

雪霸國家公園珍貴原生植物之育種研究

鳳仙花植物復育及族群遺傳分子親緣的研究

一、前言

國家公園成立宗旨在於保存原生動植物生態環境、維護生物多樣性，而特稀有植物不僅是國家公園自然特徵，亦是國人珍貴的資產。復育珍貴之動植物資源為國家公園重點工作之一，考慮各個國家公園氣候區特有之樹種，選擇具有代表地方的特有種，透過育種方式，栽種於國家公園園區內，甚至推廣至全國各都市或者公園綠地，係國家公園未來努力的方向。

鳳仙花屬(*Impatiens*)植物大部分生長在熱帶與亞熱帶地區的高地和山區，全世界超過 900 種。主要分布的五個熱點(hotspots)分別為：熱帶非洲有 109 種、馬達加斯加島 120 種、印度南部及斯里蘭卡 150 種、東南亞 250 種及喜馬拉雅山脈以東 120 種。其他如北半球溫帶地區則種類稀少，南美洲及澳洲沒有原生種。此屬植物的特有種比例高，印度約有 91%、馬達加斯加島的鳳仙花種類也幾乎全為特有種。臺灣原生的鳳仙花共有三種：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)，都是臺灣的特有種植物、分布特殊(紫花鳳仙花為全島中海拔廣泛零星分布、黃花鳳仙花為侷限分布於北部之稀有植物，棣慕華鳳仙花則僅限於雪霸國家公園觀霧高海拔地區之特稀有植物)分類爭議少，皆具觀賞價值。

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，而雪霸國家公園內武陵及雪見二地，不論就海拔高度、自然環境而言，均為復育及推廣栽植台灣原生種鳳仙花植物最佳之處。此外棣慕華鳳仙花由於目前生育地全世界僅限於雪霸國家公園觀霧高海拔地區，根據 IUCN 認定稀有植物受威脅程度分類表標準，可將其歸為易受害(vulnerable)，屬於小而且狹隘分佈的族群，因此對棣慕華鳳仙花族群遺傳變異，理應有更進一步的認識，故有此復育研究計畫的提出。

雖然棣慕華鳳仙花在生態保育上如此珍貴，但其種子屬於短距離傳播，族群的數量少，因此各區族群的遺傳結構易形成隔離分化，目前鳳仙花屬植物研究僅紫花鳳仙花的遺傳結構分析(林玟娟，1995)，其他分子親緣關係及族群遺傳方面的研究尚未完備。因此棣慕華鳳仙花與黃花鳳仙花及紫花鳳仙花彼此間的親緣關係值得進一步研究，是否源自於同一共祖(most recent ancestor)? 隔離分化機制是否早已確立? 在雪霸國家公園觀霧地區的棣慕華鳳仙花，在遺傳上是否因地理分

隔或其他生態因子而已演化出亞族群抑或族群？是否因為族群地區分隔而發生自交(inbreeding)、基因漂變或遺傳多樣(歧異)性減少的現象？

本研究擬以分子生物學的方法，探討棣慕華鳳仙花的與其他鳳仙花的分子親緣關係及其族群遺傳結構。並利用棣慕華鳳仙花與黃花鳳仙花、紫花鳳仙花的分子親緣關係，瞭解臺灣原生的鳳仙花的起源及分化的情形。族群遺傳結構的研究則可以推估棣慕華鳳仙花是否自交情況嚴重，並推估牠們在雪霸國家公園的散佈(dispersal)方式。針對其基因歧異性我們可以訂立更詳細的保育計劃，例如保育遺傳結構特殊的亞族群，保育基因歧異性大的亞族群及以人為方式交配植株，以避免自交及歧異性降低的情形等。

核糖體基因轉錄間隔區(internal transcribed spacer, ITS)的 DNA 序列(Fig. 2)，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. 棣慕華鳳仙花的族群分布：

目前已知的棣慕華鳳仙花族群分布的地點(Fig. 1-2)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，

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。

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，在本路線，尚可觀察發現有紫花鳳仙花伴生，然數量極少。

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。

V、122 號縣公路

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。

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。

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。

VIII、翠峰湖有採集紀錄。

IX、台大梅峰農場多年前自觀霧地區引進台灣原生三種鳳仙花目前更新良好

2. 鳳仙花植物之育苗復育：

由於臺灣原生的三種鳳仙花其生活史都只有短短的一年，其中棣慕華鳳仙花與黃花鳳仙花又屬於狹隘分佈的特稀有與稀有植物。倘若某年的結實量銳減，或因病蟲、氣候、人為等因素危害以致族群量減少，則族群數量可能會急速下降；若不加以保護，經惡性循環的結果，棣慕華鳳仙花極有可能會絕滅、而黃花鳳仙花亦可能遭受嚴峻地生存考驗。

