

國立臺灣大學生物資源暨農學院森林環境暨資源學系

碩士論文

School of Forestry and Resource Conservation

College of BioResources and Agricultures

National Taiwan University

Master Thesis



鹿寨秋海棠之族群遺傳與親緣地理

Population genetics and phylogeography of

Begonia luzhaiensis T. C. Ku

黃瀚嶢

Han-Yau Huang

指導教授：鍾國芳 博士

彭鏡毅 博士

Advisor: Kuo-Fang Chung, Ph.D.

Ching-I Peng, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July 2014



誌謝

我想沒有一本論文是「個人」能完成的。在知識生產的系統中，研究者經過基礎知識的吸收，方法學的訓練，彙整前人的成果來設計研究架構，調度相關資源來獲得研究材料並支持整體計畫，每一步都是經由許許多多的「他人」協助才得以持續，這往往才是成就一篇論文的關鍵；而研究生活中，除了學術外的其他部分，時常也扮演隱性的力量，支持著研究者的心靈，敦促其邁步前進，那些部分同樣有許多他人的參與——這些人實際上都共同造就了研究成果。

此論文當然也不會例外。

本研究的整體構想來自鍾國芳博士，我大學與研究所階段最重要的指導老師，除了整體方向的引導與許多細節的討論，他的耐心包容與幾回深談都一次次引領我走出低潮。鍾老師帶給我的不只是學術與思考的訓練，他的豐富的人生閱歷與處事態度也對我產生了深遠的正面影響。而另一位指導教授彭鏡毅博士，是整個秋海棠研究系統的建立者，我兩度的野外採集經費，廣西方面的資源聯繫，以及分子實驗的經費，都由他協助統籌，彭老師的研究室可說是亞洲秋海棠研究方面最重要的核心團隊。

在本論文開始前，有整整一年，台大森林系植物演化與生物地理研究室的前輩們，包括長期訓練我實驗技巧，令人敬佩的大學長游旨价，以及章璿、劉筱蕾和林婷婷等優秀的學姊，悉心地協助我建立了實驗室的基本能力，並傳授許多分子親緣分析方面重要的概念，成為我往後學習上的根基。而在本研究架構大致確立後，中央研究院的楊巽安學姊認真真切地陪我進行初期的探索，她的鼓勵與叮嚀推動著論文的進展，引領我克服一個又一個的難關，是最重要的顧問與指導者。而中研院彭鏡毅老師實驗室其他助理們，包括陳觀斌學長、黃群智學姊、馬家柔學姊以及何孟容學姊，也都在我的實驗過程中不斷地提供協助。

在秋海棠材料的取得方面，廣西植物所的劉演教授和許為斌學長提供了巨大的幫忙，他們都是最熟悉石灰岩植物多樣性的傑出研究者，不只協助安排廣西的野外行程，並跨越數百公里帶領我們取得各個已知族群的材料，沒有他們的協助，本研究將難以進行。

在研究前期，台大森林系的曲芳華教授及其博士班學生文起祥學姊在秋海棠RNA的萃取上提供了極大的幫忙，這個關卡的克服，使所有工作得以繼續進行。而本研究後期的分析，我時常向中研院的中村剛博士請益，在分子標記的開發上我們也曾進行不少討論，對我而言，他們都是研究者的最佳典範與楷模。

本論文的誕生，是接續著前人的數個研究，包括古訓銘學長對於側膜組秋海棠的分類處理，梁慧舟學長對於亞洲秋海棠親緣關係的研究，以及林家瑜學姊針對側膜組秋海棠所建構的親緣關係樹；潘姿麟學姊和章璿學姊對報春苣苔屬的研



究增進了我們對於石灰岩地區植物演化概略的了解，而蔡永信學長與柯雅青學姊的族群遺傳研究則使我在微衛星體的開發與族群遺傳的分析上有了重要的參考依據。他們的貢獻是本研究主要的基礎，而許多樣本也來自於他們早年的辛苦採集成果。

論文的最後修改，有賴於我的口試委員江友中老師、廖培鈞老師、胡哲明老師以及兩位指導老師所給予的精闢建議，以及群智、巽安、馨卉、宜軒和冠穎在口試時的熱心幫忙，使論文的最後呈現得以更加完備。

上述都是成就本論文的關鍵人物，我在此對他們致上最深的敬意與感激。

研究室就像一個小社會，形形色色的人扮演了不同的角色，我想感謝研究室的每個人，與他們的相處使我更加圓熟，也更加誠實地定位與認識自己。期勉尚未畢業的學弟妹們，也都能謙卑地面對每一個挑戰，並最終認知到，生產知識是許多人團隊合作的結果。

碩士班的三年對我而言不只是完成了一本論文，也是一種生活態度的養成過程，當中時間的安排，解決問題的邏輯與態度，以及人際間的溝通能力，都是需要一輩子努力的功課。而除了研究外，生活的其他部分不僅只是調劑，也是我重要的出口與支持的力量。謝謝與我一同參與樹木學助教工作的阿德、馨卉、柏璋、宜軒、承翰與雅青，我非常喜歡每個星期五與他們共事的教學工作，以及許多在野外共同的愉快回憶，感謝他們的陪伴，我從他們每個人身上都學到許多。此外也感謝嘉穎不時提供的紅茶，孟容的生活經驗分享，彭老師的京劇邀約，建華與佩儀的工作甘苦談，群智、郁嵐、敏綺、宜軒與柏璋相伴的野外旅行，旨价的玩笑話與美好的文筆，還有凌軒及小天下出版社所有的照顧與包容。

最後，感謝我的父母和妹妹，無條件地支持我，包容我一次次徹夜面向電腦的冷漠，用溫暖化解我的挫折與焦慮，並適時地激勵我繼續前進。感謝其他家人與親友們，在每次聚會及網路上對我的問候與關心；感謝我的女友與貓，在我最無助的時候使我不忘微笑；感謝與我一起在碩士班奮鬥的同學們，與他們的相處往往幫助我跳脫自我封閉的困境；也感謝許多社團的朋友們，讓我永遠不忘對大自然與保育純粹的初衷。

在論文進行中，我時常幻想著謝詞。期待寫謝詞的心情，代表著我應當能無愧的面對每個幫助過我的人，但在一切尚未完成的彼時，我時常警惕地拋開幻想而回到論文的其餘部分。如今真正動筆，才發現腦中的感謝不斷湧現，手指完全跟不上那些道不盡的情感。這本論文最終要獻給所有我提及或不及提起的貴人們，若這些知識能在人類社會中有那麼點小小貢獻，也是他們所有人共同成就的。

2014.08.09 於蘭嶼

摘要

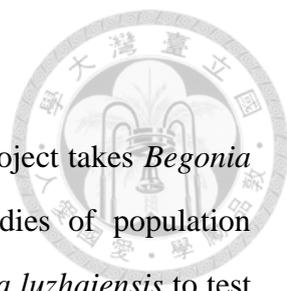
本研究針對廣西地區廣布型的鹿寨秋海棠進行族群遺傳學與親緣地理學研究，共取樣 10 個族群，透過新開發的 16 組微衛星體以及葉綠體 DNA 片段 *trnC-ycf6*，以不同的角度檢視中越邊境亞熱帶喀斯特地貌中，族群的分化模式及歷史的族群量變動，以檢驗從側膜組秋海棠演化樹所推論的種化機制假說，亦即在旺盛的喀斯特作用下，破碎地貌促成的距離隔離為喀斯特地貌中異域種化的主要機制。並進一步藉此特有於中越邊境石灰岩區域的代表性支序，作為研究喀斯特地景中生物多樣性起源的案例參考。

本研究首先以次世代定序技術，開發表現序列標幟微衛星體作為族群遺傳研究的分子標記。在 44,368 個組合序列中，搜尋出 5,602 個含有表現標幟微衛星體的基因座，並從中開發出 16 組具多型性的引子對。以此為工具，本研究進而分析鹿寨秋海棠的族群遺傳特性，其偏高的 F_{ST} 值顯示高度分化的狀況。另透過貝氏群聚分析，發現各種群集數量的分布皆具有顯著的地理結構；進而，在地理距離與族群遺傳距離的相關性檢測中發現高度的正相關，搭配 *trnC-ycf6* 序列的基因單型網狀圖以及巢狀支序分析，可證實在不同階層與時間尺度下距離隔離分化與族群擴張間歇出現，此在描述歷史族群量變動的差異分布分析、中性檢測以及貝氏天際線分析中均獲得不同時間尺度的驗證，顯示鹿寨秋海棠在起源之初曾隨著喀斯特地貌的旺盛發育而呈現族群擴張後距離隔離的分化歷史，而在近期有效族群量的緩慢下降，可能因亞洲大陸五萬年前受冰期影響所產生之乾燥氣候導致。由微演化的研究與巨觀的演化樹相對照，可推論喀斯特地貌中距離隔離的分化模式在更長的時間與空間尺度上很可能成為異域種化的重要成因，也很可能扮演著喀斯特生物多樣性起源的主要機制。

在廣西喀斯特石灰岩地區，族群的遺傳多樣性呈現在各處分化出的獨特基因型上，也表示著任何一地的局部滅絕均可能造成特定基因型的喪失，整體生物多樣性的調查與保育是當前重要的課題。

關鍵字：異域種化、喀斯特作用、次世代定序、棲位保守性、表現序列標幟微衛星體、距離隔離分化模式

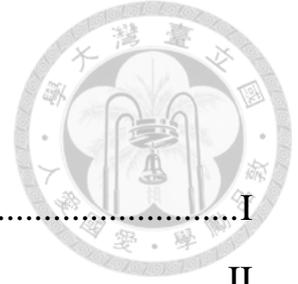
Abstract



To investigate the origin of limestone karst biodiversity, this project takes *Begonia* sect. *Coelocentrum* as a model system. We incorporate the studies of population genetics and phylogeography of a widely distributed species *Begonia luzhaiensis* to test the hypothesis of allopatric speciation via isolation-by-distance triggered by extensive karstification. We sampled 10 populations from limestone karst area of Guangxi, China. Using next-generation sequencing (NGS) technique, 16 polymorphic EST-SSR markers was developed from 5,602 contigs, combine with chloroplast DNA sequence *trnC-ycf6* as tool of the population genetics study. Significantly high F_{ST} suggests strong population differentiation. Based on Bayesian clustering analyses, all populations were restrictively distributed in isolated area. Mantel Tests indicate a significant positive correlation between genetic differentiation and geographic distances, which is also suggested by nested clade analyses of the haplotype network of *trnC-ycf6*. Historical demography was described by neutrality test, mismatch distribution analysis and Bayesian skyline plot analysis. In the higher level clades, a pattern of range expansion followed by isolation-by-distance was shown, as predicted based on the early developments of karst area. A recent decline of effective population size might have been caused by increased aridity of East Asia at ca. 50,000 years ago during the Pleistocene glacial period. The microevolution patterns of *Begonia luzhaiensis* suggest that the similar process might have caused allopatric speciation via isolation-by-distance in a larger time scale, and support strongly the importance of extensive karstification in shaping the species diversity on the Sino-Vietnamese limestone karsts. From a conservation prospective, geographically isolated populations on limestone karsts often harbor unique genetic variation that is threaten by rapid habitat destructions and their uniqueness deserves high conservation priority.

Keywords: allopatric speciation, karstification, Next generation sequence (NGS) technique, niche conservatism, EST-SSR, isolation-by-distance (IBD)

目錄



圖目錄.....	I
表目錄.....	II
一、前言.....	1
(一) 喀斯特地貌簡介.....	1
(二) 喀斯特地景生物多樣性之特色.....	2
(三) 自巨演化角度看喀斯特地區秋海棠的起源.....	5
(四) 以微演化角度看喀斯特物種的分化機制.....	9
(五) 研究目標.....	12
二、材料與方法.....	14
(一) 微衛星體開發.....	14
(二) 取樣、定序與基因型鑑定.....	15
(三) 族群遺傳參數統計.....	18
(四) 族群遺傳結構.....	18
(五) 分子遺傳變異數分析.....	19
(六) 距離隔離模式檢驗.....	19
(七) 基因單型網狀圖建立.....	20
(八) 巢狀支序分析.....	20
(九) 中性檢測.....	21
(十) 差異分布分析.....	22
(十一) 替換率估算與貝氏天際線分析.....	23
三、結果.....	24
(一) 微衛星體開發結果.....	24
(二) 鹿寨秋海棠的族群遺傳特徵.....	27

(三) 族群遺傳結構.....	28
(四) 族群分化模式.....	32
(五) 親緣地理結構.....	36
(六) 歷史族群變動.....	39
四、討論.....	41
(一) 鹿寨秋海棠的族群分化歷史.....	41
(二) 族群擴張事件與喀斯特地貌之演化.....	42
(三) 近期的族群下降與保育上的啟示.....	42
(四) 側膜組秋海棠種化機制之推論.....	43
五、結論.....	44
參考文獻.....	45
附錄：鹿寨秋海棠採集資訊一覽表.....	55





圖目錄

圖一、全球喀斯特地貌分布圖.....	2
圖二、廣西喀斯特地貌分布圖.....	3
圖三、秋海棠屬生物地理支序.....	6
圖四、亞洲秋海棠定年結果.....	7
圖五、鹿寨秋海棠族群變異與採集點.....	17
圖六、重複序列長度分布圖.....	25
圖七、 ΔK 變動折線圖.....	26
圖八、貝氏群聚分析權重值統計圖.....	31
圖九、Mantel 相關性分析結果.....	34、35
圖十、基因單型網狀圖.....	37
圖十一、基因單型頻率分布圖.....	37
圖十二、巢狀支序劃分.....	38
圖十三、貝氏天際線模擬之族群量變動.....	40

表目錄



表一、RNA 萃取品質測試.....	24
表二、讀序長度統計表.....	25
表三、微衛星體引子序列整理.....	26
表四、各微衛星體基因座之族群遺傳特性.....	27
表五、地理區劃與各分子標記之族群遺傳資料.....	29
表六、 <i>trnC-ycf6</i> 序列 AMOVA 分析.....	32
表七、兩兩族群間 F_{ST} 、 F'_{ST} 統計.....	33
表八、巢狀支序分析流程.....	38
表九、Tajima's D 及 Fu's F_S 統計量.....	39
表十、差異分布分析與歷史族群擴張時間推估.....	40



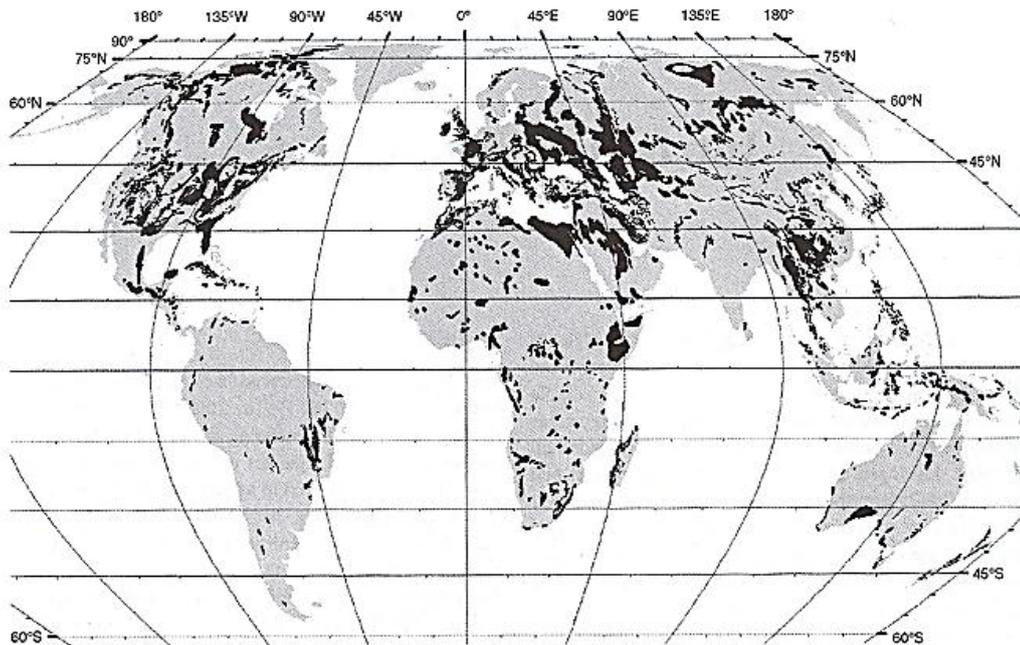
一、前言

(一) 喀斯特地貌簡介

喀斯特地貌 (karst landform)，亦稱為岩溶地貌，其原意指「岩石之山」的字根可追溯自印澳語系起源之前，「喀斯特」(karst) 一詞反映了先民對此特殊地貌的觀察；現今學界對岩層溶蝕風化的過程稱為「喀斯特作用」(karstification)，該作用往往使整體地形呈現千溝萬壑的崎嶇外觀，並於其中交錯著複雜的地下水文系統。

喀斯特地貌可發生於許多易被雨水侵蝕的母岩種類，包括石灰岩(碳酸鈣)、白雲岩(碳酸鎂與碳酸鈣)、大理岩(石灰岩或白雲岩所形成之變質岩)，亦可見於石膏岩(水合硫酸鈣)或岩鹽(氯化鈉)等其他基質之上；但目前世界上最主要的喀斯特地形，仍主要出現在石灰岩地區(Williams, 2008)。石灰質母岩主要起源於淺海的古生物沉積，經由地殼抬升而突出地表後，喀斯特作用於焉展開(Clements *et al.*, 2006)。當雨水解離空氣中的二氧化碳形成碳酸，並隨著降水滲入岩層，便會造成碳酸鈣的溶解，持續侵蝕後，石灰岩表面便充滿了孔洞與雨水入滲後的裂隙，久而久之形成窪地或鏤刻為岩溝(lapies)，並伴隨著地底的水道與岩穴，這些凹陷與孔道的持續形成以及周邊的崩塌，便不斷形塑出越來越複雜的結構，諸如深邃的峽谷、拱狀的天橋(karst bridge)、廣大的陷坑(doline)、錯綜的地下河流(sinking creek)或半開放的岩洞，在喀斯特地貌發育的中晚期，更可見到綿延的峰叢(fengcong)、險峻的峰林(fenglin)、獨立的殘丘(hum)和其間廣大的灰岩盆地(polje)或岩溶平原(karst plain)(Waltham, 2010)。

就世界的分布而言，喀斯特地貌覆蓋了近 11% 的陸地面積，然若將其起伏褶皺的地形及水文系統一併計算，其範圍佔了全球地表面積約 14% (Williams, 2008)，其分布位置包含了北美洲、中美洲加勒比海區域、俄羅斯西部，亞洲南方至東南亞，歐洲的法國南方、土耳其、愛爾蘭與英國，以及澳洲等地區(圖 1)(Clements *et al.*, 2006; Ford & Williams, 2007)。在時間上，喀斯特作用在地質年代中是個持續發生的現象，早至寒武紀，晚至第四紀均有喀斯特地貌先後生成，而其存在時間與所處位置，便決定了整體地景的發育程度(Day & Urich, 2000; Ford & Williams, 2007; Williams, 2008)。全球面積最廣的喀斯特地貌位於中國西南延伸至東南亞的



圖一、全球喀斯特地貌之分布，黑色部分代表喀斯特區域。

範圍內，佔地超過 800,000 km²，其厚達 2500–3000 m 的碳酸鈣沉積，構成了全世界規模最大的石灰岩岩床。此古老的岩層是大約四億一千萬年至約兩億五千萬年間，累積了兩億多年的古老產物 (Xu, 1995; Day & Ulrich, 2000)。例如中國著名的桂林山水景觀，雖然其複雜地形的發育是新生代 (Cenozoic) 之後的事件 (Waltham, 2010)，但其母岩層的定年結果卻可追溯至三疊紀 (Triassic) 的早即至中期 (Liu, 1994, 1995, 1996; Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2014)。

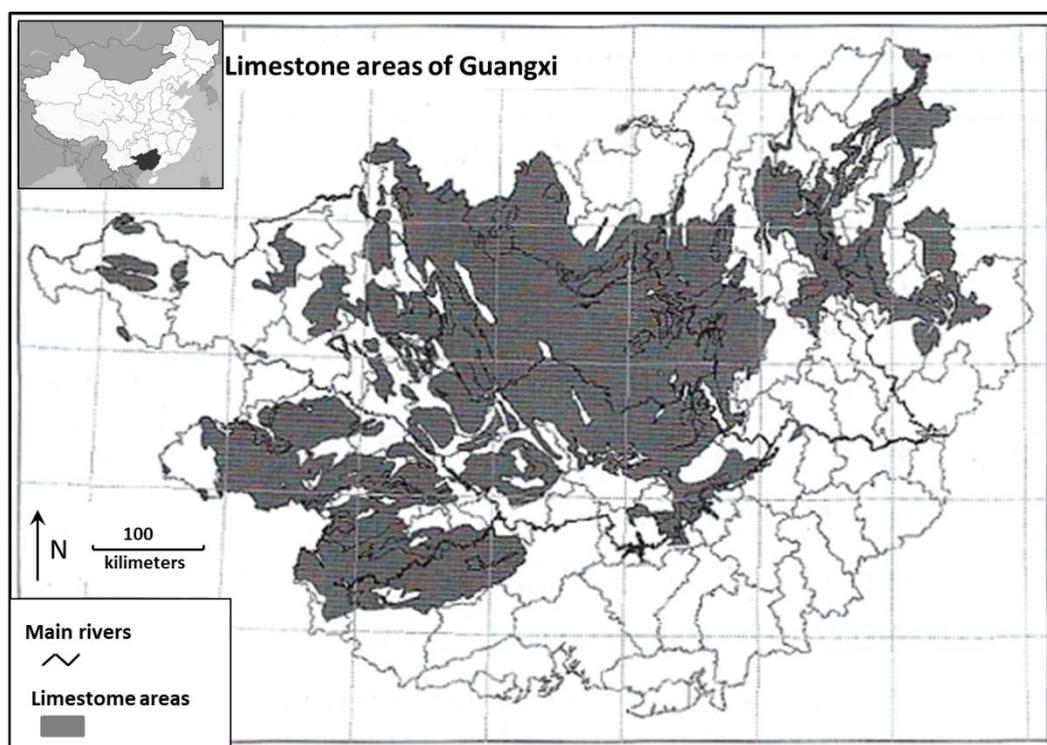
由於這個區域主要位處亞熱帶至熱帶的季風氣候區，雨量豐沛，喀斯特地貌的發育也因而非常旺盛，許多屬於發育中晚期的奇特地景，均被聯合國教科文組織 (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, UNESCO) 列入世界遺產 (World Heritage Sites)，亦被認為是熱帶喀斯特與亞熱帶喀斯特地貌最具代表性的景觀 (Li *et al.*, 2010; Williams, 2008)。

