶解並使其與 buffer 均勻混合及反應。
- (3) 先將 Kits 內附之 Gel extraction column 置入於收集管之上方，再將反應完全之溶液 ( 約 0.6ml ) 以吸量管吸取入 Gel extraction column 內。
- (4) 高速離心( 10,000g )約 1 分鐘後，DNA 留滯於 Gel extraction column 之濾膜上，將濾出液丟棄。
- (5) 以 0.5ml 之 Wash I buffer 沖洗濾膜上的 DNA，再以高速離心 1 分鐘後將濾出之沖洗液丟棄。
- (6) 以 0.7ml 之 Wash II buffer 沖洗濾膜上的 DNA，以高速離心 1 分鐘後將濾出之沖洗液丟棄，此步驟進行兩次。
- (7) 高速離心 3 分鐘，將殘餘之沖洗液完全濾出。
- (8) 將 Gel extraction column 置於新的 1.5ml 離心管上，加入 30 $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O (60 °C) 於濾膜上，靜置約一分鐘後再以高速離心 2 分鐘將 DNA 濾至離心管內，完成 PCR 產物之純化回收。
- (9) 取 2  $\mu$ l 混合 1/10 體積的 loading dye，進行 1% 瓊脂膠體電泳，觀察

回收效果是否良好，並估算 DNA 片段的濃度，以便進行直接定序，保存於-20 備用。

#### 4. DNA 定序：

DNA 片段經純化回收後，以自動定序儀定序。

#### 5. 資料分析：

##### (1)序列分析：

以 BioEdit 7.0 軟體進行序列排序，並以手動調整，再以 DNaSp 4.10.9 程式 (Rozas and rozas, 2000) 計算變異位點之比例、單套基因型歧異度 (haplotype diversity,  $h$ ) 及核? 酸歧異度 (nucleotide diversity,  $d_n$ )。

##### (2)親緣關係樹之建構：

###### a. 鄰接法分析

利用 MEGA 4 程式 (Tamura et al., 2007) 以鄰接法 (Neighbor joining, NJ), 建構葉綠體單套型間之親緣關係樹。分析時遺傳距離採用 Kimura's two-parameter, 鹼基缺失 (gap) 設定為第五種鹼基 (fifth base), 再進行 1000 次的 Bootstrap 檢定, 以獲得各分支支持度。

###### b. 貝葉氏法分析

利用 MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) 進行貝葉氏法 (Bayesian inference analysis) 分析, 核? 酸替代模型設定為 GTR+G, 採用 MCMCMC (Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo) 演算法, 以隨機樹為起始樹, 進行 1,000,000 個 generation, 每 1000 個 generation 取一次值, 前 25% 產生資料作為老化樣本 (burnin) 捨棄, 總和剩餘資料後計算得各節點之機率值。

## 參、結果與討論

### 一、地理分布資訊

根據各主要標本館標本記錄及野外調查結果，配合文獻紀錄資料（嚴等，2003），哈氏狗脊蕨複合種群主要分布於東亞及東南亞北部地區（圖 2-1），分布模式約略等於 Kuo（1985）及郭城孟（1998）所提出的「東南中國大陸型」，其中哈氏狗脊蕨分布較廣，包括中國大陸廣東、廣西、福建、湖南、海南島、日本九州屋久島、琉球群島、越南北部、泰國北部與台灣北部。細葉狗脊蕨的地理分布範圍基本上與哈氏狗脊蕨重疊，但分布地點較少，範圍較窄，最西分布至大陸廣西一帶，未見於更西的大陸海南島、越南及泰國。整體而言，此複合種群在東亞及東南亞地區呈現一長帶狀分布，以台灣至大陸廣西及海南島此一區域內發現紀錄的族群數量最多。台灣地區哈氏狗脊蕨複合種群族群約位處於世界地理分布的中間位置，野外調查發現的生育地點超過 12 個（圖 2-2），其中有 7 個生育地同時可發現哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨，其為混生或緊鄰生長，另 4 個生育地僅發現哈氏狗脊蕨，1 處則僅記錄到細葉狗脊蕨。

根據標本記錄及野外調查結果，哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨在許多生育地點都呈現共域分布，導致生育地重疊的可能原因有二，其一為此二物種具有密切關係，因此利用極為相似的棲地環境；第二種可能原因為此二物種屬於關係較遠物種，但因具類似生態需求，而導致如此顯著的生育地重疊。Cranfill（2001）及 Cranfill & Kato（2003）針對狗脊蕨屬與相關類群的研究結果顯示，哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨是系統演化上關係最近緣的姊妹群，所以此二物種利用相同或相似棲地環境是因其具有密切關係而有類似生態需求。系統演化關係近緣物種共域分布情形亦見於其他同型孢子蕨類植物（Yatabe et al., 2001; Shinohara et al., 2006），然此類共域分布近緣種間通常具有明顯的生殖隔離，方能維持二個獨立可區分之分類群。如四倍體

與六倍體假蹄蓋蕨 (*Deparia petersenii*) 共域分布於日本奄美島，由於染色體倍體性不同，此二類群間遺傳物質並無法有效交流，偶發的雜交事件只能形成不具繁衍能力的五倍體個體 (Shinohara et al., 2006)，顯示四倍體與六倍體假蹄蓋蕨間具有明顯的生殖隔離。Yatabe 等 (2001) 研究印尼西爪哇島一山地國家公園內之山蘇花 (*Asplenium nidus*) 複合群植物時，發現同一地區形態無法區分的這群植物其實包含 3 個分類群，分別具有不同的葉綠體單套基因型，此 3 類群雖具有相同的染色體數，然其間具有生殖隔離機制使得彼此無法交配產生可孕的後代。共域分布的哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨為系統演化關係最近緣的姊妹群，因此其間應具有顯著的生殖隔離，方能維持此形態有所差異的群體為二個獨立之分類群。若無有效的生殖隔離機制，則兩者或僅為不同外型 (葉片分裂形式不同) 的同一分類群，其形態上的差異或另有其他因子所調控。

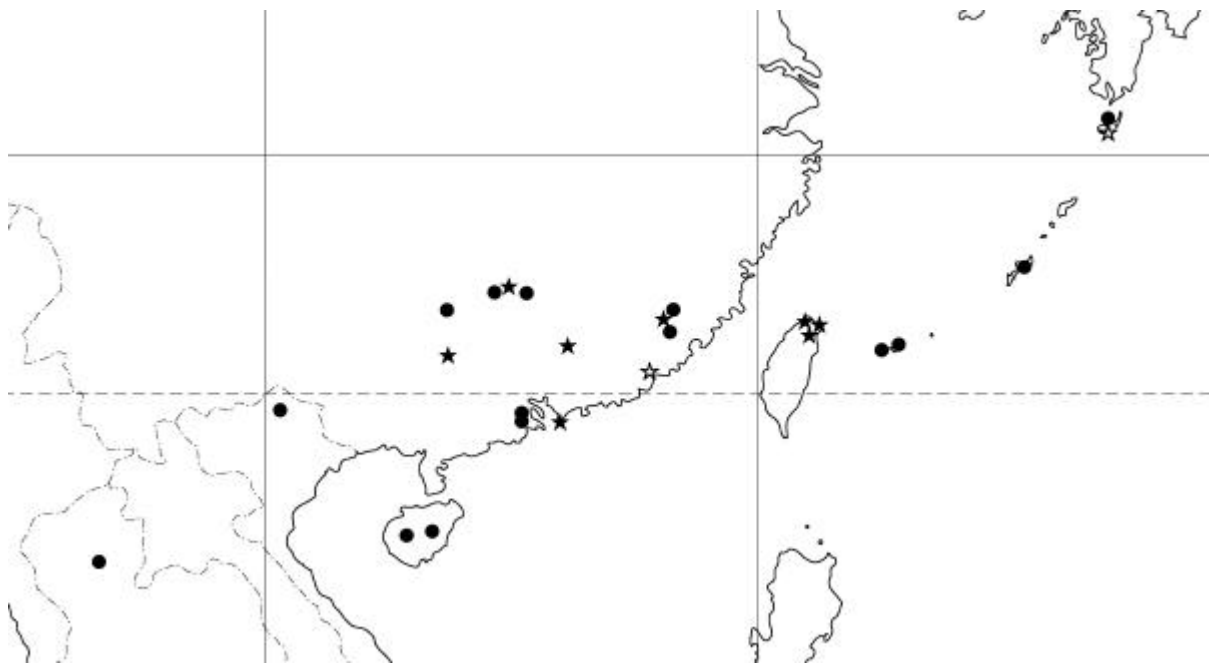


圖 2-1、哈氏狗脊蕨複合種群之地理分布。黑色實心圓表示哈氏狗脊蕨之分布地，空心星號表示細葉狗脊蕨之分布地，實心星號表示哈氏細葉狗脊蕨共同之分布地點。

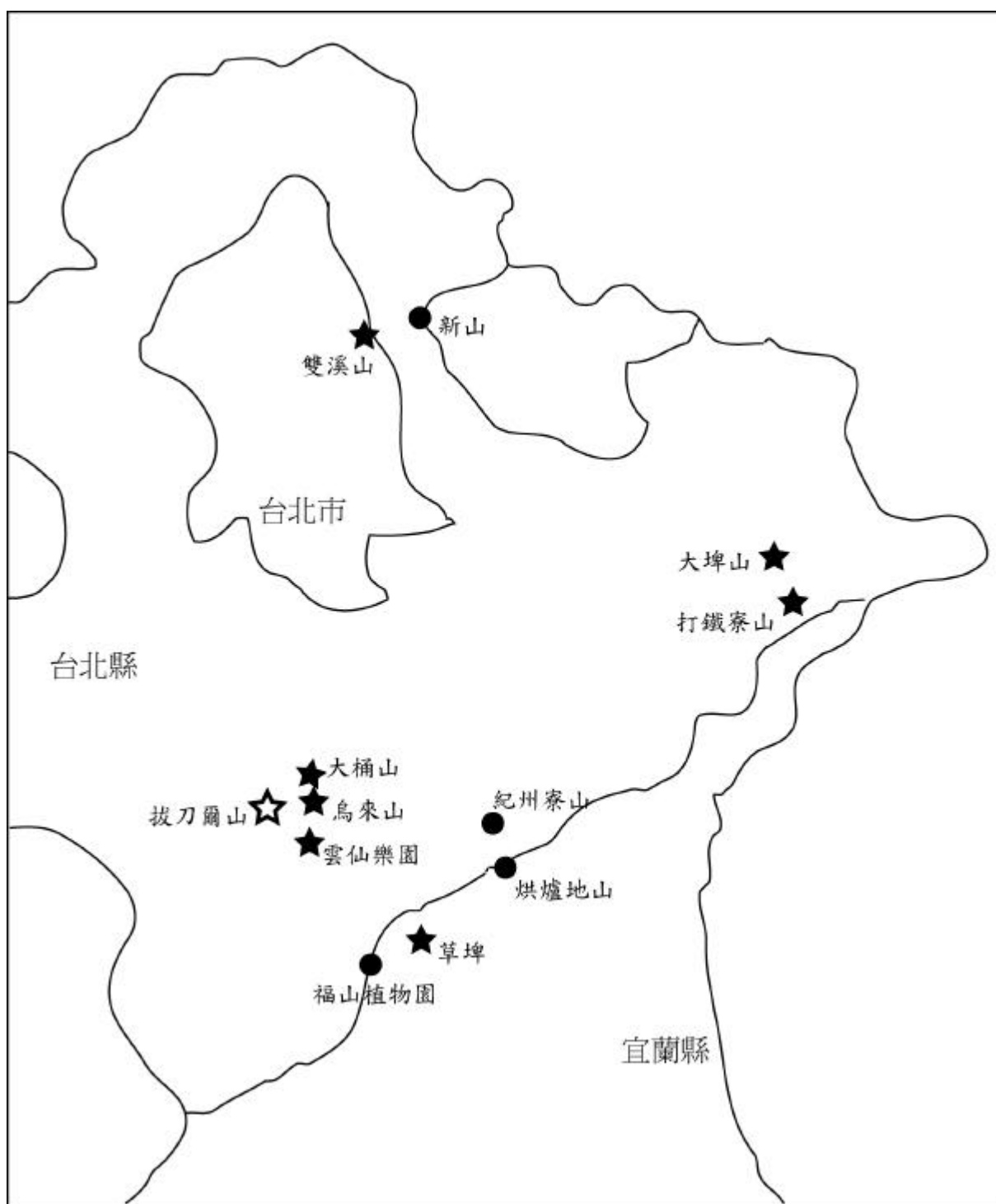


圖 2-2、台灣地區哈氏狗脊蕨複合種群野外調查紀錄之分布地點。黑色實心圓表示哈氏狗脊蕨之分布地，空心星號表示細葉狗脊蕨之分布地，實心星號表示哈氏細葉狗脊蕨共同之分布地點。

## 二、物候學資訊

統計台灣北部烏來地區共域分布哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨 3 年週期（2000 至 2003 年）每月物候現象觀測記錄結果，繪製成圖 2-3 與 2-4 之新生葉片組成月變化圖。由此 3 年週期的物候統計資料可以發現兩種狗脊蕨葉片產生與組成都具有明顯的季節性變化，孢子葉的形成集中於 2 至 5 月，其中細葉狗脊蕨以 3 月為最高峰，而哈氏狗脊蕨則以 2 月為極大期。8 及 9 兩月另有一波抽新葉之高峰，此時期新長葉片全為營養葉，之後新葉數產生量明顯降低。

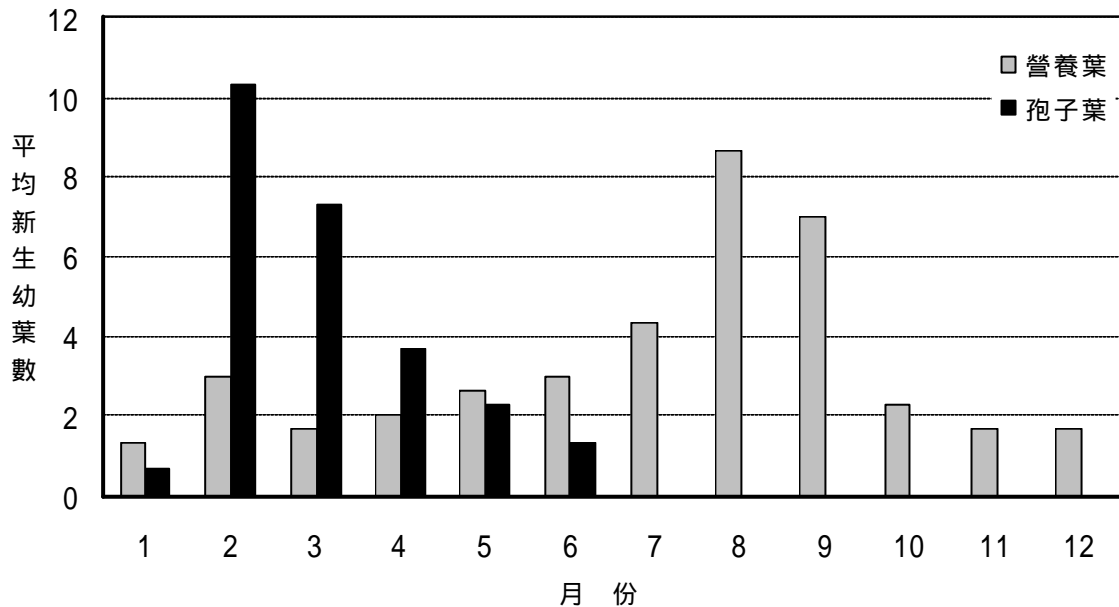


圖 2-3、哈氏狗脊蕨新生幼葉數量月變化圖

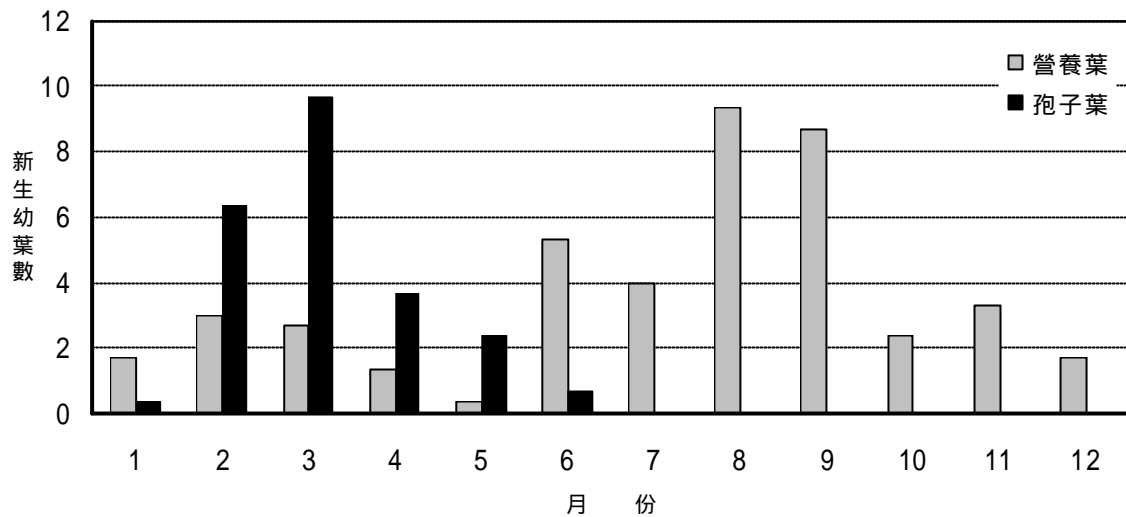


圖 2-4、細葉狗脊蕨新生幼葉數量月變化圖

孢子葉的發育具有季節性，孢子囊的發育、成熟與孢子釋放也具有明顯的季節性。圖 2-5 哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨孢子囊發育每年自 6 月開始成熟，7 及 8 月達到成熟期高峰，孢子釋放則一般自 7 月開始，8 及 9 兩月為最大釋放期，多數個體至 10 月時已接近釋放完畢。

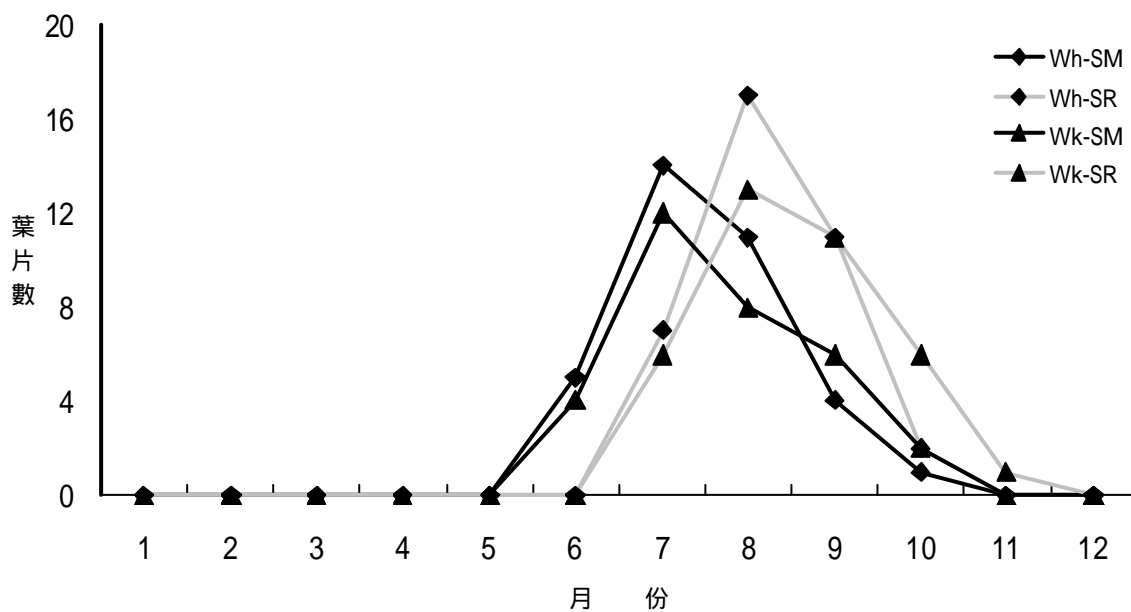


圖 2-5、哈氏狗脊蕨 (Wh) 與細葉狗脊蕨 (Wk) 孢子囊成熟 (SM) 與孢子釋放 (SR) 月變化圖。

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨的物候現象基本上與鄰近地區針對另 16 種蕨類植物的調查結果 ( Lee et al., 2009 ) 一致 , 即 2 至 3 月為孢子葉新葉抽芽鼎盛期 , 6 至 9 月則為孢子囊成熟與釋放的極大期。Lee 等研究地點 ( 福山植物園 ) 與本研究設樣的地點 ( 烏來雲仙樂園 ) 直線距離不到 10 公里 , 地理上應屬同一氣候區。過去的研究顯示蕨類植物季節性地物候現象受降雨量與氣溫變化所影響 ( Sharpe, 1997; Arens, 2001; Mehltreter & Palacios-Rios, 2003 ) , 因此同樣的氣候條件一致可能是決定本研究二物種與福山植物園地區 16 種具有幾為一致物候表現時期的主要原因。

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨於多處分布地區均為共域分布 ( 見圖 2-1 及 2-2 ) , 本項物候學研究顯示共域分布的此二物種具有幾為一致的物候表現 , 推測此將影響孢子釋放後孢子萌發與配子體發育的時間亦趨於一致。許多開花植物會藉由錯開開花時間以避免近緣種間雜交 , 物候學觀測結果顯示哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨間並產生物候表現的差異 , 因此若共域分布的此二物種確實為獨立的分類群 , 則其應另有物候學以外其他生殖行為或遺傳物質方面的顯著差異 , 以達到生殖隔離的目的。

### 三、細胞學證據

Takamiya 等人 (1992) 曾對日本產狗脊蕨屬植物做過細胞學研究，結果顯示日本產細葉狗脊蕨為四倍體 ( $2n=124$ )，由此所推算的染色體基數 ( $x=31$ ) 與同屬其他種類 ( $x=34$ ) 明顯不同。Cranfill (2001) 以台灣哈氏狗脊蕨材料所做的細胞學研究，亦顯示此類群為四倍體 ( $n=ca.70$ )，然而其染色體基數為 35。本研究以台灣北部烏來地區細葉狗脊蕨材料進行根尖細胞有絲分裂之染色體觀察，結果如圖 2-6，細葉狗脊蕨染色體數為 126。若參考前人觀察結果，台灣北部烏來地區所產細葉狗脊蕨應為四倍體，染色體基數為 31 或 32，結果與日本學者 Takamiya 等人 (1992) 的觀察類似，顯示台灣與日本產的細葉狗脊蕨可能都是四倍體，惟其確切之染色體基數則需要再進一步確認。

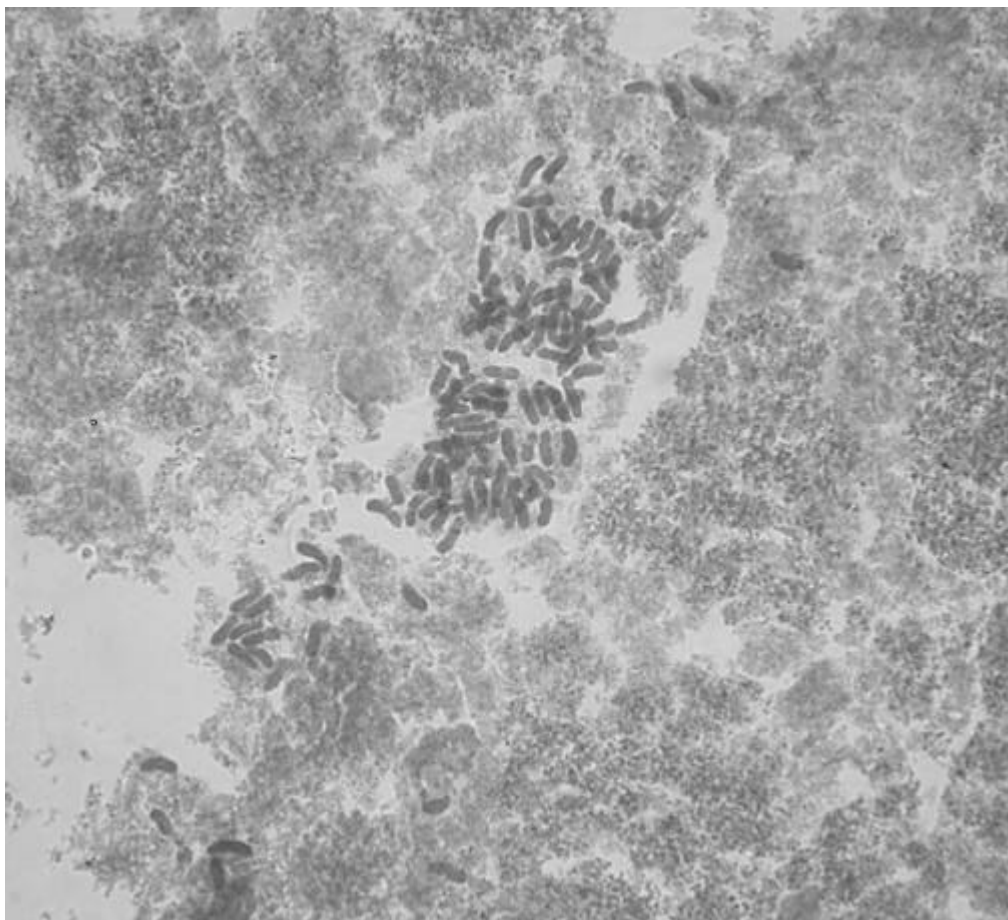
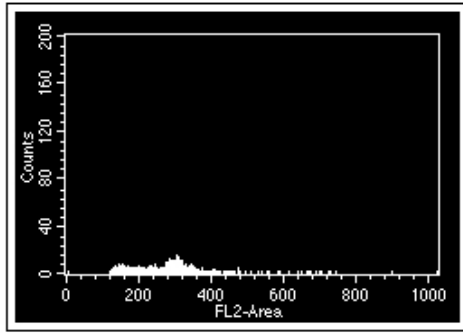
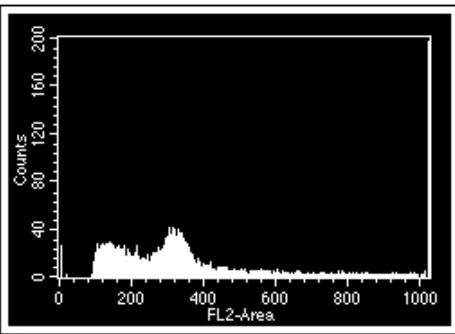
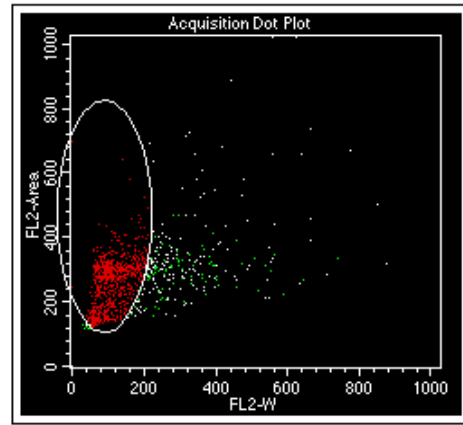
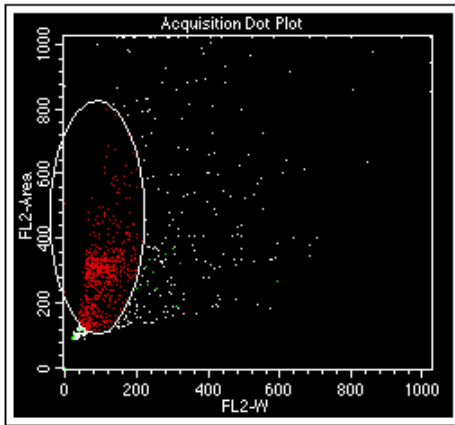


圖 2-6、細葉狗脊蕨體細胞之染色體 ( $2n=ca. 126$ )

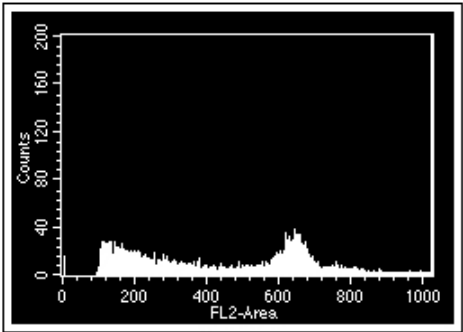
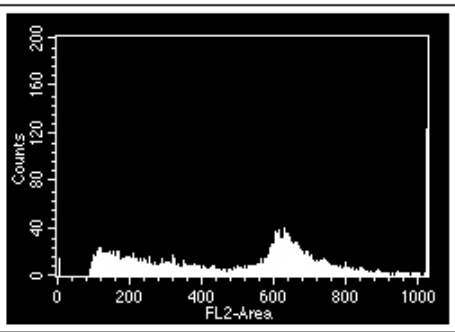
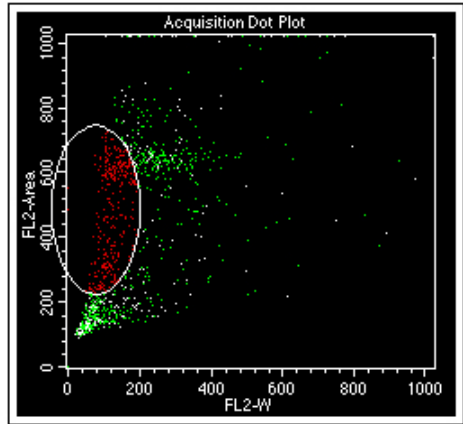
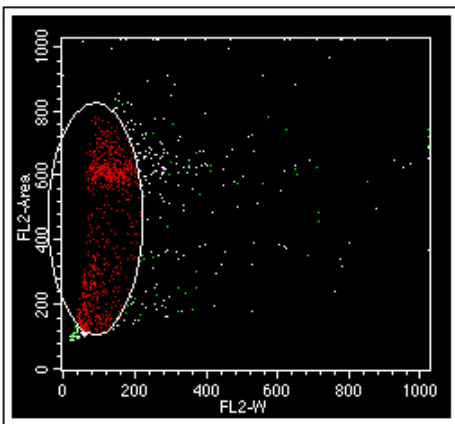
除了直接的細胞學觀察外，根據已知染色體數的個體（族群），以流式細胞技術比對細胞內 DNA 含量（C value）方法，檢測其他族群個體之染色體套數，以推估其倍體性。判讀方法為利用 PI（Propidium Iodide）單染後之 DNA 直方圖上二倍體峰（G1 細胞）落點位置（FL2-W 值），與已知倍體性個體之二倍體峰落點位置比較，以推估其倍體性。C value 推算方法為同時檢測已知 C value 值之物種（如煙草）之二倍體峰落點位置，比對 FL2-W 值後乘上該物種 C value 即得之。本研究共檢測台灣地區 3 個族群 18 個個體，其中哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各 9 個個體，中國大陸廣東省新會地區 2 個哈氏狗脊蕨族群 5 個個體，福建省南靖地區哈氏狗脊蕨 1 個個體，以及香港大東山地區哈氏狗脊蕨族群 5 個個體。結果如圖 2-7 及 2-8 所示，經由與已知 C value 之煙草（*Nicotiana tabacum* L.）比對後，取自大陸廣東省新會地區哈氏狗脊蕨族群的 C value 約為 11 pg，台灣、香港及大陸福建地區哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群則都落在 20 至 23 pg 範圍。已知其中取自台灣北部烏來地區細葉狗脊蕨個體為四倍體（圖 2-6），據此推算台灣、香港及大陸福建地區所產哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨個體皆為四倍體，而中國大陸廣東省新會地區 2 個哈氏狗脊蕨族群則都為二倍體。

