

國立臺灣大學生命科學院生命科學系



碩士論文

Department of Life Science

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

台灣特有常綠杜鵑亞屬物種的適應分歧

Adaptive divergence of the *Rhododendron* subgenus

Hymenanthes endemic to Taiwan

曹佳佳

Jia-Jia Cao

指導教授：王俊能 博士

黃士穎 博士

Advisor: Chun-Neng Wang, Ph.D.

Shih-Ying Hwang, Ph.D.

中華民國 107 年 10 月

October 2018

摘要



臺灣的地形呈現豐富的海拔梯度變化，此一海拔梯度差異所產生的多樣化環境，提高了廣適性物種的族群破碎分佈到不同海拔而產生遺傳分化與在地適應，甚至最終導致族群間產生生殖隔離而促成新物種的產生。然而另一方面高低海拔族群間，可能受限於地理隔離不足而仍能基因交流，進而抑制族群間的分化。因此，在臺灣間斷分佈的杜鵑便提供了探討適應性演化抗衡族群間基因交流以建立生殖隔離，最終產生新品種的絕佳素材。杜鵑花科的玉山杜鵑複合群包含四種杜鵑，其中紅星杜鵑局限分佈於低海拔，其餘三種（玉山杜鵑、森氏杜鵑、南湖杜鵑）則局限分佈於較高的海拔。本研究以擴增片段長度多態性（AFLP）分子標記獲得四種杜鵑（9 個族群、172 個個體）之變異。

為了評估玉山杜鵑複合群的族群結構與遺傳距離，我們採用 STRUCTURE 和 DAPC 分析 AFLP 分子標記基因座，幫助我們瞭解各種間的遺傳差異。為了評估環境差異是否對玉山杜鵑複合群的遺傳變異產生影響，表示有適應性演化的發生，我們使用 ARLEQUIN 和 BAYESCAN 對種間遺傳變異做離群檢測找出偏離中性演化的基因座。而為了評估環境變量對玉山杜鵑複合群的影響，我們使用 PCA 分析族群間的環境因數差異性，並通過相關性檢測篩選出共線性較低的六個環境因子。然後以 RDA 分析遺傳變異、族群分群和環境因子之間的關聯性。最後使用 SAMBADA 的邏輯回歸來檢測偏離中性演化的基因座頻率和這些族群間有差異的環境變數之間的關聯性，以確定那些環境因數可能和適應性演化有關。

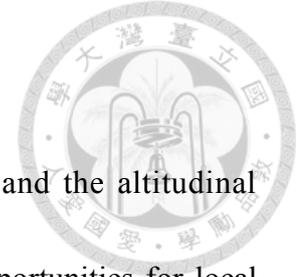
STRUCTURE 和 DAPC 分析一致顯示紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群內的另外三種杜鵑之間具有最大的種間遺傳差異。Outlier loci 檢測到六個顯著偏離中性演化的基因座。環境因子做 PCA 分析發現與溫度相關的环境因子相較於雨量而言，可以更好的將紅星杜鵑和其他三個物種的生育環境做區分。RDA 分析證明六個相關性較低的環境因子中（BIO01、BIO04、BIO13、BIO18、BIO19、BIO20）三個與溫度相關的环境因子（BIO01、BIO04、BIO20）在區分紅星杜鵑和其他三個物

種間貢獻了主要力量。SAMBADA 的分析結果也顯示六個偏離中性演化的位點中有五個檢測出與溫度相關的环境因子存在較大的關聯性。

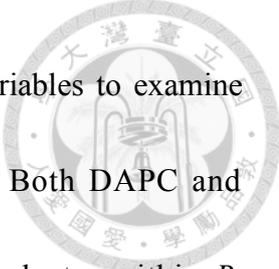
總結發現，紅星杜鵑和玉山杜鵑複合群內的其他三個種隨著海拔梯度的變化呈現遺傳分化和環境差異，且檢測出偏離中心演化的基因座和环境因子具有關聯性。因此，我們認為紅星杜鵑已經發生了適應性分化，應該將其從玉山杜鵑複合群中獨立出來。另外，南湖杜鵑雖然形態上和複合群內的其它三個種有所差異，但遺傳分析並不支持南湖杜鵑與複合群內的其它三個種有最大的遺傳距離，所以本研究不認同南湖杜鵑歸為亞屬里不同的種。

關鍵詞：玉山杜鵑複合群、天擇、在地適應、適應性基因座、遺傳分化

Abstract



Taiwan has dramatic elevation gradient changes of terrain, and the altitudinal gradients of diversified environment may lead to the increased opportunities for local adaptation of different ecotypic species. Populations distributed at different altitudes may encounter reproductive isolation and even speciation. *Rhododendron pseudochrysanthum* complex (*Ericaceae*) includes four species. Among them, *Rhododendron rubropunctatum* is restricted to low elevation and the other three (*Rhododendron morii*, *Rhododendron pseudochrysanthum*, *Rhododendron hyperythrum*) are restricted to higher elevations. We used amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique to quantify the genetic variation and divergence of 172 individuals from nine populations of *R. pseudochrysanthum* complex. In order to evaluate genetic structure and genetic differentiation of the *R. pseudochrysanthum* complex, STRUCTURE and DAPC were used to infer genetic composition of *R. pseudochrysanthum* complex. To detect genetic loci deviated from neutral evolution, we used ARLEQUIN and BAYESCAN to detect the outlier loci. To evaluate the suitable whether environmental factors variation among species in *R. pseudochrysanthum* complex, we applied PCA analysis the environmental factors among different populations. Further, to co-evaluate the Association between genetic data and environmental variables, we applied RDA to study correlation among genetic data, population data and environmental variables. Finally, we used SAMBADA



to assess the correlation between outlier loci and environmental variables to examine whether local adaptation signal exist among these outlier loci. Both DAPC and STRUCTURE showed that *R. rubropunctatum* formed its own cluster within *R. pseudochrysanthum* complex. Outlier loci analysis detected six loci that deviated from neutral selection. PCA and RDA portrayed that environment factor of *R. pseudochrysanthum* complex can be diversified into two groups. SAMBADA results showed that the outlier loci were significantly correlated with the environmental factors about temperature. In conclusion, according to the genetic data and environmental variables analysis, *R. rubropunctatum* has the local adaptation in *R. pseudochrysanthum* complex, We proposed that the *R. rubropunctatum* may be phylogenetically separated from *R. pseudochrysanthum* complex. In addition, although the *R. hyperythrum* is morphologically different from the other three species in *R. pseudochrysanthum* complex, but the genetic analysis does not support the maximum genetic distance between the *R. hyperythrum* and the other three species in the complex. So this study doesn't support that the *R. hyperythrum* belong to the *Hymenanthes* subgenus's *Ponica* subsection.

Key words: *Rhododendron pseudochrysanthum* complex, Natural selection, Local adaptation, Selective outliers, Genetic differentiation

目錄



摘要	I
Abstract	III
圖目錄	VII
表目錄	VIII
第一章：研究背景與動機	1
1.1：冰河期循環對於植物遷徙的影響	1
1.2：族群破碎化對遺傳結構變動與演化的影響	2
1.3：地理隔離和環境差異對次族群間遺傳分化產生的影響	3
1.4：玉山杜鵑複合群之相關研究	4
1.5：本研究欲探討之議題	6
第二章：材料與方法	7
2.1：研究材料	7
2.2：實驗方法	10
2.2.1：DNA 定量與稀釋	10
2.2.2：擴增片段長度多型性(AFLP)	10
2.2.2.1：限制酶切割(Digestion)	11
2.2.2.2：Adaptor 接合(Ligation)	11
2.2.2.3：前擴增反應(Pre-selection amplification)	11
2.2.2.4：選擇性擴增反應(Selective PCR amplification of restriction fragments)	12
2.2.2.5：電泳及基因分型(Genotyping)檢測	12
2.3：資料分析	13
2.3.1：AFLP 條帶之獲得	13
2.3.2：引子錯誤率(Error rate)及多型性(Polymorphism)條帶之獲得	13



2.3.3：遺傳資料之分析	14
2.3.3.1：遺傳歧異度.....	14
2.3.3.2：族群遺傳結構與分群.....	15
2.3.3.3：偏離中性演化的基因座之選擇.....	17
2.3.4：環境因數之分析及篩選	19
2.3.5：適應性演化基因座之檢測	20
第三章：結果	21
3.1：AFLP 引子的篩選	21
3.2：遺傳歧異度.....	22
3.3：族群遺傳結構與分群.....	24
3.4：偏離中性演化的基因座之選擇.....	32
3.5：環境因數的差異.....	33
3.6：偏離中性演化基因座與環境因數的關聯.....	36
第四章：討論	38
4.1：往高海拔遷徙引起的族群收縮並沒有造成各族群間遺傳歧異度產生較大 差異	38
4.2：紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群內的其它三個種存在最大的遺傳分化... ..	38
4.3：南湖杜鵑與玉山杜鵑和森氏杜鵑的遺傳分化較小.....	39
4.4：海拔梯度造成的溫度差異有可能是促成紅星杜鵑與其它玉山杜鵑複合群 適應性分歧的原因	40
4.5：玉山杜鵑複合群各種間的適應性分歧可能已經趨向於種化.....	41
第五章：結論	43
附件	44
參考文獻	46



圖目錄

圖一、 各樣本採集點分佈圖.	9
圖二、 玉山杜鵑複合群獨立之分群方式.	18
圖三、 STRUCTURE 檢測臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群獨立之分群結果	27
圖四、 STRUCTURE 檢測臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之分群 $\Delta L(K)$ 結果	28
圖五、 刪除 STRUCTURE 分群下 $\Delta L(K)=9$ 後的離值後檢測臺灣杜鵑及玉山杜鵑 複合群之分群 $\Delta L(K)$ 結果.	28
圖六、 STRUCTURE 檢測玉山杜鵑複合群獨立之分群 $\Delta L(K)$ 結果.	28
圖七、 臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群的親緣關係進行主成分的判別分析(DAPC)之結 果	29
圖八、 玉山杜鵑複合群的親緣關係進行主成分的判別分析(DAPC)之結果	30
圖九、 Neighbor Joining 親緣樹顯示臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群的親緣關係	31
圖十、 玉山杜鵑複合群下分別對 11 個溫度相關和 8 個雨量相關的 BIO 環境因數 進行主成分分析(PCA)之結果.	34
圖十一、 玉山杜鵑複合群和環境因數進行冗餘分析(RDA)之結果.	35

表目錄

表一、 臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群物種樣本數及採集地資訊表.	8
表二、 選擇性擴增反應引子之序列及錯誤率.	21
表三、 臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之遺傳歧異度	23
表四、 臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之族群間兩兩比較的 F_{ST} 值	25
表五、 臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之 AMOVA 分析結果.	26
表六、 ARLEQUIN 和 BAYESCAN 檢測下，玉山杜鵑複合群之受天擇作用基因座 (Outlier loci)分析結果.	32
表七、 八個環境因子的共線性檢測結果.	35
表八、 SAMBADA 檢測下，玉山杜鵑複合群之受天擇作用基因座(Outlier loci)與 環境因數關聯性分析結果.	37
表九、 玉山杜鵑複合群之受天擇作用基因座(Outlier loci)數量統計結果.	37





第一章：研究背景與動機

1.1：冰河期循環對於植物遷徙的影響

因氣候震盪引起的冰河循環，深深地影響著陸生動植物的分佈與拓殖史。當冰期(Glacial)來臨時，全球氣溫下降，使得原本適應寒冷氣候的寒溫帶物種往低緯度或低海拔遷徙。相反，當間冰期(Interglacial)來臨時，溫度上升，原本拓殖於低緯度或低海拔的寒溫帶物種會再度退回高緯度或高海拔。Hewitt 對動物於冰期遷徙的研究也證明，在冰期未被冰層覆蓋的地區因穩定潮濕的氣候環境為物種生存和新譜系的產生提供了適當的棲息地而成為避難所(Hewitt, 2000)。很多研究也不斷的發現新的避難所，例如：美國西部、日本南部、澳大利亞北部等。這些研究都說明更新世(Pleistocen)的氣候變化確實影響了物種的族群史(Brubaker et al., 2005; Shumpei et al., 2005; Su et al., 2007)。

臺灣是位於亞洲大陸邊緣的大陸島(Continental island)，由歐亞板塊與菲律賓板塊推擠而形成多樣的地形地貌。南北走向的中央山脈將臺灣分成東部和西部區域，最高海拔達 3,952 公尺且海拔達到 3,000 公尺的高峰就超過 200 個，從而形成了臺灣島豐富的地形(Hsieh, 2002)。冰期來臨時海平面下降，亞洲大陸上的寒溫帶物種透過露出水面的臺灣海峽(陸橋)往臺灣遷移，使得臺灣的中低海拔區域，在冰期成為寒溫帶植被的避難所。Tsukada 學者以日月潭湖底沉積物分析孢粉化石組成並配合 C¹⁴ 同位素定年法推估最後一次冰河期(玉木冰期)該區域的植被環境。研究發現日月潭湖底沉積物中的孢粉多為寒溫帶針葉樹種(Tsukada, 1966)。與今日的植被環境比較則發現，玉木冰期生長於日月潭一帶的植物現今則生長於海拔約 2,500 公尺的山區，以海拔上升 100 公尺氣溫便下降 0.6°C 推算可得知，當時的平均溫度比現在約低 8 至 11°C。以此推估，玉木冰期寒溫帶植物曾廣泛分佈在中低海拔，而冰河退去後，由於溫度升高，寒溫帶植物無法與生長迅速且更適應低海拔環境的亞熱帶物種競爭(Jump et al., 2009)，這時寒溫帶植物就會往高緯度或高海拔拓殖以尋求適合的生長環境。但後冰期(Postglacial)氣候回暖造成的海平面上升使得臺灣海



峽的陸橋沒入海裡，臺灣島不與大陸相連，導致植物無法往亞洲大陸的高緯度回遷，但臺灣高聳的山脈卻提供了寒溫帶物種往高海拔遷徙的空間。研究發現，臺灣的森林在冰期過後往高海拔遷移 1,500 至 1,600 公尺(Chen et al., 2013)。以上研究都支持，間冰期的氣候暖化會使得分佈在較為局限區域(如臺灣島嶼)的低海拔寒溫帶物種往高海拔拓殖。

植物本身拓殖能力差異和地形限制都會影響植物族群能否隨氣候變化而成功拓植到新棲息地。臺灣中央山脈的寒溫帶植物族群在後冰期就因為受到地形和氣候的限制而被迫往棲息地較小的高海拔遷徙，這樣往往會造成連續分佈的原始族群消失或破碎化為次族群(Subpopulation) (Dechaine & Martin, 2005)。次族群破碎化後會使得各族群間的基因流(Gene flow)受到限制，且不同海拔的環境差異也可能會促進在地適應的發生。若分佈於不同海拔的族群持續缺乏基因交流，甚至可能會演化出新的物種(Gavrilets & Vose, 2005)。

1.2：族群破碎化對遺傳結構變動與演化的影響

不論是人為還是自然因素都有可能造成植物族群的破碎化，而族群破碎化後立即的影響包括次族群間隔離程度的增加和有效族群數量的下降(Lowe et al., 2005)。進一步的影響則是基因流(Gene flow)的減少、遺傳漂變(Random genetic drift)強度的增加、以及近親交配和自交(Inbreeding)機率的升高。破碎化的次族群面臨的不同生態環境，會影響族群遺傳結構分歧，並可能導致適應性演化的發生，因此破碎化的族群能夠為早期異域種化之特徵的相關研究提供良好的機會(Bernardi & Lape, 2005; Wiens, 2004)。

族群破碎化會使得族群縮小，族群的縮小會導致有效個體數量的下降，有效個體數量下降的程度和持續的時間都會影響族群遺傳結構變動的嚴重程度。族群因破碎化而失去棲息地後個體數量的減少，會導致有機會繁衍後代的有效個體數量也隨之下降，進而導致稀有對偶基因 (Rare alleles) 先消失，經過數個世代後



