農委會林務局保育研究系列 89-14 號

台 灣 油 杉 之 遺 傳 歧 異 度 分 析

Genetic variation analysis of *Keteleeria davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.

林彩雲　張淳琤

主辦機關：TVBS 關懷台灣基金會

行政院農業委員會林務局

執行機關：國立清華大學生命科學系

中華民國八十九年十二月

目錄

中文摘要……………………………………………………………………………1

英文摘要……………………………………………………………………………2

緒論…………………………………………………………………………………3

材料與方法………………………………………………………………………13

植物材料與維持………………………………………………………………13

基因組核酸的萃取……………………………………………………………13

逢機引子………………………………………………………………………17

基因組核酸的複製……………………………………………………………17

資料分析………………………………………………………………………18

核糖體核酸的複製……………………………………………………………19

核酸接合反應及質體傳送至大腸桿菌………………………………………21

雙股核酸自動序列定序………………………………………………………21

結果………………………………………………………………………………23

逢機引子的篩選………………………………………………………………23

台灣油杉基因組核酸的多形性………………………………………………24

RAPD資料分析…………………………………………………………………28

油杉親緣關係的分析…………………………………………………………28

台灣油杉核糖體核酸序列關係的分析………………………………………31

討論……………………………………………………………………………………34

參考資料………………………………………………………………………………36

表目錄

表一、六種裸子植物細胞核 ITS 區域的長度。……………………………………11

表二、台灣油杉（*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay）葉片採樣植株編號、所在地及本文中所使用的編號。…………………………………………………14

表三、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 核糖體 DNA 所設計的引子序列。…………………………………………………………………20

表四、選用於分析台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay） RAPD標誌的逢基因子標號、序列及複製出多形性片段的數目。………………25

表五、對於不同區域之台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 之間具有專一性的逢機引子。…………………………………………………26

表六、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.）111 樣本之 Nei and Li's 與 Jaccard's 相似性係數指標。…………………………………37

表七、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.）去除礁溪第 25 林班後的 104 株樣本之 Nei and Li's 與 Jaccard's 之相似性係數指標。…40

圖目錄

圖一、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 外觀。…………4

圖二、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay） 自然保護區位置。5

圖三、坪林台灣油杉自然保留區。……………………………………………………7

圖四、大武山自然保留區。……………………………………………………………8

圖五、細胞核核糖體 DNA 基因排列情形。…………………………………………11

圖六、複製台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 核糖體 DNA 所使用的引子之位置。……………………………………………………………20

圖七、以 182 號逢機引子 （5'GTTCTCGTGT3'） 進行台灣油杉 (*K. Beissn*. var.*Formosana* Hay) RAPD 多形性分析之電泳圖。…………………………27 **圖**

八、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 111 樣本之 Nei and Li's 相似性係數指標親源關係樹形圖。………………………………………38

圖九、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 111 樣本 之 Jaccard's 相似性係數指標親源關係樹形圖。…………………………………………39

圖十、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.）去除礁溪第 25 林班後的 104 株樣本之 N and Li's 相似性係數指標親源關係樹形圖。…………41

圖十一、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.）去除礁溪第 25 林班後的 104 株樣本之 accard's 相似性係數指標親源關係樹形圖。…………42

圖十二、台灣油杉（*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.）坪林文山事業區第41林班編號8與9植株5.8S rDNA與木本植物5.8S rDNA序列比對與親源關係樹形圖。……………………………………………………………………32

中文摘要

台灣油杉 （*Keteleeria davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 於台灣本島之兩端呈不連續分布；北部有礁溪與坪林台灣油杉自然保護區，南部有大武台灣油杉自然保護區。其族群相當稀少，結實率低，是林務局正積極保育的固有種。本計劃係對分布於台灣南北地區之台灣油杉進行 DNA 分析，利用 RAPD 標誌分析為主和核糖體 DNA 序列分析為輔來探討台灣油杉種源與其地域分布的相關性。本實驗以 17 個逢機單股核酸序列做引子分析 111 株南北植株，所得的 RAPD 標誌分析結果得到的親源關係樹形圖中，可知台灣油杉可分為四個類群，分別為第一類群包含了北部坪林油杉自然保留區文山事業區第 40 及 41 林班；礁溪油杉自然保護區宜蘭事業區第 24 及 25 林班，第二類群包含了南部台東林管區管理處大武油杉自然保留區大武事業區第 41 林班，第三類群為台東林管區管理處大武油杉自然保留區大武事業區第 30 林班，以及第四類群為達仁山區第一陵線及第二陵線，顯示為台灣油杉的基因組歧異度符合南北不連續分布的型式。而核糖體 DNA 序列分析部分目前已得到坪林台灣油杉 5.8S 核糖體 DNA 基因序列，其序列比對結果顯示台灣油杉與其他種裸子木本植物之間有些歧異度。因為台灣油杉的基因組之間歧異度低，其基因組成份相似度高，建議未來應對分布於台灣南北之台灣油杉有著手復育之必要。

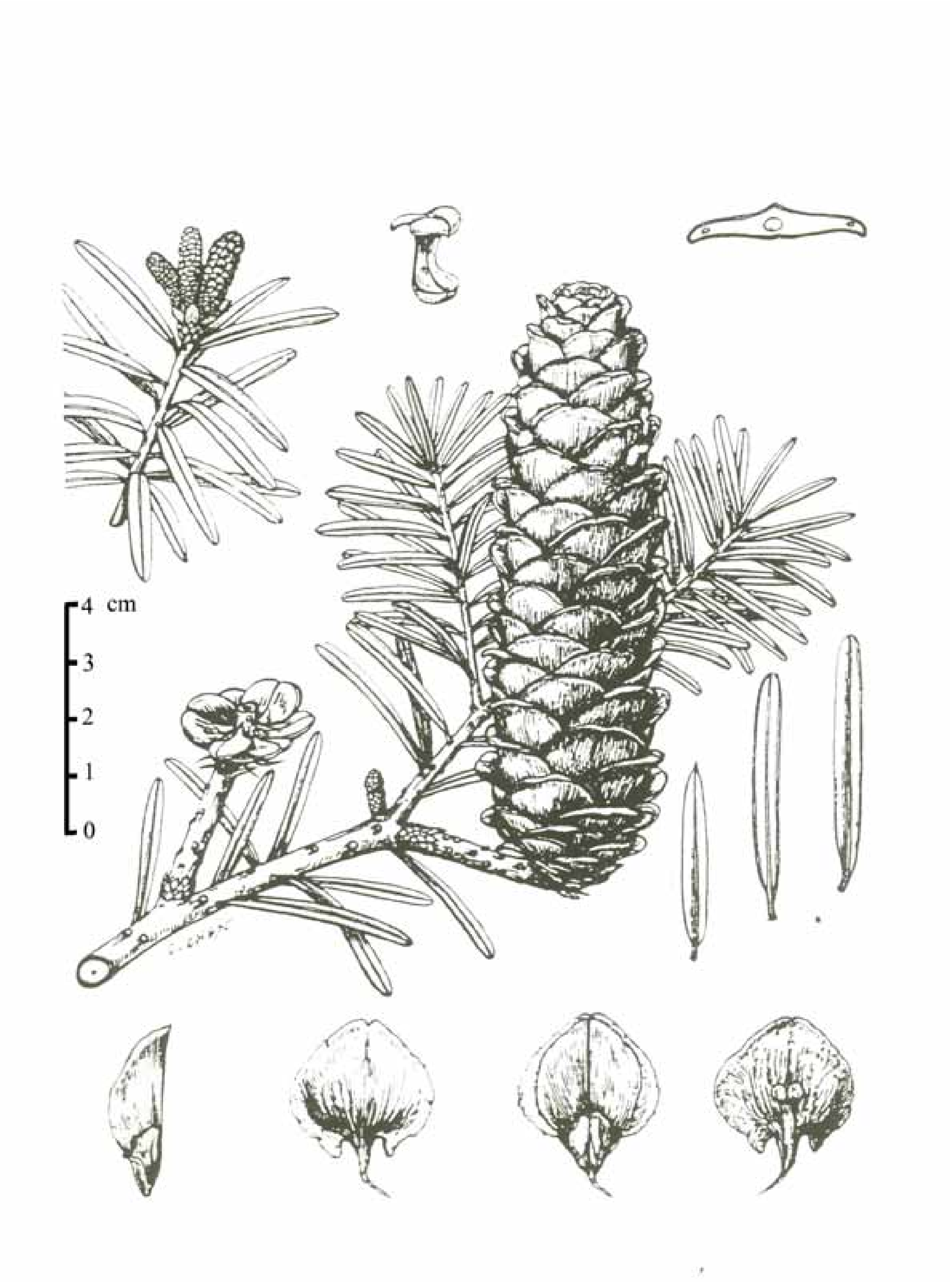
英文摘要

Keteleeria davidiana Beissn. var. *formosana* Hay. distributes disjunctively in Taiwan. Jiau-Shi and Ping-Lin nature reserves are located in northern Taiwan and Da-Wu nature reserve is located in southern Taiwan. This native species is currently protected by Taiwan Forest Bureau due to its scarce population and low ratio of seed setting. This study was to investigate the phylogentic relationship between these two disjunctive populations using RAPD markers resulted from genetic variation and variation in nuclear ribosomal DNA. To analyze the phylogenetic relationships among 111 plants of *K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay., 17 synthetic oligonucleotides were used as probes to obtain RAPD markers. According to the phylogenetic tree, the samples were clustered into four groups. Group A includes Jiau-Shi Compartment 24 and 25 and Ping-Lin Compartment 40 and 41; group B includes Da-Wu Compartment 41; group C includes Da-Wu Compartment 30 and group D includes Da-Zen Ridges 1 and 2. Our result indicates that the genome of *K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.population in northern Taiwan is different from that in southern Taiwan.Corresponding to the disjunct distribution of this species.The nucleotide sequences of 5.8S rDNA in 2 samples of *K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay. sre found to be identical. However, the 5.8S rDNA of *K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.is somewhat diverged from 6 species in gynosperms. Our results suggests the importance of protecting and re-establishing the population of this species due to the low divergency and high similarity of its genome.