(二) 喀斯特地景生物多樣性之特色

除了地理上的獨特性，亞洲南方的喀斯特地景亦蘊含著極其豐富多樣的生物類群，成為各個相關研究領域的天然實驗室。如洞穴與地下水系的黑暗棲地，促成了許多缺乏色素及視覺的趨同演化，是生物學中的經典案例；而喀斯特地景特殊的基質與破碎的外表，也孕育了多樣的石灰岩專性植群。這些特殊的生命形式

不但是分類學、生態學、親緣地理學、演化生物學等學門的重要資源，在保育方面更被譽為生物多樣性的方舟(Vermeulen & Whitten, 1999; Clements *et al.*, 2006)。僅僅是馬來半島，便有超過 1,200 種被子植物分布於喀斯特地貌中，涵蓋了馬來西亞區系植物相的 14% (Clements *et al.*, 2006)。而在中國廣西地區，佔地超過 40% 的喀斯特地貌 (圖二) (Xu, 1995)，更於其中蘊藏了超過 1,500 種、662 屬、175 科的維管束植物，約為該省植物種類的 17% (8,500 種、1,820 屬、297 科) (Qin & Liu, 2010)。綜觀而言，喀斯特地景中的生物多樣性，無論是在洞穴棲地或在岩石表面生存，均常呈現高特有度且極度侷限分佈的特色 (Clements *et al.*, 2006)。

在馬來西亞，儘管喀斯特地貌僅占了全國土地的 1%，但石灰岩特有的蝸牛種類卻占了整個陸棲貝類相 80% (Schilthuizen, 2000)。而擁有較強的移動能力的哺乳類及鳥類，仍有不少種類侷限分布於喀斯特地區，諸如黑葉猴 (*Trachypithecus francoisi*)，鬣羚 (*Capricornis sumatraensis*) 與灰岩鷓鴣 (*Napothera crispifrons*) 等，都是同屬中特別稀有的種類 (Clements *et al.*, 2006)。而寮國岩鼠屬 (*Laonastes*) 及灰岩鼠屬 (*Saxatilomys*) 更在近年被發現為寮國石灰岩地區特有的屬 (Jenkins *et al.*, 2005; Musser *et al.*, 2005)。



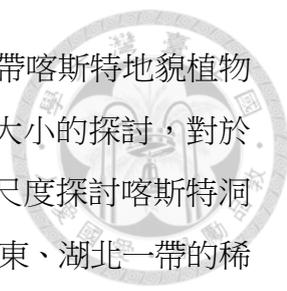
圖二、廣西喀斯特地貌分布圖，深色部分代表石灰岩區域。



而石灰岩表特有的植物相，也呈現了類似的情形。中國的 250 個特有植物屬中，便有近 25%（61 屬）分佈於廣西，且多數分布於石灰岩生境。以苦苣苔科（*Gesneriaceae*）植物為例，中國約 470 個物種（58 屬）中，便有至少 200 種（41 屬）分布於廣西，且多數專一地生長於喀斯特石灰岩地區，且大約有 100 種（10 屬）為廣西特有（Qin & Liu, 2010）。假葉樹科（*Ruscaceae*）中，東亞大約 95 種的蜘蛛抱蛋屬（*Aspidistra*）植物，約有 50 種分布於廣西，其中 40 種僅在喀斯特地區發現，且均只有極少的已知棲地（Lin *et al.*, 2010; Qin & Liu, 2010）。馬來西亞沙巴地區 18 種石灰岩地區特有的秋海棠屬（*Begonia*）植物中，便有 12 種僅分布於單一地點（Kiew, 2001）。而婆羅洲沙勞越（Sarawak）的古晉（Kuching）地區，共 15 種已知的喀斯特地貌特有秋海棠，更各自都僅生長於單一座石灰岩丘上（Kiew, 2004; Chung *et al.*, 2014）。

目前關於喀斯特生物多樣性形成之研究，大多是針對溫帶喀斯特區域（Rivière-Dobigny *et al.*, 2002），儘管亞洲南方與東南亞的喀斯特地貌是生物多樣性的重要熱點（Myer *et al.*, 2000），但對此區域的學術討論仍集中於基礎調查與生態研究，關於各類群親緣關係的建構，及其種化機制的相關報告，仍寥寥無幾，且集中在東南亞的熱帶喀斯特地區，並以動物為主要對象（Rivière-Dobigny *et al.*, 2002; Latinnel *et al.*, 2012; Nicolas *et al.*, 2012）。Latinnel *et al.*（2012）及 Nicolas *et al.*（2012）分別進行了泰國與寮國喀斯特地貌特有的齧齒類族群研究，兩者均著重在其關注的特有物種之族群結構，以及其與近緣物種之分化歷史，無論是前者所討論的耐氏長尾大鼠（*Leopoldamys neilli*），或後者研究中珍稀的寮國岩鼠（*Laonastes aenigmamus*），東南亞地區發育晚期的喀斯特地貌均促成了近五百萬年內顯著的族群內分化，足見在較小尺度下的微異域種化（microallopatric speciation）很可能是喀斯特生物多樣性的重要形成機制。

而在中國南方的亞熱帶喀斯特區域，較具代表性的研究包含苦苣苔科報春苣苔屬（*Primulina*）基因體大小（genome size）之演化研究（Kang *et al.*, 2014），該屬在中國西南喀斯特地區有超過 100 個物種，相當具有代表性。經過親緣關係樹的建構，該研究發現報春苣苔之基因體大小具有親緣關係上的結構，且經由迴歸分析，亦與緯度成正相關，即分布較熱帶的物種具有較小的基因體。研究者由此推論報春苣苔基因體的大小變化乃是對氣候的適應性演化與支序間各自的非適

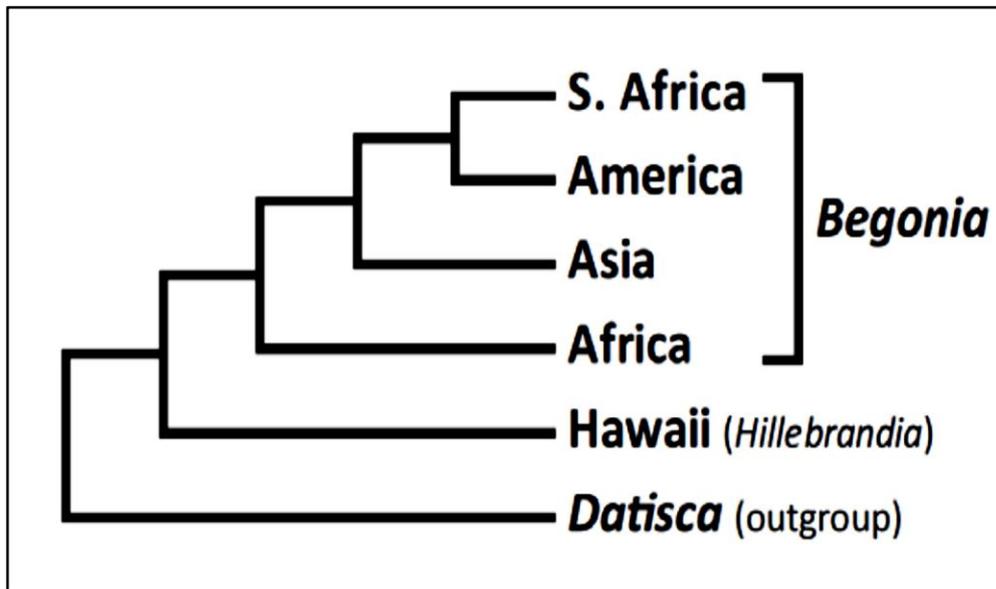


應性演化共同造成的結果 (Kang *et al.*, 2014)。此資料對於亞熱帶喀斯特地貌植物較大尺度的演化機制提供了獨特的觀點，但其較著重於基因體大小的探討，對於喀斯特地貌與各支序的交互影響關係則較少論述。在較微觀的尺度探討喀斯特洞穴生境造成的植物演化者，如 Wang *et al.* (2013) 針對分布於廣東、湖北一帶的稀有苦苣苔科植物報春苣苔 (*Primulina tabacum*) 所進行之族群遺傳研究，其以葉綠體片段分析後，發現在四百公尺以內的岩洞生育地，自花授粉為主的報春苣苔族群竟已能產生族群內的遺傳分化，提供了僅有且十分特殊的一則案例 (Wang *et al.*, 2013)。儘管有了少數不同尺度的研究，然而對於此區域中各種特有的植物類群，欲了解其多樣化的機制與族群遺傳的模式，仍缺乏較完整的資料。

就多樣性與特有度而言，秋海棠屬也是熱帶及亞熱帶喀斯特地貌最具代表性特有植物類群之一 (Ku, 2006; Chung *et al.*, 2014)。在中越邊境的喀斯特地區，其主要分布於雲南、貴州、廣西、廣東及越南北部，而其多樣性又以廣西及越南交界帶最高。近年因分類學者的關注，中越邊境喀斯特地貌特有的秋海棠種類不斷增加，截至今日，已自原本不到 20 種的紀錄 (Ku, 1999) 增加至近 70 種 (Ku, 2006; Gu & Peng, 2007; Liu *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008a; Peng *et al.*, 2008b; Chung *et al.*, 2014)，然因中越邊境地區尚有許多未探索的地點，新的物種很可能仍會持續被發表。整體而言，石灰岩生境中的各種秋海棠幾乎都非常侷限地生長於少數棲地，目前僅知有三個廣泛分布種，且各地區的形態具有高度變異，充分展現了喀斯特生物多樣性的特色 (Ku, 2006; Chung *et al.*, 2014)。而更重要的是，亞洲秋海棠屬的各種分子親緣地裡研究資料在近年來日漸完備 (Tebbitt *et al.*, 2006; Goodall-Copestake *et al.*, 2010; Dewitte *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2011b; Chung *et al.*, 2014)，可說是目前最適於探討喀斯特生物多樣性之起源與演化的模式類群。

(三) 自巨演化角度看喀斯特地區秋海棠的起源

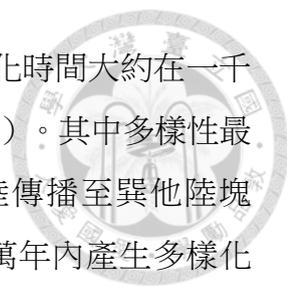
透過觀察親緣關係樹，研究者得以探討近緣物種在大時間尺度中的巨演化 (macroevolution) 過程，包括支序的起源時間、歷史中地理分布的變動，及相應於地質事件的演化等等，也能進一步對支序內物種的多樣化有初步的推論。關於秋海棠屬的親緣關係、歷史生物地理學以及物種分化的推論，在近年的研究中已逐步被釐清，對於喀斯特地貌中代表性秋海棠之認識提供了更加完整的輪廓。



圖三、簡化的秋海棠屬親緣關係樹，支序末端附帶的地理分布資訊。
參考自 Forrest and Hollingsworth (2003) 與 Goodall-Copestake *et al.* (2010)。

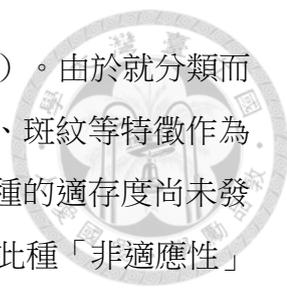
除了夏威夷秋海棠屬 (*Hillebrandia*) 的一個物種單獨存在於夏威夷外，所有的秋海棠科種類皆歸類於多樣性極高的秋海棠屬中，該類群的種數超過1,600種，是被子植物的第六大屬 (Frodin, 2004; Goodall-Copestake *et al.*, 2010; Dewitte *et al.*, 2011)。秋海棠具有開放的花型，透過昆蟲行異花授粉，在全球的分布主要集中於熱帶與亞熱帶的濕潤環境，多數呈侷限分布；除了極少數的例外，秋海棠屬在各大洲的類群均呈現單一起源。親緣關係上，亞洲與美洲的秋海棠位於同一支序，而非洲大部分的種類為此支序的外群，暗示著自非洲向亞洲與美洲傳播的歷史 (圖三) (Forrest & Hollingsworth, 2003; Clement *et al.*, 2004; de Wilde *et al.*, 2011)。

在亞洲，本屬共計有超過750種，是秋海棠多樣性最高的地區，在種類繁多的「屬」層級之下，「組」的層級成為重要分類單位。但近年經過分子親緣關係的研究，原本以子房及胎座等外部性狀所劃分的組，已被發現許多皆非單系群 (monophyletic group)，意味著過去用以分組的型態依據需要重新調整 (Tebbutt *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2011b)。有趣的是，對亞洲南方喀斯特棲地具專一性的秋海棠，在新的架構之下，絕大部分可歸類在單一支序中，根據 Chung *et al.* (2014) 最新的分子親緣關係研究，其取樣的24種石灰岩秋海棠，包含原屬於側膜組 (sect. *Coelocentrum*) 的18種，原屬於秋海棠組 (sect. *Diploclinium*) 的2種，原屬棒果組



依據分子定年，包含側膜組在內，整體亞洲秋海棠的多樣化時間大約在一千三百萬年左右(13 ± 2.55 million years ago, Ma) (Dewitte *et al.*, 2011)。其中多樣性最高的類群，是主要分布在東南亞的等翅組秋海棠，在由大陸傳播至巽他陸塊 (Sundaland) 及馬來西亞區 (Malesia) 後，此類群在近五百萬年內產生多樣化 (Thomas *et al.*, 2012)，據 Thomas *et al.* (2012) 的推測，此可能與該區域在上新世 (Pliocene) 與更新世 (Pleistocene) 週期性的海平面升降有關，因為島嶼與陸橋的反覆生成，以及對於不同微棲地的適應，即各自具方向性的選汰 (directional selection) 力量，促成了東南亞地區秋海棠的適應性輻射分化 (adaptive radiation)。由於等翅組中有許多趨同演化 (convergent evolution) 的案例，顯示特定形態對於棲地適應的重要，也解釋了等翅組秋海棠分類上的困難 (Thomas *et al.*, 2011a; Thomas *et al.*, 2011b; Thomas *et al.*, 2012)。

然而對於喀斯特地貌具有專一性的側膜組支序，呈現了頗為不同的狀況。在親緣關係樹上，側膜組對於石灰岩生境的適應呈現單一事件，並且沒有任何現生類群重新適應其他生境，在整個支序的尺度下展現了強烈的棲位保守性 (niche conservatism) (Kozak *et al.*, 2006; Wiens, 2004)。而根據分子定年，側膜組秋海棠約在一千萬年前 (10.5 Ma) 左右即出現，經過二至三百萬年對於石灰岩基質的適應，其多樣化約在七百五十萬年 (7.5 ± 2.35 Ma) 即開始，比東南亞的等翅組秋海棠還要古老得多。側膜組自適應石灰岩環境至開始多樣化的時間，正好位於新近紀 (Neogene) 中新世 (Miocene) 的中晚期，此時期正逢青藏高原的抬升開始對於周邊氣候系統產生顯著影響 (Zhisheng *et al.*, 2001)，促成了東亞的季風系統在約七百至一千一百萬年前 (7.2–11.0Ma) 開始穩定 (Zhisheng, 2000; Zheng *et al.*, 2004)，其創造的乾濕交替氣候被認為促進了同時期許多植物類群的分化，包括亞洲大陸的多種秋海棠類群 (Rajbhandary *et al.*, 2011) 以及中國及日本的瓦葦屬 (*Lepisorus*) 蕨類 (Wang *et al.*, 2012)。而更重要地，當溫濕多雨的環境出現後，進一步使亞洲南方累積了上億年的石灰岩層開始了旺盛的喀斯特作用 (Zheng, 1989)。根據 Liu (1997) 及 Liu (2003) 的資料，中越邊境喀斯特地貌發育的極盛期約在五百至一千一百萬年前 (5.09–11.21Ma)，與側膜組秋海棠多樣化的時間大致吻合。在此時期，喀斯特地貌逐漸廣布的洞穴系統與愈加崎嶇的地形一方面創造了石灰岩植物許多新的生境，一方面也因逐漸破碎的棲地造成族群間遺傳交

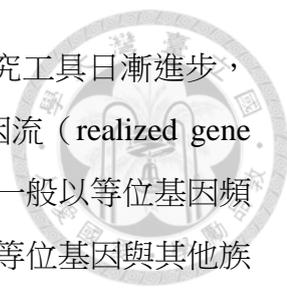


流的阻隔，很可能因而促進了側膜組的分化（Chung *et al.*, 2014）。由於就分類而言，側膜組秋海棠種類間主要以葉部形態，諸如葉形、毛被物、斑紋等特徵作為區別重點，近年關於功能性的研究指出，這些細微差別對於物種的適存度尚未發現顯著的影響（Sheue *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009），事實上此種「非適應性」的種間分化是秋海棠屬植物的常態，主要因為其種子傳播能力不佳，分布又大多侷限，在族群間的遺傳交流往往受阻，透過隨機的遺傳漂變（genetic drift）產生中性的形態分化常是重要機制（Hughes & Hollingsworth, 2008; Dewitte *et al.*, 2011）。親緣分析指出，在側膜組支序中，雖然有幾個主要分枝，但各類群間的關係仍缺乏解析度（Lin, 2011），進一步暗示著其亦具有輻射演化的歷史（Kozak *et al.*, 2006; Rundell & Price, 2009），但不同於東南亞秋海棠的適應性分化，「非適應性輻射演化」很可能才是亞洲喀斯特地區側膜組秋海棠的主要種化模式。

（四）以微演化角度看喀斯特物種的分化機制

在種的尺度以下，整體族群遺傳組成的維繫，取決於各個地區族群（local deme）間遺傳物質的交流，亦即基因流（gene flow）的大小。基因交流的不均衡，使某些群體的遺傳組成較其他群體更為類似，此時整體族群便在空間上產生了遺傳結構。探討生物在空間中的族群結構，本質上就是在觀察微演化（microevolution）的過程（Kutschera & Niklas, 2004），而種化則是微演化的一種最終結果。推論自巨觀演化樹的種化機制，應可藉觀察族群尺度的微演化狀況來獲得更有說服力的推論，其後也才能進一步藉由操弄實驗或更細緻的觀察真正「驗證」種化現象。關於微演化的研究，一般常見的作法為討論族群遺傳距離（population genetic distance）與地理資訊的關聯，或研究地方族群的空間分布（spatial distribution pattern），以從中觀察是否具有與種化模型相對應的結構。

就傳統觀點而言，生物的空間分布是區分各類種化模型的重要參考依據，諸如在重疊的分布範圍內產生棲位分化，乃至於生殖隔離的「同域」（sympatric）種化、「相鄰」分布範圍間因環境梯度而產生適應差異所促成的「鄰域」（parapatric）種化，以及因為地質事件的割裂（vicariance）作用，或偶然跨越地理障礙的傳播（dispersal）事件，造成族群間有明顯地理隔離的「異域」（allopatric）種化。這些分類用的詞彙本身即隱含著地理分布格局（geographic distribution pattern）的意



義，也即是預設地理環境的配置決定了基因流的動向。但在研究工具日漸進步，族群尺度上的遺傳結構與基因交流已能被觀測計算後，實際基因流（realized gene flow）成為種化模型的真正區分關鍵。在族群遺傳學上，基因流一般以等位基因頻率（allele frequency）為表示方法。每個世代，每個地方族群的等位基因與其他族群交流的比例 m ，便代表著基因流的大小。在二倍體生物中，當 $m=0.5$ ，意味著逢機交配（random mating），從此狀態開始的分化現象便是「同域」分化；相反，當 $m=0$ ，代表地方族群間完全沒有遺傳交流的情形，其對應的分化模式即是「異域」分化。若分化始於 $0 < m < 0.5$ ，或可定義為「鄰域」分化，也有研究者主張和同域分化均歸類為基因交流下的分化事件（divergence with gene flow），亦即 $m > 0$ （Harrison, 2012）。以基因流來定義族群的分化型式無疑是較為精準的描述，除了可避免表面觀察的誤判，並更容易以數學模型來運算。例如廣泛應用在描述族群遺傳分化的 F_{ST} 統計量（ F_{ST} ）以及其衍生的類似參數，便可用於計算基因流的 m 值。由於 F_{ST} 或類似的參數是實際研究中較容易測量的指標，例如透過各地方族群中的異型結合度（heterozygosity），或計算分子標記中的遺傳多樣性（genetic diversity），均可推估出 F_{ST} ，如此基因流的計算以及分化模型的判斷便不再受限於直接觀測。在族群分化的案例中，若各個族群間的基因流可以隨機地傳遞，這類模型稱為島嶼模型（island model）（Slatkin, 1991）。但現實中，由於地理距離的不同，基因流在每個地方族群間具有不同的傳遞機會。最常見的一種情形，便是相隔越遠的族群之間越難以有基因的交流，於是鄰近的族群間遺傳資訊較相近，相互遠離的地方族群間則愈漸疏離，這類模型稱為「距離隔離模型」（isolation by distance model），很早便由 Wright 所建構（Wright, 1943）。