由細胞學直接觀察，配合流式細胞儀檢測 C value 間接推算各族群個體染色體套數之結果，可以發現哈氏狗脊蕨實包含兩種不同倍體性的族群，其中二倍體類群僅見於大陸廣東省新會一帶，而四倍體類群則見於台灣及大陸香港與福建的族群（圖 2-9）。具有不同染色體套數的蕨類植物複合種群常可發現不同倍體性個體共域分布或生育於鄰近地區（Ohta & Takamiya, 1999; Shinohara et al., 2006），由於倍體性差異使其無法交配，或交配後之孢子體不正常的減數分裂而無法產生可孕的孢子，因而阻隔不同倍體性類群間之基因交流。台灣北部 3 個細葉狗脊蕨族群的細胞學觀測結果都顯示為四倍體，而與其共域分布的哈氏狗脊蕨亦為四倍體，因此哈氏



a

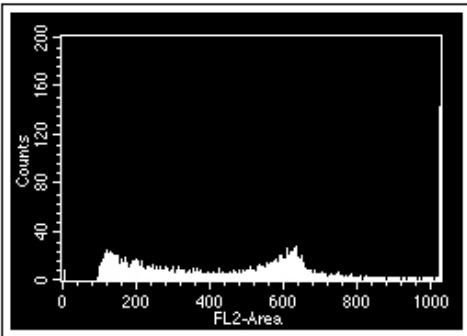
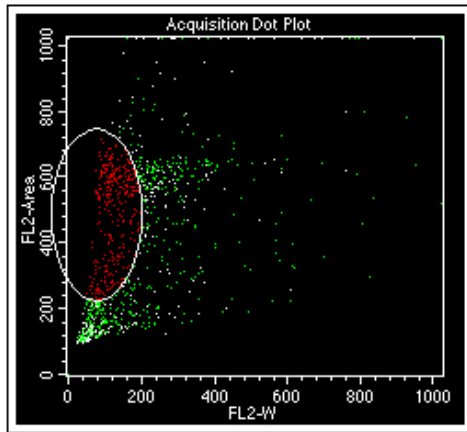
b



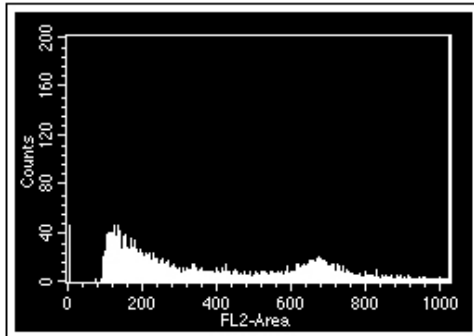
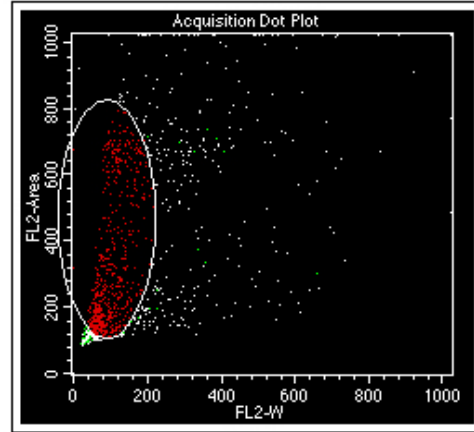
c

d

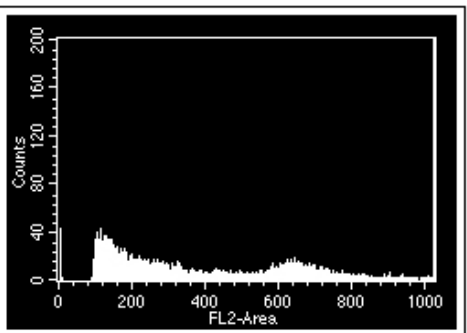
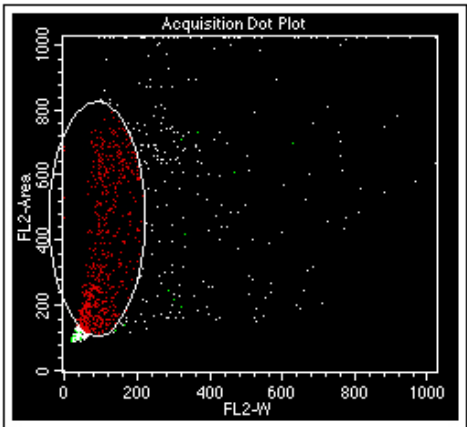
圖 2-7、哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨細胞內 DNA 含量 (C value) 檢測結果。a: 大陸廣東省新會五指山哈氏狗脊蕨；b: 大陸廣東省新會大圓嶺哈氏狗脊蕨；c: 台灣烏來地區哈氏狗脊蕨；d: 台灣烏來地區細葉狗脊蕨



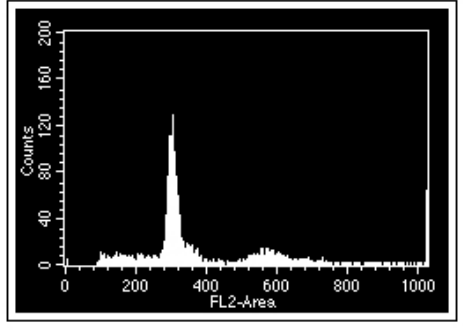
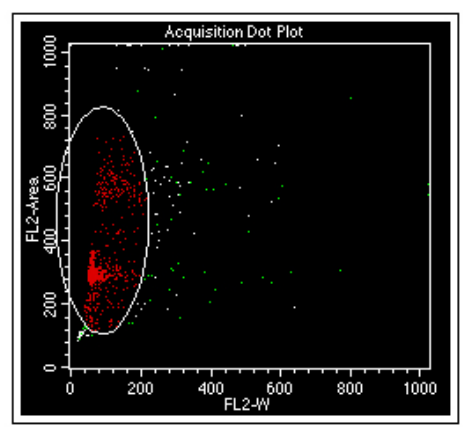
a



b



c



d

圖 2-8、哈氏狗脊蕨與 煙草細胞內 DNA 含量 (C value) 檢測結果。a: 大陸福建省南靖哈氏狗脊蕨 ; b: 香港哈氏狗脊蕨 ; c: 台灣貢寮地區哈氏狗脊蕨 ; d: 煙草 (*Nicotiana tabacum* L.)

狗脊蕨與細葉狗脊蕨間並無染色體倍體性差異以形成生殖上的隔離。因此若共域分布的此二形態種確實為獨立的分類群，則應有其他生殖隔離的機制，例如哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨的染色體具有不整倍體性的差異，而此需更多兩種類群個體的直接染色體數觀察結果予以驗證。

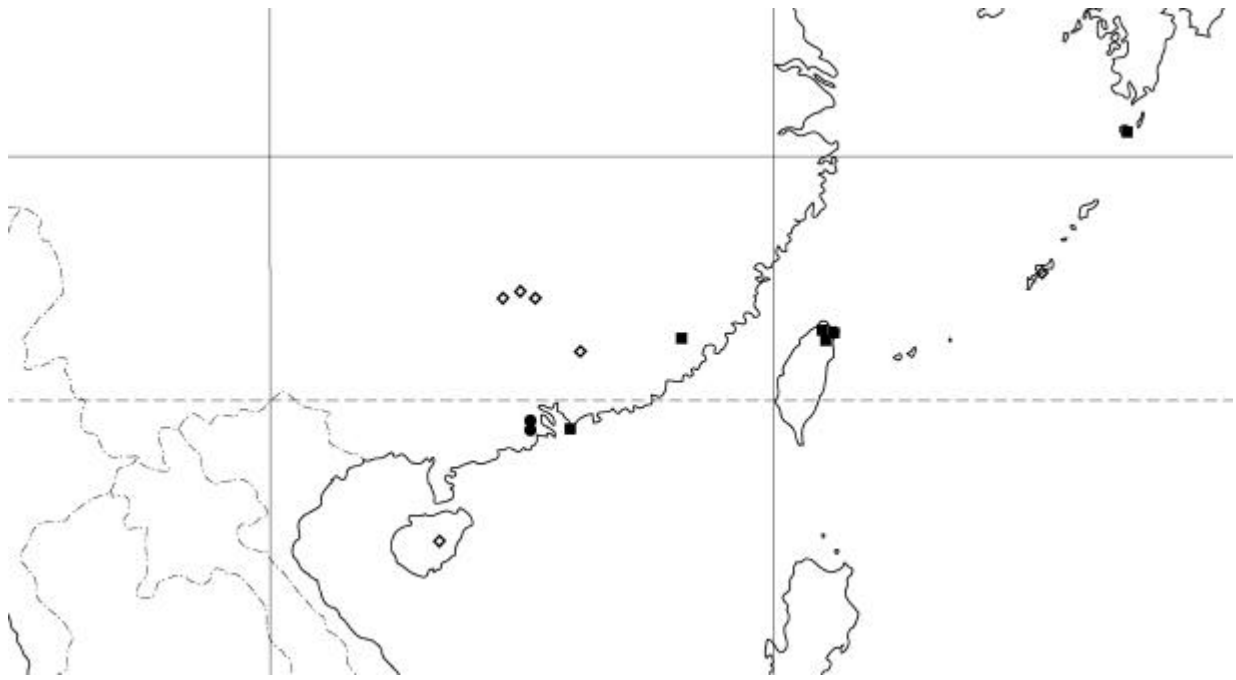


圖 2-9、哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨體細胞型之地理分布。實心圓表示二倍體，實心正方形表示四倍體，空心菱形表示未知細胞型之 DNA 分子材料採樣族群。

#### 四、DNA 分子證據

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨二段葉綠體基因區間片段 (*atpB-rbcL* 及 *trnS-rps4*) 合併後共計長 1,313 bp, 具有 21 個多型性位點, 全為點突變 (Point mutation), 合計共獲得 15 個單套基因型 (表 2-2) 利用 MEGA 4 程式 (Tamura et al., 2007) 以鄰接法 (Neighbor joining, NJ), 以及利用 MrBayes 3.0b4 程式 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) 軟體進行貝葉氏法 (Bayesian inference analysis) 分析, 建構哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨葉綠體單套型間之親緣關係。分析時選用分布於台灣之同屬另三種 (狗脊蕨 (*Woodwardia japonica*)、台灣狗脊蕨 (*W. orientalis* var. *formosana*) 及頂芽狗脊蕨 (*W. unigemmata*)) 作為外群, 所建構之親緣關係樹如圖 2-10。兩種分析方法所建構的親緣關係樹基本上是一致的, 哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨個體於此單套基因型之親緣關係樹中形成一單系群, 而此單系群可以再區分為兩大分支 (C1-C2 及 C3-C15), 細葉狗脊蕨僅見於 C1-C2 分支, 四倍體類群亦僅見於此一分支, 而 C3-C15 分支包含所有二倍體類群。由已知二倍體與四倍體族群個體分別僅出現在此二分支之其一 (圖 2-10), 透露葉綠體 DNA 的演化與染色體套數有關, 而大陸南嶺地區 (CNh1) 及海南島 (CHh) 哈氏狗脊蕨族群的單套基因型同時分布於 C1-C2 (CNh1-C1 及 CHh-C1) 及 C3-C15 (CNh1-C3、CNh1-C5、CNh1-C13 及 CHh-C4) 分支中, 顯示二倍體與四倍體間似乎仍有一定程度的基因交流。

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨細胞核基因 *pgiC* Intron 14-15 片段計長 349 至 352 bp, 具有 3 處 Indel 及 12 個多型性位點, 其中具系統演化訊息位點有 6 個, 合計共有 12 個單套基因型 (表 2-3) 利用 MEGA 4 程式 (Tamura et al., 2007) 以鄰接法, 以及利用 MrBayes 3.0b4 程式 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) 軟體進行貝葉氏法分析, 建構哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨細胞核單套基因型間之親緣關係。分析時亦選用分布於台灣之同屬另三種 (狗脊蕨、

表 2-2、 The variable loci (base substitution) of chloroplast *atpB-rbcL* and *trnS-rps4* intergenic spacer sequences

Haplotype	Variable sites																				
	<i>atpB-rbcL</i> intergenic spacer											<i>trnS-rps4</i> intergenic spacer									
	1	1	2	3	3	4	4	4	5	6	7	0	1	1	2	2	3	3	3	3	3
	1	4	5	1	2	5	6	8	5	4	8	6	0	8	2	5	2	5	6	7	7
	0	1	7	8	1	2	8	1	3	6	6	1	6	6	5	7	7	6	7	1	8
C1	C	C	T	C	C	G	T	G	A	G	G	C	A	G	A	G	T	C	T	C	G
C2	C	C	T	C	C	G	T	G	A	G	G	C	A	G	A	G	T	C	C	C	G
C3	C	C	T	C	C	G	T	G	A	G	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C4	C	C	T	C	T	G	T	G	A	G	A	A	G	G	G	G	T	T	C	T	A
C5	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C6	C	C	T	C	T	A	C	G	G	G	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C7	C	T	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C8	C	C	T	C	T	A	C	A	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C9	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	C	C	C	T	G
C10	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	A	C	C	C	T	G
C11	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	C	G
C12	C	C	C	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	C	G
C13	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	A	G	A	G	T	C	T	C	G
C14	C	C	T	T	T	A	C	G	G	A	G	C	A	A	A	G	T	C	C	C	G
C15	T	C	T	C	T	G	C	G	G	A	G	C	A	G	A	G	T	C	C	C	G

台灣狗脊蕨及頂芽狗脊蕨) 作為外群，所建構之親緣關係樹如圖 2-11。哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨個體於核 *pgiC* Intron 14-15 基因片段所建構親緣關係樹中歸於一單系群，而此單系群再區分為三大分支 (A、B 及 C)，可信度分析支持率在 93% 以上。檢視 A、B 及 C 三群之序列變異位點分布情形 (表 2-3)，可以發現其各具有 3 個以上變異位點或 Indel 是僅見於某一群者，如位點 101 為 G、位點 240-241 為 A 及位點 293 為 C 等組合為 A 群所特有的組合。相較於 C 群基因型序列，A 群基因型在位點 241 為缺失位點，B 群基因型則具有 240、241 及 293 等 3 處位點的缺失。

所有檢測樣品除了採自大陸廣東省新會一帶 2 個族群的個體 PCR 後可以直接定序外，其餘地區樣品皆需進行 cloning，以獲得單一序列。所有大陸廣東省新會地區二倍體之個體均僅具有 A 群基因型，其他地區族群個體則至少具有 A、B 及 C 等 3 群基因型中任二群之序列 (圖 2-11)，如台灣烏

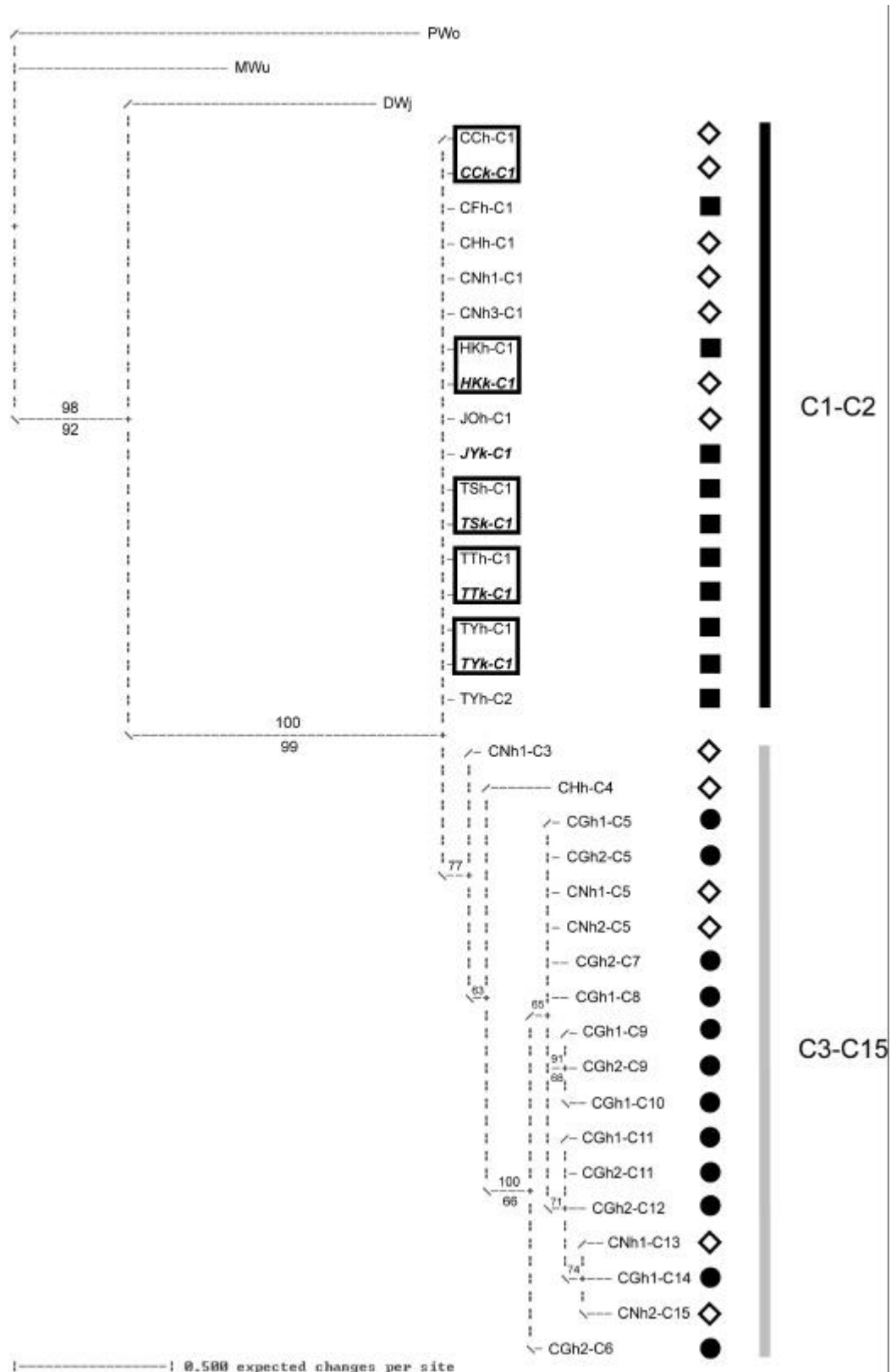


圖 2-10、根據葉綠體 *atpB-rbcL* 及 *trnS-rps4* 基因區間片段 DNA 以貝葉氏分析法 (BI) 所建構之親緣關係樹。實心圓表示二倍體，實心正方形表示四倍體，空心菱形表示未知細胞型之 DNA 分子材料採樣族群。節點上方數值為貝葉氏分析之機率值，下方數值為鄰接法之 Bootstrap 支持度。方框表示共域分布之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨。

Table 2-3、The variable loci (indel & base substitution) of *pgiC* intron 14-15 sequences

Haplotype	Occuring ploidy		Variable sites														
			0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	
	4x	2x	9	0	1	2	3	3	2	4	4	5	6	7	8	8	9
C	v		A	C	A	A	C	G	C	A	G	T	A	A	C	T	T
B1	v		T	<b>T</b>	A	A	C	<b>A</b>	<b>T</b>	-	-	T	A	A	C	T	-
B2	v		T	<b>T</b>	A	A	C	<b>A</b>	<b>T</b>	-	-	T	A	<b>G</b>	C	T	-
A1	v	v	T	<b>G</b>	A	A	C	G	C	A	-	C	A	A	C	T	<b>C</b>
A2	v	v	T	<b>G</b>	<b>G</b>	A	C	G	C	A	-	C	A	A	C	T	<b>C</b>
A3	v	v	T	<b>G</b>	<b>G</b>	A	C	G	C	A	-	T	A	A	C	T	<b>C</b>
A4		v	T	<b>G</b>	A	A	C	G	C	A	-	T	A	A	C	T	<b>C</b>
A5		v	T	<b>G</b>	A	A	<b>T</b>	G	C	A	-	T	A	A	C	T	<b>C</b>
A6		v	T	<b>G</b>	<b>G</b>	A	<b>T</b>	G	C	A	-	T	A	A	C	T	<b>C</b>
A7	v	v	T	<b>G</b>	A	A	C	G	C	A	-	T	A	A	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>
A8		v	T	<b>G</b>	A	<b>G</b>	C	G	C	A	-	T	A	A	C	T	<b>C</b>
A9	v		T	<b>G</b>	A	A	C	G	C	A	-	T	<b>G</b>	A	C	T	<b>C</b>

來地區檢測的哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨所有個體均同時具有 A1 及 B1 兩種序列，而香港地區族群則都同時具有 A1、B1 及 C 序列。由已知染色體倍體性之族群樣品於細胞核基因型親緣關係樹之分布情形 (圖 2-11)，除了二倍體族群僅具有 A 群基因型外，其餘已知四倍體都至少具有 2 群之基因型，其餘未知倍體性族群檢測個體亦都具有 2 群以上之基因型。根據此細胞核基因型親緣關係與細胞學證據，推測已採集檢測樣品中，除了大陸廣東省新會地區 2 族群為二倍體外，其他地區族群皆為四倍體，且為異源四倍體 (allotetraploid)，而其基因體組成推測二倍體為 AA，四倍體類群則有 AABB、BBCC 及 ACBB 等 3 種 (圖 2-12)。

細葉狗脊蕨 (所有個體基因體組成皆為 AABB) 除了採自日本九州屋久島的族群具有 A1、A7 及 B1 基因型外，其餘細葉狗脊蕨族群基因體型都僅具有 A1 及 B1 基因型，ACBB 基因體型絕多數族群則都由 A1、B1 及 C 基因型組成，僅香港地區族群具有由 A1、B2 及 C 組成基因體型之個體，而同一地區共域分布的哈氏狗脊蕨則都擁有與細葉狗脊蕨一致的基因體型。此結果與葉綠體基因型於哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨的族群分布情形相吻合，顯示此二種外型不同的「類群」在遺傳組成上並無差異，彼此間基因

交流顯然並無阻礙，此暗示這兩種形態種並無生殖上的隔離機制，因此遺傳組成並無差異。哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨的親緣關係情形恰與 Yatabe 等（2001）所研究山蘇花（*Asplenium nidus*）複合群植物案例相反，其研究顯示外形相似的山蘇花複合群其實包含 3 種具有不同葉綠體基因型且彼此生殖隔離的隱藏種（cryptic species）。Perrie & Brownsey（2005）研究的紐西蘭產虎克氏鐵角蕨（*Asplenium hookerianum*）複合種群則具有與類似哈氏狗脊蕨及與細葉狗脊蕨的情形，其發現兩個先前被認為不同種但共域分布的類群，雖然擁有明顯可分的羽片外形，然分子證據顯示共域分布的「兩種」總是具有一致或較類似遺傳組成，此種情況與本研究之類群相同。

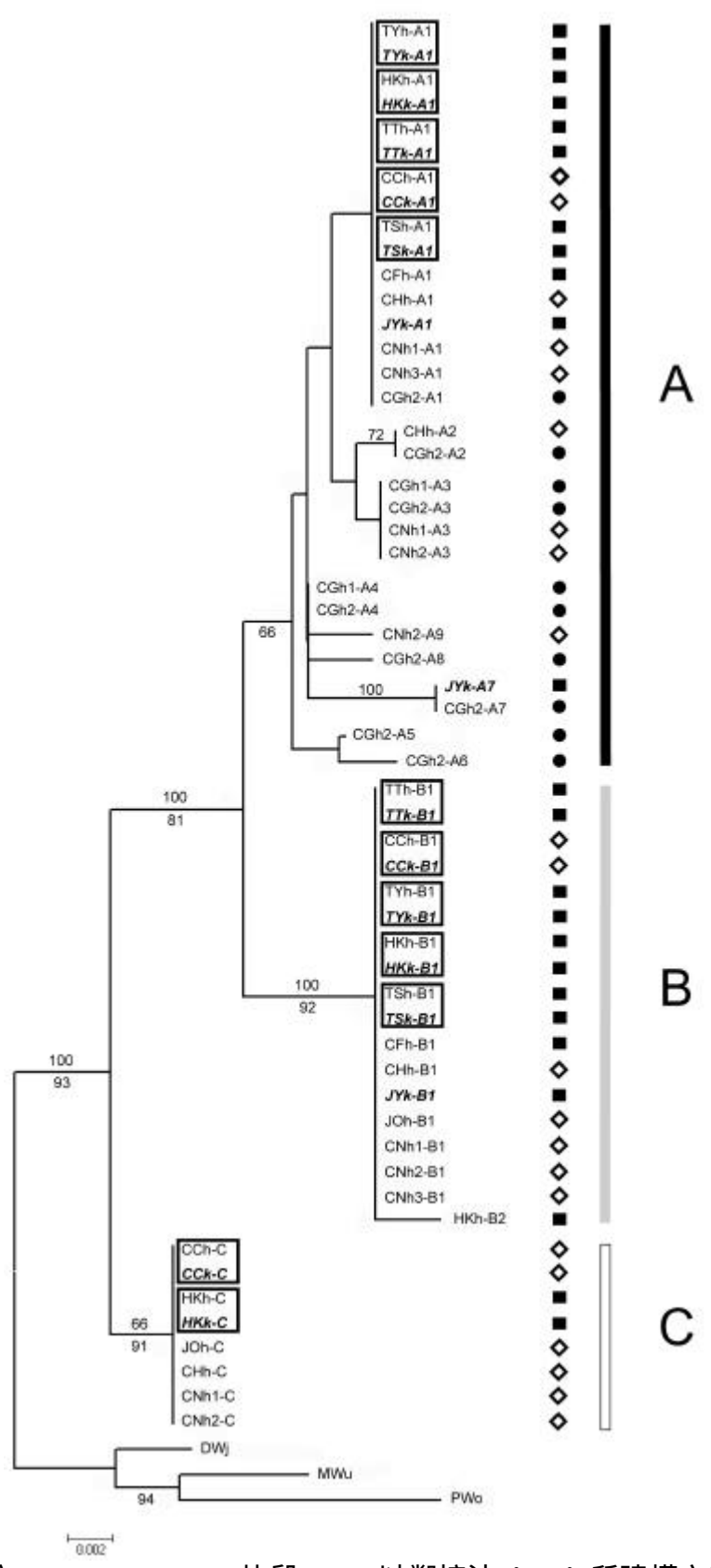


圖 2-11、根據核 *pgiC* Intron 14-15 片段 DNA 以鄰接法 (NJ) 所建構之親緣關係樹。實心圓表示二倍體，實心正方形表示四倍體，空心菱形表示未知細胞型之 DNA 分子材料採樣族群。節點上方數值為貝葉氏分析之機率值，下方數值為鄰接法之 Bootstrap 支持度。方框表示共域分布之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨。

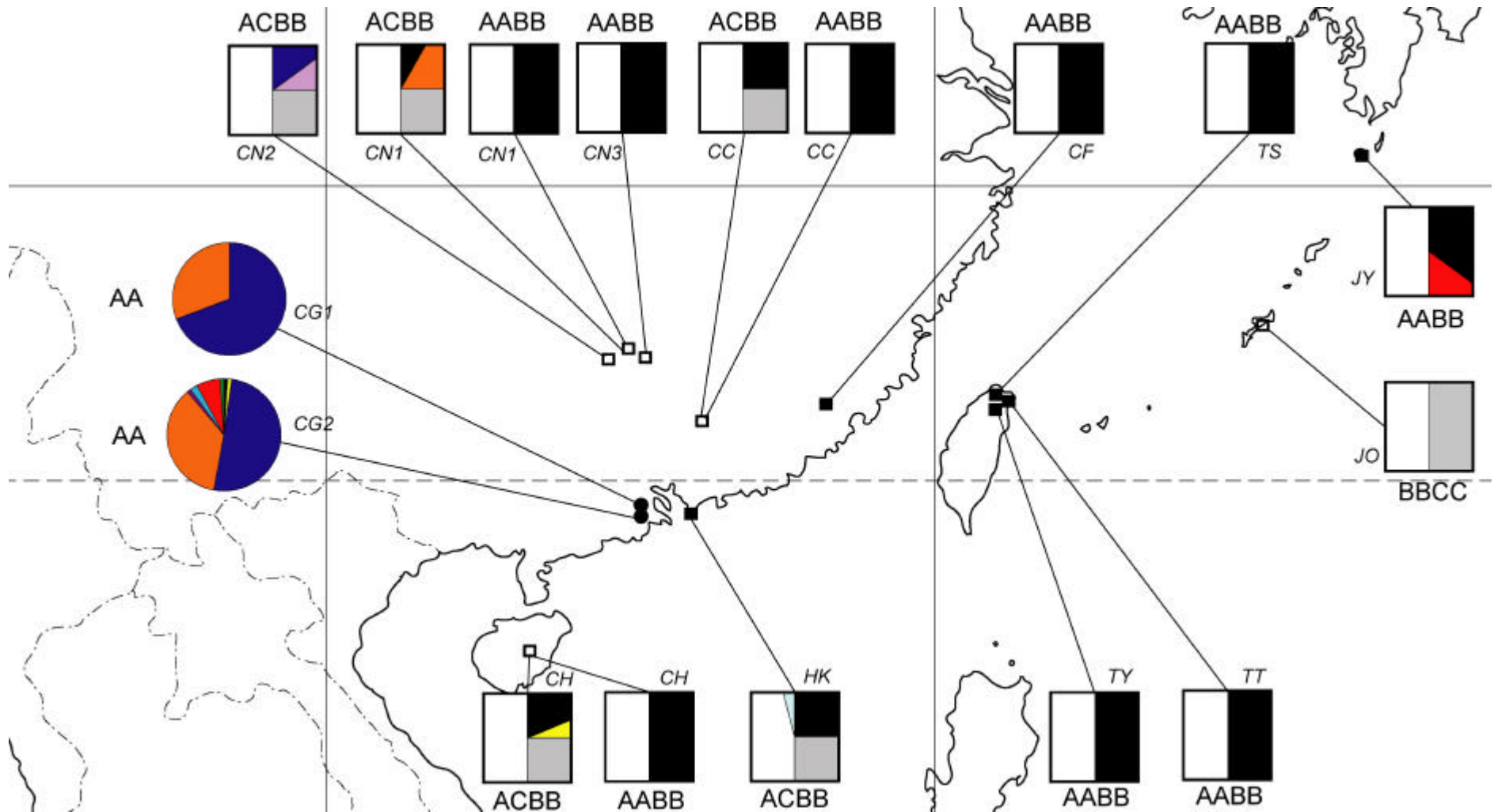


圖 2-12、核 *pgiC* Intron 14-15 片段單套基因型之地理分布。圓形餅圖顯示二倍體類群之基因型種類與頻率，方形餅圖顯示四倍體類群基因型種類與推測之頻率，餅圖旁之組合字母顯示推測之基因體型，斜體字與數字組合則為族群代碼。

## 肆、結論

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨為系統演化關係最近緣的姊妹群，而不管是地理分布或生育環境都高度重疊，台灣地區族群的調查結果顯示其經常混生或緊鄰生長，因此若此二分類群確為生物學上的不同種類，則其間應具有足夠的生殖隔離，方能維持此形態有所差異的群體為二個獨立之分類群。若無有效的生殖隔離機制，則兩者或僅只是不同表現型（葉片分裂形式不同）的同一分類群，其形態上的差異或另有其他因子所調控。

共域分布的哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨具有幾為一致的物候現象，此將影響孢子釋放後孢子萌發與配子體發育的時間，因此此二類群並無物候表現的差異以形成生殖上的隔離。細胞學證據顯示，除了中國大陸廣東省新會地區之族群為二倍體外，其餘檢測的哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群皆為四倍體，其中台灣地區更有多處是屬於共域生長的族群，因此哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨間並無染色體倍體性差異以形成生殖上的隔離。在分子生物學證據方面，細葉狗脊蕨葉綠體基因片段僅發現 C1 此一與共域分布哈氏狗脊蕨一致的單套基因型，細胞核基因片段方面，細葉狗脊蕨族群亦都具有與共域分布哈氏狗脊蕨一致的基因體型，因此分子證據顯示此二種外型不同的類群在遺傳組成上並無差異，彼此間基因交流顯然並無阻礙。哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨除了外在表形的差異外，其他證據都顯示其並非獨立的好分類群。相對地，二倍體的哈氏狗脊蕨與其他四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨之間，不管是地理分布與倍體性差異都顯示其為不同的分類群，而分子證據更顯示其間具有明顯的遺傳分化。因此哈氏狗脊蕨複合種群實包括二倍體的哈氏狗脊蕨與四倍體的哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨，目前證據顯示二倍體哈氏狗脊蕨是可與四倍體的哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨區分的不同生物種，而研究結果顯示四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨之間除少數形態特徵外，並無法有效隔離機制區別為獨立的分類群，因此在獲得更多生物學

直接證據支持前，先暫以四倍體哈氏狗脊蕨複合群稱之。

## 伍、參考文獻

吳兆洪 . 1999 . 烏毛蕨科 . 中國植物志 4(2):192-215.

