

玉山國家公園境內紅檜之微衛星DNA研究

黃啟俊¹、林其永¹、王國雄¹、許再文^{1,2}、蔣鎮宇^{1,3}

(收稿日期：2007年5月14日；接受日期：2007年6月12日)

摘 要

分子指紋技術已廣泛應用於生物保育，其中基因體中的微衛星DNA因具有高解析力及變異性的特性，使得此一分子技術在物種之保育及遺傳多樣性的分析上提供了快速又可靠的工具。本研究針對之物種紅檜，其不論在林業、觀光或園藝上均極具價值，鑑於過去濫採盜伐等人為因素干擾造成紅檜野外族群受到極大的衝擊，針對紅檜野外族群進行族群遺傳結構及歧異度的分析，研究結果顯示紅檜野外族群仍維持高度遺傳歧異度，其中又以南橫地區檜谷的族群遺傳歧異度為最高，可考慮作為保育遺傳多樣性的熱點，紅檜雖然曾受到過去砍伐影響而降低老樹數量及分布，但仍保有較高之遺傳歧異度，因此針對紅檜擬定保育策略時，首重於維持野外族群數量及棲地完整性以降低外在因素干擾，微衛星DNA的高度變異是以區分紅檜巨木個體及族群，提供了紅檜的分子身份證。

關鍵詞：紅檜、分子指紋、微衛星DNA，保育

1. 國立成功大學生命科學系
2. 行政院農委會特有生物研究保育中心
3. 通訊作者

一、前 言

近年來，分子生物學技術的快速進展，使得探索野外生物族群的遺傳歧異程度及結構變得不但可行而且快速，其中針對特定基因的分分子定序，提供了演化學者在基因分子演化及可能的適應機制的了解上了不可或缺的資訊。一如(Chiang et al., 2001)於 Molecular Ecology 所發表關於東亞紅樹林的親緣地理，該研究不但顯示出水筆仔族群間藉由洋流攜帶頻繁的種子傳播，更提供了分類學者認定台灣的水筆仔為新種的佐證。

眾多分子證據顯示出台灣植物高遺傳歧異度的特質，甚至遠高於整體中國大陸族群遺傳歧異的總和(Chiang et al., 2006)。異常的高遺傳歧異度與台灣的冰河歷史有密不可分的關係，根據現今的植物組成以及化石證據，台灣島嶼的生物大多來自於鄰近的亞洲大陸，這一個由歐亞大陸板塊及菲律賓海板塊擠壓隆起的島嶼(Sibuet and Hsu, 1997, 2004)，約在距今約200-300萬年前，開始有動植物從大陸移入並拓殖(colonization)，並且歷經多次的冰河週期，而最後一次冰河擴張距今約10萬年前，一直延續到最近的兩萬年前。在冰河擴張時期，因海水水位明顯下降(約達120公尺)，使得連結台灣及大陸間的陸橋從海中裸露出來，提供了動植物移入台灣的管道，加上台灣地處低緯度，在冰河擴張時期，提供了許多生物避難的棲所，因為此一不平常的冰河及地質歷史，使得台灣島嶼保有了許多遺傳的多型性及歧異度(Hikida and Ota, 1997; Chiang and Schaal, 2006)。

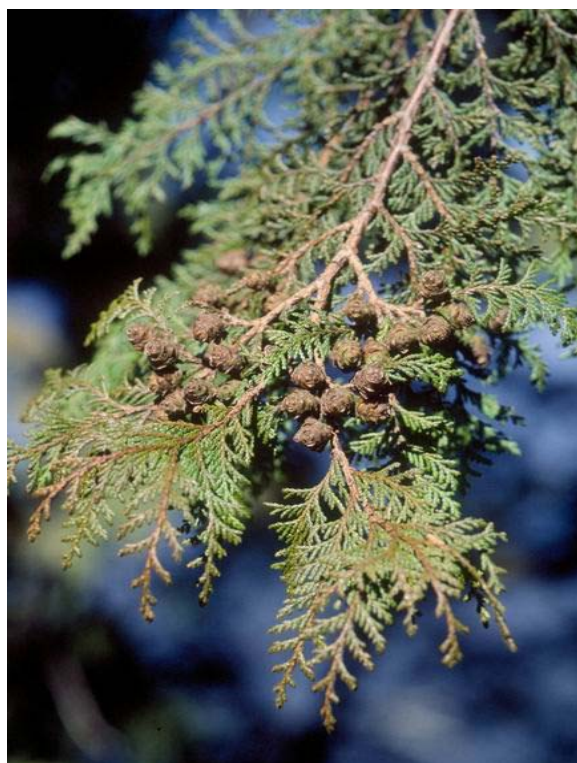
然而，在這樣的冰河時期生物大量移入避難所的歷史之下，加上後冰河時期族群的大量擴張，使得多數現今的植物族群間擁有極低的遺傳分化。在保育工作的推展中，如若採取 Moritz (1994)的定義，亦即所有的保育單位都必須是單源群(monophyletic)，勢必造成界定及執行上的困難，因為多數的台灣植物族群是多源群(polyphyletic)或並系群(paraphyletic)，在保育單位的界定上極為困難，因此必須尋求更適切的證據，另一方面，雖然單一基因的分分子序列的確提供了不少族群及物種演化的訊息，但是對於基因體上其他多數的基因座卻被忽略了，基於上述理由，如何慎選適用的分分子標記作為保育遺傳學的參考是當務之急。