距離隔離模型是可以推導出種化現象的（Mayr, 1942）。在此模式之下，相隔越遠的族群間基因流越小，在兩個遠端的族群間便可能出現生殖隔離；由於把地理距離視為基因流的阻隔，此情況也屬於異域種化。距離隔離種化模式最經典的案例為環物種（ring species）的產生（Cain, 1963），亦即族群的距離隔離分化朝著環形的地理結構分頭進行，當整體族群的兩端終於在對向互相接觸時，此二地方族群已經產生了種化現象。儘管現在尚不確定是否有真正符合相關理論的環物種，但仍有相當接近的案例。Irwin *et al.*（2001）利用形態、鳴聲波形以及分子證據，證實柳鶯屬的複合種群 *Phylloscopus trochiloides* 從青藏高原南緣以漸進的遺傳

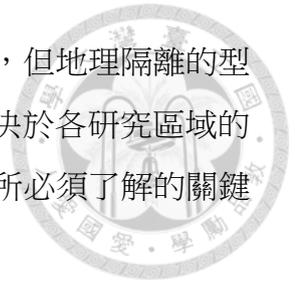
分化，呈東西兩路環形向北推進，最後在西伯利亞中部形成兩個具生殖隔離的族群（Irwin *et al.*, 2001）。像這樣二度接觸的分化族群，其遺傳距離反而會與地理距離呈現負相關。藉由觀察相關性，我們可推論族群的種化程度（Suatoni *et al.*, 2006; Fouquet, *et al.*, 2007）。

距離隔離模式所造成的分化，在實際研究上，主要藉由遺傳距離與地理距離的相關性檢測來驗證。其中族群遺傳距離的運算是關鍵步驟，其不同於我們熟知的，分子遺傳上所指的「遺傳距離」（genetic distance），而是評估不同地方族群之間的平均的遺傳多樣性差異。此時可直接運用 F_{ST} 值或類似的統計量，將任兩個地方族群作為整體族群來估算兩兩分化的程度（Hedrick, 2005）。須注意的是，遺傳距離的多寡取決於天擇與遺傳漂變的作用。若為適應性分化，遺傳距離應與環境因子的變化較有關係；而距離隔離模式的出現，除非環境的變化是梯度性的連續分布，否則理當屬於非適應性的分化（Gittenberger, 1991）。

秋海棠屬的族群遺傳已有若干研究案例（Matolweni *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2003; Hughes & Hollingsworth, 2008; Twyford *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2014）。綜觀而言，無論類群或棲地型式，本屬雖具開放式、單性的花朵，屬於以蟲媒行異花授粉的型態，但大部分物種的族群分布均十分狹隘，少數廣布種在各地族群間亦往往呈現高度的形態變異，而各個針對廣布種秋海棠所進行的研究，也大多證實地方族群遺傳結構的高度分化，此現象應與秋海棠屬植物種子傳播能力不佳的特性相關（Tebbitt *et al.*, 2006; Hughes & Hollingsworth, 2008），一般秋海棠物種主要藉由風力與水力，造成短距離的濺灑式播種（Tebbitt *et al.*, 2006），而少數族群間分化不明顯之廣布型物種，則多半具有漿果狀，利於動物傳播的果實形態（Tebbitt *et al.*, 2006; Hughes & Hollingsworth, 2008）。

由於上述特性，目前普遍認為地理隔離所造成的異域分化，應在多數秋海棠類群的演化上扮演非常重要的機制（Matolweni *et al.*, 2000; Tebbitt *et al.*, 2006; Hughes & Hollingsworth, 2008; Thomas *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2014）。據此，Hughes and Hollingsworth（2008）針對南非廣泛分佈的森林性秋海棠物種 *Begonia sutherlandii* 進行族群分化的研究，並進一步預測，秋海棠族群間應呈現距離隔離的分化模式，並可由此判斷該物種處於異域種化的過程。在廣泛取樣並計算遺傳距離後，發現整體族群呈現高度的分化，進一步檢視其與地理距離的關係，得到

顯著的正相關，確認了其預測。儘管許多案例呈現類似的結果，但地理隔離的模式、天擇及漂變的作用強弱，以及整體族群的變動歷史，仍取決於各研究區域的不同時空背景與物種族群的互動，此才是種化研究與保育策略所必須了解的關鍵內容。



(五) 研究目標

不同於東南亞地區發育晚期的喀斯特地貌，在中越邊境的亞熱帶喀斯特區域，其發育過程屬於壯年時期，崎嶇地形的密度較高，峰林峰叢為代表性的景觀，只有在東南緣才可見相隔遙遠的殘丘。在此時空背景下，物種的分布不如熱帶喀斯特孤立如島嶼，廣泛分布的物種可能正經歷著分化的過程，而各地族群可能正處於種化前的階段。在中國廣西壯族自治區，著名的「桂林山水」景緻，實際上便是亞熱帶地區發育中晚期的喀斯特地貌之代表。此地景遍佈廣西的北部與西部，佔有全區約40%的面積（圖二）。其整體發育的時序相當漫長，從古老石灰岩層的累積，地勢的緩慢抬升，雨水在裂隙中逐步的溶蝕作用，乃至巨大窪地的塌陷，歷經上千萬年，接著群聚的峰叢景觀才逐漸形塑而成，而後才進一步有各自獨立的峰林地貌衍生出來。依據沉積物的古地磁學估算，廣西的峰叢與峰林地貌大約於新近紀的中新世（10–20Ma）便開始發育至今（Waltham, 2008），經過漫長的歲月後才形成現今複雜的喀斯特景觀。在峰林、峰叢邊緣的坡腳，地下河道經抬升與塌陷作用形成的半開放岩洞，或環繞著岩峰的石灰岩基質森林底層，便是側膜組秋海棠最主要的分布棲位（Ku, 2006）。

就巨演化的觀點，透過整個支序的親緣關係樹，我們了解到側膜組秋海棠的多樣化大致與整個中越邊境喀斯特地貌的發育時序吻合，且呈現單一次的適應事件，並沒有已知的類群二度適應其他棲地，意味著側膜組秋海棠對於棲位的保守性（Chung *et al.*, 2014）。而其支序呈現多叉狀（polytomy），並且在物種的分類上主要以非功能性的葉部形態差異作區分，暗示著「非適應性輻射演化」的歷史，而自其大多一山一種、一洞一種的侷限分布樣式，可推論傳播能力之限制與破碎的地形，造就了重複出現的割裂事件，促進了廣泛的異域種化現象。

如從整個類群中，選取一可能正經歷著潛在分化的廣布種類來進行微演化分析，諸如族群遺傳結構觀察、親緣地理的分析、分子標記的中性檢測以及歷史族

群量的變動推算等，相對應於上述推測，可預期的結果應是高度的族群分化、各地區族群內的遺傳多樣性應遠低於族群間的變異度，而相鄰區域的遺傳組成也應較遠離的樣本更為相近，呈現顯著的距離隔離模式。此外，若經歷喀斯特地貌發育的高峰期，由於棲地增加，有效族群可能會有相應的擴張事件。

在側膜組內，目前僅知有三種秋海棠屬於廣泛分布型，包括分布於廣西西北部、貴州南部，雲南東部及越南北部的昌感秋海棠 (*B. cavaleriei*)，分布於廣西中北部至廣東西部的癩葉秋海棠 (*B. leprosa*)，以及廣布於廣西中北部鹿寨秋海棠 (*B. luzhaiensis*) (Lin, 2011)。就形態而言，鹿寨秋海棠擁有具翅的蒴果與側膜胎座，為典型的側膜組秋海棠，最具有代表性。昌感秋海棠與癩葉秋海棠過去則因特殊的果實與胎座形式，曾分別被置入秋海棠組 (sect. *Diploclinium*) 與棒果組 (sect. *Leprosae*) (Shui *et al.*, 2002)。鹿寨秋海棠不同地區的族群間，類似於其他廣布種秋海棠，同樣呈現顯著的形態分化，在植株大小、葉片顏色與斑紋的深淺，葉片毛被疏密程度、總花梗的毛被物、花被顏色、花柱之癒合程度等特徵皆存在地區性的差異 (圖五)，如廣西的臨桂縣、鳳凰縣等地區性族群均曾被認為應區分為變種 (variety) (Ku, 2006)。依據 Lin (2011) 所建構的親緣關係樹，包括形態變異的地方族群，鹿寨秋海棠在整個側膜組中呈現單一分支，但與其他支序間的關係尚不明確。而分子定年的結果，此分支的出現時間點大約為二至五百萬年 (Chung *et al.*, 2014)。

由於其分布與性狀的代表性，本研究選取鹿寨秋海棠為研究材料，並依上述情境作出以下假設：

- (1) 在中越邊境石灰岩地區持續的喀斯特作用下，廣布種秋海棠的遺傳結構應呈現高度分化。
- (2) 在變化大致類似的廣大岩溶地貌中，據非適應性型態分化的推論，在物種傳播能力不佳而基因流受阻的前提下，族群間應會呈現顯著的距離隔離模式。
- (3) 各族群的歷史動態應會反映中越邊境亞熱帶喀斯特地貌發育的過程。

運用適當的分子工具，本研究藉驗證上述假說，進而推測其他喀斯特石灰岩物種之種化歷史，及其高度生物多樣性之形成機制，並對於其保育提供實際參考資料與相應的策略。



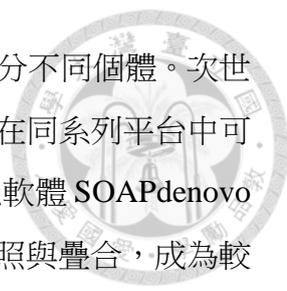
二、材料與方法

(一) 微衛星體開發

微衛星體 (microsatellite), 又稱為簡單序列重複 (simple sequence repeat, SSR) 或短縱列重複序列 (short tandem repeat, STRs), 是一到十個特定鹼基排列樣式 (motif) 的多次重複, 其重複數目的不同在個體間具有高度變異性, 且在真核生物的基因組中含量非常豐富 (Li et al., 2002; Takayama et al., 2011), 另因其具有共顯性 (codominance) 的特點, 在族群遺傳學上是最常被應用的分子標記 (Sunnucks, 2000)。過去側膜組秋海棠尚未有過微衛星體標記的報導, 為了較細緻地研究鹿寨秋海棠族群, 本研究預計開發足夠數量的微衛星體標記, 並期望可應用在其他側膜組秋海棠之族群研究。

在傳統上, 非模式物種的微衛星體開發是一項相當耗時費力的工作, 且特定的微衛星體往往僅能應用於單一物種, 成為應用上相當大的限制 (Squirrell et al., 2003; Zane et al., 2002)。近年來發展的次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 技術, 可以同時進行成千上萬的 DNA 片段定序 (Ansorge, 2009; Metzker, 2010), 而後從大量輸出的序列資料中直接探勘需要的分子標記, 相對於傳統方法更為省時且便宜, 因此微衛星體的開發隨即成為次世代定序最主要的應用之一 (Castoe et al., 2012; Malausa et al., 2011; Takayama et al., 2011)。為了尋找可通用於其他側膜組秋海棠的微衛星體, 本研究選擇應用此定序技術開發表現序列標識微衛星體 (expressed sequence tag-simple sequence repeat, EST-SSR), 這種微衛星體存在於轉錄體 (transcriptome) 中, 亦即會被轉錄的 DNA 片段。因多半具有特定功能, 包夾著微衛星體的側翼序列 (flanking region) 在演化上不會有過大的變異, 亦即具保守性 (conservatism), 該特性使此種微衛星體的引子對 (primer) 較容易可為各近緣物種間共同使用 (Coulibaly et al., 2005; Ellis et al., 2006; Ellis et al., 2007)。

本研究採用栽植於中央研究院溫室的兩株鹿寨秋海棠個體 (CIP18732 及 CIP18735) 進行 EST-SSR 之開發。分別使用植株之嫩葉、雄花苞與新鮮果實為材料, 將組織用液態氮快速冷凍後磨碎, 以 PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) 進行 RNA 萃取, 以取得秋海棠的轉錄體。經過品質測試後, 將 RNA 反轉錄為 cDNA, 接著將其以超音波震碎為大約 300bp 的片段, 並在片段一端接上轉接序列 (adaptor),



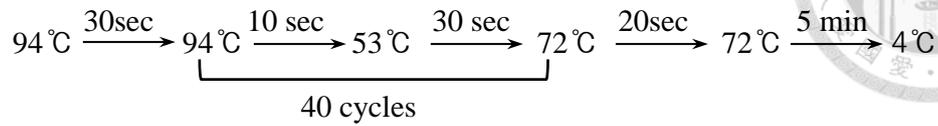
令其可附著於定序的晶片上，另外加上一段 barcode 序列，以區分不同個體。次世代定序系統採用 Illumina MiSeq 平台，其具有適當的輸出量，且在同系列平台中可定序較長的片段，有利於序列較完整的拼湊。輸出的讀序(read)以軟體 SOAPdenovo (Luo et al., 2012) 分析，其可將所有單邊的讀序進行初步的對照與疊合，成為較完整的重疊序列 (contig)，若重複量足夠確認完整性，便可成為較長較完整的序列資料。定序結果以 SSRIT (Temnykh et al., 2001) 程式進行資料比對，搜尋重複次數大於 5 的 di-, tri-, tetra-, penta-, 以及 hexamer 的微衛星體樣式，並將包含該微衛星體的片段編號後整理為表格方便對照。選取足夠數量的片段，以軟體 Primer3 (Rozen & Skaletsky, 1999) 在側翼序列設計適用的引子對，以進行隨後的篩選。為確認微衛星體具有足夠的多型性，本研究以廣西的六個鹿寨秋海棠族群進行測試篩選，並使用癩葉秋海棠的兩個族群做跨物種的測試。分別以待測試的引子對進行 PCR 擴增後，定序確認其側翼序列的保守性，以及微衛星體部分的長度多形性。通過測試的微衛星體引子對，便依照其序列重新合成帶有螢光的引子對，以利後續的基因型鑑定 (genotyping)。在進行過族群樣本的基因型鑑定後，進一步使用軟體 Genepop (Raymond & Rousset, 1995) 進行連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) 的檢測，以確認不同的微衛星體基因座是否有關連性。

(二) 取樣、定序與基因型鑑定

為瞭解鹿寨秋海棠的整體族群遺傳結構，本研究於廣西喀斯特地貌中進行各地的族群式採樣，根據現有採集資訊，共在廣西中北部至東北部取樣了 6 個族群，結合過去野外採集所得的 3 個族群樣本，以及數個不同採集點的個體，總共取樣了 18 個不同地點的族群。每處均採集新鮮嫩葉，並置入硅膠 (silica gel) 中乾燥保存，以利 DNA 的萃取。每個族群均採一株個體做為引證標本，存放於中央研究院植物標本館 (HAST)，並附上採集時的經緯度資訊以供後續參考。採樣數量與地點見表五。

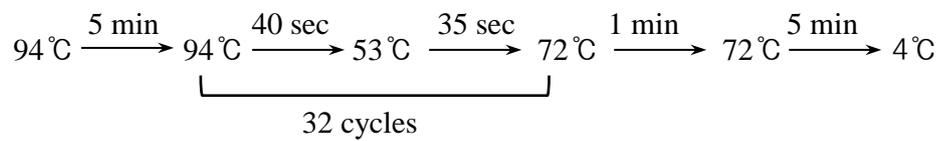
所有樣本均以 CTAB 法萃取基因體 DNA (Doyle, 1990)，以供後續 PCR 擴增使用。因側膜組秋海棠的 DNA 含有較多次級代謝物與有機酸，將葉片磨成粉狀後須先以 1ml 0.2X 之 CTAB 溶液清洗後再行萃取。

數量大於4的族群樣本均使用前一節所開發之16組微衛星體之螢光引子進行PCR擴增，流程設定如下：

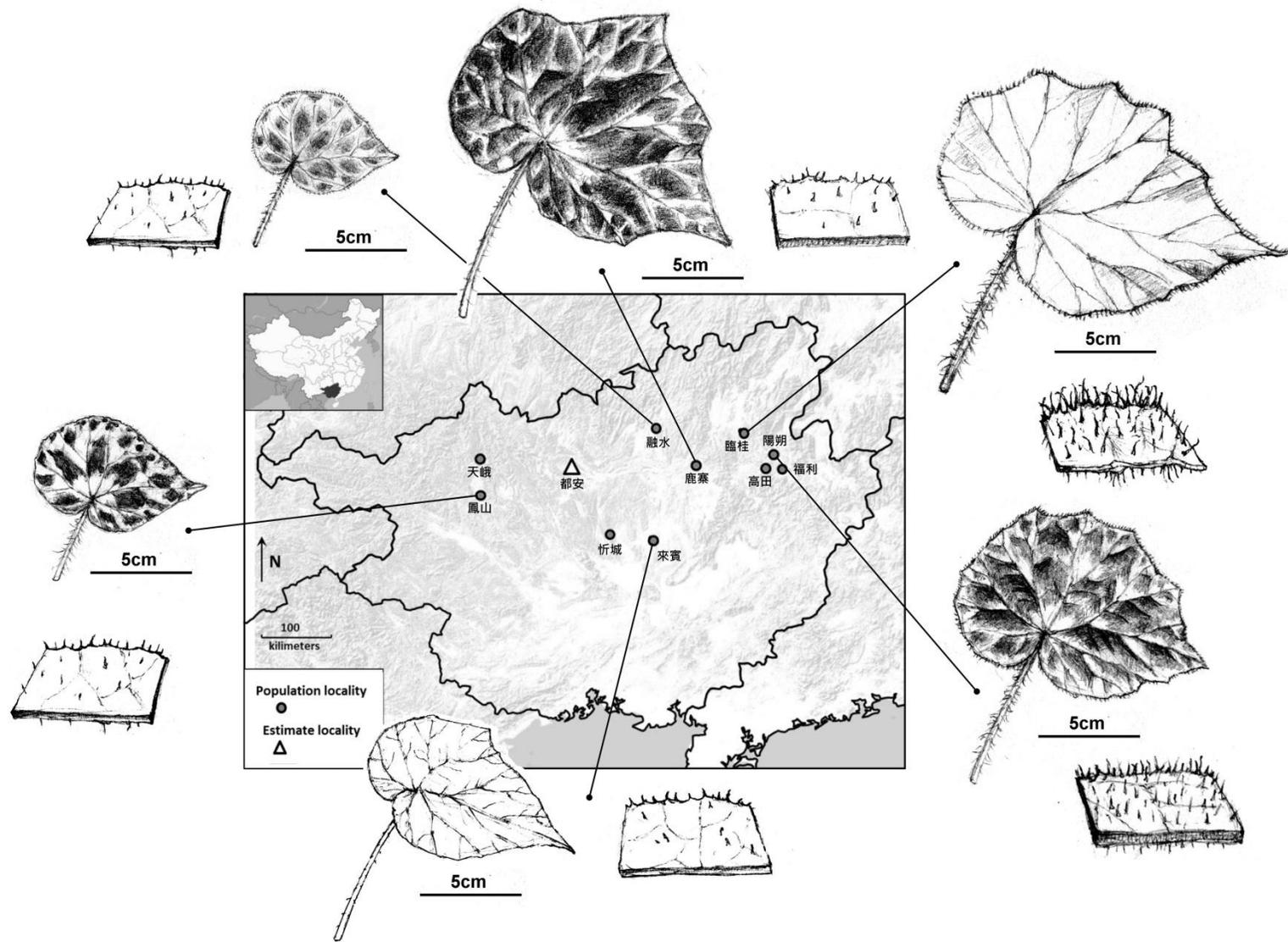


微衛星體產物擴增後隨即進行基因型鑑定（genotyping），將所得之等位基因資料編輯整理成各種格式後，供後續分析軟體使用。

另針對所有樣本進行葉綠體*trnC-ycf6*片段之擴增，流程如下：



將擴增的產物定序後，依據位點的同源性整理成適當的排列表（alignment）以供後續的比較分析。



圖五、本研究採集族群之分布，以及各地區植株葉形、斑紋與毛被物變異。都安地區的族群因詳細點位不明確，使用引證標本資訊推測大致位置並以三角形標示。



(三) 族群遺傳參數統計

依據微衛星體的各等位基因頻率，以軟體 FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001) 統計每個基因座及每個族群的期望異型結合度 (expected heterozygosity, H_E)、實際異型結合度 (observed heterozygosity, H_O) 以及等位基因數量，亦稱等位基因豐富度 (Allelic richness, A_R)、整體等位基因數量 (total number of detected alleles, N_A) 以及族群近交係數 (inbreeding coefficient, F_{IS})，另以軟體GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) 進行每個基因座偏離哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HW) 的顯著性檢測。

