

陽明山地區台北堇菜族群遺傳結構之研究

王震哲* 黃生* 林讚標**

* 國立臺灣師範大學生物學系所

** 台灣省林業試驗所育林系

摘要

本研究使用同功鋤分析陽明山地區台北堇菜次族群內與次族群間遺傳結構, 並探討其與生育系統及地理分布之關係。總共檢查四個次族群, 81株個體, 八種同功鋤, 包含11基因座。族群遺傳變異度理論值為0.142, 範圍介於0.007-0.186, 實際觀測值為0.160, 範圍介於0.097-0.252; 多型性基因座比例為36.4, 平均每一基因座有1.7基因(alleles)。F-statistics分析結果, 族群內自交係數 $F_{IS} = -0.276$, 顯示此種植物偏好異花授粉, 族群間變異度 $F_{ST} = 0.132$, 顯示種內具有中度的遺傳分化。次族群間基因流傳率大於一($Nm = 1.64$), 且各次族群之遺傳距離與地理距離無關, 顯示次族群間的遺傳分化並非來自基因流傳的阻礙, 而可能係受生育環境影響所造成, 故天擇作用為造成台北堇菜次族群遺傳分化之主要力量。

關鍵詞: 基因流傳、族群遺傳分化、族群遺傳結構、同功鋤電泳法、堇菜屬、台北堇菜

緒言

堇菜屬 (*Viola* L.) 植物為多年生草本, 廣泛分布於北溫帶地區, 台灣共有18個分類群 (taxa) (Wang and Huang, 1990)。本屬植物常在不同季節分別形成兩種類型的花, 在冬季至春季形成顯著之開放花 (chasmogamous flower), 而在其餘季節則形成小而不明顯之閉鎖花 (cleistogamous flower) (Lord, 1981; Mayers and Lord, 1983)。開放花具五枚花瓣, 上有明顯之蜜腺

導引 (nectary guide), 基瓣向後延伸形成囊狀之距, 內含有由雄蕊藥隔延伸形成之蜜腺, 故為蟲媒花, 行異花授粉 (Beattie, 1969a); 而閉鎖花之花瓣退化成鱗片狀, 雄蕊僅二枚, 雌蕊之花柱頂端彎曲貼住花藥頂端, 花粉直接在花藥內萌發, 穿透花粉囊進入花柱內 (West, 1930; Lord, 1981; Satake and Ito, 1964; Wang and Huang, 1991), 故為自花授粉。自花授粉有利於種族之繁衍, 及對穩定環境之適應, 但往往降低遺傳變異度, 不利於對環境變化之適應, 而異花

授粉則反之，有利於對環境變化之適應（Beattie, 1978; Richards, 1986），故兩種方式並行之生育系統，大大增強了本屬植物之適應與競爭能力，但同時也造成了本屬植物族群內和族群間相當複雜的遺傳結構。

台北董菜(*V. nagasawai* Makino & Hayata) 為台灣特有種，局限分布於本省北部（台北、桃園、宜蘭）海拔 500-2000 公尺之山區（Hsieh, 1977; Wang, 1988），多生育於森林邊緣或開闢之草生地，野外初步觀察結果往往可見不同生育環境之族群其形態略有差異。本研究擬利用同功酶之凝膠電泳方法分析陽明山地區台北董菜之族群遺傳結構，並進一步探討族群變異與生育系統及地理分布之關係。

材料與方法

一、取樣及澱粉凝膠電泳：

研究所用材料全部採自陽明山國家公園，分別為大屯自然公園、中興農場、擎天崗及小油坑，共四個族群 81 株個體，各族群之生育地環境及樣本數列如表一。

採回之植物先栽植於實驗室，待實驗前再剪取新長出且已充份展開之葉片，以約 0.5ml 之酵素淬取液（grinding buffer）研磨，並以濾紙片（3×6mm, Whatman 3MM）吸附後，以水平式澱粉凝膠電泳法（horizontal starch gel electrophoresis）進行電泳。本研究主要依據 Soltis *et al.* (1983) 之方法，使用 Histidine-HCl 及 Tris-citric acid 兩種緩衝液，前者用於檢測 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD)，isocitrate dehydrogenase (IDH)，malate dehydrogenase (MDH) 及 shikimate dehydrogenase (SDH)，而後者則用於 acid phosphatase (ACPH)，malic enzyme (ME)，phosphoglucoisomerase (PGI) 及 triosephosphate isomerase (TPI)。染色方法悉依 Soltis *et al.* (1983)，待充份呈色後洗去染劑並即記錄結果。