秦仁昌 . 1964 . 崇樹蕨屬(*Chieniopteris* Ching)—中國蕨類植物的一新屬 . 植物分類學報 9(1):37-40, pl. 4.

郭城孟 . 1998 . 台灣蕨類植物區系之研究 . 於邱少婷及彭鏡毅 (主編), 海峽兩岸植物多樣性與保育論文集 , pp. 9-19 , 國立自然科學博物館 , 台中 .

裘佩熹 . 1974 . 亞洲大陸狗脊蕨屬的分類研究 . 植物分類學報 12(2):237-248.

嚴岳鴻、秦新生、邢福武 . 2004 . 廣東古兜山自然保護區蕨類植物群落的特徵 . 熱帶亞熱帶植物學報 11(1): 59-63.

Arens, N. C. 2001. Variation in performance of the tree fern *Cyathea cracasana* (Cyatheaceae) across a successional mosaic in Andean cloud forest. *Am. J. Bot.* 88: 545–551.

Chiou, W.-L., W.-C. Shieh, and C. E. DeVol. 1994. Blechnaceae. *In* Huang, T.-C. et al (eds.), *Flora of Taiwan*, 2nd ed., Vol. 1, pp. 266-279.

Christensen, C. 1934. *Index Filicum Supplement tertium pro annis 1917-1933.* Hafniae, Hagerup

Cox, C. B. and P. D. Moore. 2000. *Biogeography: an ecological and evolutionary approach*, 6th ed. John Wiley & Sons, N.Y.

Cranfill, R. B. 2001. *Phylogenetic Studies in the Polypodiales (Pteridophyta) with an Emphasis on the Family Blechnaceae.* Ph.D. thesis, Univ. California, Berkeley.

Cranfill, R. B. and Kato, M. 2003. Phylogenetics, biogeography and classification of the woodwardioid ferns (Blechnaceae). *In* Chandra, S. &

- Srivastava, M.(eds.), Pteridology in the New Millennium, pp. 25–48. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ennos, R. A., W. T. Sinclair, X.-S. Hu and A. Langdon. 1999. Using organelle makers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In P. M. Hollingsworth, R. M. Bateman and R. J. Gornall (eds.), Molecular systematics and plant evolution, pp. 1-19., Taylor & Francis, London.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics Applications Note*: 17: 754 -755.
- Ishikawa, H., Y. Watano, K. Kano, M. Ito and S. Kurita. 2002. Development of primer sets for PCR amplification of the *PgiC* gene in ferns. *J. Plant Res.* 115: 65–70.
- Iwatsuki, K.1995. Blechnaceae. *In* Iwatsuki, K. et al. (eds.), *Flora of Japan*, Vol. I: Pteridophyta and Gymnospermae, pp. 112-115., Kodansha Ltd., Tokyo.
- Kramer, K. U. 1990. Blechnaceae. *In* Kramer, K. U. and P. S. Green (eds.), *The families and genera of vascular plants*, Vol. I: Pteridophytes and gymnosperms. pp. 60-68., Springer-Verlag, Berlin.
- Kuo, C.-M. 1985. Taxonomy and phytogeography of Taiwanese pteridophytes. *Taiwania* 30:5-100.
- Lee, P.-S., T.-T. Lin and W.-L. Chiou. 2009. Phenology of 16 species of ferns in a subtropical forest of northeastern Taiwan. *J. Pl. Res.* 122: 61-67.
- Masamune, O. 1930. Contribution to our knowledge of the flora of the southern part of Japan, II. *J. Soc. Trop. Agric.* 2(2):151.
- Mehlreter, K. and M. Palacios-Rios. 2003. Phenological studies of *Acrostichum danaefolium* (Pteridaceae, Pteridophyta) at a mangrove site on the Gulf of Mexico. *J. Trop. Ecol.* 19: 155–162.
- Ohta, N. and M. Takamiya. 1999. Taxonomic studies of the *Diplazium mettenianum* complex (Woodsiaceae: Pteridophyta) in Japan: morphology, cytology and taxonomy of plants with normal-shaped spores. *J. Plant. Res.* 112: 67-86.

- Perrie, L. R. and P. J. Brownsey. 2005. Genetic variation is not concordant with morphological variation in the fern *Asplenium hookerianum* sensu lato (Aspleniaceae). *Am. J. Bot.* 92:1559-1564.
- Sharpe, J. M. 1997. Leaf growth and demography of the rheophytic fern *Thelyperis angustifolia* (Willdenow) Proctor in a Puerto Rican rainforest. *Pl. Ecol.* 130: 203–212.
- Shinohara, W., T.-W. Hsu, S.-J. Moore and N. Murakami. 2006. Genetic analysis of the newly found diploid cytotype of *Deparia petersenii* (Woodsiaceae: Pteridophyta): evidence for multiple origins of the tetraploid. *Int. J. Pl. Sci.* 167(2): 299-309.
- Smith, J. 1875. *Historia filicum*. MacMillan & Co., London.
- Stuessy, T. F. 1990. *Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data*. Columbia Univ. Press, New York.
- Tagawa, M. 1936. A review of the genus *Woodwardia* of Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 5(3): 167-178.
- Takamiya, M., K. Osato and K. Ono. 1992. Karyomorphological studies on *Woodwardia* sensu-lato of Japan. *Bot. Mag. (Tokyo)* 105: 247-263.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Yatabe, Y., S. Masuyama, D. Darnaedi and N. Murakami. 2001. Molecular systematics of the *Asplenium nidus* complex from Mt. Halimun National Park, Indonesia. Evidence for reproductive isolation among three sympatric *rbcL* sequence types. *Am. J. Bot.* 88: 1517-1522.

### 第三章 哈氏狗脊蕨複合種群之生殖生物學研究

#### 壹、前言

蕨類植物的配子體階段從孢子發芽、配子體發育模式、配子體形態、配子囊發生行為到孢子體形成方式，不同物種會有不同的模式，甚至同種不同染色體套數類群（通常為不同亞種或變種）間，即具有不同的模式。蕨類植物的配子體形態與行為容易被分類學者所忽視（Nayar & Kaur, 1971; Haufler, 2002），然而不同的配子體形態與發育形式除了與分類群有關外，配子體的生殖行為更與物種的演化有關，並影響物種間與族群間遺傳組成樣式（Haufler, 2002）。蕨類植物藉由孢子進行長距離的傳播，其繁衍主要發生在有性階段的配子體，僅有少數種類是依賴配子體行營養增殖而不形成孢子體的(Wagner & Wagner, 1966; Farrar, 1990)，或僅見孢子體之無性繁殖而無孢子的產生(Walker, 1979)。由於孢子體與配子體彼此皆可獨立存活，所以兩種階段的生物學性質與蕨類植物的地理分布都有關連(Kato, 1993)，而配子體的分布範圍甚至遠大於孢子體(Farrar, 1990)。

Nayar & Kaur (1971)對於蕨類配子體發育的型式做過完整而系統性的討論與分類，並認為早期配子體的發育型式可作為科以上的分類標準，其將同型孢子蕨類分成 7 種發育型式：鐵線蕨型(*Adiantum* type)、三叉蕨型(*Aspidium* type)、水蕨型(*Ceratopteris* type)、槲蕨型(*Drynaria* type)、*Kaulinia* 型(*Kaulinia* type)、觀音座蓮舅型(*Marattia* type)及紫萁型(*Osmunda* type)。烏毛蕨科配子體的發育型式有三叉蕨型與鐵線蕨型兩類(Nayar & Kaur, 1971; 邱文良, 1989)，Stone(1969)曾觀察過狗脊蕨屬 3 種 1 變種(*W. Japonica*, *W. orientalis*, *W. orientalis* var. *prolifera* & *W. martinezii*)的配子體發育，而國內學者邱文良(1986)則觀察台灣狗脊蕨(*W. orientalis* var. *formosana* = *W. prolifera*)的配子體，所獲得的發育型式都屬於三叉蕨型。

蕨類植物形成的孢子有同型孢子(homospore)與異型孢子(heterospore)兩類，同型孢子可以發育成同時具有雌雄配子囊的兩性配子體，或僅具雌或雄配子囊的單性配子體，而異型孢子中的大、小孢子則分別發育成分別只具有雌、雄配子囊的配子體。由於同型孢子潛在可以發育成能獨立生活與兩性的配子體，並可單獨自交產生孢子體，因此理論上同型孢子蕨類可藉由單一孢子傳播而形成新的族群(Klekowski, 1969)。實際上新的族群能否建立，除受外在生育環境條件影響外，主要受內在的生殖配育系統(mating systems)所控制。蕨類植物有性生殖的配育系統可區分為三類(Klekowski, 1979; Haufler, 2002)：1)同配子體自交(intragametophytic selfing)，即孢子體由同一配子體之精、卵結合而產生；2)異配子體自交(intergametophytic selfing)，即孢子體由來自同一孢子體之不同配子體的精、卵結合而產生；3)異配子體異交(intergametophytic crossing)，即孢子體由不同配子體的精、卵結合而產生，且此二配子體分別來自不同的孢子體。後兩種又合稱為異配子體交配(intergametophytic mating)。在維管束植物中，同配子體自交僅可能發生在同形孢子蕨類植物，其結果是絕對的同質性基因配對(homozygous)，相對地異配子體交配則有助於異質性(heterozygous)後代的形成(Klekowski, 1973; 邱文良, 1998)。同配子體自交雖然有利於同形孢子蕨類植物長距離的族群擴大，然有些種類具有自交不親和系統，無法藉由單一孢子的散播而建立新族群。其他種類雖然具有自交親和性，但是完全同質性的基因組合卻會立即顯現潛在隱性致死基因的效應，可能造成孢子體的死亡或發育不正常，因此 Klekowski (1972) 提出遺傳負荷(genetic load)假說，以推算植物體內隱性致死基因比例。

蕨類植物的配育系統類型與其生育地環境有關 (Soltis et al., 1991)，針對不同棲地環境蕨類植物配育系統的研究顯示，生育於先驅性環境的蕨類植物通常具有較低的遺傳負荷(Lloyd, 1974)，因此多數先驅性環境的蕨類可

以經由同配子體自交快速而大量地建立族群，而其他環境的蕨類則傾向異配子體交配(Christ & Farrar, 1983; Chiou et al., 2000)。許多著生性蕨類具有長壽且可形成群落(clone)的配子體，其藉由營養增殖擴大所佔據的面積，並延長生存的時間，除了可以拉近與其他配子體的距離外，並可增加與其他配子體進行異配子體交配的時間及機會(Chiou & Farrar, 1997; Dassler & Farrar 1997, 2001; Chiou et al., 1998)。此外，有些物種其配子體可行分芽繁殖，藉由新長出的分芽體( proliferous prothallium )取代原有老化的配子體，使其壽命得以延續，增加異配子體交配的機會。因此，觀察配子體的形態發生過程，可使蕨類植物配育系統的研究更為完整。

配子體的生殖行為對蕨類植物的存活與族群消長具有關鍵影響，並與族群的遺傳多樣性有關，因此欲探討特定蕨類物種現今的族群分布模式與遺傳組成關係，首先必須清楚其配子體階段的生殖行為，也就是需要明瞭其配育系統，方可能針對物種分布與遺傳組成提出一合理之解釋。蕨類植物的配育系統與染色體倍體性( ploidy )亦有關聯，近年來的研究結果顯示，二倍體物種傾向於異配子體交配，且具有較高的遺傳負荷；多倍體物種則傾向於同配子體自交或無配生殖( apogamy )，並具有較低的遺傳負荷( Masuyama, 1979; Hedrick, 1987; Masuyama et al., 1987; Masuyama & Watano, 1990; Chiou et al, 2000 )。Masuyama ( 1979 )針對日本產短柄卵果蕨( *Phegopteris decursive-pinnata* )的研究更指出染色體倍體性對於蕨類植物配育系統的影響包括配子囊在配子體上位置的差異，其中二倍體類群的藏精器與藏卵器距離較遠，而四倍體類群兩種配子囊距離較近，作者藉此推測雌雄配子囊距離較近的四倍體趨向同配子體自交。綜合蕨類植物倍體性與配育系統關係研究結果顯示，傾向異配交配系統的二倍體物種有利於維持較高的遺傳多樣性組成，而可行同配子體自交或無配生殖的多倍體物種孢子通常比二倍體物種孢子有利於長距離散播並建立新族群，此由多倍

體類群的廣泛分布與分子遺傳學證據獲得驗證 ( Haufler, 2002; Pinter et al., 2002 )。

前人的研究與前一章節的結果指出哈氏狗脊蕨複合種群具有二倍體與四倍體類群 ( Takamiya et al., 1992; Cranfill, 2001 )，其中二倍體類群僅侷限分布於中國大陸廣東省珠江口左岸之新會一帶，已知四倍體類群則分布於日本九州屋久島、台灣北部、中國大陸福建南靖及香港等地區。兩種不同倍體性類群的分布差異是否因為配子體的生殖行為的差異所導致，以及配育系統與遺傳組成分布模式的關係，都需要配合明確的生殖生物學證據，方能獲致合理的解釋，因此本研究首先針對四倍體哈氏狗脊蕨複合種群進行其生殖生物學研究。

## 貳、研究材料及方法

### 一、研究材料：

根據物候學調查結果，於孢子囊群成熟而未散播前 ( 6-8 月 )，每種各採取 2 株不同個體的孢子葉，攜回實驗室後收集成熟孢子，以供後續實驗培養。

### 二、研究方法：

以 2007 年自台灣北部烏來地區採樣之四倍體哈氏狗脊蕨複合種群個體進行試驗，先收集成熟孢子，以不同培養基於 25-30 °C、1000-1500 lux 光照強度及 12 小時光照週期下培養，並進行以下試驗。

#### 1. 孢子發芽率試驗

分別取哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各 2 個植株所收集的孢子，播撒於不織布過濾袋上，下置吸水之水苔保濕，進行光照培養，每週觀察配子體發育狀況，並於不同發育階段畫圖及拍照存證。

#### 2. 配子體形態觀察

分別取哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各 2 個植株所收集的孢子，播撒於

洋菜培養基 ( Grantt & Arnott, 1965 ) 中，進行光照培養，每週觀察配子體發育狀況，並於不同發育階段畫圖及拍照存證。

### 3. 配子囊個體發生觀察

- (1) 分別取哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各 2 個植株所收集的孢子，共 4 個孢子樣品，各撥撒於 4 盆水苔培養基中，進行光照培養。
- (2) 自第 3 週起，每週自每個體孢子樣品 4 盆培養基中分別任取 25 個配子體，記錄其大小及觀察其性別表現。
- (3) 觀察記錄至配子體性別表現無明顯變化止 ( 約為第 18-19 週 )。

### 4. 配育系統試驗：

- (1) 分別取哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各 1 個植株所收集的孢子，共 2 個孢子樣品，各撥撒於 1 大盆水苔培養基中，進行光照培養。
- (2) 於第 3-4 週時，自哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨孢子樣品水苔培養基中各取 48 個配子體 ( 須確認無配子器形成 )，分別獨立培養於以根基旺 ( Kingroot; vermiculite: peat: perlite = 4: 4: 2 ) 為基質之培養小格中 ( 共 96 小格，其中哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各 48 小格 )，進行光照培養，並定時補充水分。
- (3) 同時自哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨體孢子樣品水苔培養基中再各取 48 個配子體 ( 須確認無配子器形成 )，同孢子樣品來源配子體兩兩配對於同一小格之獨立根基旺培養格中 ( 共 48 小格，其中哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各 24 小格 )，進行光照培養，並定時補充水分。
- (4) 同時自哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨個別不同孢子樣品水苔培養基中再各取 48 個配子體 ( 須確認無配子器形成 )，同種不同孢子樣品來源配子體兩兩配對於同一小格之獨立根基旺培養格中 ( 共 48 小格，其中哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨各 24 小格 )，進行光照培養，

並定時補充水分。

(5) 自第 10 週起每隔兩週記錄不同處理所形成的孢子體數量。

## 參、結果與討論

### 配子體形態發生

播撒於洋菜培養基的四倍體哈氏狗脊蕨複合種群孢子 3-5 天後開始發芽，初由豆形孢子膨大成圓球形，孢子殼再裂開發展出假根，1 週後哈氏狗脊蕨孢子發芽率達 91% (表 3-1)，細葉狗脊蕨孢子發芽率更高達 95%。孢子播撒培養 4 週後，配子體漸呈心形外觀 (圖 3-1)，配子體發育至第 7 週具藏卵器的雌配子體首先形成，而至第 10 週時，始觀察到具藏精器的雄配子體發育形成，而孢子體形成則出現在撒播 16 週後。根據 Nayar & Kaur (1971) 對於配子體發育類型的定義，哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨的孢子萌發與配子體發育型式皆屬於「三叉蕨型」(圖 3-1)，這與烏毛蕨科其他種類相同(邱文良，1986；1989)。此外，自配子體絲狀期至幼孢子體階段，都可發現單細胞腺毛散佈於表面或邊緣。此外，體型 5 mm 以上之配子體基部會偶發長出分芽體 (proliferous prothallium)，外型多為帶狀或橢圓形，此分芽體生長較遲緩，多停滯於 30 至 50 個細胞階段。

表 3-1、四倍體哈氏狗脊蕨複合種群孢子發芽率及遺傳負荷試驗結果

Species	發芽率	孢子體產生率*		
		同配自交	異配自交	異配異交
<i>W. harlandii</i>	91%	0 (0/45)	30.56% (11/36)	37.50% (15/40)
<i>W. kempii</i>	95%	0 (0/48)	38.10% (16/42)	34.38% (11/32)
Total	93%	0 (0/93)	34.62% (27/78)	36.11% (26/72)

\* 培養過程中死亡之配子體數已扣除

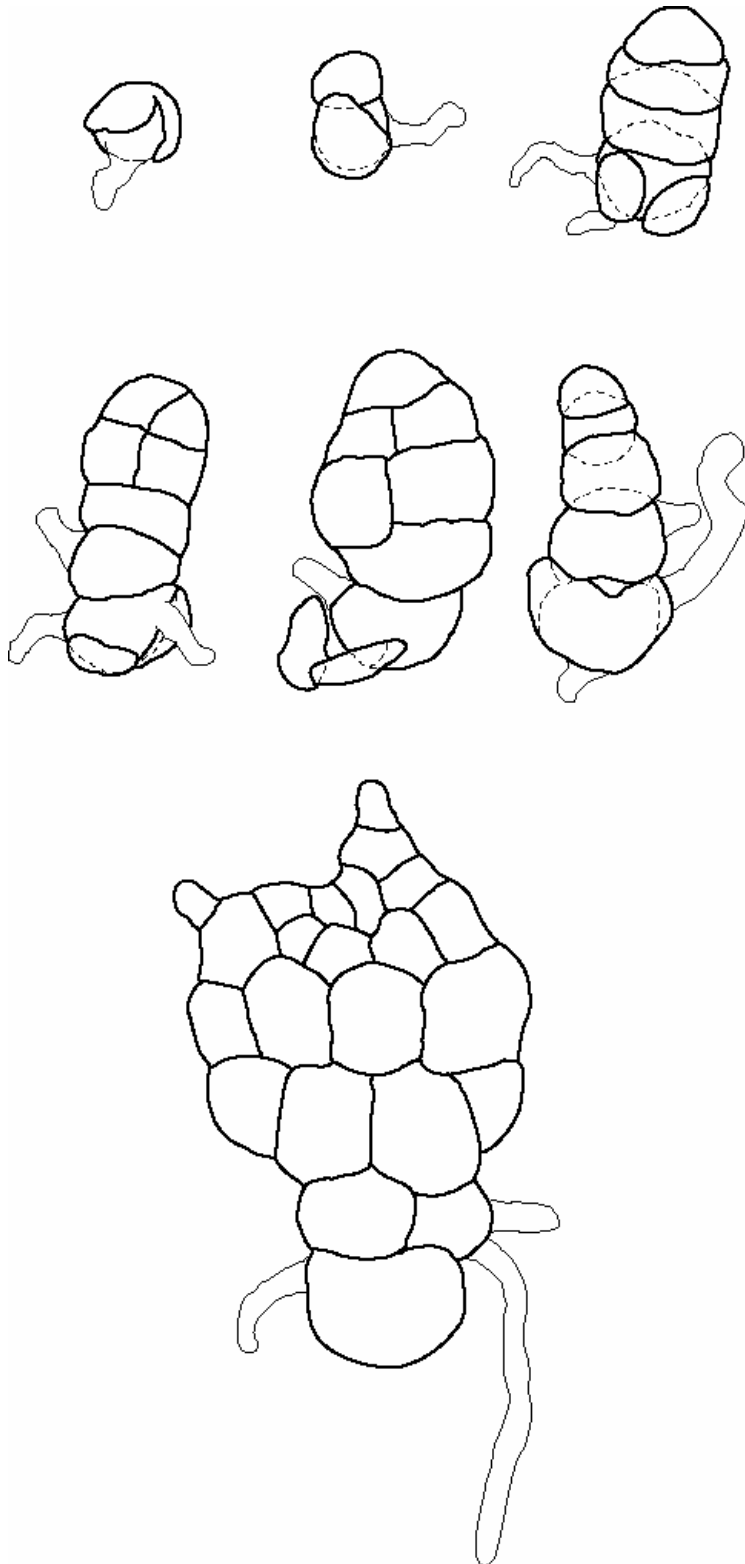


圖 1、四倍體哈氏狗脊蕨複合群之配子體發生，以細葉狗脊蕨為例，ph 為單細胞腺毛。

由表 3-2 可以發現雌雄配子體在體型大小有著極顯著的差異，雄配子體直徑絕大多數小於 4 mm，而以 2 mm 以下的配子體佔最多數；雌配子體體

型分布則大多在 4 mm 以上，2 mm 以下之配子體全無藏卵器發生；大多數兩性配子體體型分布於 3 至 5 mm 範圍，此恰為雌雄配子體體型大小重疊或略傾向雌配子體大小的範圍。藏精器一般發育於中等體型心形配子體（具中肋）邊緣或兩翼之下半部，或小體型配子體（不具中肋）的上下表面各處；藏卵器則集中發育於中大體型配子體分生組織（心形頂端缺刻處）下方的中肋上，多少朝基部彎曲。

表 3-2、哈氏狗脊蕨複合群配子囊個體發生

週數	寬度(mm)	無性				雄性				雌性				兩性				
		H15	H19	K15	K13	H15	H19	K15	K13	H15	H19	K15	K13	H15	H19	K15	K13	
12	<0.5		2	4	5	8	10	5	8									
	1		1	2	4	11	11	9	9									
	2	3	2	4	1	6	7	8	4				2					
	3	2		4	3	6	5	4	4	5	4	2	3		1			
	4			1					2	4	4	4	2			1	1	
	5									4	2	1	1					
	>5									1	2							
總數		5	5	15	13	31	33	26	27	14	12	7	9		1	1	1	
14	<0.5	2	1	2	5	8	12	2	5									
	1	2		3	2	12	7	8	12									
	2			4	1	9	7	10	5				2					
	3	3	1	2	1	2	4	7	3		2	1	4					
	4			3			1		1	7	5	2	3					1
	5									4	3	2	1			2	1	
	>5									1	7	1	3					
總數		7	2	14	9	31	31	27	26	12	17	6	13		2	2		
16	<0.5			7	5	9	12	10	8									
	1		1	1		7	9	8	8									
	2			1	2	10	7	9	12									
	3		1	5	2	3	3	1	4		2	1	1	5	2	2		
	4									6	7	3	2	1				
	5									4	3	2	3					
	>5									5	3		3					
總數		2	14	9	29	31	28	32	15	15	6	9	6	2	2			
18	<0.5	1	1	4	2	9	6	7	13									
	1	1				10	9	14	9									
	2	1		3	1	8	7	7	9									
	3	2		1	1	4	4	4	5	2	4	1	1		2			
	4				1					6	7	5	3			1		
	5									4	3	2	3					
	>5									2	6	1	2					
總數		5	1	8	5	31	26	32	36	14	20	9	9	2	1			

註 1、植株代碼 H15 及 H19 為哈氏狗脊蕨，K15 及 K13 為細葉狗脊蕨。

註 2、寬度為配子體兩翼之距離，以此表示植株大小。

## 生殖生物學

四倍體哈氏狗脊蕨複合種群發育成熟配子體(至少具有藏精器或藏卵器之配子體)以單性為主(表 3-2),以經 18 週培養之配子體估算,單性配子體佔 98.33%,其中雄性配子體佔 69.44%,雌性配子體佔 28.89%,兩性配子體佔成熟配子體的比例極低,僅 1.67%,其中哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨兩性配子體的比例分別為 2.15%及 1.15%。根據配子囊發育行為與配子體性別比例,可推知四倍體哈氏狗脊蕨複合種群配子體性別發育主要有二種模式:(一)中大體型配子體直接發育出藏卵器,形成雌配子體,此後不再產生藏精器;(二)小型配子體發育出大量藏精器後,體型發育停止,終其一生為雄配子體。極少數中等體型配子體先發育出少數藏精器,隨著體型變大,再發育出藏卵器,形成兩性配子體,惟藏卵器形成後,通常不再發育新的藏精器,因此在功能上仍屬於單性配子體。

配子囊個體發生觀察結果顯示四倍體哈氏狗脊蕨複合種群孢子主要發育成單性配子體,而雌雄配子體形成時間點具有明顯的差異,即雌配子體在第 7 週起即逐漸達到成熟,然雄配子體則一直到第 10 週時方逐漸成熟。此外,雌雄配子體累積形成的速率亦有所不同,其中中大體型配子體自第 7 週起陸續發育成雌配子體,一直到 16 週後才到達一較穩定數量,而雄配子體則到第 12 週時即達一穩定數量狀態。由雌雄配子體形成時間的顯著差異,可以推測四倍體哈氏狗脊蕨複合種群之配子囊個體發生行為有利於異配子體交配(intergametophytic mating),而雄配子體在相對較短時間內大量發育形成,且雌配子體附近的小體型配子體甚至在 10 至 20 個細胞發展階段即產生大量的藏精器,因此推測四倍體哈氏狗脊蕨複合種群雌配子體會形成促精素(antheridiogen),藉此促使周邊配子體發育成雄配子體,而達成異配子體交配。類似的生殖生物學模式亦見於同屬之台灣狗脊蕨(邱, 1986),與其他四倍體蕨類植物,如鳳尾蕨科之 *Cryptogramma crispera*

( Pajaron et al., 1999 )。

配育系統試驗培養過程中部分配子體會死亡，此數值不列入計算，試驗結果如表 3-1，哈氏狗脊蕨複合群同配自交孢子體產生率為 0 (0/93)，異配自交孢子體產生率為 34.62% (27/78)，異配異交孢子體產生率則為 36.11% (26/72)；其中哈氏狗脊蕨同配自交孢子體產生率為 0 (0/45)，異配自交孢子體產生率為 30.56% (11/36)，異配異交孢子體產生率則為 37.50% (15/40)；細葉狗脊蕨同配自交孢子體產生率為 0 (0/48)，異配自交孢子體產生率為 38.10% (16/42)，異配異交孢子體產生率則為 34.38% (11/32)。由於四倍體哈氏狗脊蕨複合群配子體以單性為主，因此異配自交試驗正常應僅產生配子體數一半之孢子體，即孢子體最大潛在產生數量為試驗小格子數，因此異配自交孢子體產生率應修正為 69.23% (27/39)，其中哈氏狗脊蕨為 61.11% (11/18)，而細葉狗脊蕨則為 76.19% (16/21)；同理異配異交孢子體產生率應修正為 72.22% (26/36)，其中哈氏狗脊蕨為 75.00% (15/20)，而細葉狗脊蕨則為 68.75% (11/16)。此外，單性配子體無法產生絕對同質性( homozygous )之孢子體，因此單配試驗結果( 孢子體產生率為 0 )無法直接反映四倍體哈氏狗脊蕨複合群之遺傳負荷。

同型孢子蕨類植物中，配育系統通常與染色體倍體性有關( Masuyama & Watano, 1990; Haufler, 2002 )。Masuyama (1979; 1986)研究日本產短柄卵果蕨( *Phegopteris decursive-pinnata* )之生殖行為，發現二倍體類群傾向雜交，而四倍體類群則可行同配自交。Chiou 等(2002)研究附生型水龍骨科( Polypodiaceae )植物時亦發現類似的結果，即多倍體物種可行同配子體自交，二倍體物種則主要行異配子體交配。此外，許多蕨類植物尚可行無配生殖( apogamy )。四倍體哈氏狗脊蕨複合群配子體以單性為主，由單配自交孢子體產生率為 0 可知其並不行無配生殖與同配自交，而是以異配交配為主要的配育系統，其中異配自交成功率高達 69%，因此單一孢子體個體

即潛在可以形成一大族群。多倍體物種因具有更多套的染色體，因此單配自交產生絕對同質性 (homozygous) 孢子體時可以緩衝隱性致死基因的表現 (Chiou et al., 2002)。配育系統實驗雖顯示四倍體哈氏狗脊蕨複合群配子體無法進行同配自交，然在觀察配子體發育過程發現少數大型配子體會在基部產生分芽體，而先前的研究顯示其他狗脊蕨屬及烏毛蕨科具有促精素 (Naf et al., 1975; Quintanilla et al., 2007)，因此考慮本研究之四倍體哈氏狗脊蕨複合群潛在具有之促精素作用，推測單一孢子在遠距離傳播後「有機會」形成孢子體。當單一孢子體形成後，可藉由異配自交的方式繁殖更多孢子體，進而在當地建立新族群，此推測或可解釋四倍體哈氏狗脊蕨複合群具有廣大分布範圍之原因。

#### 肆、結論

四倍體哈氏狗脊蕨複合種群孢子發芽率極高，達 93%，培養 4 週後即逐漸呈心形，至第 7 週具藏卵器的雌配子體首先形成，至第 10 週時具藏精器的雄配子體發育形成，而孢子體形成則出現在孢子播撒 16 週後。配子體發育類型屬於「三叉蕨型」，與烏毛蕨科其他種類相同。配子體發育成熟後多形成單性配子體，兩性配子體的比例僅 1.15~2.15%。雌雄配子體在體型大小有著極顯著的差異，雄配子體以 2 mm 以下的配子體佔最多數，雌配子體體型分布則多在 4 mm 以上，少數的兩性配子體大小分布於 3 至 5 mm 範圍。

四倍體哈氏狗脊蕨複合種群配子體性別發育具有二種模式：(一) 中大體型配子體直接發育出藏卵器，形成雌配子體；(二) 小型配子體發育出大量藏精器後，終其一生為雄配子體。極少數中等體型配子體雖形成兩性配子體，惟藏卵器形成後，通常不再發育新的藏精器，因此在功能上仍屬於單性配子體。雌雄配子體形成時間具明顯差異，雌配子體在第 7 週起逐漸

成熟，雄配子體則到第 10 週方逐漸成熟，由此形成時間的差異，推測四倍體哈氏狗脊蕨複合種群之配子囊個體發生行為有利於異配子體交配 ( intergametophytic mating )，而雄配子體在相對較短時間內大量發育形成，且雌配子體附近的小體型配子體可產生大量的藏精器，推測此複合種群具有促精素(antheridiogen)系統，藉此促進異配子體交配。

四倍體哈氏狗脊蕨複合群配子體以單性為主，單配自交孢子體產生率為 0，可知其並不行無配生殖與同配自交，而是以異配交配為主要的配育系統，其異配自交成功率高達 69%，因此單一孢子體個體即潛在可形成一大族群。配子體發育過程少數大型配子體會在基部產生分芽體，另潛在具有促精素作用，因此推測單一孢子在遠距離傳播後「有機會」形成孢子體，進而在當地建立新族群，此推測或可解釋四倍體哈氏狗脊蕨複合群具有廣大分布範圍之原因。

## 伍、參考文獻

邱文良 . 1986 . 台灣狗脊蕨配子體及幼孢子體的研究 . *Yushania* 3(3):7-13.

