

雪霸國家公園珍貴原生植物之育種研究—

棣慕華鳳仙花物候調查及族群遺傳分子親緣的研究

一、前言

鳳仙花(*Impatiens*)屬於鳳仙花科(*Balsaminaceae*)，種類繁多而且分佈廣泛，主要分布於歐亞大陸高海拔地區，熱帶非洲及馬達加斯加。台灣原生的鳳仙花共有一屬三種，分別為棣慕華鳳仙花(*Impatiens devolii* Hung)、黃花鳳仙花(*Impatiens tayemonii* Hayata)及紫花鳳仙花(*Impatiens uniflora* Hayata)。三者皆為臺灣特有種，其中棣慕華鳳仙花的棲地，在全世界中僅限於雪霸國家公園的觀霧高海拔地區，佔有面積小於 100 平方公里，屬於小而且狹隘分布的族群。根據 IUCN 認定的稀有植物受威脅程度分類標準，將其歸類為易受害(*vulnerable*)，因此棣慕華鳳仙花早已被雪霸國家公園列為第一優先的保育類植物。

雖然棣慕華鳳仙花在生態保育上如此珍貴，但卻缺乏其分子親緣及族群遺傳方面的相關研究。因此無法確定棣慕華鳳仙花和黃花鳳仙花及紫花鳳仙花之間的親緣關係，也不知道棣慕華鳳仙花在雪霸公園觀霧地區是否因地理或其他生物因子而被分隔成許多亞族群，或者會因為族群局限於一個地區，而產生自交或遺傳歧異度減少的現象。

鳳仙花植物花型特殊，是相當不錯的園藝觀花植物，有學者推薦篩選台灣原生種進行推廣，而棣慕華鳳仙花僅分布於雪霸國家公園內幾處狹小範圍，又被視為易受害植物之一，民國 87 年曾估計植群數量僅約 4,000 ~ 6000 之間，對於其族群數量的多寡、分布範圍的增減、物候週期的變化、遺傳基因變異及育苗所需要條件，理應有更進一步的認識，故有此研究計畫的提出。

本研究用分子生物學的方法來探討雪霸國家公園的觀霧地區棣慕華鳳仙花的分子親緣關及其族群遺傳結構。探討棣慕華鳳仙花是否因為侷限於狹小的地理區域使得自交情況嚴重，而喪失了遺傳多樣性。是否有形成亞族群的情況。希望將來可以針對其基因遺傳多樣性來建立更完善的保育計畫，例如保育基因歧異度大及遺傳結構特殊的亞族群，或者可以利用人為方式交配植株來避免自交導致歧異度降低的現象等。

核醣體基因轉錄間隔區(*internal transcribed spacer, ITS*)的 DNA 序列 (Fig. 3)，因為其序列短，複製及分析容易，而且在各物種間變異度大等優點，近年來常被用於鑑定藥材或者比較各物種之間的遺傳歧異度。只要利用聚合酶連鎖反應(*polymerase chain reaction, PCR*)方法即可從少量的樣本中增幅出中 DNA 以做為親緣分析。

Yuan et al (2004)用 ITS 來分析鳳仙花科(*Balsaminaceae*)物種間的親緣

關係。為了便於與他們的結果比較，以及此段基因用聚合酶連鎖反應方法增幅很穩定，本研究仍以ITS片段做為遺傳標誌。由於Yuan et al (2004)的研究中並未使用貝氏分析法(Huelesenbeck et al., 2001, 2002)重建演化樹。而且他們的研究結果顯示棣慕華、黃花紫花鳳仙花的親緣關係很遠。為了確認他們的結果，本研究重新分析用貝氏分析法重新分析Yuan et al (2004)主要分佈於亞洲的鳳仙花。

二、材料與方法

1. 物候週期調查：於觀霧地區選擇棣慕華鳳仙花、黃花鳳仙花、紫花鳳仙花不同生育地，觀察紀錄三種鳳仙花植物於各區、各階段生長的情形。

表 1、台灣產三種鳳仙花型態特徵（資料來源：台灣維管束植物簡誌）

IMPATIENS 鳳仙花屬	
多年生草本植物。葉鋸齒或鈍齒緣，有柄。花單生或總狀；萼片 3，中央者囊狀，形成距；花瓣 3，兩翼瓣常 2-3 裂；雄蕊 5，單體。蒴果細長，受力時快速捲裂而彈出種子。台灣有 3 種。	
台灣鳳仙花種名	辨識特徵
<i>Impatiens devolii</i> Huang 棣慕華鳳仙花	葉橢圓至長橢圓形，長 5 - 14 cm，寬 2 - 5 cm，先端尾尖。總狀花序 3-6 朵花。花冠淡紫紅色(原始描述為黃色)；花距末端不裂；翼瓣 2 裂。特產北部中海拔略陰濕處。
<i>Impatiens tayemonii</i> Hayata 黃花鳳仙花	葉橢圓狀披針形，長 4-10 cm，寬可達 5 cm，先端漸尖。花通常單生葉腋，黃色，裡面帶紅或粉紅色斑點；花距末端 2 裂；翼瓣 2 裂。特產中、北部中高海拔潮濕處。
<i>Impatiens uniflora</i> Hayata 紫花鳳仙花	莖有翼。葉面具剛毛，橢圓至披針狀橢圓形，長 1 - 10 cm，寬 1 -5 cm，先端漸尖或尾尖。花通常單生稀 2 朵腋生；花距末端 2 淺裂；翼瓣通常 3 裂。特產中高海拔潮濕處或小山溝中。

2. 棣慕華鳳仙花自我更新觀察：二月起於野外尋覓可能有鳳仙花小苗發生處，特別注意種子萌發之形態、單位面積的小苗數目及最後開花株數存活成長情形。
3. 棣慕華鳳仙花的族群面積及數量推估。
4. 族群遺傳基因變異情形：
 - (1). 採樣

採樣點為雪霸國家公園附近觀霧一帶(Fig. 1-2)。由於今年雪霸國家許多地區發生山崩，道路中斷因此採樣困難。野外的標本包括採石鹿古道、神木步道、大鹿林道及宜蘭翠峰湖附近的的棣慕華鳳仙花。

表 2 採集樣本點及採集資料。(衛星座標 x=TWD67x, y=TWD67y)

NO	Species	採集地	座標	採集時間
01	<i>Impatiens devolii</i>	宜蘭縣大同鄉翠峰湖	x 303660 y 2710749	2004,7,25
02	<i>Impatiens devolii</i>	臺大梅峯園藝試驗場		2005,4,14
03	<i>Impatiens uniflower</i>	神木步道五指山看板旁		2005,4,22
04	<i>Impatiens devolii</i>	神木步道五指山看板旁		2005,4,22
05	<i>Impatiens devolii</i>	石鹿古道		2005,7,29
06	<i>Impatiens devolii</i>	石鹿古道		2005,7,29
07	<i>Impatiens devolii</i>	石鹿古道		2005,7,29
08	<i>Impatiens devolii</i>	臺大梅峯園藝試驗場網室		2005,8,9
09	<i>Impatiens devolii</i>	臺大梅峯園藝試驗場網室		2005,8,9
10	<i>Impatiens devolii</i>	臺大梅峯園藝試驗場網室		2005,8,9
11	<i>Impatiens devolii</i>	臺大梅峯園藝試驗場網室		2005,8,9
12	<i>Impatiens devolii</i>	臺大梅峯園藝試驗場昆蟲室旁		2005,8,9
13	<i>Impatiens devolii</i>	臺大梅峯園藝試驗場昆蟲室旁		2005,8,9
14	<i>Impatiens devolii</i>	臺大梅峯園藝試驗場燥花坊		2005,8,9
15	<i>Impatiens uniflower</i>	臺大梅峯		2005,8,9
16	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.265273, y.2710439	2005,9,30
17	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.265252, y.2710441	2005,9,30
18	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.265162, y.2710498	2005,9,30
19	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.264293, y.2710071	2005,9,30
20	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.264189, y.2709962	2005,9,30
21	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.264073, y.2709950	2005,9,30
22	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.263594, y.2709694	2005,9,30
23	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.263389, y.2709996	2005,9,30
24	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.263006, y.2710073	2005,9,30
25	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	X.262585, y.2710158	2005,9,30
26	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.262658, y.2710772	2005,9,30
27	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道	x.261354, y.2711106	2005,9,30
28	<i>Impatiens devolii</i>	觀霧		2005,10,14

