

## 貳、研究材料與方法

### 一、研究材料

參考各大標本館之採集記錄及相關文獻後，至全島各地採集新鮮材料，部份材料為親友所贈。

形質分析所使用材料採自中橫霧社支線：台 14 甲（6 個族群）與台 8 線沿線（7 個族群），每間隔 2~3 公里視為一個族群。由於喜岩堇菜與雪山堇菜皆具有匍匐莖，為避免採到同一植株，故族群內樣本間之最小距離為 5 公尺。詳細的採集地資料列於表 1，採集地點分布見圖 1。

分子分析使用的材料採自台灣各地，共 28 個族群，總計共 226 個樣本。故將樣本間最小距離仍為 5 公尺。詳細的採集地資料列於表 2。

### 二、研究方法

#### （一）形質分析：

針對中橫台 14 甲與台 8 線沿線採得的喜岩堇菜複合群之新鮮材料進行測量。為避免新鮮材料在花瓣或花軸部份因彎曲程度不同造成測量上的誤差，故先將新鮮材料平展，以透明膠帶黏貼在紙上後，掃描成數位圖檔。再利用影像測量軟體 Image-Pro Plus 3.0（Total Integra Tech Co., Taiwan）進行測量。

選取下列項目作為測量特徵（圖 1）：

1. 上瓣長：測量左側上瓣的長度。
2. 上瓣寬：測量左側上瓣的寬度。
3. 側瓣長：測量左側側瓣的長度。
4. 側瓣寬：測量左側側瓣的寬度。
5. 基瓣長：測量基瓣的長度。
6. 基瓣寬：測量基瓣的寬度。

7. 花距長：測量花距的長度。
8. 花距寬：測量花距的最寬處。
9. 萼片長：選取著生在左側側瓣上的萼片，測量其長度。
10. 萼片寬：選取著生在左側側瓣上的萼片，測量其寬度。
11. 花軸長：測量萼片著生處至托葉著生處的長度。
12. 側瓣鬚毛數：在解剖顯微鏡下計數右側側瓣基部鬚毛的數目。
13. 葉長：選取生長在最外圍任一完整未破損的成熟葉，測量葉先端至葉身最下端的長度。
14. 葉寬：測量第 13 項所選用葉子的寬度。
15. 葉最寬處長：測量第 13 項所選用葉子在最寬處的長度。
16. 葉柄長：測量第 13 項所選用葉子的葉柄長度。
17. 葉長/葉寬：第 13 項值除以第 14 項值，表示葉片形狀。
18. 葉長/葉最寬處長：第 13 項值除以第 15 項值，表示葉片形狀。
19. 葉片厚度：在葉身 1/2 處，以徒手切片法作橫切。分別測量距離葉脈 600  $\mu\text{m}$  與 1200  $\mu\text{m}$  的厚度，以兩者平均值代表葉厚。

利用統計軟體 JMP 5.0.1 (SAS Institute Inc., NC, USA) 進行分析。在單變數分析方面，針對每一項特徵值作變異數分析 (ANOVA)。在多變數分析方面，進一步進行區別分析 (DA) 以及歸群分析 (CA)。在 CA 中選用分層分群法 (hierarchical clustering procedure)，群間距離計算採用華德法 (Ward's minimum variance method)。所有統計分析之顯著水平 ( $\alpha$ ) 皆設定為 0.05。