普遍對偶基因 (Common alleles) 也會消失，造成遺傳歧異度降低。有效個體數量的減少也會增加遺傳漂變的強度，因為不一定每個個體都有機會將基因傳給下一代，所以遺傳漂變是隨機事件，而這個過程將會造成對偶基因頻率的隨機變化，以至某個基因固定或消失在族群裡，此過程對個體數量較少的族群有更大的影響力(Elam, 1993)。有效個體數量的減少還會增加自交和近親交配的機率，自交會影響對偶基因的異質結合度，而近親交配也會將有害的隱性遺傳累計在族群裡。因此，族群破碎化會造成次族群間遺傳結構的分歧(Young et al., 1996)。

不過破碎化對族群遺傳結構的影響程度還取決於不同植物生活史特性的差異，例如種子的散佈方式、繁殖系統的形式和壽命的長短等(Lowe et al., 2005)。以種子的散佈方式而言，風傳媒比蟲傳媒的物種具有更廣泛的傳播距離，因此相距較遠的族群間可能會有更多的基因流，族群遺傳結構也更相似。破碎化的次族群也可能會存活在不同的生態環境下，而次族群間的地理隔離和生存地的環境差異都有可能促進遺傳分化的驅動力(Gavrilets & Vose, 2005; Laurance et al., 2007)。

1.3：地理隔離和環境差異對次族群間遺傳分化產生的影響

影響物種遺傳分化最常見的兩種原因是環境差異和地理隔離。在物種分化的過程中，環境差異對基因組的遺傳分化所產生的影響一直是演化生物學的重要議題(Schluter, 2001; Williams, 1966)，而過去的研究發現地理距離也會通過影響基因交流(Gene flow)的頻繁程度而影響遺傳分化(Bolnick & Fitzpatrick, 2007)。

台灣這個板塊擠壓形成的多山島嶼，夏季除了容易受到颱風及梅雨帶來大規模降雨外，冬季還會受到西伯利亞大陸冷氣團的影響。一方面，如此錯綜複雜的地形結構及氣候形態，可能導致物種棲地的生態環境產生異質性，及不同的天擇壓力發生。另外一方面，台灣面積有限，分佈臨近的族群可能有較多的基因交流，因而降低族群間遺傳分化的產生(Jerry & Coyne, 2004; Via, 2012)。但近年來



的研究發現伴隨基因交流發生分化的例子越來越多(Patrik, 2008)，尤其是因為族群間生態環境或棲位(Niche)差異的分歧天擇(Divergent selection)作用，導致生殖隔離而產生的生態分化(Ecological differentiation)(Nosil et al, 2009(B); Rundle & Nosil, 2005; Schluter, 2001)，由此給我們研究環境差異可能是開啟基因交流族群間分化的重要因數提供了良好的機會(Via, 2012)。

1.4：玉山杜鵑複合群之相關研究

玉山杜鵑複合群在分類上屬於杜鵑花科(*Ericaceae*)杜鵑花屬(*Rhododendron*)，是分佈最廣泛的木本植物之一，除南美洲及非洲以外的溫帶及寒溫帶均有分佈，主要分佈於北半球，全球有超過一千個種，共 70 個屬(Chamberlain et al., 1996)，其中有 6 個屬在臺灣被發現(黃啟俊與徐再文, 2005)。臺灣氣候環境豐富，海拔差異大，是冰河時期(Ice age)的避難所(Refuge)之一，所以植被種類豐富。在後冰河期(Postglacial)的長期地理隔離下，現在已經發現了很多臺灣特有種，根據 2003 年完成的第二版《臺灣植物志》統計，臺灣的維管束植物共計 4,077 分類群，其中大約有 1/4 是特有種。

Hymenanthes 是杜鵑花屬中常見的亞屬，包含 225 個物種(Mabberley, 1997)。臺灣的特有種杜鵑包含 13 個種以及 2 個亞種，其中 5 個特有種杜鵑被分類在 *Hymenanthes* 亞屬之下，這 5 個物種為臺灣杜鵑(*Rhododendron formosanum*)與玉山杜鵑複合群(*Rhododendron pseudochrysanthum* complex)。玉山杜鵑複合群包含四個種，分別為紅星杜鵑(*Rhododendron rubropunctatum*)、玉山杜鵑(*Rhododendron pseudochrysanthum*)、森氏杜鵑(*Rhododendron morii*)和南湖杜鵑(*Rhododendron hyperythrum*)。紅星杜鵑、玉山杜鵑和森氏杜鵑分類屬於 *Maculifera* subsection，南湖杜鵑則是 *Hymenanthes* 亞屬裡面唯一屬於 *Ponica* subsection 的種(Li et al., 1998)。玉山杜鵑複合群之所以被稱為複合群是因為各種間外在形態上只有微小的差異，難以區分，所以也曾有研究建議將這些種應合併

為同一物種，但難以否認他們之間確實仍存在差異(Chung et al., 2007)。

臺灣杜鵑分佈廣泛，在海拔 1,000 至 2,000 公尺的亞熱帶闊葉林均能存活，葉片背部沒有絨毛，葉緣捲曲，花期為 4 月。玉山杜鵑複合群分佈在山地，其中紅星杜鵑族群僅稀疏的生長於臺灣北端海拔 600 至 1,200 公尺之間的亞熱帶闊葉林 (Li et al., 1998)，葉片背部有白色絨毛，厚革質葉，且葉緣捲曲，花期為 4 月到 6 月。如今在野生環境中只剩下少數殘餘族群，並且已經被認為是瀕臨滅絕的物種。森氏杜鵑族群主要生長於海拔約 2,400 至 3,000 公尺之間的寒溫帶闊葉林的裸露碎石斜坡上，葉片背部有棕色絨毛，厚革質葉，且葉緣捲曲，花期為 3 月到 5 月。玉山杜鵑族群主要生長於海拔 3,000 公尺以上的冷溫帶針葉林周邊的裸露碎石斜坡上，葉片背部有白色至淺棕色絨毛，厚革質葉，且葉緣捲曲，花期為 4 月到 6 月。森氏杜鵑與玉山杜鵑生長于高山的頂端，在臺灣中南部與南部海拔在 3,000 至 3,950 公尺處有重疊分佈。因為森氏杜鵑與玉山杜鵑在形態和分佈上的雷同，親緣樹等遺傳研究也發現這兩種物種極為相似，故有人主張將其二者合併為同一物種(Lu & Yang, 1989)。南湖杜鵑族群僅生長于南湖大山頂峰，海拔約 3,500 公尺的高山凍原，葉片背部有黃褐色絨毛，葉緣平緩，花期為 3 月到 5 月。

前人以 cpDNA(Chloroplast DNA)基因 *trnF-trnL* 序列分析 8 個臺灣特有種杜鵑，結果表明玉山杜鵑複合群四個種間的親緣關係非常接近(黃士穎與徐國凱，2001)。近一步以 cpDNA 基因 *atpB-rbcL* 的序列分析森氏杜鵑及玉山杜鵑發現，森氏與玉山杜鵑有相當多類似的單套型而使兩者無法清楚分開，結果表明森氏杜鵑和玉山杜鵑是非常相似的物種(黃啟俊與徐再文，2005)。藉由葉綠體 DNA 序列變異數據的分析，顯示玉山杜鵑複合群在上一次冰期可能經歷了由中海拔山區由北往南擴張的情形，以演化的角度來看，演化方向是由北部的紅星杜鵑往中、南部分佈的玉山杜鵑複合群其它物種演變(Chung et al., 2007)。因為葉綠體 DNA 在演化上的特性為母系遺傳，所以具有高度的保守性。更進一步的研究使用核基因 ITS(Internal transcribed spacer)分析玉山杜鵑複合群內四個物種間的親緣關係發



現，南湖杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑的遺傳距離為 0，紅星杜鵑與南湖杜鵑的遺傳距離為 0.4(Tsai et al., 2015)，因此核基因 ITS 的序列分析說明玉山杜鵑複合群裡的紅星杜鵑與其它三個種間有較遠的親緣關係。最新使用 EST-SSR 做多型性分子標記的研究發現，後冰期(Postglacial)的氣候暖化造成了玉山杜鵑複合群的破碎化，在分佈於臺灣各區域的次族群中，除紅星杜鵑以外的其他種的各族群都分佈在高海拔山頂，且紅星杜鵑與其它三種杜鵑有較大的遺傳差異(Chen et al., 2013)。本研究則可以進一步探索玉山杜鵑複合群次族群間造成在地適應的環境因數。

1.5：本研究欲探討之議題

玉山杜鵑複合群因為各種間的形態特徵差異微小，不易採用形態特徵區分。鑒於此，前人研究也嘗試用不同類型的分子標記如 cpDNA、ITS 和 SSR，針對玉山杜鵑複合群進行鑒別種的研究。然而，這些分子標記僅能鑒別出紅星杜鵑與他種杜鵑有遺傳差異，至於其他種杜鵑之間則仍然無法區別。此外，前人研究著重于玉山杜鵑複合群內的鑒種，並沒有探討分佈於不同海拔的玉山杜鵑族群是否有適應演化的現象。因此本研究想要根據玉山杜鵑複合群的遺傳差異和生存環境因數之間的關聯性，進一步瞭解玉山杜鵑複合群內是否有因為適應環境差異而演化出新物種的趨勢。



第二章：材料與方法

2.1：研究材料

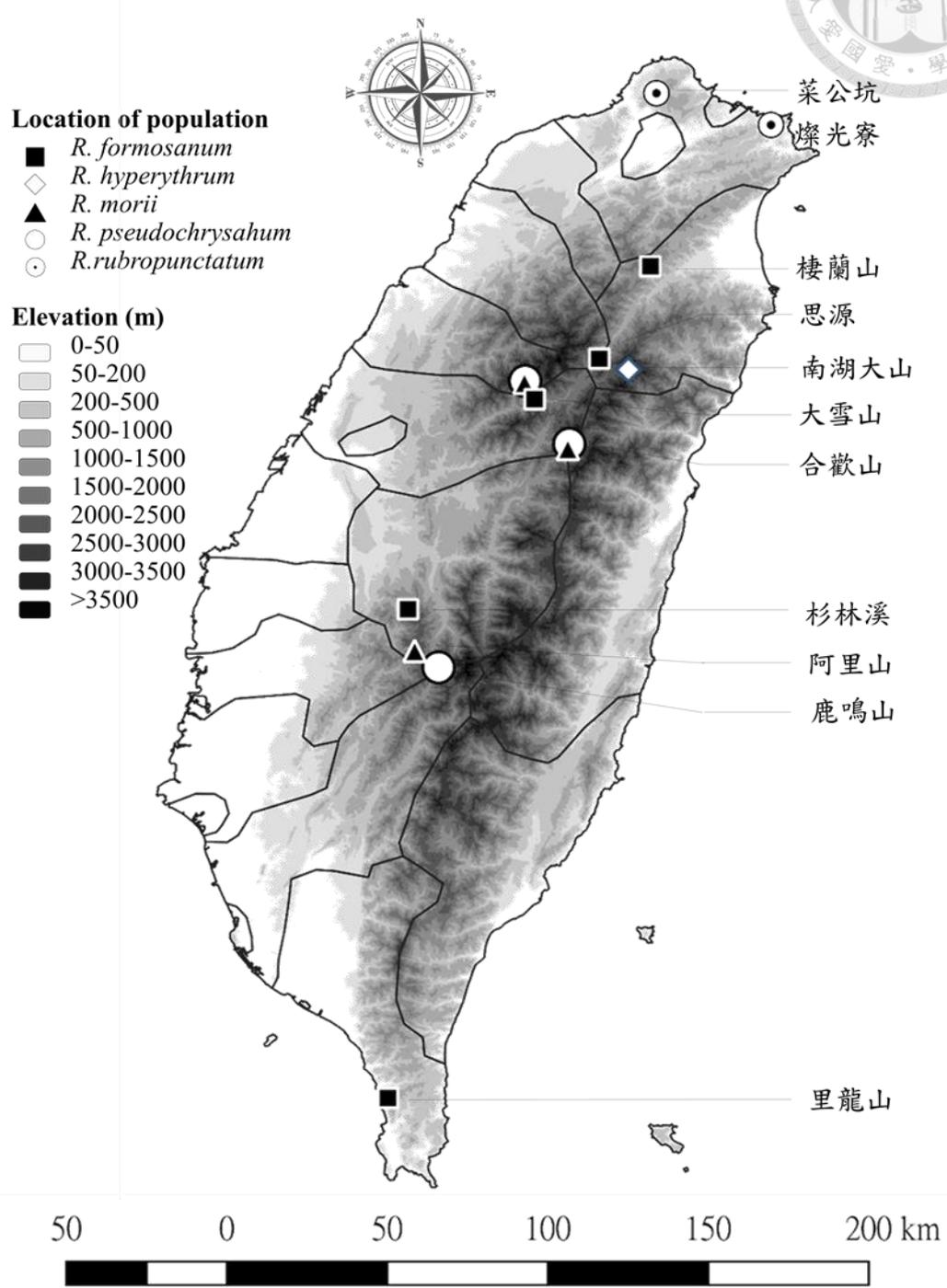
本研究對象為杜鵑花 *Hymenantes* 亞屬中的 5 個台灣特有種，包含台灣杜鵑 (*Rhododendron formosanum*) 與玉山杜鵑複合群 (*Rhododendron pseudochrysanthum* complex)。玉山杜鵑複合群包含四個種，紅星杜鵑 (*Rhododendron rubropunctatum*)、玉山杜鵑 (*Rhododendron pseudochrysanthum*)、森氏杜鵑 (*Rhododendron morii*) 和南湖杜鵑 (*Rhododendron hyperythrum*)，它們因為形態相似而被歸為一個複合群，早期的形態分類學家認為紅星杜鵑、玉山杜鵑、森氏杜鵑和南湖杜鵑都起源于玉山杜鵑 (Hui-Lin et al., 1998)，所以統稱為玉山杜鵑複合群。在本研究中加入台灣杜鵑的樣本是因為台灣杜鵑為玉山杜鵑複合群的最近緣物種，同在 *Hymenantes* 亞屬之下 (黃士穎與徐國凱, 2001)，因此使用台灣杜鵑當作有效的外群，以提升玉山杜鵑複合群內的解析度。

紅星杜鵑樣本來源於菜公坑 (RrTGK) 族群的 14 個個體、燦光寮 (RrTGL) 族群的 21 個個體。玉山杜鵑樣本來源於大雪山 (RpTHS) 族群的 19 個個體、合歡山 (RpHHS) 族群的 17 個個體、鹿鳴山 (RpLLS) 族群的 20 個個體。森氏杜鵑樣本來源於阿里山 (RmALS) 族群的 18 個個體、大雪山 (RmTHS) 族群的 8 個個體、合歡山 (RmHHS) 族群的 14 個個體。南湖杜鵑樣本來源於南湖大山 (RhNHTS) 族群的 41 個個體。台灣杜鵑樣本來源於棲蘭山 (RfCLS) 族群的 11 個個體、大雪山 (RfTHS) 族群的 11 個個體、裡龍山 (RfLELS) 族群的 14 個個體、杉林溪 (RfSLX) 族群的 10 個個體和思源 (RfSY) 族群的 14 個個體。本研究樣本採集點位置如圖一所示，樣本數及採集地資訊如表一所示。



表一、臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群物種樣本數及採集地資訊表

物種	採集地	族群代號	樣本數	經度	緯度	海拔(m)
紅星杜鵑 <i>R. rubropunctatum</i>	菜公坑	RrTGK	14	25° 11'23"	121° 31'18"	886
	燦光寮	RrTGL	21	25° 05'40"	121° 51'48"	630
玉山杜鵑 <i>R. pseudochrysalum</i>	大雪山	RpTHS	19	24° 19'25"	121° 07'49"	3121
	合歡山	RpHHS	17	24° 08'03"	121° 15'43"	3400
	鹿鳴山	RpLLS	20	23° 27'41"	120° 52'19"	2862
	阿里山	RmALS	18	23° 30'40"	120° 48'02"	2100
森氏杜鵑 <i>R. morii</i>	大雪山	RmTHS	8	24° 19'07"	121° 07'41"	3085
	合歡山	RmHHS	14	24° 07'10"	121° 15'27"	2800
南湖杜鵑 <i>R. hyperythrum</i>	南湖大山	RhNHTS	41	24° 21'27"	121° 26'17"	3500
台灣杜鵑 <i>R. formosanum</i>	棲蘭山	RfCLS	11	24° 40'07"	121° 30'12"	1600
	大雪山	RfTHS	11	24° 16'07"	121° 09'30"	2200
	里龍山	RfLELS	14	22° 09'56"	120° 43'14"	1000
	杉林溪	RfSLX	10	23° 38'11"	120° 46'50"	1700
	思源	RfSY	14	24° 23'27"	121° 21'05"	1900