邱文良 . 1989 . 烏毛蕨配子體及幼孢子體的研究 . *Yushania* 6(3):1-8.

邱文良 . 1998 . 同型孢子蕨類之配子體 . 於黃明得(主編)，蕨類植物種源蒐集及應用研討會專輯，pp. 34-37，台東區農改場，台東 .

Chiou, W.-L. and D. R. Farrar. 1997. Comparative gametophyte morphology of selected species of the family Polypodiaceae. *Amer. Fern J.* 87(3):77-86.

Chiou, W.-L., D. R. Farrar, and T. A. Ranker. 1998. Gametophyte morphology and reproductive biology in *Elaphoglossum* Schott. *Can. J. Bot.* 76:1967-1977.

Chiou, W.-L., D. R. Farrar, and T. A. Ranker. 2002. The mating systems of some epiphytic Polypodiaceae. *Am. J. Bot.* 92(2):65-79.

Chiou, W.-L., P.-H. Lee, and S.-S. Ying. 2000. Reproductive biology of gametophytes of *Cyathea podophylla* (Hook.) Copel. *Taiwan J. For. Sci.*

15(1):1-12.

- Christ, K. C. and D. R. Farrar. 1983. Genetic load and long-distance dispersal in *Asplenium platyneuron*. *Can J. Bot.* 61:1809-1814.
- Dassler, C. L. and D. R. Farrar. 1997. Significance of form in fern gametophytes: clonal, gemmiferous gametophytes of *Callistopteris baueriana* (Hymenophyllaceae). *Int. J. Plant Sci.* 158:622-639.
- Dassler, C. L. and D. R. Farrar. 2001. Significance of gametophyte form in long-distance colonization by tropical, epiphytic ferns. *Brittonia* 53(2): 352-369.
- Farrar, D. R. 1990. Species and evolution in asexually reproducing independent fern gametophytes. *Syst. Bot.* 15:98-111.
- Grantt, E. and I. T. Arnott. 1965. Spore germination and development of the young gametophytes of the ostrich ferns (*Matteucia struthiopteris*). *Am. J. Bot.* 52:82-94.
- Haufler, C. H. 2002. Homospory 2002: an odyssey of progress on pteridophyte genetics and evolutionary biology. *BioScience* 52(12):1081-1093.
- Hedrick, P. W. 1987. Genetic load and the mating system in homosporous ferns. *Evolution* 41:1282-1289.
- Kato, M. 1993. Biogeography of ferns: dispersal and vicariance. *J. Biogeogr.* 20:265-274.
- Klekowski, E. J. 1969. Reproductive biology of the Pteridophyta II, theoretical considerations. *Bot. J. Lin. Soc.* 62:361-377.
- Klekowski, E. J. 1972. Evidence against genetic self-incompatibility in the homosporous fern *Pteridium aquilinum*. *Evolution* 26:66-73.
- Klekowski, E. J. 1973. Genetic load in *Osmunda regalis* population. *Amer. J. Bot.* 60(2):146-154.
- Klekowski, E. J. 1979. The genetics and reproductive biology of ferns. *In: Dyer, A. F. (ed.), The Experimental Biology of Ferns*, pp. 133-169. Academic Press, London.

- Lloyd, R. M. 1974. Mating systems and genetic load in pioneer and non-pioneer Hawaiian Pteridophyta. *Bot. J. Linn. Soc.* 69:23-35.
- Masuyama, S. 1979. Reproductive biology of the fern *Phegopteris decursive-pinnata*, the dissimilar mating systems of diploids and tetraploids. *Bot. Mag. Tokyo* 92:275-289.
- Masuyama, S. and Y. Watano. 1990. Trends for inbreeding in polyploid pteridophytes. *Plant Species Biol.* 5:13-17.
- Masuyama, S., K. Mitui and N. Nakato. 1987. Studies on intraspecific polyploids of the fern *Lepisorus thunbergianus* (3), mating system and ploidy. *J. Jap Bot.* 62:321-331.
- Naf, U., K. Nakanishi and M. Endo. 1975. On the physiology and chemistry of fern antheridiogens. *Bot. Rev.* 41(3): 315-359.
- Nayar, B. K. and S. Kaur. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *Bot. Rev.* 37(3):295-396.
- Pajaron, S., E. Pangua and L. Garcia-Alvarez. 1999. Sexual expression and genetic diversity in populations of *Cryptogramma crispa* (Pteridaceae). *Am. J. Bot.* 86(7): 964-973.
- Pinter, I., F. Bakker, J. Barrett, C. Cox, M. Gibby, S. Henderson, M. Morgan-Richards, F. Rumsey, S. Russell, S. Trewick, H. Schneider and J. Vogel. 2002. Phylogenetic and biosystematic relationships in four highly disjunct polyploid complexes in the subgenera *Ceterach* and *Phyllitis* in *Asplenium* (Aspleniaceae). *Org. Divers. Evol.* 2(4) 299-311.
- Quintanilla, L. G., L. De Soto, A. Jimenez and M. Mendez. 2007. Do antheridiogens act via gametophyte size? A study of *Woodwardia radicans* (Blechnaceae). *Am. J. Bot.* 94(6): 986-990.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis and A. R. Smith. 1991. Breeding systems of three tree ferns: *Alsophila firma* (Cyatheaceae), *Cyathea stipularis* (Cyatheaceae), and *Lophosoria quadripinnata* (Lophosoriaceae). *Pl. Sp. Biol.* 6:19-26.
- Stone, I. G. 1969. The gametophytes of the Victorian Blechnaceae II, *Doodia*

*aspera* R. Br., *D. media* R. Br. and *D. caudata* R. Br.: a comparison with three extra-Australian genera, *Brainea*, *Sadleria* and *Woodwardia*. *Aust. J. Bot.* 17:31-57.

Wagner, W. H. and F. S. Wagner. 1966. Pteridophytes of the Mountain Lake Area, Giles Co., Virginia: biosystematic studies 1964-65. *Castanea* 31: 121-140.

Walker, T. G. 1979. The cytogenetics of ferns. *In*: Dyer, A. F. (ed.), *The Experimental Biology of Ferns*, pp. 87-132. Academic Press, London.

## 第四章 以同功異構？探討哈氏狗脊蕨複合種族群遺傳變異

### 壹、前言

物種的遺傳變異樣式影響其演化潛力，同時亦顯示其適應不同環境的能力 ( Hamrick et al., 1992 )，而決定物種或族群適應力的因素，除了遺傳變異程度外，還包括這些變異在不同族群間的分布模式 ( Soltis & Soltis, 1987 )。因此要較精準的了解一物種的演化過程，與未來演化潛力，需要充分掌握其種內之遺傳變異模式。同型孢子蕨類植物擁有的生物學獨特性使得不易全盤瞭解其遺傳系統與演化潛力 ( Haufler, 2002 )。

蕨類植物的生活史包含孢子體階段與可獨立生活的配子體階段，同型孢子蕨類植物與其他維管束植物最大的差異在於其可以形成兩性配子體，因此在一個世代時間即可產生完全同質結合的孢子體。如此的生殖機制使得單一散播的孢子即潛在可形成一新的族群 ( Klekowski, 1979 )，相對地，其遺傳多樣性卻因此顯著下降，因應環境變動的適應力與演化潛力亦大大地下降。電泳分析同功異構？的變異性可以檢驗族群或種內的遺傳組成，其表現方式為每基因座上平均對偶基因數，其數值越高，表示族群多型性越高，擁有越高遺傳變異。此外，藉由評估個體或整個族群平均異質結合基因座比例，可以推論族群盛行的配育系統模式。

台灣位於亞洲大陸邊緣，是太平洋島弧中間位置的一個重要島嶼，在 5 百多萬年前凸出海面後逐漸隆起，地質上經歷多次冰河事件。冰河期間，海平面下降，台灣與亞洲大陸相連 ( Sam Boggs et al., 1979 )，植物便可在台灣與臨近地區間遷移、擴散；間冰期，海平面上升，台灣便與亞洲大陸隔離，其間的族群基因交流中斷，進而分別演化、分化。由於如此特殊的地質歷史，台灣成為探討植物親緣地理學絕佳的地點。近幾年，研究台灣島和臨近地理區植物族群遺傳變異及親緣關係的報告數量快速增長，如 Chiang 等 ( 2001 ) 研究分布於台灣、日本、大陸粵閩瓊、越南北部水筆仔

(*Kandelia obovata*) 的親緣關係，Wu 等 (2001) 研究分布於台灣及日本昆欄樹 (*Trochodendron aralioides*) 的族群遺傳結構，Lin (2001) 及 Lu 等 (2002) 研究同樣分布於台灣及日本地區烏心石 (*Michelia formosana*) 之遺傳變異，Huang 等 (2002) 研究分布於台灣、大陸及日本地區青剛櫟 (*Cyclobalanopsis glauca*) 之空間模式。先前的研究多著重於木本種子植物，有關蕨類植物相關的研究則付之闕如。

哈氏狗脊蕨 (*Woodwardia harlandii*) 與細葉狗脊蕨 (*W. kempii*) 為烏毛蕨科 (Blechnaceae) 狗脊蕨屬 (*Woodwardia*) 之物種，是分類上關係極為相近的分類群，具有類似的地理分布，在許多地區更是共域生長在一起。大陸學者秦仁昌將此二物種自狗脊蕨屬獨立出來 (Ching, 1964)，成立新屬—崇澍蕨屬 (*Chieniopteris*)，然分子生物學證據並不支持此一處理 (Cranfill & Kato, 2003)，多數蕨類植物分類學者仍將其置至於狗脊蕨屬中 (Kramer, 1990; Chiou *et al.*, 1994; Iwatsuki, 1995)。目前已知哈氏狗脊蕨包含二倍體與四倍體類群，而細葉狗脊蕨目前所檢測結果皆為四倍體 (Takamiya *et al.*, 1992; Cranfill, 2001; 第二章結果)，分子生物學證據顯示兩者為一複合種群 (詳見第二及五章)。此複合種群分布範圍自日本南部，經琉球群島、台灣、中國大陸東南沿海省分至越南北部、泰國東北 (Chiou *et al.*, 1994; Iwatsuki, 1995; Boonkerd & Rossarin, 2004)，為東北西南方向的帶狀分布，以大陸東南省分與台灣的族群數量較多。本研究利用同功異構？電泳分析法，分析哈氏哈氏狗脊蕨複合種群的族群遺傳多樣性，以及族群間遺傳變異分布模式與結構，並探討其配育系統，藉此評估族群遺傳多樣性與地理分布的關係。

## 貳、研究材料及方法

### 一、研究材料：

根據標本館之採集記錄於大陸華南、日本及台灣北部地區取樣，台灣地區每一族群以隨機方式選取不同植株之幼嫩葉片，取樣數量取決於天然族群的大小。由於此二種狗脊蕨地下莖可行斷裂營養繁殖，為避免採到同一營養系個體，每兩株之間至少相距 1 公尺。為保持酵素活性，所採得材料立即置於冰桶中保持低溫，儘速帶回實驗室後置於超低溫 (-70 ) 冷凍櫃中，以備使用。國外材料則各取一小段走莖 (2-4 公分，含生長點)，栽植於溫室中使其發芽生長備用。本研究共取樣分析哈氏狗脊蕨 11 個天然族群 (8 者於台灣北部，2 者於大陸廣東)，計 318 個樣本；細葉狗脊蕨 7 個族群 (6 者於台灣北部，1 者於大陸廣東，1 者於日本九州屋久島)，共 132 個樣本 (表 4-1)。

表 4-1、Analyzed populations of *W. harlandii* and *W. kempii*

Population site	<i>Woodwardia harlandii</i>		<i>Woodwardia kempii</i>	
	Code	Sample size	Code	Sample size
<b>台灣</b>		<b>227</b>		<b>119</b>
台北雲仙樂園	TWL-H	42	TWL-K	29
台北雙溪山	TSS-H	54	TSS-K	43
台北大埤山	TDP-H	22	TDP-K	5
宜蘭福山	TFS-H	5		
宜蘭草埤	TTP-H	46	TTP-K	4
台北大桶山	TDT-H	15	TDT-K	18
台北新山夢湖	TSM-H	20		
台北打鐵寮山	TDL-H	23	TDL-K	20
<b>中國大陸</b>		<b>91</b>		<b>7</b>
廣東新會大圓嶺	CDY-H	44		
廣東新會五指山	CWJ-H	47		
廣東從化			CCG-K	7
<b>日本</b>				<b>6</b>
九州屋久島			JOJ-K	6
<b>合計</b>		<b>318</b>		<b>132</b>

## 二、研究方法：

1. 酵素萃取：取植物體幼嫩新葉，經液態氮研磨後加入萃取液萃取（Feret, 1973）以 3\*12 mm<sup>2</sup>濾紙片吸附萃取液，移入超低溫冷凍櫃中保存備用。
2. 電泳：以水平式澱粉電泳分析法（Soltis *et al.*, 1983），依不同緩衝液系統檢測（系統 H、Bnd 及 8\*），進行電泳分析。
3. 酵素條帶讀取：以拍照方式立即記錄酵素條帶圖譜，判讀酵素條帶為單聚體、二聚體或多聚體，並判別同質或異質結合，記錄後進行統計分析。
4. 資料分析：將每個個體在檢測基因座上的基因型輸入電腦，以套裝軟體 BIOSYS-II（Swofford & Selander, 1989）及 TETRAPLOIDE 計算遺傳變異度、分析遺傳結構及遺傳距離。

### (1)遺傳歧異度：

- a. 多型性基因座百分比（P）
- b. 基因座平均對偶基因數（A）
- c. 異合度觀測值（H<sub>O</sub>）
- d. 異合度期望值（H<sub>E</sub>）

### (2)遺傳結構：F-統計分析（F-statistic）

### (3)遺傳距離：群叢分析（cluster analysis）

UPGMA, unweighted pair group method analysis

## 參、結果與討論

萃取液以 12% 之水平澱粉膠於 4 下電泳,依 Wendel & Weeden( 1989 ) 所述之染色法染色,哈氏狗脊蕨複合種群共測得可分析基因座 11 個,位點如下:哈氏狗脊蕨於系統 H ( Cheliak & Pitel, 1984 ) 中得到 DIA-3 ( Diaphorase ) ( E.C.1.6.99.1 )、G3PD ( Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ) ( E.C.1.2.1.12 )、MDH-1 ( Malate dehydrogenase ) ( E.C.1.1.1.37 ) 6PGD-1( Phospho-gluconate dehydrogenase ) ( E.C.1.1.1.44 ) PGM-1 ( Phosphoglucomutase ) ( E.C.5.4.2.2 )、PGM-2 等位點;系統 Bnd ( Cheliak & Pitel, 1984 ) 可得 AAT-2 ( Aspartate aminotransferase ) ( E.C.2.6.1.1 )、HK ( Hexokinase ) ( E.C.2.7.1.1 )、PGI-3 ( Phosphoglucoisomerase ) ( E.C.5.3.1.9 );系統 8\* ( Soltis et al., 1983 ) 得 AAT-2、LAP ( Leucine aminopeptidase ) ( E.C.3.4.11.1 ) 等,共計 10 個。細葉狗脊蕨則較前者多一位點 EST-2 ( Esterase ) ( E.C.3.1.1.- ) ( 系統 8\* ), 計 11 個。各位點之對偶基因比例,如表 4-2,其中 G3PD 及 HK 在哈氏狗脊蕨複合種群所有個體均只顯示單一條帶;EST-2 在細葉狗脊蕨所有個體亦均只顯示單一條帶,但在哈氏狗脊蕨則未偵測出現條帶;LAP 除了在日本九州屋久島族群具有異質合子 ( heterozygote ) 外,其餘所有哈氏狗脊蕨複合種群所有個體均只顯示單一條帶;MDH-1 及 6PGD-1 除了在大陸廣東五指山與大圓嶺族群具有異質合子外,其餘所有哈氏狗脊蕨複合種群所有個體均只顯示單一條帶。其餘 5 個基因座 ( AAT-2、DIA-3、PGI-3、PGM-1 及 PGM-2 ) 多數族群個體都具有兩個以上對偶基因,呈多型性表現。

表 4-2、 Allele frequencies for populations of *W. harlandii* and *W. kempii*

Loci	Pop*	<i>Woodwardia harlandii</i>										<i>Woodwardia kempii</i>							
		TWL-H	TSS-H	TDP-H	TFS-H	TTP-H	TDT-H	TSM-H	TDL-H	CDY-H	CWJ-H	TWL-K	TDP-K	TSS-K	TDT-K	TTP-K	TDL-K	CCG-K	JOJ-K
AAT-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.250	0.250	
	B	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.985	0.957	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.438	0.417	
	C	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.015	0.043	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.312	0.333	
DIA-3	A	-	0.407	0.500	0.500	0.453	0.500	0.500	0.500	0.386	0.362	-	0.500	0.395	0.500	0.375	0.500	0.429	0.500
	B	1.000	0.593	0.500	0.500	0.547	0.500	0.500	0.500	0.614	0.638	1.000	0.500	0.605	0.500	0.625	0.500	0.571	0.500
EST-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
G3PD	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
HK	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
LAP	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.750	1.000	
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.250	-	
MDH-1	A	-	-	-	-	-	-	-	-	0.087	0.048	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	0.349	0.607	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.564	0.345	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6PGD-1	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	0.091	0.076	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.909	0.924	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PGI-3	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.107	-	
	B	-	0.165	0.179	-	0.065	-	-	0.023	0.110	0.064	-	-	-	0.153	0.125	0.111	0.107	0.208
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.474	-	0.482	0.083	0.125	-	-	-
	D	0.750	0.585	0.571	0.750	0.685	0.750	0.750	0.727	0.802	0.878	0.052	0.500	0.024	0.472	0.438	0.639	0.357	0.542
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.474	-	0.482	0.083	0.125	-	-	-
	F	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.087	0.059	-	0.500	0.012	0.208	0.188	0.250	0.429	0.250
PGM-1	A	-	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.028	-	-	0.500	0.500	0.500	0.500	0.300	0.500	
	B	1.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.944	0.976	1.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.700	0.500	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	0.028	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-
PGM-2	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.107	-	
	B	-	-	-	-	0.011	-	-	-	-	-	0.009	-	-	-	-	-	-	-
	C	0.500	0.528	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.136	0.065	0.500	1.000	0.500	0.500	0.500	1.000	0.536	0.500
	D	0.500	0.472	0.500	0.500	0.489	0.500	0.500	0.500	0.818	0.924	0.491	-	0.500	0.500	0.500	-	0.250	0.500
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-	-	-	-	0.107	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.011	-	-	-	-	-	-	-	-

Pop\*: Populations of *W. harlandii* and *W. kempii*. Population codes are identical to table 4-1.

經由 Biosys-II 套裝軟體分析，哈氏狗脊蕨基因座平均對偶基因數 (A) 為 1.68，多型性位點百分比 (P) 為 48.55；細葉狗脊蕨之基因座平均對偶基因數 (A)、多型性基因座百分比 (P) 分別為 1.56 及 40.07。表 4-3 顯示大陸哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨之平均 A 值及 P 值均較台灣者高；表 4-2 亦顯示大陸哈氏狗脊蕨族群擁有 6 個兩地不相重疊的特有對偶基因的其中 5 個，大陸細葉狗脊蕨族群則擁有 5 個特有的對偶基因其中的 4 個。此外，日本屋久島細葉狗脊蕨族群各基因座對偶基因頻率與台灣族群相近，兩地理區 A、P 值相近，但在 AAT-2 基因座屋久島族群具有一與大陸廣東地區細葉狗脊蕨共有的獨特對偶基因，此對偶基因不見於台灣地區族群，亦未在哈氏狗脊蕨族群中發現。若以日本屋久島細葉狗脊蕨與大陸地區族群比較，則前者不具任何特有對偶基因。

哈氏狗脊蕨台灣族群之平均異合度觀測值 ( $H_o$ ) 為 0.454，平均異合度期望值 ( $H_E$ ) 為 0.393；大陸族群雖有較高之 A、P 值，但因部份對偶基因的頻率甚低（如 AAT-2 之 C 與 PGM-1 之 A 及 C 等對偶基因）， $H_o$  反而較低（表 4-3）；所有哈氏狗脊蕨族群之平均異合度觀測值 ( $H_o$ ) 為 0.390，平均異合度期望值 ( $H_e$ ) 為 0.370。台灣、大陸及日本三地細葉狗脊蕨族群之異合度觀測值 ( $H_o$ ) 均相近，平均為 0.387，平均異合度期望值 ( $H_E$ ) 則為 0.357。與前人研究台灣及其他地區同型孢子蕨類植物的遺傳歧異度比較（表 4-4），本研究中二物種之遺傳歧異度顯然偏高，其中兩分類群多型性位點百分比 (P) 及哈氏狗脊蕨平均對偶基因數 (A) 高於同型孢子蕨類植物之平均值（表 4-4），而不論哈氏狗脊蕨族群或細葉狗脊蕨，其異合度觀測值 ( $H_o$ ) 更是表中所列物種最高者。若與台灣產木本植物種類之遺傳歧異度比較（Cheng et al., 2008; Table 5）， $H_o$  值亦明顯偏高。

若將哈氏狗脊蕨複合種群二倍體類群（哈氏狗脊蕨中國大陸族群）與四倍體類群（其他哈氏狗脊蕨族群與所有細葉狗脊蕨族群）分開統計，則

表 4-3、Genetic diversity for the populations of *W. harlandii* and *W. kempii*

Population	N	A	P×100	Mean heterozygosity		Fixation index (F)
				Observed (H <sub>O</sub> )	Expected* (H <sub>E</sub> )	
TWL-H	41.8	1.3	30	0.300	0.243	-
TSS-H	52.5	1.6	50	0.476	0.435	-
TDP-H	21.6	1.6	50	0.500	0.439	-
TFS-H	4.9	1.5	50	0.500	0.418	-
TTP-H	44.6	1.7	50	0.491	0.427	-
TDT-H	13.8	1.5	50	0.500	0.418	-
TSM-H	19.8	1.5	50	0.500	0.418	-
TDL-H	20.2	1.6	50	0.500	0.422	-
CDY-H**	39.7	2.1	60	0.241	0.343	0.298
CWJ-H**	44.7	2.0	50	0.210	0.287	0.267
<b>Mt</b>		<b>1.55</b>	<b>46.19</b>	<b>0.454</b>	<b>0.393</b>	-
<b>Mc**</b>		<b>2.05</b>	<b>54.70</b>	<b>0.225</b>	<b>0.314</b>	0.283
<b>M</b>		<b>1.68</b>	<b>48.55</b>	<b>0.390</b>	<b>0.370</b>	-
TWL-K	28.2	1.4	27.3	0.273	0.271	-
TDP-K	5.0	1.4	36.4	0.364	0.318	-
TSS-K	40.1	1.6	45.5	0.436	0.396	-
TDT-K	16.5	1.7	45.5	0.455	0.404	-
TTP-K	4.0	1.6	45.5	0.432	0.401	-
TDL-K	18.6	1.5	36.4	0.364	0.314	-
CCG-K	6.2	2.0	54.5	0.425	0.464	-
JOJ-K	5.2	1.6	45.5	0.455	0.407	-
<b>Mt</b>		<b>1.54</b>	<b>39.02</b>	<b>0.382</b>	<b>0.349</b>	-
<b>M</b>		<b>1.56</b>	<b>40.07</b>	<b>0.387</b>	<b>0.357</b>	-

\* Unbiased estimate (see Nei, 1978)

\*\* Diploid taxa; others were tetraploid

N: Mean sample size per locus

A: Mean no. of alleles per locus

P: Percentage of loci polymorphic. A locus is considered polymorphic if the frequency of the most common allele does not exceed 0.95

Mt: mean of populations in Taiwan

Mc: mean of populations in main land China

M: mean of all populations

可發現二倍體類群之異合度觀測值明顯低於四倍體類群，但其觀測值 (H<sub>O</sub>=0.225) 仍高於表 4-4 統計之平均值與中間值，而與一些台灣產木本植物種類之遺傳歧異度相當；相對地，二倍體類群之基因座平均對偶基因數 (A) 則明顯高於四倍體類群 (大陸廣東地區產細葉狗脊蕨族群除外)。

Haufler (1985) 針對 *Bommeria* 屬進行之族群遺傳研究，發現四倍體 *B. pedata*

的遺傳歧異度較其二倍體親本 *B. ehrenbergiana* 要高 (表 4-4); Hauk & Haufler (1999) 研究陰地蕨屬 (*Botrychium*) 之亞屬 *Botrychium* 時, 亦發現多倍體物種之遺傳歧異度多高於二倍體物種; Allard 等 (1993) 在研究四倍體禾草 *Avena barbata* 時, 也發現其對偶基因歧異度高於其親本二倍體 *Avena hirtula*。Soltis & Soltis (2000) 在文獻回顧研究亦歸納指出, 植物多倍體遺傳歧異度較其親本二倍體為高。本研究同時取樣二倍體與四倍體哈氏狗脊蕨複合群之族群, 分析結果亦證實多倍體具較高之異合度觀測值, 而此觀測值明顯高於過去針對二倍體與多倍體同型孢子蕨類植物的觀測結果, 推測應與四倍體哈氏狗脊蕨複合群為異源四倍體有關; 相對地, 二倍體類群則具有較高的平均對偶基因數 ( $A$ ), 推測與其減數分裂時較高的基因重組有關; 另一可能原因為大陸廣東新會一帶為廣大族群退縮之避難所, 因此匯集了較多的遺傳多樣性, 而此長期且穩定的族群並保存了不見於其他地區的稀有對偶基因 (林, 2000)。

觀察哈氏狗脊蕨複合種群對偶基因頻率 (表 4-2) 可以發現, 除了二倍體哈氏狗脊蕨族群 (CDY-H 及 CWJ-H) 外, 其餘族群之基因型多形成固定模式。可能的形成原因有三: 一是所取樣本為營養繁殖形成, 然而如研究方法所述, 取樣時已避免之, 另一方面從表 4-2 結果可以發現四倍體類群內基因型仍有變異, 故排除此因素。二為取樣樣本為無配生殖形成。然而根據前一章對四倍體類群配子體之生殖生物學研究結果, 兩種狗脊蕨均以單性配子體為主, 且未在單配試驗中發現無配生殖的現象, 故亦排除此一因素。三為此多倍體類群是異源四倍體, 異源四倍體在減數分裂時, 不同於同源四倍體符合孟德爾定律 (Mendel's law) 之四同源染色體任二聯會分離 (Soltis et al., 2003; Gastony, 1990), 其染色體傾向兩兩同源染色體聯會而後分離, 故易造成基因型為固定模式 (Werth et al., 1985), 四倍體哈氏狗脊蕨複合群的對偶基因頻率大致符合此模式, 而核 DNA 的研究結果 (見第二

表 4-4、Genetic variability in 53 fern species

Species	A	P	He	References
11 terrestrial outcrossing ferns	1.67	0.35	0.113	
<i>Adenophorus tamariscinus</i>	2.2	0.553	0.146	
<i>Alsophila firma</i>	1.24	0.200	0.078	Soltis et al. 1991
<i>Alsophila spinulosa</i>	1.34	0.345	0.145	Cheng et al. 2008
<i>Blechnum spicant</i>	1.4	0.236	0.02	Soltis & Soltis, 1988
<i>Bommeria ehrenbergiana</i>	1.38	0.213	0.128	Haufler, 1985
<i>Bommeria hispida</i>	2.62	0.615	0.206	Haufler & Soltis, 1984
<i>Bommeria pedata</i>	1.62	0.462	0.244	Haufler, 1985
<i>Bommeria subpaleacea</i>	1.54	0.385	0.162	Haufler, 1985
<i>Botrychium acuminatum</i>	1.58	0.5	0.277	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium ascendens</i>	1.33	0.333	0.169	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium crenulatum</i>	1	0	0	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium echo</i>	1.67	0.667	0.343	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium hesperium</i>	1.5	0.5	0.253	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium lanceolatum</i>	1.21	0.214	0.086	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium lineare</i>	1	0	0	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium lunaria</i>	1.11	0.119	0.07	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium matricariifolium</i>	1.67	0.5	0.271	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium minganense</i>	1.35	0.455	0.233	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium pedunculom</i>	1.33	0.333	0.089	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium pinnatum</i>	1.42	0.417	0.218	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium pseudopinnatum</i>	1.5	0.5	0.286	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium pumicola</i>	1	0	0	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium simplex</i>	1.03	0.033	0.017	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium spathulatum</i>	1.17	0.167	0.089	Hauk & Haufler, 1999
<i>Botrychium virginianum</i>	1.19	0.161	0.012	Soltis & Soltis, 1986
<i>Cyathea stipularis</i>	1.2	0.175	0.037	Soltis et al. 1991
<i>Dryopteris expansa</i>	1.09	0.095	0.016	Soltis & Soltis, 1987a
<i>Gymnocarpium dryopteris</i>	1.79	0.586	0.194	Kirkpatrick et al. 1990
<i>disjunctum</i>				
<i>Lophosoria quadripinnata</i>	1.2	0.190	0.047	Soltis et al. 1991
<i>Pellaea andromedifolia</i>	1.3	0.635	0.221	Gastony & Gottlieb, 1985
<i>Pleopeltis astrolepis</i>	2.18	0.682	0.153	Hopper & Haufler, 1997
<i>Pleopeltis complanata</i>	2.25	0.582	0.162	Hopper & Haufler, 1997
<i>Pleopeltis crassinervata</i>	2.65	0.691	0.252	Hopper & Haufler, 1997
<i>Pleopeltis polylepis erythrolepis</i>	1.95	0.545	0.179	Hopper & Haufler, 1997
<i>Pleopeltis polylepis polylepis</i>	2.42	0.651	0.201	Hopper & Haufler, 1997
<i>Pleopeltis wiesbaurii</i>	2.09	0.576	0.14	Hopper & Haufler, 1997
<i>Polystichum acrostichoides</i>	1.59	0.444	0.075	Soltis & Soltis, 1990
<i>Polystichum dudleyi</i>	1.09	0.083	0.016	Soltis & Soltis, 1990
<i>Polystichum imbricans</i>	1.8	0.5	0.158	Soltis & Soltis, 1987b
<i>Polystichum lemmonii</i>	1.31	0.25	0.046	Soltis & Soltis, 1990
<i>Polystichum lonchitis</i>	1.08	0.067	0.005	Soltis & Soltis, 1990
<i>Polystichum munitum</i>	1.64	0.394	0.1	Soltis & Soltis, 1987b
<i>Polystichum otomasui</i>	1.93	0.619	0.177	Maki & Asada, 1988
<i>Pteridium aquilinum</i>	1.62	0.346	0.097	Wolf et al. 1988
<i>Sphaeropteris lepifera</i>	1.1	0.125	0.057	Chen, 1995
<b>Mean</b>	<b>1.585</b>	<b>0.367</b>	<b>0.133</b>	
<b>Median</b>	<b>1.42</b>	<b>0.389</b>	<b>0.146</b>	
<i>Woodwardia harlandii</i> (2x)	2.05	0.547	0.225	This study
<i>Woodwardia harlandii</i> (4x)	1.55	0.462	0.454	This study
<i>Woodwardia kempii</i> (4x)	1.56	0.401	0.387	This study