分分子指紋(fingerprinting)技術中微衛星指紋(microsatellite DNA)提供了幾近於中性(neutral)且代表整個基因組的分分子標記(molecular marker)，其對偶基因的特性更提供了估算族群中異型基因合子和遺傳變異以及族群間遺傳分化程度的可能，因此，分離及利用微衛星指紋基因已成為保育遺傳學的研究主流之一。微衛星指紋技術的高變異性，使得不同種類及族群間存在著特殊的電泳條帶型式，對於特有生物的保育、確定造林種原以及遏止林木被盜採上極有應用性，因此建構本土的分分子指紋資料庫對特有生物的保育有其必要性及迫切性。台灣的植物具有極高的特有種比例，許多特有植物受限於狹隘之生育特性，造成野外族群數量稀少、分布狹隘等，加上近年來人類對自然棲地的大肆開發，造成這些種類面臨生存上的危機。遺傳多樣性是否因為人為的干擾以及棲地的消失而大量流失一直是保育工作者最關心的議題之一，微衛星指紋技術不但提供了高度敏感的工具，更提供了物種間相互比對的齊一標準。

過去受限於分分子技術尚未成熟及物種來源判斷不易，導致面臨非法盜採時常因物種鑑定或來源判定資料不足而束手無策，而個體間不管在形態方面或是遺傳組成方面均擁有獨特表

型及基因型，藉由此一特性，不同基因座之微衛星 DNA 所累積個體間遺傳變異可明確且快速以電泳膠條帶區分，以不同微衛星 DNA 差異建立專屬於個體之分子身份證，獨特之分子身份證，配合個體分布棲地、特性所建構之分子指紋資料庫將可廣泛運用於物種及個體鑑定，在物種保育上極具價值。

紅檜 (*Chamaecyparis formosensis*) (圖一) 隸屬於柏科 (Cupressaceae) 扁柏屬 (*Chamaecyparis*)，為台灣特有種，偏好生活在涼爽、潮濕的地區，主要分布於海拔 1000-2900 公尺的中高海拔雲霧帶山區，常和台灣扁柏 (*C. obtusa* Sieb. & Zucc. var. *formosana* (Hayata) Rehder) 及其他針葉樹木混生或形成純林，由於其分布範圍較廣泛，常可在全省中海拔山區發現其蹤跡，例如嘉義阿里山、南投溪頭以及新竹觀霧等均可發現紅檜巨木的存在，又因木材質地良好、不易腐壞等優良條件，適合用於建築加工、家具、雕刻等用材，為高級木材之一，具有高度經濟價值，而紅檜樹皮較薄且紋路細緻，又稱為「薄皮」。紅檜為台灣特有物種，在空間分佈上較廣泛分佈種狹隘，相對地較易受到危害而影響其族群適存度，加上過去人為砍伐極為嚴重，對於紅檜族群數量及遺傳歧異度均有極大的影響，因此本研究以紅檜作為研究物種，瞭解其族群遺傳結構，藉此瞭解過去人為干擾對其分布及遺傳多樣性所造成之影響，並據此提供合適之保育策略，不僅有助於瞭解紅檜之族群演化歷史，更有助於未來台灣特有物種保育策略的建立。