圖一、各樣本採集點分佈圖



2.2：實驗方法

2.2.1：DNA 定量與稀釋

本研究使用的 DNA 來自於梁博凱學長留下的 DNA 原液，萃取方法請詳見梁博凱之碩士論文(梁博凱, 2011)。

取出 DNA 原液 1 μ L 放置於 Nano drop1000(Thermo fisher scientific)測定濃度，再從已測定 DNA 濃度值的樣本中取出適量的原液用 ddH₂O 稀釋，使稀釋後樣本濃度為 20ng/ μ L，置於-20 $^{\circ}$ C 冰箱中儲存備用。

2.2.2：擴增片段長度多型性(AFLP)

本研究選用的 AFLP 分子標記法已被廣泛的應用於動植物、細菌、真菌及害蟲的研究上(Bensch & Akesson, 2005)，此方法的特點在於結合了過去限制片段多型性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)和聚合酵素連鎖反應(Polymerase chainreaction, PCR)的優點，首先是此技術不需要預先得知物種的序列資訊，並可偵測到全基因組遺傳差異，而且只需要少量的 DNA 就可以得到大量的多型性條帶以此來估算出族群間的遺傳差異。

根據 1995 年 Vos 等人所提出 AFLP 之實驗方法及結合引子序列(Adapter)進行 AFLP 實驗流程，主要分為三個步驟。首先，利用兩種限制性酵素酶(Restriction enzyme)切割基因組 DNA 後，在這些片段的兩端黏上相對應的結合子序列，其序列包含一段核心序列(Core sequence)及一段限制酶專一序列(Enzyme-specific sequence)。其次，利用與結合子序列對應的引子(Primer)進行選擇性擴增限制片段，引子的設計包含一段核心序列、一段限制酶專一性序列和一段選擇性衍伸序列，衍伸序列(Selective extension)由 3 到 4 個可以任意組合的鹼基組成，此步驟需進行兩次聚合酶連鎖反應(PCR),分別為前擴增反應(Pre-selective amplification)和選擇性擴增反應(Selective amplification)，在選擇性擴增時，添加熒光標記於引子的 5'端，並擴增出具有引子相對應的 DNA 片段。



2.2.2.1：限制酶切割(Digestion)

1：取濃度為 20 ng/ μ L 的 DNA 稀釋液 5 μ L，加入所需的內切酶(Restriction endonuclease)，包含 1 μ L 的 *EcoR* I (濃度為 20U/ml) (NEB, cat. #R3101L)和 1 μ L 的 *Mse* I (濃度為 10U/ml) (NEB, cat. #R0525L)，以及相對應的反應試劑 2 μ L 的 CutSmart buffer(濃度為 10X) (NEB, cat. #B7204S)，和 11 μ L 的 ddH₂O，共 20 μ L 於 37°C 下對 DNA 進行 1.5 小時的酶切。切割反應結束後升溫至 65°C 處理 15 分鐘用以去除反應管內限制酶的活性。

2.2.2.2：Adaptor 接合(Ligation)

1：酶切後的 DNA 模版會形成與 *EcoR* I 及 *Mse* I 相對應具有突出末端的切位，我們使用相對應的反應試劑 Rapid ligation kit (cat. #RC011, Real Biotech Corporation, Taipei, Taiwan)，包含 2 μ L 的 *EcoR* I adaptor (濃度為 5 μ M)、2 μ L 的 *Mse* I adaptor (濃度為 50 μ M)、2 μ L 的 10 \times Buffer A、2 μ L 的 10 \times Buffer B、1 μ L 的 Ligase (濃度為 3U/ μ l)和 1 μ L 的 dd H₂O，共 10 μ L 加到 Digestion 的產物中，於 22°C 作用 1 小時，使其產生平整的引子對接位供後續多型性片段擴增使用。

2：將 Ligation 完成後的產物以 T₁₀E_{0.1} 稀釋 10 倍備用。

2.2.2.3：前擴增反應(Pre-selection amplification)

1：取 4 μ L 已稀釋 10 倍的 Ligation 產物，加入含 0.75 μ L 的 *EcoR* I (濃度為 20U/ml) (E00AC: 5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3')及 0.75 μ L 的 *Mse* I (濃度為 10U/ml) (M00G: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAG-3') 引子對的 PCR 緩衝液中(配方為 1 μ L 的 10X Buffer (2 ml 的 Tris-HCl, 10 ml 的 KCl, 0.01 ml 的 EDTA)、0.5 μ L 的 dNTP (濃度為 2.5mM)、0.5 μ L (濃度為 0.15mM)的 MgCl₂、0.2 μ L 的 Units Taq DNA 聚合酶 (濃度為 5U/ μ l) (Zymeset biotech, Taipei, Taiwan)和



2.3μL 的 ddH₂O 中，共 10 μL 的混合物進行第一次 PCR,以 BIO-RADs1000™ Thermal Cycler 進行反應，其 PCR 反應溫度設定如下：(a)72°C(Pre-heating)作用 2min。(b)94°C(Pre-denaturation)作用 3min。(c)94°C(Denaturation)作用 30s、56°C(Annealing)作用 30s、72°C(Extension)作用 1min，循環 25 次。(d)72°C(Final Extension)作用 5min。

2：將 Pre-selective amplification 完成後的產物以 T₁₀E_{0.1} 稀釋 20 倍備用。

2.2.2.4：選擇性擴增反應(Selective PCR amplification of restriction fragments)

1：取 1μL 已稀釋 20 倍的 Pre-selection 產物，在 5'端含螢光標定 (Fam、Hex) 的 1μL 的 *EcoR* I (濃度為 20U/ml)及 1μL 的 *Mse* I (濃度為 10U/ml)選擇性引子對 (Selective primer pair)的 PCR 反應所需緩衝液中(Selective amplification) ((1μL 的 10X Buffer、0.5μL 的 dNTP (濃度為 2.5mM)、0.1μL 的 Taq DNA 聚合酶 (濃度為 5U/ul) (Zymeset biotech, Taiwan)、0.5μL 的 MgCl₂ (濃度為 0.15mM)和 4.9μL 的 ddH₂O)，共 10μL 的混合液中進行第二次的 PCR 反應溫度設定如下：(a)94°C(Pre-denaturation)作用 3min。(b)94°C(Denaturation)作用 30s、65°C (Annealing)作用 30s (第一個循環 65°C，之後每個循環降 0.7°C)、72°C (Extension)作用 1min，循環 13 次。(c)94°C(Denaturation)作用 30s、56°C (Annealing)作用 30s、72°C(Extension)作用 1min，循環 23 次。(d) 72°C(Final Extension)作用 5min。

2.2.2.5：電泳及基因分型(Genotyping)檢測

AFLP 引子對的篩選對是否能成功擴增出多型性片段及獲得正確的遺傳分型資料極為重要，我們會先以瓊膠電泳判讀 AFLP 產物。判讀法是將 PCR 反應後各樣本最終所得之產物各取 2μL 加上 1μL 的 Loading dye 和 2%洋菜膠，置於 60 伏特、0.5×TBE 緩衝液中，進行電泳約 60 分鐘後，在 UV 燈照射下用相機拍照記

錄，確認產物在 100-500 bp 之間發現均勻分佈的 Smear 片段並帶有少數明顯條帶後，將剩餘產物交送生技公司做基因分型(Genotyping)的檢測。

本研究以 ABI PRISM 3730 XL DNA Analyzer(Applied Biosystems)進行毛細管電泳分析，並加入 LIZ600 螢光標定片段做為參考標準品比對擴增片段大小，獲得的基因數據後使用軟體 Peak Scanner Software V1.0(Applied biosystems)匯出條帶資訊，並以 TinyFLP(Arthofer, 2010)判讀條帶有無(1/0)並獲得遺傳分型數據。

2.3：資料分析

2.3.1：AFLP 條帶之獲得

我們使用 TinyFLP 軟體依據顯示的螢光訊號之強弱及 DNA 片段的長度來自動判讀條帶(Automatic scoring pattern)。判定條件如下所敘，將特定片段長度位置有條帶出現者記錄為 1(Presence)，無條帶被擴增者記錄為 0 (Absence)。但條帶的篩選須符合如下條件(TinyFLP 軟體參數設定)： DNA 條帶長度介於 100 到 500bp 之間(Minimum size:100, Maximum size:500)；條帶螢光強度(Intensity)要高於 150 (Minimum peak height:150)；峰寬需小於 1bp (Maximum peak width:1)；兩條帶最高峰相近時，雙峰的間距如果小於 1bp 時，這個雙峰都會捨棄 (Minimum peak-peak distance:1, Peak height difference:0)，不同的個體間峰值範圍左右距離不能超過 0.8bp (Size tolerance range: +/- 0.8 bp)，等位基因頻率在 1-99%之間 (Minimum and maximum allelic frequency: 1% – 99%)。

2.3.2：引子錯誤率(Error rate)及多型性(Polymorphism)條帶之獲得

Bonin (2007)建議 AFLP 遺傳分型的錯誤率應維持在 10%以下，才能獲得較正確的估算數據。我們從玉山杜鵑複合群內九個族群的樣本中每個族群都各隨機選取 1 個個體，從外群台灣杜鵑內五個族群的樣本中隨機選取 3 個個體，共 12 個個體做三重複試驗，利用所獲得共 3 次重複數據中有差異的條帶數除以總條帶數



計算出各組引子的錯誤率。

由於外群(台灣杜鵑)的樣本數量約占總樣本量的 1/3，所以在僅分析玉山杜鵑複合群時為避免過多數量的外群影響分析，藉由 ARLEQUIN v3.5(Excoffier & Lischer, 2010)單獨分析玉山杜鵑複合群，並移除該資料組中無多型性條帶的基因座並將其刪除，以得到玉山杜鵑複合群的 AFLP 多型性條帶。

2.3.3：遺傳資料之分析

2.3.3.1：遺傳歧異度

AFLP 為顯性分子標記，因此各種遺傳歧異度參數(Diversity indexes)是利用條帶的出現與否(0/1)進行估算。估算參數包含獨有和固定獨有的條帶數(Numbers of private and fixed private bands, N_p/N_{fp})、多型性基因座比例(Percentage of polymorphic loci, P)、平均理論異質度(Expected heterozygosity, H_E)和遺傳分化值(Pairwise F_{ST}) 等。

使用軟體 FAMD v1.31(Schlüter, 2013)以分析只有某族群個體才有可能出現的 Loci(N_p)和已經固定下來在某族群個體中都會出現的 loci (N_{fp})，計算獨有或固定獨有的條帶數(N_p/N_{fp}) (Huang et al., 2015(A))。使用軟體 AFLP-SURV v1.0(Vekemans (A), 2002)以計算各族群個體的多型性條帶的基因座所占該族群總數的比例，並基於貝氏統計(Bayesian)執行 500 次的 Permutation，估算多型性基因座的比例(Percentage of polymorphic loci, %P) ($P\% = \text{多型性條帶的基因座數} / \text{總基因座數}$)；以及依據哈溫定律計算各族群中雜合子所佔該族群總數的比例，估算平均理論異質度(Expected heterozygosity, H_E)，估計公式為：
$$H_E = 1 - \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m \sum_{i=1}^k P_i^2$$
(m 為基因座總數， P_i 為第 k 個等位基因的第 i 個頻率)。

為了估算遺傳分化值(Pairwise F_{ST})，我們使用軟體 ARLEQUIN v3.5(Excoffier & Lischer, 2010)和 AFLP-SURV v1.0(Vekemans (B), 2002)進行 500 次的重複排列(Permutation test)分析。遺傳分化值(F_{ST})是以族群內及族群間的遺傳差異為計算基



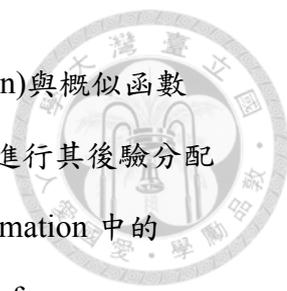
礎，其計算結果可以從 0(族群間沒有分化)到 1(不同對偶基因都已經固定，族群間完全分化)。Wright 建議，實際研究中， F_{ST} 為 0-0.05 時表示群體間遺傳分化很小，可以不考慮； F_{ST} 為 0.05-0.15 時表示群體間存在中等程度的遺傳分化； F_{ST} 為 0.15-0.25 時表示群體間遺傳分化較大； F_{ST} 為 0.25 以上時表示群體間有很大的遺傳分化(Weir & Cockerham, 1984)。 F_{ST} 值的大小會受到族群間的距離和生存地的環境差異等影響，如長時間受到地理隔離而累積變異、遷徙後產生適應性演化或是受到天擇影響使得兩組群間差異增大，均會使 F_{ST} 值有上升趨勢；相反，若是基因交流頻繁，族群間沒有太大差異，則族群間的 F_{ST} 值則會降低。

2.3.3.2：族群遺傳結構與分群

為瞭解玉山杜鵑複合群和台灣杜鵑的遺傳組成，並依據遺傳組成推估適當的歸群數目，我們使用 AMOVA、STRUCTURE、DAPC 和 NJ tree(Neighbor-Joining Tree)進行下列分析。

分子變方分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)可估算族群不同階層下的遺傳組成差異，可分析階層遺傳變異程度在包含分群間(Among group)、分群內或族群間(Within group or among population)和族群內(Within population)。軟體 ARLEQUIN v3.5(Excoffier & Lischer, 2010)在分析台灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合、及玉山杜鵑複合群獨立時，會執行 1,000 次的重複排列(Permutation)檢測其顯著性。

推估適當的歸群數目是使用軟體 STRUCTURE(Jombart et al., 2010)分析台灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合、及玉山杜鵑複合群獨立時的 AFLP 所獲得的基因型數據，以建立適當的分群數。STRUCTURE v2.3.4 為一種利用貝式分群法(Bayesian model-based)做歸群分析的軟體(Porrás-Hurtado et al., 2013)。在考慮每個個體的等位基因頻率及連鎖不平衡(Linkage Disequilibrium, LD)的情況下，以 Bayesian clustering approach 估算每個個體被分配於可能歸群數(K)下的機率值



(Posterior probability)。貝氏分析結合了先驗機率(Prior distribution)與概似函數(Likelihood function)來針對不可觀測的數量(包括參數及預測值)進行其後驗分配(Posterior distribution)。在估算後機率值之前，先定義 Prior information 中的 Ancestry model(即過去演化歷史祖先與後裔個體的關係)及 Allele frequency model，並利用 MCMC(Markov Chain Monte Carlo)隨機過程理論中的 Metropolis-Hasting(MH)或 Gibbs 等抽樣方法來進行估計，以計算貝氏模式中被歸為 K 群的各後驗分配的參數值，確保當模擬次數趨近於無窮時，其所模擬出的樣本積分點可以代表欲積分函數的分配形狀與機率，因此我們可以利用 MCMC 的隨機模擬過程來累積模擬樣本，再運用樣本的平均數去估計複雜的貝氏後驗機率分配平均值等。最後以 Mean log probability (LnP(D))及 Change in the log probability (ΔK)判斷最佳歸群結果(Evanno et al., 2005)。有關詳細的貝氏理論說明及抽樣方法可參考 Basu 和 Smith 的相關文章(Basu, 2003; Smith, 1993)。