二、資料分析：

資料分析，包括對偶基因頻度（allelic frequency），多型性基因座比例（percentage of polymorphic loci），平均異質度（mean heterozygosity），遺傳同源性及遺傳距離

表一、研究材料採樣地點、生育地環境及樣本數。

地點	代碼	生育環境	樣本數
大屯自然公園	TATUN	芒草組成之草原，高約 50 公分	22
中興農場	CHUNG	沿產業道路，兩側為闊葉樹林	16
擎天崗	TAIYAN	芒草、類地毯草及闊葉樹灌叢混生地	15
小油坑	SHAW	台灣矢竹灌叢，高約二公尺	28

表二、Genetic variability at 11 loci in all subpopulations(Standard errors in parentheses).

subpopulation	Mean sample size per Locus	Mean no. of allelse per locus	Percentage of loci polymorphic*	Mean heterozygosity	
				Direct-count	HdyWbg expected**
1. TATUN	21.0 (0.9)	1.5 (0.2)	36.4	0.252 (0.112)	0.186 (0.079)
2. CHUNG	16.0 (0.0)	1.6 (0.3)	27.3	0.199 (0.105)	0.158 (0.079)
3. TAIYAN	14.7 (0.2)	1.3 (0.1)	27.3	0.097 (0.090)	0.119 (0.064)
4. SHIAW	28.0 (0.0)	1.8 (0.1)	18.2	0.110 (0.090)	0.070 (0.048)

* A locus is considered polymorphic if the frequency of the most common allele does not exceed 0.95

** Unbiased estimated (see Nei, 1978)

(genetic identity and distance, Nei, 1972) 以及聚類分析 (cluster analysis, 使用UPGMA) 等, 均以套裝軟體BIOSYS-1 (Swofford and Selander, 1989) 爲之。凝膠電泳所呈現之色帶排列判讀係根據Gottlieb(1977), Kephart(1990)及Wendel and Weeden(1989)等報告所提出的方法判讀之。

結 果

根據八種酶系之色帶類型, 推測出11個基因座, 分別是 6-PGD、IDH、MDH、SDH、ACPH-1、ACPH-2、ME、PGI-1、PGI-2、PGI-3、TPI。此外, ACPH-3、ACPH-4、GDH、PGM-1、PGM-2亦經測試, 但結果不穩定, 未納入分析。

在所分析之11個基因座中, 有6個基因座 (IDH、MDH、SDH、ACPH-1、ACPH-2、TPI) 在所有個體均只顯示單一色帶。6-PGD 則呈現異基因型 (heterozygote), 均視爲單型性表現 (monomorphism)。

ME基因座除一個個體爲異基因型外, 其餘所有個體全爲同基因型 (homozygote)。其餘基因座則屬多型性表現 (polymorphism)。多型性表現之基因座數雖然不多, 但因本研究旨在探討族群分化情形, 故結果仍屬可信。

四個次族群之遺傳變異度 (H_e) 理論值介於7% 到 18.6%之間 (表二), 實際觀測值 (H_o) 則介於9.7%到25.2%之間; 每一基因座之平均對偶基因數 (A) 介於1.3和1.6之間, 整體爲 1.27; 多型性基因座比例 (P) 介於18.2到36.4之間, 整體爲36.4。

F-statistics之分析結果顯示次族群間之分化 (F_{ST}) 平均爲 0.132 (表三), 而族群內自交係數 F_{IS} (inbreeding coefficient) 爲 -0.276,

表三、Summary of F-statistics at all loci.