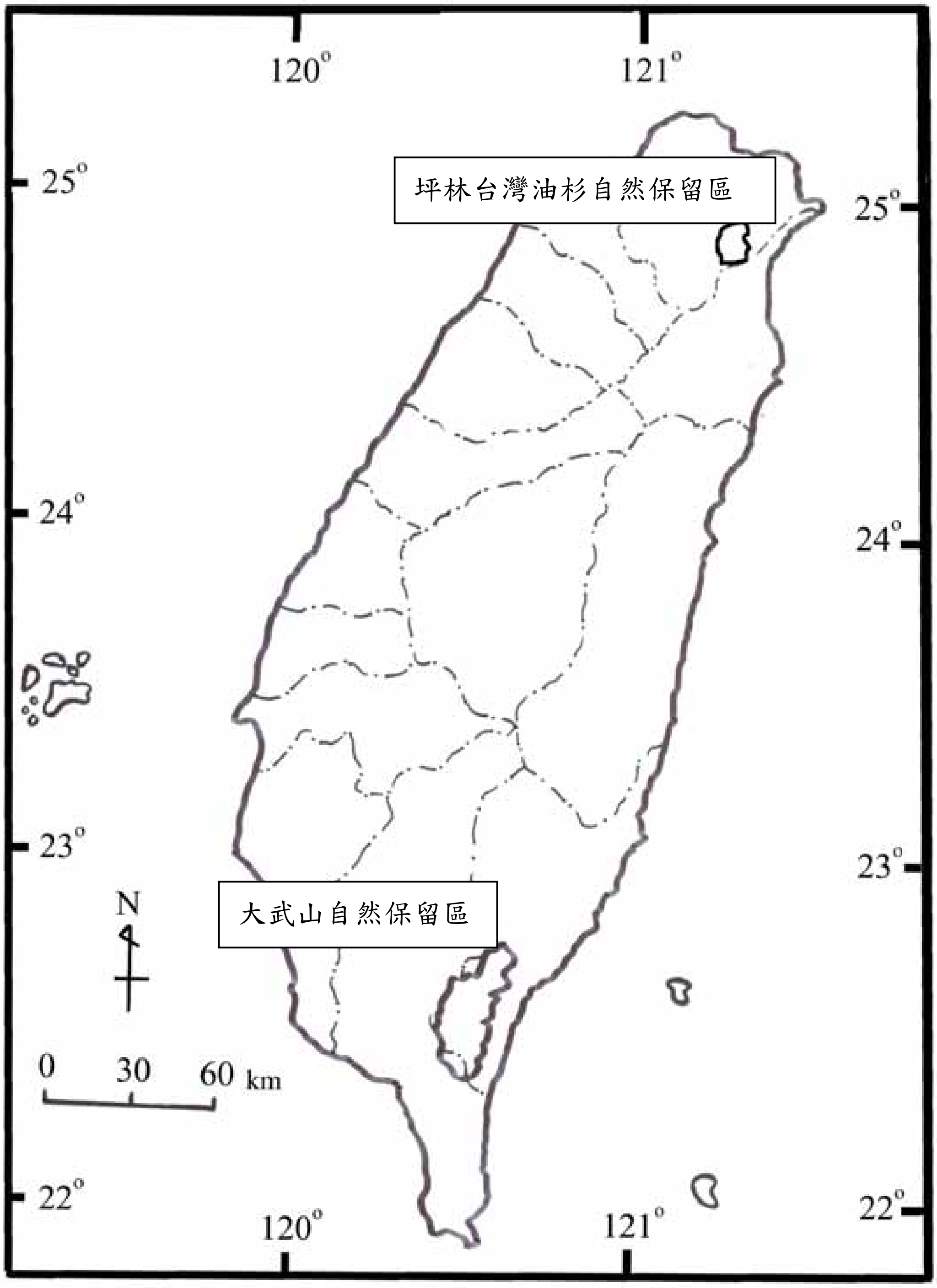
緒論

油杉屬 （*Keteleeria* ） 植物為常綠喬木，枝條平展輪生，葉呈線形，具淡綠色寬氣孔帶。於 1862 年發現時曾經被誤認為冷杉屬 （*Abies*）、松屬 （*Pinus*）及鐵杉屬（*Tsuga*），1868 年由 E.A. Carriere 正式定名為 *Keteleeria* （Adams *et al*., 1998；http://www.geocities.com/~earlecj/pi/ke/），為紀念法國一位育苗家 J.B. Keteleeria（1813-1903），油杉屬曾經被認為有 14 種與一變種 （variety），後來 Farjon 將油杉屬分為四種 （Farjon, 1989） 分別為 *K. davidiana* （Bertrand） Beissn、*K. evelyniana* Mast、.*K. fabri* Mast 及 *K. fortunei* （A. Murray bis） Carriere。

台灣油杉 (*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.) 屬於松科油杉屬，為台灣特有種，是常綠大喬木，樹皮暗褐色至灰黑色，具不規則裂縫，略呈鱗片狀剝落；樹高可達 40 公尺，枝條平展，輪生。葉線形有光澤，表面中肋凸起，背面中肋亦凸起，先端頓圓或微凹。雄花圓柱形，毬果圓柱狀長橢圓形；果鱗圓卵形，先端近於圓形，微反曲，種子連翅長 20 至 2 公厘。德氏油杉產於川、陝、鄂與雲南西南部，台灣油杉為德氏油杉之變種，特產於台灣海拔 300 至 900 公尺處（圖一）（金平亮三，1936），為「文化資產保存法」公告正式列入保護之珍貴稀有植物之一 （王維洋，1995）。



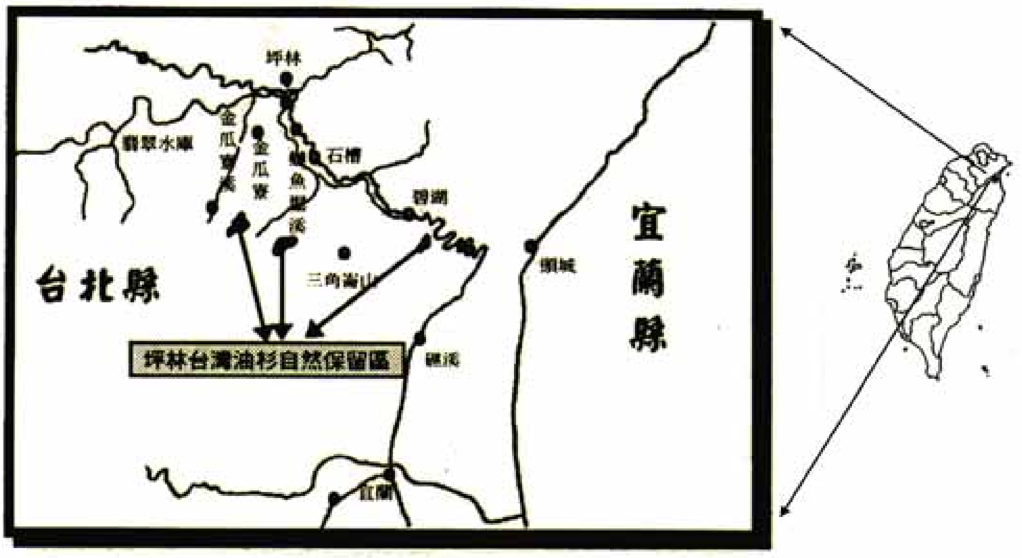
圖一、台灣油杉（*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.）外觀。（金平亮三，1936）