因此若欲進行鳳仙花植物之保育工作，除生育地之保護外，大量增殖新個體進行移地保育應是另一可行之道。

本研究計畫於雪霸國家公園內武陵地區及雪見地區，進行臺灣原生的三種鳳仙花

野外復育區之設置。

復育區的選定 於雪霸國家公園行政區域內，遊容易到之處與野外生育環境相似之處。武陵地區選定台灣鮭魚生態中心周遭。雪見地區選定於遊客中心前的道路旁。

苗木培育 委託臺大梅峰農場，採集該場內自觀霧地區引種的原生三種鳳仙花小苗，於穴植盤中撫育約 40 天。

黃花鳳仙花因植株較少，有部分為扦插苗。

苗木數量 黃花鳳仙花 1500 株、棣慕華鳳仙花 2000 株、紫花鳳仙花 3000 株。

栽種方式 單株 及 成叢。

3. 族群遺傳基因變異：

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，本研究以 ITS 片段做為遺傳標誌

(1). 採樣

棣慕華鳳仙花、黃花鳳仙花及紫花鳳仙花採樣點主要為雪霸國家公園附近觀霧一帶。紫花鳳仙花的標本亦包括嘉義縣阿里山、南投縣杉林溪及嶺頭山附近。

表 1、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>	樂山林道	x.260484 y.2711092	2006.08.30
02	<i>Impatiens devolii</i>	觀霧山莊	x.260821 y.2711122	2006.08.30
03	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道西線	x.260616 y.2710984	2006.08.30
04	<i>Impatiens devolii</i>	神木步道入口	x.260405 y.2710927	2006.08.30
05	<i>Impatiens devolii</i>	神木步道	x.259867 y.2710893	2006.08.30
06	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道東線	x.261443 y.2711100	2006.08.30
07	<i>Impatiens devolii</i>	大鹿林道東線	x.261134 y.2711179	2006.08.30

08	<i>Impatiens devolii</i>	雪霸農場	x.260736 y.2713755	2006.08.30
09	<i>Impatiens tayemonii</i>	神木步道入口	x.260405 y.2710927	2006.08.30
10	<i>Impatiens tayemonii</i>	神木步道	x.259867 y.2710893	2006.08.30
11	<i>Impatiens uniflora</i>	神木步道入口	x.260405 y.2710927	2006.08.30
12	<i>Impatiens uniflora</i>	嘉義縣阿里山	x. y.	2006.09.25
13	<i>Impatiens uniflora</i>	南投縣杉林溪	x. y.	2006.10. 01
14	<i>Impatiens uniflora</i>	南投縣嶺頭山	x. y.	2006.10. 01

(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 1 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

20µl 的溶液，重新懸浮後加入 spin filter 中心，離心 13000xg 1 分鐘，加入 500µl wash solution，再離心 1 分鐘，丟掉 flow-through，風乾 spin filter 上的酒精，最後加入 15µl Elution solution 到 spin filter，離心 1 分鐘，將離心下去的溶液保存於-20°C。

(5). DNA 定序

純化的 PCR fragment 利用 PCR machine，在 20µl 的反應中，加入 0.5 unit 的 *Taq* polymerase，8µl 的 Bigdye，適量的純化產物，並加入單方向的 primer 1µl，最後加滅菌水至 20µl，放入 94°C 4 分鐘後，和 PCR 方法類似的熱循環，96°C 30 秒，50°C 10 秒，55°C 4 分鐘，35 個循環，最後 72°C 10 分鐘後停於 4°C。在 1.5ml eppendorf 中，加入 95% 的 ethanol 50µl，2µ 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 250µl 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°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。了進一步驗證他們的結果，我們們從 GenBank 下載主要產於亞洲的鳳仙花的 ITS 序列 (表 2)，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 2、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. bicornuta</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. 隸慕華鳳仙花的族群分布未發現新的分布地點。

2. 鳳仙花植物之育苗復育結果

出栽時間 5 月 23 日雪見地區栽種黃花鳳仙花 1500 株及隸慕華鳳仙花 2000 株。

6 月 6 日武陵地區栽種紫花鳳仙花 3000 株。

成活情形 7 月 22 日調查武陵台灣鮭魚生態中心周遭所植紫花鳳仙花全部成活且生長良好。

8 月 17 日調查雪見地區黃花及隸慕華鳳仙花兩種鳳仙花生長良好。

另培育三種鳳仙花的盆苗置於本處及武陵遊客服務中心，以利民眾認識。

3. DNA 序列資料與分析結果

經由直接定序 PCR 產物的兩端並進行人工判別，所有的研究材料之序列均能正確無誤地判別。為確定所研究之 DNA 序列是否具個體或族群間的明顯差異，因此每個採集點採集 3 個植株進行序列檢測，發現均無差異，故下述分子序列之研究均以單一個體的資料作為代表。

如 Fig. 4-6 所示，隸慕華鳳仙花之 ITS DNA 序列 G+C 比值為 45%，黃花鳳仙花 G+C 比值為 48%，紫花鳳仙花 G+C 比值為 44%，其排序 (alignment) 結果如 Fig. 7 所示。經整理、去除不確定的核苷酸及用 ClustalW 軟體排序，隸慕華、黃花及紫花鳳仙花 DNA 排序後總長度為 625 base pairs。

其中 1-239 base pairs 的位置為 ITS-1 的序列，240-402 base pairs 的位置為 5.8S rRNA 的序列，403-625 base pairs 的位置為 ITS-2 的序列。在 DNA 序列排序中，三種鳳仙花的差異處，如 76-80 base pairs 的位置隸慕華鳳仙花有插入(DNA insertions)的現象。423-426 base pairs 黃花及紫花鳳仙花則有 DNA 插入現象。

由表 3 顯示，隸慕華鳳仙花種內相似度(identity)的範圍(Range)在 100~98.2%之間，黃花鳳仙花種內相似度的範圍在 100~99%之間，紫花鳳仙花種內相似度的範圍在 100~99%之間。而隸慕華鳳仙花與黃花鳳仙花、紫花鳳仙花的平均遺傳歧異度(p-distance)分別為 19%及 17%。