## (二) 分子資料

### 1. DNA 定序

以 Viogene® 的 Plant Genomic DNA Miniprep System Kit 進行

DNA 萃取。

- (1) 取約 0.5 g 的植物葉片，在研鉢中加入液態氮後研磨至細粉末狀，並移至 2 mL 之離心管中。
- (2) 加入 400  $\mu$ L 的 PX1 緩衝液及 4  $\mu$ L 的 Rnase (100mg/mL)，經振盪均勻混合後，置於 65°C 30 分鐘。
- (3) 待溫度降回室溫後，加入 130  $\mu$ L 的 PX2 緩衝液至離心管中，經振盪均勻混合後，為提高 DNA 產量置於冰上延長為 3 小時。
- (4) 將離心管中的黏稠混合物移至過濾管 (shearing tube) 內，下置收集管。經轉速 10,000 rpm 離心 2 分鐘後，將混合物過濾至收集管中。
- (5) 加 0.5 體積的 PX3 溶液與等體積的無水酒精至步驟 4 之收集管內，緩慢混合均勻。
- (6) 取步驟 5 的混合液 650  $\mu$ L，移至離心柱 (spin column) 內，在其下置收集管，以轉速 10,000 rpm 離心 1 分鐘。此時葉片所有的 DNA 已吸附於離心柱的濾膜上，將濾出至收集管內之液體丟棄。
- (7) 再取步驟 5 的剩餘樣品至離心柱中，重複步驟 6。
- (8) 加入 0.7 mL 的清洗緩衝液 (washing buffer)，以轉速 13,000 rpm 離心 30 秒，將濾出至收集管內之液體丟棄。
- (9) 再加入 0.5 mL 的清洗緩衝液，以極速離心 2 至 3 分鐘，將濾出至收集管內之液體丟棄。
- (10) 將離心柱以極速離心 2 分鐘，完全去除殘留於濾膜上的清洗緩衝液。

(11) 將離心柱置於新的微量離心管 (1.5 mL) 上，加入 100  $\mu$ L (65°C) 的二次水於離心柱之濾膜上，以轉速 10,000 rpm 離心 1 分鐘，濾出於微量離心管中的即為萃取出之 DNA 溶液。

(12) 將 DNA 置於 -20°C 保存。

將萃取所得之 DNA 溶液，以 1× TBE buffer 所配製的 1.2% agarose gel (內含 0.25  $\mu$ g/mL 之 Ethidium Bromide 染劑) 進行電泳約 20 分鐘。利用 DNA Marker 與所萃取出之 DNA 比對，藉以檢測萃取出 DNA 之品質及濃度。將 DNA 濃度稀釋為 30 ng/ $\mu$ L，並置於 -20°C 下保存備用。

## 2. PCR 反應：

(1) 引子的選擇：

*trnV-trnM* 基因間片段的 PCR 放大反應引子對是參考已發表之黑松 (*Pinus thunbergii*) 葉綠體 DNA 序列而設計 (Wakasugi *et al.*, 1994)，引子對序列如下：

*trnV* 5'-GCT ATA CGG GCT CGA ACC-3'

*trnM* 5'-TAC CTA CTA TTG GAT TTG AAC-3'

*trnS-trnG* 基因間片段的 PCR 放大反應引子對是參考已發表之 *Corythophora alba* (Lecythidaceae) 葉綠體 DNA 序列而設計 (Hamilton, 1999)，引子對序列如下：

*trnS* (GCU) 5'-GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC-3'

*trnG* (UCC) 5'-GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C-3'

(2) PCR 反應試藥與濃度：

每個 PCR 反應試劑體積為 10  $\mu$ L，各試藥之濃度、所需體積及最終之反應試劑濃度如表 3。

(3) PCR 反應條件：

使用溫度循環機 (GeneAmp® PCR system 9700, Applied Biosystems, USA) 進行 PCR 反應，採用之擴增週期溫度設定及流程如下：

- a. 先以 94 °C 處理 5 分鐘，使雙股 DNA 變性 (denaturatuion)。
- b. 再以 94 °C 30 秒 (DNA denaturatuion)，57°C 45 秒 (annealing)，72 °C 1 分鐘 (DNA extension) 為一擴增循環，共進行 40 次的擴增循環。(註：*trnM-trnV*、*trnG-trnS* 兩引子對之擴增循環溫度設定皆相同，最佳黏合溫度皆為 57°C)
- c. 保持 72 °C 處理 5 分鐘。
- d. 反應產物溫度降至 4°C 保存。