在玉山杜鵑複合群和台灣杜鵑的歸群分析中，Structure 假定所有樣本共來自 K 個族群，接著對這些樣本每一個基因座的對偶基因頻率加以定義，再利用貝氏分群策略(Bayesian clustering approach)建立族群結構並指定每個樣本歸屬哪一個族群的機率。當分析台灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合時，我們使用 Admixture model 做為 Prior information(使用 Admixture model 意謂著有一定比例的個體來自 K 個群)，因為共有 14 個族群，所以設置 $K = 1-15$ 進行分析，進行 1,000,000 次的運算，並忽略前 10%(MCMC (Markov Chain Monte Carlo): 10^6 、Burn-in length: 10^5)，並對 K 的每個級別重複 10 次運行。當獨立分析玉山杜鵑複合群時，因為一共有 9 個族群，所以設置 $K = 1-10$ 進行分析，其它運算同上。接著使用軟體 STRUCTURE HARVESTER v0.6.8 統計選擇適當分群，藉由 LnP(D)和 $\Delta L(K)$ 來判斷最適當的分群數及給定 K 值下每次運行的相似係數 SSC 值(Symmetric similarity coefficient)。最後使用軟體 CLUMPP v1.1.2 進行 Structure 圖表的呈現。

除了以 STRUCTURE 推估玉山杜鵑複合群可能的歸群數目，我們還使用 R



軟體“adegenet” package 以主成分判別分析(Discriminant Analysis of Principle Components, DAPC)進行族群間差異的估算(Jombart et al., 2010)。相較於 STRUCTURE，DAPC 在運算過程中無任何有關族群遺傳模型的假設。此外相較於 PCA 分析，DAPC 有機會得到更清楚的分群結果，因為 DAPC 是先做 PCA 分析，後將 PCA 所產生的 PCs 經由 Discriminant Analysis(DA)進行計算，以放大解釋族群間的遺傳變異，並減少族群內個體間的遺傳變異(Jombart et al., 2010)。要將多少的 PCs 交由 DA 進行分析是 DAPC 的關鍵，PCs 太少可能導致遺傳變異不足以區分族群，過多則會造成分析 Over-fitting，因此我們會利用 a-score 優化值(a-score optimisation spline interpolation)先計算出最佳的 PCs 量，再透過兩個解釋最多的 DA 軸呈現結果，並分別繪製台灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合、及玉山杜鵑複合群獨立時的 DAPC，以檢測各族群可能的分群關係。

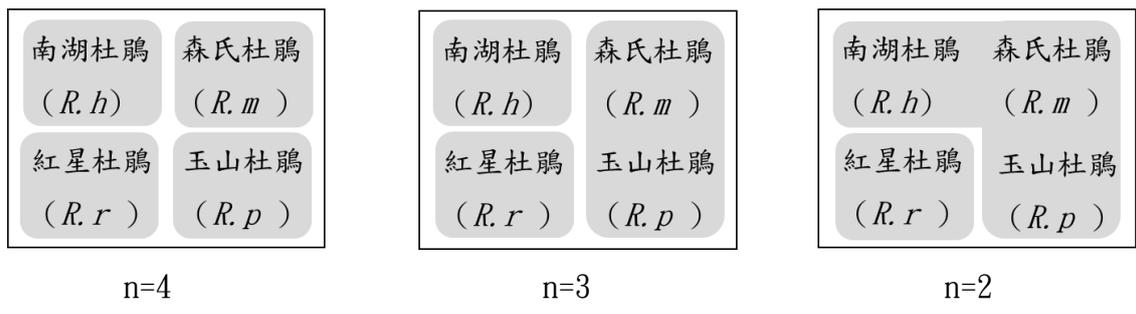
另外，我們還使用軟體 R 建立 NJ tree (親緣樹)，利用族群間遺傳距離計算台灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合時各族群間的親緣關係。我們以 R 軟體“poppr” package 裡的 nei.dist 函數(Kamvar et al., 2017)計算出族群間的遺傳距離矩陣，並使用 about 函數畫出 Neighbor-Joining (NJ) Tree。

2.3.3.3：偏離中性演化的基因座之選擇

為了瞭解玉山杜鵑複合群在演化的過程中基因組是否有受到天擇作用之影響，因而某些基因位點發生適應性分歧。此部分藉由 ARLEQUIN(Excoffier & Lischer, 2010)和 BAYESCAN(Foll & Gaggiotti, 2008)這兩種中性檢測的方法來檢測族群內是否有基因座受到天擇的影響，藉此瞭解玉山杜鵑複合群在演化過程中是否受到天擇作用之影響而發生基因組的適應性分歧。因為本研究只需要探討玉山杜鵑複合群內各族群間所受的環境影響，所以只會單獨對的玉山杜鵑複合群做分析。使用軟體 ARLEQUIN 和 BAYESCAN 將玉山杜鵑複合群分為 2 到 4 群作分析(圖二)，具體分群方式為：當 n=2 時，是將複合群內有最大遺傳差異的紅星杜鵑



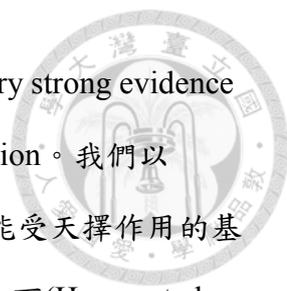
和其它三個種區分(紅星杜鵑為一群，玉山、森氏和南湖杜鵑為一群)；當 $n=3$ 時，是將屬於不同亞屬的南湖杜鵑從複合群內的其它三個種間區分出來(紅星杜鵑為一群，南湖杜鵑為一群，玉山和森氏杜鵑為一群)；當 $n=2$ 時，是將玉山杜鵑複合群內四個種各為一群。



圖二、玉山杜鵑複合群之分群方式

尋找偏離中性演化基因座的第一種方法是使用軟體 ARLEQUIN，這種方法來自於 Beaumont 和 Nichols(1996)(Harding, 1999; Mark, 1996)開發的 FDIST2 模型的延伸和優化。為了使得分析結果穩定，參考前人研究分析參數的設置如下(Huang et al., 2015(B))：50,000 次的模擬(Simulations)和每組 100 個 Demes。尋找可能受天擇影響的基因座是基於 $F_{ST} P$ -value 選擇的，當 $F_{ST} P$ -value<0.001 時，表示強烈支持其為 Outlier。

尋找偏離中性演化基因座的另一種方法是使用軟體 BAYESCAN，這種方法是基於貝氏回歸模型(Bayesian regression model)，利用 MCMC 計算每個基因座(Locus)的 Odds of probability(PO)，PO 值為受天擇作用基因座的事後機率值(Posterior probability)。軟體中參考 Jeffrey's scale of evidence(Graham Coop et al., 2010)，將 PO 值轉換為 $\log_{10}(PO)$ 且 p 值經 FDR 校正後其 p -value 仍顯著者，做為判斷基因座可能受天擇作用的可信度。BAYESCAN 採用基於貝氏回歸模型(Bayesian regression model)，利用 MCMC 計算每個基因座(Locus)的 Odds of probability(PO)；如果 $\log_{10}(BF)$ 值($\log_{10}(BF)=\log_{10}(PO)-1$)介於 0.5-1 時為

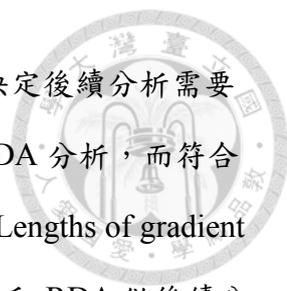


Substantial evidence for selection ; $\log_{10}(\text{BF})$ 值介於 1.5-2 時為 Very strong evidence for selection ; $\log_{10}(\text{BF})$ 值大於 2 時為 Decisive evidence for selection。我們以 $\log_{10}(\text{BF})$ 值大於 1 當作標準以篩選出玉山杜鵑複合群各族群可能受天擇作用的基因座。為了使得分析結果穩定，參考前人研究分析參數的設置如下(Huang et al., 2015(B))：50,000 的樣本大小(Sample size)，20 次試驗運行(Thinning interval)，100 次反覆運算(Pilot runs)，長度(Pilot run length)為 50,000，並進行 100,000 次運算(Additional burn in)，其他參數的設置為預設值。

2.3.4：環境因數之分析及篩選

我們收集了 20 個環境因數(19 個 BIO 氣候因數和海拔)以分析可能影響玉山杜鵑複合群遺傳變異的潛在因素，除採樣時記錄的海拔高度以外，其它 19 個藉由 WorldGlim v1.4 資料庫下載，該資料庫記錄 1960-1990 年間的全球生物氣象(Hijmans et al., 2005)，並由 ArcGIS 軟體中 Kriging method 與 Spherical model 等推估法估算研究樣點周圍未知環境因數的各項參數 BIO01-19 (Hunter, 2005)。具體包含：BIO01 年平均溫、BIO02 溫差範圍(每月平均(最高溫-最低溫))、BIO03 年溫變化指標(BIO02/BIO07) (數值越大，溫度變化越劇烈)、BIO04 溫度季節性變化(標準差)、BIO05 最熱月份的最高溫度、BIO06 最冷月份的最低溫度、BIO07 年溫範圍(BIO05- BIO 06)、BIO08 最濕季節的平均溫度、BIO09 最乾季節的平均溫度、BIO10 最熱季節的平均溫度、BIO11 最冷季節的平均溫度、BIO12 年降雨量、BIO13 最濕月份的降雨量、BIO14 最乾月份的降雨量、BIO15 雨量季節性變化(標準差)、BIO16 最濕季節的降雨量、BIO17 最乾季節的降雨量、BIO18 最熱季節的降雨量、BIO19 最冷季節的降雨量。

為探討環境差異對玉山杜鵑複合群遺傳變異的影響，此部分藉由 PCA 和 RDA 等分析方法探討玉山杜鵑複合群遺傳分化和環境因數之間的關聯性。在分析前先使用 R 程式“vegan”package 中的 varpart 函數對遺傳資料進行 DCA 分析以判



斷是否該選用線性(Linear)模型或單峰(Unimodal)模型，以此來決定後續分析需要使用的分析方法，因為符合線性模型的數據適合使用 PCA 和 RDA 分析，而符合單峰模型的數據則更適合使用 DCA 和 CCA 做分析。分析發現 Lengths of gradient 的第一軸(DCA1=1.05)小於 3，所以會選用基於線性模型的 PCA 和 RDA 做後續分析。我們先以 PCA 排除環境因數間的自相關性(Autocorrelation)，並觀察溫度和雨量不同類型的環境因數分別對族群遺傳分歧的影響，再使用 RDA 變異分配分析探討遺傳變異可被溫度、雨量和海拔因素所影響的程度及解釋的比例。

為排除環境因數間的共線性，我們以 R 程式 “stats” package 中的 prcomp 函數進行主成份分析(PCA, Principal Component Analysis) 將各族群與溫度(BIO01-11)和雨量(BIO02-19)相關的環境因數簡化降維，瞭解溫度和雨量當作解釋變因時玉山杜鵑複合群各族群間的關係，通過考慮 PCA loadings, correlation between variables ($r < 0.8$)及 VIF (< 10)以解決共線性的問題並保留有效的環境變量進行後續分析。

我們以 R 程式 “vegan” package 中的 varpart 函數進行 Redundancy Analysis (RDA) (Yaqian Guo et al., 2018)分析，將樣本遺傳資料、族群分群和環境因數反映在同一個二維圖上，藉以瞭解樣本遺傳分群和環境因數間的關聯性。

2.3.5：適應性演化基因座之檢測

為了瞭解偏離中性演化的基因座與環境因數間的相關性，我們利用 SAMBADA 程式來檢測各基因座頻率和環境因數之間是否存在相關性(Stucki et al., 2017)。此方法主要採用邏輯迴歸檢測(Logistic regression)分析所有的 AFLP 基因座與環境因數的關聯性，以瞭解哪些環境因數扮演天擇的角色影響遺傳變異。本研究目的在於瞭解玉山杜鵑複合群各族群是否因受到分歧天擇(Divergent selection)而產生在地適應(Local adaptation)。



第三章：結果

3.1：AFLP 引子的篩選

本研究經由前測，篩選出再現性較高的引子組合。於前擴增反應中使用了一組引子 E00 和 M00 (5'-GACTGCGTACCAATTC-3'; 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3')，於選擇性擴增反應中使用了七組引子(表二)來篩選。

表二、選擇性擴增反應引子之序列及錯誤率

Name	Sequence(5' →3')	Number of Marks	Error rate
E00+TGA* / M00 GAT	5'-GACTGCGTACCAATTCTGA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAT-3'	86	8.47
E00+TGA*/ M00 CTGA	5'-GACTGCGTACCAATTCTGA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTGA-3'	85	5.61
E00+TGA*/ M00 CTTC	5'-GACTGCGTACCAATTCTGA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTTC-3'	89	7.47
E00+CTA^/ M00 CTAT	5'-GACTGCGTACCAATTCCTA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTAT-3'	80	11.37
E00+CTA^/ M00 CTAC	5'-GACTGCGTACCAATTCCTA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTAC-3'	75	11.02
E00+CTA^/ M00 CTTC	5'-GACTGCGTACCAATTCCTA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTTC-3'	79	10.83
E00+CTA^/ M00 CTGT	5'-GACTGCGTACCAATTCCTA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTGT-3'	89	11.38

*螢光標定為 Fam

^螢光標定為 Hex

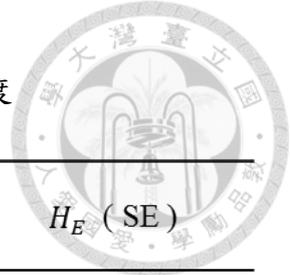


本研究使用七組選擇性擴增引子對，對台灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合的 14 個族群 232 個樣本中，共篩選出 583 個多型性條帶，每對引子對可獲得 75-89 個多型性條帶，錯誤率在 5.61-11.38%之間；而在獨立的玉山杜鵑複合群內 9 個族群 172 個樣本中，則篩選出 515 個多型性條帶。

3.2：遺傳歧異度

本研究包含臺灣杜鵑的五個族群和玉山杜鵑複合群裡四個種的九個族群，共 232 個樣本(表一)，多型性條帶和遺傳歧異度皆經由 AFLP-SURV 分析。臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群中的多型性百分比(%P, Percent polymorphism)平均為 62.4%，標準差為 1.4，其中多型性百分比最高的種是森氏杜鵑(%P = 64.8%)，其次為玉山杜鵑(%P = 62.6%)與臺灣杜鵑(%P = 62.4%)，最低的種是紅星杜鵑(%P = 60.5%)(表三)。本研究五個種的遺傳歧異度(Diversity)平均為 0.21，標準差為 0.01，其中遺傳歧異度最高的種是臺灣杜鵑(HE = 0.23)，其次為紅星杜鵑 (HE = 0.22)，最低的是南湖杜鵑(HE = 0.19)(表三)。

表三、臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之遺傳歧異度



Species	Code	N	%P	N_p (N_{fp})	H_E (SE)
紅星杜鵑 <i>R. rubropunctatum</i>	RrTGK	14	60.5	2(0)	0.21823 (0.00782)
	RrTGL	21			
玉山杜鵑 <i>R. pseudochrysalum</i>	RpTHS	19	62.6	4(0)	0.21173 (0.00742)
	RpHHS	17			
	RpLLS	20			
森氏杜鵑 <i>R. morii</i>	RmALS	18	64.8	2(0)	0.21156 (0.00753)
	RmTHS	8			
	RmHHS	14			
南湖杜鵑 <i>R. hyperythrum</i>	RhNHTS	41	61.9	4(0)	0.19505 (0.00741)
臺灣杜鵑 <i>R. formosanum</i>	RfCLS	11	62.4	53(0)	0.22738 (0.00767)
	RfTHS	11			
	RfLELS	14			
	RfSLX	10			
	RfSY	14			

Code：各採樣點族群代號

N：各採樣點樣本的數量

P%：各採樣點樣本的多型性基因座比例

N_p ：獨有的條帶數

N_{fp} ：固定獨有的條帶數

H_E ：各採樣點樣本的歧異度(Gene diversity)