表 3、Sequence identity matrix

Seq->	Id-1	Id-2	Id-3	Id-4	Id-5	Id-6	Id-7	Id-8	Id-NCBI	It-9	It-10	It-NCBI	Iu-11	Iu-12	Iu-13	Iu-14	Iu-NCBI
Id-1	ID	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.982	0.807	0.807	0.801	0.826	0.827	0.827	0.827	0.824
Id-2	1.000	ID	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.982	0.807	0.807	0.801	0.826	0.827	0.827	0.827	0.824
Id-3	1.000	1.000	ID	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.982	0.807	0.807	0.801	0.826	0.827	0.827	0.827	0.824
Id-4	1.000	1.000	1.000	ID	1.000	1.000	1.000	1.000	0.982	0.807	0.807	0.801	0.826	0.827	0.827	0.827	0.824
Id-5	1.000	1.000	1.000	1.000	ID	1.000	1.000	1.000	0.982	0.807	0.807	0.801	0.826	0.827	0.827	0.827	0.824
Id-6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	ID	1.000	1.000	0.982	0.807	0.807	0.801	0.826	0.827	0.827	0.827	0.824
Id-7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	ID	1.000	0.982	0.807	0.807	0.801	0.826	0.827	0.827	0.827	0.824
Id-8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	ID	0.982	0.807	0.807	0.801	0.826	0.827	0.827	0.827	0.824
Id-NCBI	0.982	0.982	0.982	0.982	0.982	0.982	0.982	0.982	ID	0.794	0.794	0.788	0.811	0.813	0.813	0.813	0.810
It-9	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.794	ID	1.000	0.990	0.862	0.867	0.867	0.867	0.862
It-10	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.794	1.000	ID	0.990	0.862	0.867	0.867	0.867	0.862
It-NCBI	0.801	0.801	0.801	0.801	0.801	0.801	0.801	0.801	0.788	0.990	0.990	ID	0.859	0.864	0.864	0.864	0.859
Iu-11	0.826	0.826	0.826	0.826	0.826	0.826	0.826	0.826	0.811	0.862	0.862	0.859	ID	0.995	0.995	0.995	0.991
Iu-12	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.813	0.867	0.867	0.864	0.995	ID	1.000	1.000	0.990
Iu-13	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.813	0.867	0.867	0.864	0.995	1.000	ID	1.000	0.990
Iu-14	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.827	0.813	0.867	0.867	0.864	0.995	1.000	1.000	ID	0.990
Iu-NCBI	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824	0.810	0.862	0.862	0.859	0.991	0.990	0.990	0.990	ID

表中數字部份為 sequence identity matrix，Id 代表隸慕華鳳仙花，It 代表黃花鳳仙花 *I. tayemonii*，Iu 代表紫花鳳仙花 *I. uniflora*，-NCBI 代表由 GenBank 下載的鳳仙花序列。

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 Mega 軟體，以 K2P model 重建演化樹。從結果(Fig. 8)看來，隸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。觀霧地區 8 個隸慕華鳳仙花採集點的樣本 DNA 序列完全相同，顯示這些隸慕華鳳仙花族群彼此間的演化距離很短，族群間無差異性。黃花鳳仙花在觀霧地區 2 個採集點的樣本 DNA 序列亦無差異性。至於紫花鳳仙花在觀霧地區的族群與中南部地區(嶺頭山、杉林溪及阿里山)族群的序列有三個位點的差異。

由演化樹(Fig. 9)結果得知亞洲的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隸慕華、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*。隸慕華鳳仙花與產於雲南的 *I. purpurea* 親緣最近，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

本研究計畫於雪霸國家公園內武陵地區及雪見地區，進行臺灣原生的三種鳳仙花野外復育區之設置。栽種復育結果，原生的鳳仙花種類於武陵及雪見地區生長良好，可利用為觀賞及生態解說的材料。因此鳳仙花植物之保育工作，除生育地之保護外，大量增殖新個體進行移地保育應是另一可行之道。

鳳仙花親緣關係方面，本次研究共分析了 25 株不同個體的隸慕華鳳仙花，其中有 24 株來自觀霧地區的 8 個採集點，另外一條 DNA Sequence 由 Genbank 下載而來。由相互比對結果，推測觀霧地區的隸慕華鳳仙花族群，其遺傳歧異度可能很小，以致於所採集之材料研究結果均無變異性；與 Genbank 下載的隸慕華鳳仙花 DNA Sequence 比對結果，變異位置(variable sites) 的數目有 6 個，但不知該份樣本來自何處，與我們這次在觀霧地區的採集樣本，在 ITS DNA 序列上有這樣差異性存在。若比對結果確實反映出野外族群的差異性，則隸慕華鳳仙花在野外的遺傳歧異度(多樣性)仍然很大；觀霧地區的隸慕華鳳仙花族群是否可視為同一族群，則需更多樣本數佐證，才能作較明確之判斷。。

至於黃花鳳仙花在觀霧地區的 2 個採集點，其 DNA 序列亦皆相同，顯示其分化程度可能很小，與北部其他分佈地的遺傳歧異度為何？亦需採集更多的樣本來做分析，才能作較明確之判斷。

紫花鳳仙花方面，在觀霧地區的族群與中南部地區(嶺頭山、杉林溪及阿里山)族群的序列有三個位點的差異，推測其遺傳歧異度可能已有地域之分化。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。

此外，從演化樹可以知道，台灣這3種特有之鳳仙花，棣慕華鳳仙花、黃花鳳仙花及紫花鳳仙花的親緣關係距離很遠，因此以 ITS 片段作為鳳仙花之遺傳標誌，可以很明確區分物種間的親緣關係。

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歧了。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，台灣3種特有種鳳仙花在族群內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其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。我們在紫花鳳仙花的研究結果，發現不同地理位置會具有不同的 haplotype，因此從此觀點來看，為確保該地區鳳仙花基因庫的特殊性，若以人工培育的方法，則可以考慮將不同採集地區的鳳仙花分開培育。

五、建議事項

- 1.鑑於園藝上大量利用外來鳳仙花種類美化環境，對園區內台灣原生的鳳仙花種類應加強介紹給民眾認識。
- 2.各管理站的環境綠美化植物可多利用園區內的特色代表物種。
- 3.可設置簡易的生態展示區呈現園區特有的生物資源以達教育解說的目的。

六、參考書目

- 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棣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。
- 柳楹、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 棣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/>