(4) PCR 產物檢測：

取 2  $\mu$ L PCR 產物混合適量 6X 染色溶液 (loading dye)，加入 1 $\times$  TBE buffer 配製成之 1.2% 瓊脂凝膠 (agarose gel，內含 0.25  $\mu$ g/mL EtBr) 中進行電泳，每次電泳均加入分子量參考標記 (molecular weight marker, 100 bp DNA ladder, MDBio Inc.)，作為 PCR 產物分子量及 DNA 濃度的參考基準。在 120V 條件下，進行電泳 20 分鐘後，隨即置於紫外燈下觀察並拍照記錄，檢測 PCR 產物的分子量、濃度及是否為單一條帶。

### 3. DNA 定序：

DNA 片段經 PCR 擴增之產物，利用雙去氧核苷鏈停止法 (dideoxynucleotide chain termination, Sanger *et al.*, 1977)，以 ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) 完成分子定序。

### 4. 資料分析：

#### (1) 序列分析：

定序結果先以 Sequencher 4.5 (Gene Codes, Corp., Ann Arbor, MI, USA) 檢視波形圖，避免機器判讀錯誤，再以 ClustalX 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) 完成序列排序 (alignment)。

#### (2) 最小關連網狀圖 (minimum spanning network) 之建構：

利用 Arlequin 3.11 (Excoffier, 2005) 建構最小關聯網狀圖 (Rohlf, 1973)。在建構最小關聯網狀圖時，2 個鹼基 (base pair) 以上的長 indels 會使單套型 (haplotype) 間差異步數變得比實際上大。基於將一個長 indels 視為一次演化事件的觀點，必須先將所有 2 個鹼基以上的 indels 處理成 1 個鹼基的變異。

#### (3) 遺傳變異分析：

以 DnaSP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003) 計算族群內核苷酸歧異度 (nucleotide diversity,  $\pi$ )、單套型歧異度 (haplotype diversity,  $h$ ) 及中性假說測試 (Tajima's D test)。基於將一個長 indels 視為一次演化事件的觀點，必須先將所有 2 個鹼基對以上的 indels 處理成 1 個鹼基對的變異。

DnaSP 軟體對於空隙 (gap) 的處理是將其排除在外而不納入計算，以致於空隙的訊息會因此漏失。因為以上檢測項目其計算原理只考慮相同位置上核苷酸種類相同與否及種類數量，而不考慮其轉變形式，所以在利用 DnaSP 軟體分析時，對空隙的處理是將已完成

排序之 DNA 序列中插入 (insertion) 及刪除 (deletion) 轉換成替換 (transition) 形式。例如，第 60 個位點為 A，則將其他樣本上第 60 位點的空隙改成 G；若相同位置上有兩種核苷酸，則改成第三種核苷酸，例如第 100 位點上的鹼基有 A 及 T 兩種，則將其他樣本的序列上第 100 位點的空隙改成 G 或 C 其中一種來置換。如此，空隙的位置便能由 DnaSP 軟體計算，不會因此喪失其訊息。

- a. 核苷酸歧異度 ( $\pi$ ) 的計算公式 (Nei, 1987, quation 10.5 或 10.6)

$$\pi = n \sum x_i x_j \pi_{ij} / (n-1)$$

$n$  為族群的總樣本數， $x_i$  是族群內單套型  $i$  的個數， $x_j$  是族群內單套型  $j$  的個數，除了計算單套型頻率外，並考慮不同單套型間序列的差異程度  $\pi_{ij}$  (第  $i$  個與第  $j$  個單套型間的序列差異)。

- b. 單套型歧異度 ( $h$ , 又稱基因歧異度, gene diversity) 的估計依照公式 (Nei, 1987, equation 8.4, 以  $2n$  代替  $n$ )

$$h = n (1 - \sum x_i^2) / (n-1)$$

$n$  為族群的總樣本數， $x_i$  是第  $i$  個基因型的頻率。族群內單套型歧異度指數，其意義為族群中不同個體間序列差異的加權，僅考慮各單套型在族群中所佔頻率。