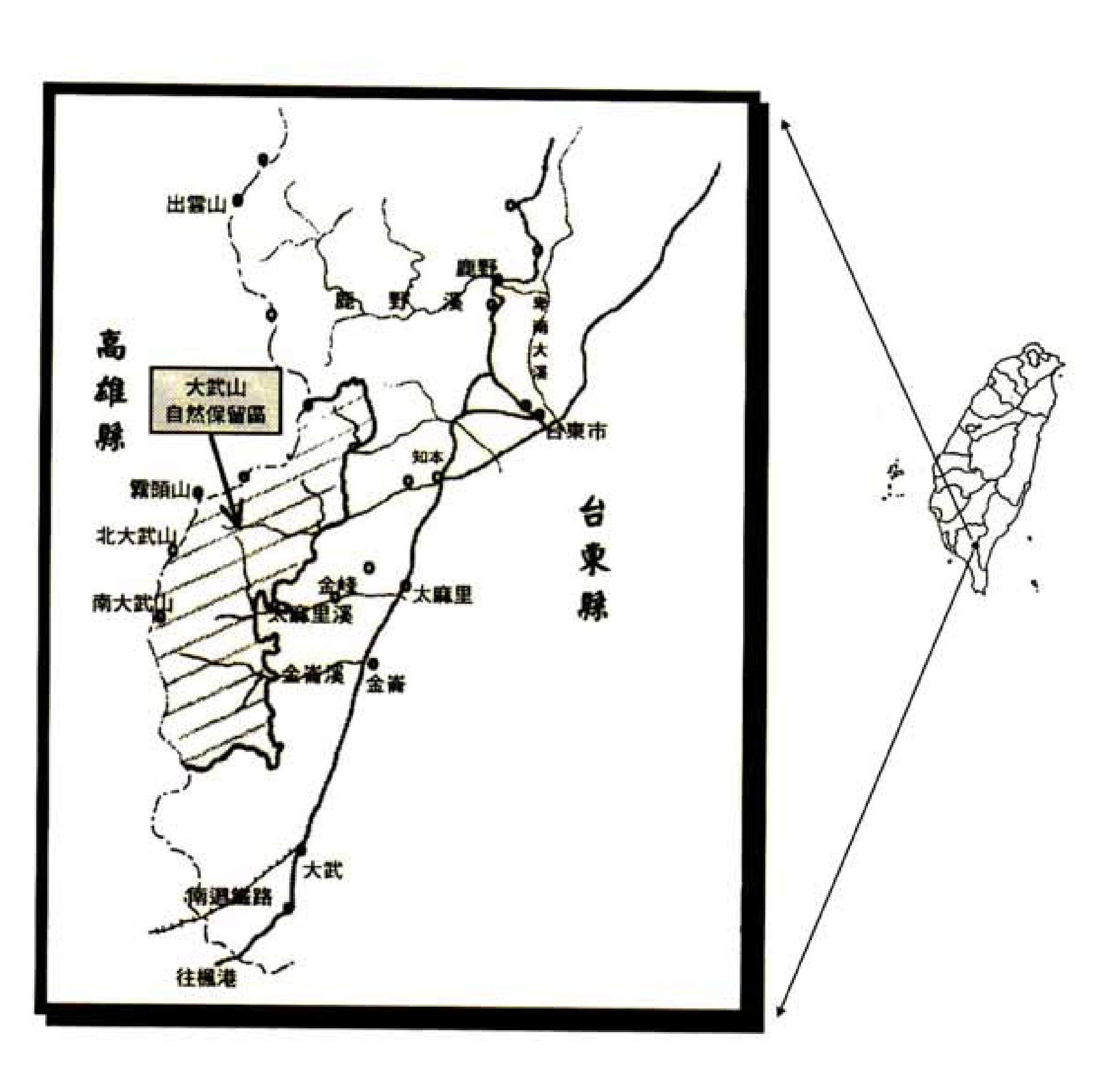
圖二、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay） 自然保護區位置圖。台灣油杉呈不連續分布，林務局設置有南北兩處自然保護區，北部有坪林台灣油杉自然保留區，以及南部的大武山自然保留區。

台灣油杉是台灣特有種，於全台呈不連續分布（圖二），北部族群只分布於台北縣坪林鄉境內（圖三），沿著北宜公路及北勢溪的支流金瓜寮溪分布，全區為山區，總面積約為 34.6 公頃，海拔 350 至 650 公尺，約有 200 餘株，屬於坪林油杉自然保留區文山事業區第 28、29、40 及 41 林班；以及礁溪與石牌之分水嶺礁溪油杉自然保護區宜蘭事業區第 24、25 林班。南部族群分布於屏東仿寮山 (海拔 900 公尺)與大武山(海拔 500 公尺)的中央山脈南部分水嶺附近（圖四），全區面積約 5.04 公頃，海拔約 600 至 700 公尺，屬於台東林管區管理處大武油杉自然保留區大武事業區第 30 林班、大武台灣油杉自然保護區大武事業區第 41 林班，30 林班有超過 200 株以上之台灣油杉，而 41 林班則約有 50 株。南北油杉共約 400 餘株（王維洋，1995，劉思謙和唐立正，1998），然而台灣油杉天然林結實稀少，雖然每顆毬果約可產生約 100 粒種子，但能夠發芽長成幼苗的飽滿種子不到 3 粒，發芽率很低，根據調查主要是自花授粉不良及胚胎發育失敗所致；加上競爭力不敵其他針葉樹種，而種子萌發過程中又受到鳥類、氣候等外在壓力，人類又喜歡砍油杉當建築材料，因此數量日漸稀少，長此以往台灣油杉未來可能走向滅絕一途，台灣油杉的滅絕可能不僅是一個物種的消失而已，連帶也將造成遺傳基因的消失（http://www.tari.gov.tw/news）。

屬於台灣稀有植物的台灣油杉，由於族群很小可能導致大量遺傳基因的消失及基因型趨向於同質化，而南北族群經長期分離，其遺傳基因是否具有相當程度的分化？研究族群遺傳學的主要目的在檢測物種內遺傳變異的情形及這些變異在族群內及族群間分布的狀態，進而了解族群遺傳結構及族群演化的潛能，探討各種演化力量對於



圖三、坪林台灣油杉自然保留區位於台北縣坪林鄉境內，屬於羅東林管處文山事業區第28、29、40及41林班，共有三小區，總面積34.6公頃 （楊政川和潘富俊，1997）。



圖四、大武山自然保留區位於中央山脈南端的東向坡面，台東縣之太麻里、達仁及金崙鄉境內，分屬林務局台東林區管理處之台東事業區及屏東林管處之屏東事業區，面積 47,000 公頃。是台灣地區面積最大，林相最完整的自然保留區。

族群遺傳結構的影響。族群本身所具遺傳變異的多寡會影響一個族群數目增加的潛力 。當環境若發生巨大的變動時，這些族群是否比較容易受到影響；當族群的遺傳變異度已趨近於零時，生物是否會失去演化的動力。因此了解族群內基因歧異度是保育稀有物種的基本課題。

生物科技發展至今，對於分類學方面，除了傳統的利用型態標誌 （morphological markers） 分類之外，分子生物學的方法應用在分類上也日益增多，如：同功異構酵素 （isozyme）、核酸限制酵素片段長度多形性 （restriction fragment length polymorphism，簡稱 RFLP）（Beckmann and Soller, 1983； Tanksley, 1983； Tanksley *et al*., 1989）及逢機擴大多形性核酸 (random amplified polymorphic DNA，簡稱 RAPD) 標誌 （Welsh and Mcclelland, 1990； William *et al*., 1990），其中 RAPD 方法為利用一個逢機序列的一小段單股核酸作為引子，將萃取自不同區域的基因組 DNA 作為模版，利用聚合脢連鎖反應 (polymorase chain reaction，簡稱 PCR) 進行核酸片段之擴增。並分析所形成之 RAPD 標誌多形性，其多樣性是由於基因組 DNA 核酸序列的變異，以致於原可和基因組 DNA 結合的引子無法再與作為模板的基因組 DNA 結合所產生的，這些資料經由統計及程式分析可了解生物之親源關係。利用 RAPD 標誌分析植物親緣關係已被廣泛應用 （Yu and Lin, 1997； Hsu *et al*, .2000）。

一般所使用分析細胞核核糖體 DNA （ribosomal DNA, 簡稱 rDNA） 轉錄區之間的間隔序列 （internal transcribed spacer, 簡稱 ITS），其基因在細胞核中的排列情形

為 18S rDNA、5.8S rDNA 接著 26S rDNA（圖五），分別負責產生 18S rRNA、5.8S rRNA 與 26S rRNA。在 18S rDNA 與 5.8S rDNA 之間轉錄區序列稱為 ITS1，而 5.8S rDNA 與 26S rDNA 之間的轉錄區序列稱為 ITS2，在 DNA 進行轉錄時 ITS1 與 ITS2 會與 18S、5.8S 及 26S rRNA 一起被轉錄出來，但在之後細胞對轉錄之 rRNA 進行修飾（processing）過程中 ITS1 與 ITS2 會被除去，產生成熟的 rRNA（Takaiwa *et al*. 1985; Barker *et al*., 1988；D'Ovidio 1992）。由於在演化的過程中 ITS 區的變異性經常會被保留下來，因此可做為遺傳相關分析之依據（謝惠婷，1998; Terry *et al*., 2000）。rDNA 基因的核酸序列在許多物種間相當一致，但在 ITS 區域的長度和序列常有很大的變異 (表一)（Cheng *et al*., 2000）。對於松科而言，ITS 是研究天然族群的好材料（Ouijada *et al*.,1998），分析 ITS 變異區核酸序列之異同，可以了解植物地域分布與基因歧異度的關係。利用 ITS 序列分析植物之親源關係在各種植物例如：*Eupatorium*（Eupatorieae, Asteraceae）（Motomi Ito *et al*., 2000）、*Crambe L*.（Brassicaceae）（Francisco-Ortega *et al*., 1999）、*Diervilla*（Caprifoliaceae）（Kim and Kim, 1999）；、*Magnolia*（Magnoliaceae）（Hiroshi Azuma *et al*., 1999）、Maples（*Acer* L; Aceraceae）（Suh *et al*., 2000）已經廣泛的被利用。