A: Mean no. of alleles per locus

P: Percentage of loci polymorphic

Ho: Observed mean heterozygosity

章)亦支持此推論,因此本研究中哈氏狗脊蕨複合群除中國大陸廣東地區之哈氏狗脊蕨外,其餘族群應均為異源四倍體。異源多倍體物種之基因型多為固定模式的情形有許多例証,如異源四倍體 *Bommeria pedata* (Haufler, 1985)、異源四倍體 *Hemionitis pinnatifida* (Ranker et al., 1989)、異源四倍體 *Pelleae rufa* (Gastony, 1990) 及 *Botrychium* 亞屬的多倍體物種 (Hauk & Haufler, 1999) 等。

雖大多數族群推測為異源四倍體,其固定模式的對偶基因頻率亦符合推論,然台灣族群內基因型仍有少許分化(如哈氏狗脊蕨中 PGM-2 之 B, 與細葉狗脊蕨中 PGM-2 之 B 及 PGI-3 之 C、E 等對偶基因),並不全為固定模式(表 4-2)。異源多倍體類群內基因型分化的可能情形有三:一為不同的對偶基因可能源自不同祖先,即此異源多倍體為多次起源,這在雜交種及多倍體類群甚為常見(Ranker et al., 1989; Soltis & Soltis, 1999; Chang et al., 2009)。第二種可能來自突變,突變的結果若無立即的致命危險,可以產生新的基因型,若此新的基因型有利於物種的生存,則其在族群中的頻率有可能會快速地提高。惟不論新基因型的適應力,突變需足夠的演化時間方足以累積形成。第三種可能為減數分裂時偶發的基因重組或互換所造成(Werth et al., 1985; Soltis & Soltis, 2000; Haufler, 2002),多倍體類群部分同源染色體在減數分裂時偶發性的配對(Chapman et al., 1979; Haufler, 2002),或偶發的自由聯會或四體聯會所造成(Gastony, 1990)。Ramsy & Schemske (2002) 在其文獻回顧研究中指出,多體聯會(三個以上染色體聯會)的結構會阻礙基因重組與互換的產生,故多倍體物種比其二倍體親本不易有互換的情形。Ramsy & Schemske 並統計 78 篇有關異源多倍體研究報告的成果,發現有 80% 被研究的異源多倍體物種在減數分裂時有多體聯會的情形,其中減數分裂時有平均 8% 的聯會是多體聯會。本研究中哈氏狗脊蕨台灣族群內基因型的少數分化,有可能是保留自祖先類群的變異,或

因多體聯會及部分同源染色體的偶發性配對造成基因重組所致，惟若為後者，則在擴大大陸地區四倍體類群的取樣後，應可發現更多類似的分化結果。此外，基因突變導致的可能性亦無法排除。

固定指數 ( fixation index ) 可以指示多型性基因座異質合子之狀況，即表示異合度觀測值是否符合哈溫平衡，其數值變動範圍在+1 與 - 1 之間。當  $F=0$  或接近 0 時，對偶基因頻率符合哈溫平衡，族群內個體為隨機交配；當  $F$  值顯著小於 0，表示族群內異質合子比例偏高，族群內多數個體可能藉由無配生殖產生；當  $F$  值顯著大於 0，表示族群內同質合子比例偏高，族群內個體傾向近親交配或自交。表 4-3 的  $F$  值統計結果可以發現，二倍體哈氏狗脊蕨  $F$  值顯著地大於 0，檢視對偶基因頻率分布 ( 表 4-2 )，未發現二倍體族群基因座具有固定模式對偶基因頻率，顯示其傾向於採取雜交或異配子體交配，因此造成同質合子比例偏高的原因推測應是華倫得效應 ( the Wahlund effect ) 所造成，即不同亞族群間具有一定程度隔離，由少數個體繁衍形成的亞族群內個體間容易近親交配或異配自交比例偏高，顯現在整個族群的結果就是異質合子比例偏低 (  $H_O < H_E$  )，此推論可可由核 DNA 單套基因型亦明顯有亞族群間分化獲得支持。

根據 Nei ( 1978 ) 的方法估算遺傳相似度，結果如表 4-5 及 4-6，哈氏狗脊蕨族群間遺傳相似度  $I$  為 0.890-1.000，細葉狗脊蕨族群間之  $I$  值更高，為 0.934-1.000，哈氏狗脊蕨族群間遺傳相似度若不包含二倍體類群 ( CDY-H 及 CWJ-H )，則  $I$  值高達 0.947-1.000。根據族群間之遺傳相似度或遺傳距離，進行歸群處理，以群叢分析法 ( UPGMA ) 繪製群叢樹狀圖 ( 圖 4-1 及 4-2 )。由圖 4-1 可以發現，哈氏狗脊蕨的大陸族群和台灣族群明顯分為兩群，此與其為不同倍體性的兩類群關係相符合。台灣地區族群間  $I$  值幾近 1 ( 0.947-1.000 )，且與地理相對位置無關，推測台灣族群的來源相同，且分隔時間較短，或族群間基因交流順暢。細葉狗脊蕨所有族群間  $I$  值均高 ( 表 4-6 )，

表 4-5、Matrix of genetic similarity of *W. harlandii*.

Population	TWL-H	TSS-H	TDP-H	TFS-H	TTP-H	TDT-H	TSM-H	TDL-H	CDY-H
TSS-H	0.947	-							
TDP-H	0.947	1.000	-						
TFS-H	0.947	1.000	1.000	-					
TTP-H	0.947	1.000	1.000	1.000	-				
TDT-H	0.947	1.000	1.000	1.000	1.000	-			
TSM-H	0.947	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-		
TDL-H	0.947	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	
CDY-H	0.890	0.890	0.890	0.890	0.890	0.890	0.890	0.890	-
CWJ-H	0.890	0.890	0.890	0.890	0.890	0.890	0.890	0.890	0.994

表 4-6、Matrix of genetic similarity of *W. kempii*.

Population	TWL-K	TDP-K	TSS-K	TDT-K	TTP-K	TDL-K	CCG-K
TDP-K	0.934	-					
TSS-K	0.959	0.934	-				
TDT-K	0.934	0.987	0.934	-			
TTP-K	0.934	0.987	0.934	1.000	-		
TDL-K	0.934	1.000	0.934	0.987	0.987	-	
CCG-K	0.934	0.987	0.934	1.000	1.000	0.987	-
JOJ-K	0.934	0.987	0.934	1.000	1.000	0.987	1.000

群叢分析結果 (圖 4-2) 顯示台灣地區部分族群與日本及中國大陸族群較先歸群，烏來及雙溪山族群與其他細葉狗脊蕨族群遺傳相似度較低。若計算哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨所有族群間遺傳相似度後，進行群叢分析，可以發現大陸地區之二倍體哈氏狗脊蕨類群與其他四倍體類群相似度最低 (圖 4-3)。此外，烏來地區族群 (包括哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨) 和台灣其他族群遺傳相似度稍低，從表 4-2 可發現其失去二個台灣族群共有的對偶基因 (DIA-3 之 A 及 PGM-1 之 A)，推測此應是其受較強之先驅者效應或基因漂變所致；另一可能的解釋為—烏來地區族群與其他地區族群起源不同，即在台灣至少有 2 次以上的雜交-多倍體化事件，形成現今台灣之四倍體哈氏狗脊蕨複合群族群。大陸廣東省從化地區之細葉狗脊蕨族群在 3 個基因座上具有不見於其他地區族群的獨特對偶基因 (LAP 之 B、PGI-3 之 A 及 PGM-2 之 A)，此獨特對偶基因可能來自當地族群所新產生的突變，亦可能是來自不同親本的孤兒對偶基因 (orphan allele)。核 DNA 的研究結果顯然

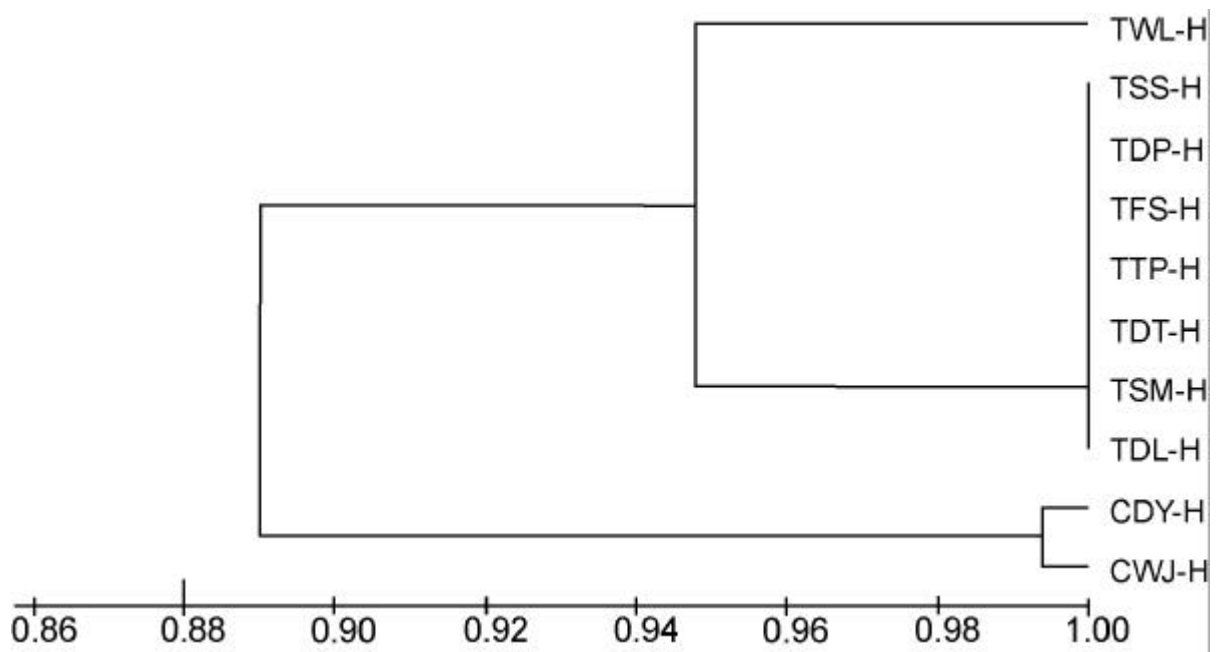


圖 4-1、UPGMA dendrogram showing the genetic relationships among 10 populations of *Woodwardia harlandii*

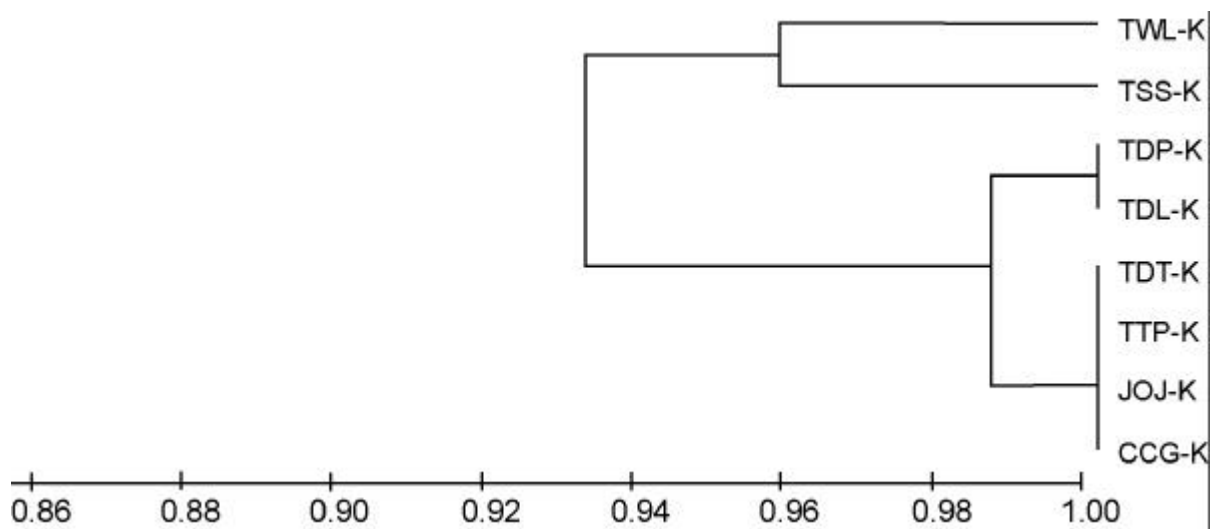


圖 4-2、UPGMA dendrogram showing the genetic relationships among 8 populations of *Woodwardia kempii*

支持後一種可能性，即大陸廣東省從化地區的細葉狗脊蕨族群具有不同於台灣及日本地區族群的基因體組成。

Soltis & Soltis (1989) 綜合當時同功異構? 的研究，統計指出蕨類植物種內 I 值介於 0.72 至 1.00 之間，哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨類群內 I 值都落在此範圍，將此二類群合併後計算(圖 4-3)，其最小遺傳相似度為 0.876，出現在二倍體哈氏狗脊蕨與其他四倍體類群族群間，若不包含二倍體族群，則最小 I 值高達 0.919，此遺傳相似度值顯示四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨應為同種。此外，同一地區之四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群總是擁有近似的對偶基因頻率(表 4-2)，如 TWL-H/TWL-K、TDT-H/TDT-K、TTP-H/TTP-K、TSS-H/TSS-K 及 TDL-H/TDL-K 等，則進一步支持四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨為同種的推論。EST-2 基因座之 A 對偶基因出現於所有細葉狗脊蕨族群而完全不見於哈氏狗脊蕨，此表現型式並不支持四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨為同種的推論，然此差異究竟是與哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨之間的遺傳分化有關，抑或只是與葉片羽裂程度有關的表現型差異，則仍需再進一步深入的探討。

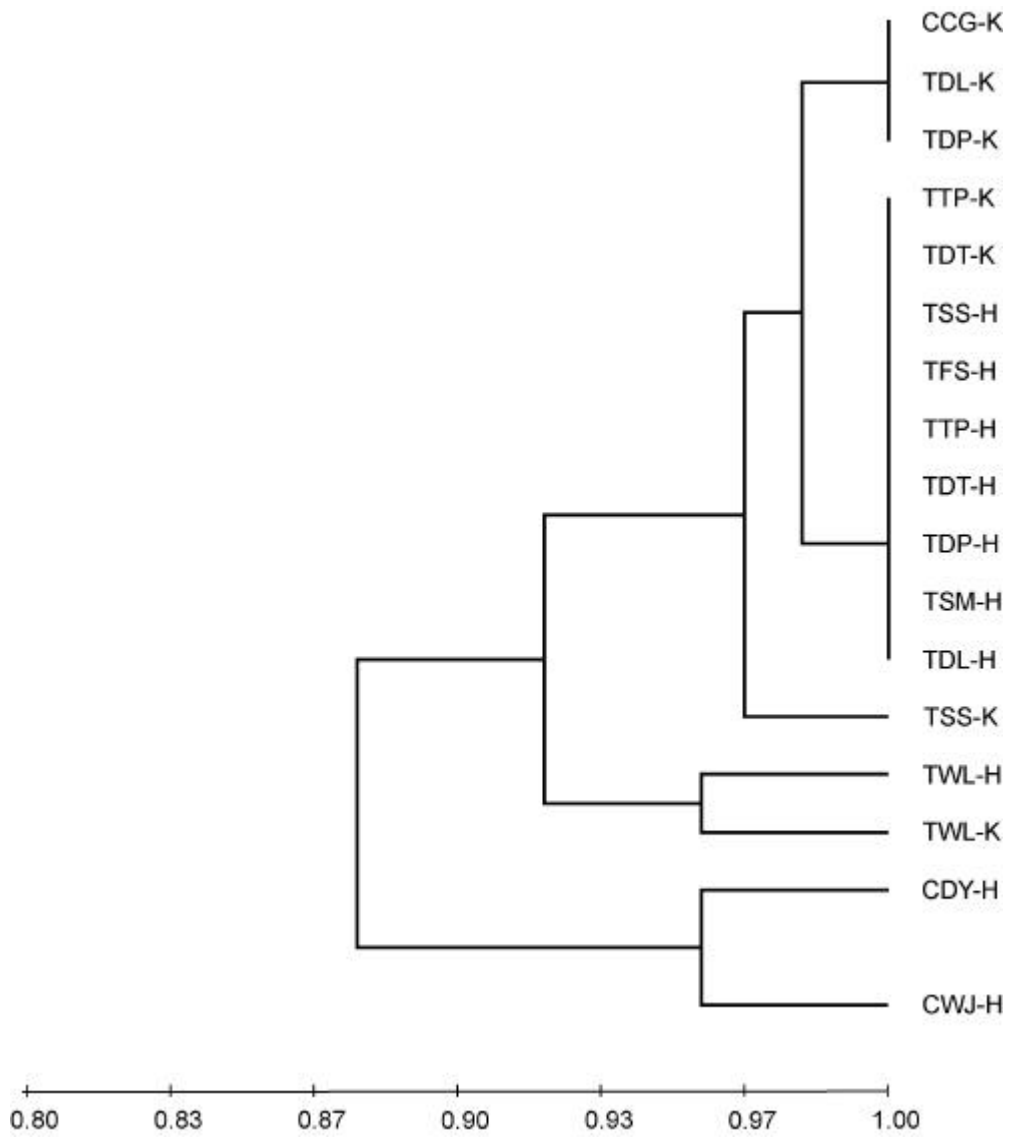


圖 4-3、UPGMA dendrogram showing the genetic relationships among the populations of *Woodwardia harlandii* and *W. kempii*

## 肆、結論

哈氏狗脊蕨複合種群二倍體類群（中國大陸廣東省新會地區族群）基因座平均對偶基因數（ $A$ ）明顯高於四倍體類群（其他哈氏狗脊蕨族群與所有細葉狗脊蕨族群），平均異合度觀測值（ $H_o$ ）反而較低。前人研究結果顯示多倍體通常比其二倍體親本種具有較高之異合度觀測值，本研究之結果亦符合此模式。二倍體類群具有較高的平均對偶基因數，推測與其減數分裂時較高的基因重組有關，或因為大陸廣東新會一帶為廣大族群退縮之避難所，因此保留較多的遺傳多樣性。

四倍體哈氏狗脊蕨複合種群對偶基因頻率大多形成固定模式，推測形成原因應為此多倍體類群是異源四倍體，因異源四倍體在減數分裂時，其染色體傾向兩兩同源染色體聯會而後分離，故易造成基因型為固定模式，以及異合度觀測值偏高。四倍體哈氏狗脊蕨台灣族群內基因型的少數分化，可能是保留自祖先類群的變異，或因多體聯會及部分同源染色體的偶發性配對造成基因重組所致。烏來地區哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群同時失去二個台灣地區族群共有的對偶基因（ $DIA-3$  之  $A$  及  $PGM-1$  之  $A$ ），推測可能是其受較強之先驅者效應或基因漂變所致，或烏來地區族群與其他地區族群起源不同，即在台灣發生至少 2 次以上的雜交-多倍體化事件。

二倍體類群固定指數（ $F$ ）值顯著大於 0，表示其同質合子比例偏高，推測應是華倫得效應（the Wahlund effect）所造成，即二倍體族群內不同亞族群間具有一定程度隔離，由少數個體繁衍形成的亞族群內個體間容易近親交配或異配自交比例偏高，顯現在整個族群的結果就是同質合子比例偏高。四倍體類群族群內異質合子比例較高，則應是異源四倍體多數基因座都具有固定之異質配對對偶基因所造成。計算族群間遺傳相似度（ $I$ ）後進行群叢分析，二倍體類群與其他四倍體類群相似度最低，若不包含二倍體族群，則四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群間最小  $I$  值仍高達 0.919，

遠高於 Soltis & Soltis (1989) 所提出蕨類植物種內族群間之最小 I 值，因此推論四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨應為同種，而同地區四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群總是擁有近似的對偶基因頻率，亦支持此推論。

## 伍、參考文獻

- 林讚標 . 2000 . 由同功酵素的研究看台灣溫帶林樹種的演化與避難所的推定 . 於邱文良、黃怡菁、沈勇強 (主編), 森林資源保育與經營研討會論文集, pp. 107-113, 行政院農委會林業試驗所, 台北 .
- Allard, R. W., R. Garcia, L. E. Saenz-de-Miera and M. Perez de la Vega. 1993. Evolution of multilocus genetic structure in *Avena hirtula* and *Avena barbata*. *Genetics* 135: 1125-1139.
- Boonkerd, T. and R. Pollawatn. 2004. A revised taxonomic account of the fern genus *Woodwardia* (Blechnaceae) in Thailand. *Thai Forest Bull. (Bot.)* 32: 1-5.
- Cheliak, W. M. and J. A. Pitel. 1984. The techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service. Canada.
- Chang, H. M., J. C. Wang and W. L. Chiou. 2009. Molecular evidence for genetic heterogeneity and the hybrid origin of *Acrorumohra subreflexipinna* from Taiwan. *Am. Fern J.* 99: (in press)
- Chapman, R. H., E. J. Klekowski and R. K. Selander. 1979. Homoeologous heterozygosity and recombination in the fern *Pteridium aquilinum*. *Science* 204: 1207-1209.
- Chen, ML 1995. The study of genetic structure of *Sphaeropteris lepifera*(Hook.) Tryon (Cyatheaceae) in Taiwan. M.S. thesis. Department of Biology, Taiwan Normal University. Taipei, Taiwan. p.74.
- Cheng, Y. P., S. H. Liu, Y. M. Huang, C. W. Chen and W. L. Chiou. 2008. Allozyme variations of a widespread tree fern, *Alsophila spinulosa*

- (Hook.) Tryon (Cyatheaceae), in Taiwan. *Taiwan J. For. Sci.* 23(1): 21-34.
- Chiang, T. Y., Y. C. Chiang, Y. J. Chen, C. H. Chou, S. Havanond, T. N. Hung and S. Hung. 2001. Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Mol. Ecol.* 10: 2697-2710.
- Ching, R. C. 1964. *Chieniopteris* Ching, A new fern genus from China. *Acta Phytotax. Sinica.* 9(1): 37-41.
- Chiou, W. L., W. C. Shieh and C. E. DeVol. 1994. Blechnaceae. In Huang, T.-C. et al (eds.), *Flora of Taiwan*, 2nd ed., Vol. 1, pp. 266-279. Taipei, Taiwan.
- Cranfill, R. B. and Kato, M. 2003. Phylogenetics, biogeography and classification of the woodwardioid ferns (Blechnaceae). In Chandra, S. & Srivastava, M.(eds.), *Pteridology in the New Millennium*, pp. 25–48. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Feret, P. P. 1971. Isozyme variation in *Pecea glauca* (Moench) Voss seedlings. *Silvae Genet.* 20: 46-50.
- Gastony, G. J. 1990. Electrophoretic evidence for allotetraploidy with segregating heterozygosity in South African *Pelleae rufa* A. F. Tryon (Adiantaceae). *Ann. Miss. Bot. Gard.* 77(2): 306-313.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt and S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests.* 6: 95-124.
- Haufler C. H. 1985. Enzyme variability and modes of evolution in *Bommeria* (Pteridaceae). *Syst. Bot.* 10(1): 92-104.
- Haufler, C. H. 2002. Homospory 2002: an odyssey of progress on pteridophyte genetics and evolutionary biology. *BioScience* 52(12):1081-1093.
- Hauk, W. D. and C. H. Haufler. 1999. Isozyme variability among cryptic species of *Botrychium* subgenus *Botrychium*. *Am. J. Bot.* 86(5): 614-633.
- Hooper, E. A. and C. H. Haufler. 1997. Genetic diversity and breeding system in

- a group of neotropical epiphytic ferns (*Pleopeltis*; Polypodiaceae). *Am. J. Bot.* 84(12): 1664-1674.
- Huang, S. F., S. Y. Hwang and T. P. Lin. 2002. Spatial pattern of chloroplast DNA variation of *Cyclobalanopsis glauca* in Taiwan and East Asia. *Mol. Ecol.* 11: 2349-2358.
- Iwatsuki, K. 1995. Blechnaceae. *In* Iwatsuki, K. et al. (eds.), *Flora of Japan*, Vol. I: Pteridophyta and Gymnospermae, pp. 112-115., Kodansha Ltd., Tokyo.
- Klekowski, E. J. 1979. The genetics and reproductive biology of ferns. *In*: Dyer, A. F. (ed.), *The Experimental Biology of Ferns*, pp. 133-169. Academic Press, London.
- Kramer, K. U. 1990. Blechnaceae. *In* Kramer, K. U. and P. S. Green (eds.), *The families and genera of vascular plants*, Vol. I: Pteridophytes and gymnosperms. pp. 60-68., Springer-Verlag, Berlin.
- Lin T. P. 2001. Allozyme variations in *Michelia formosana* (Kanehira) Masamune (Magnoliaceae), and the inference of a glacial refugium in Taiwan. *Theor. Appl. Genet.* 102: 450-457.
- Lu, S.Y., K. H. Hong, S. L. Liu, Y. P. Cheng, W. L. Wu and T. Y. Chiang. 2002. Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization. *J. Pl. Res.* 115: 203-216.
- Nei, M. 1978. Estimation of heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ramsy, J. and D. W. Schemske. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 33: 589-639.
- Ranker, T. A., C. H. Haufler, P. S. Soltis and D. E. Soltis. 1989. Genetic evidence for allopolyploidy in the neotropical fern *Hemionitis pinnatifida* (Adiantaceae) and the reconstruction of an ancestral genome. *Syst. Bot.* 14(4): 439-447.
- Sam Boggs, J. R., W. C. Wang, F. S. Lewis and J. C. Chen. 1979. Sediment

- properties and water characteristics of the Taiwan shelf and slope. *Acta Oceanograph. Taiwanica* 10: 10-49.
- Soltis, D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow and G. J. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Am. Fern J.* 73(1): 9-27.
- Soltis, D. E. and P. S. Soltis. 1989. Polyploidy, breeding systems, and genetic differentiation in homosporous pteridophytes. *In* D. E. Soltis and P. S. Soltis (eds.), *Isozymes in plant biology*, pp.241-258. Dioscorides Press, Portland, OR.
- Soltis, D. E. and P. S. Soltis. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends Ecol. Evol.* 14(9): 348-352.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis and J. A. Tate. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* 161: 173-191.
- Soltis, P. S. and D. E. Soltis. 1987. Population structure and estimates of gene flow in the homosporous fern *Polystichum munitum*. *Evolution* 41(3): 620-629.
- Soltis, P. S. and D. E. Soltis. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *PNAS* 97(13): 7051-7057.
- Swofford, D. L. and R. B. Selander. 1989. BIOSYS-2. A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics based on BIOSYS-1, modified by W. C. Black. 1997. Colorado State Univ., Fort Collins, CO.
- Wendel, J. F. and N. F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In* Soltis, D. E. & P. S. Soltis (eds.) *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, U.S.A.
- Werth, C. R., S. I. Guttman and W. H. Eshbaugh. 1985. Recurring origins of allopolyploid species in *Asplenium*. *Science* 228: 731-733.
- Wu, J. E., S. Huang, J. C. Wang and W. F. Tong. 2001. Allozyme variation and the genetic structure of populations of *Trochodendron aralioides*, a monotypic and narrow geographic genus. *J. Pl. Res.* 114: 45-57.