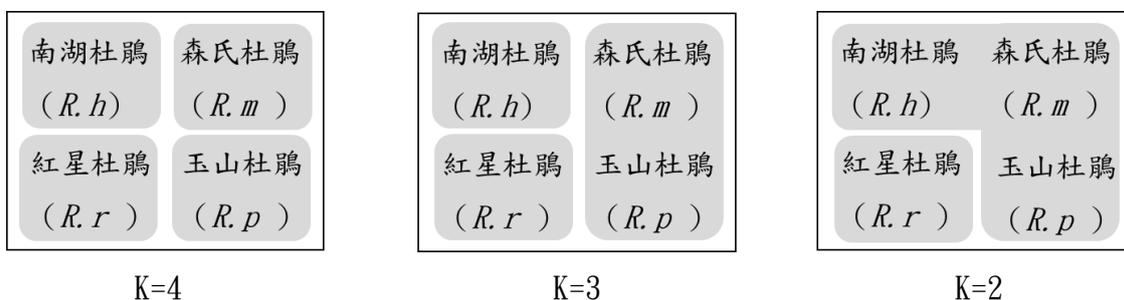
SE： H_E 的標準誤差(Standard error)



3.3：族群遺傳結構與分群

為了得出兩兩族群間的遺傳差距 F_{ST} ，分別用 AFLP-SURV 和 ARLEQUIN 來計算十四個族群(臺灣杜鵑的五個族群和玉山杜鵑複合群的九個族群)，這兩個分析結果均顯示，玉山杜鵑複合群和臺灣杜鵑之間呈現顯著分化 ($F_{ST}>0.25$)，其中 ARLEQUIN 估算的 F_{ST} 值表示顯著支持(P -value <0.01)(表四)，且這兩種程式演算法的 F_{ST} 值成顯著相關性。

分子變方分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 用來探究玉山杜鵑複合群的遺傳變異在 3 種不同階層分群間的遺傳變異分布情形(圖二)。結果顯示，臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群間為顯著分化 ($R.f$ vs $R.r+R.p+R.m+R.h$)，差異值 F_{CT} 為 0.275 ($P<0.001$)；玉山杜鵑複合群各族群間為低度分化且顯著($R.r$ vs $R.p$ vs $R.m$ vs $R.h$)，差異值 F_{CT} 為 0.064 ($P<0.001$)；將玉山杜鵑複合群分為三群(紅星杜鵑、玉山杜鵑和森氏杜鵑、南湖杜鵑)分別比較時($R.r$ vs $R.p+R.m$ vs $R.h$)，各族群間為低度分化且顯著，差異值 F_{CT} 為 0.07($P<0.001$)；將玉山杜鵑複合群分為兩群(紅星杜鵑、玉山杜鵑和森氏杜鵑及南湖杜鵑)分別比較時($R.r$ vs $R.p+R.m+R.h$)，各族群間為低度分化且顯著，差異值 F_{CT} 為 0.11 ($P<0.001$)(表五)。該分析結果顯示，臺灣杜鵑和玉山杜鵑之間為顯著分化，在玉山杜鵑複合群內各族群間的分化程度不一，但皆顯著，且大部分遺傳差異都集中在族群內(Within population)。



圖二、玉山杜鵑複合群獨立之分群方式

表四、臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之族群間兩兩比較的 F_{ST} 值

Population	RfCLS	RfELS	RfSLX	RfSY	RfTHS	RhNHHS	RmALS	RmHHS	RmTHS	RpHHS	RpLLS	RpTHS	RrTGK	RrTGL
RfCLS	<u>0.00</u>	0.15***	0.09***	0.05***	0.04***	0.32***	0.29***	0.26***	0.23***	0.27***	0.28***	0.27***	0.19***	0.29***
RfELS	0.18	<u>0.00</u>	0.05***	0.10***	0.11***	0.35***	0.32***	0.31***	0.29***	0.32***	0.31***	0.32***	0.27***	0.33***
RfSLX	0.11	0.11	<u>0.00</u>	0.05***	0.04***	0.30***	0.27***	0.26***	0.24***	0.27***	0.26***	0.27***	0.21***	0.28***
RfSY	0.07	0.16	0.08	<u>0.00</u>	0.02***	0.33***	0.30***	0.28***	0.25***	0.29***	0.28***	0.28***	0.21***	0.29***
RfTHS	0.05	0.17	0.07	0.05	<u>0.00</u>	0.33***	0.31***	0.29***	0.26***	0.29***	0.30***	0.28***	0.22***	0.30***
RhNHHS	<u>0.40</u>	<u>0.47</u>	<u>0.44</u>	<u>0.43</u>	<u>0.44</u>	<u>0.00</u>	0.08***	0.06***	0.04***	0.06***	0.09***	0.08***	0.14***	0.16***
RmALS	<u>0.36</u>	<u>0.44</u>	<u>0.40</u>	<u>0.40</u>	<u>0.42</u>	0.13	<u>0.00</u>	0.06***	0.04***	0.05***	0.03***	0.11***	0.11***	0.14***
RmHHS	<u>0.32</u>	<u>0.43</u>	<u>0.38</u>	<u>0.38</u>	<u>0.40</u>	0.08	0.11	<u>0.00</u>	0.01***	0.04***	0.06***	0.09***	0.11***	0.13***
RmTHS	<u>0.30</u>	<u>0.43</u>	<u>0.37</u>	<u>0.37</u>	<u>0.38</u>	0.07	0.09	0.05	<u>0.00</u>	0.02**	0.05***	0.05***	0.07***	0.09***
RpHHS	<u>0.35</u>	<u>0.44</u>	<u>0.40</u>	<u>0.39</u>	<u>0.41</u>	0.11	0.11	0.08	0.05	<u>0.00</u>	0.04***	0.05***	0.09***	0.10***
RpLLS	<u>0.36</u>	<u>0.43</u>	<u>0.40</u>	<u>0.40</u>	<u>0.41</u>	0.16	0.05	0.13	0.11	0.08	<u>0.00</u>	0.09***	0.09***	0.13***
RpTHS	<u>0.34</u>	<u>0.44</u>	<u>0.41</u>	<u>0.39</u>	<u>0.39</u>	0.13	0.18	0.15	0.11	0.09	0.16	<u>0.00</u>	0.10***	0.11***
RrTGK	<u>0.29</u>	<u>0.41</u>	<u>0.35</u>	<u>0.34</u>	<u>0.36</u>	0.23	0.16	0.20	0.14	0.15	0.14	0.19	<u>0.00</u>	0.05***
RrTGL	<u>0.37</u>	<u>0.46</u>	<u>0.42</u>	<u>0.41</u>	<u>0.42</u>	0.25	0.23	0.23	0.19	0.18	0.21	0.20	0.07	<u>0.00</u>

“_” : AFLP-SURV 估算的臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之族群間兩兩比較的 F_{ST} 值

無 “_” : ARLEQUIN 估算的臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之族群間兩兩比較的 F_{ST} 值

加粗：族群間顯著 F_{ST} 值大於 0.25

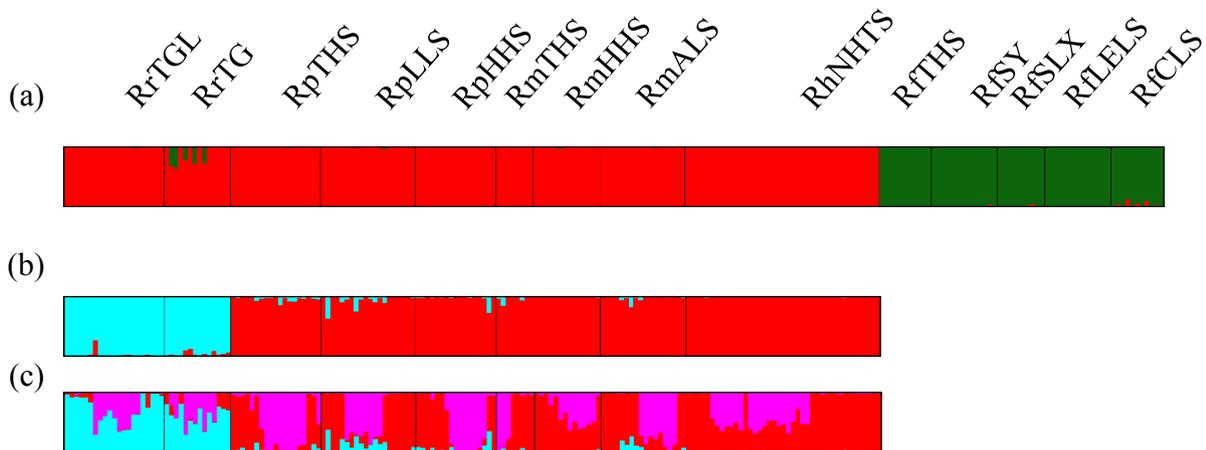


表五、臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之 AMOVA 分析結果

Source of variation	<i>df</i>	Sum of squares	Percent of variation	<i>F</i> Statistics	<i>P</i> value
<i>R.f</i> vs <i>R.r</i> vs <i>R.p</i> + <i>R.m</i> + <i>R.h</i>					
Among groups	2	3370.1	27.53	$F_{CT} : 0.27528$	< 0.001
Among populations within groups	13	1803.26	8.05	$F_{SC} : 0.11109$	< 0.001
Within populations	231	11852.99	64.42	$F_{ST} : 0.27528$	< 0.001
Total	246	17026.35			
<i>R.r</i> vs <i>R.p</i> vs <i>R.m</i> vs <i>R.h</i>					
Among groups	3	1046.89	6.38	$F_{CT} : 0.06385$	< 0.001
Among populations within groups	8	709.3	9.34	$F_{SC} : 0.09976$	< 0.001
Within populations	171	8375.14	84.28	$F_{ST} : 0.15724$	< 0.001
Total	182	10131.34			
<i>R.r</i> vs <i>R.p</i> + <i>R.m</i> vs <i>R.h</i>					
Among groups	2	864.16	6.97	$F_{CT} : 0.06966$	< 0.001
Among populations within groups	8	892.04	9.87	$F_{SC} : 0.10604$	< 0.001
Within populations	171	8375.14	83.17	$F_{ST} : 0.16831$	< 0.001
Total	181	10131.34			
<i>R.r</i> vs <i>R.p</i> + <i>R.m</i> + <i>R.h</i>					
Among groups	1	581.54	11.26	$F_{CT} : 0.11261$	< 0.001
Among populations within groups	8	1174.66	9.67	$F_{SC} : 0.10904$	< 0.001
Within populations	171	8375.14	79.06	$F_{ST} : 0.20937$	< 0.001
Total	180	10131.34			



為了分析族群遺傳結構並獲得最適當的分群數，我們使用基於貝氏法 (Bayesian) 來估算分群機率值的軟體 STRUCTURE。本研究參考下列幾項參數做為選取該物種最佳歸群數 (Optimal K) 的判斷標準：(1) $\ln Pr(D)$ 的最大值或轉折點 (Curvature plateau)；(2) ΔK 最大值；(3) Symmetric Similarity Coefficient (SSC)；(4) 對該物種在生物學上的瞭解 (Janes et al., 2017)。當同時分析臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群時， $\Delta L(K)$ 值在 $K=2$ 時支持度最高 (圖四 a)，歸群 (Clustering) 結果顯示將臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群分開 (圖三 a) (SSC > 0.99)，而 $\Delta L(K)=8$ 的高支持度是由 $\Delta L(K)=9$ 的標準偏差過大引起的 (圖四 b)，所以將 $\Delta L(K)=9$ 的離值刪除後，標準偏差消失 (圖五 b)， $\Delta L(K)=8$ 的高支持度也隨之下降 (圖五 a)。當獨立分析玉山杜鵑複合群時， $\Delta L(K)$ 值在 $K=3$ 時支持度最高 (圖六 a)，結果顯示紅星杜鵑自成一類 (Cluster)，而另外三個種的遺傳差異無法分離 (圖三 b、c) (SSC > 0.99)。該分析結果顯示，玉山杜鵑複合群四個種間雖然任保留有部分相同的基因座位點，但歸群結果任能夠看出紅星杜鵑與其它三個種有明顯的分化。

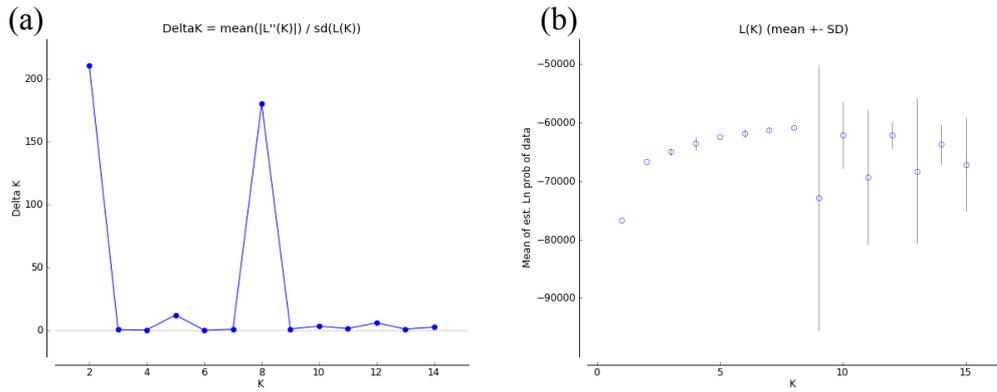
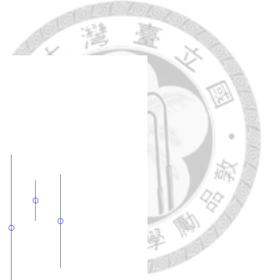


圖三、STRUCTURE 檢測臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群獨立之分群結果 (族群代號請見表一)

(a): $K=2$

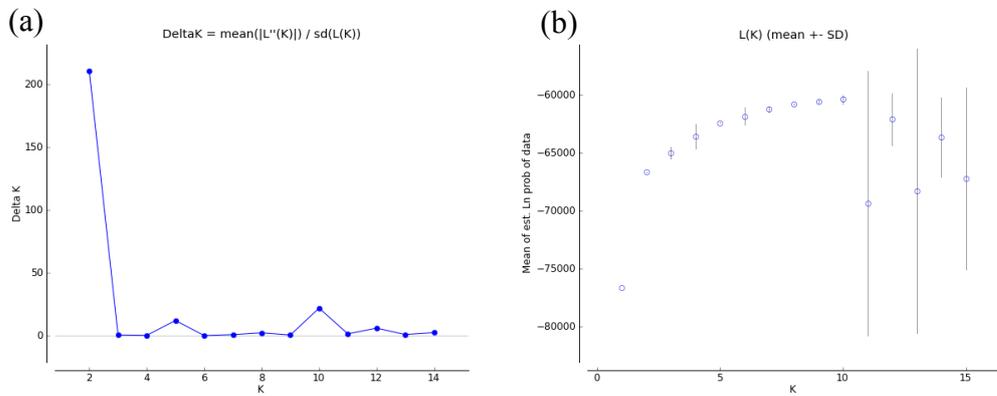
(b): $K=2$

(c): $K=3$



圖四、STRUCTURE 檢測臺灣杜鵑及玉山杜鵑複合群之分群 $\Delta L(K)$ 結果

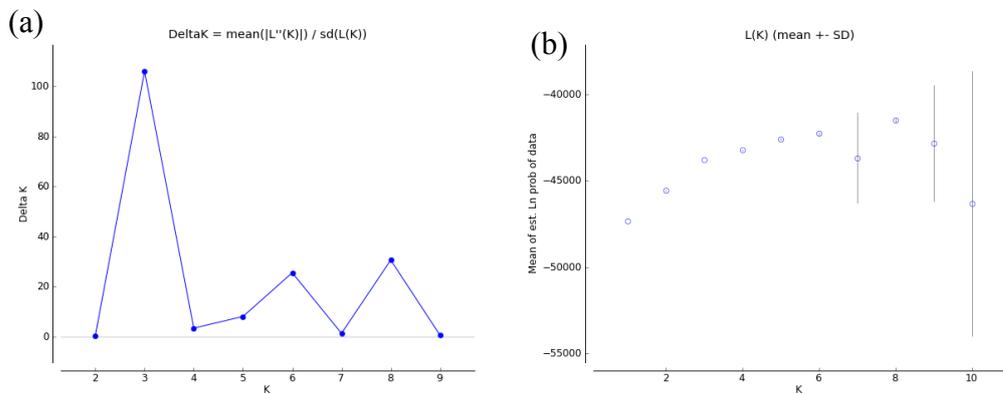
(a):圖顯示 K=2 時， $\Delta L(K)$ 值最高；(b):各 K 值的 meanL(K)