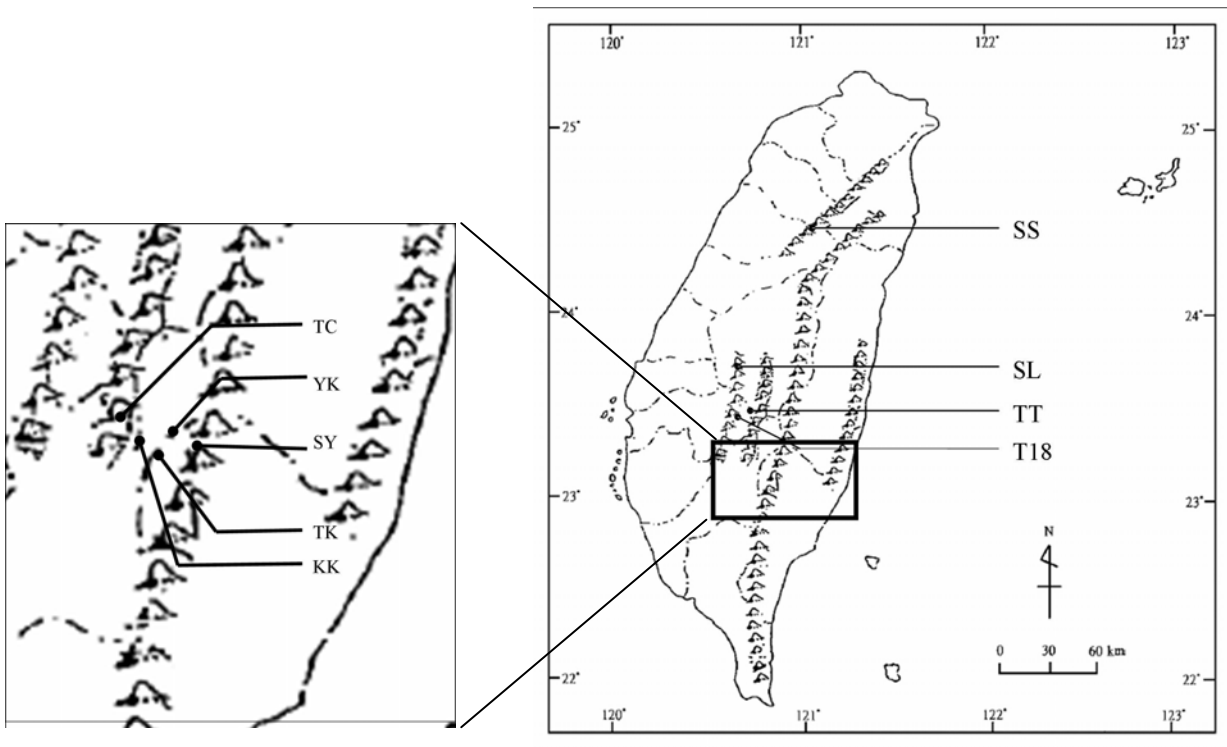
圖一．紅檜 (*Chamaecyparis formosensis*)

二、材料與方法

一、採集地點：

本研究針對中央山脈及玉山山脈之紅檜進行採樣，每一個體取3-5片嫩葉以矽膠乾燥，以利DNA萃取：

紅檜在新中橫、南橫等地區(表一，圖二)進行採樣，主要針對具有林務局編號之老樹及巨木(直徑4公尺以上)進行採樣，以每10公尺為最小間距進行族群隨機採樣，共取得9個族群78個個體，每一個體以矽膠取幼嫩葉片乾燥，並利用GPS記錄每一個體之經緯度位置及加以編號。在新中橫地區之紅檜植群結構不論在數量、樹型、大小均不及南橫族群完整，且多為殘株(如夫妻樹)，顯示過去人為砍伐對新中橫之紅檜族群數量確實造成影響。



圖二. 紅檜之採集點地圖，英文縮寫請見表一

表一. 紅檜族群之採樣資料

	地點	經緯度	族群代號	樣本數
<i>Chamaecyparis formosensis</i>	南投縣塔塔加	23'29"N 120'53E	TT	3
	南投縣石山工作站	23'29"N 120'51E	T18	2
	高雄縣檜谷	23'15"N 120'56"E	KK	3
	高雄縣塔關山	23'15"N 120'56"E	TK	1
	高雄縣啞口至檜谷	23'15"N 120'55"E	YK	4
	高雄縣天池	23'16"N 120'54"E	TC	2
	台東縣向陽台 20 線 154km	23'14"N 120'58"E	SY	4
	台中縣雪山登山口(人工林)	24'23"N 121'17"E	SS	2
	南投縣杉林溪林道(人工林)	23'40"N 120'47E	SL	2

二、實驗室工作：

(一)DNA 萃取：

幼嫩的葉組織以矽膠乾燥處理，回到實驗室並以液態氮將葉組織研磨成粉狀。利用 CTAB 方式(Doyle and Doyle, 1987)將在液態氮下磨成粉末的植物組織分離出 genomic DNA。