Locus	F(IS)	F(IT)	F(ST)
PGD	-1.000	-1.000	0.000
ME-1	-0.018	-0.004	0.013
PGI-1	-0.001	0.296	0.297
PGI-2	-0.460	-0.103	0.245
PGI-3	0.339	0.401	0.093
Mean	-0.276	-0.108	0.132

這個負值的數據表示這是一種偏好異花授粉的植物。四個次族群配對比較的結果顯示採自中興農場和採自擎天崗兩地的台北董菜遺傳上完全相同 ($I=LD=0$) (表四)，而大屯自然公園之台北董菜則與其他三個地點之同種植物在遺傳上略有差異 (表四、圖一)。

討 論

董菜屬植物之生育系統係以閉鎖花行自花授粉，開放花行異花授粉並行之方式 (Valentine, 1962; Wang and Huang, 1991)，而種子之傳播多為兩種傳播 (diplochory)，即先利用果實爆裂之力量將種子彈出，再由螞蟻搬運 (Beattie, 1978; Beattie and Lyon, 1975; Culver and Beattie, 1980; Wang and Huang, 1991)，此種傳播方式之距離並不遠，常在數公尺之內 (Beattie, 1978; Takenouchi, 1969)。理論上，自花授粉及上述之種子傳播方式應造成族群內的變異降低及族群間的差異增高，而異

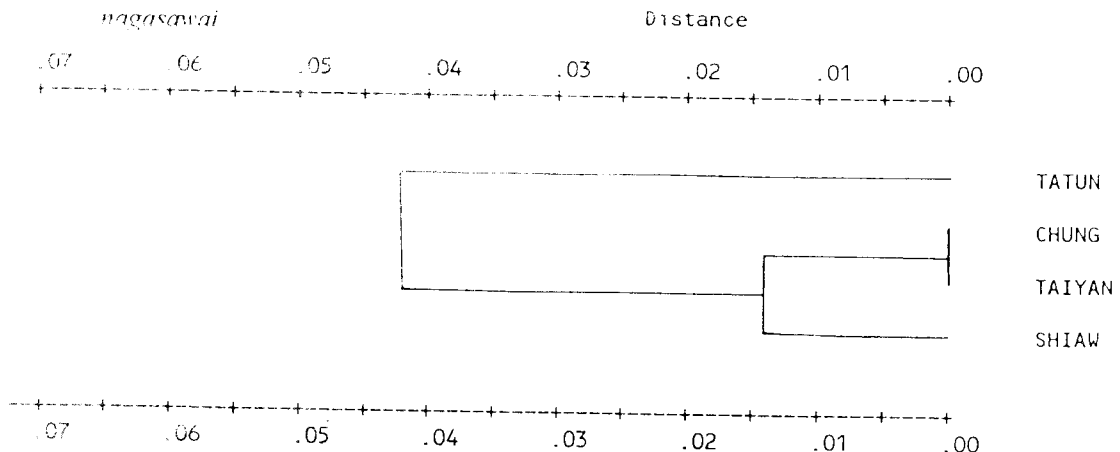
表四、Matrix of genetic similarity and distance coefficients. Below diagonal: Nei (1978) unbiased genetic distance. Above diagonal: Nei (1978) unbiased genetic identity.

subpopulation	1	2	3	4
1 TATUN	****	0.977	0.964	0.937
2 CHUNG	0.023	****	1.000	0.982
3 TAIYAN	0.037	0.000	****	0.989
4 SHIAW	0.065	0.018	0.011	****

花授粉則反之 (Hamrick, 1989)。董菜屬植物之傳粉者以蜂為主 (Beattie, 1971, 1978)，台北董菜亦然 (Liu and Wang, unpubl data)，此類昆蟲之飛行距離不遠，花粉之傳播常在鄰近個體之間 (Beattie, 1978; Loveless and Hamrick, 1984)，故有性生殖造成之遺傳變異通常亦僅作用於族群內，使得族群內的變異大於族群間的差異。綜合上述花粉傳播及種子播散兩種生殖策略相互作用之結果，使得這種既有自花授粉又有異花授粉行為之植物有相當複雜的族群內和族群間遺傳變異度的表現。

在本研究結果中近親交配係數 ($F_{IS}=-0.276$) 為負值，顯示此種植物為異花授粉，使得族群內遺傳

圖一 UPGMA dendrogram showing the genetic relationship among 4 subpopulations of *Viola nagasawai*



變異度相對的高 (Loveless and Hamrick, 1984)，而族群間遺傳變異度則相對的低 ($F_{ST}=0.132$)。根據 Wright(1978)的假設，凡族群間變異度數值在0.05~0.15之間者屬於遺傳上的中度分化，本研究以同功酶電泳法得到的數據說明了陽明山地區的台北堇菜有著種以內的中度遺傳分化。