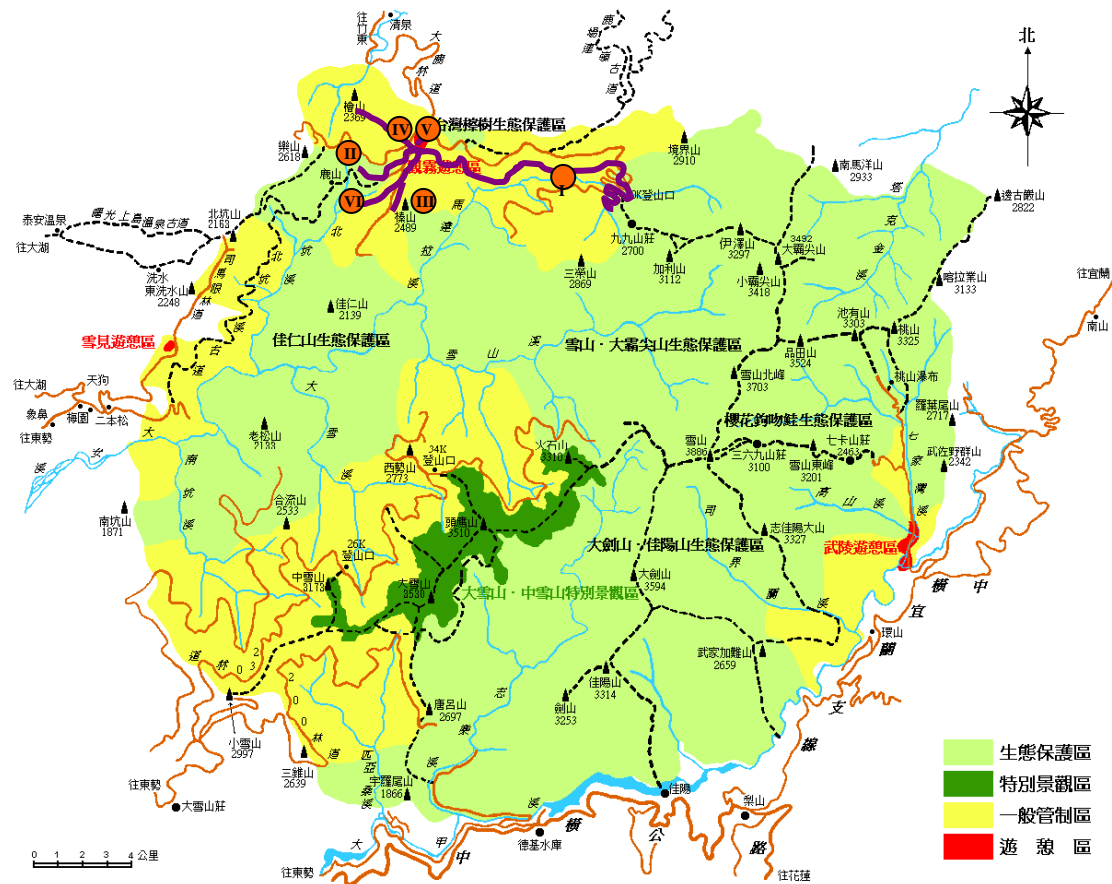


Fig. 1 雪霸國家公園範圍內棣慕華鳳仙花分布圖

- 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、 122 號縣公路
- 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