29	<i>Impatiens devolii</i>	觀霧		2005,10,14
30	<i>Impatiens devolii</i>	觀霧		2005,10,14
31	<i>Impatiens devolii</i>	觀霧		2005,10,14

(2). DNA 萃取

依照 Genomic DNA purification kit (Puregene)方法，將新鮮或者乾燥的棣慕華鳳仙花葉片，剪下長寬約 0.5~1.5cm 大小的葉片，並放入研磨器中搗碎，過程中加入 lysis solution 300 μ l，磨至葉片溶解，將之放到 1.5ml 的離心管中，置於 65 $^{\circ}$ C 加熱器上約 14-16 小時，接著置於冰上 1 分鐘，加入 protein precipitation solution 100 μ l，vortex 20 秒，置於 4 $^{\circ}$ C 冰上 15~60 分鐘，離心 13000 \times g 3 分鐘，加入 isopropanol 400 μ l vortex 均勻，置於冰上 10 分鐘，離心 13000 \times g 5 分鐘，去除上清液，留下 DNA 沉澱，加入 70% ethanol 300 μ l，離心 13000 \times g 5 分鐘，去除上清液，風乾 5 至 10 分鐘去除水氣，最後加入 50 μ l 的 DNA hydration solution，保存於-20 $^{\circ}$ C。

(3). PCR 增幅

選定 5.8S ribosomal RNA gene 中的 internal transcribed spacer (ITS) 為 genetic marker，合成一對 ITS-1, ITS-4 primers (White et al., 1990)。PCR 的主要步驟為，在 100 μ l 的反應中，加入 1 unit 的 *Taq* polymerase，10 μ l 的 buffer，適量的萃取 DNA(Crude DNA)，4 μ l 的 dNTP，及所夾片段兩端的 primer 各 1 μ l，最後加滅菌水至 100 μ l。將配好的溶液置於 PCR machine 中，先 94 $^{\circ}$ C 加熱 4 分鐘，而後熱循環定為 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘，52 $^{\circ}$ C 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 50 秒 共 40 個 cycle，最後於 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘後結束於 4 $^{\circ}$ C。

(4). PCR 產物純化

將 PCR 產物移到新的 1.5ml 離心管，依照 Micro-Elute DNA Clean/Extraction Kit 的方法，加入同體積的 binding solution，重新懸浮 silica matrix 至均勻，並加入 10 μ l silica matrix 到 PCR 產物的混合液中，置在 RT 下 5 分鐘，過程中 vortex 2~3 次，接著離心 13000 \times g 1 分鐘，保留 20 μ l 溶液，去除剩餘上清液，將 spin filter 放到 collection tube，將剛才 20 μ l 的溶液，重新懸浮後加入 spin filter 中心，離心 13000 \times g 1 分鐘，加入 500 μ l wash solution，再離心 1 分鐘，丟掉 flow-through，風乾 spin filter 上的酒精，最後加入 15 μ l Elution solution 到 spin filter，離心 1 分鐘，將離心下去的溶液保存於-20 $^{\circ}$ C。

(5). DNA 定序

純化的 PCR fragment 利用 PCR machine，在 20 μ l 的反應中，加入

0.5 unit 的 *Taq* polymerase，8 μ l 的 Bigdye，適量的純化產物，並加入單方向的 primer 1 μ l，最後加滅菌水至 20 μ l，放入 94 $^{\circ}$ C 4 分鐘後，和 PCR 方法類似的熱循環，96 $^{\circ}$ C 30 秒，50 $^{\circ}$ C 10 秒，55 $^{\circ}$ C 4 分鐘，35 個循環，最後 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘後停於 4 $^{\circ}$ C。在 1.5ml eppendorf 中，加入 95% 的 ethanol 50 μ l，2 μ 的 3M NaOAc (pH 4.6) 以及剛剛的 PCR 產物，混合均勻，置於冰上 20~25 分鐘，離心 13000xg 25 分鐘，去除上清液，加入 250 μ l 的 70% ethanol，vortex 2~3 秒，離心 13000xg 10 分鐘，去除上清液，最後以 speed vacuum 抽乾，存放於 -20 $^{\circ}$ C，等到待測時進一步重新溶解並利用儀器定序。

(6). 資料分析

從 NCBI 將棣慕華鳳仙花 ITS 序列下載，並將紫花及黃花鳳仙花做為外族群，利用軟體 Bioedit 將我們定序的 DNA 及網路上下載的 DNA 做比對及整理。用 Clustal W (Thompson et al., 1994) 軟體排序。配合 DAMBE (Xia and Xie, 2001)、MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) 做出差異度和相似度的比較。用 Modeltest 軟體 (Posada and Crandall, 1998) 選擇符合 DNA 序列最適當的 Model。演化樹用最大似然率 (Maximum likelihood)。我們使用 MrBayes 軟體 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) 及最小演化法 (Minimum evolution)。在族群分析上，使用 Dnasp 軟體 (Rozas and Rozas, 1999)，配合 Network (Bandelt et al., 1995, 1999) 軟體以及 Spectronet (Huber et al., 2002) 軟體做出其族群歧異度比較。

雖然 Yuan et al (2004) 已用 ITS 重建鳳仙花的親緣關係，但是他們並未採用的貝氏分析法重建演化樹。棣慕華、黃花、紫花鳳仙花與其它鳳仙花的關係也未解析。為了進一步驗證他們的結果，我們從 GenBank 下載主要產於亞洲的鳳仙花的 ITS 序列 (表 3)，重新用最大似然率中的貝氏分析法重建演化樹 (Huelsenbeck et al., 2001, 2002)。這是一種新的分析方法，已為重建演化樹最重要的方法之一 (Huelsenbeck et al., 2001, 2002)。

表 3. 鳳仙花 ITS sequences (由 GenBank 下載)

Accession number	Species	Origin
AY348740	<i>I. amphora</i>	W Himalaya
AY348744	<i>I. apsotis</i>	Sichuan, China
AY348745	<i>I. aquatilis</i>	Yunnan, China
AY348750	<i>I. barbata</i>	Yunnan, China
AY348754	<i>I. bicormuta</i>	Yunnan, China
AY348756	<i>I. brachycentra</i>	Central Asia
AY348759	<i>I. capensis</i>	Quebec, Canada
AY348760	<i>I. chimiliensis</i>	Yunnan, China
AY348762	<i>I. chungtienensis</i>	Yunnan, China

AY348767	<i>I. corchorifolia</i>	Yunnan, China
AY348770	<i>I. cyanantha</i>	Yunnan, China
AY348771	<i>I. cyathiflora</i>	Yunnan, China
AY348773	<i>I. delavayi</i>	Yunnan, China
AY348774	<i>I. desmantha</i>	Yunnan, China
AY348775	<i>I. devolii</i>	Taiwan
AY348776	<i>I. drepanophora</i>	Yunnan, China
AY348777	<i>I. eubotrya</i>	Sumatra, Indonesia
AY348778	<i>I. faberi</i>	Sichuan, China
AY348779	<i>I. fenghwaiana</i>	Guangxi, China
AY348782	<i>I. fissicornis</i>	Shaanxi, China
AY348783	<i>I. flanaganae</i>	Africa
AY348784	<i>I. forrestii</i>	Yunnan, China
AY348788	<i>I. glandulifera</i>	Western Himalaya origin
AY348789	<i>I. gongshanensis</i>	Yunnan, China
AY348793	<i>I. holocentra</i>	Yunnan, China
AY348796	<i>I. imbecilla</i>	Sichuan, China
AY348802	<i>I. lecomtei</i>	Yunnan, China
AY34808	<i>I. microcentra</i>	Yunnan, China
AY348813	<i>I. noli-tangere</i>	Jilin, China
AY348816	<i>I. parviflora</i>	Poland
AY348818	<i>I. platychlaena</i>	Sichuan, China
AY348820	<i>I. poculifer</i>	Yunnan, China
AY348821	<i>I. pritzelii</i>	Sichuan, China
AY348823	<i>I. purpurea</i>	Yunnan, China
AY348824	<i>I. radiata</i>	Yunnan, China
AY348825	<i>I. rectangula</i>	Yunnan, China
AY348827	<i>I. rothii</i>	Ethiopia
AY348830	<i>I. scutisepala</i>	Yunnan, China
AY348831	<i>I. siculifer</i>	Yunnan, China
AY348833	<i>I. soulieana</i>	Sichuan, China
AY348838	<i>I. taronensis</i>	Yunnan, China
AY348839	<i>I. tayemonii</i>	Taiwan
AY348840	<i>I. teitensis</i>	Africa origin
AY348841	<i>I. textorii</i>	Japan
AY348845	<i>I. uliginosa</i>	Yunnan, China
AY348846	<i>I. uniflora</i>	Taiwan