種內族群間遺傳分化的原因可能來自基因流傳 (gene flow) 的阻礙，也可能導因於嚴格的天擇作用。關於基因流傳的假說擬使用地理距離與遺傳距離的相關性來檢驗，而關於天擇作用的影響則擬以生殖行為與生育地微環境影響來評估，茲分別討論如下：

若依前述傳粉媒介之行為以及種子散播的方式，本屬植物族群間之基因流傳可能極為有限，但 Beattie (1971)曾指出除了蜂以外，若干鱗翅目昆蟲也幫本屬植物傳粉，Liu and Wang (unpubl. data)曾記錄台灣紋白蝶 (*Pieris canidia canidia*) 以及烏羽蛾科 (Pterophoridae) 昆蟲拜訪台北堇菜。這些昆蟲的相對數量雖低，但因其飛行距離較遠，故在基因流傳上扮演重要角色 (Beattie, 1978)。利用 F_{ST} 間接計算基因流傳 (Wright, 1931)，得知 $Nm=1.64$ ，其量 ($Nm > 1$) 應已足以使大族群不致產生地區性分化。再從地理距離與遺傳距離之相關性來看，四個次族群之距離均相隔一公里以上，遠超過傳粉者飛行及種子傳播之距離，其中中

興農場與大屯自然公園距離最近，但遺傳距離 $D=0.023$ ，而中興農場與擎天崗相隔最遠，直線距離達三公里，且中間相隔一座七星山，但二者在遺傳上完全相同 ($D=0$ ，表四)，顯然可見遺傳分化程度與地理距離並不相關。綜上所述，台北堇菜次族群間的分化並非來自基因流傳的阻礙。

既然陽明山地區台北堇菜次族群間沒有顯著基因流傳之阻礙存在，則這些次族群的分化，很可能導因於生育地環境所造成的天擇效應。很多學者 (e.g. Ehrlich and Raver, 1969; Endler, 1973; Slatkin, 1987) 均認為天擇的力量遠勝過基因流傳所產生的均質化影響，故族群的分化是由其環境因素所決定。仔細比較四個次族群之生育地環境 (表一)，發現遺傳上差異最大之大屯自然公園次族群 (圖一)，其生育環境為芒草原，開闊向陽且乾燥，而其他三個次族群之生育地多少均有遮蔭且較為潤濕，形態上亦可看出大屯自然公園次族群之個體均較為矮小，葉片較小且毛茸較密，似與同功酶有相似的分化，二者之相關性雖仍待進一步研究判明，但已充份顯示次族群間的差異與生育地環境有密切關係。

若進一步分析各次族群之遺傳結構，可以發現大屯自然公園族群之多型性基因座比例 ($P=36.4$ ，圖二) 以及平均異質度 ($H_0=0.252$, $H_E=0.186$) 均高於其他三個次族群，顯示此一次族群具有較大之族

群內變異，故有利於對嚴苛環境之適應。由此一結果亦可看出，堇菜屬植物採自花授粉與異花授粉並行之生殖方式，雖然自花授粉之閉鎖花所結種子數量遠多於行異花授粉之開放花（Beattie, 1969b; Valentine, 1962），但何者擁有較高的生殖成功率卻完全取決於當時的環境，也就是地區性的天擇力量在決定族群遺傳結構上扮演了相當重要的角色。