(二)增幅微衛星 DNA：

利用微衛星 DNA 引子以聚合酵素(*Taq polymerase*)在溫度循環器擴增出微衛星 DNA，在總體積 100 μ l 的反應液中加入 5U 聚合酵素，10 μ L 10X 緩衝液，10 μ L 的 dNTP，濃度 2 pmole 的引子各 10 μ l，最後加入 20 ng DNA，以無菌水補足 100 μ l。聚合酵素反應在溫度循環機(Thermal cycler)進行，共進行 31 個循環，每個循環流程為：92°C，45 秒，將 DNA 的雙股變性打開(denaturation)；以各自引子黏合溫度，與 DNA 進行黏合(annealing)，1 分 15 秒；72°C，1 分 30 秒，進行 DNA 延伸反應(extension)，最後在 72°C 作用 10 分鐘。PCR 結束後，取 5 μ l 的 PCR 產物加上 1 μ l 6 倍的染色溶液，在 1% 瓊脂凝膠(agarose gel)中以 100 伏特電壓跑電泳進行前測，經過溴化乙啶螢光染劑(EtBr)處理後，配合所選用的 DNA ladder 當分子大小的標記，並在紫外線燈下顯色及拍照，選取有條帶之產物以 polyacrylamide gel 進行長度及條數分辨。

(三)Polyacrylamide gel 電泳判斷 PCR 產物片段長度及 band 條數：

取一大 (33.3 \times 41.9 cm^2) 一小 (33.3 \times 39.4 cm^2) 玻璃，在小片玻璃上塗上 γ -methacryloxypropyl-trimethoxysilane，可使膠片可附著其上，在大片玻璃上塗上 dimethyldichlorosilane solution，可使膠片和玻璃分離，將兩片玻璃重疊並插入梳子以及用膠布封住四周空隙，配置 6% acrylamide stock solution (acrylamide : N,N'-methylene bisacrylamide = 29:1)，10% Ammonium persulfate 以及 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)，以 3:24:1 比例混合均勻後利用針筒注入兩片玻璃之間並清除氣泡，水平靜置等待其凝固即可拔除梳子及膠布，利用微量吸管清洗 well 後加入 PCR 產物，將垂直電泳槽注入 1X TBE buffer 跑膠，

在室溫下以 150V 電壓進行電泳，經過溴化乙啶螢光染劑(EtBr)處理後判別 DNA 片段長度及條帶數。

(四)分子指紋的變異分析，主要利用 Arlequin Version 2.0 (Schneider et al., 2000)估算族群間及種間的遺傳分化；平均觀測異質度(H_o)是每個基因座中所包含之異型合子個體(heterozygosity)在族群中實際所佔之比率。平均期望異質度(H_e)則是根據哈溫定所估算之期望值，定義如下 (Hamrick and Allard, 1972)：

$$H_e = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (P_{ij})^2$$

其中 m 為基因座總數， n 為各基因座對偶基因數， P_{ij} 為第 i 個基因座的第 j 各對偶基因頻率；並根據 $F_{ST} = 1 / (1 + 4Nm)$ 的公式，估計族群間可能的基因交流，其中 N 中表示有效族群量， m 表示個體的遷徙能力。 F_{ST} 代表族群間遺傳分化程度，當族群分化程度 $F_{ST} < 0.05$ ，表示族群間幾乎沒有遺傳分化，若 $0.05 < F_{ST} < 0.15$ ，表示族群間的分化程度低等，若 $0.15 < F_{ST} < 0.25$ ，表示族群間屬於中度分化，若 $F_{ST} > 0.25$ ，表示族群間屬於高度分化。

三、結 果

根據前人研究(Nakao et al., 2001; Matsumoto et al., 2006)設計微衛星DNA之引子共24組(表二)，其中11組可成功增幅出紅檜之微衛星DNA，每個族群選1-4個個體進行測試，顯示不同族群之個體均擁有其獨特之基因型(表三)，可作為個體間區別之特徵，支持個體分子身份證建立的可行性。

在計算異型合子(heterozygosity，表四)時發現平均觀測異質度(H_o : 0.49242)多大於平均期望異質度(H_e : 0.44576)，顯示紅檜保有較高之遺傳歧異度；除了COS2619及COS1991為同型合子之外，其他基因座均有較高之異型合子比例，而且平均觀測異質度(1.00000-0.04167)多大於平均期望異質度(0.77216-0.33599)，顯示不同的基因座在紅檜中均具有較高之遺傳歧異度，在紅檜各族群的比較(表五)，各族群之平均觀測異質度(0.43182-0.54545)多大於平均期望異質度(0.36364-0.54545)，其中南橫地區之平均觀測異質度最高(0.52121)，人工林次之(0.50000)，新中橫地區最低(0.44318)，顯示南橫地區之族群具有最高之遺傳歧異度。