三、結果

1. 棣慕華鳳仙花族群分布範圍及數量概估

棣慕華鳳仙花為一年生夏季開花的草本植物，分布區域多於林道、步道或森林開闊處，少數在陰暗之杉木或柳杉林下可見；多發生於陽光充裕、水分充足之生育地。目前已知的棣慕華鳳仙花族群分布的地點有：

I、大鹿林道東線（林道入口至馬達拉溪河口）

由林道入口起至馬達拉溪河口，總長約 20 公里之大鹿林道東線，棣慕華鳳仙花零星分布於林道沿線約 18 公里長，即由林道口至馬達拉溪河口前 2 公里。可斷斷續續地發現有棣慕華鳳仙花的分布，但大多數的鳳仙花族群分布在林道的前段（長約 8 公里）。黃花鳳仙花在此路線有單一之族群，或少數與棣慕華鳳仙花混生，但多分布於馬達拉溪河口附近。本路線是棣慕華鳳仙花主要的分布區域，於民國 87 年估算之棣慕華鳳仙花族群數量約 2,000 株；88 年估算之族群約 500-800 株；今年調查估計約有 2000 株。

II、樂山林道全線

由林道入口起，即可發現成群的黃花鳳仙花及棣慕華鳳仙花，兩族群混生的情形少見。於民國 88 年估算之族群約 500-800 株棣慕華鳳仙花的族群，今年未調查此林道。

III、大鹿林道西線至 3.5Km

棣慕華鳳仙花至大鹿林道西線的分布量少，民國 87 年之調查估計，鳳仙花的族群數量約 300-400 株；但 88 年調查發現數量有下降之趨勢。在本路線，尚可觀察發現有紫花鳳仙花伴生，然數量極少，僅數十株；今年未調查此林道。

IV、神木步道

神木步道入口處即有紫花鳳仙花與黃花鳳仙花之混生族群，在此處的紫花鳳仙花高約 60-80cm；因神木步道較為陰涼潮溼，紫花鳳仙花極少分布於神木步道沿線。黃花鳳仙花的族群較棣慕華鳳仙花為優勢且形成單一族群。棣慕華鳳仙花的族群多發生於陽光及水分較為充足處；少數與黃花鳳仙花混生。於民國 88 年調查估計棣慕華鳳仙花族群數量約 300-500 株；今年調查估計約有 1500 株。

V、大鹿林道

由 122 號縣公路的終點起至大鹿林道 17K 處（海拔高 1,650m），棣慕華鳳仙花零星分布於公路兩側；但以觀霧地區附近的族群數量較多。民國 87 年的調查估計族群數量約 1,000 株，民國 88 年觀察之結果發現，近觀霧遊憩中心附近數量減少甚多。今年由於道路中斷沒有遊客干擾，棣慕華鳳仙花的族群數量調查估計增加了許多約有 2500 株。

VI、北坑溪古道北段

除上述觀霧地區外，在歐辰雄（1996）、李瑞宗（1996）之研究報告指

出，在北坑溪古道北段，鹿山—觀霧一帶之森林潮溼處有棣慕華鳳仙花的分布。今年未調查此林道。

VII、石鹿古道至霞喀羅古道

民國 88 年 9 月，清大生科所郭福麟等人於由新竹縣五峰鄉清泉部落進入，探索石鹿古道至霞喀羅古道（新竹縣尖石鄉）的過程中，發現棣慕華鳳仙花的分布。此地區是棣慕華鳳仙花繼觀霧地區以外的新紀錄分布地點。

今年調查到約有 500 株。

觀霧地區棣慕華鳳仙花之族群今年已調查到的總量約有 6,500 株，呈增長的趨勢。

VIII、翠峰湖有採集紀錄。

IX、台大梅峰農場多年前引進台灣原生三種鳳仙花目前更新良好。

2. 族群遺傳基因變異情形

棣慕華鳳仙花、紫花鳳仙花及黃花鳳仙花其 ITS-1, ITS-2, 5.8S 的 DNA 序列的排序 (alignment) 結果如 Fig. 4 所示。棣慕華鳳仙花共來自 19 株不同個體，其中一株是由 GenBank 下載的 DNA Sequences (NCBI)。經整理、去除不確定的核苷酸及用 ClustalW 軟體排序，棣慕華、黃花及紫花鳳仙花 DNA 排序後總長度為 634 base pairs。其中 1-251 base pairs 的位置為 ITS-1 的序列，252-405 base pairs 的位置為 5.8S rRNA 的序列，253-622 base pairs 的位置為 ITS-2 的序列。623-634 base pairs 的位置為 28S 的部份序列。在 DNA alignment 中，三種鳳仙花的差異處如 7-81 的位置，棣慕華鳳仙花有插入 (DNA insertions) 的現象。434-437 黃花及紫花鳳仙花則有 DNA 插入現象。

由表 4 顯示，棣慕華鳳仙花種內相似度 (identity) 的範圍 (Range) 在 100~97.4% 之間，而遺傳歧異度 (p-distance) 則介於 0 至 1.65% 之間。棣慕華鳳仙花種內遺傳歧異度 (p-distance) 平均為 0.4%。而棣慕華鳳仙花與黃花鳳仙花、紫花鳳仙花的平均遺傳歧異程 (p-distance) 分別為 17.7% 及 15.5% (表 5)。