圖五、刪除 STRUCTURE 分群下 $\Delta L(K)=9$ 後的離值後檢測臺灣杜鵑及玉山杜

鵑複合群之分群 $\Delta L(K)$ 結果

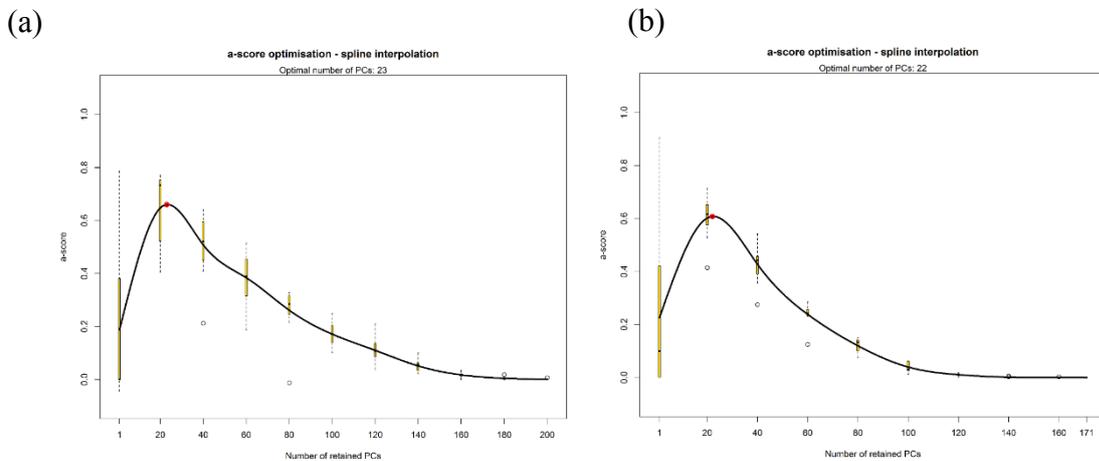
(a):圖顯示 K=8 時的高支持度已經下降；(b):各 K 值的 meanL(K)



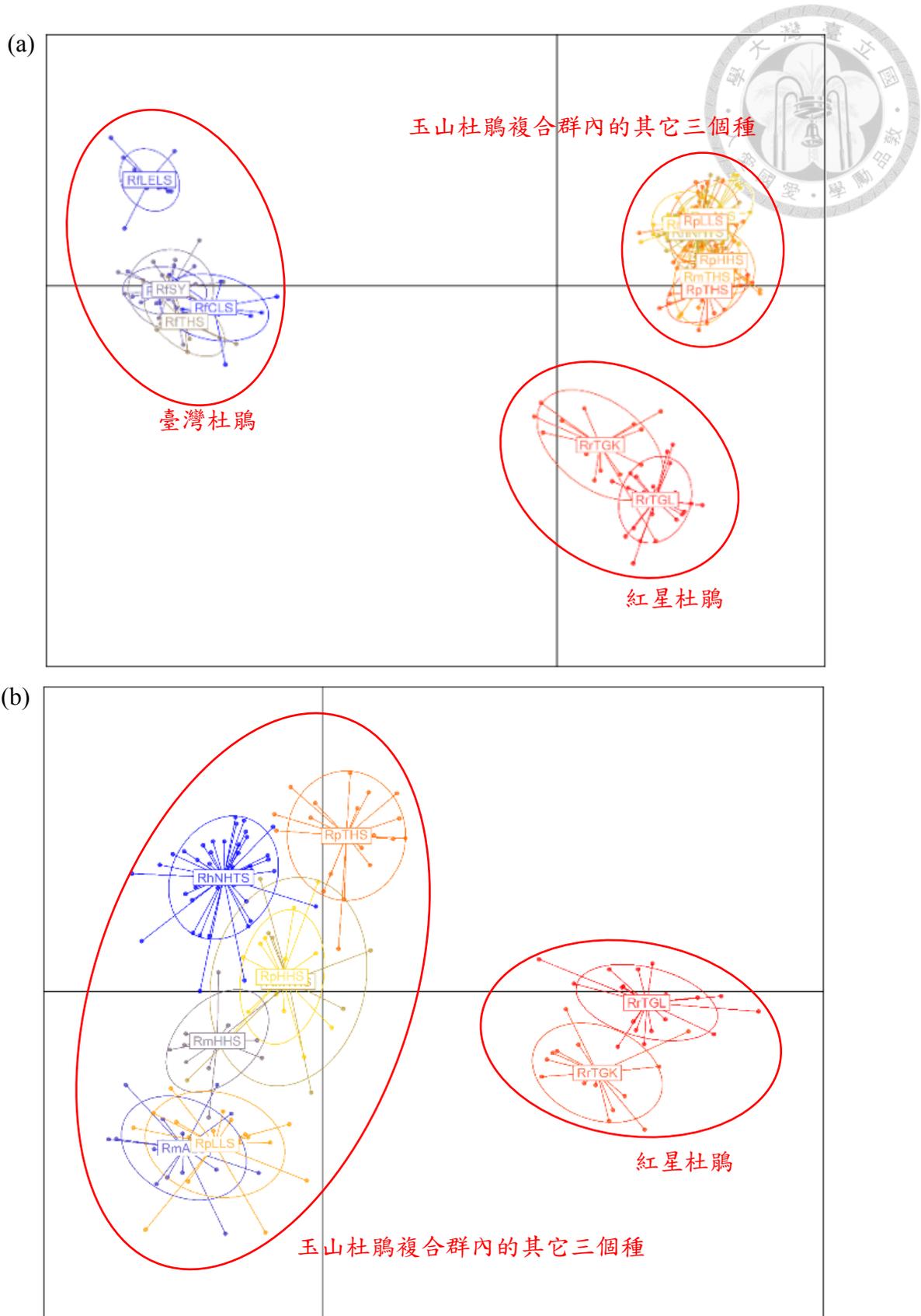
圖六、STRUCTURE 檢測玉山杜鵑複合群獨立之分群 $\Delta L(K)$ 結果

(a):圖顯示 K=3 時， $\Delta L(K)$ 值最高；(b):各 K 值的 meanL(K)

相較於 STRUCTURE 分析族群結構時套入與族群遺傳有關的模型，沒有任何遺傳前提(Prior information)僅計算族群間遺傳變異的 DAPC，也能提供族群遺傳結構視覺化的歸群結果。臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群一起做主成分判別分析(DAPC)時結果顯示，LD1(Linear Discriminant)和 LD2 一共能解釋 49.3%的遺傳變異，LD1 能清楚將臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群分隔，且各分為 2 個明顯歸群(Cluster)，其中玉山杜鵑複合群被分為兩個歸群：紅星杜鵑的兩個族群獨立一群，另外三個種因有重疊的分佈，所以將他們歸為一群(圖七)。當單獨對玉山杜鵑複合群做主成分判別分析(DAPC)時結果顯示，LD1(Linear Discriminant)和 LD2 一共能解釋 45.3%的遺傳變異，且 LD1 也能清楚將紅星杜鵑和玉山杜鵑複合群的其它三個種分隔，產生 2 個明顯歸群(圖八)。該分析結果顯示，紅星杜鵑的兩個族群不論是否包含台灣杜鵑都存在明顯分隔。



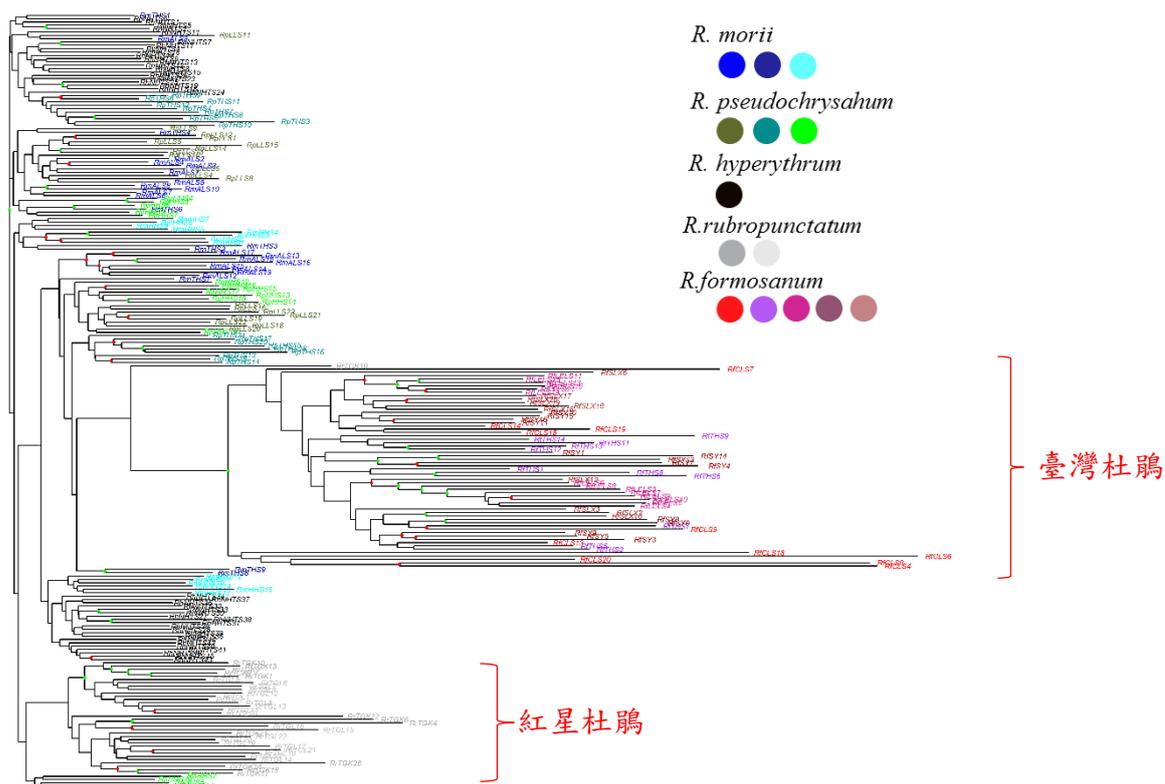
圖七、臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群的親緣關係進行主成分的判別分(DAPC)之結果
(三角形指示為紅星杜鵑，族群代號請見表一)



圖八、台灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合時及單獨分析玉山杜鵑複合群時的親緣關係進行主成分的判別分析(DAPC)之結果



最後，臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群的親緣關係樹以 Neighbor Joining 的方式建立。該分析結果顯示，臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群在遺傳距離上相距最遠，可明顯辨認出兩個歸群，而在複合群內可以看到紅星杜鵑有分化現象(圖九)。



圖九、 Neighbor Joining 親緣樹顯示臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群的親緣關係

總的來說，利用 STRUCTURE、DAPC 和 NJ tree 探究台灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合時的遺傳結構發現，台灣杜鵑與玉山杜鵑複合群有明顯的歸群(K=2)，而玉山杜鵑複合群內紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群內的其他三個種在遺傳上存在明顯分隔。



3.4：偏離中性演化的基因座之選擇

以兩種軟體(ARLEQUIN 和 BAYESCAN) 檢測玉山杜鵑複合群基於遺傳分化值 F_{ST} 受天擇作用(環境因數)而偏離中性演化的基因座(Outlier loci)。經由 ARLEQUIN 檢測，將紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群的其它三個種作較(k=2)時，篩選出一個 Outlier(c04_2400)；將紅星杜鵑和南湖杜鵑與玉山杜鵑複合群的其它兩個種作較(k=3)時，篩選出兩個 Outlier(c04_2400、p06_2591)，將玉山杜鵑複合群內的四個種相互作比較(k=4)時，篩選出三個 Outlier(c04_2400、p06_2591、c04_2726)(表六)。經由 BAYESCAN 檢測，將紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群的其它三個種作較(k=2)時，篩選出一個 Outlier(c04_2400)；將紅星杜鵑和南湖杜鵑與玉山杜鵑複合群的其它兩個種作較(k=3)時，篩選出三個 Outlier(c04_2400、p03_1912、p04_3516)，將玉山杜鵑複合群內的四個種相互作比較(k=4)時，篩選出四個 Outlier(c04_2400、p04_3516、c05_2732)(表六)。該分析結果顯示，兩種檢測方法在三種分群方式下共找到 6 個偏離中性演化的基因座，且共同找到了 1 個偏離中性演化的基因座 c04_2400。

表六、 ARLEQUIN 和 BAYESCAN 檢測下，玉山杜鵑複合群之偏離中性演化的基因座(Outlier loci)分析結果

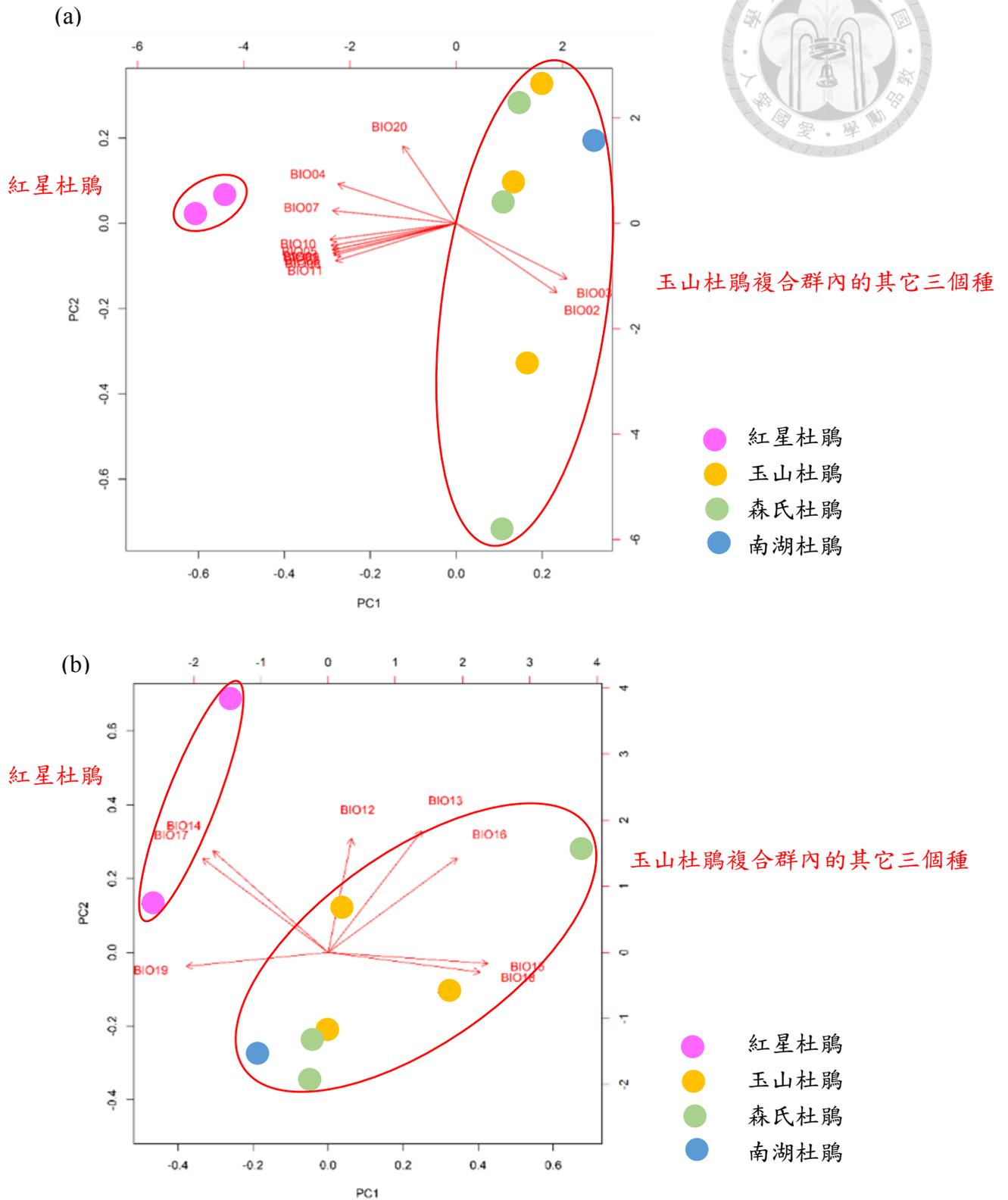
Locus	ARLEQUIN F_{ST} P-value	BAYESCAN log10(BF)
c04_2400	6.65E-06 (k=2)	1.15 (k=2)
	5.03E-15 (k=3)	2.42 (k=3)
	3.35E-36 (k=4)	3.10 (k=4)
p06_2591	0.00057 (k=3)	N.d
	0.00047 (k=4)	
c04_2726	0.0007 (k=4)	N.d
p03_1912	N.d	1.05 (k=3)
p04_3516	N.d	1000 (k=3)
		3.10 (k=4)
c05_2732	N.d	2.09 (k=4)