(四) 族群遺傳結構

為了界定族群，並確認每個取樣地區內個體的遺傳組成是否來自同樣的祖先群體，針對16組微衛星體的資料，使用STRUCTURE version 2.2 (Pritchard *et al.*, 2007) 軟體進行貝氏群聚分析 (Bayesian clustering algorithm)。分析時預設沒有顯著偏離哈溫平衡，使用混合模型 (admixture model)，並以原始的取樣資訊作為分群的參考，且依據先前連鎖不平衡的檢測，認定每個基因座的等位基因頻率是獨立的。以100,000次的蒙地卡羅馬可夫鏈 (Markov chain Monte Carlo, MCMC)，就不同的歸群數量 (K) 來逐一運算其後驗機率值 (posterior probability)， $\ln P(D)$ (Pritchard *et al.*, 2007)，據此將微衛星體的資料進行分群，最後捨棄 (burn-in) 前10,000次的運算，以得到較穩定的結果。依據本研究的取樣狀況，預設 K 介於1與13 (取樣族群數量加3) 之間，並算出每個族群對應於各分群的權重值 (membership coefficient, Q) 以觀察分群的完整性。 $\ln P(D)$ 微分後的二階變化率 (second-order rate of change) 以統計量 ΔK 表示 (Evanno *et al.*, 2005)，利用軟體STRUCTURE HARVESTER (Earl, 2012) 進行每個 K 值十次的運算，並做出變化率的折線圖以利判斷最適當的分群結果，並再次以STRUCTURE version 2.2針對每個最佳的 K 值均重複運算三次，以確認其可信度。

為進一步了解族群間的分化程度，使用軟體FSTAT version 2.9.3.2，參考Weir & Cockerham (1984) 估算 F_{ST} 的方法，藉原用以推估族群內兩個體間遺傳組成關聯性的參數 " θ " (Weir & Cockerham, 1984) 來推算兩兩族群間的分化程度 (pairwised F_{ST})。除對每一個微衛星體基因座運算，同時也推估整體的 F_{ST} ，並以隨機排列不同族群之基因型10,000次來檢測其是否顯著偏離逢機交配。使用軟體

GENEPOP來計算類似於 F_{ST} 的 R_{ST} 統計量，以微衛星體中簡單序列的重複次數來進一步辨別等位基因差別程度（Slatkin, 1995），並同樣以隨機排列基因型的方式來檢視分化的顯著與否。由於微衛星體是變異較大的分子標記，為避免過多的基因型導致 F_{ST} 的估算僅由於統計因素而過小或甚至不顯著，本研究因此將 F_{ST} 值標準化為 F'_{ST} ，參考公式如下（Hedrick, 2005）：

$$F'_{ST} = \frac{F_{ST}(k - 1 + H_{EMAX})}{(k - 1)(1 - H_{EMAX})}$$

其中 k 為族群數量， H_{EMAX} 為在所有族群中最大的期望異型結合度。此計算可使用程式RECODE（Meirmans, 2006）協助將原始資料轉換，而後再用FSTAT計算。

（五）分子遺傳變異數分析

本研究使用演化速率較慢的葉綠體序列 *trnC-ycf6*，以不同時間尺度來觀察鹿寨秋海棠的遺傳結構。參考微衛星體建構的遺傳分化單位，依據相對位置將整體族群區分為三個地理區域，分別為桂東（East Guangxi）、桂北（North Guangxi）以及桂西（West Guangxi）。利用軟體 ARLEQUIN version 3.5 進行分子遺傳變異數分析（Analysis of molecular variance, AMOVA）分析，以估算三個地理區域間的遺傳變異程度（variation among areas）、三地理區域內各自族群間的遺傳變異度（variation among population within areas），以及地理區域內各族群中平均的遺傳變異程度（variation within population），每個分析均進行矩陣內 10,000 次的無母數隨機重複檢定（non-parametric permutation procedure）。此分析有助於了解喀斯特地貌中階層性的遺傳結構，並從中討論可能的分化模式。

（六）距離隔離模式檢驗

為了解喀斯特地貌中廣布族群的分化機制，地理距離與遺傳距離之相關性是本研究的關鍵所在，亦即地理距離矩陣（geographic distance matrix）與族群遺傳距離矩陣（population genetic distance matrix）的迴歸分析。這種矩陣間的相關性迴歸一般常運用的方法為Mantel相關性檢定（Mantel test），此方法會將矩陣的行與列多次地隨機重新置換並分別計算標準化的相關係數（ R_{XY} ），藉重複試驗所得的機率分布來判斷兩矩陣最可能的相關性。首先依據採集時記錄下的GPS點位，用軟體 GDMG（Ersts, 2008）來建立地理直線距離的矩陣，並設定單位為公里（km）。族群遺傳距離方面，則依據微衛星體的等位基因資料，使用GenAlEx version 6.0

(Peakall & Smouse, 2006) 建構兩兩族群間標準化後的 F'_{ST} 矩陣。另為使資料不致過於離散，地理距離改以 $\ln(km+1)$ 重製矩陣， F'_{ST} 則以 $F'_{ST}/(1-F'_{ST})$ 取代(Hughes & Hollingsworth, 2008; Nakamura, *et al.*, 2014)。兩矩陣間的Mantel test以GenAlEx version 6.0進行9,999次的隨機重複檢驗，結果以圖表呈現。

(七) 基因單型網狀圖建立

為探討各地區樣本間的親緣關係，本研究使用 *trnC-ycf6* 序列矩陣，以 TCS version 1.21 軟體 (Clement *et al.*, 2000)，其透過 95% 的儉約準則 (95% parsimony criterion) 來建構基因單型網狀圖 (haplotype network)。此方法最適合用於經歷輻射演化事件的近緣種或種內族群的分析，單一個祖先基因單型 (haplotype) 可同時連結到多個衍生的基因單型，進一步透過基因單型在地理上的分布，理論上便能重建族群間分化的脈絡。在序列處理上，為納入所有可提供資訊的變異，除了點突變 (point mutation) 外，簡單重複序列的單一重複樣式或插入/刪除 (insertion/deletion, indel) 均視為一次突變事件，將其縮減為單一個鹼基，並定義出現/消失兩種特徵狀態。此外，亦將間隔 (gap) 當作除了四種核苷酸外的第五種特徵。而在排序尚無法確認同源性的位點，則將之刪除。

為確定鹿寨秋海棠的祖先基因單型，本研究依據前人所建構的親緣關係樹選定數個外群加入分析 (Lin, 2011)，由於鹿寨秋海棠與其他支序間的關係並未明朗，所以在側膜組其他與之最近緣的分枝中個別選取一至數個物種作為外群，包含了星果草葉秋海棠 (*B. asteropyrifolia*)、癩葉秋海棠 (*B. leprosa*) 及麗紋秋海棠 (*B. kui*) 等物種。

(八) 巢狀支序分析

根據前述分析所得之基因單型網狀圖，本研究進一步以巢狀支序分析 (nested clade analyses, NCA)，來探討每個基因單型以及網狀圖中各階層的分支可能經歷的分化歷史 (Templeton *et al.*, 1995)。首先將網狀圖內的每個分支由末端至其最近分歧點劃為一個群體，以此方式可重新建立一個以此種群體為單位的網狀圖，並可在此新的網狀圖中再進一步劃分出更高階層的群體，以此步驟依序定義出的每一個群體即為「巢狀支序」(nested clade)。每個基因單型與推測的基因單型可稱為第零階層 (zero-step clade)，包含基因單型的為第一階層 (one-step clade)，



而包含第一階層的支序則為第二階層 (two-step clade)，依此類推，直到最後劃出包含整個網狀圖的整體支序 (total cladogram) 為止。使用軟體 GeoDis version 2.6 (Posada *et al.*, 2000) 計算三個參數：每個巢狀支序內所含各單位到其地理分布中心的平均距離，稱為支序距離 (clade distance, D_c)，代表整個支序的地理分布範圍；各單位與包含它們的上一層巢狀支序分布中心間，平均的地理距離，稱為巢狀支序距離 (nested clade distance, D_n)，代表整個之序分化時的遷移。另外，區分網狀圖中的末端支序 (tip clade) 與內含支序 (interior clade)，便可計算兩者的距離比較 (interior-tip comparison, I-T)，即在特定層級中，末端與內含分枝 D_c 與 D_n 值的差異。因應每階層巢狀分枝所經歷的不同歷史事件，諸如割裂、長距離傳播、距離隔離、族群擴張等等，在這些統計數值上均會有對應的變化，透過最近更新的參考檢索表 (inference key)，便可以對這些統計量加以解讀。

(九) 中性檢測

為偵測歷史中鹿寨秋海棠族群量變動的事件，本研究利用軟體 ARLEQUIN version 3.5 進行中性檢測 (neutrality test)，計算兩個關於歷史族群量變動的參數：Tajima's D 統計量和 Fu's F_s 統計量。

一般在推算序列的核苷酸多樣性 (nucleotide diversity, θ) 時，變異的位點數 (k) 及兩序列間平均差異程度 (π) 是兩種不同評估的角度，可理解為前者著重在變異的類型，後者著重在變異的程度。Tajima's D 藉由比較上述兩種角度所推估的核苷酸多樣性是否有顯著差異，來作為族群經歷特殊微演化趨力的指標。例如，依本研究所選用的分子標記，在預設天擇作用可忽略下，若變異的類型相對多而程度相對少，暗示著族群經歷擴張事件而有新的突變位點在近期內產生；若變異類型相對少而程度相對多，暗示著瓶頸效應 (bottleneck effect) 或偶然傳播造成的創始者效應 (founder effect)，使許多變異位點隨機地丟失而並未被存留在族群中。

Fu's F_s 則預設在所有序列的隨機抽樣檢測中，若每個位點的突變率均相等且可重複變異 (即 infinite site model of mutation)，所抽樣觀察的等位基因多樣性應近似或小於整體的等位基因多樣性。此情形的機率若顯著高，代表等位基因多樣性由眾多具類似變異位點的序列所貢獻，並且其間變異程度小。在沒有天擇作用下，暗示著類似瓶頸效應的事件；此機率若低，代表有許多特殊的等位基因存在少量序列中，可能意味著族群的擴張事件。

Fu's F_S 的檢測一般被認為比 Tajima's D 更為靈敏，但在族群沒有經歷特殊演化趨力的預設下，上述兩個統計量應都不會顯著偏離 0。兩者的顯著性檢測亦使用 ARLEQUIN version 3.5，藉由 1,000 次的隨機取樣，配合溯祖模擬的運算（coalescent simulation algorithm）加以檢測，在此評估方法中，在 5% 信心水準下，P 值小於 0.02 即表示顯著偏離虛無假設（Excoffier & Lischer, 2010）。

（十）差異分布分析

另外一個常用於估計較近期尺度族群量變化之檢測為核苷酸差異分布分析（mismatch distribution analysis），類似於 Tajima's D ，差異分布分析意指觀察任兩樣本間序列差異量的頻率分布，若差異程度不高的序列頻率分布呈單峰狀，暗示著近期擴張事件尚未累積足夠的序列間差異，反之若差異程度大的序列亦有較高頻率的峰值，使分布呈雙峰狀，則代表有較長時間累積的突變存在，比較支持長久穩定的族群量（Schneider & Excoffier, 1999）。除了頻率分布圖的觀察，差異分布分析亦提供統計上的數值佐證，其預設近期的有效族群量 N_0 在一段時間 t 後擴張為另一個有效族群量 N_1 ，所以相應的核苷酸多樣性在替換率（substitution rate） μ 不變的狀況下便會由 $\theta_0 = N_0\mu$ 變為 $\theta_1 = N_1\mu$ （單倍體分子標記的狀況下），而其差異量為 $\tau = 2\mu t$ 。另一種模型則為空間擴張（spatial expansion）模型，其預設 $\theta_0 = N_0\mu = \theta_1$ ，當 τ 值顯著大於零，意味著族群分布範圍擴張的事件。本研究使用 ARLEQUIN version 3.5 自既有資料的 θ 值及序列間的差異頻率分布計算有效族群量 N_0 及 N_1 ，進而推算出 τ 值（Roger & Harpending, 1992）。接著使用空間擴張模型，統計出兩兩序列間，每個位點變異量的離差的平方和（SSD, sum of squared deviations），以便藉此判斷既有資料是否顯著偏離前述預期，若統計上沒有顯著偏離空間擴張的假設，即可進一步配合替換率與世代長度（generation time）來推算近期族群分布變動的時間點。差異分布分析另會估算在近期 N_1 的有效族群量中的基因流比例 m ，以及貢獻基因流的遷移個體數 $M = N_1m$ （單倍體分子標記狀況下），配合預期擴張事件的顯著性檢定，大於 1 的 M 值亦可作為分布範圍擴張的另一種指標（Nakamura *et al.*, 2014）。

(十一) 替換率估算與貝氏天際線分析

替換率的估算可配合貝氏天際線 (Bayesian skyline plot, BSP) 的分析。使用軟體 BEAST 1.7.5，藉由塑祖過程 (coalescent process) 的運算，來模擬最近共同祖先 (most recent common ancestor, MRCA) 以降的歷史族群變動情形 (Drummond *et al.*, 2005; Drummond & Rambaut, 2007)，其呈現上以分段的線性函數 (piecewise linear function) 表示，並設定 10 個控制點 (control point)。 *trnC-ycf6* 的序列矩陣以軟體 MEGA 5 (Tamura, 2011) 確認資料符合分子鐘 (molecular clock) 的特性，即每個分支的演化速率並不偏離一致性，同時以 BIC 準則 (Bayesian information criterion, BIC) 來評估各種分子演化模型的適當性。最終在貝氏天際線的分析中，最適當的選擇為 HKY 模型，鹼基的頻率分布設定則依據經驗準則 (empirical)。分子演化速率參考其他葉綠體研究的資料，平均替換率為每年每個位點 1.01×10^{-9} 次 (Graur, 2000)，其機率設定為常態分布，信賴區間數值設定為 3×10^{-10} ，據此由軟體估算本研究序列的突變率。另在族群量的估算上，機率設定為均勻分布，範圍由 1×10^2 至 2×10^6 株個體。設定 100,000,000 次 MCMC 運算過程，每 1000 個運算取樣一次。運算結果由軟體 TRACER 1.5 (Drummond & Rambaut, 2005) 讀取，捨棄前 10% 的運算以得到較穩定的數據，並依據結果繪製貝氏天際線的圖表。在此處亦會得到推估替換率 μ 的機率分布圖，若圖形大致符合常態分配，取其平均值或中位數不會有太大差異，但若有單尾的分布情形，則取其中位數，作為前述差異分布分析中，推估近期擴張事件的參考。



三、結果

(一) 微衛星體開發結果

萃取自兩株個體的 RNA 共分成三個基因庫 (library)，分別標示為 A、B 以及 C，其中 A、C 分別來自於個體 *CIP18732* 的嫩葉與新鮮雄花，B 來自 *CIP18735* 的發育中的果實。萃取之 RNA 以分光光度計測試之 A260/A280 比值，濃度及總量見表一。定序前將 AC 基因庫混合，並與 B 基因庫以一樣的注入量同時上機定序。Illumina MiSeq 平台的定序結果，每個片段自其兩端共得到 $2 \times 90\text{bp}$ 的讀序長度，基因庫 AC 與 B 分別得到 8,425,431 及 3,885,990 條讀序，95.34% 均符合 Q20 的標準 (即每個鹼基的錯誤率在 1% 以下) 經過 SOAPdenovo 的拼接 (assembly)，基因庫 AC 與 B 分別組合成 40,226 及 28,454 條重疊序列 (contigs)，而相互混合再次拼接後，共得到 44,368 條重疊序列，其長度分布見圖六，最長的序列有 15769bp，對短者為 227bp，平均 864bp，N50 長度為 1,196，此為一判斷拼接品質的標準，意指自最長重疊序列累加到總長度 50% 時的重疊序列長度 (表二)。從 44,368 條重疊序列中，搜尋得 5,602 條含有 EST-SSR 基因座的序列，平均長度約 665bp，相當足夠設計微衛星體的引子對。根據微衛星體的重複樣式以及重複次數排序後，共設計了 60 組引子對，從中篩選出 17 個具穩定多型性的微衛星體。而其中有五個亦可用於癩葉秋海棠的擴增，且具有多形性 (表三)。值得注意的是，

表一、RNA 樣本的品質測試結果

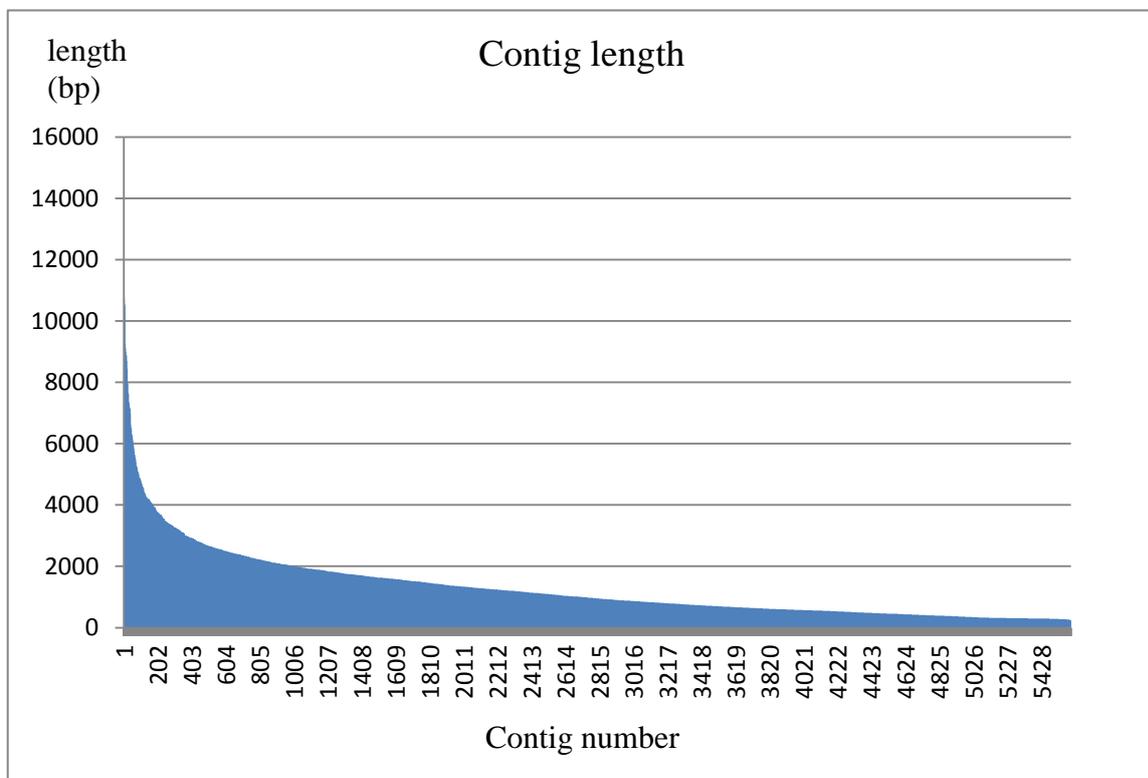
Sample ID	Concentration (ng/ μl)	A260/A280	Total amount (μg)
A1	218.2	1.98	4.15
A2	253.5	1.98	4.82
A3	212.4	1.82	4.04
A4	186.2	1.85	3.54
B1	258.2	1.98	1.29
B2	366.0	1.95	1.83
B3	512.3	1.97	2.56
B4	535.8	1.94	2.68
C	230.9	1.80	1.15
Total A	218.8	1.97	-
Total B	414.8	2.10	-

測試過程中亦有四組引子對僅能用於癩葉秋海棠的擴增，此現象可能與插入子 (intron) 的影響有關。

依據連鎖不平衡檢定的結果，A11 與 B4 基因座呈現顯著的連鎖不平衡，故在後續分析中僅用 A11 與其他 15 個基因座的資料 (表三)。此 16 個微衛星體標記在測試時以其螢光排列，故後續整理時分別命名為：*BLZ001*(A5)、*BLZ002*(A11)、*BLZ003*(B15)、*BLZ004*(B5)、*BLZ005*(B28)、*BLZ006*(A15)、*BLZ007*(B17)、*BLZ008*(A18)、*BLZ009*(B8)、*BLZ010*(B29)、*BLZ011*(A20)、*BLZ012*(B10)、*BLZ013*(B20)、*BLZ014*(B6)、*BLZ015*(B12)、*BLZ016*(B27)。

表二、所有讀序 (read) 經拼接 (assembly) 後的序列長度統計

Library	Contig number	N50 (bp)	Minimum (bp)	Maximum (bp)	Average (bp)	Total (bp)	GC content (%)
AC	40,226	1,199	226	19,335	874	35,152,737	42.2
B	28,454	1,065	229	24,371	850	24,173,200	42.9
Mix	44,368	1,196	227	15,769	864	38,350,207	42.1



圖六 . 經拼接後，所有鹿寨秋海棠重疊序列(contig)的長度分布圖。

表三、以鹿寨秋海棠開發出的 23 組 EST-SSR 引子對。以癩葉秋海棠(*B. leprosa*)做跨物種擴增測試：可通用者標註**，僅能用於鹿寨秋海棠者標註*，僅能用於癩葉秋海棠者標註！