在族群分化指數(F_{ST})上(表六)，新中橫和南橫之族群分化指數為0.02136，顯示兩地區之族群並無顯著分化；人工林之族群和新中橫族群之分化指數為0.1238，屬於低度分化，而和南橫地區族群之分化指數為0.03928為不顯著分化。

表二. 紅檜微衛星DNA之引子序列

基因座	引子序列(5' to 3')	黏合溫度(°C)	重複序列	長度(bp)
CO 31	F: AACAAATAGGCACCCAACTTC R: GATGGTGAGATGAGGGAGG	45	(CT)11	136
CO 66	F: CTAGGAGCCAATCTAAGACTTCTC R: TGACAATGAAATCCTACAAGACC	45	(CT)25	223
CO 67	F: CTCAAATAACTACCCAAACACTC R: TCCAATGCCTTACAAAGC	50	(CT)27	298
CO 69	F: TATATTGGCTCAAGGTGGGT R: AATCTGAGAGCTGCAAGGAA	50	(CT)13	242
CO 88	F: GAAGGTAGTTGGTAGAAGTATTAG R: ACACATGGAAGCAATTATAC	56	(CT)22	238
CO 93	F: CAAGCAGCTACAACAAAGAATGAC R: AGCAAGAAGGTGAAAGTTATGAGG	56	(CT)8	257
CO 115	F: AATACACAATCGAATCAATC R: TGCAGGACTGGTTTTAG	56	(CT)35	255
CO 118	F: CTTGATTTATGATAGATTTGTTG R: GGCATTAGACTTAGTGGATT	56	(CT)16	320
CO 144	F: CTTGTACTTGTTGGTTGTG R: ATTTAGGTCTCTTTATAGTCCTT	56	(CT)19	229
COS 0319	F: GCTACTAATAGAGGGAGGGA R: AATAAAATGACAAGGGGATA	55	(AG)17	220-275
COS 1526	F: AGGAGCGGGTAGACATTATTCAGTC R: CCTATAGTATGCCCAAATCTTGTTGC	55	(AG)20	156-188
COS 1536	F: GATCAAGTTCATAAGTTAGGATTG R: GTTCTTTTATGGAGGAGAAAGTGACAA	55	(CT)15CC	194-260
COS 1761	F: CTTCTGGTATGAATCAACT R: ACGGACAAACATCTTCTCT	55	(CT)14(AC)16	158-183
COS 1874	F: TAGTGCTAGGGATTGATGAG R: GACCACCTTGAACCTAACC	49	(GAT)6	195-202
COS 1951	F: AAGTGAAATAAGTCCTCATCAAATCC R: GTTCTTTCATGAACATAACCAACACTGCC	55	(AG)16GG	184-254
COS 1991	F: AATTGCGTGATATGAGTGTGTGGC R: CAGAGGGATAATTCACTTGTTGAGGG	63	(AG)18	170-192
COS 2126	F: GCGAAATCAAGTGGAGTC R: AAGAGGGAGGATGTTGTAATAC	45	(CTG)5	176-224

表二(續). 紅檜微衛星 DNA 之引子序列

基因座	引子序列(5' to 3')	黏合溫度(°C)	重複序列	長度(bp)
COS2165	F: GGTATCAACAAATCATCAAATGC R: GTTCTTCAAGTTTGGAATCAAGGGAG	55	(TG)21	145-172
COS 2224	F: TGGTGATGTCAGGGTTAGAG R: GGCTAGGATGGGAGGG	63	(CT)19	178-215
COS 2590	F: CAACCCACATCACCACCTGAC R: TGGATGAGGAGAGGCAGTTGTAGTTA	63	(CA)13	142-198
COS 2610	F: GATCTATGTCTCTTCGGTACTATT R: TTACACAATGGGATGATGA	55	(CA)13	177-206
COS 2619	F: CCCTACCATTACCTGTTATATATGTGTG R: GCTATGGTTAGGATTTGGGACTG	56	(GT)14	171-192
COS 2667	F: TTCCAATTATAACTCATTATGGG R: TCCTTTATTTCCTTTAATCTTGTTT	53	(GT)13(GA)20	178-234
COS 2680	F: CTTGCATGTGTTTTTACAAGCTAAG R: TTAGTATCATGTTCCAGGTTATTCTCTC	50	(GT)13	160-180