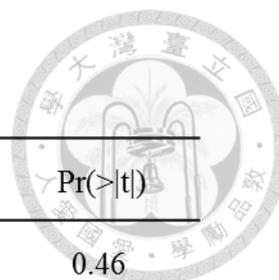
3.5：環境因數的差異

為了探討玉山杜鵑複合群的四種杜鵑棲息地環境是否有所差異，本研究利用主成分分析(PCA)與溫度相關的 12 個環境因數 (BIO01-11 和海拔) 時，結果顯示 PCA 差異性最大的成分 PC1(貢獻率為 83%，PC2 的貢獻率為 11%)可以將玉山杜鵑複合群各樣本族群區分為 2 群，分別是紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群的其它三個種(圖十 a)。當利用主成分分析(PCA)與雨量相關的 8 個環境因數 (BIO12-19) 時，結果顯示 PCA 無法將玉山杜鵑複合群內四個種做有效的歸群，其中差異性最大的兩個成分 PC1 及 PC2 的貢獻率分別為 59.5%和 28.1%(圖十 b)。通過 PCA loading (圖十) 首先篩選出 8 個環境因數，分別是與溫度相關的四個環境變量：BIO1，BIO2，BIO4，BIO20 (海拔)，以及和雨量相關的四個環境變量：BIO13，BIO14，BIO18，BIO19，因為 VIF 檢測均大於 10 (表七)，所以通過 Correlation between variables ($Pr \leq 0.8$)的條件篩選出六個環境因數，分別為：BIO1，BIO04，BIO13，BIO18，BIO19，BIO20 (表七)。

以冗餘分析(RDA，Redundancy Analysis)探討遺傳變異可被環境因數所解釋百分比，其中環境因數包含通過共線性檢測的六個環境因數，結果顯示紅星杜鵑的兩個族群可以明顯的和玉山杜鵑複合群的其它三個種分離，且遺傳變異所被解釋的比例為 15%(圖十一)。



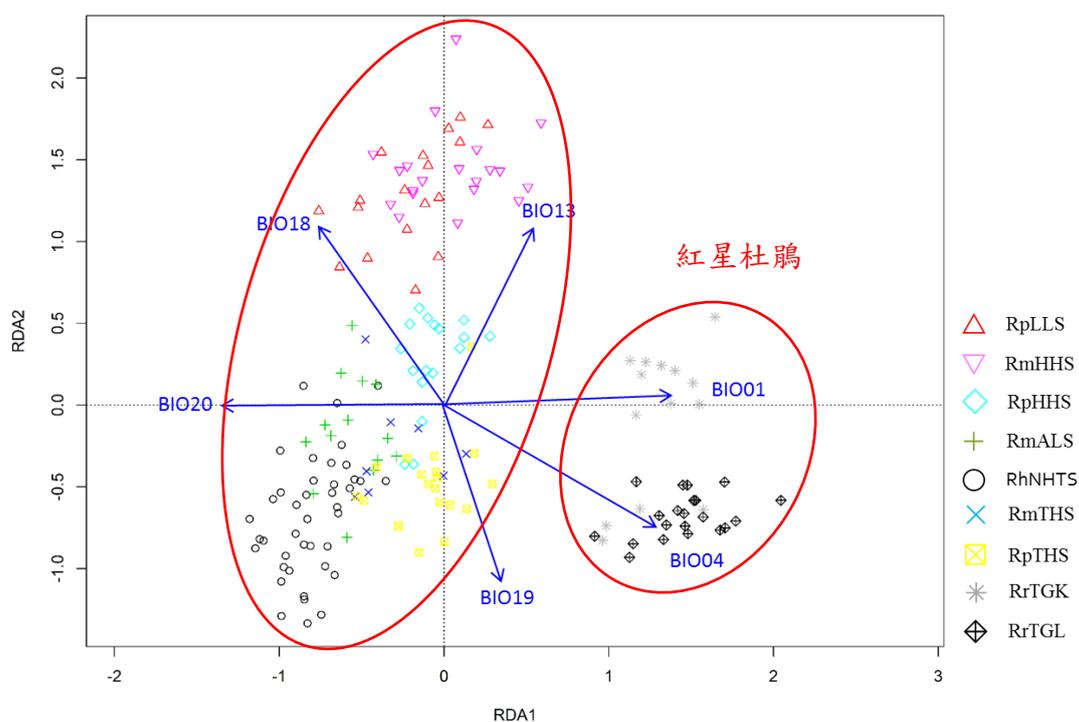
圖十、玉山杜鵑複合群下分別對 11 個溫度相關(a)和 8 個雨量相關(b)的 BIO 環境因數進行主成分分析(PCA)之結果



表七、 八個環境因子的共線性檢測

Estimate	VIF	Error	t value	Pr(> t)
BIO01	188.28	464.73	1.12	0.46
BIO02	245.34	6.11	-0.27	0.83
BIO04	446.11	0.058	-1.78	0.33
BIO13	39.47	0.24	1.46	0.38
BIO14	76.05	0.61	-0.12	0.92
BIO18	44.63	0.07	-0.80	0.57
BIO19	81.16	0.06	2.70	0.23
BIO20	528.98	0.02	-4.75	0.13

玉山杜鵑複合群內的其它三個種



圖十一、 玉山杜鵑複合群和環境因數進行冗餘分析(RDA)之結果



總的來說，該分析結果顯示紅星杜鵑和玉山杜鵑複合群內其它三個種之間存在最大的環境差異，且因為紅星杜鵑在 RDA1 的方向上和 BIO01（年均溫）和 BIO04（溫度季節性變化）成正相關，和 BIO20（海拔）成負相關，所以中海拔的紅星杜鵑和高海拔的玉山杜鵑複合群內其它三個種在生存環境方面年均溫更高且溫度季節性變化更大。

3.6：偏離中性演化基因座與環境因數的關聯

SAMBADA (Spatial Analysis Method) 利用邏輯回歸分析并依據 Wald test 檢測玉山杜鵑複合群內多型性基因座的頻率與環境因數間的關聯性，共檢測出 52 個與環境因數相關聯的基因座(附表一，P value<0.001)。ARLEQUIN 和 BAYESCAN 利用貝式機率法在 AFLP 基因座中找到的 6 個偏離中性演化的基因座(Outlier loci)(表六)在 SAMBADA 分析中能找到 5 個與環境因數具有關聯性，其中在兩種 F_{ST} outlier 檢測方法的多種分析中皆被認定為是可能受天擇作用的基因座 c04_2400，在 SAMBADA 分析中也檢測出與 BIO1（年均溫），BIO04（溫度季節性變化），BIO18（最熱季節的降雨量），BIO20（海拔）具有最高的相關度（表八）。回到最原始的遺傳資料發現，該基因座在紅星杜鵑中為 Rare allele，而玉山杜鵑複合群的其它三種內則為 Common allele (表九)。

表八、SAMBADA 檢測下，玉山杜鵑複合群之受天擇作用基因座(Outlier loci)與環境因數關聯性分析結果

Outlier	Gscore ($P_value < 0.001$)					
	BIO01	BIO04	BIO13	BIO18	BIO19	BIO20
c04_2400	127.00	126.52	N.d	129.53	N.d	122.24
p06_2591	62.71	82.89	N.d	65.99	N.d	68.89
c04_2726	92.32	89.59	N.d	70.76	N.d	90.63
p03_1912	79.38	48.33	26.20	N.d	N.d	76.41
p04_3516	112.67	N.d	74.36	N.d	N.d	82.66
c05_2732	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d

表九、玉山杜鵑複合群之受天擇作用基因座(Outlier loci)數量統計結果

Locus	Unique band identified in each species			
	<i>R. rubropunctatum</i> 紅星杜鵑(35)	<i>R. pseudochrysanthum</i> 玉山杜鵑(56)	<i>R. Morii</i> 森氏杜鵑(40)	<i>R. hyperythrum</i> 南湖杜鵑(41)
c04_2400	3	55	40	40
p06_2591	5	47	37	39
c04_2726	28	2	1	1
p03_1912	3	40	28	41
p04_3516	0	16	15	41
c05_2732	0	0	23	28



第四章：討論

4.1：往高海拔遷徙引起的族群收縮並沒有造成各族群間遺傳歧異度產生較大差異

遺傳歧異度不僅可以體現該族群歷史上的規模波動，更可以代表族群面對環境變化時的適應力(Hedrick, 2004)。例如，當 H_E 值過小時說明該族群可能處於瓶頸期，如果突然出現劇烈的環境變化，該族群就會因為沒有更適合新環境的遺傳變異而有較高的滅絕風險。本研究採用擴增片段長度多型性(AFLP)來量化臺灣杜鵑和玉山杜鵑複合群混合時，十四個族群的 232 個個體間的遺傳變異，檢測發現該研究結果和前人 SSR 分子標記的結果一致，說明玉山杜鵑複合群及台灣杜鵑各族群間的遺傳歧異度並沒有太大的差異。

局部分佈的族群常常會出現較低水準的遺傳歧異度，意味著該物種面臨著隨機生態事件的威脅(Quiroga & Premoli, 2007)。在類似的研究中發現，台灣油杉各族群間的 H_E 維持在 0.15 到 0.31 之間，台灣杉各族群間的 H_E 維持在 0.21 到 0.25 之間，而在本研究中，玉山杜鵑複合群各族群間的 H_E 均維持在 0.19 到 0.23 之間(表三)，不同物種間的對比說明玉山杜鵑複合群各種間遺傳歧異度沒有較大差異，因此儘管族群由於向高海拔遷移可能因為適合棲息地減少而造成範圍收縮，但在玉山杜鵑複合群中並沒有發現分高海拔族群的遺傳多樣性水準低於低海拔族群。

4.2：紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群內的其它三個種存在最大的遺傳分化

臺灣間冰期的氣候與冰期相反多為潮濕和溫暖(Liew et al., 1998; Wei, 2002)，因此適應寒冷氣候的杜鵑等寒溫帶植被只能往氣溫較為寒冷的高海拔遷徙。前人 Tsukada(1966)的研究結果推測，玉山杜鵑複合群在冰期曾廣泛分佈於中低海拔區域，但隨著冰期結束後的全球暖化，在間冰期(Interglacial)經歷族群的破碎化。進一步由 Chung(2007)葉綠體 DNA 單套型的研究發現，其演化方向是由北部的紅星杜鵑往中南部的玉山杜鵑複合群的其它物種演變。因此，可以推測玉山杜鵑複合



群在上一次冰期可能經歷了在中低海拔由北往南擴張的情形，而當冰河結束之後氣溫上升，適應低溫環境的杜鵑族群便往高海拔遷徙。擴張-收縮的族群變動所造成的棲息地破碎化讓分散在不同海拔的族群間因基因難以交流而累積遺傳變異，進而發生遺傳結構的分化。最近由 Chung (2013) 用 EST-SSR 分子標記研究玉山杜鵑複合群各族群間的分化結果推測，玉山杜鵑複合群之紅星杜鵑族群可能有因棲息地的環境差異而產生分化。前人研究共同發現，紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群內的其它三個種存在最大的遺傳分化。而本研究分析採用 AMOVA (表七)、STRUCTURE (圖三)、DAPC (圖七、圖八) 及 NJ tree (圖九) 的結果皆顯示玉山杜鵑複合群內紅星杜鵑與其它三個種之間存在最大的遺傳分化。

眾多的研究表明，杜鵑的繁殖是以昆蟲為媒介的異交為主，例如 *R. ferrugineum* (Escaravage & Wagner, 2004)、*R. ponticum* (Stout, 2007)、*R. semibarbatum* (Ono et al., 2008)、*R. brachycarpum* (Hirao, 2010)，以及棲息於香港的六個杜鵑種(Corlett & Ng, 2000)的研究均顯示異交情形，因此 STRUCTURE 中觀察到的紅星杜鵑和複合群內的其他三個種間仍可觀察到共有的遺傳組成可以解釋為各種間任然存在基因交流，或者該現象也可能是因為複合群各種間殘留的祖先遺傳多型性。雖然紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群內的其它三個種之間仍然有共同的遺傳組成，但 DAPC 等分析也支持紅星杜鵑與其它三個種間有最大的遺傳差異，因此推測紅星杜鵑可能已經產生了分化的跡象。

4.3：南湖杜鵑與玉山杜鵑和森氏杜鵑的遺傳分化較小

分類學認為玉山杜鵑複合群的四個種均在 *Hymenanthes* 亞屬之下，其中紅星杜鵑、玉山杜鵑和森氏杜鵑分類屬於 *Maculifera* subsection，南湖杜鵑則屬於 *Ponica* subsection (Li et al., 1998)。在臺灣植物志中記錄中記錄南湖杜鵑的主要鑒別方式為葉厚皮質，先端銳尖，基部圓形到鈍，邊緣全緣強烈後彎，下表面無毛 (Chamberlain et al., 1996)。但前人使用核基因 ITS (Internal transcribed spacer) 分析



玉山杜鵑複合群內四個物種間的親緣關係發現，南湖杜鵑、森氏杜鵑及玉山杜鵑的遺傳距離為 0(Tsai et al., 2015)，因此核基因 ITS 的序列分析說明玉山杜鵑複合群裡的南湖杜鵑與玉山杜鵑和森氏杜鵑之間的親緣關係很近源。且本研究中各類分析結果皆顯示南湖杜鵑與玉山杜鵑和森氏杜鵑之間的遺傳分化不明顯，其可能原因是複合群內的四個種均起源於紅星杜鵑，且南湖杜鵑的分化時間較短而無法累積足夠的遺傳差異。

南湖杜鵑只存在于南湖大山，其形態差異產生的原因可能是受南湖大山特殊的氣候環境影響。南湖大山地理位置獨特，其峽谷內有很多特有種。例如柳葉菜屬植物共約 170 種，廣泛分佈於全球冷溫帶山區；台灣有 7 個種，其中 4 種為特有種。南湖柳葉菜是在 1926 年由山本由松教授發表以“南湖大山”命名的新種，其形態方面也與其它種有較大的差異，其形態特徵為花朵紫紅美麗，明顯比葉片大，柱頭球形先端 4 瓣裂，種子具有宿存的冠毛，為東亞地區最具特色的柳葉菜屬植物。分佈於台灣海拔 3400 公尺以上的地區，是典型高山岩屑地指標植物。因此本研究推測，南湖杜鵑遺傳上可能與其它種之間沒有太大差異，可能因為受到南湖大山特殊的氣候影響而產生較大的形態差異，所以本研究不支持南湖杜鵑在複合群內被歸類于另一個亞種。

4.4：海拔梯度造成的溫度差異有可能是促成紅星杜鵑與其它玉山杜鵑複合群適應性分歧的原因

諸多研究顯示，溫度及降雨量是驅使山地植物物種發生適應性演化的主要選擇力量 (Manel et al., 2010; Manel et al., 2012; Fang et al., 2013; Huang et al., 2015(B); Hsieh et al., 2013)。在玉山杜鵑複合群中，紅星杜鵑菜公坑和燦光寮族群所在的位置海拔高度比其它玉山杜鵑複合群種群至少低了 1,200 公尺以上，在溫度上，紅星杜鵑所在地平均氣溫也比其它複合群的杜鵑族群的生長點高出 5 到 10 °C。本研究環境因數的 PCA 分析(圖十)結果表明，相較於降雨，和溫度相關的環