表 4. Sequence identity matrix 以及 Pairwise genetic distance

	LD1	LD5	LD7	LD16	LD17	LD18	LD19	LD20	LD21	LD22	LD23	LD24	LD25	LD26	LD27	LD29	LD30	LD31	N.I.D	I.T	I.U	
LD1	ID	0.987	0.990	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.992	0.993	0.993	0.995	0.993	0.992	0.995	0.995	0.995	0.977	0.793	0.818	
LD5	0.014	ID	0.990	0.992	0.992	0.992	0.992	0.992	0.992	0.988	0.990	0.990	0.992	0.990	0.988	0.992	0.992	0.992	0.974	0.794	0.815	
LD7	0.010	0.010	ID	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.992	0.993	0.993	0.995	0.993	0.992	0.995	0.995	0.995	0.977	0.793	0.818	
LD16	0.005	0.009	0.005	ID	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	0.998	0.998	1.000	0.998	0.996	1.000	1.000	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD17	0.005	0.009	0.005	0.000	ID	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	0.998	0.998	1.000	0.998	0.996	1.000	1.000	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD18	0.005	0.009	0.005	0.000	0.000	ID	1.000	1.000	1.000	0.996	0.998	0.998	1.000	0.998	0.996	1.000	1.000	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD19	0.005	0.009	0.005	0.000	0.000	0.000	ID	1.000	1.000	0.996	0.998	0.998	1.000	0.998	0.996	1.000	1.000	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD20	0.005	0.009	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	ID	1.000	0.996	0.998	0.998	1.000	0.998	0.996	1.000	1.000	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD21	0.005	0.009	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ID	0.996	0.998	0.998	1.000	0.998	0.996	1.000	1.000	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD22	0.005	0.012	0.009	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	ID	0.995	0.998	0.996	0.998	1.000	0.996	0.996	1.000	0.996	0.979	0.818	
LD23	0.009	0.010	0.007	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	ID	0.996	0.998	0.996	0.995	0.998	0.998	0.998	0.980	0.794	0.819	
LD24	0.007	0.010	0.007	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	ID	0.998	1.000	0.998	0.998	0.998	0.998	0.980	0.794	0.819	
LD25	0.007	0.009	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	ID	0.998	0.996	1.000	1.000	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD26	0.005	0.010	0.007	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.000	0.002	0.002	ID	0.998	0.998	0.998	0.998	0.980	0.794	0.819	
LD27	0.007	0.012	0.009	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.005	0.002	0.003	0.002	ID	0.996	0.996	0.996	0.979	0.796	0.818	
LD29	0.009	0.009	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.002	0.002	0.000	0.002	0.003	0.003	ID	1.000	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD30	0.005	0.009	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.002	0.002	0.000	0.002	0.003	0.000	ID	1.000	0.982	0.796	0.821	
LD31	0.005	0.009	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.002	0.002	0.000	0.002	0.003	0.000	0.000	ID	0.982	0.796	0.821	
N.I.D	0.005	0.016	0.016	0.010	0.010	0.010	0.010	0.100	0.014	0.012	0.012	0.010	0.012	0.014	0.010	0.010	0.010	0.010	ID	0.780	0.804	
I.T	0.184	0.182	0.184	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.182	0.182	0.180	0.182	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.193	ID	0.862
I.U	0.166	0.170	0.166	0.161	0.161	0.161	0.161	0.161	0.161	0.166	0.163	0.164	0.161	0.164	0.166	0.161	0.161	0.161	0.174	0.120	ID	

圖中右上部份為 sequence identity matrix，左下部分為 pairwise genetic distance，I.D 代表 *I.devollii*，N.I.D 代表 NCBI 上下載的 *I.devollii*，I.T 代表 *I.tayemonii*，I.U 代表 *I.uniflora*，I.Y 代表 *I.yingjiangensis*。

表 5 不同採集地棣慕華鳳仙花 ITS-1, 5.8S, ITS-2 的 DNA 序列特徵

Number of sequences	19
Total number of sites (excluding sites with gaps/missing data)	620
Number of polymorphic (segregating) site	19
Total number of singleton mutations	16
Average number of pairwise nucleotide differences	2.433
Haplotypes	8
Haplotypes diversity	0.725
Variance of haplotype diversity	0.01137
Standard deviation of haplotype diversity	0.107
Nucleotide diversity, Pi	0.00392

使用 Modeltest 軟體選出的最適演化模式為 Kimura-two parameter model (K2P)，因此我們用 MrBayes 及 Mega 軟體，以 K2P model 重建演化樹。從結果(Fig. 5)看來，19 株棣慕華鳳仙花構成一個單系群

(monophyly)，而黃花鳳仙花、紫花鳳仙花構成另一個單系群。大鹿林道大部分的樣本 (ID16-21, 25) 都跟觀霧地區的樣本 (29-31) DNA 序列完全相同。而大鹿林道的其它棣慕華鳳仙花標本 (ID22, 24, 26, 27) 則形成一個單系群，但是統計支持度並不高 (0.94/64)。石鹿古道的樣本自己也形成一個單系群，此外宜蘭翠峰湖的樣本也獨自在外，不過統計支持度也並不高。這些棣慕華鳳仙花彼此間的演化距離很短，而且都處在同一個大單系群中，顯示族群差異並不大。

為了更進一步去了解棣慕華鳳仙花個體之間 ITS 序列間可能的演化關係，我們將棣慕華鳳仙花的 DNA 序列以 network 軟體中的 median joining parsimony 作圖，結果如 Fig. 6 所示。其中最大的點由 10 株個體 (I.D15-21、25、29-31) 相同的 haplotype 構成。此 haplotype 包括從大鹿林道與觀霧地區的標本。這個 haplotype 與其它大鹿林道的標本只有二個位點以內的差異，而與來自宜蘭 (I.D1) 及石鹿古道 (I.D5、I.D7) 的標本則有三個位點或以上的差異 (Fig. 6)。

進一步使用 Spectronet 軟體來預測所有可能的變異途徑，結果如 Fig. 7 所示。由圖顯示上可以了解棣慕華鳳仙花群 DNA 變異的可能途徑，從立體骨架上不同的顏色，也可以看出棣慕華鳳仙花族群會全部相連在同一個立體空間上。主要的 haplotype (I.D15-21、25、29-31) 可能是其它如 NCBI、ID7、ID23、ID24-26 等 haplotypes 的祖先型。

由演化樹 (Fig. 8) 結果得知鳳仙花共分為主要的三群：第一群為產於西馬拉亞山的 *I. amhorata*。第二群為主要分佈於中國雲南的鳳仙花包括棣慕華、黃花、紫花鳳仙花。第三群為產於中亞的 *I. brachycentra* 及產於波蘭的 *I. parviflora*。棣慕華鳳仙花與產於雲南的 *I. purpurea* 親緣最近，而與黃花鳳仙花 (*I. tayemonii*) 及紫花鳳仙花 (*I. uniflowra*) 親緣關係很遠。

四、討論

1. 由本計畫野外調查的資料顯示，棣慕華鳳仙花的分布地點有越來越多的趨勢，自我更新良好，族群數量緩慢增加。
2. 在雪霸國家公園的棣慕華鳳仙花，種內仍然存在中度的遺傳變異，但是並沒有分化亞族群的現象。
3. 棣慕華鳳仙花與產於雲南的 *I. purpurea* 親緣最近，而與黃花鳳仙花 (*I. tayemonii*) 及紫花鳳仙花 (*I. uniflowra*) 親緣關係很遠。

本次研究共分析了十九株不同個體的棣慕華鳳仙花。一條 DNA Sequence 由 Genbank 下載而來。由分別相互比對得知共發現有八種不同的 DNA 序列 (haplotypes)，Pi 值是 0.00392，而 singleton mutations 的數目有 16 個。由此推論棣慕華鳳仙花在野外的遺傳歧異度 (多樣性) 仍然很大。自交的情況並不嚴重。

從演化樹可以知道，棣慕華鳳仙花的族群並沒有明顯分群的現象。但是親緣關係跟地理位置確實有關係。如來自石鹿古道的兩株自己形成一群。來自宜蘭縣的標本自己也為一群。由 network 來看這些地區的 haplotype 與最主要的 haplotype (I.D15-21、25、29-31) 差異至少有三個以上，因此隨著距離增加，應該有遺傳歧異度增加的現象。將來若有足夠的樣品，也許可以發現族群分化的現象。

由 Network (Fig. 6) 以 Spectronet (Fig. 7) 的結果推論大鹿林道與觀霧地區棣慕華鳳仙花都具最主要的 haplotype (I.D15-21、25、29-31)。這可能該區域是最古老的 haplotype。其它型式的 haplotype 是由此變異而

來，甚至包括由石鹿古道及 NCBI 的標本。

我們將 Yuan et al. (2004) 的資料重新用他們沒有用的貝氏分析法重新再做一次分析。結果支持 Yuan et al. (2004) 的結果，棣慕華鳳仙花與產於雲南的 *I. purpurea* 親緣關係最近。並且顯示棣慕華鳳仙花很早以前就與紫花與黃花鳳仙花在血緣上分岐了。與 Yuan et al. (2004) 結果略不同的是貝氏分析法解析了紫花鳳仙花 (*I. uniflora*) 與產於雲南的 *I. forrestii* 及產於四川的 *I. faberi* 及 *I. imbecilla* 之間關係。紫花鳳仙花介於 *I. forrestii* 與 *I. faberi* 之間。此外黃花鳳仙花與產於陝西的 *I. fissicornis* 及四川產的 *I. pritzelii* 親緣關係較近。