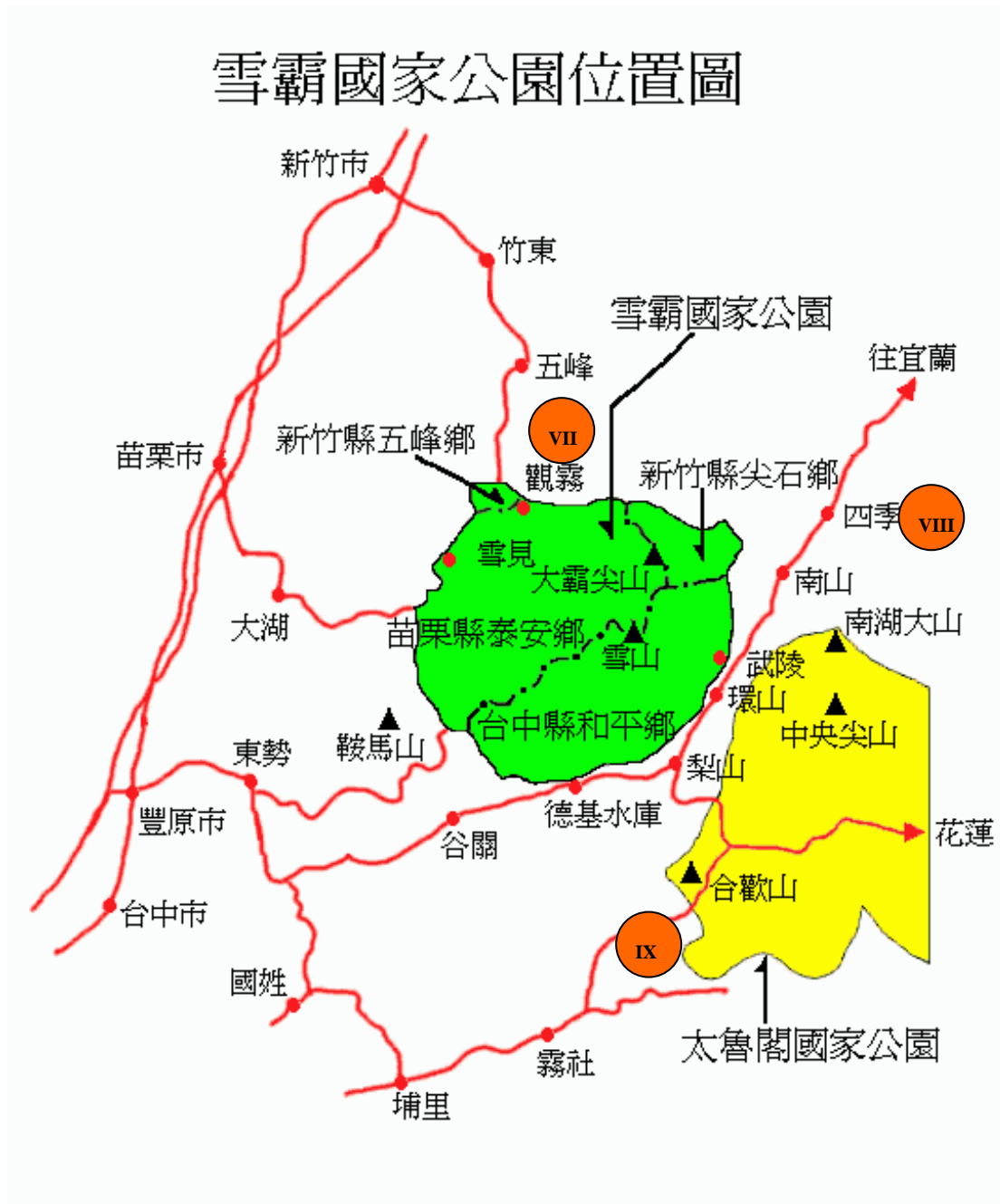


Fig. 2 雪霸國家公園範圍外棧慕華鳳仙花分布圖

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

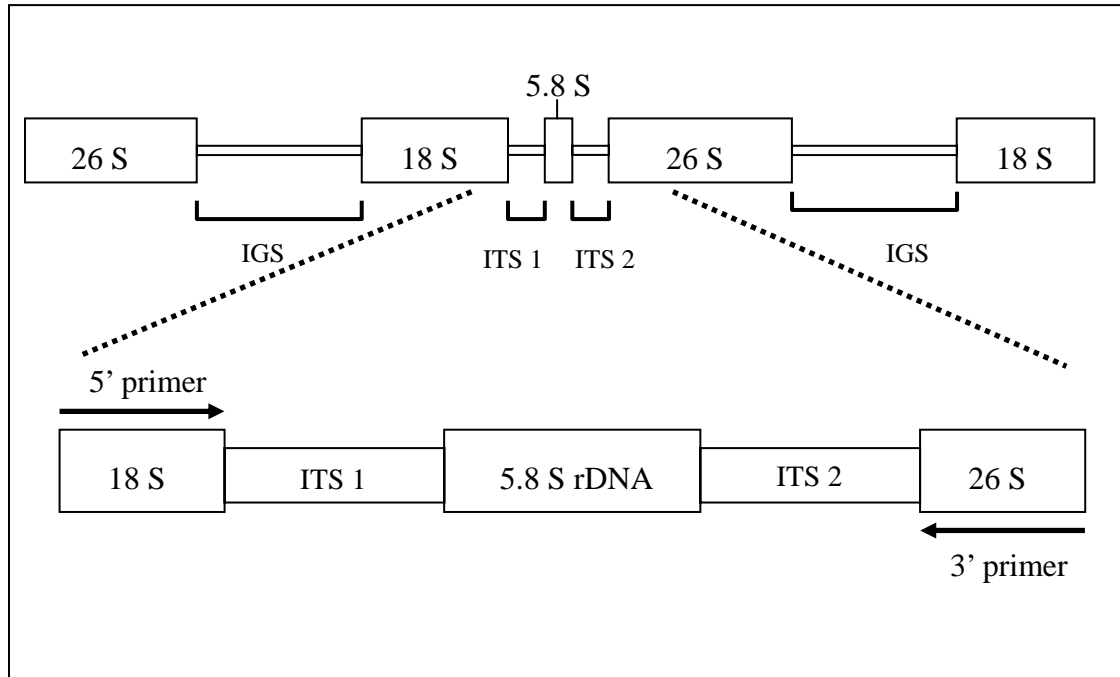


Fig. 3 核糖體 rRNA 基因間序列 ITS (internal transcribed spacer) 為 18S ribosome DNA 及 26S ribosome DNA 之間，包含了 ITS-1、5.8S ribosome DNA 以及 ITS-2 的片段。

SEQ Unknown: 625 bp;

Composition 157 A; 138 C; 141 G; 189 T; 0 OTHER

Percentage: 25% A; 22% C; 23% G; 30% T; 0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 192.87 dsDNA: 385.3

ORIGIN

```
1      TCGAATACTA ATTCAAACAA CCGGTGAACA TGTTAATAAA ATTGGGTTGT GATTGGTCTC
61     GGCCGATCCC TTCCTTATCC ATAATGCGTT GGAGTGCATT TTTTGTATCC TCTTTTGTGT
121    ACAAATATTT GTTCCCCCAA CTCATAAACA AACCCCGGCG TAAACCGCCA AGGAATGTTA
181    AAAAGACTTC CCATGCTAGA CCCATTCAAT TGGGAGTACG CATTGGTGTT AGTTTTCCAT
241    AAAAAAACGA CTCTCGACAA CGGATATCTC GGCTCTCGCA TCGATGAAGA ACGTAGCAAA
301    ATGCGATACT TGGTGTGAAT TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTTTTTG AACGCAAGTT
361    GCGCCTAAAG CCATTAGGCT GAGGGCACGT CTGCCTGGGC GTCTCGCTTC GTGTCGCCCC
421    ATTCAATCAT TTTCTTTTCA TTGGAGCGAA TGATTGTTTT GGGACGTATA ATGGCCTCCT
481    ATGCATATTT ATGGAGTAGT TGGCCGAAAT AGAAGTCCAT ACGAAAGGAC ACACGGTTAG
541    TGGTGGTTGA GAGACTGTTT CGAACCCGTG TTA CTCTCTCG TGGATTTATT GACCCTTGGT
601    GCTTCCTTTA TGGTGCATCG ACTGC
```