表三. 紅檜微衛星 DNA 不同之基因座在個體所顯現之基因型(I~IV 表示同一基因座之不同基因型)

個體\基因座	COS2224	COS2590	COS2619	COS2680	COS1991	COS2667	COS1874	COS2165	COS1536	COS2126	CO66
SL01	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I	I
SL02	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
SY01	I	II	I	I	I	II	I	II	III	I	I
SY02	I	III	I	II	I	II	I	II	II	I	I
SY03	III	IV	I	II	I	I	I	II	III	I	I
SY04	I	IV	I	I	I	I	I	IV	II	I	I
TC01	I	III	I	II	I	I	III	III	IV	I	I
TC02	I	III	I	II	I	I	I	II	II	I	I
YK01	I	III	I	I	I	I	III	II	IV	I	I
YK02	IV	IV	I	I	I	II	I	III	I	I	I
YK03	III	IV	I	I	I	I	I	III	III	I	I
YK04	I	III	I	I	I	II	III	II	IV	I	I
KK01	III	IV	I	I	I	I	I	IV	II	I	I
KK02	III	IV	I	II	I	I	I	II	III	I	I
KK03	III	IV	I	II	I	I	I	II	IV	I	I
TK01	III	IV	I	II	I	II	I	V	IV	I	I

表三. (續)紅檜微衛星 DNA 不同之基因座在個體所顯現之基因型(I~IV 表示同一基因座之不同基因型)

個體\基因座	COS2224	COS2590	COS2619	COS2680	COS1991	COS2667	COS1874	COS2165	COS1536	COS2126	CO66
TT01	II	III	I	I	I	II	III	II	IV	I	I
TT02	II	III	I	I	I	II	III	II	IV	I	I
TT03	III	III	I	II	I	I	I	II	II	I	I
TT04	III	IV	I	I	I	I	I	II	II	I	I
T1801	II	III	I	I	I	II	I	III	II	I	I
T1802	II	IV	I	III	I	II	I	II	IV	I	I
SS01	I	IV	I	II	I	III	IV	II	II	I	II
SS02	I	IV	I	I	I	III	IV	II	IV	I	II

表四. 紅檜不同微衛星 DNA 基因座之基因歧異度

基因座	對偶基因 數目	平均觀測異 質度	平均期望異 質度
COS2224	5	0.04167	0.68883
COS2590	5	1	0.77216
COS2619	1	0	0
COS2680	3	0.375	0.58422
COS1991	1	0	0
COS2667	2	0	0.49645
COS1874	2	1	0.51064
COS2165	5	0.375	0.33599
COS1536	4	0.625	0.49379
COS2126	2	1	0.51064
CO66	2	1	0.51064
Mean	2.909	0.49242	0.44576

表五. 紅檜族群之衛星 DNA 歧異度

族群 代號	對偶基因 數目	平均觀測異 質度	平均期望異 質度
SL	1.636	0.54545	0.37879
SY	2.182	0.52273	0.47403
TC	1.818	0.54545	0.4697
YK	2.091	0.47727	0.42208
TT	2	0.43182	0.41234
T18	1.818	0.45455	0.4697
KK	1.818	0.51515	0.37576
TK	1.545	0.54545	0.54545
SS	1.636	0.45455	0.36364

四、討 論

本研究主要是以微衛星 DNA 做為分子標記，建構紅檜的分子指紋，被分離及鑑定的微衛星 DNA 以(AG)、(CT)、(AC)為主，進一步分析顯示，紅檜不同之個體均擁有獨特之基因型(表三)，證實分子指紋實際應用的可行性，藉由微衛星 DNA 所建構之分子指紋資料將可分辨不同個體以及族群。