雖然目前為止，棣慕華的族群看來沒有太大的分化現象，但是種間的變異度卻很大。而如果要再深入研究棣慕華鳳仙花的族群分布以及演化情形，應該有系統的採集更多的野生種樣本來做分析，並加入不同的遺傳標誌 (genetic marker)，重新分析看是否仍然支持目前的研究結果。也要配合實際的生長地理環境，去評估這些結果跟地理環境的關聯性。我們發現不同地理位置會具有不同的 haplotype，因此應避免人為散佈不同地區的棣慕華鳳仙花，以確保該地區的特殊性。若以人工培育的方法，則可以考慮將不同採集地區的棣慕華鳳仙花分開培育。宜蘭翠峰湖附近的棣慕華鳳仙花與石鹿古道的棣慕華鳳仙花與大鹿林道的 haplotype 並不同也可以納入人工培育的範圍。

五、 建議

1. 為保護雪霸國家公園各地區棣慕華鳳仙花的遺傳獨特性，在雪霸國家公園內不要隨意轉植不同地區的棣慕華鳳仙花。
2. 培育棣慕華鳳仙花時，應選擇不同地區的棣慕華鳳仙花做為種原，以保存多樣性。

六、 参考書目

- Antlfinger, A. E. 1989 seed bank, survivorship, and size distribution of a Nebraska population of *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *Amer. J. Bot.* 76(2):222-230.
- Bandelt H.-J., P. Forster, Sykes, B.C. and Richards, M.B. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141: 743-53.
- Bandelt, H.-J., P. Forster, P., and Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Beebe, T and Rowe, G. 2004. *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford Univ. press.
- Hans-Jiirgen, B., Peter, F., and Arne, R. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16(1): 37-48.
- Huber, K. T., Langton, M., Penny, D., Moulton V., and M. Hendy. 2002. Spectronet: A package for computing spectra and median networks. *Applied Bioinformatics* 1: 159-161.
- Huelsenbeck, J. P., Larget, B., Miller, R., and Ronquist, F. 2002. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Syst. Biol.* 51(5): 673-688.
- Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., and Bollback, J.P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*. 294: 2310-2314.
- Kumar S, Tamura K & Nei M 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lento, G.M., Hickson, R.E., Chambers G.K., and Penny, D. 1995. Use of spectral analysis to test hypotheses on the origin of pinnipeds. *Mol. Biol. Evol.* 12(1):28-52.
- Posada D and Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- Rozas, J. and R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Thompson, J.D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thompson, K. and Grime, J. P. 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *J. Ecol.* 67:893-921.
- White, T. J., Bruns, T. Lee, S. and Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp.315-322.

- Xia, X., and Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* **92**: 371-373,
- Yuan, Y.-M., Song, Y., Geuten, K., Rahelivololona, E., Wohlhauser, S., Fischer, E., Smets, E. and Kuepfer, P. 2004. Phylogeny and biogeography of Balsaminaceae inferred from ITS sequences. *Taxon* **53**(2), 391-403.
- 何坤益、呂福原、歐辰雄 1998 薜荔之榕果發育與生殖週期之觀察。國立中興大學實驗林研究彙刊。20(2):27-40
- 李俊偉 1997 雪霸觀霧地區稀有植物黃花鳳仙花及棗慕華鳳仙花繁殖之研究。國立臺灣大學園藝研究所碩士論文。72 頁。
- 林玟娟 1995 臺灣紫花鳳仙花族群遺傳結構。國立臺灣師範大學生物研究所碩士論文。72 頁。
- 柳楡、徐國士 1971 台灣稀有及有絕滅危機之動植物資源。中華林學季刊。4(4):89-96。
- 徐國士、張惠珠 1994 雪霸國家公園特有及稀有植物之研究。中華民國國家公園學會。42 頁。
- 黃生、葉玉英、方采禾 1998 臺灣產三種鳳仙屬植物葉內的類黃素化學分類研究。師大生物學報。23:181-186。
- 劉儒淵 1977 植物物候觀測。台大森林 10:17-31。
- 歐辰雄 1999 棗慕華鳳仙花植群的研究。內政部營建署雪霸國家公園管理處八十八年度研究報告。67 頁。
- 歐辰雄、呂福原 1997 觀霧地區植群生態調查及植栽應用之研究。內政部營建署雪霸國家公園管理處。129 頁。
- 賴明洲 1991 台灣地區植物紅皮書-稀有及瀕危植物種類之認定與保護等級之評定。行政院農業委員會八十年生態研究第 12 號。113 頁。
- 應紹順、黃曜謀 1995 蘇澳地區筆筒樹物候學之研究。台大農學院研究報告 35(4):451-464。

中文網站

1. 工研院生醫中心及經濟部技術處合作之中草藥科技專案相關訊息,
<http://doit.moea.gov.tw/news/newscontent.asp?ListID=0625&TypeID=64&CountID=22&IdxID=1>
2. 台灣維管束植物簡誌, <http://chunchi.nctucis.org/~plantbook/>
3. 特有生物研究保育中心-分子生物研究,
http://www.tesri.gov.tw/content/manager/manager_molecule.asp
4. 雪霸國家公園網站 Shei-Pa National Park, <http://www.spnp.gov.tw/>

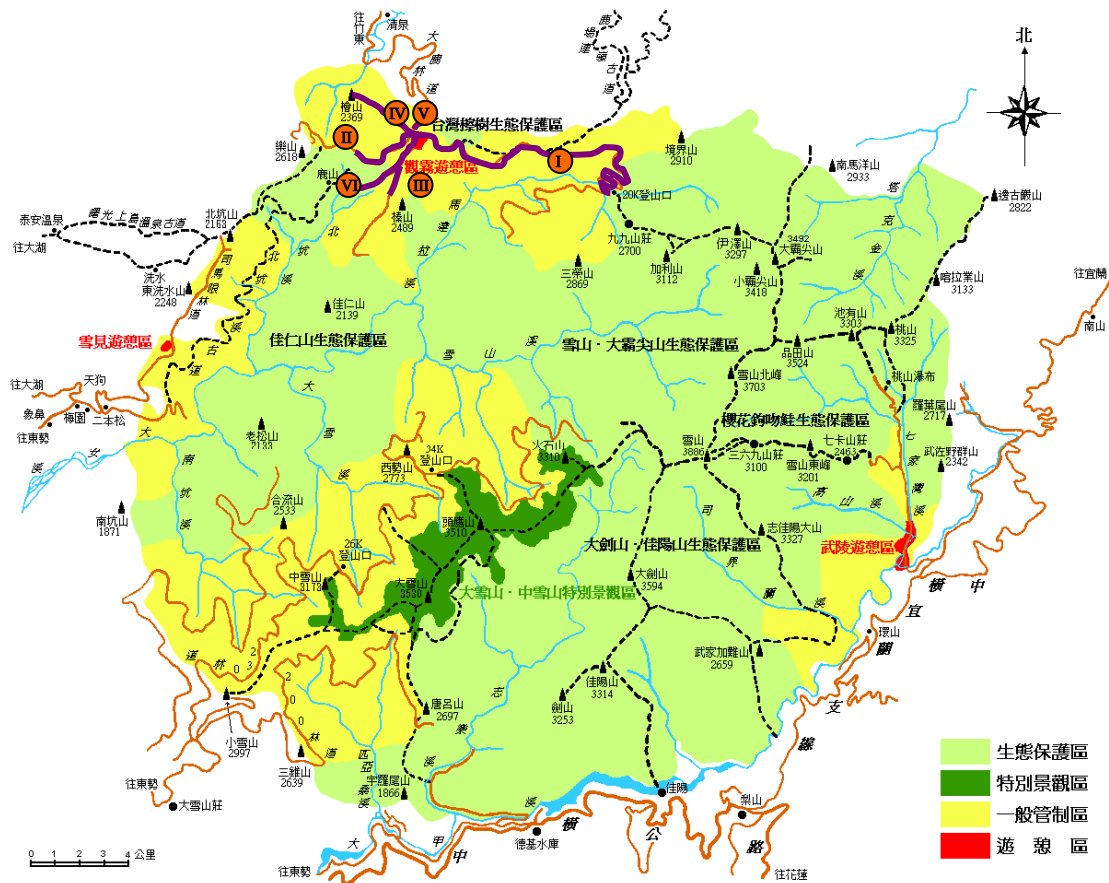


Fig 1 雪霸國家公園內檫木華鳳仙花分布圖

- I、 大鹿林道東線（林道入口至馬達拉溪河口）
- II、 樂山林道全線
- III、 大鹿林道西線至 3.5Km
- IV、 神木步道
- V、 大鹿林道
- VI、 北坑溪古道北段