## 第五章 以葉綠體 DNA 片段序列進行哈氏狗脊蕨複合種群親緣地理學研究

### 壹、前言

生物的現今地理分布模式是由許多因子交互作用所形成，這些因子可歸類為生態與歷史兩大部分(Barrington, 1993)，其中歷史因素包括過去的地質歷史、長期的氣候改變及物種的播遷歷史等，生態因素則包括物種的生態適應幅度、拓殖體擴散能力及物種間的競爭等。綜合不同的生態與歷史因子所顯現的現今分布模式，是兩種不同的地理分布作用機制：散播 (dispersal)與片段化(vicariance) ( Kato, 1993; Avise, 2000 ) 所彼此作用的結果。親緣地理學(phylogeography) 為 Avise 等(1987)所提出有關歷史性生物地理學(historical biogeography)的新觀念，主要在探討物種的演化與地質歷史之間的關係。親緣地理學與傳統地理學的差異在於後者通常重視較高分類群的地理分布，但親緣地理學的研究雖不排除高階分類群的探討，但主要的研究對象則是近緣物種（強調其來自共同起源的歷史）及種內族群間的關係，並藉由不同族群間的遺傳變異，分析探討現今物種分布模式的形成機制。因此親緣地理學的研究被視為族群遺傳（或稱微演化 (microevolution)）與種化（或稱巨演化 (macroevolution)）之間的橋樑 (Bermingham and Martin, 1998; Avise, 2000)。

植物生育地範圍的拓殖需靠種子與孢子等拓殖體的散播，而隔離機制 (isolating mechanism)的形成則阻隔基因流傳，並產生遺傳分化。不同的演化過程（如天擇或基因漂變）及不同的族群大小變動因子（如不同的族群成長速率）會導致族群間基因譜系關係產生不同的分支結構（Page and Holmes, 1998）。因此，欲檢測某一特定分布模式究為散播與片段化何者所造成，或其發生先後順序，可藉由分析近緣種或同種不同地理族群的遺傳

變異，基因型差異與親緣關係，以及族群間分化程度推估 ( Crawford et al., 1992; Cain et al., 2000 )。

分子生物學及其相關應用的快速進展，使得研究者可以從許多不同基因中選擇合適的片段探討生物遺傳變異的內容與方向，進行系統演化的研究。分子標記的性質決定它們是否適合於解決或回答族群階層及親緣遺傳關係的問題，植物體內蘊藏遺傳訊息的三種基因體在演化模式及種內遺傳變異型式具有極大的差異 ( Ennos et al. 1999 )，因此，唯有選擇合適的分子標記方能有效解析不同階層的系統演化關係。植物的胞器 DNA 因具有較低的突變率 ( Wolfe et al., 1987; Graur & Li, 2000 )，以往被認為僅適合科及科以上分類系統的探討 (Olmstead & Palmer, 1994)，不適合做為分析種內族群遺傳變異的標誌 ( Ennos et al. 1999 )。然而近幾年愈來愈多的研究發現近緣種間部份胞器 DNA 片段具有高度的遺傳變異，其中葉綠體的非編碼區 ( noncoding region ) 因不具功能限制，具有自由變異與快速演化特性，可提供足夠系統發育與演化訊息，此外，其具有單系遺傳 ( 通常是母系遺傳 ( Harris & Ingram, 1991; Vogel et al., 1998 ) ) 與不具遺傳重組等特性，因而被認為適合於建構屬以下分類群的系統演化關係 ( Chiang et al., 1998 )，以及種內族群間地理親緣重建與評估在地質歷史過程的遷移路線 ( Clegg et al., 1994; Ferris et al., 1995; Gastony & Rollo, 1995; Haufler & Ranker, 1995; Demesure et al., 1996; Avise, 2000; Huang et al., 2001 )。

過去十幾年來探討東亞地區維管束植物親緣地理關係的研究逐漸盛起 ( Chiang & Schaal, 2006 )，然其所涵蓋的地理範圍多以日本、琉球群島至台灣此一島弧鍊為主 ( Huang et al., 2004 )，含括中國大陸物種材料的研究甚少，即使有包含中國大陸材料，其所使用族群數通常甚少 ( Shinohara et al., 2006 )，代表性嚴重不足。取樣方法應儘量涵蓋物種主要分布範圍，以期能充分了解物種過去族群變動與演化的全貌。過去僅有少數研究於東亞分布地理區域廣泛採樣 ( Chiang et al., 2001; Chung et al., 2004 )，然其多以開花

植物為研究對象，甚少以蕨類植物為探討之主題。哈氏狗脊蕨複合種群主要分布於東亞及東南亞北部地區（圖 2-1），分布模式約略等於 Kuo（1985）及郭城孟（1998）所提出的「東南中國大陸型」，其中哈氏狗脊蕨分布較廣，包括中國大陸廣東、廣西、福建、湖南、海南島、日本九州屋久島、琉球群島、越南北部、泰國北部與台灣北部。細葉狗脊蕨的地理分布範圍基本上與哈氏狗脊蕨重疊，但分布地點較少，範圍較窄，最西分布至大陸廣西一帶，未見於更西的大陸海南島、越南及泰國。整體而言，此複合種群在東亞及東南亞地區呈現一長帶狀分布，而台灣地區族群位處於此一帶狀地理分布的中間位置，生育地點數量多，且多數地點兩者呈共域分布（圖 2-2），因此是研究哈氏狗脊蕨複合種群地理親緣關係關鍵的族群。本研究利用葉綠體 *trnS-rps4* 及 *atpB-rbcL* 兩基因區間片段的變異來探討哈氏狗脊蕨複合種群中二倍體類群與四倍體類群之親緣關係，以及複合種內各族群的遺傳多樣性與地理親緣關係，並根據葉綠體基因型的地理分布檢測不同的地理遷移模式假說。

## 貳、研究材料及方法

### 一、研究材料：

於台灣北部及東亞地區採集哈氏狗脊蕨複合群材料，共計取得 14 個族群共 364 棵植株樣品（表 5-1），其中台灣有 3 個族群 120 棵植株樣品，日本 2 個族群 41 棵植株樣品，大陸 8 個族群 183 棵植株樣品。此外，以廣泛分布於東亞地區的日本狗脊蕨（Wj, *W. japonica*）、台灣狗脊蕨（Wo, *W. orientalis* var. *formosana*）及頂芽狗脊蕨（Wu, *W. unigemmata*）做為外群。取樣時自野外族群採集新鮮健康之新葉，或於野外即以矽膠進行快速乾燥，而後置於超低溫冷凍櫃備用。

### 二、研究方法：

1. DNA 萃取：以 Viogene®的 Plant Genomic DNA Miniprep System Kit 進行 DNA 萃取。

- (1) 取約 100mg 的植物材料，以液態氮研磨至粉末狀，並移至一離心管中。
- (2) 加 400 $\mu$ l 的 PX1 溶劑及 4 $\mu$ l 的 Rnase (100mg/ml)，經振盪均勻混合後，置 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 分鐘。
- (3) 回室溫後，再加 130 $\mu$ l 的 PX2 溶劑至管中，經振盪均勻後，置冰浴 5 分鐘。
- (4) 將反應完後之黏稠混合物移至過濾管 (Shearing tube) 內，再置於收集管上，經高速離心 (10,000rpm) 後，將液狀物質過濾至收集管中。
- (5) 加 0.5 體積的 PX3 溶劑與等體積的純酒精，至步驟 4 所收集之回收管內，並以吸管充分混合。
- (6) 取步驟 5 的混合液 650 $\mu$ l，移至離心柱 (Spin column) 內，再置於收集管上，經高速離心 1 分鐘後，將濾出液丟棄。
- (7) 重複步驟 6，至步驟 5 的樣品全部處理完。
- (8) 用 0.7ml 的清洗劑，以 30 秒高速離心的方式清洗離心柱 2 次，將濾出液丟棄。
- (9) 高速離心 2 分鐘，去除殘留的清洗劑。
- (10) 將過濾管 (2) 移至新的離心管 (1.5ml) 中，加 200 $\mu$ l 的 0.1 $\times$ TE 緩衝液(事先預熱至 65 $^{\circ}$ C)，以高速離心的方式將 DNA 溶至離心管中。
- (11) 將 DNA 保存於 -20 $^{\circ}$ C。

表 5-1、Codes and demographic parameters for populations of *Woodwardia harlandii* complex in this study. Shaded rows indicating the diploid populations while the others being tetraploid.

Population (Code)	Sample size	Polymorphic site	No. of haplotype	<i>h</i>	$p \times 10^3$	Haplotype
<b>台灣</b>	<b>142</b>					
烏來(TY)**	100	1	2	0.432	0.33	C1, C2
陽明山(TS)**	22	0	1	0	0	C1
貢寮(TT)**	20	0	1	0	0	C1
<b>日本</b>	<b>39</b>					
九州屋久島(JY)***	20	0	1	0	0	C1
琉球沖繩島(JO)*	19	0	1	0	0	C1
<b>中國大陸</b>	<b>183</b>					
香港(HK)**	33	0	1	0	0	C1
福建南靖(CF)*	10	0	1	0	0	C1
海南島(CH)*	15	9	2	0.248	1.70	C1, C4
廣東從化(CC)**	17	0	1	0	0	C1
湖南南嶺莽山(CN1)*	10	8	4	0.533	2.17	C1, C3, C5, C13
廣東南嶺連州(CN2)*	11	4	2	0.545	1.66	C5, C15
廣東南嶺乳源(CN3)*	4	0	1	0	0	C1
廣東新會古兜山(CG1)*	39	7	6	0.703	1.18	C5, C8, C9, C10, C11, C14
廣東新會大圓嶺(CG2)*	44	5	6	0.770	0.83	C5, C6, C7, C9, C11, C12

\* 表示僅發現哈氏狗脊蕨之地點

\*\* 表示哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨共域分布之地點

\*\*\* 表示僅發現細葉狗脊蕨之地點

*h*: Haplotype diversity

*p*: Nucleotide diversity

將以上兩種萃取方法所得之 DNA 溶液, 以 1×TBE buffer 所配製的 1% agarose gel( 內含 0.25 μg/ml 之 Ethidium Bromide 染劑 ), 進行電泳約 30-50 分鐘後, 利用已知濃度的 DNA Marker 比對所萃取的 DNA 之品質及濃度後, 再將 DNA 濃度稀釋成 10 ng/μl, 保存於 4°C 備用。

## 2. PCR 反應：

### (1)引子的選擇：

選用的 DNA 片段為 *atpB-rbcL* 及 *trnS-rps4* 等 2 基因區間片段, 其中 *atpB-rbcL* 片段參考 Chiang et al.(1998)設計的引子( *atpB-1* 及 *rbcL-1* ), 再重新設計更專一性之引子( *atpB-F*: 5'-CCRAGAGTAGT TTCACCAA-3 及 *rbcL-W*: 5'-TCGGTATCTTTGGTCTTGTAT-3' ), 進行 *atpB-rbcL* 基因區間片段的擴增。*trnS-rps4* 片段則參考 Smith and Cranfill (2002)之引子 ( *trnS R* 及 *rps4 R1* ), 再重新設計更具專一性之引子 ( *tSr4-W-f* : 5'-CCGAGGGTTCGAATCCCTCC-3' 及 *tSr4-W-r* : 5'-GCCAATCGAGAATCCGTCAATTT-3' )

### (2)PCR 反應試藥與濃度：

每個 PCR 反應試劑體積為 50μl, 各試藥之濃度、所需體積及最終之反應試劑濃度如下 ( 參考 Viogene Biotek® 之濃度配方 ):

試藥	所需體積	反應試劑最終濃度
10×PCR buffer (with 15mM MgCl <sub>2</sub> , Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1% Triton X-100, 50% glycerol)	5μl	1×
10mM dNTP mixture	1μl	0.2 mM each
Primer mix(10u M each)	2.5μl	0.5uM each
Template DNA	1-10μl	
VioTag DNA polymerase	0.5μl	2.5 units
Autoclaved distilled water to	50 μl	

(3) PCR 反應條件：

PCR 反應採用之溫度週期及流程如下：

- a. 先以 94 °C 處理 5 分鐘，使雙股 DNA 變性。
- b. 再以 94 °C (變性溫度) 一分鐘、53 °C (鏈合溫度) 一分鐘、72 °C (延長溫度) 兩分鐘，進行 35~40 次的擴增循環。
- c. 最後保持 72 °C 處理 8 分鐘。
- d. 反應產物溫度降至室溫或 5°C 保存。

(4) PCR 結果檢測：

以 1× TBE buffer 所配製成之 1% agarose gel (內含 0.25 µg/ml 之 EtBr 染劑) 在 110mA 條件下，進行電泳約 30 分鐘後，隨即於紫外燈上觀察及記錄 PCR 產物的分子量、濃度及產物條帶是否單一。每次電泳中並加入分子量參考標記 (molecular weight marker, 100 bp DNA ladder, Violet)，以標示 PCR 產物條帶的分子量並當作 PCR 產物之 DNA 濃度的參考。

3. PCR 產物之純化回收：

利用 Viogene® Gel Extraction System Kit 純化回收，步驟如下：

- (1) 將所有 PCR 反應溶液取出，加入 1/10 體積的 loading dye，以 1.2% agarose gel 進行電泳約 100 分鐘，於紫外燈上觀察並將膠片上的 PCR 產物切下 (約 100 mg) 放入 1.5ml 的離心管中。
- (2) 加入 0.5 ml 的 GEX buffer，以 60 °C 水浴至少 10 分鐘直至 gel 完全溶解並使其與 buffer 均勻混合及反應。
- (3) 先將 Kits 內附之 Gel extraction column 置入於收集管之上方，再將反應完全之溶液 (約 0.6ml) 以吸量管吸取入 Gel extraction column 內。
- (4) 高速離心 (10,000g) 約 1 分鐘後，DNA 留滯於 Gel extraction column

之濾膜上，將濾出液丟棄。

- (5) 以 0.5ml 之 Wash I buffer 沖洗濾膜上的 DNA，再以高速離心 1 分鐘後將濾出之沖洗液丟棄。
- (6) 以 0.7ml 之 Wash II buffer 沖洗濾膜上的 DNA，以高速離心 1 分鐘後將濾出之沖洗液丟棄，此步驟進行兩次。
- (7) 高速離心 3 分鐘，將殘餘之沖洗液完全濾出。
- (8) 將 Gel extraction column 置於新的 1.5ml 離心管上，加入 30 $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O (60 )於濾膜上，靜置約一分鐘後再以高速離心 2 分鐘將 DNA 濾至離心管內，完成 PCR 產物之純化回收。
- (9) 取 2  $\mu$ l 混合 1/10 體積的 loading dye，進行 1%瓊脂膠體電泳，觀察回收效果是否良好，並估算 DNA 片段的濃度，以便進行直接定序，保存於-20 備用。

#### 4. DNA 定序：

DNA 片段經純化回收後，以自動定序儀定序。

#### 5. 資料分析：

##### (1)序列分析：

以 BioEdit 7.0 軟體進行序列排序，並以手動調整，再以 DNaSp 4.10.9 程式 ( Rozas and rozas, 2000 ) 計算變異位點之比例。

##### (2)遺傳變異度與遺傳分化分析：

以 DnaSP 4.10.9 程式計算以下數值

- a. 族群內核？酸歧異度 ( Nucleotide diversity,  $p$  )
- b. 單套基因型 ( 單套型 ) 歧異度 ( Haplotype diversity,  $h$  )
- c. 族群內及族群間間遺傳分化指數  $G_{ST}$  及  $N_{ST}$
- d. 基因流傳值  $N_m$

##### (3)親緣關係樹之建構：

a. 鄰接法分析

利用 MEGA 4 程式 ( Tamura et al., 2007 ) 以鄰接法 ( Neighbor joining, NJ ), 建構葉綠體單套型間之親緣關係樹。分析時遺傳距離採用 Kimura's two-parameter , 鹼基缺失 ( gap ) 設定為第五種鹼基 ( fifth base ), 再進行 1000 次的 Bootstrap 檢定 , 以獲得各分支支持度。

b. 貝葉氏法分析

利用 MrBayes 3.0b4 ( Huelsenbeck & Ronquist, 2001 ) 進行貝葉氏法 ( Bayesian inference analysis ) 分析 , 核? 酸替代模型設定為 GTR+G , 採用 MCMCMC ( Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo ) 演算法 , 以隨機樹為起始樹 , 進行 1,000,000 個 generation , 每 1000 個 generation 取一次值 , 前 25% 產生資料作為老化樣本 ( burnin ) 捨棄 , 總和剩餘資料後計算得各節點之機率值。

c. 最大檢約法分析

利用 MEGA 4 程式( Tamura et al., 2007 )以最大簡約法( Maximum parsimony, MP ), 建構葉綠體單套型間之親緣關係樹。分析時採用? ? 式搜索 ( heuristic search ) 方法 , 鹼基缺失 ( gap ) 設定為第五種鹼基 ( fifth base ), 綜合相等樹長的最簡約樹得到嚴格共識樹。

(4)網狀親緣關係圖之建構 :

利用 TCS 1.21 軟體 ( Clement et al. 2000 ) 進行網狀親緣關係之建構。

## 參、結果與討論

### 葉綠體 DNA 序列多型性與遺傳歧異度

哈氏狗脊蕨複合群 14 個取樣族群中，有 8 個族群只發現哈氏狗脊蕨之個體，而在台灣 3 個族群及大陸香港與廣東省從化等 5 處生育地，哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨則為共域生長，或分布距離很近，日本屋久島則僅發現 2 小族群之細葉狗脊蕨。此 14 個族群 364 個樣品經萃取分析與 PCR 擴增放大上述二基因區間片段後，其中 *trnS-rps4* 基因區間片段排序後計長 420 bp，多型性位點（變異位點）有 10 個，*atpB-rbcL* 基因區間片段則為 893 bp，多型性位點則有 11 個。二段葉綠體基因區間片段合併後共計長 1,313 bp，A/T 含量為 58.6%，多型性位點有 21 個，全為點突變（point mutation）。各族群核 DNA 酸歧異度（ $p$ ）介於 0 至 0.00217 之間，平均值為 0.00056，其中大陸南嶺地區之莽山族群（CN1）具有最高之核 DNA 酸歧異度（ $p=0.00217$ ），其次為大陸海南島（CH）與連州（CN2）之族群，核 DNA 酸歧異度分別為 0.00170 及 0.00166。全部檢測族群一半以上此二段葉綠體基因區間片段全無變異，即呈固化（fixation），其單套基因型皆為 C1（表 5-1）。

若以整個哈氏狗脊蕨複合種群為單一族群，則其核 DNA 酸歧異度為最高（ $p=0.00256$ ），與同樣自東亞地區族群取樣的琉球松複合群（ $p=0.06345$ ）比較（Chiang et al., 2006），則琉球松複合群之核 DNA 酸歧異度明顯高於哈氏狗脊蕨複合群。若與同型孢子蕨類植物台灣杪櫞（*Alsophila spinulosa*）的研究結果比較（Su et al., 2005），其核 DNA 酸歧異度值（ $p=0.02263$ ）亦明顯高於本研究結果。然而若與僅自台灣地區族群取樣的長尾栲（Cheng et al., 2005）、紅楠及大葉楠（Wu et al., 2006）比較，本研究哈氏狗脊蕨複合群之核 DNA 酸歧異度則偏高。若將哈氏狗脊蕨複合群二倍體類群與四倍體類群分開計算（表 5-2），可以發現二倍體類群之核 DNA 酸歧異度（ $p=0.00108$ ）明顯高於四倍體類群（ $p=0.00072$ ）。

表 5-2、Demographic parameters and test statistics of neutrality for major groups of *Woodwardia harlandii* complex in this study.

Group*	N <sub>pop</sub>	N <sub>var</sub>	N <sub>hap</sub>	<i>h</i>	p×10 <sup>3</sup>	Gst	Nst	Nst-Gst	Test statistics of neutrality		
									D	D*	F*
<b>Wh (2x)</b>	2	10	9	0.797	1.08	0.072***	0.138***	0.066	-0.77366	-0.66157	-0.82978
<b>Wh+Wk (4x)</b>	12	14	7	0.294	0.72	0.296***	0.607***	0.311	-1.41041	1.50656	0.46727
Wh (4x)	11	14	7	0.391	0.97	0.312***	0.606***	0.294	-1.16462	1.52583	0.61078
Wk (4x)	6	0	1	0	0	-	-	-	-	-	-
<b>Wh complex (2x+4x)</b>	14	21	15	0.567	2.56	0.421***	0.768***	0.347	0.09422	0.13707	0.14467

\*: 2x indicating diploid (2n=2x); 4x indicating tetraploid (2n=4x)

\*\*\*: P<0.001

N<sub>pop</sub>: Number of population

N<sub>var</sub>: Polymorphic site

N<sub>hap</sub>: Number of haplotype

*h*: Haplotype diversity

p: Nucleotide diversity

Gst: Estimate of genetic differentiation as defined in Nei (1973)

Nst: Estimate of genetic differentiation as defined in Lynch & Crease (1990)

D: Tajima's D test statistic

D\*: Fu and Li's D\* test statistic

F\*: Fu and Li's F\* test statistic

合併二段葉綠體基因區間片段共獲得 15 個單套基因型 (表 5-1), 各族群單套型歧異度 (haplotype diversity) 介於 0 至 0.770 之間, 平均為 0.231。大陸廣東大圓嶺 (CG2) 具有最高之單套型歧異度 ( $h=0.770$ ), 其次為大陸廣東之古兜山 (CG1), 單套型歧異度為 0.703, 大陸南嶺一帶之連州 ( $h=0.545$ ) 與莽山 ( $h=0.533$ ) 再次之。若純就基因型數目而言, 大陸廣東新會一帶之大圓嶺與古兜山同時具有最高之單套基因型數目 (6 個), 其次為南嶺一帶之莽山, 具有 4 個單套基因型 (表 5-1)。若將哈氏狗脊蕨複合群二倍體類群與四倍體類群分開計算, 可以發現二倍體類群之單套型歧異度 ( $h=0.797$ ) 顯著地高於四倍體類群 ( $h=0.294$ ) (表 5-2)。

### 中性假說檢定與族群結構檢測

中性假說的理論基礎為大多數的非有害突變是中性的, 當基因未受到純化天擇 (purifying selection) 與族群大小變動 (demography) 等因素影響時, 存在於族群間的遺傳變異只受隨機的中性突變及基因漂變 (genetic drift) 影響 (Kimura, 1983)。本研究利用 DnaSP 軟體測試分別測試哈氏狗脊蕨複合群、二倍體類群、四倍體類群與四倍體哈氏狗脊蕨等四群此二葉綠體基因區間片段之分子演化是否符合中性假說。檢測結果顯示 (表 5-2), 四群的 3 種檢測統計值 ( $D$ 、 $D^*$  及  $F^*$ ) 都未顯著偏離 0, 即其 DNA 序列的變異分布都符合中性假說。二倍體類群之中性假說檢測值雖未顯著偏離 0, 然而檢視圖 5-5 中 9 種二倍體類群基因型呈現星狀之譜系關係, 以及其具有較高的單套基因型歧異度與較低的核 DNA 歧異度 (表 5-2), 顯示大陸廣東省新會一帶之二倍體族群有近期族群快速成長與分布範圍擴張現象 (Avise, 2000)。

$G_{ST}$  及  $N_{ST}$  皆可檢測族群間遺傳分化情形, 但  $G_{ST}$  只運用基因型的頻率分布做為計算基準, 而  $N_{ST}$  的演算除了基因型頻率分布外, 另考慮基因型間的相似性, 因此比較  $G_{ST}$  及  $N_{ST}$  的差異顯著與否, 可以做為族群間是否具有明顯親緣地理結構的指示 (Pons & Petit, 1996)。同樣以 DnaSP 軟體分別計

算哈氏狗脊蕨複合群、二倍體類群、四倍體類群與四倍體哈氏狗脊蕨等四群之  $G_{ST}$  及  $N_{ST}$  值，並檢測其是否具有顯著差異。統計結果顯示哈氏狗脊蕨複合群、四倍體哈氏狗脊蕨複合群、四倍體哈氏狗脊蕨與二倍體哈氏狗脊蕨等四群之群內族群間都具有明顯的遺傳分化（表 5-2），且其  $N_{st}$  與  $G_{st}$  值都具有顯著差異，顯示各群內族群間都具有明顯的親緣地理結構。

### 單套基因型親緣關係

利用 MEGA 4 程式( Tamura et al., 2007 )分別以鄰接法( Neighbor joining, NJ )及最大檢約法 ( Maximum parsimony, MP ), 以及利用 MrBayes 3.0b4 ( Huelsenbeck & Ronquist, 2001 ) 軟體進行貝葉氏法 ( Bayesian inference analysis ) 分析，建構葉綠體單套型間之親緣關係。分析時選用分布於台灣同屬之日本狗脊蕨 ( *Woodwardia japonica* )、台灣狗脊蕨 ( *W. orientalis* var. *formosana* ) 及頂芽狗脊蕨 ( *W. unigemmata* ) 作為外群，所建構之親緣關係樹如圖 5-1 至 5-3。三種分析法所建構之葉綠體基因型親緣關係樹頗為近似，哈氏狗脊蕨複合群所有葉綠體基因型構成一單系群，支持度都極高，此結果與 Cranfill & Kato ( 2003 ) 利用 3 段葉綠體 DNA 片段分析狗脊蕨屬植物系統演化關係之結果一致。哈氏狗脊蕨複合群單系群內則可以區分為四群，其中最大的一群為以二倍體類群為主的一主要分支，支持度從 75% 至 100%，此分支除了二倍體類群之葉綠體單套型外，另包含 2 型來自南嶺之四倍體單套型 ( C13 及 C15 )。廣泛分布於四倍體類群之 C1 單套型與僅分布於台灣烏來地區之 C2 單套型則構成另一支持度較弱的分支，此二單套型僅在 *trnS-rps4* 基因區間片段有 1 鹼基之差異，另二群分別由侷限分布於大陸南嶺莽山 ( C3 ) 與海南島 ( C4 ) 族群之單套型構成。

檢視二葉綠體基因區間片段變異位點之分布( 表 5-3 ), 可以發現二倍體與四倍體各主要基因型間具有 7 至 8 個位點的差異，其中 *atpB-rbcL* 基因區間片段有 5 個，*trnS-rps4* 基因區間片段則有 3 個，其中 2 個鹼基差異在不

同倍體性類群間較不明確。檢視侷限分布於大陸南嶺地區之基因型 (C3、C13 及 C15), 可以發現此 3 種基因型序列局部區段分別類似二倍體或四倍體之主要基因型, 如 C3 單套型在 *atpB-rbcL* 基因區間片段的序列與 C1 完全一致, 在 *trnS-rps4* 基因區間片段的序列則與 C5 及 C9 一致。C13 單套型則恰好相反, 即其在 *atpB-rbcL* 基因區間片段的序列與 C5、C9 及 C11 完全一致, 而在 *trnS-rps4* 基因區間片段的序列則與 C1 一致。C15 具有與 C13 單套型類似的序列結構, 但另有 3 個鹼基的變異。此外, 僅分布於大陸海南島的 C4 單套型序列同樣局部區段分別類似二倍體或四倍體之主要基因型, 其中 *atpB-rbcL* 基因區間片段的序列與二倍體類群基因型相近, 但有 1 獨特變異位點不見於其他哈氏狗脊蕨複合群個體序列, *trnS-rps4* 基因區間片段的序列與四倍體主要基因型 C1 類似, 但具有 4 個不見於其他哈氏狗脊蕨複合群個體的變異位點 (表 5-3)。由於大陸南嶺與海南島此 4 種單套型 (C3、C4、C13 及 C15) 皆同時具有類似二倍體或四倍體主要基因型之序列, 使得建構之葉綠體基因型親緣關係樹的解析力下降, 若將此四基因型抽離後重新建構親緣關係樹, 則哈氏狗脊蕨複合群可以區分為二倍體與四倍體兩群, 此二分支之支持度亦明顯提高。

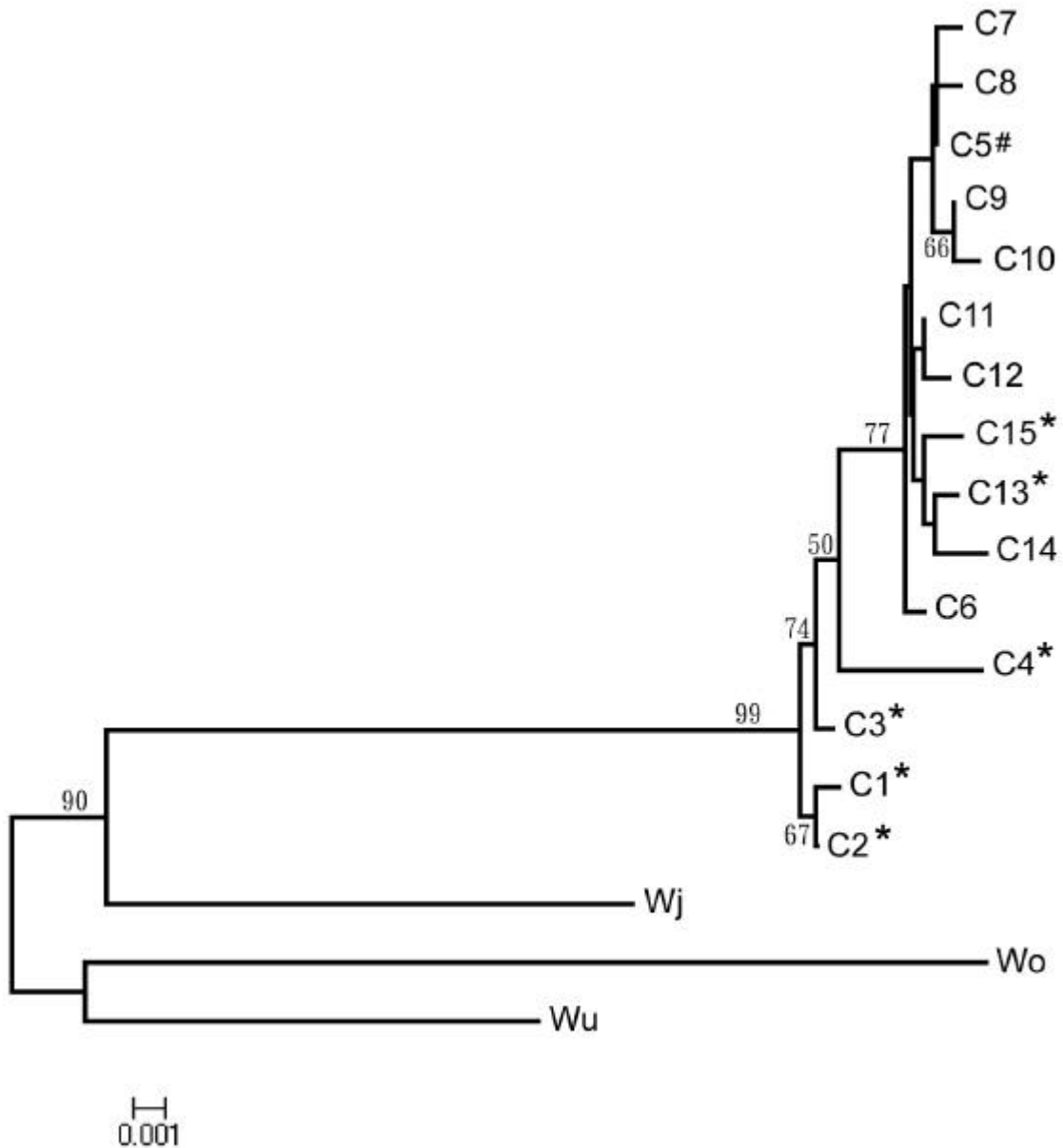


圖 5-1、以葉綠體 *atpB-rbcL* 及 *trnS-rps4* 基因區間片段所建構之鄰接樹(NJ Tree)。Wj 為日本狗脊蕨，Wo 為台灣狗脊蕨，Wu 為頂芽狗脊蕨，C1 至 C15 為哈氏狗脊蕨複合群之基因型(表 5-1)，其中\*號表示僅見於四倍體之基因型，#表示同時發現於二倍體與四倍體族群之基因型，其餘未標示之基因型僅見於二倍體類群。節點上方數值為 Bootstrap 支持度。

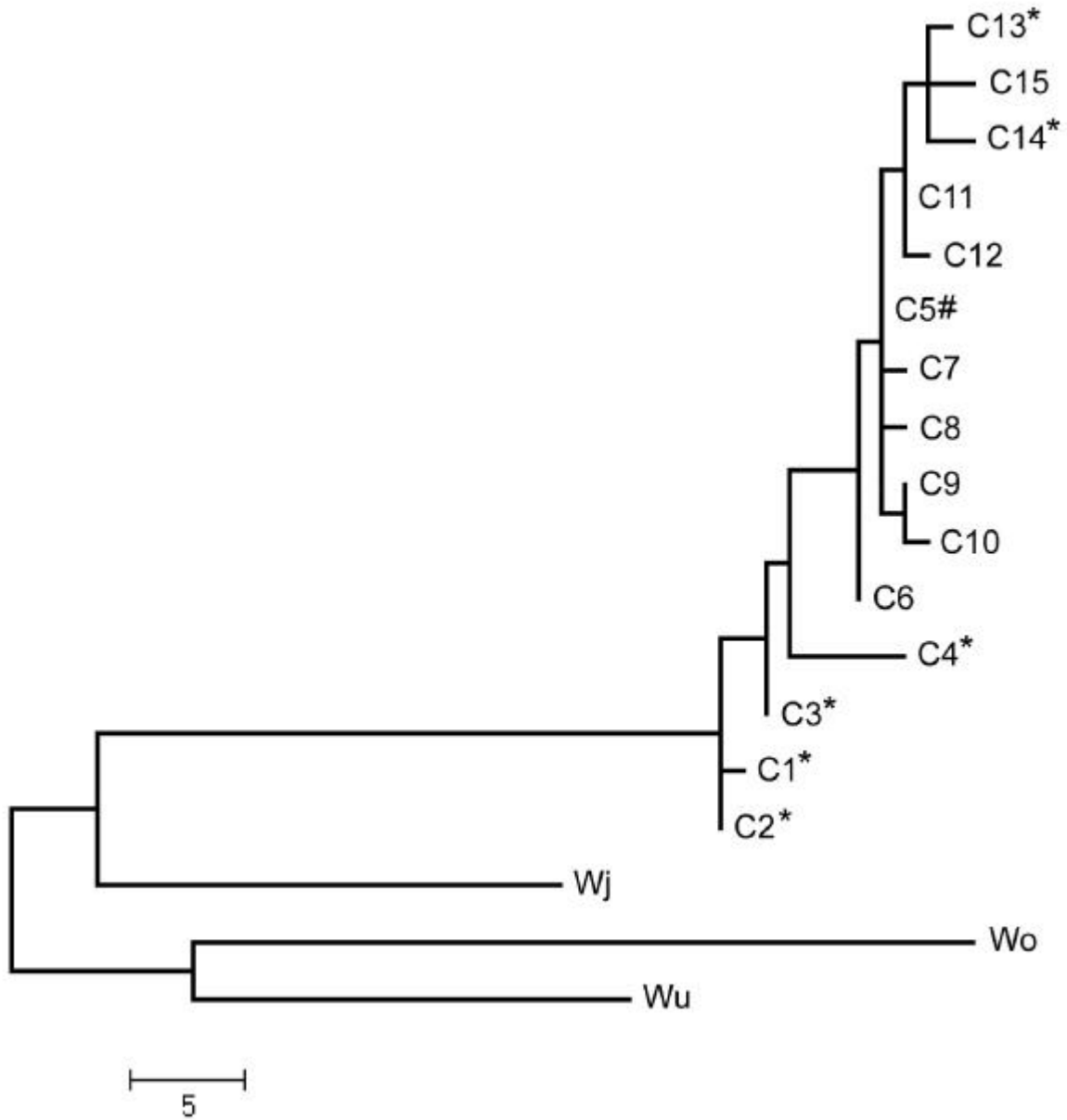


圖 5-2、以葉綠體 *atpB-rbcL* 及 *trnS-rps4* 基因區間片段所建構最大簡約樹(MP Tree)之嚴格共識樹。Wj 為日本狗脊蕨，Wo 為台灣狗脊蕨，Wu 為頂芽狗脊蕨，C1 至 C15 為哈氏狗脊蕨複合群之基因型(表 5-1)，其中\*號表示僅見於四倍體之基因型，#表示同時發現於二倍體與四倍體族群之基因型，其餘未標示之基因型僅見於二倍體類群。