Fig. 4 棣慕華鳳仙花(*Impatiens devolii*)ITS序列

SEQ Unknown: 623 bp;

Composition 149 A; 141 C; 153 G; 180 T; 0 OTHER

Percentage: 24% A; 23% C; 25% G; 29% T; 0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 192.44 dsDNA: 384.1

ORIGIN

```
1      TCGAAAGCTA AACAAATAAC CAGTGAACAT GTTAACAAAA TACGGATCGT GGTGGGGCTT
61     TCCAATCCAT TCCGACAATG TGTTTGGGGT GCTTTCTTGG CATCACGTGT GTGCGTGTCA
121    TTCTAGGTTC CCTCACTCAC AAACGAACCC CGGCGTAAAC CGCCAAGGAA TGATAACAAG
181    ACTTGCCTTG CTCGGCCCAT TTTTGGGAAC GGGTACTGGC ATTAGTTTTTC CATAAATAAA
241    ACGACTCTCG GCAACGGATA TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CAAAATGCGA
301    TACTTGGTGT GAATTGCAGA ATCCCGTGAA CCATCGAGTT TTTGAACGCA AGTTGCGCCT
361    GAAGCATTGA GGCTGAGGGC ACGTCTGCCT GGGCGTCTCG CTTCGTGTCTG TCTCATTTCA
421    TCTCGAGATC CCCTTTAAAT CGGGTATTGA GTGTCTTTGG ACGTATAATG GCCTCCTGTG
481    TGAACTTGTC AAACAGTTGG TTGAAATACA AGTCCATGTG AAAGGACACA CGGTTAGTGG
541    TGGTTGAGAG ACTGTTTCGA ACCCGTGTA CTTCTTTTGG ATTTTTTTTGA CCCTTGGTGT
601    GCCTTTCACG GTGCATCGAT TGC
```

Fig. 5 黄花凤仙花(*Impatiens tayemonii*) ITS序列

SEQ Unknown: 624 bp;

Composition 156 A; 134 C; 144 G; 189 T; 1 OTHER

Percentage: 25% A; 21% C; 23% G; 30% T; 0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 192.69 dsDNA: 384.7

ORIGIN

```
1      TCGAAAGCTA AACAAACAAC CTGCGAACAT GTTAATAAAA TATGGGTTTT GATTGGTCTT
61     TCCAATCTCT TCCTGCAATG TAGTTGGGGT GCTTGCTTGG TTA CTACACAC GTGGGTGCCT
121    CTCTTTGTTC CCTCAACTCA TAAACGAACC CCGGCCTAAA CCGCCAAGGA ATTTTAAAAA
181    GACTTGCCAT GCTTGCCTCA TTATTTGGGA TTAAGTATGG GTTTAGTTTT CTATAAATAA
241    AACGACTCTC GGCAACGGAT ATCTCGGCTC TCGCATCGAT GAAGAACGTA GCAAAATGCG
301    A TACTTGGTG TGAATTGCAG AATCCCGTGA ACCATCGAGT TTTTGAACGC AAGTTGCGCC
361    TGAAGCCATT AGGCCGAGGG CACGTCTGCC TGGGCGTCTC GCTTCGTGTC GTCTCGTTTC
421    ATTTGAAAAT CTCTTTATTT ATAAGGGGAT GATTGTCTCG AGACGTATAA TGGCCTCCTG
481    TGC GTACATA TCAAACAGTT GGCTCAAATA MAAGTCCATG TGAAAGGACA CACGGTTAGC
541    GGTGGTTGAG AA ACTGTTTC GAACCCGTGT AAATCTTTT GGATCTATTG ACCCTTGGTG
601    TGCCTTTGAT GGTGCATCGA TTGC
```