(圖片來源: 雪霸國家公園網站 Shei-Pa National Park, <http://www.spnp.gov.tw/>)

雪霸國家公園位置圖

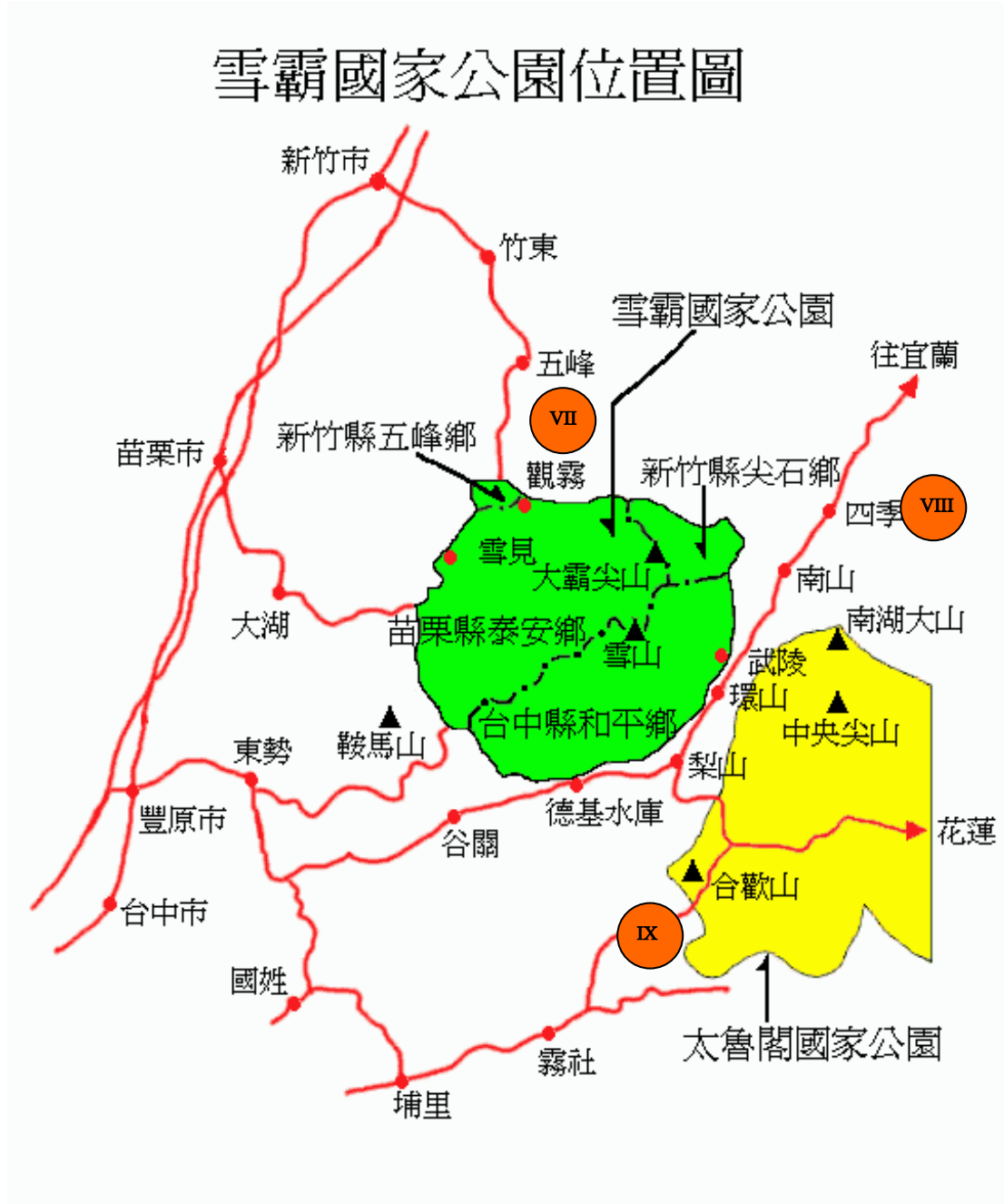


Fig.2 雪霸國家公園範圍外棧慕華鳳仙花分布圖

- VII、 石鹿古道至霞喀羅古道
- VIII、 翠峰湖
- IX、 台大梅峰農場

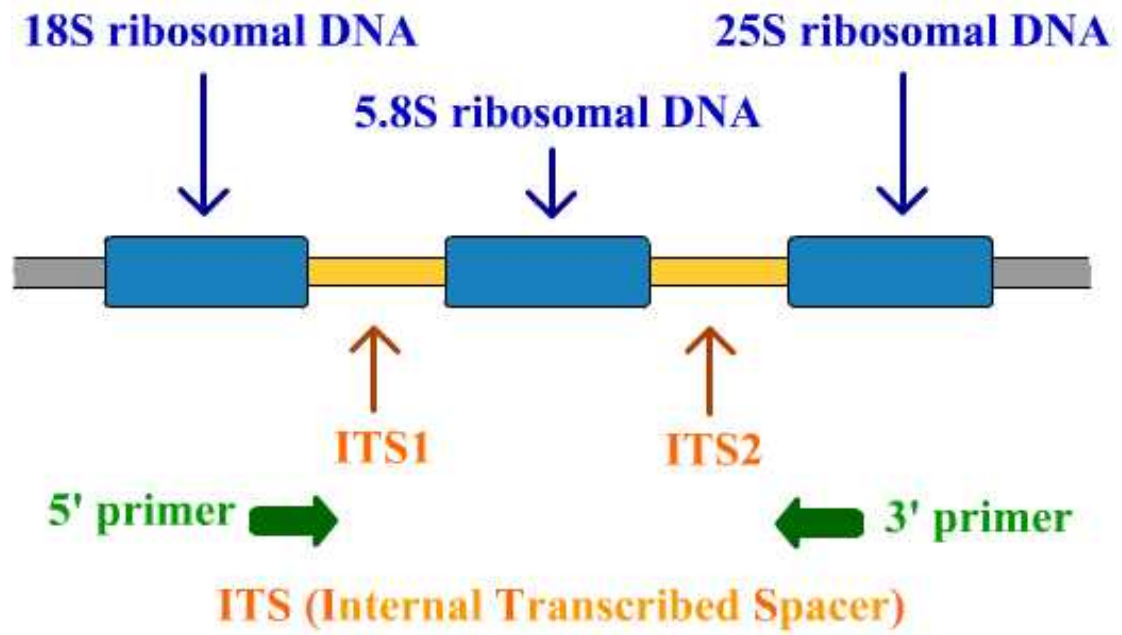


Fig.3 核糖體 rRNA 基因間序列圖

核糖體 rRNA 基因間序列 ITS (internal transcribed spacer) 為 18S ribosome DNA 及 25S ribosome DNA 之間，包含了 ITS-1、5.8S ribosome DNA 以及 ITS-2 的片段。