圖五、細胞核核糖體 DNA 基因排列情形。

表一、六種裸子植物細胞核 ITS 區域的長度 （Cheng, *et al*., 2000.）。

學名	中文名	Accession number	Its1	5.8s	Its2	全長
Agathis borneensis	南洋杉	Ab023974	944	162	263	1369
Amentotaxus formosana	台灣穗花杉	Ab023976	626	162	231	1019
Cephalotaxus sinensis	粗榧	Ab023985	604	162	226	992
Cryptomeriia japonica	柳杉	Ab023983	610	162	221	993
Nageia nagi	南宮竹柏	Ab023989	1622	162	195	1979
Taxus mairei	紅豆杉	Ab024000	707	162	224	1093

本實驗分析林務局之台灣油杉自然保護區內之台灣油杉，包括北部坪林台灣油杉自然保護區文山事業區第 40 林班 6 株，第 41 林班 7 株；礁溪台灣油杉自然保護區宜蘭事業區第 24 林班 6 株，第 25 林班 13 株。南部台東林管區管理處大武油杉自然保護區大武事業區第 30 林班 32 株，第 41 林班 26 株，以及達仁山區第一陵線 8 株，第二陵線 13 株，共計台灣油杉 111 株，另外以台灣紅豆杉（*Taxus mairei*）及菸草（*Nicotiana*）的基因組作為參考組。實驗以 RAPD 標誌分析為主，用 17 個逢機單股核酸序列做引子進行 PCR 反應，得到的多形性標誌再以 NTSYS-pc （numerical

taxonomy and multivariate analysis system）軟體分析得到親源樹形圖。並以 ITS 序列分析為輔，目前得到一段台灣油杉 5.8S 基因序列，本計劃係對分布於台灣南北之台灣油杉進行基因分析，探討台灣油杉種源分布與地域分布之相關性。這些實驗結果顯示，台灣油杉的基因組歧異度符合南北不連續分布的型式。

材料與方法

植物材料與維持

本實驗所使用的材料為台灣油杉葉片，均由林務局惠予提供，並由羅東林管處周怡芳小姐與石正男先生惠予協助採集，以及台東林管處王柏五先生等人惠予協助採集。每一採樣約為 5 克。採樣植株編號及植株所在地列於表二中。台灣油杉葉片採集後放入封口袋帶回實驗室，在進行基因組核酸的萃取之前，經液態氮冷凍後，保存於−70℃冷凍箱中。

基因組核酸的萃取

台灣油杉之基因組 DNA 的萃取是利用 Rogers 與 Bendich 於 (1988)所提出的 CTAB 方法，稍加修改適用，萃取過程如下。

將-70℃冷凍保存的植物組織 (約 3-4 克) 取出，置於事先預冷之研缽中，加入液態氮，待植物組織以研缽與杵磨成粉末後，將植物粉末置入 65℃預熱之裝有約 12 ml 的 1×CTAB (1% CTAB，100 mM Tris（pH 8.0），20 mM EDTA（pH 8.0），1.4 M NaCl，1% PVP) 萃取液的離心管中，將離心管置於 65℃加熱後，再以均質機進行細胞均質作用，再將離心管置於 65℃加熱 10 分鐘使萃取液充分作用， 接著在離心管中

表二、台灣油杉（*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay）葉片採樣植株編號、所在地及本文中所使用的編號。

採集區	組號	編號	胸徑(公分)	本文編號	備註	採集區	組號	編號	胸徑(公分)	本文編號	備註
坪林油杉自然保留區文山事業區第40林班	1	10	—	40-10		礁溪油杉自然保護區宜蘭事業區第24班	1	57	12	24-57	
	2	11	—	40-11			2	66	12.5	24-66	
	3	95	27	40-95			3	68	26	24-68	
	4	96	22	40-96			4	82	33	24-82	
	5	99	24	40-99			5	N2	6	24-N2	
	6	109	18	40-109			6	N5	2.5	24-N5	
坪林油杉自然保留區文山事業區第41林班	1	1	36	41-1		礁溪油杉自然保護區宜蘭事業區第25林班	1	2	36	25-2	
	2	2	—	41-2			2	5	50	25-5	
	3	3	—	41-3			3	6	20	25-6	
	4	4	—	41-4			4	14	20.1	25-14	
	5	7	—	41-7			5	20	15	25-20	
	6	8	—	41-8			6	30	37.1	25-30	
	7	9	—	41-9			7	76	20.7	25-76	
							8	84	28.2	25-84	
							9	131	16.1	25-131	
							10	132	37.2	25-132	
							11	133	32.1	25-133	
							12	135	24.5	25-135	
							13	137	25.6	25-137	

表二 （連續）

採集區	組號	編號	胸徑(公分)	本文編號	備註	採集區	組號	編號	胸徑(公分)	本文編號	備註
大武自然保留區大武事業區第30林班	1	23	3	30-23		大武台灣油杉自然保護區大武事業區第41林班	1	2	35	D41-2	
	2	36	0.5	30-36			2	7	50	D41-7	
	3	54	1	30-54			3	9	12	D41-9	
	4	58	5	30-58			4	11	76	D41-11	
	5	59	3	30-59			5	12	30	D41-12	
	6	60	0.8	30-60			6	16	60	D41-16	
	7	85	2	30-85			7	17	46	D41-17	
	8	88	2.5	30-88			8	18	76	D41-18	
	9	91	1	30-91			9	19	45	D41-19	
	10	92	3	30-92			10	20	46	D41-20	
	11	98	6	30-98			11	21	88	D41-21	
	12	101	3	30-101			12	22	82	D41-22	
	13	104	1	30-104			13	23	48	D41-23	
	14	106	2	30-106			14	24	42	D41-24	
	15	107	1	30-107			15	25	30	D41-25	
	16	115	4.5	30-115			16	28	75	D41-28	
	17	119	0.5	30-119			17	29	65	D41-29	
	18	120	1	30-120			18	30	64	D41-30	
	19	122	4.5	30-122			19	31	50	D41-31	
	20	151	1.5	30-151			20	33	15	D41-33	
	21	165	5	30-165			21	34	106	D41-34	
	22	194	5	30-194			22	35	68	D41-35	
	23	197	3	30-197			23	36	40	D41-36	
	24	198	0.5	30-198			24	38	70	D41-38	
	25	265	—	30-265			25	39	34	D41-39	
	26	266	—	30-266			26	41	48	D41-41	
	27	278	—	30-278							
	28	281	—	30-281							
	29	282	—	30-282							
	30	284	—	30-284							
	31	285	—	30-285							
	32	288	—	30-288							
達仁山區第一稜線	1	13	82	1-13		達仁山區第二稜線	1	160	30	2-160	
	2	52	90	1-52			2	162	119	2-162	
	3	57	175	1-57			3	166	69	2-166	
	4	79	62	1-79			4	167	21	2-167	
	5	84	36	1-84			5	168	19	2-168	
	6	105	48	1-105			6	170	24	2-170	
	7	128	40	1-128			7	171	3	2-171	
	8	150	39	1-150			8	173	35	2-173	
							9	264	31	2-264	
							10	273	76	2-273	
							11	274	50	2-274	
							12	280	74	2-280	
							13	287	62	2-287	

加入等體積之 chloroform/isoamyl alcohol （24：1），充分混合後以 11,000×g 的轉速於室溫下離心 15 分鐘，將上層液體置入新的離心管中，再加入 1/10 體積的 10% CTAB（10% CTAB，0.7 M NaCl） 萃取液，接著加入等體積之 chloroform/isoamyl alcohol（24：1），充分混合後以 11,000×*g* 的轉速於室溫下離心 15 分鐘，將上層液體置入新的離心管中，再加入等體積的 CTAB 沉澱溶液 （1% CTAB，50 mM Tris （pH 8.0），10 mM EDTA（pH 8.0）），均勻混合後置於-20℃隔夜。

第二天將-20℃沉澱之離心管置於室溫中回溫，以 3,500×g的轉速於 4℃下離心 1 小時，將上清液去除，留下的沉澱物以高鹽的TE溶液 （10 mM ,Tris-HCl（pH 8.0），1 mM EDTA（pH 8.0），1 MNaCl）回溶，加入 2.5 倍體積的冷的 95% 酒精置溶液中，混合均勻後將離心管置於-20℃約 30 分鐘，再將離心管以 3,500×*g*的轉速於 4℃下離心 15 分鐘，去除上清液，將沉澱物轉移至 1.5 ml之微量離心管中，以 80% 酒精清洗兩次，風乾沉澱物，再以 500μl的無菌去離子水回溶。接著再加入 100 μl的RNase水解溶液（300 mM TrisHCl（pH 7.5），300 mM NaCl，60 mM $MgCl_2$，0.1 mg/ml RNase （最後的濃度為 0.1 mg/ml） 於 37℃下作用 1 小時，加入SDS （最後濃度為 0.1% ） 及 2 μl的pronteinase K （最後的濃度為 10 mg/ml）於 37℃下作用 1 小時，以phenol萃取一次，phenol/chloroform萃取一次，chloroform萃取一次，加入 1/10 體積的 10 M sodium acetate 與 0.8 倍體積的isopropanol，置於冰上 1 小時，以 12,000×*g*的轉速於 4℃下離心 15 分鐘，以 80% 酒精清洗，風乾，將沉澱物回溶於 100 μl的TE溶液中，加入 1/10