Locus	product size	Repeat motif	Left Primer	Right Primer
!A4	~169	(TC) ₂₁	TCTCCATTGGATATTTTGTCTCC	TCCATTGGATTTTGTGAGCA
*A5	~218	(GA) ₂₀	TCGGTTGAGCTGCTCTTTTT	CCGCATGAATGCCTCTTATT
**A11	~182	(TCT) ₁₁	AGCTCCCTCTTCCATCTTCC	CGTGTCCCTCCTTCCCTACAA
*A15	~230	(CGAAC) ₅	GACGAACGAAGGGTACTGT	CGGCTTCAGATTACCAGGAC
!A16	~164	(CTTCTC) ₅	GCATATGCATCGTCGGAGTA	GCTGAAAAGAACAGGCAAGC
**A18	~169	(AGGGAG) ₅	TGTCACCGTGGAAGAAGATG	CTCTCGCTCTCGTTCCTTGT
**A20	~245	(GATGGA) ₅	TGAAGCCAGAGCATGAGATG	ACTGGAACACCCATTTACGC
!A30	~138	(GAA) ₁₀	TATGGCCATGCGTAAGAACA	TCCTCCGAAGCTAAGACCAA
*B4F	~212	(TCT) ₁₁	TGGAGTAGATGGCTCTGCAA	CGTGTCCCTCCTTCCCTACAA
**B5	~154	(TTC) ₁₂	AGCATCAGAGGAAAGCTTCG	CCTCCATCCTCAATGGAAAA
*B6	~215	(CAG) ₁₁	GCAAGGAGTTGCAGAGGAAG	CCAAAACCATTGCCAGTAG
*B8	~192	(GAAAG) ₅	TTTTGGAGAAGACGACCCTTT	AGCGCAAGGCATTCATATTC
*B10	~209	(CCCATT) ₆	GATCTGGCAAGGTTTTGGAA	GTGGCTGATCTTGCAGCATA
!B11	~206	(GGC) ₁₀	AGCTCGAGAACCCATGCTAA	ACTGCAGAAGCAAGGGAAAG
*B12	~168	(GAA) ₁₀	AAAATGGCTAAGACGTGGAAA	TTTGGTTGCGAGAAGTTGC
!B13	~164	(TCTT) ₅	CTGGAACGGGAATGTAATGG	CACCATTACCCAGTCACCAC
*B15	~238	(AAAT) ₅	ACGTGCGACTCTGGAAAAC	GGCTTTCAATTCCTCGAAAA
*B17	~163	(TTTG) ₅	AAATGGGGAAGAACGGGTTA	GTATAAGCCCAGCTGCCAAG
**B20	~204	(TTCTCC) ₆	TCCAAGTTCAGGACCCAAAA	TCTGTGCGTGCATTTCTAGC
*B27	~221	(GACCGA) ₅	ATCCCATGGCTATCAGCATT	GGTATGGCGAGACCTAGTGC
*B28	~222	(GAGATG) ₅	AGCAACACCCAGACTTCCAC	CGCCTGAGTCATCGTTTTCT
*B29	~241	(TCTCCA) ₅	GACGTGATAAGGCCACAACC	CTTCTCCTCCACCTTCATCG



(二) 鹿寨秋海棠的族群遺傳特徵

擴增自 10 個族群，共 105 株個體的 16 組微衛星體，在基因型鑑定後，共偵測到 137 個等位基因，平均每個基因座 8.56 個。除基因座 *BLZ01*（唯一呈兩個鹼基的重複式樣者）外，整體族群在每個基因座的評估上均沒有顯著偏離哈溫平衡。異型結合度在兩個鹼基重複式樣的基因座（*BLZ01*）特別高，三個鹼基重複式樣的基因座亦普遍較高（*BLZ02*、*BLZ04*、*BLZ014* 及 *BLZ015*）。族群內異型結合度在不同微衛星體基因座上差異甚大，同樣反映了不同基因座的變異程度。 R_{ST} 及 F_{ST} 在每一個基因座的統計量均高於 0.2，而平均值分別為 0.542 與 0.469，顯示整體鹿寨秋海棠的族群呈高度分化。整體 F_{IS} 值的範圍在 -0.029 至 0.366 之間，暗示秋海棠屬植物外向配育之特性，同時反映各地族群量偏小的事實（表四）。

表四、依據 16 個微衛星體資料建立的族群遺傳統計。 n ：成功進行基因型鑑定的個體數量； A ：等位基因數量； ms ：重複式樣大小（motif size）； H_E ：期望異型結合度（expected heterozygosity）； H_O ：實際異型結合度（observed heterozygosity）； F_{IS} ：族群近交系數； HW ：偏離哈溫平衡的顯著性（** $P < 0.01$ ；* $P < 0.05$ ；ns 不顯著）

Locus	n	N_A	ms	H_E	H_O	R_{ST}	F_{ST}	F_{IS}	HW
<i>BLZ01</i>	96	18	2	0.734	0.454	0.568	0.261	0.412	**
<i>BLZ02</i>	102	14	3	0.629	0.649	0.491	0.248	-0.041	ns
<i>BLZ03</i>	99	6	4	0.234	0.179	0.658	0.701	0.301	ns
<i>BLZ04</i>	94	7	3	0.334	0.281	0.619	0.611	0.215	ns
<i>BLZ05</i>	104	4	6	0.191	0.204	0.771	0.601	-0.071	ns
<i>BLZ06</i>	88	7	5	0.340	0.227	0.450	0.462	0.366	ns
<i>BLZ07</i>	94	7	4	0.186	0.130	0.850	0.701	0.298	ns
<i>BLZ08</i>	84	9	6	0.520	0.376	0.791	0.496	0.139	ns
<i>BLZ09</i>	93	4	5	0.293	0.216	0.264	0.493	0.173	ns
<i>BLZ10</i>	97	6	6	0.236	0.149	0.579	0.695	0.364	ns
<i>BLZ11</i>	91	6	6	0.253	0.193	0.577	0.656	0.122	ns
<i>BLZ12</i>	77	9	6	0.500	0.504	0.326	0.238	-0.029	ns
<i>BLZ13</i>	100	7	6	0.302	0.254	0.413	0.439	0.013	ns
<i>BLZ14</i>	77	14	3	0.529	0.462	0.524	0.410	0.103	ns
<i>BLZ15</i>	95	13	3	0.627	0.586	0.441	0.308	0.069	ns
<i>BLZ16</i>	100	6	6	0.474	0.416	0.534	0.395	0.047	ns
All	93.2	8.56	-	0.399	0.330	0.542	0.469	0.140	-

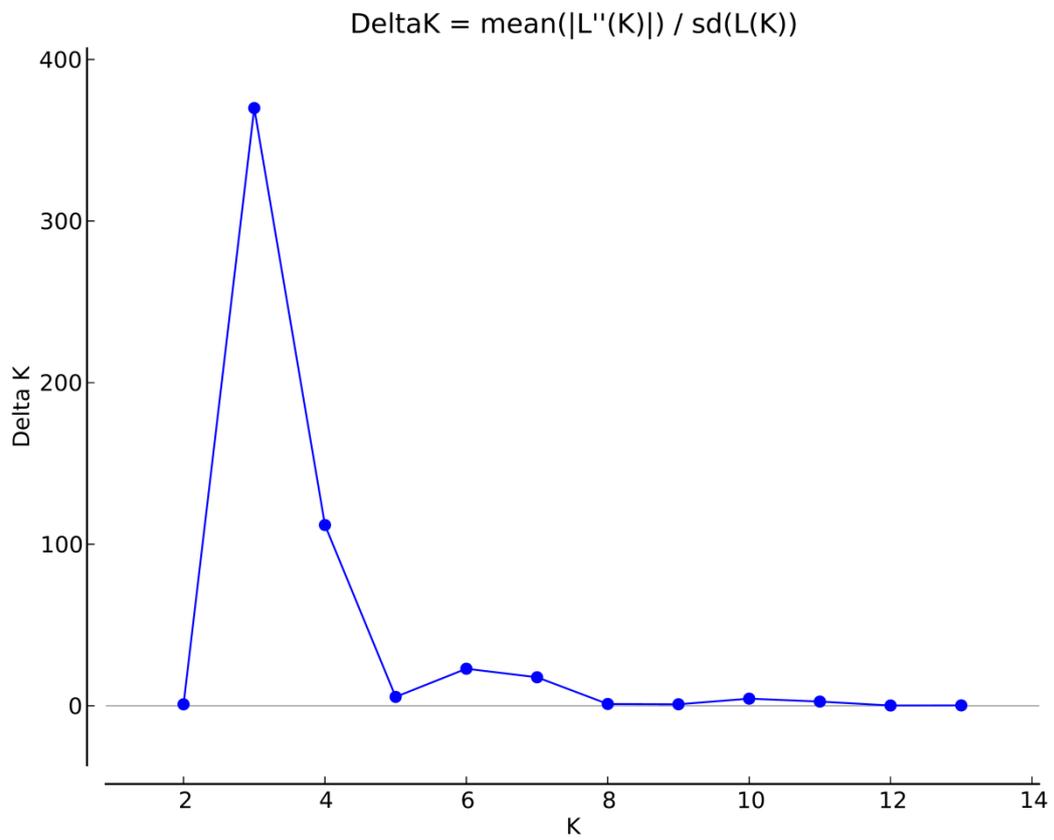
在葉綠體序列 *trnC-ycf6* 方面，鹿寨秋海棠 DNA 樣本擴增之長度為 574 bp，而加入外群排序整理後為 538 bp。成功擴增 *trnC-ycf6* 片段的個體數為 92 株，共來自 18 個不同採集點（**附錄 2**），並依據貝氏群聚分析的分群結果，將之歸納成 11 個族群。序列中，包含 STR 及 indel 在內，序列中共有 13 個具變異的位置，可歸納出 10 個基因單型（H1-10）。每個族群的基因單型頻率見**表五**。各族群的基因單型多樣性 (h) 在 0.000 至 0.667 之間，而核苷酸多樣性 (π) 則落在 0.00 至 1.143 之間（**表五**）。

（三）族群遺傳結構

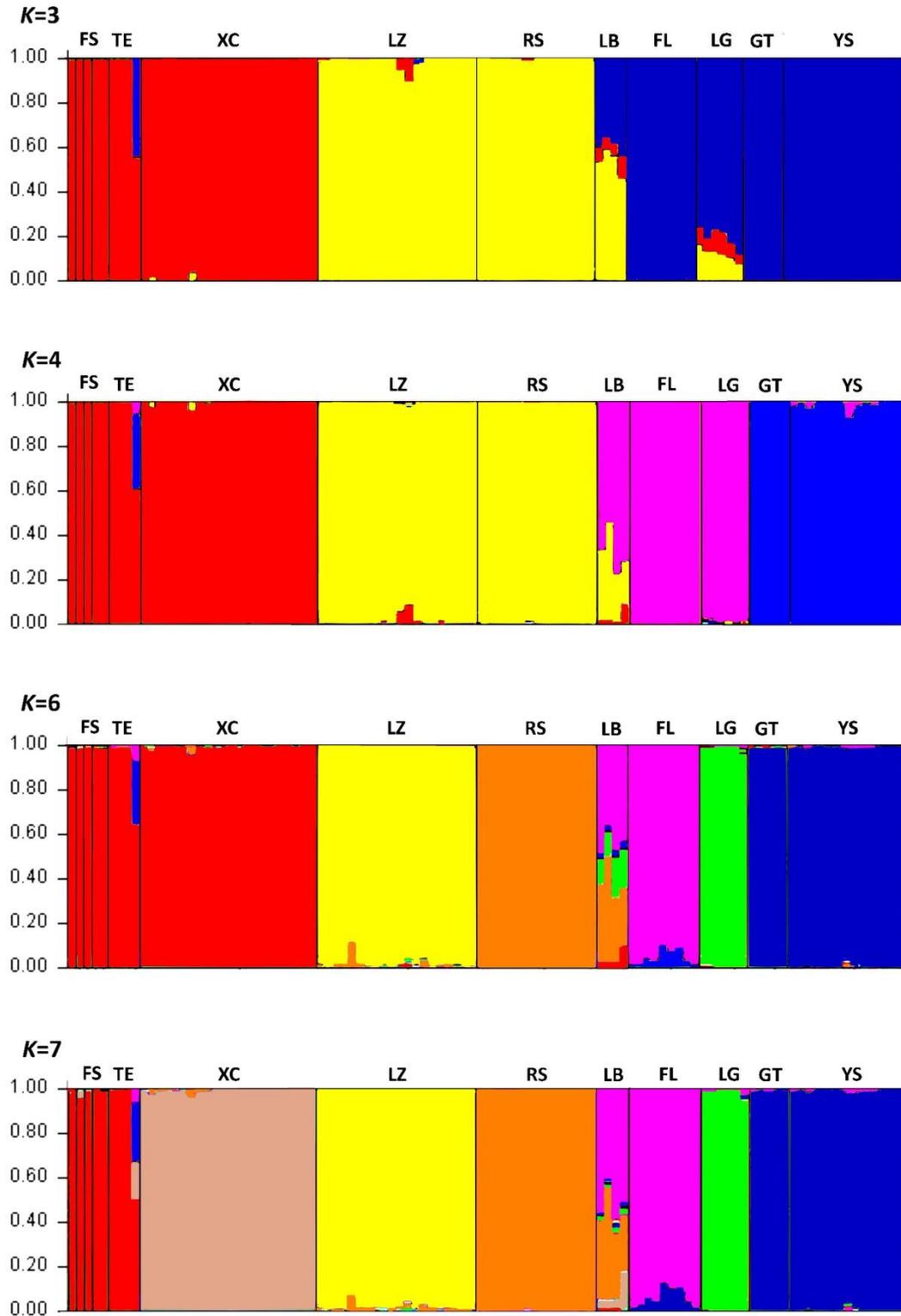
根據微衛星體資料所做的貝氏群聚分析，針對 12 個分群數量 K 值所算出的後驗機率值 $\ln P(D)$ 的二階微分變化率 ΔK 如**圖六**，最高的峰值出現在 $K=3$ 時，其次為 $K=4$ ，代表此為最適當的分群數。兩者主要差別在於，來自陽朔 (Yangshuo, YS) 與高田 (Gautian, GT) 的族群在 $K=3$ 時包含在整個廣西東部的分群中，而 $K=4$ 時則呈現獨立的群集（**圖七**）。另一個略為起伏的峰值出現於 $K=6$ 及 $K=7$ 時；當 $K=6$ ，廣西北部原屬同一群的鹿寨 (Luzhai, LZ) 及融水 (Rongshui, RS) 族群分作兩個群體，同時廣西東部的臨桂 (Lingui, LG) 族群自福利 (Fuli, FL) 與來賓 (Laibin, LB) 組成的群體中獨自分出。在 $K=7$ 時，忻城 (Xingcheng, XC) 的族群亦從來自西部的群體中獨自分出，而其餘廣西西部的採集點在所有群集分析中均歸在同一個群體，在往後分析中視為同一族群，即鳳山族群 (Fengshan, FS)，見**表五**。整體分群結構大致符合地理區域，值得注意的是來賓的族群雖與忻城族群相鄰，但在所有分群中均與廣西東部的族群較相關，而其遺傳組成又受到廣西北部融水族群的影響（**圖八**）。依據群聚分析，本研究將廣西分作三個地理區，分別是桂東 (East Guangxi)、桂北 (North Guangxi) 與桂西 (West Guangxi)，其詳細的組成族群整理於**表五**。根據前述地理區域劃分所進行的 AMOVA 分析，地理區間的遺傳變異程度占了 30.03%；地理區內，族群間的遺傳變異則高達 57.60%，貢獻了最主要的變異量；族群內則占 12.37%，顯示微衛星體在族群內仍具有一定程度的變異（**表六**）。

表五、廣西 11 個族群/採集點之地理資訊與族群遺傳資料。各族群內的數值分別來自葉綠體片段 *trnC-ycf6* 及 16 個微衛星體 (nSSR) 的基因型資料。來自都安一帶 (Du'an) 的一個樣本因採集資訊不完備，以星號 (*) 標註，其經緯度由其引證標本的資訊概略估記而得。 n ：成功擴增個體數； h ：基因單型多樣性 (haplotype diversity)； π ：核苷酸多樣性； N_A ：等位基因數量； A_R ：等位基因豐富度； H ：異型結合度； F_{IS} ：族群近交系數。

Group	Population locality	Collector number	Latitude(°N)/ Longitude(°E)	n (cpDNA/nSSR)	<i>trnC-ycf6</i>			nSSR			
					h	π	Haplotype (no.of seq.)	N_A	A_R	H	F_{IS}
East Guangxi	Fuli (FL)	HYH006	24°47'08.2" 110°31'22.5"	5/9	0.000	0.000	H1(5)	56	1.556	0.557	0.055
	Yangshuo (YS)	HYH008	24°46'12.9" 110°27'43.4"	13/15	0.233	0.467	H1(14), H10(2)	67	1.481	0.483	0.077
	Gaotian (GT)	KFC1855	24°44'25.8" 110°25'04.9"	5/5	0.000	0.000	H7(5)	36	1.478	0.472	-0.106
	Lingui (LG)	HYH031	25°02'27.9" 110°11'59.4"	7/6	0.571	1.143	H3(3), H4(4)	40	1.382	0.392	0.241
	Laibin (LB)	SMK2030	23°59'59.0" 109°10'17.0"	3/4	0.667	0.667	H2(2) H9(1)	32	1.337	0.383	0.275
North Guangxi	Luzhai (LZ)	HYH018	24°43'37.9" 109°39'50.6"	12/20	0.143	0.143	H2(13), H6(1)	54	1.495	0.469	0.245
	Rongshui (RS)	HYH033	25°05'30.2" 109°12'10.7"	14/15	0.000	0.000	H5(14)	44	1.330	0.332	0.139
West Guangxi	Fengshan (FS)	SMK2016	24°26'33.0" 107°08'43.0"	6/5	0.600	0.867	H2(1), H6(1), H8(4)	32	1.300	0.316	0.446
	Tian'e (TE)	KFC1825	24°52'21.2" 107°11'31.0"	3/4	0.000	0.000	H6(3)	26	1.245	0.266	0.569
	Xingcheng (XC)	HYH102	24°03'49.5" 108°40'08.9"	19/22	0.000	0.000	H2(19)	44	1.309	0.310	0.100
	*Du'an (DA)	YMS9001	24°14'36.0" 108°37'05.6"	1/-	-	-	H2(1)	-	-	-	-



圖七、 $\ln P(D)$ 的二階微分變化率，以縱軸的 ΔK 表示，而橫軸則為各個可能的分群數 K (Evanno *et al.* 2005)。



圖八、根據鹿寨秋海棠的微衛星體資料所進行的貝葉氏群聚分析。縱向色帶長度代表樣本對於每個群體的權重值 Q 。圖中依序呈現 $K=3$ 、 4 、 6 、 7 的結果。FL=Fuli(福利)；YS=Yangshuo(陽朔)；LZ=Luzhai(鹿寨)；LG=Lingui(臨桂)；RS=Rongshui(融水)；XC=Xingcheng(忻城)；TE=Tian'e(天峨)；GT=Gaotian(高田)；LB=Laibin(來賓)；FS=Fengshan(鳳山)。

表六、鹿寨秋海棠 *trnC-ycf6* 序列的 AMOVA 分析。地理區共分成桂東、桂北及桂西三群，分群依據為微衛星體的群聚分析結果。

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among areas	2	32.233	0.29261	30.03*
Among populations within areas	7	30.511	0.56113	57.60*
Within populatoins	82	9.762	0.12052	12.37*
Total	91	72.505	0.81019	