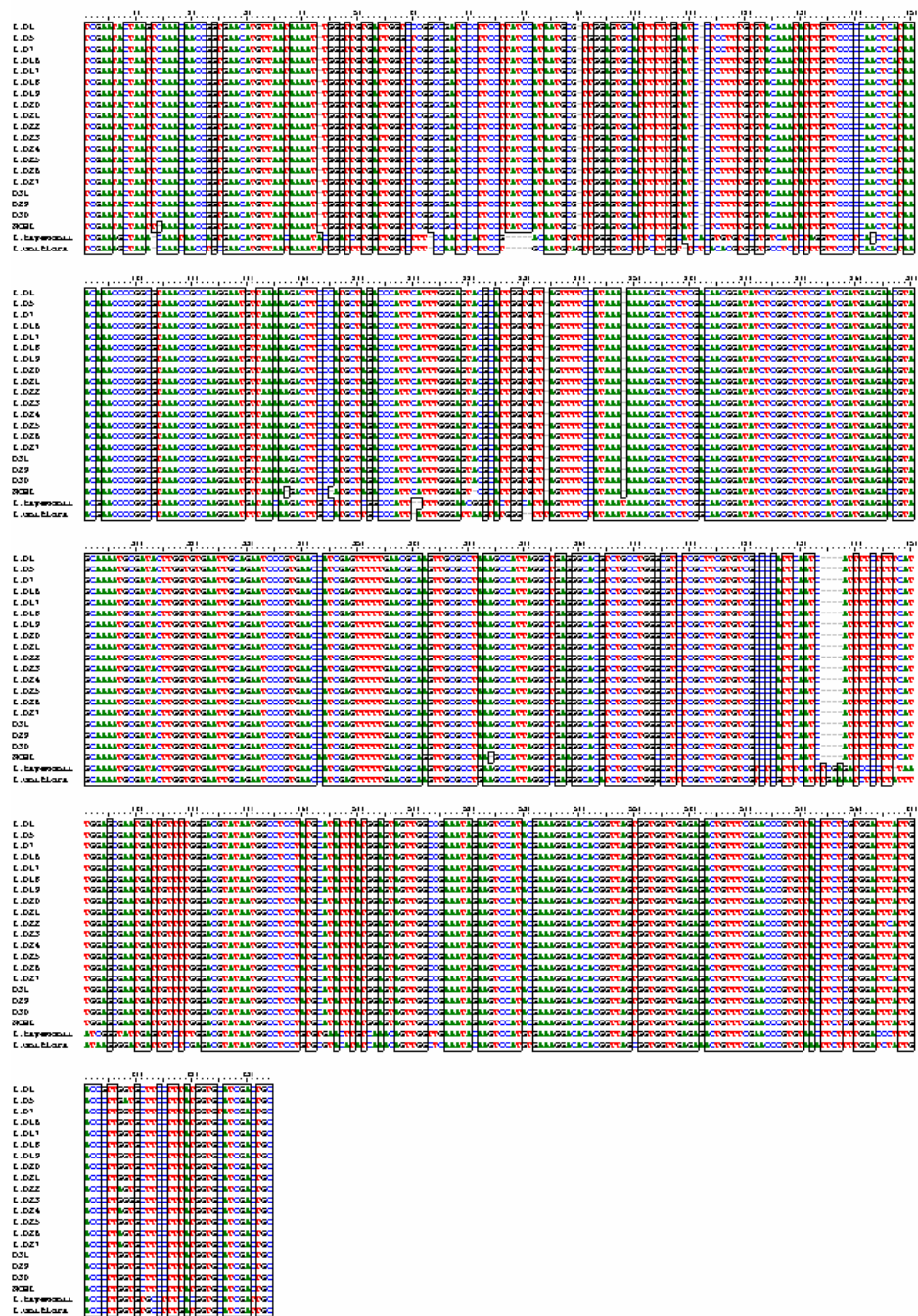


Fig. 4 鳳仙花 DNA 序列圖

本研究鳳仙花的 ITS-1, 5.8S 及 ITS-2 的 DNA 序列。黑線框起來的部分表示序列完全相同。I. D. 為棣慕華鳳仙花 *Impatiens devolii*。