體積的 10 M sodium acetate 與 2.5 倍體積的酒精置於-20℃沉澱 2 小時之後，以 80% 酒精清洗，風乾，將沉澱物回溶於適量的無菌去離子水中。

逢機引子

本實驗所使用的逢機引子 （random primer） 是從加拿大英屬哥倫比亞大學（University of British Columbia） 之核酸合成實驗室 （Oligonucleotide Synthesis Laboratory, Nucleic Acid-Protein Service Unit, Dr. J. B. Hobbs, Director） 所購得。這些逢機引子接由 10 個核酸組成 （10 mers），其中 G＋C 的含量為 50-80% 。用於實驗的核酸引子共有 400 個，編號依序為 1-100、101-200、201-300、301-400。從這些逢機引子所產生的核酸片段 （DNA fragments） 的型態而挑選出 17 個合適的引子。

基因組核酸的複製

台灣油杉基因組核酸的複製方法是根據Williams 等人 （1990） 的方法加以修改而得， PCR（polymorase chain reaction）反應的總體積為 25 µl，含有 10 mM Tris-HCl（pH 8.8），50 mM KCl，1.5 mM $MgCl_2$，0.1% Triton X-100，200 µM dNTPs（Pharmacia），0.2% BSA， 0.2 µM引子 （primers），100 ng基因組DNA，與 1 units 的DyNAzyme^{TM} II DNA Polymerase，最後再加入一滴 （約 20µl） 礦物油 （Mineral

oil，Mallinckrodt）。反應的進行是使用PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 480 及 HYBAID Omni Gene Thermal Controller，反應的條件設定為 94℃兩分鐘，36℃一分鐘，72℃兩分鐘，兩個循環，再接著 94℃30 秒，36℃30 秒，72℃一分鐘，43 個循環，最後一個循環為 72℃10 分鐘之後，保存在 4℃。PCR反應後之產物以在加入 1 µl 的 bromophenol blue DNA染料後，在 1.5% 洋菜凝膠 （agarose gel，Kramel Biotech） 於 1×TBE （89 mM Tris，89 mM boric acid，2 mM EDTA） 緩衝液中經電泳 （electrophoresis） 解析 （150 Volts，3hr），經ethidium bromide染色之後可在UV燈下以利可拍軟片 （Polaroid film 667） 照相，再分析RAPD資料。

資料分析

台灣油杉的基因組 DNA 在經過 PCR 的反應之後，由逢機引子擴增出來的 DNA 片段我們選定的逢機多形性片段標誌，在洋菜膠電泳圖上出現的時記為 1，未出現時記為 0，如此將多形性的核酸片段以 0 或 1 的方式紀錄下來，存為 ASCII 檔案，接著我們以 NTSYS-pc（numerical taxonomy and multivariate analysis system），version 1.80 programme （Rohlf, 1993） 電腦軟體來分析這些紀錄的多形性的核酸片段資料，首先利用 SIMQUAL （similarity for qualitative data） 的程式計算出 Nei and Li’s 與 Jaccard’s 相似性係數 （similarity coefficients），其中 Nei and Li’s 相似性係數的計算公式為：NL=2a/（2a+b+c）；而 Jaccard’s 相似性係數的計算公式為：J＝a/（a＋b＋c）。

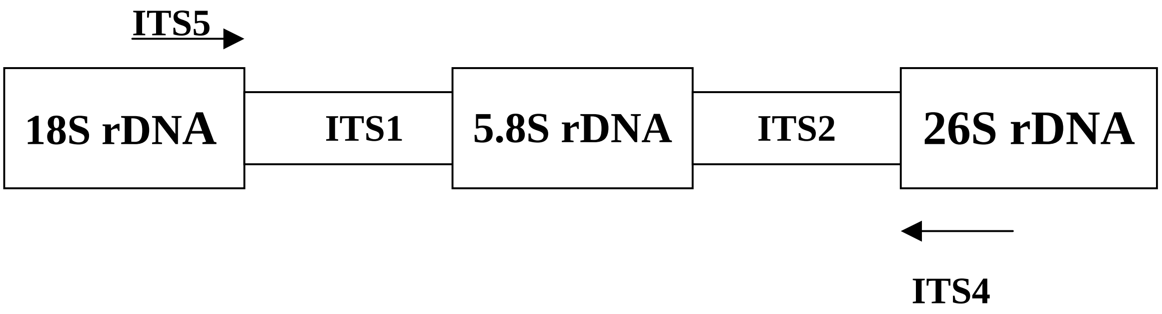
若以樣本 A 與樣本 B 為例，在多形性的核酸片段資料中，樣本 A 與樣本 B 同時具有核酸片段紀錄為 a，樣本 A 其有而樣本 B 沒有的紀錄為 b，樣本 A 沒有而樣本 B 有的紀錄為 c，若樣本 A 和樣本 B 均無核酸片段產生則紀錄為 d，如此帶入公式便能算出 Jaccard's 相似性係數。接著再利用 SAHM （sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering） 計算程式中的 UPGMA （unweighted pair-group method with arithmetic averages） 分組方式即能構築出一個親緣樹形圖 （phylogenetic tree）。

核糖體核酸的複製

台灣油杉基因組核糖體核酸的複製方法是根據 D'Ovidio （1992） 的方法加以修改而得， PCR （polymorase chain reaction） 反應所設計的引子列於表三，引子設計的位置分別位於 18S rDNA之尾端與 26S rDNA之前端 （圖六），PCR反應的總體積為 50 µl，含有 10 mM Tris-HCl （pH 8.8），50 mM KCl，1.5 mM $MgCl_2$，0.1% Triton X-100，200µM dNTPs （Pharmacia），0.2% BSA， 1 µM設計的引子 （primers），500 ng基因組DNA，與 2 units的DyNAzyme™ II DNA Polymerase，反應的進行是使用 PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 2400，反應的條件設定為 95℃三分鐘，一個循環，再接著 94℃一分鐘，48℃一分鐘，72℃一分 30 秒，30 個循環，最後一個循環為 72℃10 分鐘之後，保存在 4℃。PCR反應後之產物以 1% 洋菜凝膠（agarose gel，Kramel Biotech） 經電泳解析照相如前所述。

表三、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 核糖體 DNA 所設計的引子序列。

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
ITS5	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC



圖六、複製台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 核糖體 DNA 所使用的引子之位置。

核酸接合反應及質體傳送至大腸桿菌

接合反應所使用的工具為 pGEM-T Easy Vector Systems （Promega），反應總體積為 10 µl，包含載體 1 µl及欲嵌入之純化的核酸片段 7 µl，加入接合反應所需的緩衝液 （10×T4 DNA ligase buffer （300 mM Tris-HCl，pH 7.8，100 mM $MgCl_2$，100 mM DTT，5 mM ATP）)，再加入 1 µl（約 3 unit）的接合酵素（T4 DNA ligase，Promega），置於 14-16℃中進行反應 12 小時。

將 10 µl 的接合反應溶液加入 300 µl 的勝任細胞之中，置於冰上 45 分鐘後，再置於 42℃兩分鐘，接著立刻置於冰上直到微量離心管冰透，加入 0.5 ml 的 LB 培養液，置於 37℃恆溫培養箱中培養 25 分鐘，以低速 3,000×*g* 於室溫下離心 2 分鐘，將約 550 µl 的 LB 上清液棄置後，使細菌沉澱物重新回溶於剩餘的 LB 溶液中，再將此菌液均勻塗佈在含有 0.012% X-gal、200 µM/ml IPTG、100 µg/ml ampicillin 的 LB 固態培養基上，倒置於 37℃恆溫培養箱中培養 8 至 16 個小時。

雙股核酸自動序列定序

嵌入核糖體DNA片段之質體DNA經以大腸桿菌擴增後萃取出的DNA進行雙股核酸定序，定序使用ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit，反應的總體積為 20 µl，包含欲定序的雙股核酸 5 µl （200-500 ng），定序所用

的引子 （最後濃度為 3.2 pmol），再加入 4 μl含有螢光物質的溶液，最後再以無菌去離子水將體積補足至 20 μl，反應物置於 0.2 ml微量離心管。混合均勻之後以PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 2400 進行反應，反應的條件設定為 96℃10 秒鐘，接著 50℃5 秒鐘，60℃四分鐘，25 個循環，最後保存在 4℃。PCR反應產物接者進行純化的工作，先加入 2 μl的 3 M sodium acetate與 50 μl的 95% 酒精，置於室溫下 15 分鐘，再於室溫中離心 15-30 分鐘，以 250 μl 之 70% 酒精清洗，風乾，將風乾之沉澱物置於-20℃備用。定序所使用的引子序列為pGEM-T Easy Vextor上適用的pUC/M13 Forward Sequencing Primer以及pUC/M13 Reverse Sequencing Primer，接著再利用ABI PRISM™ 377 DNA Analysis System作為核酸序列電泳之分析。得到的核酸序列經由GCG （http://www.nhri.org.tw）做序列相似度比對。