比較紅檜在不同地區之微衛星 DNA 基因型發現新中橫及南橫地區部分個體有重疊情形發生，加上採樣樣本均為直徑 4 公尺以上巨木(徐國士, 1974)，據此推測兩地理區間之紅檜老樹均保有古老之基因型或是曾經發生基因交流(Chiang et al., 2006)，造成兩地理區基因型部分重疊的情形產生，而在人工林中也發現和南橫部分個體有基因型重疊的情況，推測人工林的族群可能以南橫的紅檜族群作為親本。在野外族群中之平均觀測異質度較期望值高，顯示野外族群仍保有較高之遺傳歧異度，推測主要是因為紅檜的分布海拔範圍較廣、族群數量多、交配模式偏向異交，加上野外族群保有老樹數量比例高，即使在過去大量砍伐之威脅下，現生族群仍然能夠保有較高之遺傳歧異度；當將不同地理區之紅檜相比較時，顯示位於塔塔加及石山工作站之異型合子比值較其他地理區低，推測主要是因為早期伐木事業主要產地為阿里山、塔塔加一帶，伐木業的盛行加上開發較早，造成新中橫之老樹被砍伐，只留下較小或無經濟價值之老樹，使得位於阿里山到塔塔加一帶之紅檜因過去人為砍伐造成數量減少、遺傳歧異度喪失；但位於南橫之紅檜族群則相對保有較高之遺傳歧異度，推測主要因開發時間較晚，且有國家公園的設立，相較於阿里山、塔塔加一帶的族群因早期伐木事業而數量銳減，南橫地區能夠保有較多老樹，其分布的比例及範圍也較廣泛。

位於杉林溪及雪山登山口之紅檜族群，當地之族群雖多為樹齡較短之人工林，但仍具有較高之遺傳歧異度且和南橫部分族群之基因型重疊，顯示在執行物種復育或栽種時，所栽植之種苗來源對於人工林之遺傳多樣性將有極大影響，選用高遺傳歧異度之親本族群將有助於增加人工林之遺傳多樣性，由於過去造林種原資訊的缺乏，以致於無法釐清造林種子來源，而隨著分子技術的進展，將有助於瞭解人工林之物種種原鑑定。此外，為保有物種遺傳歧異度，在選擇栽植之種苗時，可選用來自擁有較高遺傳歧異度之物種族群，避免選用遺傳同質化高之族群作為親本植物，才能保有較高之遺傳多樣性，避免有限保育資源之耗費。

遺傳分化指數的分析，顯示紅檜(表六)在新中橫地區和南橫地區之分化指數低($F_{ST}=0.02136$)代表族群間無顯著分化，加上兩地理區間部分個體擁有相同之基因型，推測主要是因為兩地理區間均保有古老之基因型或是曾發生基因交流造成彼此間無顯著分化，而人工林和新中橫地區族群呈低度分化($F_{ST}=0.1238$)，但和南橫地區族群卻無顯著分化($F_{ST}=0.03928$)，加上人工林之個體擁有和南橫地區族群相同之基因型，顯示人工林的親本族群含有於南橫地區之族群，並可與新中橫地區之族群呈現分化狀態；在地理區內族群之遺傳分化指數顯示新中橫及南橫兩地理區內之族群分化指數均低($F_{ST}=0.0374-0.1079$)，顯示地理區內之族群有基因交流情形，造成地理區內族群呈現低度或無分化狀況；而人工林內之族群分化指數為 0.1515，顯示兩族群為中度分化，推測主要是因為兩族群之親本物種來自於南橫地區不同族群，因此造成兩族群間呈現中度分化情況。

表六. 以微衛星 DNA 估算之紅檜遺傳分化指數(FST)

FST	人工林			新中橫地區			南橫地區			
	SL	SS	TT	TT	T18	SY	TC	YK	KK	TK
人工林	-									
SL	-									
SS	0.1515	-								
新中橫地區	0.1238			-						
TT	0.1649	0.104								
T18	0.1611	0.1852	0.0403		-					
南橫地區	0.03928	0.02136								
SY	0.0101	0.06	0.0064	0.0518		-				
TC	0.0782	0.127	0.0744	0.1171		0.1079	-			
YK	0.0069	0.1139	0.0059	0.0254		0.0585	0.0141	-		
KK	0.1907	0.0509	0.0689	0.2198		0.0478	0.1461	0.123	-	
TK	0.2691	0.1529	0.0086	0.0921		0.0374	0.0393	0.066	0.0278	-

以微衛星 DNA 所建構之分子指紋，不僅可用於顯現物種及個體間的獨特性，更可用於瞭解族群間遺傳結構，在紅檜的保育上，結果顯示不同個體間均帶有獨特之基因型，藉由基因型的組成可以估算個體間差異及推測造林來源，證實分子身份證建立的應用性，未來隨著分子指紋資料庫的建立，將更精準且快速地應用於物種鑑定及造林物種種原判定。在紅檜族群遺傳結構上，紅檜族群由於族群數量大、老樹比例多，雖然曾遭受過去伐木業的影響造成數量上的減少，但整體來說仍保有較高之遺傳歧異度，其中又以南橫地區之族群保有較高之遺傳歧異度，代表為遺傳歧異度的熱點，顯示國家公園及檜谷保育區的設立對於紅檜的保育的確有正面的影響，不僅能夠保存當地之老樹不受砍伐，更能保有老樹之遺傳多樣性。而人工林的栽種對於保有物種遺傳歧異度也是有必要的，只要選擇高遺傳歧異度之親本族群進行栽種，將有效地保存紅檜之特有及多樣性。