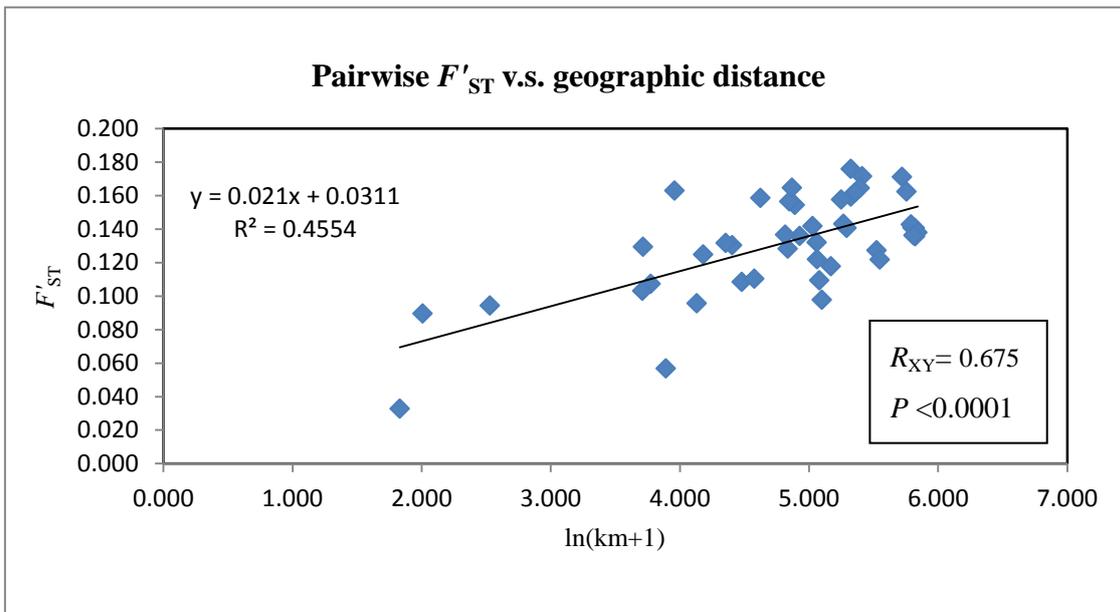
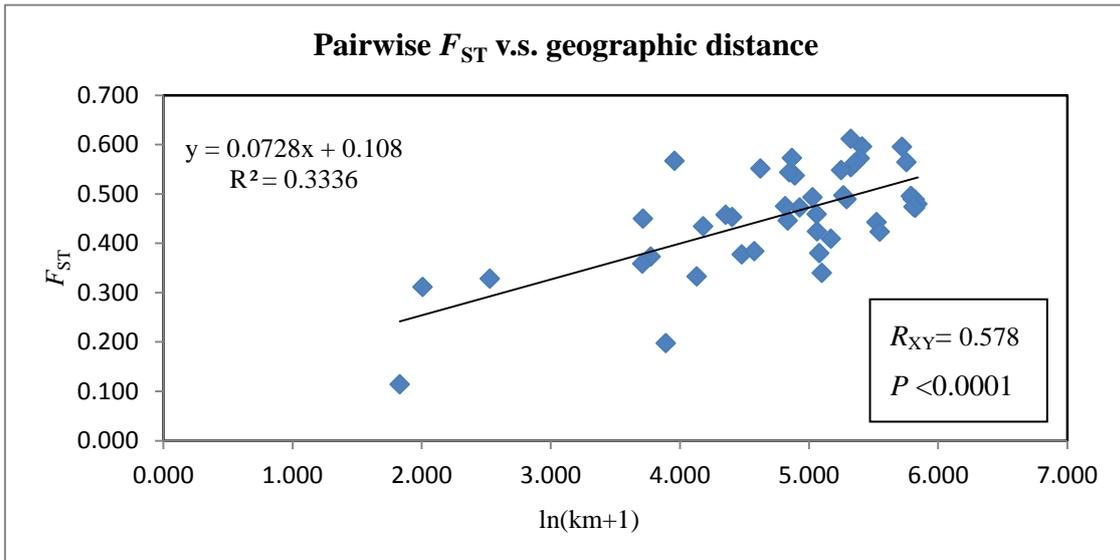
* $P < 0.05$

(四) 族群分化模式

兩兩族群間的遺傳距離，依據微衛星體的資料，以 F_{ST} 及標準化後的 F'_{ST} 呈現 (表七)。十個族群之間，以天峨 (TE) 族群和來賓 (LB) 間有最大的遺傳距離 ($F_{ST} = 0.5960$)，其次是天峨 (TE) 與臨桂 (LG)，顯示了東西部的顯著分化。然而，來賓 (LB) 與忻城 (XC) 的族群在地理距離上相隔甚近 (51.43km)，但遺傳距離卻相當大 ($F_{ST} = 0.5665$)，先前的群聚分析也支持此二族群應劃分於不同地理區域。兩兩族群間的 F_{ST} 以及經標準化後的 F'_{ST} 以矩陣形式與地理距離矩陣 $\ln(\text{km}+1)$ 進行 9,999 次的 Mantel test，其結果均呈現中度至高度的正相關。在 F_{ST} 的檢測中， $R_{XY} = 0.578$ ， $P < 0.0001$ ， $R^2 = 0.3336$ ；而 F'_{ST} 的檢測中， $R_{XY} = 0.675$ ， $P < 0.0001$ ， $R^2 = 0.4554$ 。由於來賓與忻城族群在遺傳與地理距離上之特殊性，故將來賓族群的資料自矩陣中去除，重新進行一次 Mantel test。其結果符合預期，遺傳距離與地理距離呈現更高度的正相關： F_{ST} 檢測中 $R_{XY} = 0.726$ ， $P < 0.0001$ ， $R^2 = 0.5276$ ；而 F'_{ST} 的檢測中， $R_{XY} = 0.734$ ， $P < 0.0001$ ， $R^2 = 0.5392$ 。此結果可說明鹿寨秋海棠整體族群的分化呈現顯著的距離隔離模式 (圖九)。

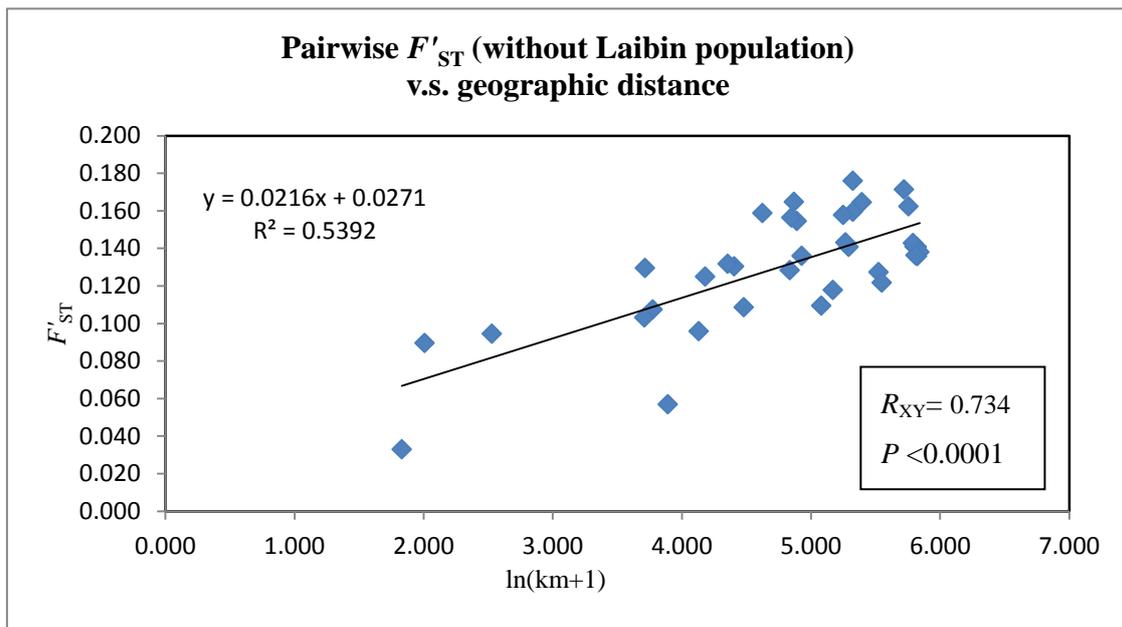
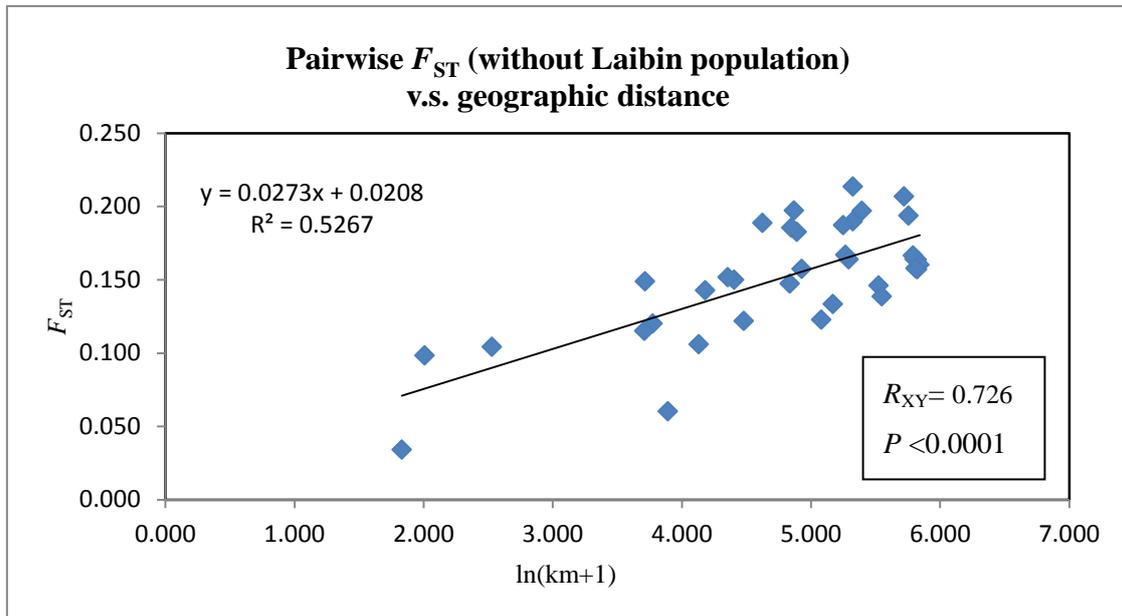
表七、鹿寨秋海棠兩兩族群間的遺傳距離，依據微衛星體的資料估算，並以 F_{ST} （左下半部表格）以及標準化後的 F'_{ST} （右上半部表格）呈現。FL=Fuli（福利）；YS=Yangshuo（陽朔）；LZ=Luzhai（鹿寨）；LG=Lingui（臨桂）；RS=Rongshui（融水）；XC=Xingcheng（忻城）；TE=Tian'e（天峨）；GT=Gaotian（高田）；LB=Laibin（來賓）；FS=Fengshan（鳳山）。

	FL	YS	LZ	LG	RS	XC	TE	GT	LB	FS
FL	-	0.0895	0.1085	0.1073	0.1358	0.1594	0.1406	0.0944	0.0977	0.1380
YS	0.3110	-	0.1303	0.1031	0.1544	0.1407	0.1409	0.0329	0.1220	0.1357
LZ	0.3771	0.4529	-	0.1249	0.0957	0.1283	0.1273	0.1317	0.1104	0.1217
LG	0.3728	0.3585	0.4341	-	0.1586	0.1577	0.1712	0.1294	0.1320	0.1623
RS	0.4722	0.5367	0.3327	0.5514	-	0.1564	0.1758	0.1647	0.1367	0.1645
XC	0.5540	0.4891	0.4459	0.5480	0.5435	-	0.1177	0.1430	0.1630	0.1093
TE	0.4887	0.4898	0.4424	0.5951	0.6112	0.4090	-	0.1427	0.1715	0.0568
GT	0.3280	0.1142	0.4577	0.4499	0.5724	0.4971	0.4959	-	0.1418	0.1362
LB	0.3397	0.4240	0.3837	0.4588	0.4751	0.5665	0.5960	0.4930	-	0.1617
FS	0.4797	0.4718	0.4230	0.5640	0.5717	0.3800	0.1973	0.4733	0.5622	-



圖九、依據 16 組微衛星體計算之族群遺傳距離與地理距離的 Mantel 相關性檢測，上半部兩次分析使用所有兩兩族群的 F_{ST} 、 F'_{ST} ，下半部兩次分析為刪除來賓(Laibin, LB)族群後的相同分析。

(接下頁)



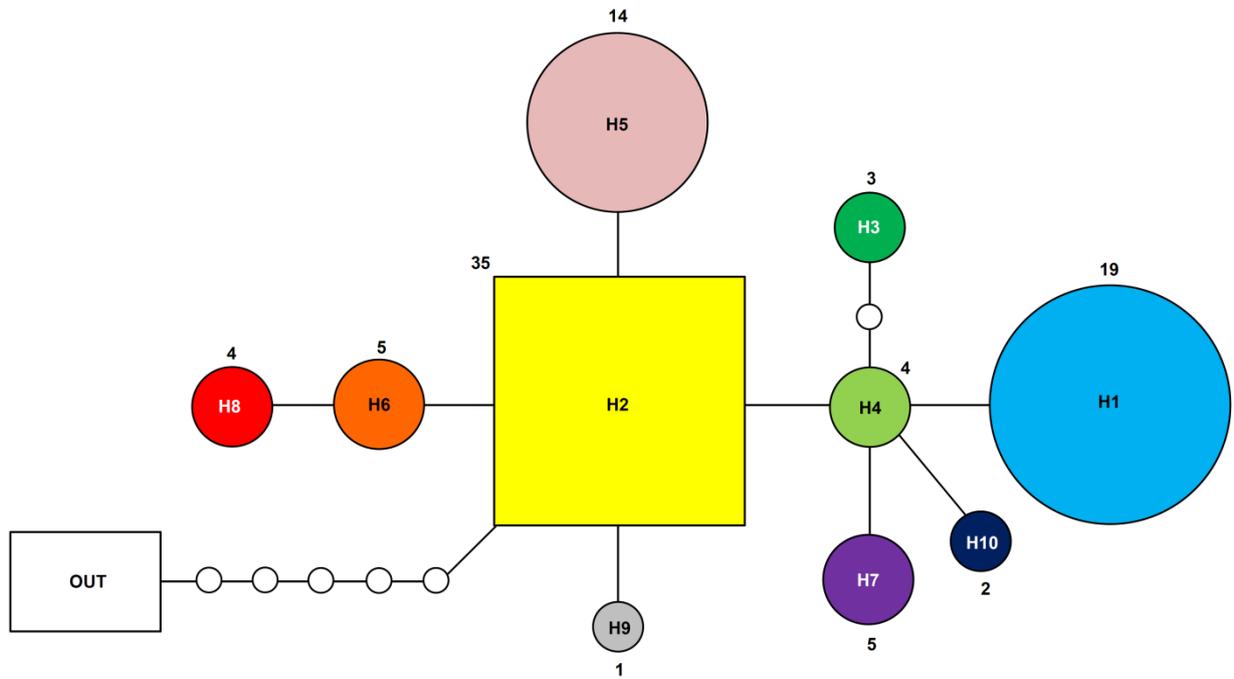
(續上頁)

圖九、依據 16 組微衛星體計算之族群遺傳距離與地理距離的 Mantel 相關性檢測，上兩次分析使用所有兩兩族群的 F_{ST} 、 F'_{ST} ，下兩次分析為刪除來賓(Laibin, LB) 族群後的相同分析。

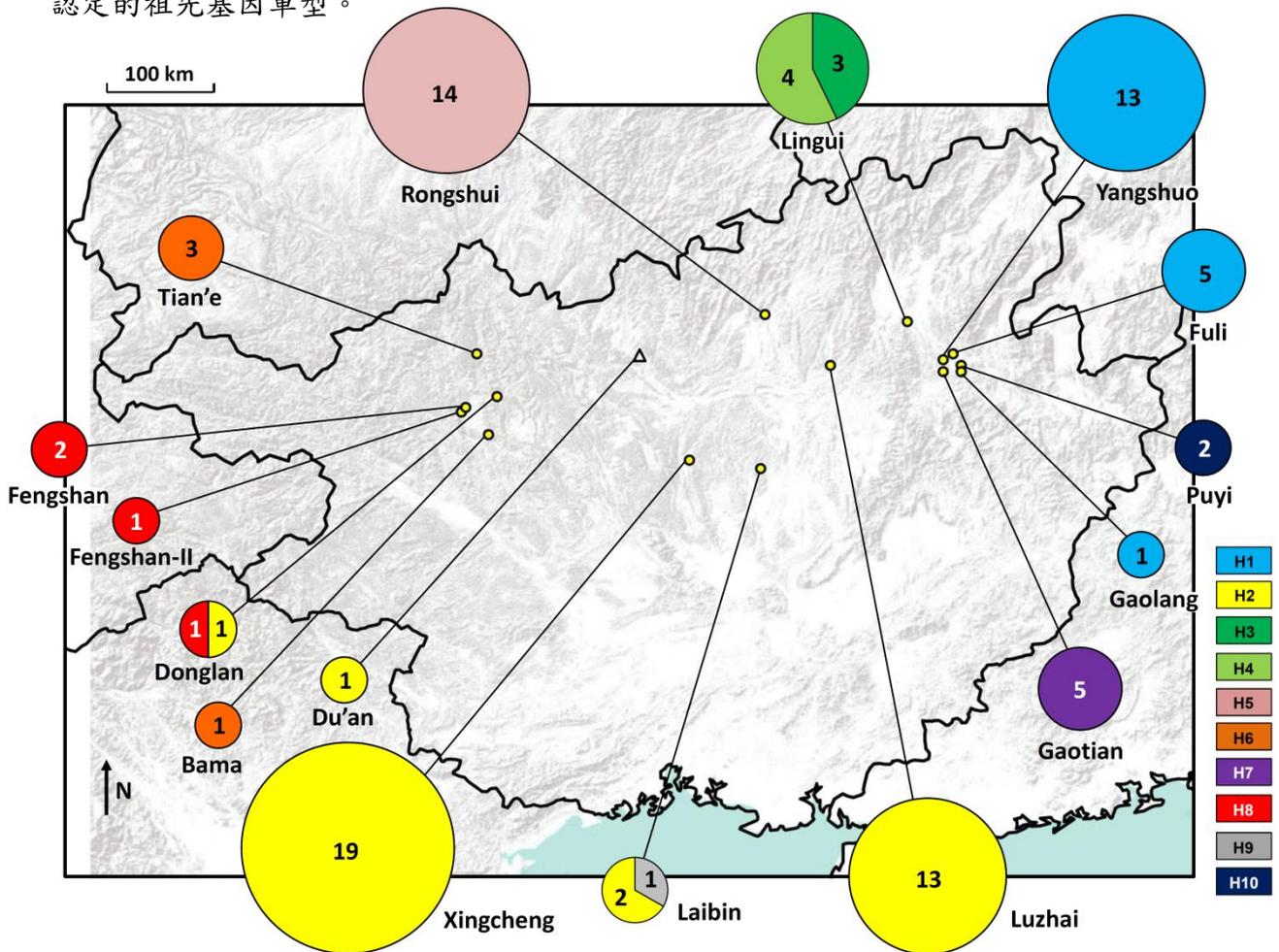
(五) 親緣地理結構

根據 *trnC-ycf6* 序列，以統計儉約法 (statistical parsimony) 建構的基因單型網狀圖 (圖十)，由 10 個基因單型 (H1-H10) 構成，每個基因單型間均只相差一至二次突變。所有鹿寨秋海棠的樣本呈現單一起源，而選用的所有外群均和本種相差五個突變以上，其中最接近鹿寨秋海棠的外群為星果草葉秋海棠 (*B. asteropyrifolia*)。H2 為數量最多的單型，在網狀圖上屬於輻輳位置，同時亦連結外群，判斷為祖先基因型，地理區域上廣泛分布於北部與西部。另一個星芒狀結構亦連結於 H2，並以侷限分布於臨桂族群的 H4 單型為中心點，暗示其可能為桂東各基因型的祖徵，包括集中於桂林地區的 H1、H4、H7 及 H10，以及同樣位於臨桂的 H3。除了東部的基因單型，其餘單型均連結到 H2，包括僅分布於融水族群的 H5，以及侷限於廣西西部，分布於鳳山族群數個採集點的 H8 及 H6。而 H9 為一稀有的基因單型，僅在一個來賓族群的個體發現。此根據葉綠體基因單型建構的網狀圖，基本上也呈現了隨地理距離增加而逐一分化的模式，與微衛星體資料的 Mantel test 結果吻合 (圖九)。

為進一步解析基因單型網狀圖，將其分為三階層的巢狀支序 (圖十一)，經過巢狀支序分析，所得的各種遺傳與地理距離見表八。將所得統計量進一步參照最新的檢索表後，可發現每個階層有大致類似的歷史。在第一階層中，儘管包含最廣泛基因單型 H2 的 clade1-2 在取樣上無法區別地理阻隔或距離阻隔的歷史，但整體而言，在此階層的族群歷史大致是基因流受到距離隔離或其他阻礙而逐漸分化。第二階層的支序，反映的是稍久遠的分化歷史，統計上均支持著族群為連續分布且擴張的事件(contiguous range expansion)。而整體支序代表族群最初分化的狀態，統計上支持距離隔離模式，與基因單型網狀圖直觀的觀察及遺傳與地理距離矩陣之相關性檢測均獲得一致的結論。



圖十、依據葉綠體 DNA 序列 *trnC-ycf6* 建立的最大儉約基因單型網狀圖，圖中共有十個基因單型 (H1-H10)，以顏色區分，面積則代表數量，而色塊旁的數字代表樣本數。方塊表示認定的祖先基因單型。

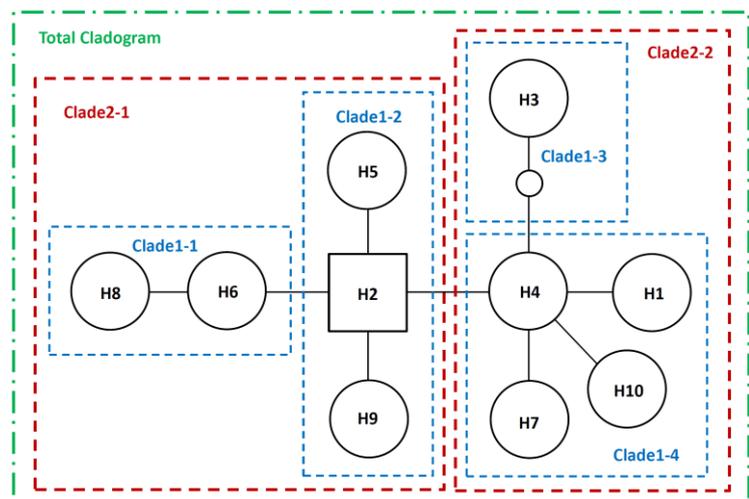


圖十一、鹿寨秋海棠 *trnC-ycf6* 基因單型分布圖，不同顏色代表不同基因單型，圓餅圖的大小對應該族群的取樣數量，其內的數字則代表族群內基因單型的頻率。圓餅圖均連結到相應的地理分布點。都安(Du'an)的族群因採其點不明確，以三角形標示大致位置。

Clade 1-1			Clade 2-1			Total Cladogram		
Clade	D _c	D _n	Clade	D _c	D _n	Clade	D _c	D _n
H6	90.80 ^L	91.05	1-1(tip)	63.46	134.13	2-1(tip)	13.26 ^S	137.92
H8(tip)	0.61 ^S	35.78 ^S	1-2	70.70 ^S	100.19 ^S	IT	-	-
IT	81.25 ^L	55.19 ^L	IT	7.52	-33.94	2-2(tip)	113.12	123.37
1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.			1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
Clade 1-2			Clade 2-2			Total Cladogram		
Clade	D _c	D _n	Clade	D _c	D _n	Clade	D _c	D _n
H2	69.97	71.77	1-3(tip)	0	36.80 ^L	IT	-	-
H5(tip)	0.00 ^S	70.22	IT	-	-	1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
H9(tip)	0.00	55.66	1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
IT	69.97 ^L	2.52	1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
1→2→3→4→9→10No Geographical sampling scheme inadequate to discriminate between fragmentation and isolation by distance.			1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
Clade 1-3			Clade 2-2			Total Cladogram		
Clade	D _c	D _n	Clade	D _c	D _n	Clade	D _c	D _n
H3(tip)	-	-	1-4	9.84 ^S	11.45 ^S	2-2(tip)	113.12	123.37
IT	-	-	IT	9.84	-25.34 ^S	IT	-	-
1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.			1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
Clade 1-4			Clade 2-2			Total Cladogram		
Clade	D _c	D _n	Clade	D _c	D _n	Clade	D _c	D _n
H1(tip)	0.00 ^S	5.83 ^S	1-4	9.84 ^S	11.45 ^S	2-2(tip)	113.12	123.37
H4	0.00	39.63 ^L	IT	9.84	-25.34 ^S	IT	-	-
H7(tip)	0.00 ^S	6.17	1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
H10(tip)	0.00	8.50	1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
IT	-3.56	33.53 ^L	1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		
1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.			1→2→11→12No Contiguous range expansion.			1→2→3→4No Restricted gene flow with Isolation by distance.		