結果

逢機引子的篩選

首先我們逢機選數株不同林班中的台灣油杉植物基因組DNA （包括礁溪油杉自然保護區宜蘭事業區第24林班之66號、24林班之人造林5號、25林班之2號、坪林台灣油杉自然保護區文山事業區第40林班之96號、40林班之108號以及第41林班之8號與41林班之9號加上來自林試所的油杉編號516-2） 作為模板，進行篩選，在經過一系列的PCR反應及1.5% 洋菜凝膠電泳解析後，從這400個核酸逢機引子 （編號分別為1-100、101-200、201-300、301-400）挑選出50個可以產生多形性核酸片段的引子。

接著利用所篩選出逢機引子，以全數的台灣油杉基因組作為模板，植物包括北部坪林台灣油杉自然保護區文山事業區第40林班6株，第41林班7株；礁溪台灣油杉自然保護區宜蘭事業區第24林班6株，第25林班13株。南部台東林管區管理處大武油杉自然保護區大武事業區第30林班32株，第41林班26株，以及達仁山區第一陵線8株，第二陵線13株，共計台灣油杉111株。並以紅豆杉 （編號T） 及菸草 （編號43C） 的基因組當作參考組，共113株樣本，進行PCR反應，用1.5% 洋菜凝膠電泳解析後，其中有17個逢機引子產生具多形性的核酸片段，因此再將這17個引子重複進行全部樣本之PCR反應，以確定篩選出的引子所產生的多形性的核酸片段具有再現性（reproducibility）。

台灣油杉基因組核酸的多形性

在利用所篩選的17個逢機引子經PCR反應之後，於1.5% 洋菜凝膠電泳膠上總共產生了189個核酸複製片段，其中出現118個可區分的多形性 （polymorphisms） 核酸片段，出現多形性的比例約為62.43% （表四），這些片段大多分布在3.6 kb至0.2 kb之間。在1.5% 洋菜膠電泳中所觀察到的這些多形性DNA片段中，其中有一些僅在特定地域分布之台灣油杉植株出現，這些具有專一性的核酸片段，例如：逢機引子編號第182號 （5’GTTCTCGTGT3’）複製出的核酸片段編號182-2 （約1.3 kb）僅發現於北部坪林台灣油杉自然保護區文山事業區第40林班、第41林班及礁溪台灣油杉自然保護區宜蘭事業區第24林班及第25林班，但不存在於南部台東台灣油杉大武第41林班（圖七）。這個多形性標誌僅對於特定區域的油杉基因組具有專一性。在本實驗中還有其他逢機引子對於台灣油杉特定區域具有專一性，均列於表五中。

表四、選用於分析台灣油杉（*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay） RAPD標誌的逢基因子標號、序列及複製出多形性片段的數目

Primer number	Nucleotide Sequence （5’ to 3’）	No. of amplified frangments (a)	No.of polymorphic fragments (b)	％polymerphism （b/a╳100）
52	TCCCGGAGC	11	5	45.45
106	CGTCTGCCCG	19	7	36.84
111	AGTAGACGGG	10	6	60.00
148	TGTCCACCAG	11	6	54.54
162	AACTTACCGC	11	8	72.72
164	CCAAGATGCT	12	3	25.00
169	ACGACGTAGG	10	5	50.00
175	TGGTGCTGAT	11	8	72.72
178	CCGTCATTGG	8	5	62.50
181	ATGACGACGG	12	8	66.66
182	GTTCTCGTGT	9	7	77.77
189	TGCTAGCCTC	12	9	75.00
195	GATCTCAGCG	11	9	81.81
283	CGGCCACCGT	14	7	50.00
337	TCCCGAACCG	14	8	57.14
346	TAGGCGAACG	17	9	52.94
347	TTGCTTGGCG	11	8	72.72
	Total	189	118	62.43

表五、對於不同區域之台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 之間具有專一性的逢機引子。

Primer number	Nucleotide Sequence (5' to 3)	DNA fragments number	Length of DNA fragment (bp)	specificity
52	TCCCGGAGC	52-1	3600	坪林 41 林班、礁溪 24 林班
106	CGTCTGCCCG	106-1	4000	礁溪 24 林班、坪林 40、41 林班
		106-2	2500	礁溪 24 林班、坪林 40、41 林班
148	TGTCCACCAG	148-1	1300	礁溪 24 林班、坪林 40、41 林班
		148-2	1200	礁溪 24 林班、坪林 40、41 林班
		148-3	900	礁溪 24 林班、坪林 40、41 林班
162	AACTTACCGC	162-1	2300	礁溪 24 林班、坪林 40、41 林班
		162-2	1900	礁溪 25 林班
		162-7	500	大武 30、41 林班、達仁第 1、2 稜線
175	TGGTGCTGAT	175-3	1100	大武 41 林班
		175-4	1000	大武 41 林班
		175-5	900	礁溪 24 林班
178	CCGTCATTGG	178-2	1000	礁溪 24、25 林班
		178-4	800	坪林 40、41 林班
181	ATGACGACGG	181-1	2300	坪林 41 林班
		181-5	700	達仁第 1 稜線
182	GTTCTCGTGT	182-2	2300	礁溪 24 林班、坪林 40、41 林班
		182-7	400	達仁第 1、2 稜線
189	TGCTAGCCTC	189-8	500	坪林 40、41 林班、達仁第 1、2 稜線
195	GATCTCAGCG	195-1	2800	礁溪 24、25 林班、坪林 41 林班
		195-2	2700	礁溪 24、25 林班、坪林 41 林班
		195-8	600	礁溪 24 林班、達仁第 2 稜線
		195-9	500	坪林 41 林班、達仁第 2 稜線
337	TCCCGAACCG	337-1	1800	礁溪 24、25 林班、坪林 41 林班
		337-7	300	大武 30 林班
346	TAGGCGAACG	346-4	1300	礁溪 24、25 林班、坪林 40、41 林班
		346-5	1000	礁溪 25 林班、坪林 40、41 林班
		346-7	300	礁溪 24 林班、坪林 41 林班

RAPD資料的分析

我們將這 17 個逢機引子所產生的 118 個可區分的核酸片段，依據其於洋菜電泳膠上的片段有無以 1 或 0 的方式紀錄於 ASCII 檔案中，接著我們以 NTSYS-pc 電腦軟體分析，先利用 SIMQUAL 的程式計算 111 株台灣油杉與紅豆杉及菸草的 Nei and Li’s 相似性係數（Nei and Li’s similarity coefficients）與 Jaccard’s 相似性係數（Jaccard’s similarity coefficients），並排列出相似矩陣（similarity matrix）（表六），之後再利用 SAHM 計算程式中的 UPGMA 分組方式即能構築出一個親緣樹形圖（phylogenetic tree）（圖八、九），另外由於礁溪台灣油杉自然保護區所惠予提供之第 25 林班之台灣油杉 9 株植株以在送達時呈現腐爛的狀態，所以在分析多形性核酸時另一組資料即將這 9 株植株樣本刪除，計算其餘 104 株植株與紅豆杉及菸草的 Nei and Li’s 相似性係數與 Jaccard’s 相似性係數（表七）構築出一個親緣樹形圖（圖十、十一）。

油杉親緣關係的分析

本實驗RAPD結果所分析的111株台灣油杉與紅豆杉及菸草的Nei and Li’s相似性係數相似性指標的範圍在0.28至0.96之間，根據所得的樹形圖（圖八），可知台灣油杉與菸草之間極不相似。菸草與任何一個台灣油杉植株樣本的相似度均在0.5以下，而

在這111株台灣油杉之間，相似性指標的範圍則分布在0.51至0.96之間，由親源關係樹形圖來看時，可以清楚的將這些油杉分為四大類群 （groups），第一類群 （group A）包含了北部坪林油杉自然保留區文山事業區第40林班，第41林班；礁溪油杉自然保護區宜蘭事業區第24林班，第25林班，其間植物之相似指標在0.91以上，而與其他類群之相似性指標為0.87；第二類群 （group B）包含了南部台東林管區管理處大武台灣油杉自然保護區大武事業區第41林班，其間植物之相似指標在0.84以上，而與其他類群之相似性指標為0.81，此類群中又包含了一亞群為礁溪台灣油杉自然保護區宜蘭事業區第25林班，其間植物之相似指標在0.87以上；第三類群 （group C）包含了台東林管區管理處大武自然保留區大武事業區第30林班，其間植物之相似指標在0.82以上，而與其他類群之相似性指標為0.76；第四類群 （group D）包含了達仁山區第一陵線及第二陵線，其間植物之相似指標在0.67以上，而與其他類群之相似性指標為0.75，其中最不相似的為達第二陵線編號280，其相似性指標為0.51，而台灣油杉與台灣紅豆杉的相似指標為0.42。由親源關係樹形圖中所得到的結果符合了台灣油杉南北不連續分布所造成的基因組上的差異。