誌 謝

本研究承國科會短期科技研究補助研究經費(計畫編號NSC83-0115-C054-0002)，陽明山國家公園管理處同意採集研究材料，謹此誌謝。

參 考 文 獻

- Beattie, A. J. 1969a. Studies in the pollination ecology of *Viola*. I. the pollen-content of stigmatic cavities. *Watsonia* 7:142-156.
- Beattie, A. J. 1969b. The floral biology of three species of *Viola*. *New Phytol.* 68: 1187-1201.
- Beattie, A. J. 1971. Pollination mechanisms in *Viola*. *New Phytol.* 70:343-360.
- Beattie, A. J. 1978. Plant-animal interactions affecting gene flow in *Viola*. In A. J. Richards (ed.), *The Pollination of Flowers by Insects*, pp.151-164. Academic Press, Linn. Soc. Symp. Ser. 6. London.
- Beattie, A. J. and N. Lyons. 1975. Seed dispersal in *Viola* (Violaceae): Adaptation and strategies. *Amer. J. Bot.* 62:714-722.
- Culver, D. C. and A. J. Beattie. 1980. The fate of *Viola* seeds dispersed by ants. *Amer. J. Bot.* 67:710-714.
- Ehrlich, P. R. and P. H. Raven. 1969. Differentiation of populations. *Science* 165: 1228-1232.
- Endler, J. A. 1973. Gene flow and population differentiation. *Science* 179:243-250.
- Gottlieb, L. D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 64:161-180.
- Hamrick, J. L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In D. E. Soltis & P. S. Soltis (eds.), *Isozymes in Plant Biology*, pp. 87-105. Dioscorides Press, Oregon.
- Hsieh, C. F. 1977. Violaceae. In H. L. Li et al. (eds.), *Flora of Taiwan*, vol. 3, pp. 769-784. Epoch Inc. Taipei.
- Kephart, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77: 693-712.
- Lord, E. M. 1981. Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *Bot. Rev.* 47:421-449.
- Loveless M. D. and J. L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15:65-95.
- Mayers, A. M. and E. M. Lord. 1983. Comparative flowers development in the cleistogamous species *Viola odorata*. I. A growth rate study. *Amer. J. Bot.* 70:1548-1555.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 106:283-292.
- Richards, A. J. 1986. *Plant Breeding System*. Chap. 9. Self-fertilisation. George Allen & Unwin (Publishers) Ltd. London.
- Satake, Y. and E. Ito. 1964. Taxonomic study of the Japanese *Viola*. I. Cleistogamous flowers. *Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo* 7:111-

125. (in Japanese)
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **16**:393-430.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**: 787-792.
- Soltis, D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow, and G. J. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.* **73**:9-27.
- Swofford, D. L. and R. B. Selander. 1989. BIOSYS-1, A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois.
- Takenouchi, M. 1969. On the observations about flying distances and flying directions of seeds of some violets. *J. Jap. Bot.* **44**:62-63. (in Japanese)
- Valentine, D. H. 1962. Variation and evolution in the genus *Viola*. *Prestlia* **34**:190-206.
- Wang, J. C. 1988. A taxonomic study of *Viola* L. (Violaceae) of Taiwan. Ph. D. dissertation, Natl. Taiwan Univ.
- Wang, J. C. and T. C. Huang. 1990. Notes on the flora of Taiwan (9)- the genus *Viola* L. (Violaceae). *Taiwania* **35**: 12-56.
- Wang, J. C. and T. C. Huang. 1991. The reproductive strategies of *Viola* L. (Violaceae). *Chinese Biosci.* **34**(2):11-18. (in Chinese)
- Wendel, J. F. and N. F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In D. E. Soltis & P. S. Soltis (eds.), *Isozymes in Plant Biology*, pp. 5-45. Dioscorides Press, Oregon.
- West, G. 1930. Cleistogamy in *Viola riviniana* with special reference to its cytological aspects. *Ann. Bot.* **44**:87-109.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**:97-159.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, vol. 4. Variability Within and Among Natural Population. Univ. of Chicago Press, Chicago.

Genetic Structure of *Viola nagasawai* in Yangmingshan, Taiwan

Jenn-Che Wang*, Shong Huang*, and Tsan-Piao Lin**

*Department of Biology

National Taiwan Normal University

**Taiwan Forestry Research Institute

ABSTRACT

Genetic structure within and among four subpopulations of *Viola nagasawai* was investigated using isozyme gel electrophoresis techniques. Eleven loci were surveyed from eight enzyme systems. The mean expected heterozygosity (H_e) was 0.142 and ranged from 0.07 to 0.186. The mean observed heterozygosity (H_o) was 0.160 and ranged from 0.097 to 0.252. The mean number of alleles per locus (A) was 1.7. The percentage of polymorphic loci (P) was 36.4. F-statistics revealed that the inbreeding coefficient within populations (F_{IS}) was -0.276. This negative value suggested that the species preferred outcrossing. The level of genetic differentiation among populations (F_{ST}) was 0.132, which suggested a medium-grade of infraspecific genetic differentiation. Gene flow rate among subpopulations was greater than one ($Nm=1.64$), and indicated that genetic differentiation among subpopulations was not likely contributed by restricted gene flow. However, natural selection probably played important role and caused genetic differentiation of *V. nagasawai* subpopulations in the Yang-ming-shan area.

Key words: gene flow, genetic differentiation, isozyme electrophoresis, population genetic structure, *Viola*, *V. nagasawai*