表八、*trnC-ycf6* 巢狀支序分析表，分別記錄各巢狀支序的 D_c、D_n 以及 IT 值，顯著性以右上標表示於數值旁，L 代表顯著大，S 代表顯著小。每個支序的表框下方為參考檢索表的推論流程，以及最後所得之族群歷史情境。

圖十二、根據 *trnC-ycf6* 基因單型網狀圖所建構的巢狀支序結構，不同顏色代表不同階層，方形框代表祖先基因單型。



(六) 歷史族群變動

根據 *trnC-ycf6* 資料，以 Tajima's D 及 Fu's F_s 所進行的中性檢測，結果顯示無論在三個地理區域內或全廣西的整體族群中，此二統計量皆不顯著偏離 0，無法拒絕中性演化的虛無假設。亦即在近其族群量沒有顯著的變化（表九）。然而在差異分布分析中， SSD 值並不顯著（ $P = 0.18 > 0.05$ ），無法拒絕族群量擴張的假設情境，代表差異分布統計支持歷史中族群的擴張事件；每世代的遷移個體數估計量 M 為 14.337（95% 信賴區間為 3.847–99999）亦支持族群量增加的歷史。 θ 值的估算結果為 0.001（95% 信賴區間為 0.001–1.925），而 τ 值為 1.937（95% 信賴區間為 0.343–3.115）（表十）。透過貝氏天際線分析，本研究使用的葉綠體序列在後驗機率分布上最可能的演化速率 μ 為每個位點每年 1.1613×10^{-9} 次突變。依據溫室栽種的鹿寨秋海棠植株觀察，一個世代估計為三年，而本次使用的 *trnC-ycf6* 片段長度為 574bp，可推算該序列每個世代的替換率 u 約為 1.9975×10^{-6} 。代表核苷酸多樣性變化量的 τ 值，為自擴張事件至今 T 個世代中，逐代的替換率 u 所累積而成，即 $\tau = Tu$ ，將前述各個估計數值帶入計算，可推得 T 約為 0.9697×10^6 個世代，由此便可換算出族群擴張事件的發生時間約在兩百九十萬年前（2.909 Ma）（95% 信賴區間為 0.515- 4.678 Ma）（表十）。

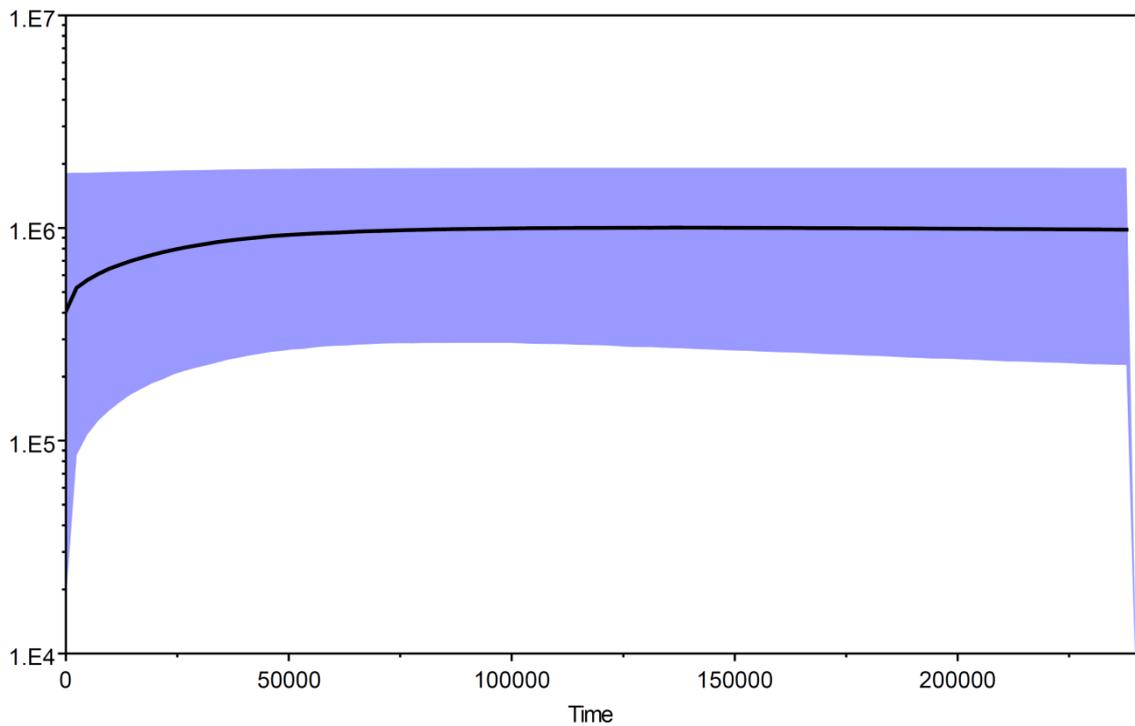
伴隨著替換率的估算，貝氏天際線分析亦可依據溯祖過程模擬所有樣本自最近共同祖先以降的族群變動曲線。結果如圖十三，顯示鹿寨秋海棠在近 25 萬年以來的整體族群量沒有顯著的變動，與中性檢測的結果大致吻合，但貝氏天際線卻額外顯示了在近五萬年間族群量有略微下降的趨勢。

表九. 依據 *trnC-ycf6* 所做的中性檢測。分別以三個地理區域內族群與整體族群運算 Tajima's D 與 Fu's F_s 統計量，括號中為 P 值。

	East Guangxi	North Guangxi	West Guangxi	Total
Tajima's D	-0.35919	1.62305	-0.01865	-0.14441
(P-value)	(0.390)	(0.983)	(0.344)	(0.485)
Fu's F_s	-1.31549	0.34882	0.63839	-1.81596
(P-value)	(0.256)	(0.553)	(0.605)	(0.224)

表十、鹿寨秋海棠 *trnC-ycf6* 片段的差異分布分析結果，分別計算 τ , θ 和 M 三個參數，括號內為 95% 信賴區間。以 SSD 值與其 P 值判斷是否違背族群擴張的預設。另根據貝葉氏天際線分析所得之替換率推算族群擴張的時間點，亦計算其 95% 信賴區間。

τ	θ	M	SSD	P -value for SSD	Time of expansion (Ma)
1.937 (0.343–3.115)	0.001 (0.001–1.925)	14.337 (3.847–99999)	0.0097	0.180	2.9091 (0.515–4.678)



圖十三、鹿寨秋海棠 *trnC-ycf6* 片段的貝葉氏天際線分析。縱軸單位為有效族群量，橫軸由右至左為過去到現今，單位為年。顏色區域表示 95% 信賴區間。



四、討論

(一) 鹿寨秋海棠的族群分化歷史

經過上述各類研究，鹿寨秋海棠的族群分化模式可由許多方面來觀察。由多個微衛星體標記估算，普遍偏高的 F_{ST} 值（平均 0.469），顯示此物種的各地方族群間無疑具有高度分化的遺傳組成。透過貝氏群聚分析，可知族群間的分化結構大致與地理分布吻合，且在各個分群數 K 的變化下，可約略觀察到北部融水族群（RS）與鹿寨（LZ）之分化，東部地區臨桂（LG）自陽朔（YS）與來賓（LB）族群分出，以及西部地區鳳山（FS）與天峨（TE）族群之分化，在三個地理區的基本分群結構之下，可能代表著更近期的分化事件，此階層性結構亦反映在葉綠體 DNA 的 AMOVA 及基因單型網狀圖的結果上，暗示著整體族群隨著時間朝越來越小的區域性單位分化。兩兩地方族群間的遺傳距離同樣呈現了依地理距離而遺傳差異逐漸增加的情形，然而，比起直線距離，三個地理區域的架構較符合族群間的遺傳距離關係，此說明了廣西喀斯特地貌的崎嶇特質，並不能全部以直線距離來判斷基因流的阻隔程度。例如去除來賓（LB）族群後，Mantel test 的相關性檢測結果便更加顯著，很可能意味著來賓族群所位處的鳳凰鎮近郊極難到達的山區，促進了地理上的隔離。另一個可能是忻城族群（XC）及來賓族群有不同的傳播起源，在代表母系的葉綠體基因單型網狀圖中，忻城與來賓族群具有共同的基因單型，與桂東的明顯不同，據此應較支持來賓族群的母本仍為桂西族群分化而出，而微衛星體呈現的是父母本共同的遺傳組成，可能意味著來賓族群與桂東的族群透過花粉的傳遞有著較近期的基因交流。除此特例外，其他的基因單型均在地理分布上有非常明顯的距離隔離結構。巢狀支序分析對此也提供了統計上的支持，在第一階層的支序很類似東、北、西的地理區域分群架構，推論出的也正是較近期的距離隔離模式。與其餘側膜組秋海棠一樣，鹿寨秋海棠葉片型態變異的並不影響光合作用效率，較支持為非功能性的演化（Sheue *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009）；其較弱的種子傳播能力亦同於其他蒴果型的秋海棠，各地族群常形成間斷破碎的分布，本研究提供的族群遺傳資料亦呈現了基因交流的受限與極具地理結構的分化形式。由種種證據看來，族群間的距離與地形因素之阻隔，促使各地族群的遺傳差異逐漸累積，為鹿寨秋海棠族群主要的分化機制，且遺傳漂變的作用力量可能較天擇更為重要。



(二) 族群擴張事件與喀斯特地貌之演化

鹿寨秋海棠的歷史族群變動，在多種推估方法下呈現不同尺度的證據。結合差異分布分析、中性檢測以及貝氏天際線分析，可得到鹿寨秋海棠由遠至近的族群歷史估算。藉由替換率的估算與差異分布分析的參數，可推測約五十萬年至四百六十萬年前有一次族群擴張事件，觀察巢狀支序分析中，相對古老的第二階層之統計推論，也支持一次較久遠的族群擴張事件；另由於 Tajima's D 及 Fu's F_s 均不顯著偏離 0，可見鹿寨秋海棠在該次族群擴張後，即保持穩定的族群大小，此狀態在貝氏天際線亦可觀察到。對照廣西喀斯特地貌的發育歷史，可進一步對此族群變動歷史進行詮釋。在長遠的歷史上，亞洲季風氣候在七百萬至一千一百萬年前開始穩定，促成熱帶及亞熱帶喀斯特地貌的旺盛發育，側膜組於此同時適應了石灰岩的環境，隨著喀斯特地貌逐漸的崎嶇與破碎，此類群多叉狀的分支暗示著輻射分化的歷史。鹿寨秋海棠的支序在此過程中分化出來，定年上約為二至五百萬年前(Chung *et al.*, 2014)，正逢喀斯特發育高峰期(五百至一千萬年前)之末尾，鹿寨秋海棠族群適應了此時開始廣布的峰叢與逐漸孤立的峰林地貌，對照著巢狀支序分析的最高階層來看，反映此地質過程的較古老事件即為廣泛適應棲地後東西向的距離隔離分化。緊接著便是族群在各自的地理區域內，因地形逐漸破碎化而增加的微棲地間以連續分布的形式進行族群擴張，共同反應在差異分布分析與巢狀支序分析的結果上。地貌的改變在趨於穩定後，經崩坍而互不相聯的洞穴，或孤峰坡腳的森林底層，便成為鹿寨秋海棠各地族群穩定存續的生境，此時的基因流已極度受限，但過去的遺傳交流仍使整體族群呈現距離隔離的分化模式。

(三) 近期的族群下降與保育上的啟示

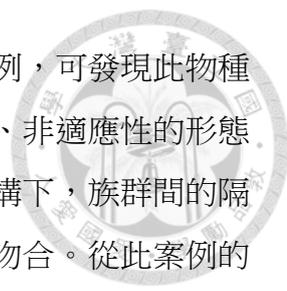
雖然有長時間的穩定族群，然而在貝氏天際線的族群量變化圖中，又提供了另一個更近代的資訊，即族群量於近五萬年來有略為下降的趨勢。五萬年的時間尺度，對於喀斯特地貌的發展而言，影響是相對微小的，故欲解釋此族群量變化事件，應以其他方面來探討。地質歷史上，約自兩百四十八萬年至今的第四紀，交替出現著影響全球的冰河期 (glacial periods)，其間不僅北方的生態系直接被從北極間歇擴張的冰棚 (Ice sheet) 所影響，原本溫濕的熱帶與亞熱帶亞洲，也因為季風的減弱，而呈現較接近於大陸型的乾濕交替氣候(Nanson *et al.*, 1992; Zhisheng, 2000)。根據澳洲墨瑞河谷 (Murray basin) 的沉積物分析，大洋洲的乾早期約自

七萬年前開始 (Zhisheng *et al.*, 1986)，而根據黃土高原的資料，東亞大陸性氣候則大約在五萬年前左右便已出現 (Pye *et al.*, 1989; Nanson *et al.*, 1992)。對於生長於溫濕氣候的秋海棠而言，長時間乾旱造成的逆境，便反應為貝氏天際線分析中，有效族群量的下降。

族群量下降與遺傳多樣性的喪失，除了氣候的影響外，不可忽略的是滅絕事件造成的影響。由於喀斯特地貌脆弱的地質，風化與崩塌是持續發生的事件，而近代的人類經濟活動如觀光、放牧、農業與礦業，也均可能造成地方族群的消失 (Clements *et al.*, 2006)。如鹿寨秋海棠所生長的棲地，性質類似於「古避難所」 (Paleoreugia)，亦即因為棲位的保守性，曾廣布的物種侷限生存在殘留的生境中，此時傳播事件並不特別帶來新的物種多樣性，而是滅絕事件主導了遺留生物相的歧異度 (Nekola, 1999)。喀斯特地貌逐漸溶蝕與崩塌的過程，對於十分依賴此環境的特有生物而言，便形同古避難所 (Chung *et al.*, 2014)。而在單一廣布種如鹿寨秋海棠的族群內，各地因距離或地理隔離各自發展出的獨特基因型，亦可能因為局部的滅絕事件，而造成整體遺傳多樣性的下降，對於族群歷史的回溯與地區自然史的研究上均是難以挽回的損失。在本研究進行的過程中，位於來賓地區的已知族群便因為坍塌而滅絕，獨特的基因單型 (H9) 可能就此消失。另外位於東蘭的採集點 (屬於鳳山族群)，亦因為人為的放牧活動，而使洞穴棲地中的小族群完全消失。鹿寨秋海棠以及其他側膜組秋海棠狹域分布或高度分化的族群遺傳性質，加上這些持續可見的滅絕事件，使得與此相近的類群在保育上均應特別被關注，整體的地景保育與各層級的生物多樣性調查也更顯急迫。

(四) 側膜組秋海棠種化機制之推論

在喀斯特地貌中，鹿寨秋海棠族群遺傳距離與地理距離的顯著正相關，暗示著因喀斯特作用而產生的棲地的破碎化，以及曾經有過但現今受限的基因流，促成了距離隔離分化模式，此為廣布類群重要的分化機制，同時也意味著許多其他支序過去也經歷過類似的分化過程，進而能造就現今異域種化的事件。從巨演化的觀點，側膜組秋海棠的多樣化時間點與中越邊境喀斯特地貌的發育歷史吻合，而其輻射分化的狀況以分類學的觀點而言應較接近非適應性的演化。另由本類群植物傳播能力的限制，以及絕大多數物種呈狹域分布的情形而言，因地理距離的阻隔與遺傳漂變的作用，造成的非適應性輻射分化，最後導致異域種化的產生，



是最主要的假說。此對照在廣布種鹿寨秋海棠的微演化研究案例，可發現此物種的族群分化歷史符合近期的喀斯特地貌演化序列，而其地區性、非適應性的形態變異，與隨地理距離而增加的遺傳距離，加上在較大的分群架構下，族群間的隔離貢獻了最主要的變異，在在與針對整個側膜組的觀察推論相吻合。從此案例的研究，可更加確認在亞熱帶喀斯特地貌中，因持續的喀斯特作用而加劇的距離隔離模式可促成廣泛的異域種化，此應在整個側膜組秋海棠的輻射演化歷史中，扮演最主要的推手，也應可說是喀斯特地貌中生物多樣性形成的重要機制之一。

五、結論

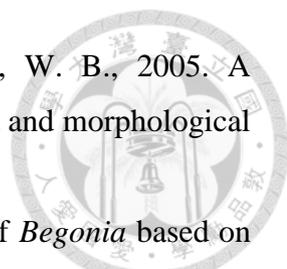
本研究透過適當的分子標記，研究鹿寨秋海棠的族群遺傳學，藉此極具代表性且為少數屬於廣布種的側膜組秋海棠為案例，探討中越邊境亞熱帶喀斯特地貌中，側膜組秋海棠的種化機制，以及此過程與周邊的特殊環境歷史之關聯。

在族群遺傳的特性上，鹿寨秋海棠的整體族群呈高度分化，依照地理位置可先分為桂西、桂北與桂東三群，群體內的族群間又各自分化，貢獻了最主要的遺傳變異。兩兩族群間地遺傳距離與上結構相應，而大多與地理直線距離也呈現高度的正相關，僅少數族群顯示地型阻隔是主要影響遺傳距離的因子，大多數族群均呈現明顯的距離隔離模式。各地方族群多半具有侷限分布的獨特基因單型，而在其網狀圖的分析中，整體族群呈現東西的距離隔離，主要地理區間則反應族群擴張的歷史，在近期的族群分化又重新出現了距離隔離模式。而鹿寨秋海棠歷史族群量的變化可反映廣西喀斯特地貌發域的時序，在發育晚期的峰林與峰叢間，因微棲地的增加而使此物種在約三百萬年前曾有過一次族群擴張事件，而後即保持大致穩定的族群量。約五萬年前因亞洲季風系統隨冰河期而減弱，形成的大陸型氣候可能導致整體族群量的略為下降。而既有棲地可見的局部滅絕事件，則反應了廣西喀斯特地質的脆弱，也凸顯了在近代人類活動干擾下，保育與資源調查的急迫性。鹿寨秋海棠微演化歷史可與整個側膜組的巨演化特性相對照，此物種因距離隔離而造成的分化，推演到整個側膜組的歷史上，可能意味著整個支序在廣西岩溶地區旺盛的喀斯特作用下以距離隔離模式產生非適應性的輻射演化，最終導致異域種化的發生，進而形塑了這特殊地景中獨特的生物多樣性。

參考文獻

- 
- An, Z.-S., 2000. The history and variability of the East Asian paleomonsoon climate. *Quaternary Science Reviews*, 19, 171-187.
- An, Z.-S., Bowler, J. M., Opdyke, N. D., Macumber, P.G., Firman, J.B., 1986. Palaeomagnetic stratigraphy of Lake Bungunna: Plio-pleistocene precursor of aridity in the murray basin, Southeastern Australia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 54, 219–239.
- Ansorge, W. J., 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25, 195–203.
- Cain, A. J., 1963. *Animal species and their evolution*. London: Hutchinson.
- Castoe, T. A., Poole, A. W., de Koning, A. P. J., Jones, K. L., Tomback, D. F., Oyler-McCance, S. J., Smith, E. N., 2012. Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS One*, 7, e30953.
- Chung, K.-F., Leong, W.-C., Rubite, R. R., Repin, R., Kiew, R., Liu, Y., & Peng, C.-I., 2014. Phylogenetic analyses of *Begonia* sect. *Coelocentrum* and allied limestone species of China shed light on the evolution of Sino-Vietnamese karst flora. *Botanical Studies*, 55, 1–15.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1660.
- Clement, W. L., Tebbitt, M. C., Forrest, L. L., Blair, J. E., Brouillet, L., Eriksson, T., & Swensen, S. M., 2004. Phylogenetic position and biogeography of *Hillebrandia sandwicensis* (Begoniaceae): a rare Hawaiian relict. *American Journal of Botany*, 91, 905–917.
- Clements, R., Sodhi, N. S., Schilthuizen, M., & Ng, P. K. L., 2006. Limestone karsts of Southeast Asia: imperiled arks of biodiversity. *BioScience*, 56, 733–742.
- Coulibaly, I., Gharbi, K., Danzmann, R. G., Yao, J., & Rexroad, C. E., 2005. Characterization and comparison of microsatellites derived from repeat-enriched libraries and expressed sequence tags. *Animal Genetics*, 36, 309–315.
- Day, M., & Urich, P., 2000. An assessment of protected karst landscapes in Southeast Asia. *Cave and Karst Science*, 27, 61–70.
- de Wilde, J. J., Hughes, M., Rodda, M., & Thomas, D. C., 2011. Pliocene

- intercontinental dispersal from Africa to Southeast Asia highlighted by the new species *Begonia afromigrata* (Begoniaceae). *Taxon*, 60, 1685–1692.
- Dewitte, A., Twyford, A. D., Thomas, D. C., Kidner, C. A., & Van Huylbroeck, J., 2011. The origin of diversity in *Begonia*: genome dynamism, population processes and phylogenetic patterns. *The Dynamical Processes of Biodiversity—Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*, 27–52. New York: InTech.
- Doyle, J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O. G., 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1185–1192.
- Earl, D. A., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361.
- Ellis, J. R., & Burke, J. M., 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*, 99, 125–132.
- Ellis, J. R., Pashley, C. H., & McCauley, D. E., 2006. High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener. *Molecular Ecology*, 15, 2345–2355.
- Ersts, P., 2008. Geographic distance matrix generator (version 1. 2. 2). Available at: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Ewens, W. J., 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology*, 3, 87–112.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L., 2010. Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Ford, D., & Williams, P., 2007. *Karst hydrogeology and geomorphology*. England: John Wiley & Sons.
- Frodin, D. G., 2004. History and concept of big plant genera. *Taxon*, 53, 753–776.