這些RAPD標誌，當改用Jaccard’s相似性係數時，得到類似的相似係數值及樹形圖（圖九），相似係數的範圍在0.21至0.92之間，菸草與任何一個台灣油杉植株樣本的相似度亦在0.33以下，而在這111株台灣油杉之間，相似性指標的範圍則分布在0.35至0.92之間，由親源關係樹形圖來看時，可以清楚的將這些油杉分為四大類群，第一類群 （group A） 包含了北部坪林油杉自然保留區文山事業區第40林班，第41林班；

礁溪油杉自然保護區宜蘭事業區第24林班，第25林班，其間植物之相似指標在0.83以上，而與其他類群之相似性指標為0.77；第二類群 （group B） 包含了南部台東林管區管理處大武台灣油杉自然保護區大武事業區第41林班，其間植物之相似指標在0.78以上，而與其他類群之相似性指標為0.73，此類群中又包含了一亞群為礁溪台杉自然保護區宜蘭事業區第25林班，其間植物之相似指標在0.78以上；第三類群 （group C） 包含了台東林管區管理處大武自然保留區大武事業區第30林班，其間植物之相似指標在0.70以上，而與其他類群之相似性指標為0.62；第四類群 （group D） 包含了達仁山區第一稜線及第二陵線，其間植物之相似指標在0.50以上，而與其他類群之相似性指標為0.60，其中最不相似的為達仁第二稜線編號280，其相似性指標為0.35，而台灣油杉與台灣紅豆杉的相似指標為0.27。由親源關係樹形圖中所得到的結果符合了台灣油杉南北不連續分布所造成的基因組上的差異。

由於在實驗的過程中，由礁溪油杉自然保護區所惠予提供之第25林班之台灣油杉9株植株在送達時呈現腐爛的狀態，在分析多形性核酸若是將此9株植株樣本刪除，礁溪油杉自然保護區第25林班的植株樣本數只剩我們從現場攜回的4株，由這些104株植株所得到的樹形圖 （圖十） 來看，台灣油杉的相似指標分布在0.98至0.51之間，其親源關係樹形圖仍分與前述者相同的為四大類群，其相似係數亦相同，所不同者為座落於第二類群之一亞群消失了，而這一亞群即是刪除之樣本，由親源關係樹形圖的結果顯示北部和南部之台灣油杉基因組有所差異。

同樣的當104株植物樣本的這些RAPD標誌，再改用Jaccard’s相似性係數時，得到類似的相似係數值及樹形圖（圖十一），由樹形圖中同樣可看出座落於第二類群之一亞群消失了，而這一亞群即是刪除之樣本，由親源關係樹形圖的結果顯示北部和南部之台灣油杉基因組有所差異。

台灣油杉核糖體核酸序列關係的分析

台灣油杉之核糖體DNA序列分析實驗所得的結果我們目前只得到兩株植株之5.8S rDNA序列部分，為北部坪林油杉自然保留區文山事業區第41林班 （編號41-8及41-9），其序列長度為162核酸序列，這兩個植物的5.8S rDNA完全相同 （圖十二），符合5.8S rDNA在種內是非常保守的序列；

圖十二、台灣油杉 （*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay.） 坪林文山事業區第41林班編號8與9植株5.8S rDNA與木本植物5.8S rDNA序列比對與親源關係樹形圖。

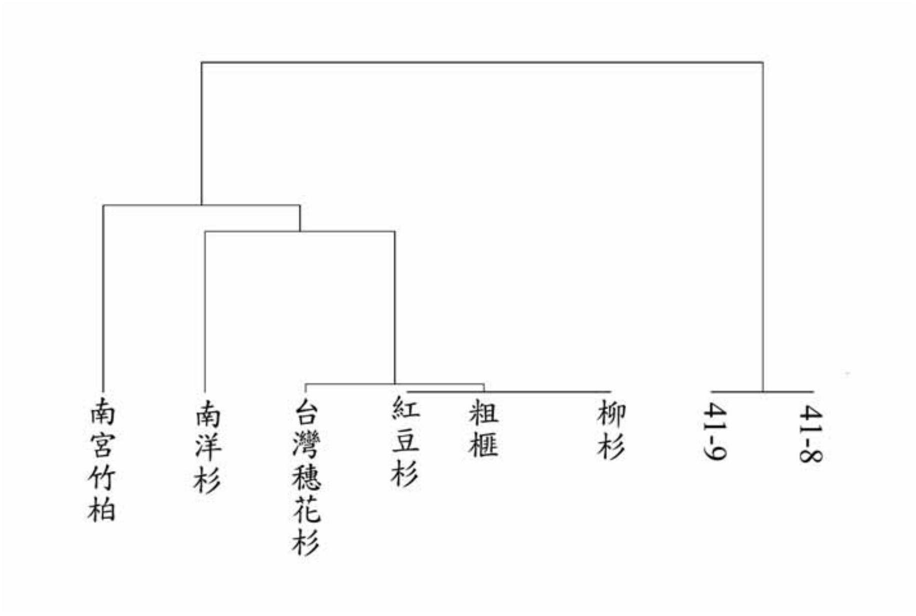
```
              1                                                  50
台灣油杉 41-8 ~~CAACTCT  CAACAACGGA  TATCTTGGCT  CCCGTAACGA  TGAAGAACGC
台灣油杉 41-9 ~~CAACTCT  CAACAACGGA  TATCTTGGCT  CCCGTAACGA  TGAAGAACGC
         柳杉 ACACGACTCT  CGGCAACGGA  TATCTCGGCT  CTCGCCACGA  TGAAGAATGT
         粗榧 ACACGACTCT  CGGCAACGGA  TATCTCGGCT  CTCGCCACGA  TGAAGAATGT
       紅豆杉 ACACGACTCT  CGGCAACGGA  TATCTCGGCT  CTCGCCACGA  TGAAGAATGT
   台灣穗花杉 ACACGACTCT  CGGCAACGGA  TATCTCGGCT  CTCGCCACGA  TGAAGAATGT
       南陽杉 ACGACTCTCT  CAGCAATGGA  TATCTTGGCT  CTCGCCACGA  TGAAGAACGT
     南宮竹柏 ACACGACTCT  CGGCAACGGA  TATCTCGGCT  CTCGCCACGA  TGAAGAACGT

              51                                                100
台灣油杉 41-8 AGCGAAGTGC  GATAAGTAGT  GTGAATTGCA  GATTTCCGTG  AACCATCAAG
台灣油杉 41-9 AGCGAAGTGC  GATAAGTAGT  GTGAATTGCA  GATTTCCGTG  AACCATCAAG
         柳杉 AGCGAAATGC  GATACTTAGT  GTGAATTGCA  GAATCCCGTG  AATCATCGAG
         粗榧 AGCGAAATGC  GATACTTAGT  GTGAATTGCA  GAATCCCGTG  AATCATCGAG
       紅豆杉 AGCGAAATGC  GATACTTAGT  GTGAATTGCA  GAATCCCGTG  AATCATCGAG
   台灣穗花杉 AGCGAAATGC  GATACTTAGT  GTGAATTGCA  GAATCCCGTG  AATCATCGAG
       南陽杉 AGCAAAATAT  GACACTTGGT  GTGAATTGCA  GAATCCCATG  AATCATCGAG
     南宮竹柏 AGCGAAATGC  GATACTTGGT  GTGAATTGCA  GAATCCCGTG  AATCATCGAG

              101                                               150
台灣油杉 41-8 TTTTTGAACG  CAAATTGCGC  TCGAGACCTC  CGGGTCAAGA  GCATGTCTGC
台灣油杉 41-9 TTTTTGAACG  CAAATTGCGC  TCGAGACCTC  CGGGTCAAGA  GCATGTCTGC
         柳杉 TCTTTGAACG  CAAGTTGCGC  CCGAGGCCTC  ..GGCCGAGG  GCACGTCTGC
         粗榧 TCTTTGAACG  CAAGTTGCGC  CCGAGGCCTC  ..GGCCGAGG  GCACGTCTGC
       紅豆杉 TCTTTGAACG  CAAGTTGCGC  CCGAGGCCTC  ..GGCCGAGG  GCACGTCTGC
   台灣穗花杉 TCTTTGAACG  CAAGTTGCGC  CCGAGGCTTC  ..GGCCGAGG  GCACGTCTGC
       南陽杉 TCTTTGAACG  CAACTTGCAC  CCGAGGCTTT  ..GGTTGAGG  GCACGTCTGC
     南宮竹柏 TCTTTGAACG  CAAGTTGCGC  CCGAGGCCCC  ..GGCCGAGG  GCAGCCTGGG

              151
台灣油杉 41-8 CTCAGCGTCG  CTCAT
台灣油杉 41-9 CTCAGCGTCG  CTCAT
         柳杉 TTGGGCGTCG  CAC~~
         粗榧 TTGGGCGTCG  CAC~~
       紅豆杉 TTGGGCGTCG  CAC~~
   台灣穗花杉 TTGGGCGTCG  CAC~~
       南陽杉 CTGGGTGTCG  CAC~~
     南宮竹柏 CGACGCACTT  TCG~~
```