Grand and Bowen (1998) 提出可依核苷酸歧異度 ( $\pi$ ) 及單套型歧異度 ( $h$ ) 高低之不同組合，推估出族群的變動歷史。

第一：族群之  $h$  與  $\pi$  皆低 ( $h < 0.5, \pi < 0.005$ )，顯示族群近期經歷了瓶頸效應 (bottleneck) 或創始者效應 (founder event)。

第二：族群具高的  $h$  與低的  $\pi$ 。顯示族群經歷瓶頸效應，或是維持低度之有效族群數一段時間後，快速擴張而來，其經歷時間所累積的突變僅使單套型變多，卻不足以使核苷酸間的差異變大 (Avice *et al.* 1984 ; Rogers and Harpending, 1992 ; Avice 1994)。

第三：族群具低的  $h$  與高的  $\pi$ 。兩個原本具地理隔離的獨立族群再度接觸，或為一有效族群數大且穩定成長的族群經歷了嚴重的瓶頸效應所致 (Bermingham and Avice, 1986 ; Burton, 1986 ; Planes and Doherty, 1997)。

第四、族群具有高的  $h$  與  $\pi$ 。顯示此為具有久遠演化歷史之穩定族群，或是兩個具高程度分化的族群再度接觸。

#### c. 中性假說測試—Tajima's D test

中性假說的理論基礎為遺傳變異存在族群中與否，大部分是受隨機的遺傳漂變影響，不受天擇影響，因此核苷酸變異只受突變率的影響，演化較快的基因具有較多的遺傳變異 (Kimura, 1983)。利用 DnaSP 進行 Tajima's D test，計算  $\pi$  值與  $\theta$  值有無顯著差異，兩者的主要差異在於  $\pi$  值計算核苷酸出現的頻率， $\theta$  值只計算核苷酸變異位置的數目，而不考慮到其出現的頻率，因此  $\theta$  值很容易受到稀有變異 (rare alleles) 的影響，所以透過分析  $\pi$  值與  $\theta$  值間的差異，可以提供此序列是否受到選汰作用 (selection) 或族群大小變動 (demographic variables) 的訊息 (Tajima, 1989 ; Fu and Li, 1993)。

$$D = (\pi - \theta) / \sqrt{V(\pi - \theta)} \quad V(\pi - \theta) : \text{為}(\pi - \theta)\text{的變方}$$

假設核苷酸變異在不受天擇 (no selection)、逢機交配 (random



mating) 且族群穩定 (constant population size) 之前提下達到平衡，則  $\pi = \theta$ ，即 D 值為 0，表示符合中性假說的預測；如果天擇對異結合子有利 (heterozygote advantage)，或族群受到近期瓶頸效應 (recent bottleneck) 的影響，會降低  $\theta$  值，使 D 值為正值；若為有害的突變， $\pi$  值不會受很大的影響，但會使  $\theta$  值增加，使 D 值為負值；若族群正穩定成長 (a growing population)，或是族群經歷過瓶頸效應然後再擴張其族群 (recovered bottleneck or population expansion)，會使  $\theta$  值成長比  $\pi$  值快，而使 D 值為負值 (Hedrick, 2000)。所使用的統計 D 值在  $\beta$  分佈的假設下，其平均為 0，變方為 1。D 值和 0 是否具顯著差異是由 Tajima's D 信賴區間所決定。

d. 族群分化指數 ( $F_{ST}$ ) 與基因流傳值 ( $Nm$ )