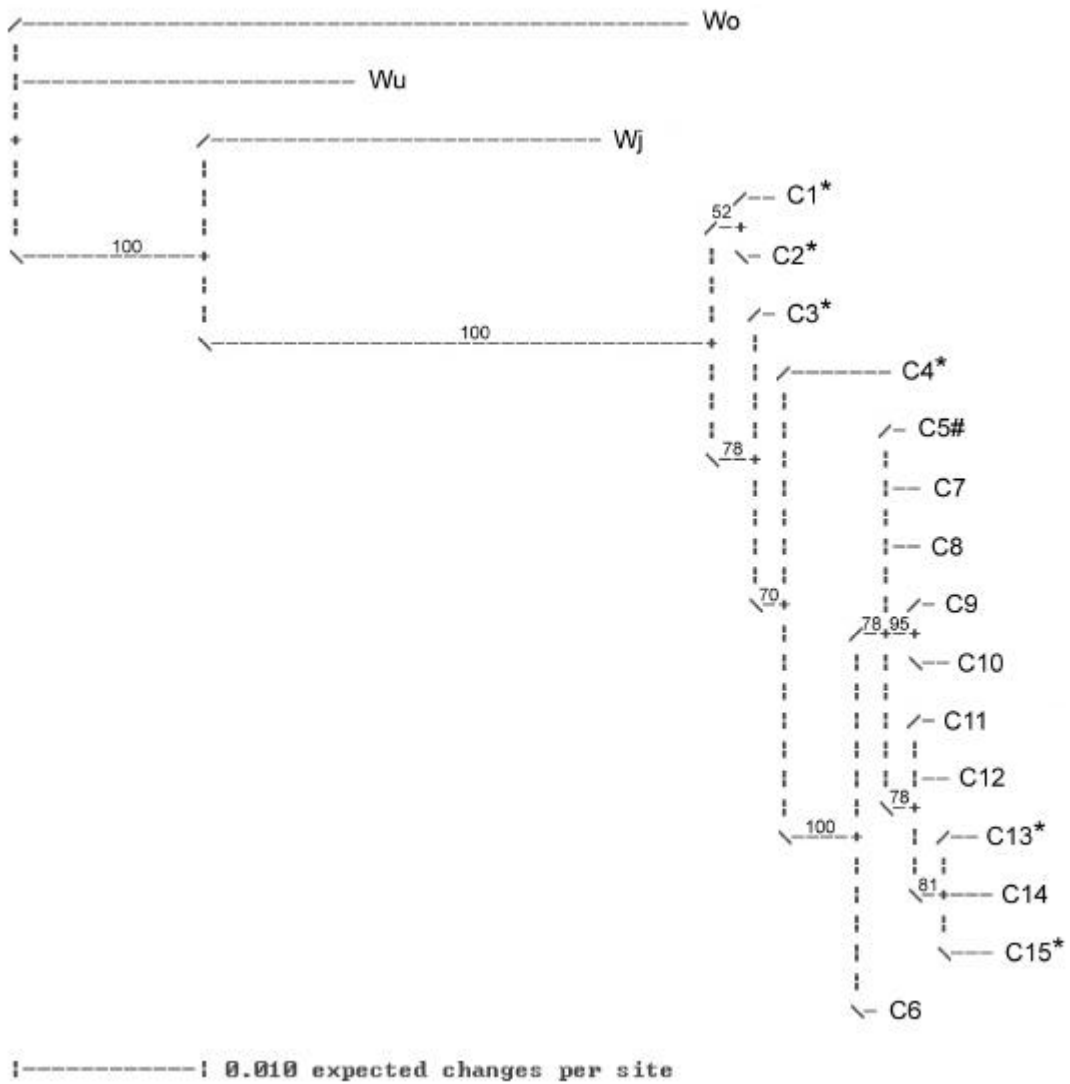


圖 5-3、以葉綠體 *atpB-rbcL* 及 *trnS-rps4* 基因區間片段所建構之貝葉氏樹(BI Tree)。Wj 為日本狗脊蕨，Wo 為台灣狗脊蕨，Wu 為頂芽狗脊蕨，C1 至 C15 為哈氏狗脊蕨複合群之基因型(表 5-1)，其中\*號表示僅見於四倍體之基因型，#表示同時發現於二倍體與四倍體族群之基因型，其餘未標示之基因型僅見於二倍體類群。節點上方數值為貝葉氏分析之機率值。

表 5-3. The variable loci of chloroplast *atpB-rbcL* and *trnS-rps4* intergenic spacer sequences

Haplotype	Variable sites																				
	<i>atpB-rbcL</i> intergenic spacer											<i>trnS-rps4</i> intergenic spacer									
	1	1	2	3	3	4	4	4	5	6	7	0	1	1	2	2	3	3	3	3	3
	1	4	5	1	2	5	6	8	5	4	8	6	0	8	2	5	2	5	6	7	7
	0	1	7	8	1	2	8	1	3	6	6	1	6	6	5	7	7	6	7	1	8
C1	C	C	T	C	C	G	T	G	A	G	G	C	A	G	A	G	T	C	T	C	G
C2	C	C	T	C	C	G	T	G	A	G	G	C	A	G	A	G	T	C	C	C	G
C3	C	C	T	C	C	G	T	G	A	G	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C4	C	C	T	C	T	G	T	G	A	G	A	A	G	G	G	G	T	T	C	T	A
C5	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C6	C	C	T	C	T	A	C	G	G	G	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C7	C	T	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C8	C	C	T	C	T	A	C	A	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	T	G
C9	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	C	C	C	T	G
C10	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	A	C	C	C	T	G
C11	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	C	G
C12	C	C	C	C	T	A	C	G	G	A	G	C	G	G	A	G	T	C	C	C	G
C13	C	C	T	C	T	A	C	G	G	A	G	C	A	G	A	G	T	C	T	C	G
C14	C	C	T	T	T	A	C	G	G	A	G	C	A	A	A	G	T	C	C	C	G
C15	T	C	T	C	T	G	C	G	G	A	G	C	A	G	A	G	T	C	C	C	G

### 基因型分布與親緣關係

觀察 15 種單套基因型的地理分布 (圖 5-4), 可以發現單套型歧異度明顯集中於二倍體類群之大陸廣東省新會一帶, 其次為其北方之南嶺一帶, 此外, 除了台灣跟海南島各有另一單套基因型外, 其餘族群都以 C1 為唯一葉綠體基因型。就地理分布而言, 大陸珠江口以東地區之四倍體哈氏狗脊蕨複合群之遺傳變異顯著地下降。南嶺地區族群 (CN1 至 CN3) 匯集了兩種倍體性類群之單套基因型, 並出現疑似重組之獨特基因型 (表 5-3: C3、C13 及 C15)。地理上, 此地區恰位於兩種倍體性類群分布區之交會地帶, 族群內同時出現兩種倍體性類群之獨特基因型為可預期之結果, 然出現疑似重組之獨特基因型則暗示哈氏狗脊蕨複合群葉綠體在世代間之遺傳並不只是單純的母系遺傳, 推測少數精子具有攜帶葉綠體之功能, 由其所受精

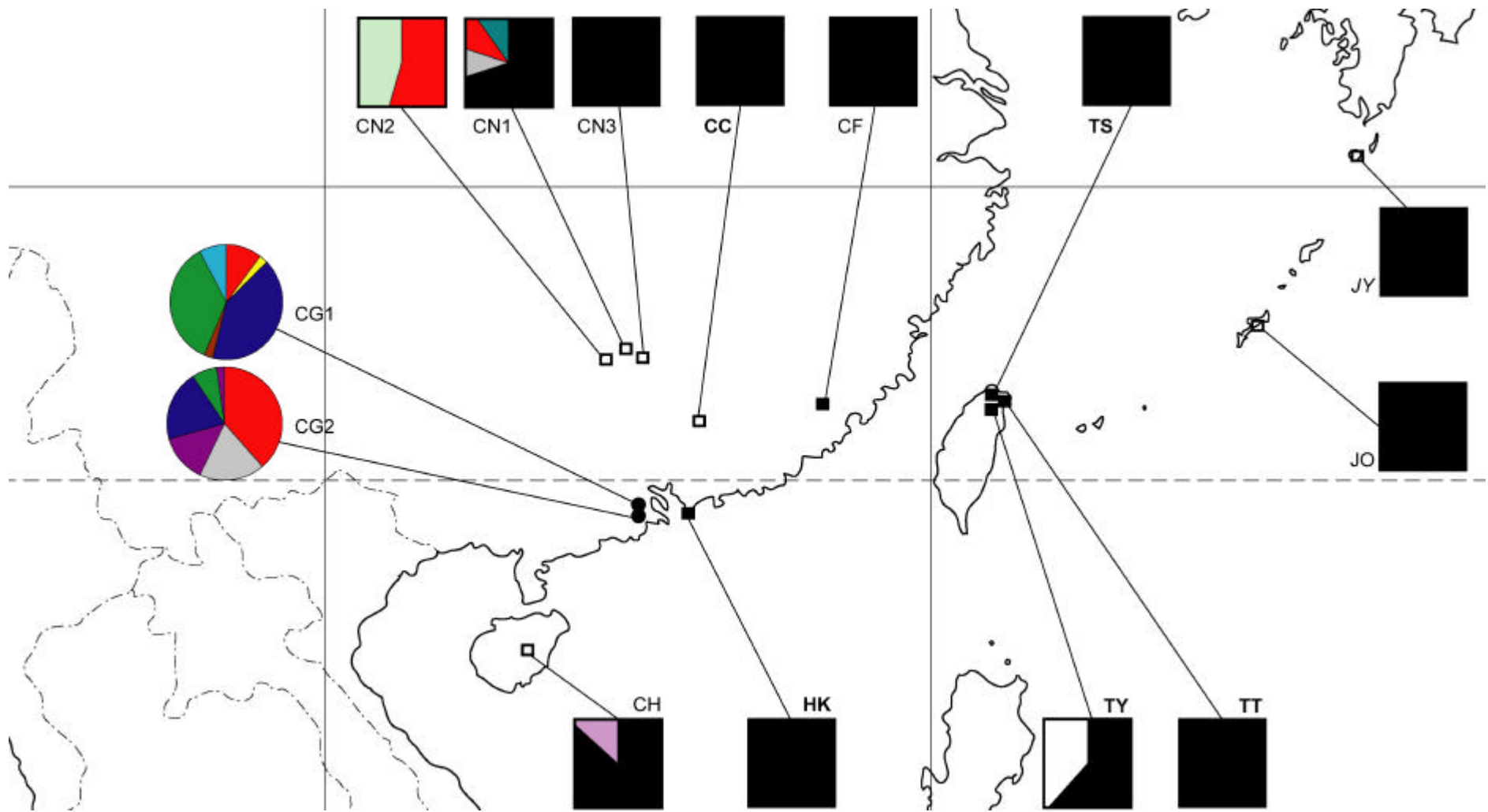


圖 5-4、葉綠體 *atpB-rbcL* 及 *trnS-rps4* 基因區間片段單套基因型之地理分布。

形成細胞質異質結合的孢子體再經由基因重組形成新的葉綠體單套基因型。

大陸海南島地區族群中 2 個體具有獨特的 C4 基因型，其具有介於二倍體與四倍體各主要基因型之間的序列結構，但除此類變異位點外，另其具有 5 個獨特的變異位點未見於其他族群基因型之序列中（表 5-3）。此地區族群中除了廣泛分布於四倍體類群之 C1 基因型與此獨特之 C4 基因型外，未發現其他葉綠體單套基因型，因此 C4 單套基因型可能並非如南嶺地區族群獨特基因型（C3、C13 及 C15）來自於細胞質異質結合與基因重組，而推測可能是源自其他未採樣地區（如大陸廣西省、越南北部或泰國北部）族群擴散至此。

根據核 DNA 與同功異構？分析分析結果（見第二章與第四章），四倍體哈氏狗脊蕨複合群推測應為異源四倍體。異源四倍體物種具有來自不同親本之遺傳物質，因此一般皆認為其具有較高的遺傳多樣性（Thompson & Lumaret, 1992），以同功異構？分析四倍體哈氏狗脊蕨複合群族群遺傳變異結果（見第四章）亦符合此推論。此類遺傳變異多分別固定在細胞核的非同源染色體（部分同源染色體或異源染色體）上，其與葉綠體 DNA 序列具有不同的遺傳特性，因此核基因體之遺傳組成多樣性高，無法直接推論葉綠體亦會具有很高之遺傳變異。由圖 5-4 葉綠體單套基因型的地理分布模式可以發現，除了位於交會帶之大陸南嶺與海南島哈氏狗脊蕨族群內同時具有不同葉綠體基因型外，其餘四倍體哈氏狗脊蕨複合群幾乎都僅具 C1 一種基因型（台灣烏來族群另具有 C2 基因型，其與 C1 僅 1 鹼基對之差異）。C1 及 C2 兩種基因型未見分布於二倍體哈氏狗脊蕨族群中，且此二基因型位於親緣關係樹中哈氏狗脊蕨複合群單系群基部位置，顯示此二古老基因型長期保留於四倍體類群中，而其二倍體親本種則已消失或僅存極小族群而未被發現。哈氏狗脊蕨複合群葉綠體基因型變異及分布模式顯然與另一

東亞產多倍體複合群假蹄蓋蕨 (*Deparia petersenii*) 不同 (Shinohara et al., 2006)。假蹄蓋蕨複合種群廣泛分布於大陸雲南、海南至台灣及日本此廣大區域，其中二倍體類群僅發現於台灣，四倍體類群則見於大陸、台灣及日本，而分布於日本之四倍體類群之葉綠體單套基因型高達 4 種，其中 3 種基因型可於台灣二倍體類群中發現。

以 TCS 軟體進行譜系分析所獲致基因型譜系關係樹 (圖 5-5) 顯示，僅分布於台灣烏來地區之 C2 單套型為位於最基部之基因型，由此衍生出的 C1 單套型則廣泛分布於四倍體族群中。不同於軟體顯示結果的另一種解釋為 C1 才是四倍體族群中最原始的基因型，其中位於烏來地區的族群突變形成 C2 基因型，並逐漸於該地區族群擴張其佔有頻率，而檢視 C1 這種廣泛且極度優勢的分布模式，使得無法確認四倍體類群可能避難所位置與遷徙路徑。C5 單套型為另一較普遍的基因型，由其衍生出多個基因型，這些主要都分布於二倍體類群中 (C13 及 C15 除外)，且位於 TCS 譜系關係樹中相對於 C1 基因型的另一端。所有 15 種基因型中，僅 C5 單套型同時分布於二倍體與四倍體類群，其餘基因型都僅發現於單一種倍體性類群。相對於植物的核基因組，葉綠體 DNA 演化速率較慢，其中非編碼區突變率為每百萬年 0.5 個鹼基 (Bohle et al., 1994)，因此不同基因型間超過 1 個鹼基以上之突變，就發生機率而言，其形成時間應都遠超過最近一次冰期開始之時間 (約 11 萬年前)。據此檢視基因型地理分布 (圖 5-4) 與 TCS 基因譜系關係 (圖 5-5)，二倍體與四倍體類群之基因型分布模式應是最近一次冰河期以來族群擴展的結果，其中大陸廣東省新會一帶推測是二倍體類群長期之避難所，方足以累積如此多獨特之基因型，與 3 次以上核 DNA 突變事件。在上次冰期極盛期結束進入間冰期後，此地區二倍體類群向北擴散，而在南嶺一帶與四倍體類群交會而發生基因重組，而族群數量較少的二倍體類群又因 minority cytotype exclusion 機制 (Levin, 1975) 而自此地區消失。四

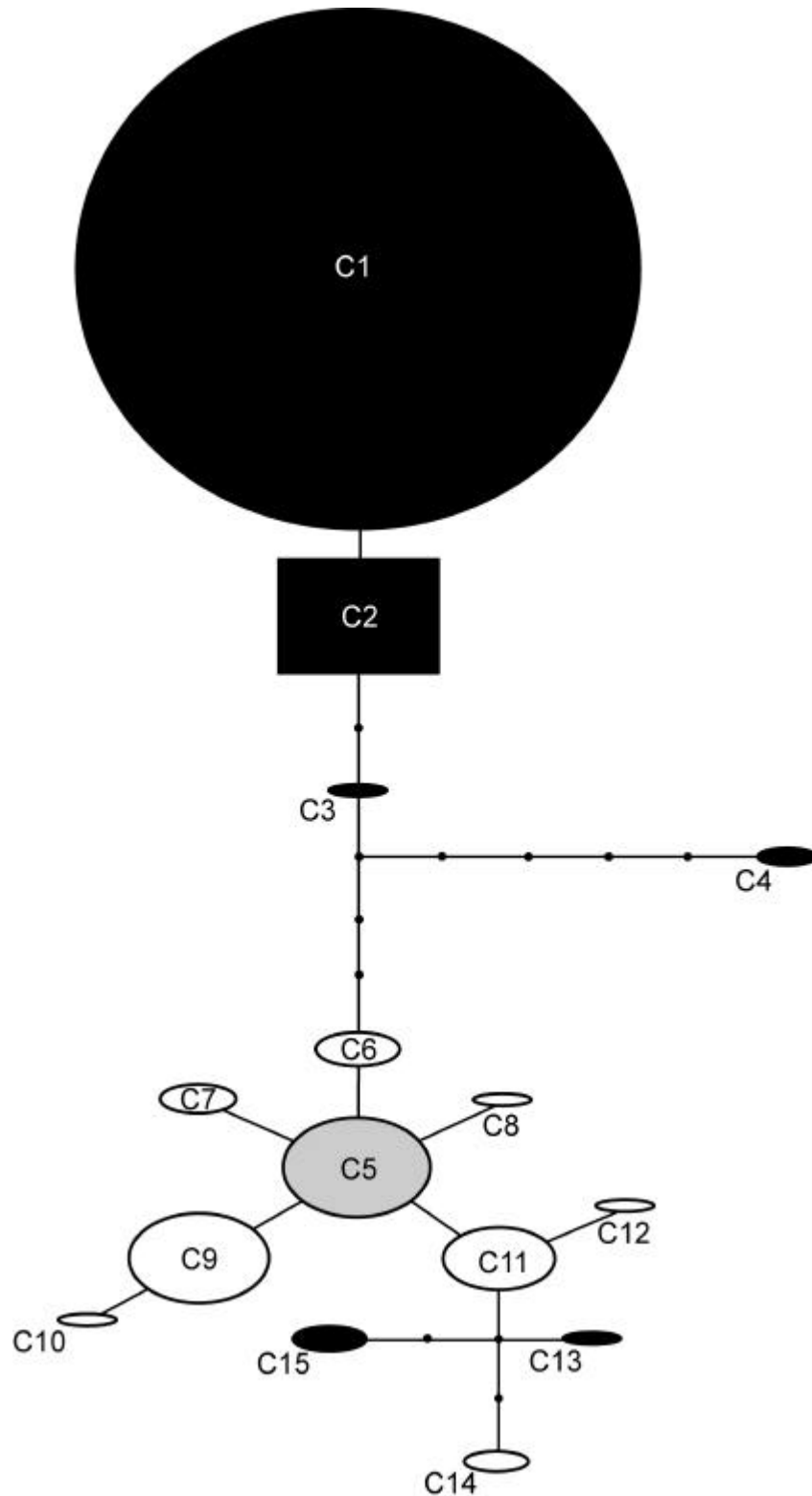


圖 5-5、The genealogical relationships between haplotypes of *Woodwardia harlandii* complex based on the *atpB-rbcL* and *trnS-rps4* spacer of the cpDNA genome. The black dots indicate the hypothetical haplotypes and each line between haplotypes represents a mutational step. Haplotypes only found in diploidy populations are labeled in white, which only found in tetraploidy populations are labeled in black, and which found in both ploidy population is labeled in gray.

倍體類群除了位於交會帶之南嶺族群外，其他廣大分布區之基因型數目甚少，因此上次冰期極盛時之避難所位置較難確認，其中台灣烏來地區為可能避難所之一，其存在廣泛基因型 C1 以外另一獨特基因型 C2，雖然 C1 與 C2 兩基因型間僅有 1 個鹼基之差異，但根據葉綠體非編碼區突變率推算，此地區族群存在時間應超過最近一次冰期。大陸海南島族群同時具有兩種序列差異頗大的基因型—C1 及 C4 (圖 5-4)，此二基因型具有 9 個位點的鹼基差異 (圖 5-5)，如此基因型組成可能的解釋有二，一為海南島地區為上次冰期之避難所，然此族群因經歷嚴重的瓶頸效應 (bottleneck effect)，造成其大量的基因型消失，最後僅留存 2 個序列差異極大的基因型 (Nei et al., 1975; Avise, 2000)，因此顯現出高核? 酸歧異度與低單套基因型歧異度的族群遺傳結構 (表 5-1)。另一可能解釋為海南島為冰期過後其他地區族群散播擴展之溶匯點 (melting point; Avise, 2000; Comps et al., 2001; Petit et al., 2003)，此兩種基因型可能分別來自兩個隔離時間甚久之分化族群，進入間冰期後始播遷匯集於此。此恰為二種相反的解釋，根據基因型序列差異與蕨類植物孢子散播距離，推斷海南島為冰期過後族群擴展之溶匯點的可能性較高。

#### 肆、結論

哈氏狗脊蕨複合群 14 個族群 364 個樣品經萃取分析與 PCR 擴增 *trnS-rps4* 及 *atpB-rbcL* 基因區間片段後，共計獲得序列長 1,313 bp，多型性位點有 21 個，核? 酸歧異度 (p) 平均值為 0.00056。若將哈氏狗脊蕨複合群二倍體類群與四倍體類群分開計算 (表 5-2)，可以發現二倍體類群之核? 酸歧異度 (p=0.00108) 明顯高於四倍體類群 (p=0.00072)。若以哈氏狗脊蕨複合群為單一族群，則其核? 酸歧異度為 0.00256，與同樣自東亞地區族群取樣的琉球松複合群及同型孢子蕨類植物台灣杪樞 (*Alsophila spinulosa*)

比較，哈氏狗脊蕨複合群之核 $\Psi$ 酸歧異度皆偏低，然若與取自台灣地區族群木本被子植物結果比較，本研究結果則偏高。此二基因區間片段共獲得 15 個單套基因型，各族群單套型歧異度 ( $h$ ) 平均為 0.231。若以哈氏狗脊蕨複合群為單一族群，則其單套型歧異度為 0.567；若將哈氏狗脊蕨複合群二倍體類群與四倍體類群分開計算，可以發現二倍體類群之單套型歧異度 ( $h=0.797$ ) 顯著地高於四倍體類群 ( $h=0.294$ )。二倍體類群之單套型歧異度略低於台灣杪欏的研究結果 ( $h=0.929$ )，但四倍體類群之單套型歧異度則明顯偏低。

以 DnaSP 軟體檢測哈氏狗脊蕨複合群此二葉綠體基因區間片段結果顯示符合中性假說，其中二倍體類群之中性假說檢測值雖未顯著偏離 0，但其 3 種檢測值都呈現負值，顯示其存在族群擴張現象，而由此類群擁有的基因型呈現星狀譜系關係，亦顯示有近期分布範圍擴張之現象。以  $G_{ST}$  及  $N_{ST}$  檢測族群間遺傳分化，統計結果顯示哈氏狗脊蕨複合群、四倍體哈氏狗脊蕨複合群、四倍體哈氏狗脊蕨與二倍體哈氏狗脊蕨等四群之群內族群間都具有明顯的遺傳分化，且其  $N_{st}$  與  $G_{st}$  值都具有顯著差異，顯示各群內族群間都具有明顯的親緣地理結構。

15 種葉綠體單套基因型地理分布顯示單套型歧異度明顯集中於廣東新會一帶之二倍體族群，次為南嶺地區族群。廣東新會一帶二倍體族群具有 9 種單套基因型，其中 8 種僅限分布於此，南嶺地區恰位於兩種倍體性類群分布區之交會地帶，推測此地區因而匯集了兩種倍體性類群之單套基因型，並出現重組之獨特基因型，此推論可由南嶺地區族群具有最高之核 $\Psi$ 酸歧異度獲得佐證。檢視基因型地理分布與基因型譜系關係，二倍體與四倍體類群之基因型分布模式應是最近一次冰河期以來族群擴展的結果，其中大陸廣東新會一帶推測是二倍體類群長期之避難所，方足以累積較多獨特之基因型。大陸南嶺及海南島地區族群同時都具有兩群序列差異頗大的

基因型，較可能解釋為南嶺及海南島為最後一次冰期以後來自其他地區族群散播擴展之溶匯點( melting point )，其基因型分別來自兩個隔離時間甚久之避難所族群，進入間冰期後始播遷匯集於此。台灣烏來地區為另一可能之避難所，其具有廣泛基因型 C1 以外另一獨特基因型，此 2 基因型間雖僅 1 鹼基之差異，然根據葉綠體非編碼區突變率推算，此地區族群存在時間應超過最近一次冰期。

## 伍、參考文獻

- 郭城孟 . 1998 . 台灣蕨類植物區系之研究 . 於邱少婷及彭鏡毅 ( 主編 ) , 海峽兩岸植物多樣性與保育論文集 , pp. 9-19 , 國立自然科學博物館 , 台中 .
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography, the history and formation of species.* Harvard University, London.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball Jr., E. Bermingham, T. Lamb, E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunder. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- Barrington, D. S. 1993. Ecological and historical factors in fern biogeography. *J. Biogeogr.* 20: 275-280.
- Bermingham, E. and A. P. Martin. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.* 7:499-518.
- Bohle, R., H. Hilger, R. Cerff and W. Martin. 1994. Noncoding chloroplast DNA for plant molecular systematics at the infrageneric level. *In* B. Schierwater, G. P. Streit and R. Desalle (eds.), *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*, pp. 391–403. Birkhauser, Basel.
- Cain, M. L., B. G. Milligan and A. E. Strand. 2000. Long-distance seed dispersal

- in plant populations. *Am. J. Bot.* 87(9):1217-1227.
- Chiang, T. Y., B. A. Schaal and C.-I. Peng. 1998. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39:245-250.
- Chiang, T. Y. and B. A. Schaal. 2006. Phylogeography of Plants in Taiwan and the Ryukyu Archipelago. *Mol. Ecol.* 15: 765-779.
- Chiang, T. Y., Y. C. Chiang, Y. J. Chen, C. H. Chou, S. Havanond, T. N. Hong and S. Huang. 2001. Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Mol. Ecol.* 10:2697-2710.
- Chung, J. D., T. P. Lin, Y. C. Tan, M. Y. Lin and S. Y. Hwang. 2004. Genetic diversity and biogeography of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae), an island species in Taiwan: a comparison with *Cunninghamia lanceolata*, a mainland species in China. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33: 791-801.
- Clegg, M. T., B. S. Gaut, G. H. Learn, Jr. and B. R. Morton. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 91: 567-575.
- Clement, M., D. Posada and K. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9(10): 1657-1660.
- Comps, B., D. Gömöry, J. Letouzey, B. Thiébaud, and R. J. Petit. 2001. Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics* 157: 389-397.
- Crawford, D. J., N. S. Lee and T. F. Stuessy. 1992. Plant species disjunctions: perspectives from molecular data. *Aliso* 13: 395-409.
- Demesure, B., B. Comps and R. J. Petit. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* 50: 2515-2520.
- Ennos, R. A., W. T. Sinclair, X.-S. Hu and A. Langdon. 1999. Using organelle makers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations.

- In P. M. Hollingsworth, R. M. Bateman and R. J. Gornall (eds.), *Molecular systematics and plant evolution*, pp. 1-19., Taylor & Francis, London.
- Ferris, C., R. P. Oliver, A. J. Davy and G. M. Hewitt. 1995. Using chloroplast DNA to trace postglacial migration route of oaks into Britain. *Mol. Ecol.* 4: 731-738.
- Gastony, G. J. and D. R. Rollo. 1995. Phylogeny and generic circumscriptions of cheilanthoid ferns (Pteridaceae: Cheilanthoideae) inferred from rbcL nucleotide sequences. *Amer. Fern J.* 85(4):341-360.
- Graur, D. and W.-H. Li. 2000. *Fundamentals of molecular evolution*, 2<sup>nd</sup> ed. Sinaur Associates, Inc., Sunderland, USA.
- Harris, J. L. and R. Ingram. 1991. Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plasmid transmission. *Taxon* 40: 393-421.
- Haufler, C. H. and T. A. Ranker. 1995. RbcL sequences provide phylogenetic insights among sister species of the fern genus *Polypodium*. *Amer. Fern J.* 85(4):361-374.
- Huang, S., Y. C. Chiang, B. A. Schaal, C. H. Chou and T. Y. Chiang. 2001. Organelle DNA phylogeography of *Cycas taitungensis*, a relict species in Taiwan. *Mol. Ecol.* 10:2669-2681.
- Huang, S. F., S. Y. Hwang, J. C. Wang and T. P. Lin. 2004. Phylogeography of *Trochodendron aralioides* in Taiwan and its adjacent areas. *J. Biogeog.* 31: 1-9.
- Kato, M. 1993. Biogeography of ferns: dispersal and vicariance. *J. Biogeogr.* 20:265-274.
- Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Kuo, C.-M. 1985. Taxonomy and phytogeography of Taiwanese pteridophytes. *Taiwania* 30:5-100.

- Levin, D. A. 1975. Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon* 24: 35–43
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lynch, M. and T. J. Crease. 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol. Biol. Evol.* 7: 377-394.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321-3323.
- Olmstead, R. G. and J. D. Palmer. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *Amer. J. Bot.* 81:1205-1224.
- Page, R. D. M. and E. C. Holmes. 1998. *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Petit, R. J., A. Kremer and D. B. Wagner. 1993. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theor. Appl. Genet.* 87: 122–128.
- Pons, O. and R. J. Petit. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237-1245.
- Rozas, J. and R. Rozas. 2000. DnaSp version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Shinohara, W., T.-W. Hsu, S.-J. Moore and N. Murakami. 2006. Genetic analysis of the newly found diploid cytotype of *Deparia petersenii* (Woodsiaceae: Pteridophyta): evidence for multiple origins of the tetraploid. *Int. J. Pl. Sci.* 167(2): 299-309.
- Smith, A. R. and R. B. Cranfill. 2002. Intrafamilial relationships of the thelypteroid ferns (Thelypteridaceae). *Am. Fern J.* 92: 131-149.
- Su, Y. J., T. Wang, B. Zheng, Y. Jiang and G. P. Chen. 2005. Genetic differentiation of relictual populations of *Alsophila spinulosa* in southern China inferred from cpDNA trnL-F noncoding sequences. *Mol. Phylogenet.*

- Evol. 34: 323-333.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- Thompson, J. D. and R. Lumaret. 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. Trends Ecol. Evol. 7: 302-307.
- Vogel, J. Chr., S. J. Russell, F. J. Rumsey, J. A. Barrett and M. Gibby. 1998. Evidence for maternal transmission of chloroplast DNA in the genus *Asplenium* (Aspleniaceae, Pteridophyta). Bot. Acta 111: 247-249.
- Wolfe, K. H., W.-H. Li and P. M. Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proc Natl Acad Sci USA 84(24): 9054-9058.