圖十二 （連續）



討論

台灣油杉（*K. davidiana* Beissn. var. *formosana* Hay），已由行政院農委會公告列為珍貴稀有植物，並設立自然保留區加以保護管理。本實驗利用RAPD多形性核酸標誌分析北部河南部兩族群之基因組，所得之親源關係樹形圖，將台灣油杉分成四個類群，解果顯示台灣油杉之族群基因組成與其地理隔絕有關。北部族群座落於第一類群其植株間的相似度較其他三類群高。然而北部樣本數遠比南部少，可能是由於族群的分布面積較小，因此族群相似度高，南部台東林管區管理處大武台灣油杉自然保護區大武事業區即達仁山區的台灣油杉樣本數量較多（總共88株），而且南部大武自然保留區的林相較大，其植株間的相似度稍低於北部者。而由與台灣紅豆杉及菸草的參考基因組互相比較得知台灣油杉與同是杉科的台灣紅豆杉親源關係較近，與草本知菸草的親源關係較遠。雖然南北部的台灣油杉可由親源關係樹形圖分成不同族群，但其相似係數仍非常接近，皆大於0.77，族群的歧異度愈小代表其基因組愈相似，未來能否因應環境的變化而生存？是值得進一步探討的課題。而核酸序列分析所得到的結果僅止於坪林油杉保護區文山事業區第41林班之編號8與9，結果顯示以5.8S rDNA而言，植株兼併無差異。而與南洋杉（*Agathis borneensis*）、台灣穗花杉（*Amentotaxus formosana*）、粗榧（*Cephalotaxus sinensis*）、柳杉（*Cryptomeriia japonica*）、南宮竹柏（*Nageia nagi*）及紅豆杉（*Taxus mairei*）的5.8S rDNA之序列也很相似（圖十二），由樹狀圖的顯示台灣油杉與這些裸子植物之間有差異，而且歧異之發生是最早的。限於時間、植物材料和經費，尚未進行進一步分析ITS序列。

利用RAPD多形性核酸片段標誌分析所得的結果可將台灣油杉南北族群分開來，然而，RAPD標誌也有其限制所在，因為RAPD標誌只能表現顯性標誌（dominant markers），但對於同源染色體（homologous chromosomes）相同基因座上的對偶基因（allele）不能區分其為同型合子（homozygosity）或是異型合子（heterozygosity），解決此限制可以利用定量的方式，從核酸片段上偵測量的改變，若為同型合子記量為1；異型合子記量為1/2（Williams *et al*.,1993），但這種限制對我們在判讀洋菜膠RAPD電泳圖時可將影響減至最小，因為當我們在判讀洋菜膠RAPD電泳圖時會盡量選用明顯的核酸片段作為標誌，若是若隱若現的核酸片段則不予紀錄，除此之外，同樣的逢機引子會進行至少兩次重複的PCR反應，以確定紀錄具有再現性的片段，而且在判讀時也經過兩次重複判讀比對，如此便能排除RAPD標誌的限制，而應用於親源關係的分析上，RAPD已成為遺傳分析上的重要工具。

本實驗係對分布於台灣南北之台灣油杉進行基因分析，其結果將有助於了解台灣油杉種源分布與地域分布之相關性（楊政川和潘富俊，1997），由親源關係樹形圖所得的族群分布結果與台灣油杉長期不連續分布於台灣南北端，受到地理的隔絕的結果相符，未來，對於稀有瀕危植物實應加強保育措施與學術研究，是生物學家急待努力的方向。

參考資料

http://www.forest.gov.tw

http://www.tari.gov.tw/news/

http://www.yam.org.tw/ntu/ntu151.htm

http://www.tfri.gov.tw/nf/news-t/news-t47.htm

http://www.nhri.org.tw

http://www.geocities.com/~earlecj/pi/ke/

http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/splist.pl?6306

金平亮三，1936。台灣樹木誌，台灣總督府中央研究所林業部，51 頁

楊政川和潘富俊，1996。台灣稀有及瀕危植物之分級彩色圖鑑 （I），p.17-18

楊政川和潘富俊，1997。自然保留區經營管理手冊。p.99，p.203

王維洋，1995。分子生物技術於台灣特有及稀有植物遺傳變異研究之應用。自然保育季刊第十一期。

謝惠婷，1998。台東蘇鐵族群生態及遺傳變異之研究。國立台灣師範大學生物研究所碩士論文。

劉思謙和唐立正，1998。礁溪油杉自然保護區動植物調查研究。台灣省農林廳林務局保育研究系列 87-3 號。

Adams, RP, and Turuspekov Y. 1998. Taxonomic reassessment of some Central Asian and Himalayan scale-leaved taxa of *Juniperus (Cupressaceae)* supported by random amplification of polymorphic DNA. *Taxon* 47: 75-83.

Barker RF, Harberd NP, Jarvis MG, and Flavell RB. 1988, Genetics and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In D. Folk and K. E. Holsinger (eds), Genetics and conservation of rare plants, pp.587. Qxford Univ. Press.

Bayer RJ, Puttock CF, and Kelchner SA. 2000. Phylogeny of South African *Gnaphalieae* (*Asteraceae*) based on two noncoding chloroplast sequences. Am J Bot 87: 259-272

Beckmann, JS, and Soller M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement methodologist, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 67: 35-43

D'Ovidio R. 1992, Nucleotide sequence of a 5.8S rDNA gene and of the Australian cycad, *Macrozamia communis* (Zamiaceae). Amer. J. Bot. 77: 677-681

Farjon A. 1989. A second revision of the genus Keteleeria Carrière (Taxonomic notes on Pinaceae II). Notes of the Royal Botanical Garden Edinburgh 46(1):81-99.

Hiroshi A, Leonard BT, and Shoichi K. 1999. Molecular Phylogeny of *Magnolia* (Magnoliaceae) Inferred from cpDNA Sequence and Evolutionary Divergence of the Floral Scents. J. Plant Res. 112: 291-306.

Javier FO, Javier FA, Cesar GC, Arnoldo SG, and Robert KJ. 1999. Internal Transcribed Spacer Sequence Phylogeny of *Crambe L.* (Brassicaceae): Molecular Data Reveal Two Old World Disjunctions. Molecular Phylogenetics and Evolution. 11: 361-380.

Kenneth MC, and Mark WC, 1999. Phylogenetic Relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): An Herbaceous Example of the Eastern North America-Eastern Asia Phytogeographic Disjunction. J. Plant Res. 112: 317-329.

Motomi I, Watanabe K, Kita Y, Kawahara T, DJ Crawforrd DJ, and Yahara T. 2000. Phylogency and Phytogeography of *Eupatorium* (Eupatorieae, Asteraceae): Insights from Sequence Data of the nrDNA ITS Region and cpDNA RFLP. J. Plant Res. 113: 79-89.

Quijada A, Liston A, Dclgado P, Vazquez-Lobo A, and Alvarz-Buylla ER. 1998. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS)region of Pinus rzedowskii revealed by PCR-RFLP. Theor. App;. Genet. 96: 539-544

Rogers SO, and Bendich AJ. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoot RA and Verma DPS. (eds). Plant Molecular Biology Manual A6: 1-10. Kiuwer Academic Publishers, Dordrecht.

Takaiwa, F, Kikuchi S, Oono K, and. Sugiura M. 1985, Nucleotide sequence of the 17-25S spacer region from rice rDNA. Plant Moil. Biol. 4: 355-364

Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, and. Bonierale MW. 1989. RFLP mapping in plant breeding : new tools for an old science. Biotechnology 7:257-264

Tanksley SD. 1983. Molecular markers in plant breeding. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 3-8

Terry RG, Nowak RS, and Tausch RJ. 2000. Genetic variation in chloroplast and nuclear ribosomal DNA in Utah juniper (*Juniperus osteosperma*, *Cupressaceae*): evidence for interspecific gene flow. Am J Bot. 87: 250-258.

Hsu TW, Moore SJ, and Chiang. TY. 2000. Low RAPD polymorphism in *Archangiopteris itoi,* a rare and endemic fern in Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 15-18

Welsh J, and McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213-7218

Williams JGK, Hanafey JA, Rafalski JA, and Tingey SV. 1993. Genetic analysis using random amplified ploymorphic DNA markers. Method Enzymol. 218: 704-740.

Williams, JGK, Kubelik AR, KJ Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

Kim YD, and Kim. SH.1999. Phylogency of Weigela and Diervilla (Caprifoliaceae)Based on Nuclear rDNA ITS Sequences: Biogeographic and Taxonomic Implications. J. Plant Res. 112:331-341.

Suh Y, Heo K, and Park CW. 2000. Phylogenetic Relationships of Maples (Acer L; Aceraceae)Implied by Nuclear Ribosomal ITS Sequences. J.Plant Res. 113: 193-202.

Cheng Y, Robert G. Nicolson,Trripp K,.and Chaw SM. 2000. Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae Genera Inferred from Chloroplast matK Gene and Nuclear rDNA ITS Region. Molecular Phylogenetics and Evolution. 14: 353-365.

Yu YL, and Lin TY. 1997. Construction of Phylogenetic Tree for Nicotiana Species Based on RAPD Markers. J.Plant Res. 110:187-193.