利用 Arlequin 3.11 (Excoffier, 2005) 計算兩兩族群間的族群分化指數 ( $F_{ST}$ ) (Hudson, 1992)。再利用所得到的  $F_{ST}$  代入推導  $Nm$  的公式計算出  $Nm$  值。當  $Nm$  值大於 1 時表示基因流傳順暢，可使族群均質化，足以抵消族群間因為天擇及遺傳漂變所導致的族群分化 (Maruyama and Nei, 1981; Slatkin, 1987)。

$$F_{ST} = 1 - (H_w / H_b)$$

$H_w$ ：族群內平均核苷酸差異

$H_b$ ：兩兩個體間之平均核苷酸差異

$$Nm = ((1 / F_{ST}) - 1) / 2 \quad (\text{單套基因型適用})$$

$N$ ：族群大小

$m$ ：每一代移入個體的基因型比例

Wright (1965) 認為  $F_{st}$  值小於 0.05 時，代表族群間無分化，當  $F_{st}$  介於 0.05~0.15 時，表示族群間呈現低度分化，當  $F_{st}$  介於 0.15~0.25 時，表示族群間呈中度分化，當  $F_{st}$  大於 0.25 時，表示族群間呈高度分化。

e. AMOVA (analysis of molecular variance)

利用 Arlequin 3.11 (Excoffier, 2005) 進行 AMOVA，用以評估變異在族群內、族群間、類群間 (山脈間) 的分布。

(4) 譜系樹的建構

以 226 個樣本建構的樹形過於龐雜，故以 21 個單套型之序列建構譜系樹。基於將一個長 indels 視為一次演化事件的觀點，必須先將所有 2 個鹼基以上的長 indels 處理成相當於 1 個鹼基的變異。故在 NEXUS 檔 data matrix 中於 indels 後加入 0 (表示 deletion) 或 1 (表示 insertion)，在 PAUP 中設定將空隙視為 missing data，如此在運算時，便可計算 indels 的變異並且不會因為長 indels 而有特徵加權的問題。

a. 高度儉約分析 (maximum parsimony analysis, MP)

利用 PAUP\* v.4.0b10 (Swofford, 2002) 以高度儉約分析法 (Edwards and Cavalli-Sforzal, 1963) 搜尋演化步驟最短的演化樹。定義外群後，以直觀發現搜尋 (heuristic search) 法，1000 次重複的 random stepwise addition，設定 steepest descent 以及 tree-bisection-reconnection (TBR) 的方式進行支序交換 (branch-swapping) 演算法。所得樹形圖每個分支的信賴程度以 1000 次隨機特徵重取 (bootstrap) (Felsenstein, 1985) 進行評估。

b. 鄰近連接分析 (neighbor-joining analysis, NJ)

利用 PAUP\* v.4.0b10 (Swofford, 2002) 以鄰近連接法 (Saitou and Nei, 1987) 進行距離法 (distance) 分析，由於使用了 0/1 表示 indels，故無法指定 nucleotide substitution model。利用連續性的鄰近搜尋演化樹，以求取綜合演化樹中距離最短的演化樹。

(5) Isolation by distance (IBD) test

利用 Mantel test 檢驗遺傳距離是否與地理距離具相關性，檢測以全台灣為地理範圍之 IBD，以及將台灣分成北中南三區，各別檢測區域性之 IBD。北區族群包括 Achli、Ack、Acnc、Afp、Anh、Asy、Ath、Ths、Tnh；中區族群包括 AA、AcL、TD、TE、Ahp、Ajs、AkL、Ankk、Awj、TcL；南區族群包括 Ahkh、Aht、Ahy、Ash、Astp、Ats、Ayu、TksL、Tyu。地理距離利用 TWD67 二度分帶座標值以幾何距離法計算，遺傳距離則使用  $F_{st}$  表示。IBD test 使用 Isolation By Distance Web Service Version 3.15 (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>) (Jensen *et al.*, 2005) 完成。

(6) 族群變異分布測驗 (mismatch distribution) :

利用 DnaSP 計算族群內兩兩個體間核苷酸序列差異 (pairwise difference) 在統計上分布的情形 (Rogers and Harpending, 1992)，根據族群內差異分布來推估族群過去演化歷史，若出現單峰分布，顯示曾發生族群快速擴張事件，若出現多峰狀態，顯示此族群在其演化歷史中並無經歷過族群快速擴張。