## 第六章 總結

哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨為系統演化關係最近緣的姊妹群，其是否為各自獨立之分類群，抑或只是不同表現型之同一分類群？比對分布資料後發現其地理分布或生育環境都高度重疊，共域分布的四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨具有一致的物候現象，而細胞學證據顯示，除了中國大陸廣東省新會地區之哈氏狗脊蕨族群為二倍體外，其餘檢測的哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群皆為四倍體。根據其核基因片段組成基因型的差異性，推測這些四倍體族群皆為異源四倍體 (allotetraploid)。此外，細葉狗脊蕨在葉綠體與細胞核基因片段均與共域分布的哈氏狗脊蕨有一致的單套基因型，顯示此二種外型不同的類群在遺傳組成上並無差異。四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨除了外在表形的差異外，其他證據都顯示其並非獨立的好分類群。相對地，二倍體的哈氏狗脊蕨與其他四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨之間，不管是地理分布與倍體性差異都顯示其明顯區隔，而分子證據更顯示其間具有明顯的遺傳分化，這些證據都顯示二倍體哈氏狗脊蕨是可與四倍體的哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨區分的不同生物種。因此哈氏狗脊蕨複合種群實包括二倍體的哈氏狗脊蕨與四倍體的哈氏狗脊蕨及細葉狗脊蕨，而四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨之間除極少數形態特徵外，並無法有效區別為獨立的分類群，故暫以四倍體哈氏狗脊蕨複合群稱之。

台灣產四倍體哈氏狗脊蕨複合種群孢子發芽率極高，配子體發育類型屬於「三叉蕨型」，成熟配子體絕大多數都是單性配子體，雌配子體先熟，且雌雄配子體發育形成時間差異達 3 週，由此推測四倍體哈氏狗脊蕨複合種群之配子囊個體發生行為有利於異配子體交配 (intergametophytic mating)，而雄配子體在相對較短時間內大量發育形成，且雌配子體附近的小體型配子體卻可產生大量的藏精器，推測此複合種群具有促精素系統，藉此促進異配子體交配。四倍體哈氏狗脊蕨複合群單性配子體單性是以異配交配為

主要的繁育系統，因此單一孢子體個體即潛在可形成一大族群。

中國大陸廣東省新會地區之二倍體哈氏狗脊蕨族群的基因座平均對偶基因數 ( $A$ ) 明顯高於四倍體類群，推測與其減數分裂時較高的基因重組有關，或因為大陸廣東新會一帶為廣大族群退縮之避難所，因此保留較多的遺傳多樣性。二倍體類群固定指數顯著大於 0，表示其檢測之同質合子比例偏高，推測應是華倫得效應 (the Wahlund effect) 所造成，即二倍體族群內不同亞族群間具有明顯的遺傳分化，由少數個體繁衍形成的亞族群內個體間容易近親交配或異配自交比例偏高，顯現在整個族群的結果就是同質合子比例偏高。四倍體哈氏狗脊蕨複合種群對偶基因頻率大多形成固定模式，推測形成原因應為此多倍體類群是異源四倍體，而四倍體族群內異質合子比例較高，則應是異源四倍體多數基因座都具有固定之異質配對對偶基因所造成。四倍體哈氏狗脊蕨族群內基因型的少數分化，可能是保留自祖先類群的變異，或因多體聯會及部分同源染色體的偶發性配對造成基因重組所形成。計算族群間遺傳相似度 ( $I$ ) 後進行群叢分析，二倍體類群與其他四倍體類群相似度最低，四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群間  $I$  值高達 0.919 以上，遠高於蕨類植物種內族群間之最小  $I$  值，因此推論四倍體之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨應為同種，而同地區四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨族群總是擁有近似的對偶基因頻率，亦支持此推論。

哈氏狗脊蕨複合群的葉綠體 *trnS-rps4* 及 *atpB-rbcL* 基因區間片段的核? 酸歧異度 ( $p$ ) 平均值為 0.00056，其中二倍體類群之  $p$  值 (0.00108) 明顯高於四倍體類群 (0.00072); 各族群單套型歧異度 ( $h$ ) 平均為 0.231，其中二倍體類群  $h$  值 (0.797) 顯著地高於四倍體類群 (0.294)。二倍體類群之中性假說檢測值未顯著偏離 0，然 9 種二倍體類群基因型呈現星狀之譜系關係，且其具有較高的單套基因型歧異度與較低的核? 酸歧異度，顯示大陸廣東省新會一帶之二倍體族群有近期族群快速成長與分布範圍擴張現象，

而以  $G_{ST}$  及  $N_{ST}$  檢測族群間遺傳分化，結果顯示哈氏狗脊蕨複合群、四倍體哈氏狗脊蕨複合群、四倍體哈氏狗脊蕨與二倍體哈氏狗脊蕨等四群之群內族群間都具有明顯的遺傳分化，且其  $N_{ST}$  與  $G_{ST}$  值都具有顯著差異，顯示各群內族群間都具有明顯的親緣地理結構。大陸廣東新會一帶二倍體族群具有 9 種單套基因型，其中 8 種僅限分布於此，推測此地區是二倍體類群長期之避難所，方足以累積較多獨特之基因型。大陸南嶺及海南島地區族群同時都具有兩群序列差異頗大的基因型，其可能為最後一次冰期以來其他地區族群擴散之溶匯點( melting point )，因此都具有較高之核 DNA 歧異度。台灣烏來地區為另一可能之避難所，根據所擁有之 2 種單套基因型與葉綠體非編碼區突變率推算，此地區族群應在最近一次冰期開始前即已存在。

哈氏狗脊蕨複合群葉綠體單套基因型在大陸珠江口以東幾乎全無變異，因此無法有效評估現今族群之過往遷移路徑或方向。核 DNA 單套基因型則擁有較多的地理變異，除了大陸廣東新會地區二倍體族群之核基因型有明顯往北擴散之趨勢外，其餘地區族群之核基因型間並無清楚之關連性，而日本屋久島與沖繩島族群獨特之核基因型與台灣島以西族群關連性較低，暗示此地區之族群可能直接遷徙自北方，而非由大陸經台灣擴散至日本，此項推論顯然較支持本研究所提出之遷徙路徑假說。共域分布之哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨總是擁有一致的葉綠體與核基因型，以及近似的同功異構？對偶基因頻率，而不同區域細葉狗脊蕨族群間或哈氏狗脊蕨族群間遺傳組成反而具有差異，因此 Cranfill 之異地種化再共域分布假說並未獲得分子生物學證據的支持。

## 第七章 未來展望

任何研究皆有不足之處，本研究階段性完成後，至少應持續以下幾項之試驗，以填補哈氏狗脊蕨複合種群目前生物學訊息缺失的角落，方能獲得此複合群完整樣貌，提出最適合本物種的保育措施。

- 一、針對四倍體哈氏狗脊蕨與細葉狗脊蕨進行生殖配對試驗，以直接檢測其雜交可行性與雜交後代之表形變化。
- 二、針對二倍體哈氏狗脊蕨進行生殖生物學試驗，以確認其生殖行為與配育系統，並與已知四倍體類群之結果比較。
- 三、以其他遺傳標記檢測哈氏狗脊蕨複合種群各種倍體性之組成基因體型，以瞭解整個複合群之親緣關係與種化過程。
- 四、以染色體壓製法及流式細胞儀檢測包括大陸南嶺地區、廣東省從化地區與日本沖繩島等地哈氏狗脊蕨複合群之染色體數，以確認其倍體性。
- 五、利用台灣北部烏來地區哈氏狗脊蕨族群具有不同葉綠體單套基因型之結果，檢測其葉綠體是否為母系遺傳。

根據本研究成果所顯示蕨類植物的生殖與遺傳特性，未來進行其他蕨類植物之保育遺傳學研究時，細胞學與生殖生物學乃最基礎的工作，唯有充分瞭解其染色體數、組成基因體型與生殖行為，方能對以其他特徵或證據所分析的結果提出最合理的解釋，也才可以擬定最適合該物種的保育政策。

## 謝 誌

論文得以順利完成，最要感謝兩位指導教授—王震哲老師與邱文良老師，沒有您們的教導、支持與包容，學生我是很難走過這段研究歷程的，僅以此論文及往後更多的研究成果，表達我由衷的感謝。感謝林讚標老師、蔣鎮宇老師與黃士穎老師三位口試委員悉心地審閱論文初稿，並指證錯誤與提供建議，使得論文可以更完善。

感謝實驗室學弟妹的幫忙，常常解決我燃眉之急的問題，同時幫了我該為實驗室盡責的那一份，辛苦了！謝謝！感謝家人對我的支持、包容與諒解，讓長年離家的我在心裡始終有一個安心的地方。感謝老婆與小犬最後這段時間的體貼與支持，讓我可以更專心地完成學業，特別是在異鄉的老婆，你那寂寥與無助是我最大的罪惡。

感謝遠在天堂的老爸，雖然我研究的東西你完全不懂，但你默默的支持，我一直都感受得到。

感念與感謝阿斌學長過去幾年無私的幫忙與指導，好像和你一起採集都是出國的時候，懷念那最愉快的野外工作時光，希望你依然笑聲爽朗地快樂著。感念郭鳳琴老師對我學業進度的關心，每次在林試所不期而遇，都讓我多一分溫暖，時間杳如輕煙，再無致謝之當下，願你一路順風！

要感謝的人還有好多，無奈時間催促，只能在未來見面的時候再一一致上我最大的謝意，謝謝！

附錄一、葉綠體 *atpB-rbcL* IGS 單套基因型序列原始資料矩陣

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45
PWo101	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
MWu101	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
Dwj 101	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CCh101	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
TGh102	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CNh119	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CHh143	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGh106	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGh204	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGh512	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGh409	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGh101	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGh404	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGh109	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGh602	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CNh118	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CGH304	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
CNh201	AAACCGTCTG	TGGCACTCAT	AGCTACAGCT	CTCACTTCAT	TATTACCTAA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	55	65	75	85	95
PWo101	TAATTGTTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
MWu101	TAATTGTTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
Dwj 101	TAATTGTTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CCh101	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
TGh102	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CNh119	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CHh143	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGh106	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGh204	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGh512	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGh409	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGh101	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGh404	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGh109	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGh602	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CNh118	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CGH304	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT
CNh201	TAATTGCTGG	ACCTCACGAG	TAACATTAAT	CTCTTGACCT	GCTGGATTTT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	105	115	125	135	145
PWo101	GTCCCTTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
MWu101	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
Dwj 101	GTCCCTTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CCh101	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
TGh102	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CNh119	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CHh143	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CGh106	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CGh204	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CGh512	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	TCCCGGCGAG
CGh409	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CGh101	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CGh404	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CGh109	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CGh602	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CNh118	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CGH304	GTCCCCTGAC	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG
CNh201	GTCCCCTGAT	TATTAGTGAG	TTGTAGATAT	TGGGCATTTT	CCCCGGCGAG

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	155	165	175	185	195
PWo101	GAAGCCACAT	CCGACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
MWu101	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
Dwj 101	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CCh101	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
TGh102	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CNh119	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CHh143	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGh106	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGh204	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGh512	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGh409	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGh101	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGh404	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGh109	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGh602	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CNh118	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CGH304	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT
CNh201	GAAGCCACAT	CCAACACTGG	TCCAATGATC	TGAGTGATAT	AGCCCACGTT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	205	215	225	235	245
PWo101	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GAGAGAACTG	GTTTTTCGTAA
MWu101	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GAGAGAACTG	GTTTTTCGTAA
Dwj 101	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CCh101	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
TGh102	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CNh119	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CHh143	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGh106	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGh204	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGh512	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGh409	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGh101	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGh404	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGh109	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGh602	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CNh118	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CGH304	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA
CNh201	TTTTTCACC	AATTCAGAAA	TTTCGAAAGA	GGGAGAACTG	GTTTTTCATAA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	255	265	275	285	295
PWo101	CTATACTTTT	TCGATGTATT	ATCTTTATCT	GATTACTGAA	TCGGTAGAAA
MWu101	CTATACTTTT	TTGGTGTATT	ATCTTTATCT	GATTACTGAA	TCGGTAGAAA
Dwj 101	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	TTCTTTATCT	GATTACTGAA	TCGGTAGAAA
CCh101	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
TGh102	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CNh119	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CHh143	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGh106	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGh204	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGh512	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGh409	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGh101	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGh404	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGh109	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGh602	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CNh118	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CGH304	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA
CNh201	CTATACTTTT	TCGGTGTATT	ATCTTTATCT	GGTACTGAA	TCGGTAGAAA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	305	315	325	335	345
PWo101	TATGTGTGGT	ATTTAATCGT	CGAGTGGCCG	ATGG----GA	AGGAGTCAAT
MWu101	TATGTGTGGT	ATTTTCATCGT	CGAGTGGCCG	ATGG----GA	AGGAGTCAAT
Dwj 101	TATGTGTGGT	ATTTTCATCGT	CGAGTGGCCG	ATGGTAAGGA	AGGATTCAAT
CCh101	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	CGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
TGh102	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	CGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CNh119	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	CGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CHh143	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGh106	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGh204	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGh512	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGh409	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGh101	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGh404	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGh109	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGh602	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CNh118	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CGH304	TATGTGTGGT	ATTTTCGTTGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT
CNh201	TATGTGTGGT	ATTTTCGTCGT	TGAGTGGCTG	ATGGGAAGGA	AGGAGTCAAT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	355	365	375	385	395
PWo101	CACCCCTTTC	CCACTCACTC	CCCTTTTTTTT	AAACTCATTT	TTGAGATATA
MWu101	CGCTCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTTTTTTTT	AAATTCATTT	TTGAGATGTA
Dwj 101	CGCCCTCTTC	CCACTCACTC	CCTTTTTTTT	TAATTCATTT	TTTAGATGTA
CCh101	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
TGh102	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CNh119	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CHh143	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGh106	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGh204	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGh512	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGh409	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGh101	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGh404	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGh109	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGh602	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CNh118	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CGH304	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA
CNh201	CGCCCCCTTC	CCACTCACTC	CCCTCCTTTT	AAATTCATTT	CTGAGATGTA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	405	415	425	435	445
PWo101	GCTATAGATA	AATGAAGTGG	GGGGAGGGGG	G-----TT	AAGCCGCAGA
MWu101	GCTATAGATA	AATAAAGTGG	GGGGGGGGGG	GGGGGGGGTT	AAGCCGCAGA
Dwj 101	GCTGTAGATA	AATAAAGTGG	GGGGGGGGGG	G-----TT	AAGCCGCAGA
CCh101	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
TGh102	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CNh119	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CHh143	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGh106	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGh204	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGh512	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGh409	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGh101	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGh404	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGh109	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGh602	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CNh118	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CGH304	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA
CNh201	GCTATAGGTA	AATAAAGTGG	GGGAAGGGGG	GG-----TT	AAGCCGCAGA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	455	465	475	485	495
PWo101	TAAATCAGAC	TTCTTCCTCG	TTTTGTACAC	GATCGGGATA	CTGATGACAT
MWu101	TAAATCAGAC	TTCTTCTTTG	TTTTGCACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
Dwj 101	TAAATCAGAC	TTCTTCTTTG	TTTTGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CCh101	TAAATCAGAC	TTCTTCTTTG	TTTTGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
TGh102	TAAATCAGAC	TTCTTCTTTG	TTTTGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CNh119	TAAATCAGAC	TTCTTCTTTG	TTTTGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CHh143	TAAATCAGAC	TTCTTCTTTG	TTTTGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CGh106	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CGh204	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CGh512	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CGh409	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAAATA	CTGATGACAT
CGh101	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CGh404	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CGh109	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CGh602	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CNh118	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CGH304	TAAATCAAAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT
CNh201	TAAATCAGAC	TTCTTCTTTG	TTTCGTACAC	GATCGAGATA	CTGATGACAT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	505	515	525	535	545
PWo101	CTGCGCCCCA	TTCACTGAAT	CTTCACTACT	GGGTTACGCG	CCATCCTATT
MWu101	CTGTGCCCCA	TTCACTGAAT	CTTCATTACC	AGGGTACGCG	GCATCCCATT
Dwj 101	CTGTGCCCCA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGATACGCG	GTATCCCATT
CCh101	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
TGh102	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CNh119	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CHh143	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGh106	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGh204	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGh512	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGh409	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGh101	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGh404	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGh109	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGh602	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CNh118	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CGH304	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT
CNh201	CTGCGCCCTA	TTGACTGAAT	CTTCATTACT	GGGGTACGCG	GTATCCCATT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	555	565	575	585	595
PWo101	TTTCAAACAA	GATTGACCAT	CAAACGCAGG	GGGTTAACAA	TTATTTAGTT
MWu101	TTTCAAACAA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
Dwj 101	TTTCAAAAAA	GATTGACCAT	TA----CGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CCh101	TTTCAAACAA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
TGh102	TTTCAAACAA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CNh119	TTTCAAACAA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CHh143	TTTCAAACAA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGh106	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGh204	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGh512	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGh409	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGh101	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGh404	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGh109	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGh602	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CNh118	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CGH304	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT
CNh201	TTTCAAACGA	GATTGACCAT	TAAACGCGAG	GGGTTGGCAA	TTATTTAGTT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	605	615	625	635	645
PWo101	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
MWu101	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
Dwj 101	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CCh101	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
TGh102	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CNh119	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CHh143	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGh106	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGh204	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGh512	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGh409	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGh101	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGh404	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGh109	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGh602	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CNh118	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CGH304	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT
CNh201	CGTATTCTAT	CGACCAGTCT	AACCACGAAG	AGATTCCCGA	GTCAATGTAT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	655	665	675	685	695
PWo101	TAGGACGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGT	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
MWu101	TGGGATGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTATGTA	AGAAAACAGA
Dwj 101	TGGGATGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CCh101	TGGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
TGh102	TGGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CNh119	TGGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CHh143	TGGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGh106	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGh204	TGGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGh512	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGh409	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGh101	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGh404	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGh109	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGh602	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CNh118	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CGH304	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA
CNh201	TAGGGTGGGG	CAGAATGCTG	CTTCTCAAGC	AGTTTCTGTA	AGAAAACAGA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	705	715	725	735	745
PWo101	TTGATTAGTT	GCACCCCGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
MWu101	TTGACTAGTT	GCACCCCGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
Dwj 101	TTGATTAGTT	GCACCCCGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CCh101	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
TGh102	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CNh119	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CHh143	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGh106	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGh204	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGh512	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGh409	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGh101	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGh404	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGh109	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGh602	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CNh118	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CGH304	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA
CNh201	TTGATTAGTT	GCACCCTGCG	TGAGGCGCGG	TATAAAATGA	TAATGTTCCA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	755	765	775	785	795
PWo101	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTGTAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
MWu101	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTGTAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
Dwj 101	TGCCTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CCh101	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
TGh102	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CNh119	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CHh143	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GAGTTGAACT
CGh106	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CGh204	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CGh512	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CGh409	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CGh101	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CGh404	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CGh109	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CGh602	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CNh118	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CGH304	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT
CNh201	TGCTTGAAAT	GGAGTTTTGA	CAGGTATAAG	TATCACGTGC	GGGTTGAACT

	805	815	825	835	845
PWo101	ATATCCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
MWu101	ATATCCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
Dwj 101	ATATCCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CCh101	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
TGh102	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CNh119	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CHh143	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGh106	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGh204	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGh512	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGh409	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGh101	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGh404	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGh109	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGh602	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CNh118	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CGH304	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA
CNh201	ATATTCGCCT	CTGCGTCTCA	TGTCGAAATA	CTCTACCTAT	GCCGAGCAGA

	855	865	875	885	895
PWo101	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
MWu101	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
Dwj 101	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CCh101	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
TGh102	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CNh119	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CHh143	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGh106	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGh204	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGh512	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGh409	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGh101	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGh404	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGh109	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGh602	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CNh118	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CGH304	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC
CNh201	TCTCATCTTT	GCAAGATTTA	CTAATTTAGT	CATAGGGAGG	AACAAACCC

附錄二、葉綠體 *trnS-rps4* IGS 單套基因型序列原始資料矩陣

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45
PWo101	TAATCATTTA	TTGAATGAAG	AAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
MWu101	TAATCATTTA	TCGAATGAAA	AAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
Dwj 101	TAATCATTTA	TTGAATGGAA	AAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CCh101	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
TGh102	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CNh119	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CHh143	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGh106	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGh204	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGh512	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGh409	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGh101	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGh404	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGh109	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGh602	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CNh118	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CGH304	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
CNh201	TAATCATTTA	TTGAATGAAA	GAGTTAATCG	AATAGTTTGG	AGGTCTCTGT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	55	65	75	85	95
PWo101	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTCG	AGAAACAGAT
MWu101	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTCG	AGAAGCAGAT
Dwj 101	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTCG	AGAAGCAGAT
CCh101	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
TGh102	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CNh119	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CHh143	AATGAAAATT	AAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGh106	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGh204	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGh512	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGh409	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGh101	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGh404	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGh109	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGh602	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CNh118	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CGH304	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT
CNh201	AATGAAAATT	CAGGCAAAGG	ACTTGGGATG	ATGGAATTTG	AGAAGCAGAT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	105	115	125	135	145
PWo101	TACTCGGGGA	ATGAAATAAC	AAAAGTTTTT	TGGCTTAGCT	TGTT-ACTCT
MWu101	TACTCGGGGA	ATGATATAAC	AAAAGTTTTT	CGGCCTAGCC	TGTTTACTCT
Dwj101	TACTCAGGGA	ATGAGATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CCh101	TACTCAGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
TGh102	TACTCAGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CNh119	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CHh143	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGh106	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGh204	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGh512	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGh409	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGh101	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGh404	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGh109	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGh602	TACTCGGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CNh118	TACTCAGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CGH304	TACTCAGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT
CNh201	TACTCAGGGA	ATAAAATAAC	AAAAGTTTCT	CGGCCTAGCT	TGTT-ACTCT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	155	165	175	185	195
PWo101	TCCCAGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCTTCAGAAA	TAGATGGAGA
MWu101	TCTCTAGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCTTCAGAAA	TAGATGGAGA
Dwj101	TTTCTAGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCTTTAGAAA	TAGATGGAGG
CCh101	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
TGh102	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CNh119	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CHh143	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGh106	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGh204	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGh512	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGh409	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGh101	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGh404	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGh109	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGh602	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CNh118	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA
CGH304	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAAAAA	TAGATGGAGA
CNh201	TTTCTGGCAG	AAATTTACTT	AGAATTTTTT	GCCTAAGAAA	TAGATGGAGA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	205	215	225	235	245
PWo101	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTC	GGTACGCGAT	GAATTATCCG
MWu101	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTACGCGAT	GAATTATCCG
Dwj 101	TAGATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTACGCGAT	GAATTATCCG
CCh101	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
TGh102	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CNh119	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CHh143	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTGATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGh106	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGh204	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGh512	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGh409	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGh101	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGh404	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGh109	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGh602	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CNh118	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CGH304	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG
CNh201	TAAATACTCT	AGTTTCGAGC	AGTTTAATTT	GGTATGCGAT	GAATTATCCG

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	255	265	275	285	295
PWo101	AATCATCGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTAT-
MWu101	AATGATCGGT	TCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCGA	CTCAGGTAT-
Dwj 101	AATCATCGGT	CCACGTCACT	TCAATAAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTAT-
CCh101	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
TGh102	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CNh119	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CHh143	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGh106	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGh204	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGh512	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGh409	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGh101	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGh404	AATTATTAGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGh109	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGh602	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CNh118	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CGH304	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC
CNh201	AATTATTGGT	CCACGTCACT	TCAATGAAAT	TCCTAATCAA	CCCAGGTATC

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	305	315	325	335	345
PWo101	-----TATC	AACTCTTACT	GCTTCTCCTT	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
MWu101	-----TATC	AACTCTTACT	GCTTCTCCTT	CGATGGCTTG	ATTCGAAACC
Dwj 101	-----TATC	AACTCTCACT	GCTTCTCTTT	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CCh101	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
TGh102	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CNh119	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CHh143	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGh106	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGh204	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGh512	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGh409	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGh101	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCCTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGh404	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCCTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGh109	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGh602	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CNh118	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CGH304	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC
CNh201	AGGTATTATC	AACTCTTACT	GCTTCTCTTC	CGACGGCTTG	ATTCGAAACC

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	355	365	375	385	395
PWo101	CCGACTCCCG	TCTGTCTCCT	TCTAATCGGC	TTTTTAAGTA	GATTTTCGATG
MWu101	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTA	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
Dwj 101	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CCh101	CCGACTCCCG	CCTGTCTTTT	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
TGh102	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CNh119	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TTTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CHh143	CCGACTTCCG	CCTGTCTCTT	TTTAATCGAC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGh106	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TTTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGh204	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TTTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGh512	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TTTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGh409	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TTTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGh101	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TTTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGh404	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TTTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGh109	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGh602	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CNh118	CCGACTCCCG	CCTGTCTTTT	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CGH304	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG
CNh201	CCGACTCCCG	CCTGTCTCTT	TCTAATCGGC	TTTTTAGCTA	GATTTTCGATG

	..... .....	..... .....	.
	405	415	
PWo101	AGAAATAAAA	GAAAGATAGC	C
MWu101	AGAAAGAAAA	GAAAGATAGC	C
Dwj101	AGAAATGAAA	GAAAGATAGC	C
CCh101	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
TGh102	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CNh119	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CHh143	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGh106	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGh204	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGh512	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGh409	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGh101	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGh404	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGh109	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGh602	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CNh118	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CGH304	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C
CNh201	AGAAAGGAAG	GAAAGATAGC	C

附錄三、細胞核 *pgiC* intron 14-15 單套基因型序列原始資料矩陣

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45
MWu101	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
PWo101	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
DWj101	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGGAGTA
HKh101	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
HKh102	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
HKh106	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
TYh101	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
CGh202	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
CGh101	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
CGh124	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
CGh508	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
CGh507	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
CGh209	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
CGh612	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA
CNh201	TCTTTTGAGT	GTTTGAATG	TCTCATTCT	TGGTCACCCA	GCACGG-GTA

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	55	65	75	85	95
MWu101	TGGAAA-TTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
PWo101	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTTT	TTTGTGGTTC	CTTTTTGGTT
DWj101	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TC-GTGGTTC	CTTT-----
HKh101	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
HKh102	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
HKh106	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTAGGTT
TYh101	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
CGh202	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
CGh101	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
CGh124	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
CGh508	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
CGh507	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
CGh209	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
CGh612	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT
CNh201	TGGAAAATTC	TATCTGAAGA	TGGCTTTTAT	TT-GTGGTTC	CTTTTTGGTT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	105	115	125	135	145
MWu101	GTCTTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTTGT	CCATTTTGAC
PWo101	GTCTTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTG	GATCACTTGT	CCATTTTGAC
DWj 101	-----GGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTTGT	CCATTTTGAC
HKh101	GTTGTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCAT	CCATTTTGAC
HKh102	GTTGTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCAT	CCATTTTGAC
HKh106	GTCGTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCGT	CCATTTTGAC
TYh101	GTGGTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCGT	CCATTTTGAC
CGh202	GTGGTGGTCT	TTTGATGAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCGT	CCATTTTGAC
CGh101	GTGGTGGTCT	TTTGATGAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCGT	CCATTTTGAC
CGh124	GTGGTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCGT	CCATTTTGAC
CGh508	GTGGTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTTGT	CCATTTTGAC
CGh507	GTGGTGGTCT	TTTGATGAGC	AATTTCTCTT	GATCACTTGT	CCATTTTGAC
CGh209	GTGGTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCGT	CCATTTTGAC
CGh612	GTGGTGGTCT	TTTGATAAGC	AGTTTCTCTT	GATCACTCGT	CCATTTTGAC
CNh201	GTGGTGGTCT	TTTGATAAGC	AATTTCTCTT	GATCACTCGT	CCATTTTGAC

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	155	165	175	185	195
MWu101	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
PWo101	AGGCAATTCT	ACCATACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
DWj 101	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
HKh101	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
HKh102	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
HKh106	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
TYh101	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
CGh202	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
CGh101	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
CGh124	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
CGh508	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
CGh507	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
CGh209	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
CGh612	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT
CNh201	AGGCAATTCT	ACCGTACTGT	CAGGCATTGG	AAAAGTTTGC	TCCTCACATT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	205	215	225	235	245
MWu101	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTA	AAGAAAAAAAA	--GGGACCTT
PWo101	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAGA	--GGGACCTT
DWj101	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	--GGGACCTT
HKh101	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTATTTTT	AAGAAAAAAAA	--AGGACCTT
HKh102	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTATTTTT	AAGAAAAAAAA	--AGGACCTT
HKh106	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	AAGGGACCTT
TYh101	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT
CGh202	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT
CGh101	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT
CGh124	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT
CGh508	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT
CGh507	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT
CGh209	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT
CGh612	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT
CNh201	CAACAGGCAA	TTTTTATCTT	CTTTACTTTT	AAGAAAAAAAA	A-AGGACCTT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	255	265	275	285	295
MWu101	TTGGGAAAGT	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTTTACTT
PWo101	TTGGGAAAGC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTTTACTT
DWj101	TCGGGAAAGC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTTTACTT
HKh101	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTT-TTCTT
HKh102	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGGGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTT-TTCTT
HKh106	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTTTTCTT
TYh101	TTGGGAAATC	CGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTCTTCTT
CGh202	TTGGGAAATC	CGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTCTTCTT
CGh101	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTCTTCTT
CGh124	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTCTTCTT
CGh508	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTCTTCTT
CGh507	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTCTTCTT
CGh209	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGATGCTGTA	TGTTCTTCTT
CGh612	TTGGGAAATC	TGACCATATC	ATTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTCTTCTT
CNh201	TTGGGAAATC	TGACCATATC	GTTGAGTGCA	TGCTGCTTTA	TGTTCTTCTT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	305	315	325	335	345
MWu101	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
PWo101	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
DWj101	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
HKh101	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
HKh102	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
HKh106	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
TYh101	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
CGh202	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
CGh101	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
CGh124	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
CGh508	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
CGh507	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
CGh209	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
CGh612	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA
CNh201	GATGTCTGCA	GCTTAGTATG	GAAAGCAATG	GAAAGGGGGT	TTCAATAGAA

.....

MWu101	GGTG
PWo101	GGTG
DWj101	GGTG
HKh101	GGTG
HKh102	GGTG
HKh106	GGTG
TYh101	GGTG
CGh202	GGTG
CGh101	GGTG
CGh124	GGTG
CGh508	GGTG
CGh507	GGTG
CGh209	GGTG
CGh612	GGTG
CNh201	GGTG