Fig. 6 紫花鳳仙花(*Impatiens uniflora*) ITS序列

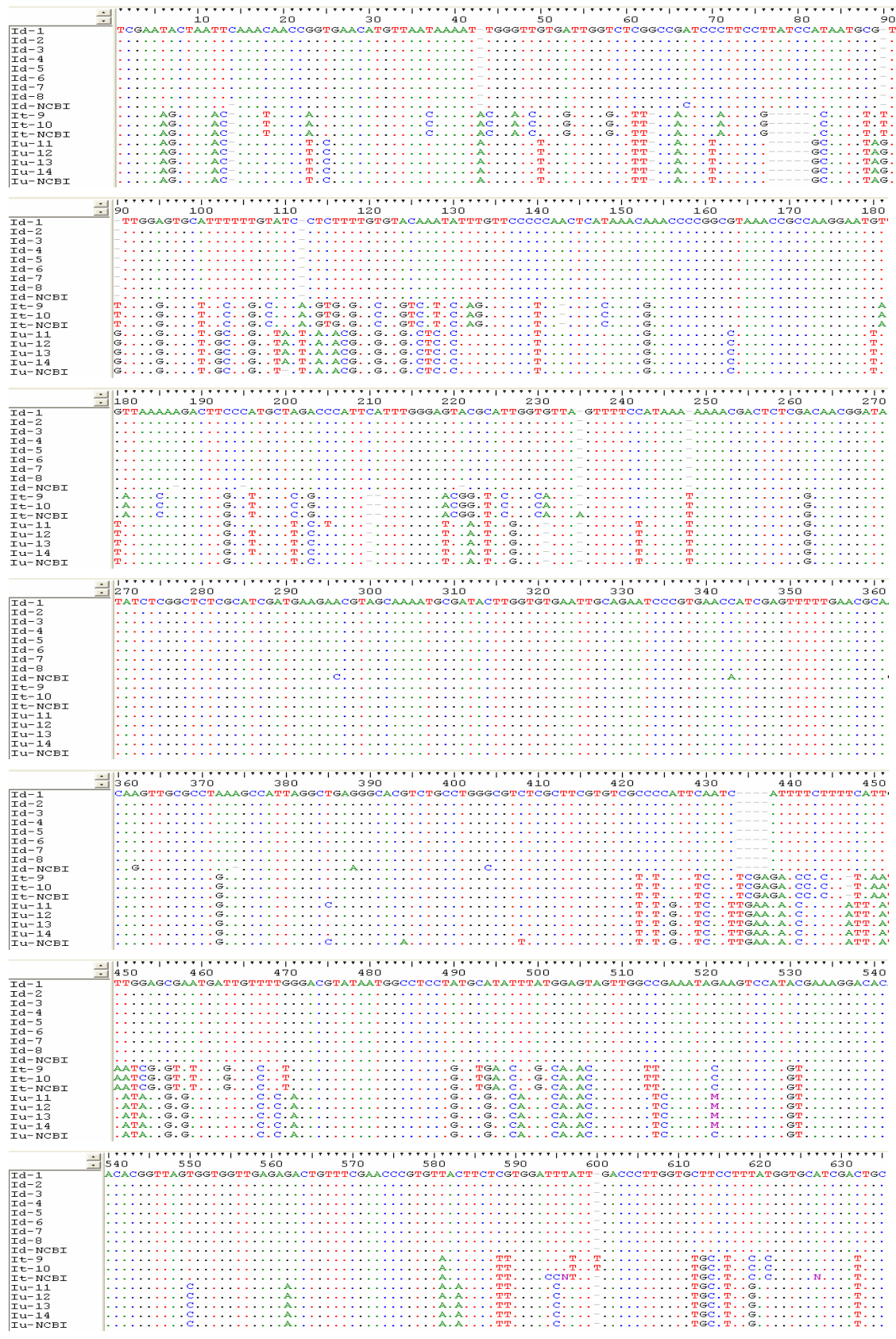


Fig. 7 鳳仙花 DNA 序列排序圖

其中 NCBI 係指由 GenBank 下載的 DNA sequence，採集地不詳。

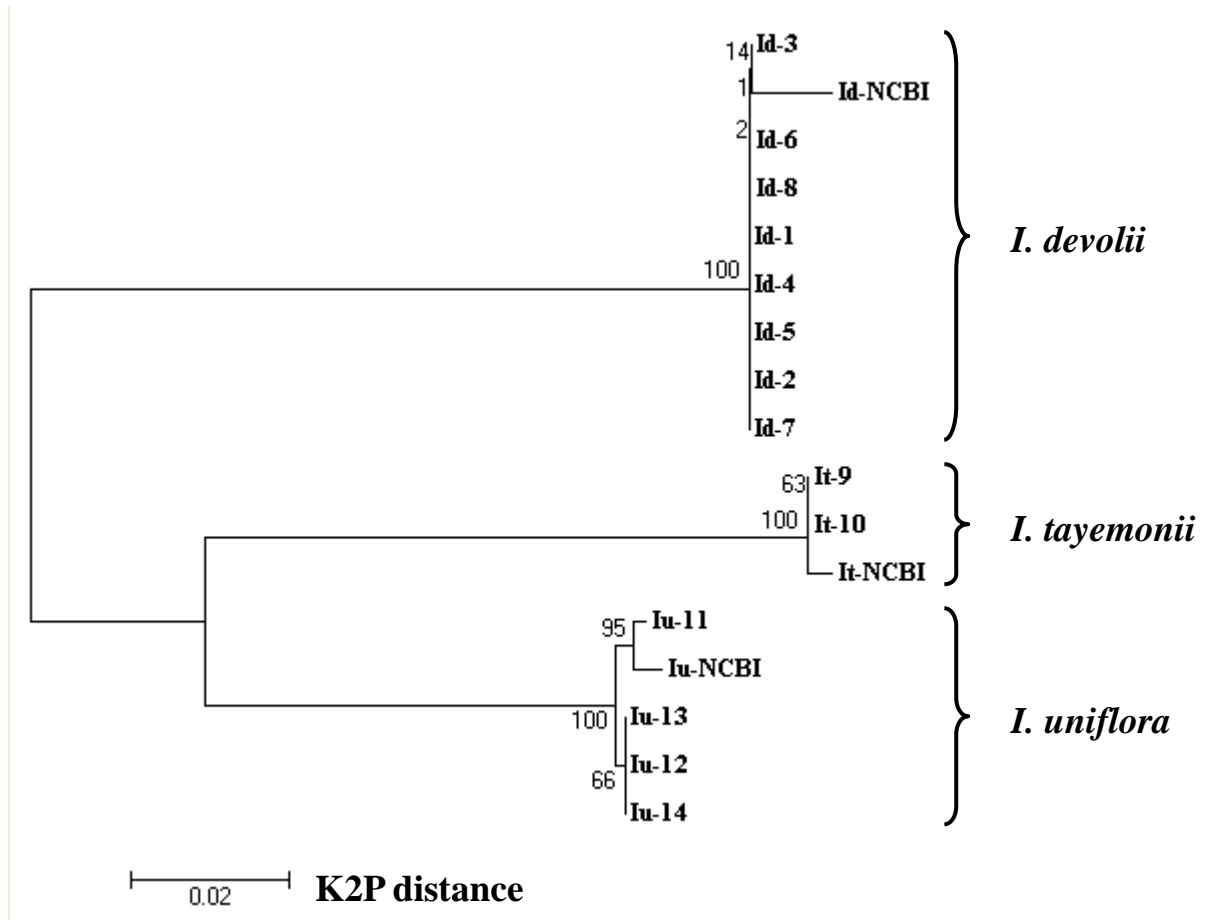


Fig. 8 不同採集地鳳仙花的親緣關係圖。
支序圖上之數字代表 Bootstrap 值，其中 NCBI 係指由 GenBank 下載的 DNA sequence，採集地不詳。