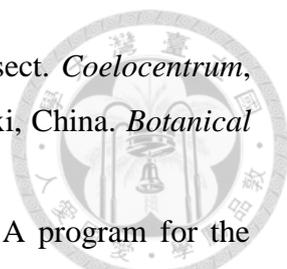
- 
- Forrest, L. L., Hughes, M., Hollingsworth, P. M., & Zomlefer, W. B., 2005. A phylogeny of *Begonia* using nuclear ribosomal sequence data and morphological characters. *Systematic Botany*, 30, 671–682.
- Forrest, L. L., & Hollingsworth, P. M., 2003. A recircumscription of *Begonia* based on nuclear ribosomal sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 241, 193–211.
- Fouquet, A. G., André, V., Miguel, M., Christian, B. M., & Gemmell, N. J., 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS One*, 2, 1109.
- Gittenberger, E., 1991. What about non-adaptive radiation? *Biological Journal of the Linnean Society*, 43, 263–272.
- Goodall-Copestake, W. P., David, J., & Hollingsworth, P. M., 2009. The origin of a mega-diverse genus: dating *Begonia* (Begoniaceae) using alternative datasets, calibrations and relaxed clock methods. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159, 363–380.
- Goodall-Copestake, W. P., Perez-espona, S. H., David, J., & Hollingsworth, P. M., 2010. The early evolution of the mega-diverse genus *Begonia* (Begoniaceae) inferred from organelle DNA phylogenies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 243–250.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, version 2.9.3.2. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Available at: <http://www2.unil.ch/popgen/siftwares/fstat.htm>
- Graur, D., Li, W. -H., 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Gu, C., & Peng, C.-I., 2007. Begoniaceae. In: *Flora of China*, 13, 153–207. Beijing: Science Press.
- Harrison, R. G., 2012. The language of speciation. *Evolution*, 66, 3643–3657.
- Hedrick, W., 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59, 1633–1638
- Hughes, M., & Hollingsworth, P. M., 2008. Population genetic divergence corresponds with species-level biodiversity patterns in the large genus *Begonia*. *Molecular Ecology*, 17, 2643–2651.
- Hughes, M., Hollingsworth, P. M., & Miller, A. G., 2003. Population genetic structure in the endemic *Begonia* of the Socotra archipelago. *Biological Conservation*,

113, 277–284.

- Irwin, D. E., Bensch, S., & Price, T. D., 2001. Speciation in a ring. *Nature*, 409, 333–337.
- Jenkins, P. D., Kilpatrick, C. W., Robinson, M. F., & Timmins, R. J., 2005. Morphological and molecular investigations of a new family, genus and species of rodent (Mammalia: Rodentia: Hystricognatha) from Lao P. D. R.. *Systematics and Biodiversity*, 2, 419–454.
- Kang, M., Tao, J., Wang, J., Ren, C., Qi, Q., Xiang, Q. -Y., & Huang, H., 2014. Adaptive and nonadaptive genome size evolution in Karst endemic flora of China. *New Phytologist*, 202, 1371–1381.
- Kiew, R., 2001. The limestone begonias of Sabah, Borneo—Flagship species for conservation. *Gardens' Bulletin Singapore*, 53, 241–286
- Kiew, R., 2004. *Begonia sabahensis* Kiew & J. H. Tan (Begoniaceae), a new yellow-flowered *Begonia* from Borneo. *Gardens' Bulletin Singapore*, 56, 73–77.
- Kozak, K. H., Weisrock, D. W., & Larson, A., 2006. Rapid lineage accumulation in a non-adaptive radiation: phylogenetic analysis of diversification rates in eastern North American woodland salamanders (Plethodontidae: Plethodon). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 539–546.
- Ku, S.-M., 2006. *Systematics of Begonia sect. Coelocentrum (Begoniaceae) of China*. Master Thesis, Tainan: National Cheng-Kung University.
- Ku, T.-C., 1999. Begoniaceae. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, vol. 52, 126–269. Beijing: Science Press.
- Kutschera, U., & Niklas, K. J., 2004. The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften*, 91, 255–276.
- Latinné, A., Waengsothorn, S., Rojanadilok, P., Eiamampai, K., Sribuarod, K., Michaux, J. R., Mitochondrial, C., & Markers, N., 2012. Revealed a deep vicariant history for *Leopoldamys neilli*, a cave-dwelling rodent of Thailand. *PloS One*, 7, e47670.
- Li, Y. -C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*, 11, 2453–2465.
- Lin, C.-Y., 2011. *Plant speciation in the Karst—Phylogenetics of limestone Begonia in China*. Master Thesis, Taipei: National Taiwan University.

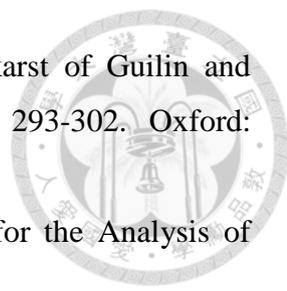
- 
- Lin, C.-R., Peng, C.-I., Kono, Y., & Liu, Y., 2010. *Aspidistra obconica*, Asparagaceae (Ruscaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China. *Botanical Studies*, 51, 263–268.
- Liu, J.-R., 1994. The development history of the Guangxi tropical karst geomorphology and its sequences. *Carsologica Sinica*, 6, 332–345.
- Liu, J.-R., 1995. Preliminary discussion on the development of karst caves in Guilin and redefinition of their forming time. *Guangxi Geology*, 8, 67–80.
- Liu, J.-R., 1996. New recognition of tropical karst development in Guilin. *Guangxi Geology*, 9, 61–66.
- Liu, J.-R., 1997. The development history of the Guangxi tropical karst geomorphology and its sequences. *Carsologica Sinica*, 6, 332–345.
- Liu, J.-R., Yuan, D.-X., Liang, Y.-C., & Bi, X.-X., 2001. Characteristics of tropical karst geomorphology in Guilin and its scientific importance. *Carsologica Sinica*, 20, 137–139.
- Liu, J.-R., Huang, G.-B., Huang, X.-L., and Liang, Y.-C., 2001. Discussion on the evolution of different types of regional tropical karst landform in Guangxi. *Carsologica Sinica*, 20, 247–252.
- Liu, J.-R., 2003. A re-discussion on the developing history of the high cluster peak in the west and northwest Guangxi. *Carsologica Sinica*, 3, 4.
- Liu, Y., Ku, S.-M., & Peng, C.-I., 2007. *Begonia bamaensis* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China. *Botanical Studies*, 48, 465–473.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., Cheung, D. W., Yiu, S. -M., Peng, S., Xiaoqian, Z., Liu, G., Liao, X., Li, Y., Yang, H., Wang, J., Lam, T. -W., & Wang, J., 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. *GigaScience*, 1, 18.
- Malausa, T., Gilles, A., Meglecz, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Delye, C., 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, 11, 638–644.
- Matolweni, L., Orlyn, B. K., & McLellan, T., 2000. Genetic diversity and gene flow in

- the morphologically variable, rare endemics *Begonia dregei* and *Begonia homonyma* (Begoniaceae). *American Journal of Botany*, 87, 431–439.
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*. Cambridge: Harvard University Press.
- Meirmans, P. G., 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 60, 2399–2402.
- Metzker, M. L., 2010. Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11, 31–46.
- Musser, G. G., Smith, A. L., Robinson, M. F., & Lunde, D. P., 2005. Description of a new genus and species of rodent (Murinae, Muridae, Rodentia) from the Khammouan Limestone National Biodiversity Conservation Area in Lao PDR. *American Museum Novitates* 497, 1–31.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Nakamura, K., Kokubugata, G., Rubitte, R. R., Huang, C. -J., Kono, Y., Yang, H. -A., Lopez-Feliciano, A., Labuguen, M. L., Yokota M., & Peng, C. -I., 2014. *In situ* glacial survival at the northern limit of tropical insular Asia by a lowland herb *Begonia fenicis* (Begoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 174, 305–325.
- Nanson, G. C., Price, D. M., & Short, S. A., 1992. Wetting and drying of Australia over the past 300 ka. *Geology*, 20, 791–794.
- Nekola, J. C., 1999. Paleoreugia and neoreugia: the influence of colonization history on community pattern and process. *Ecology*, 80, 2459–2473.
- Nicolas, V., Herbreteau, V., Couloux, A. K., Kham, Douangboupha, B., & Hugot, J. -P., 2012. A remarkable case of micro-endemism in *Laonastes aenigmamus* (Diatomyidae, Rodentia) revealed by nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *PloS One*, 7, e48145.
- Peakall, R., & Smouse, P. E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Peng, C. -I., Ku, S. -M., Kono, Y., Chung, K. -F., & Liu, Y., 2008a. Two new species of *Begonia* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae) from limestone areas in Guangxi, China: *B. arachnoidea* and *B. subcoriacea*. *Botanical Studies*, 49, 405–418.

- 
- Peng, C. -I., Liu, Y., & Ku, S. -M., 2008b. *Begonia aurantiflora* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China. *Botanical Studies*, 49, 83–92.
- Posada, D., Crandall, K. A., & Templeton, A. R., 2000. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9, 487–488.
- Pritchard, J. K., Wen, X., Falush, D., 2007. Documentation for STRUCTURE software: version 2.2. Available at: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>
- Pye, K., & Zhou, L. -P., 1989. Late Pleistocene and Holocene aeolian dust deposition in North China and the Northwest Pacific Ocean. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 73, 11–23.
- Qin, H. -N., & Liu, Y., 2010. *A Checklist of Vascular Plants of Guangxi*. Beijing: Science Press.
- Rajbhandary, S., Hughes, M., Phuttai, T., Thomas, D. C., & Shrestha, K. K., 2011. Asian *Begonia*: out of Africa via the Himalayas. *Gard Bull Singapore*, 63, 277–286.
- Raymond, M., & Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248–249.
- Rivière-Dobigny, T., Herbretreau, V., Khamsavath K., Douangboupha, B., Morand, S., Michaux, J. R., & Hugot, J. P., 2011. A preliminary assessment of the genetic population structure of the enigmatic species *Laonastes aenigmamus* (Rodentia: Diatomyidae). *Journal of Mammalogy*, 92, 620–628.
- Rogers, A. R. & Harpendingf, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552–569.
- Rozen, S., & Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols*, 132, 365–386.
- Rundell, R. J., & Price, T. D., 2009. Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 394–399.
- Schilthuizen, M., 2000. The evolution and conservation of limestone biotas in Malaysia, with special reference to land snails. *Environment, Conservation, and Land. Proceedings of the Sixth Biennial Borneo Research Conference*, 358–362.

- Kuching: Borneo Research Bureau, Universiti Malaysia Sarawak.
- Schneider, S., & Excoffier, L., 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, *152*, 1079–1089.
- Sheue, C. -R., Pao, S. -H., Chien, L. -F., Chesson, P., & Peng, C. -I., 2012. Natural foliar variegation without costs? The case of *Begonia*. *Annals of Botany*, *109*, 1065–1074.
- Slatkin, M., 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical Research*, *58*, 167–175.
- Slatkin, M., 1994. An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research*, *64*, 71–74.
- Slatkin, M., 1995. A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics*, *139*, 457–462.
- Squirrell, J., Hollingsworth, P. M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A. J., Gibby, M., & Powell, W., 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology*, *12*, 1339–1348.
- Suatoni, E., Vicario, S., Rice, S., Snell, T., & Caccone, A., 2006. An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer—*Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *41*, 86–98.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731–2739.
- Takayama, K., Lopez, P. S., Konig, C., Kohl, G., Novak, J., & Stuessy, T. F., 2011. A simple and cost-effective approach for microsatellite isolation in non-model plant species using small-scale 454 pyrosequencing. *Taxon*, *60*, 1442–1449.
- Tebbutt, M. C., Forrest, L. L., Santoriello, A., Clement, W. L., & Swensen, S. M., 2006. Phylogenetic relationships of Asian *Begonia*, with an emphasis on the evolution of rain-ballist and animal dispersal mechanisms in sections *Platycentrum*, *Sphenanthera* and *Leprosae*. *Systematic Botany*, *31*, 327–336.
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., McCouch, S., 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza*

- sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*, 11, 1441–1452.
- Templeton, A. R., Routman, E., & Phillips, C. A., 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140, 767–782.
- Thomas, D. C., Ardi, W. H., & Hughes, M., 2011a. Nine new species of *Begonia* (Begoniaceae) from south and west Sulawesi, Indonesia. *Edinburgh Journal of Botany*, 68, 225–255.
- Thomas, D. C., Hughes, M., Phutthai, T., Rajbhandary, S., Rubite, R., Ardi, W. H., & Richardson, J. E., 2011b. A non-coding plastid DNA phylogeny of Asian *Begonia* (Begoniaceae): Evidence for morphological homoplasy and sectional polyphyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60, 428–444.
- Thomas, D. C., Hughes, M., Phutthai, T., Ardi, W. H., Rajbhandary, S., Rubite, R., Richardson, J. E., 2012. West to east dispersal and subsequent rapid diversification of the mega-diverse genus *Begonia* (Begoniaceae) in the Malesian archipelago. *Journal of Biogeography*, 39, 98–113.
- Twyford, A. D., Kidner, C. A., Harrison, N., & Ennos, R. A., 2012. Population history and seed dispersal in widespread Central American *Begonia* species (Begoniaceae) inferred from plastome-derived microsatellite markers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 260–276.
- Vermeulen, J., & Whitten, T., 1999. Biodiversity and cultural property in the management of limestone resources. Washington (DC): World Bank.
- Wang, L., Schneider, H., Zhang, X. -C., & Xiang, Q. -P., 2012. The rise of the Himalaya enforced the diversification of SE Asian ferns by altering the monsoon regimes. *BMC Plant Biology*, 12, 210.
- Wang, Z. -F., Ren, H., Li, Z. -C., Zhang, Q. -M., Liang, K. -M., Ye, W. -H. & Wang, Z. -M., 2013. Local genetic structure in the critically endangered, cave-associated perennial herb *Primulina tabacum* (Gesneriaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 109, 747–756.
- Watterson, G. A., 1978. The homozygosity test of neutrality. *Genetics*, 88, 405–417.
- Waltham, T., 2008. Fengcong, fenglin, cone karst and tower karst. *Cave and Karst Science*, 35, 77–88.

- 
- Waltham, T., 2010. Guangxi karst: The Fenglin and Fengcong karst of Guilin and Yangshuo. *Geomorphological Landscapes of the World*, 293-302. Oxford: Oxford University Press.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C., 1984. Estimating *F*-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Wiens, J.-J., 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*, 58, 193–197.
- Williams, P., 2008. World heritage caves and karst. Gland: IUCN (International Union for Conservation of Nature).
- Wright, S., 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28, 114.
- Xu, Z.-R., 1995. A study of the vegetation and floristic affinity of the limestone forests in southern and southwestern China. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82, 570–580.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1–16.
- Zhang, L.-Y., 1989. Some special geomorphic processes of the monsoon area in East China. *Catena*, 16, 121–134.
- Zhang, Y., Hayashi, T., Hosokawa, M., Yazawa, S., & Li, Y. -H., 2009. Metallic lustre and the optical mechanism generated from the leaf surface of *Begonia rex* Putz. . *Scientia Horticulturae*, 121, 213–217.
- Zheng, H.-B., Powell, C., McA, R., David, K., Wang, J.-L., & Wang, P.-X., 2004. Late Miocene and mid-Pliocene enhancement of the East Asian monsoon as viewed from the land and sea. *Global and Planetary Change*, 41, 147–155.
- Zhisheng, A., Kutzbach, J. E., Prell, W. L., & Porter, S. C., 2001. Evolution of Asian monsoons and phased uplift of the Himalaya-Tibetan plateau since Late Miocene times. *Nature*, 411, 62–66.

附錄：鹿寨秋海棠採集資訊一覽表

各族群採集地點、地點代號、標本採集號、經緯度資訊、族群個體數以及基因單型頻率，由上至下依據群聚分析的地理分區排列。

Group Name	Administrative Division	Collection Locality	Locality (code)	Collector Number	Latitude(°N) / Longitude(°E)	<i>n</i>	<i>Haplotype</i> (frequency)
East Guangxi	Guilin City, Yanshuo County	Fuli Town, side of Gurung tunnel	Fuli (FL)	<i>HYH006</i>	24°47'08.2"/110°31'22.5"	5	H1(5)
		County Town, side of Yulong River	Yangshuo (YS)	<i>HYH008</i>	24°46'12.9"/110°27'43.4"	13	H1(13)
	Puyi Township	Puyi (PY)	<i>CIP18732</i>	24°43'41.0"/110°31'44.0"	2	H10(2)	
		Gaolang Village	Gaolang (GL)	<i>CIP18735</i>	24°42'34.0"/110°32'07.0"	1	H1(1)
		Gaotian Town, Paitou Village	Gaotian (GT)	<i>KFC1855</i>	24°44'25.8"/110°25'04.9"	5	H7(5)
	Guilin City, Lingui County	Huixian Town, Sishan Village	Lingui (LG)	<i>HYH031</i>	25°02'27.9"/110°11'59.4"	7	H3(3), H4(4)
Laibin City, Xingbin District	Fenghuang Town, Gulou Village, Tsendan Tun	Laibin (LB)	<i>SMK2030</i>	24°00'00.0"/109°10'12.0"	3	H2(2), H9(1)	
North Guangxi	Liuzhou City, Luzhai County	-	Luzhai-I (LZ-I)	<i>HYH018</i>	24°43'37.9"/109°39'50.6"	13	H2(13)
		-	Luzhai-II(LZ-II)	<i>WCL3708</i>	24°45'00.0"/109°39'00.0"	1	H2(1)
	Liuzhou City, Ronshui County	County Town, Xidong Scenic Area	Ronshui (RS)	<i>HYH033</i>	25°05'30.2"/109°12'10.7"	14	H5(14)
West Guangxi	Hochi City, Tian'e County	Bamu Township, Dolou Village, La'hao'yan	Tian'e (TE)	<i>KFC1825</i>	24°52'21.2"/107°11'31.0"	3	H6(3)
	Hochi City, Donglan County	Donglan Town, Dawei Village	Donglan (DL)	<i>SMK2002</i>	24°30'33.0"/107°19'13.0"	2	H2(1), H8(1)
	Hochi City, Fengshan County	Paoli Township (I)	Fenshan-I (FS-I)	<i>SMK2016</i>	24°24'14.0"/107°04'00.0"	1	H8(1)
		Paoli Township (II)	Fenshan-II (FS-II)	<i>SMK2018</i>	24°25'43.0"/107°05'46.0"	1	H8(1)
		Paoli Township (III)	Fenshan-III (FS-III)	<i>SMK2019</i>	24°25'43.0"/107°05'46.0"	1	H8(1)
	Hochi City, Bama County	Xishan Township, Bana Village, Nongna Tun	Bama (BM)	<i>SMK2022</i>	24°14'17.0"/107°15'50.0"	1	H6(1)
	Laibin City, Xingcheng County	County Town, Tsuipinshan Park	Xingchang(XC)	<i>HYH102</i>	24°03'49.5"/108°40'08.9"	19	H2(19)
Hochi City, Du'an County	between Du'an County and Yizhou City	Du'an (DA)	<i>YMS9001*</i>	24°14'00.0"/108°37'00.0"*	1	H2(1)	