生物多樣性包含生態系多樣性、物種多樣性及遺傳多樣性，其中遺傳多樣性更是近年來研究重點之一，物種一旦喪失遺傳多樣性便可能無法適應環境的改變而造成數量減少、物種滅絕等危機，因此保有高度之遺傳多樣性對於生物而言是不可或缺的，維持生育地完整便是保有物種遺傳多樣性策略之一，減少外在壓力干擾將可減少歧異度喪失，除了維護物種生育地完整外，種原的保存也是極為重要的，保有野外族群之種原將有助於保有物種遺傳歧異度，而利用分子指紋技術更能有效建構台灣本土物種之分子資料庫，在物種及保育單位的鑑定上提供有用訊息將做為未來保育工作的參考之一。

五、誌 謝

本研究計畫承玉山國家公園計畫補助經費進行，研究期間承蒙保育課同仁及委員提供寶貴意見及協助，謹致謝忱。而實驗室同仁在計畫執行期間所給予之協助及指導，謹致上十二萬分的謝意。

六、引用文獻

徐國士，1974。從巨木的發現談台灣的檜木。科學月刊 5(3)：13-15。

Chiang, T. Y., and B. A. Schaal. 2006. Phylogeography of plants in Taiwan and the Ryukyu archipelago. *Taxon* 55: 31-41.

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. *Molecular Ecology* 10: 2697-2710.

- Chiang, Y. C., K. H. Hung, B. A. Schaal, X. J. Gest, T. W. Hsu, and T. Y. Chiang. 2006. Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Molecular Ecology* 15: 765-779.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities. of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Hamrick, J. L., and R. W. Allard. 1972. Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69: 2100-2140.
- Hikida, T., and H. Ota. 1997. Biogeography of reptiles in the subtropical East Asian Islands. In: The Symposium on the Phylogeny, Biogeography and Conservation of Fauna and Flora of East Region, National Taiwan Normal University, Taipei, Taiwan.: 11-18.
- Matsumoto, A., N. Tani, X. G. Li, Y. Nakao, N. Tomaru, and Y. Tsumura. 2006. Development and polymorphisms of microsatellite markers for hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). *Molecular Ecology Notes* 6: 310-312.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Nakao, Y., H. Iwata, A. Matsumoto, Y. Tsumura, and N. Tomaru. 2001. Highly polymorphic microsatellite markers in *Chamaecyparis obtusa*. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 31: 2248-2251.
- Schneider, S., J. Kuffer, D. Rossli, and L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN: A Software for Population Genetic Data Analysis, Version 2.000. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Sibuet, J. C., and S. K. Hsu. 1997. Geodynamics of the Taiwan arc-arc collision. *Tectonophysics* 274: 221-251.
- Sibuet, J. C., and S. K. Hsu. 2004. How was Taiwan created? *Tectonophysics* 379: 159-181.

Microsatellite fingerprinting of *Chamacyparis formosensis* in Yuan-Shan National Park

Chi-Chun Huang¹, Chi-Yung Lin¹, Kuo-Hsiung Wang¹, Tsai-Wen Hsu^{1,2}, and Tzen-Yuh Chiang^{1,3}

(Manuscript received 14 May 2007 ; accepted 12 June 2007)

ABSTRACT : DNA fingerprinting has been widely applied to examine the genetic variation for the purpose of biological conservation. Microsatellites DNA with short sequence repeats provide high variability and high resolution in assessing population genetic structure. In this study, genetic diversity and population structure of *Chamacyparis formosensis* Matsumura were examined. In the past decades, human overexploitation has caused the population decline in the relic species. The microsatellite DNA diversity of *C. formosensis* is high within populations and species. Population of South-cross-island highway that processed the highest level of genetic diversity should be considered as a hot spot, as indicated by its demography. For maintaining the genetic diversity of *C. formosensis*, lowering down the disturbances that impact the habitats and increasing the effective population size are required. Microsatellite DNAs, which are able to distinguish individuals and populations, provide molecular ID for conservation.

KEYWORDS : *Chamaecyparis formosensis*, conservation, fingerprinting, microsatellite DNA

1. Department of Life Sciences, National Cheng Kung University
2. Taiwan Endemic Species Research Institute
3. Corresponding author