附錄、鳳仙花形態特徵及復育情形照片



Fig.1 棣慕華鳳仙花 *Impatiens devolii* Huang



Fig.2 棣慕華鳳仙花 *Impatiens devolii* Huang



Fig.3 黃花鳳仙花 *Impatiens tayemonii* Hayata



Fig.4 黃花鳳仙花 *Impatiens tayemonii* Hayata



Fig.5 紫花鳳仙花 *Impatiens uniflora* Hayata



Fig.6 紫花鳳仙花 *Impatiens uniflora* Hayata



Fig.7 紫花 (左)與棣慕華 (右) 鳳仙花葉片比較



Fig.8 紫花 (上)與棣慕華 (下) 鳳仙花葉緣比較



Fig.9 紫花鳳仙花、果



Fig.10 熊蜂為紫花鳳仙花授粉



Fig.11 黃花鳳仙花蒴果

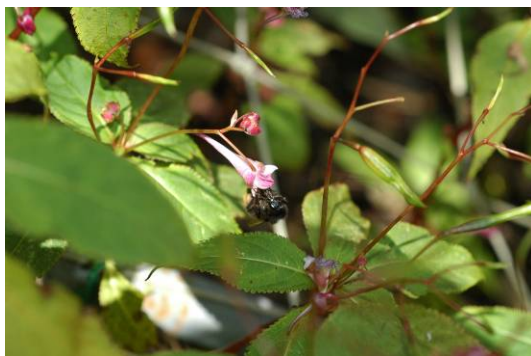


Fig.12 熊蜂為棣慕華鳳仙花授粉

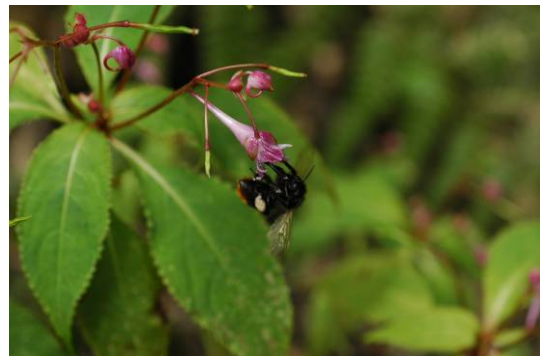


Fig.13 熊蜂為棣慕華鳳仙花授粉



Fig.14 紫花鳳仙花宿存植株



Fig.15 紫花鳳仙花葉表面被毛



Fig.16 棣慕華鳳仙花莖有黑色斑紋



Fig.17 棣慕華鳳仙花蒴果開裂



Fig.18 棣慕華鳳仙花發芽整齊



Fig.19 無初生葉時難以判斷鳳仙花種類



Fig.20 台大梅峰農場路旁棣慕華及黃花鳳仙花族群



Fig.21 石鹿古道林下路旁棣慕華鳳仙花族群



Fig.22 石鹿古道路標旁棣慕華鳳仙花



Fig.23 雪見地區復育點探勘



Fig.24 雪見地區復育點探勘

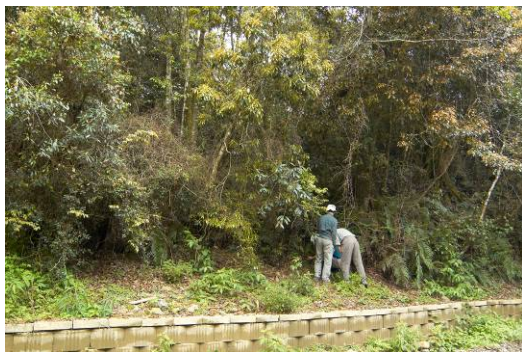


Fig.25 選定雪見地區復育點



Fig.26 選定雪見地區復育點



Fig.27 黃花及棗慕華鳳仙花苗木



Fig.28 苗高約 30 公分



Fig.29 叢狀栽植



Fig.30 單株種植



Fig.31 路邊栽種



Fig.32 栽種情形



Fig.33 雪見地區棣慕華鳳仙花存活情形



Fig.34 雪見地區黃花鳳仙花存活情形



Fig.35 雪見地區栽植工作人員



Fig.36 武陵台灣鮭魚生態中心復育點

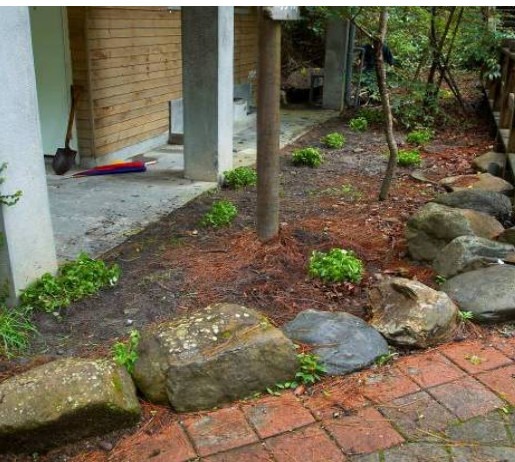


Fig.37 樓梯旁栽種點



Fig.38 種植後存活情形



Fig.39 苗圃栽種點



Fig.40 栽種後 50 天存活情形



Fig.41 木棧道旁栽種點



Fig.42 木棧道栽種 50 天後存活情形



Fig.43 大石旁栽種點



Fig.44 護坡上栽種點



Fig.45 林下栽植點



Fig.46 花園種後 50 天存活情形