NCBI 指從 GenBank 下載的 DNA 序列。

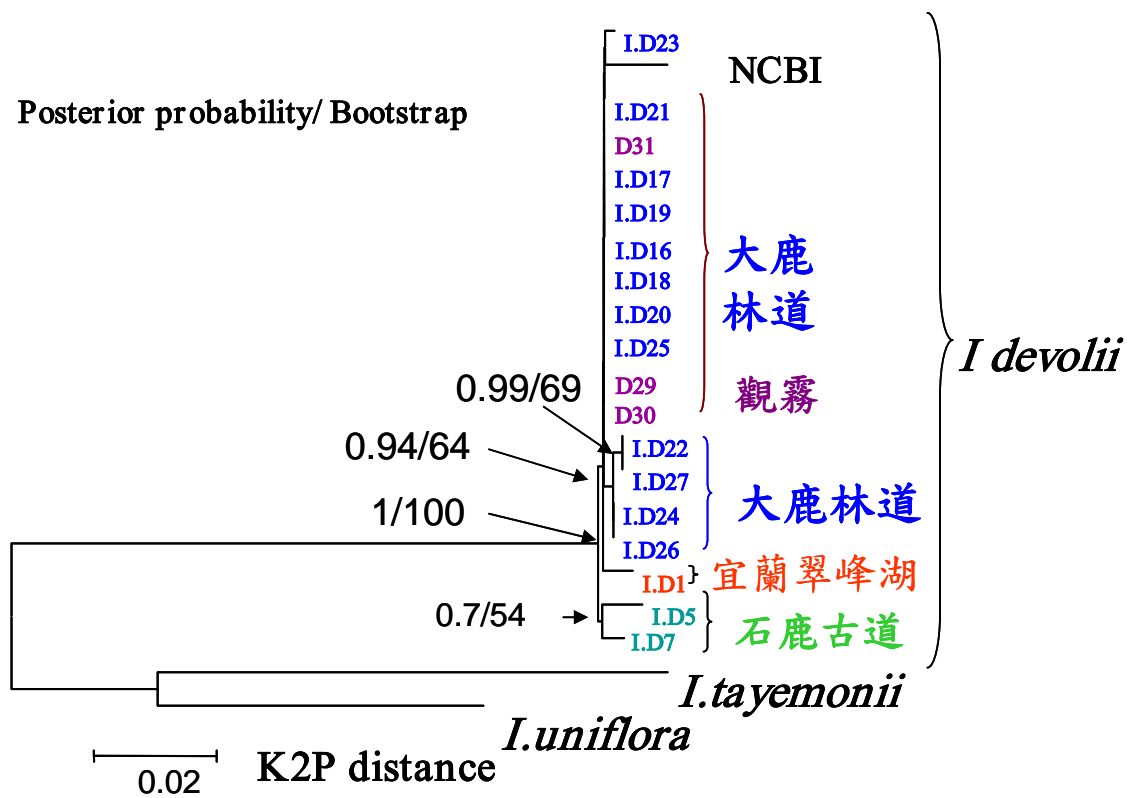


Fig. 5 不同採集地棣慕華鳳仙花的親緣關係圖。
其中 NCBI 係指由 GenBank 下載的 DNA sequence，採集地不詳。

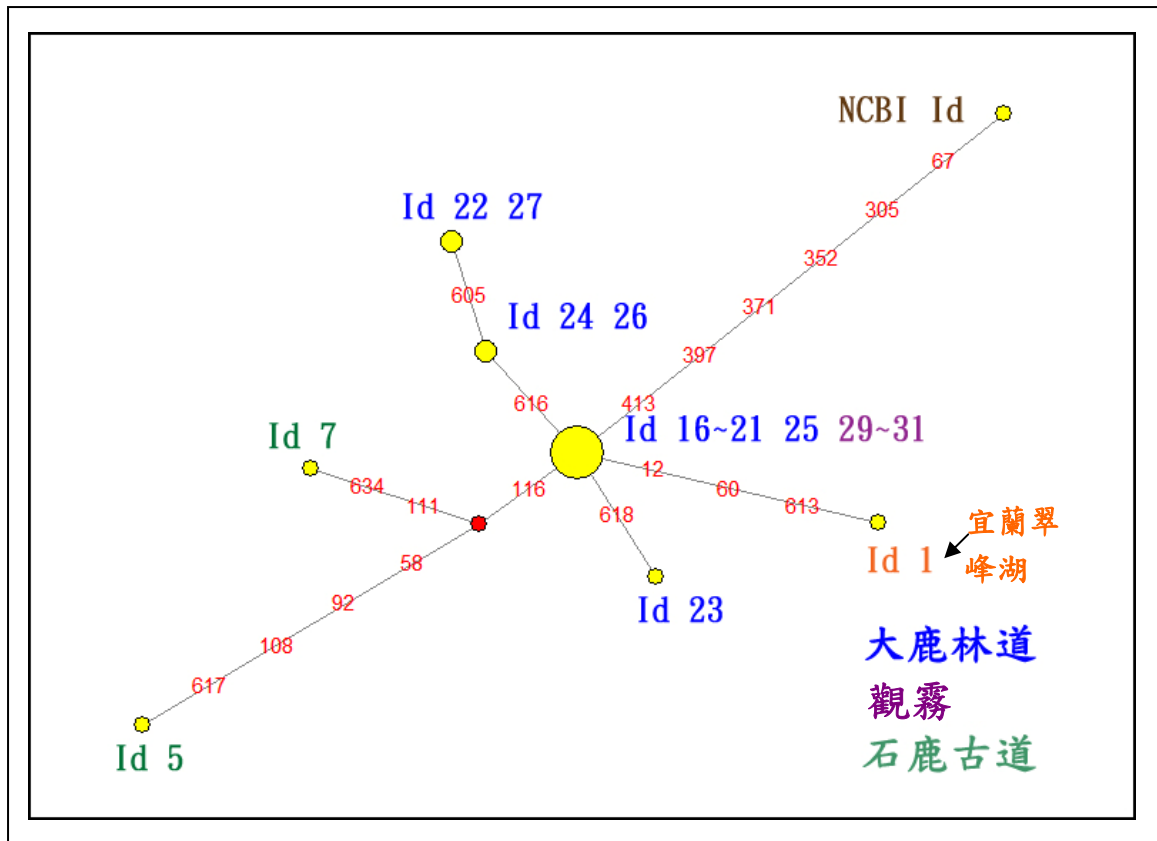


Fig. 6 不同地點採集的棣慕華鳳仙花其 DNA 序列的網狀圖關係圖(Network) 。圖上標示的紅色數字為序列上特定位置核酸的變異，黃色點代表物種，越大代表相同序列的物種越多，紅色點為推算出來的中間型態，NCBI Id 是從 GenBank 下載下來 *Impatiens devolii* 的 DNA 序列。

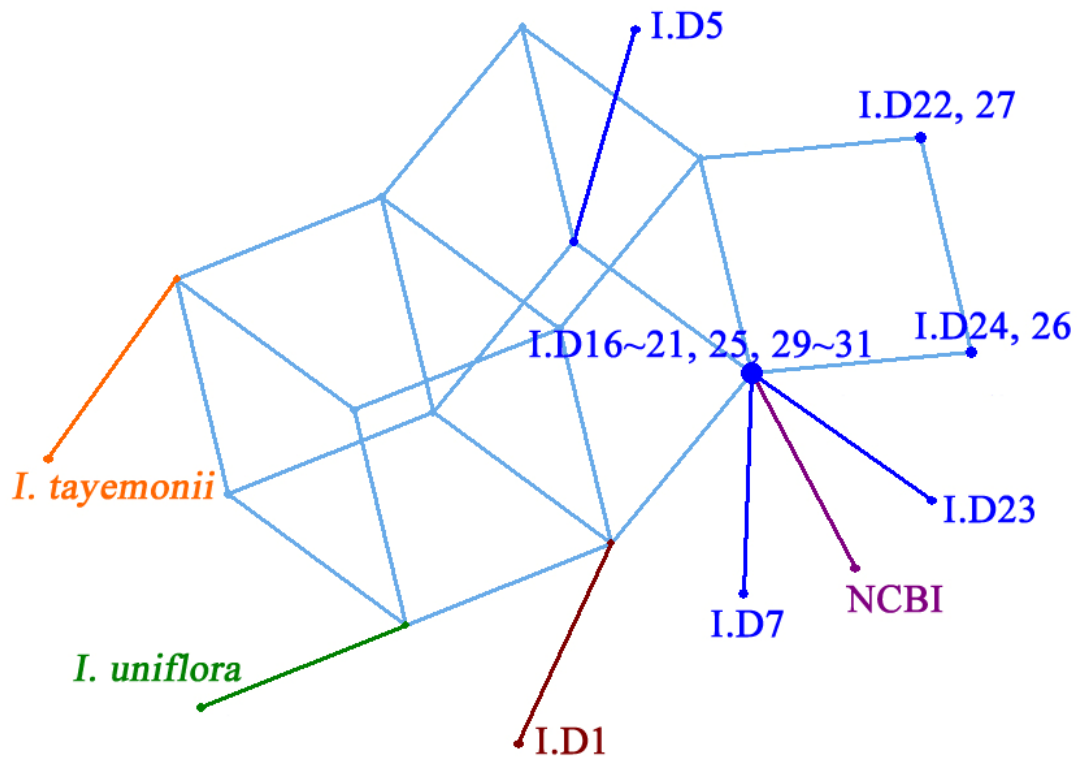


Fig. 7 黃花、紫花及不同採集地的棣慕華鳳仙花的親緣立體網狀圖(spectronet)。



Fig. 8 貝氏分析法 (Bayesian)重建的鳳仙花分子親緣關係圖。
 這些 ITS 的序列是由 GenBank 下載而來。圖中僅包括亞洲產的鳳仙花。部份不完整的 DNA 序列也排除在外。



棣慕華鳳仙花 *Impatiens devolii* Huang



棣慕華鳳仙花 *Impatiens devolii* Huang



黃花鳳仙花 *Impatiens tayemonii* Hayata



黃花鳳仙花 *Impatiens tayemonii* Hayata



紫花鳳仙花 *Impatiens uniflora* Hayata



紫花鳳仙花 *Impatiens uniflora* Hayata



紫花鳳仙花(左)與棣慕華鳳仙花(右)葉片比較



紫花鳳仙花(上)與棣慕華鳳仙花(下)葉緣比較



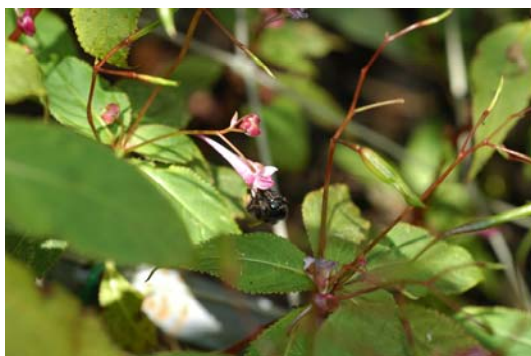
紫花鳳仙花、果



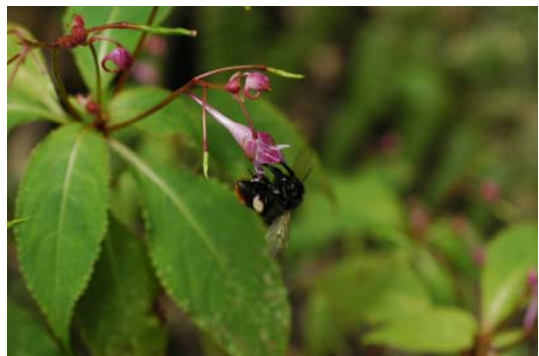
雄蜂為紫花鳳仙花授粉



黃花鳳仙花蒴果



雄蜂為棣慕華鳳仙花授粉



雄蜂為棣慕華鳳仙花授粉



紫花鳳仙花宿存植株



紫花鳳仙花葉表面被毛



棣慕華鳳仙花莖有黑色斑紋



棣慕華鳳仙花蒴果開裂



棣慕華鳳仙花發芽整齊



無初生葉時難以判斷鳳仙花種類



台大梅峰農場路旁棣慕華及黃花鳳仙花族群



石鹿古道林下路旁棣慕華鳳仙花族群



石鹿古道路標旁棣慕華鳳仙花