境因子更能區分紅星杜鵑和其他三個物種的生育環境。SAMBADA 評估偏離中性演化的基因座和環境因數之間的關聯性，以分析促進適應性演化的環境因數，其結果顯示偏離中性演化的五個位點 (表八)與溫度相關的環境因子有更多的關聯性，說明溫度在玉山杜鵑複合群的遺傳變異中可能扮演重要角色。

臺灣地形多變，季節性鋒面或季風的影響常使相同山脈的背風面及迎風面的水氣及溫度不一致，在環境因數與地形的交互作用下，這些氣候環境因數通常具有空間結構或梯度的變化(Allen et al., 2006; Strasburg et al., 2012)，很多研究已經廣泛發現了適應氣候梯度的不同植物物種的證據，特別是溫度可能作為各種植物物種適應性變異的生態驅動因素起著重要作用(Manel et al., 2010, 2012; Poncet et al., 2010; Bothwell et al., 2013; Fang et al., 2013; Hsieh et al., 2013; Huang et al., 2015 (B))，而玉山杜鵑複合群的研究結果也支持溫度是促進遺傳分化的環境因素。

另外，本研究還有相當多的未計入的變化，這可能主要歸因於其他非空間結構的生物或未測量的環境變數，和由生態漂移和擴散驅動的隨機過程 (Legendre et al., 2009)，此外，人為干擾迫使臺灣的森林變成更小、更孤立的碎片，因此改變了自然景觀也是一個不可忽略的因數。

4.5：玉山杜鵑複合群各種間的適應性分歧可能已經趨向於種化

近年隨著全球暖化的證據逐漸明顯，山地植物 (Alpine plant) 族群為因應極端氣候導致降雨強度及溫度的改變，也會間接調整本身族群在海拔或緯度上的分佈，使族群能快速回應因氣候變遷所帶來的天擇壓力並維持高海拔地區的族群多樣性 (Chen et al., 2011; Jump et al., 2012)。棲地型態呈現多樣性及植群組成產生異質性 (Li et al., 2013)，進而影響族群個體的散佈能力，或是造成次族群間等位基因頻率不一致形成適應性分歧，直至產生生態種化 (Manel et al., 2010; Keller & Seehausen, 2012)。

SAMBADA 在玉山杜鵑複合群的 515 個多型性基因座中檢測出 52 個和環境



因數有關聯的基因座，且 6 個 outlier 基因座中有 5 個檢測出與環境因子有關聯性(表九)。許多研究指出受到分歧選擇影響的族群分化可經由天擇作用於少數特定基因座或是其相連的中性基因座，一同改變他們的等位基因頻率形成所謂的 Gentic hitchhiking(Via, 2011)。這些中性基因座原先的等位基因頻率並不受天擇影響保持中性，但因分歧選擇使相連基因座的等位基因頻率偏離中性分佈變成 Outlier loci(Nosil et al., 2009)，進而影響與環境有關的適應性性狀的表達，從而快速回應環境變遷的在地式適應的發生并促進種化(Nicotra et al., 2015; Bossdorf et al., 2007; Huang et al., 2017)。綜上所述，本研究認為紅星杜鵑相對於玉山杜鵑複合群內的其它三個種的適應性分歧可能已經趨向於種化。



第五章：結論

經由本研究環境因數之調查以及 AFLP 分子標記法發現，紅星杜鵑與玉山杜鵑複合群內的其它三個種間棲息地環境差異大，種間有分化的情形發生，在族群內找到五個顯著受天擇作用的基因座，並發現這些基因座與溫度和海拔相關的環境因數具有關聯性，這代表玉山杜鵑複合群可能已經受到分歧型天擇的影響，產生不同的適應性演化。遺傳分析還發現南湖杜鵑和玉山及森氏杜鵑之間並沒有明顯的遺傳差異，且形態方面的不同可能主要是受南湖大山特有的環境影響而產生，所以本研究結果不支持南湖杜鵑在 *Hymenanthes* 亞屬裡面獨立區分成另一個種 (*Ponica* subsection)。

附件



附表一、SAMBADA 檢測下，玉山杜鵑複合群內多型性基因座的頻率與環境因子關聯性分析結果

Outlier	Gscore (P_value < 0.001)					
	BIO01	BIO04	BIO13	BIO18	BIO19	BIO20
c01_1226				26.21		
c02_2897			27.75	34.41	35.37	
c02_2977				30.87		
c02_3094	60.28	62.43931		57.53		57.83
c02_3468			32.07	34.31	41.21	
c04_1001	29.65					29.21
c04_1224				31.96		
c04_1721	30.91		26.88			27.00
c04_2314	29.75	26.78				26.85
c04_2400	127.00	126.52		129.53		122.24
c04_2432	55.57	28.68				48.20
c04_2458	28.98					26.91
c04_2637	40.90	34.49				
c04_2726	92.32	89.59		70.76		90.63
c04_3722	53.88			52.36		53.77
c04_3890			25.43			
c05_1158	31.11	23.76				28.09
c05_1336			37.37			
c05_1742	50.13	33.61				47.65
c05_1905				48.02		
c05_2128	54.52	36.60				48.19709
c05_2524	70.78	76.38		76.95834		67.54248
c05_2608			37.04		40.70	
c05_2980	52.04			37.38		40.94
c05_3404			34.98			
c05_3679	27.55					29.73



附表一、SAMBADA 檢測下，玉山杜鵑複合群內多型性基因座的頻率與環境因子關聯性分析結果（續）

Outlier	Gscore (P_value < 0.001)					
	BIO01	BIO04	BIO13	BIO18	BIO19	BIO20
p03_1289	37.10					32.80
p03_1583		24.88				23.42
p03_1835	63.24	65.15		59.55		64.10
p03_1854	46.54	29.20				45.58
p03_1912	79.38	48.33	26.20			76.41
p03_1963				49.18	31.56	
p03_2098						34.03
p03_2407	33.25					
p03_2842		24.13				
p03_3203	51.08					47.71
p03_3654	54.90	52.71				
p04_1097	56.11	44.97				55.18
p04_2104	35.52					32.63
p04_2326	59.94	51.81				56.04
p04_3516	112.67		74.36			82.66
p06_1195	26.01					
p06_1340	31.72					
p06_1525	30.16		41.66			27.85
p06_2065		39.21		46.62		
p06_2094						23.59
p06_2591	62.71	82.89		65.99		68.89
p06_2751	59.68	35.74				56.86
p06_3094			27.53			
p06_3373			33.14			
p06_3422	60.36			52.17		

參考文獻



- Allen AP, Gillooly JF, Savage VM, Brown JH. (2006). **Kinetic effects of temperature on rates of genetic divergence and speciation.** Proc Natl Acad Sci U S A 103:9130–9135
- Arthofer, W. (2010). **TinyFLP and tinyCAT: Software for automatic peak selection and scoring of AFLP data tables.** Mol Ecol Resour, 10(2), 385-388.
- Basu, S. a. S. C. (2003). **Marginal likelihood and Bayes Factors for Dirichletprocess mixture models.** Journal of the American Statistical Association, 98,224-235.
- Bensch, S., & Akesson, M. (2005). **Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals** Mol Ecol, 14(10), 2899-2914.
- Bernardi, G., & Lape, J. (2005). **Tempo and mode of speciation in the Baja California disjunct fish species *Anisotremus davidsonii*.** Mol Ecol, 14(13), 4085-4096.
- Bolnick, D. I., & Fitzpatrick, B. M. (2007). **Sympatric Speciation: Models and Empirical Evidence.** Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 38(1), 459-487.
- Bothwell H, Bisbing S, Therkildsen NO, Crawford L, Alvarez N, Holderegger R, Manel S. (2013). **Identifying genetic signatures of selection in a non-model species, alpine gentian (*Gentiana nivalis* L.), using a landscape genetic approach.** Conserv Genet 14:467–481
- Bossdorf, O., C. L. Richards, and M. Pigliucci, 2007, **Epigenetics for ecologists: Ecology Letters**, p. 071117033013002-26, p. 6621-6633.
- Brubaker, L. B., P. M. Anderson, M. E. Edwards, and A. V. Lozhkin. (2005). **Beringia as a glacial refugium for boreal trees and shrubs: new perspectives from mapped pollen data.** Journal of Biogeography, v. 32, p. 833-848.

Chamberlain, D. H., R. , Argent, G. , Fairweather, G., Walter, K. S. (1996). **The genus**

Rhododendron: its classification and synonymy.

Chen, C.-Y., Liang, B.-K., Chung, J.-D., Chang, C.-T., Hsieh, Y.-C., Lin, T.-C., &

Hwang, S.-Y. (2013). **Demography of the upward-shifting temperate woody species of the *Rhododendron pseudochrysanthum* complex and ecologically relevant adaptive divergence in its trailing edge populations.** *Tree Genetics & Genomes*, 10(1), 111-126.

Chung, J. D., Lin, T. P., Chen, Y. L., Cheng, Y. P., & Hwang, S. Y. (2007).

Phylogeographic study reveals the origin and evolutionary history of a *Rhododendron* species complex in Taiwan. *Mol Phylogenet Evol*, 42(1), 14-24.

Chen IC, Hill JK, Ohlemüller R, Roy DB, Thomas CD. (2011). **Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming.** *Science*, 333, 1024.

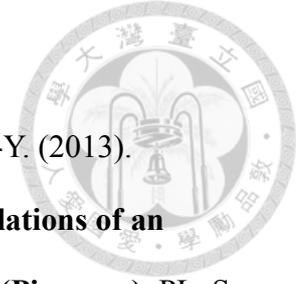
Corlett, R. T., and S. Ng. (2000). **Comparative reproductive biology of the six species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Hong Kong, South China.** v. 78, p. 221 - 229.

Elam, N. C. E. a. D. R. (1993). **Poulation genetic consequences of small population size: Implications for Plant Conservation.**

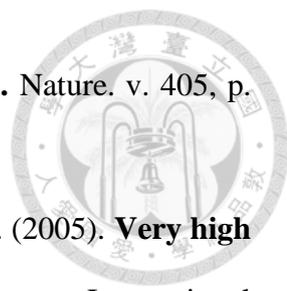
Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). **Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study.** *Mol Ecol*, 14(8), 2611-2620.

Escaravage, N., and J. Wagner. (2004). **Pollination Effectiveness and Pollen Dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) Population.** *Plant Biology*. v. 6, p. 606-615.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and**



- Windows.** *Mol Ecol Resour*, 10(3), 564-567.
- Fang J-Y, Chung J-D, Chiang Y-C, Chang C-T, Chen C-Y, Hwang S-Y. (2013). **Divergent selection and local adaptation in disjunct populations of an endangered conifer, *Keteleeria davidiana* var. *formosana* (Pinaceae).** *PLoS One* 8:e70162
- Feder, J. L., Egan, S. P., & Nosil, P. (2012). **The genomics of speciation-with-gene-flow.** *Trends Genet*, 28(7), 342-350.
- Feder, J. L., Gejji, R., Yeaman, S., & Nosil, P. (2012). **Establishment of new mutations under divergence and genome hitchhiking.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1587), 461-474.
- Foll, M., & Gaggiotti, O. (2008). **A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective.** *Genetics*, 180(2), 977-993.
- Dechaine EG, Martin AP. (2005). **Marked genetic divergence among sky island populations of *Sedum lanceolatum* (Crassulaceae) in the Rocky Mountains.** *American Journal of Botany*, 92(3), 477-486.
- Gavrilets, S., & Vose, A. (2005). **Dynamic patterns of adaptive radiation.** *Proc Natl. Acad Sci U S A*, 102(50), 18040-18045.
- Graham Coop, D. W., Anna Di Rienzo, Jonathan K. Pritchard. (2010). **Using environmental correlations to identify loci underlying local adaptation.**
- Harding, J. F. B. C. R. J. B. M. R.-T. E. B. C. A. B. A. N. M. (1999). **Minisatellite mutational processes reduce *Fst* estimates.** *Human Genetics*, December 1999, Volume 105, Issue 6, pp 567–576 | Cite as.
- Hedrick, P. W.(2004). **Recent developments in conservation genetics.** *Forest Ecology and Management*. v. 197, p. 3-19.

- 
- Hewitt, G. (2000). **The genetic legacy of the Quaternary ice ages.** *Nature*. v. 405, p. 907-13.
- Hijmans, R. J., S. E. Cameron, J. L. Parra, P. G. Jones, and A. Jarvis. (2005). **Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas.** *International Journal of Climatology*. v. 25, p. 1965-1978.
- Hirao, A. S. (2010). **Kinship between parents reduces offspring fitness in a natural population of *Rhododendron brachycarpum*.** *Annals of Botany*. v. 105, p. 637-646.
- Hsieh Chang-Fu. (2002). **Composition, endemism and phytogeographical affinities of the Taiwan flora.**
- Hsieh Y-C, Chung J-D, Wang C-N, Chang C-T, Chen C-Y, Hwang S-Y. (2013). **Historical connectivity, contemporary isolation and local adaptation in a widespread but discontinuously distributed species endemic to Taiwan, *Rhododendron oldhamii* (Ericaceae).** *Heredity* 111:147–156
- Huang, C.-L., Chang, C.-T., Huang, B.-H., Chung, J.-D., Chen, J.-H., Chiang, Y.-C., & Hwang, S.-Y. (2015). (A) **Genetic relationships and ecological divergence in *Salix* species and populations in Taiwan.** *Tree Genetics & Genomes*, 11(3).
- Huang C-L, Chen J-H, Tsang M-H, Chung J-D, Chang C-T, Hwang S-Y. (2015). (B) **Influences of environmental and spatial factors on genetic and epigenetic variations in *Rhododendron oldhamii* (Ericaceae).** *Tree Genet Genomes* 11:823
- Huang, X., S. Li, P. Ni, Y. Gao, B. Jiang, Z. Zhou, and A. Zhan, 2017, Rapid response to changing environments during biological invasions: DNA methylation perspectives: *Molecular Ecology*, v.
- Hui-Lin Li, Tang Shui Liu. (1998). **Ericaceae. In: Flora of Taiwan, Editorial**



Committee of the Flora of Taiwan.

Hunter R., M., R. K. (2005). **Climatologically Aided Mapping of Daily Precipitation and Temperature.**

Jerry A. Coyne, H. A. O. (2004). **Speciation, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.**

Janes, J. K., J. M. Miller, J. R. Dupuis, R. M. Malenfant, J. C. Gorrell, C. I. Cullingham, and R. L. Andrew. (2017). **The K= 2 conundrum.** *Molecular Ecology*. v. 26, p. 3594-3602.

Jing-Yu Fang, Jeng-Der Chung, Yu-Chung Chiang, Chung-Te Chang, Chia-Ying Chen, and S. Hwang. (2013). **Divergent Selection and Local Adaptation in Disjunct Populations of an Endangered Conifer, *Keteleeria davidiana* var. *formosana* Pinaceae.**

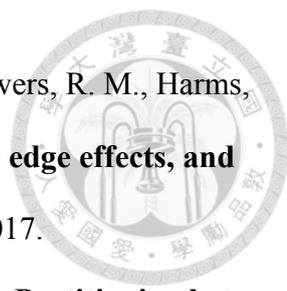
Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F. (2010). **Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations.** *BMC Genet*, 11, 94.

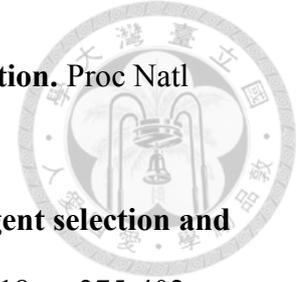
Jump, A. S., Matyas, C., Penuelas, J. (2009). **The altitude-for-latitude disparity in the range retractions of woody species.** *Trends Ecol Evol*, 24(12), 694-701.

Jump AS, Huang TJ, Chou CH. (2012). **Rapid altitudinal migration of mountain plants in Taiwan and its implications for high altitude biodiversity.** *Ecography*, 35, 204-210.

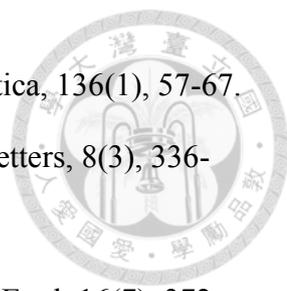
Kamvar ZN, Tabima JF, Grunwald NJ. (2014). **Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality.** *Frontiers in Genetics*, 6, 208.

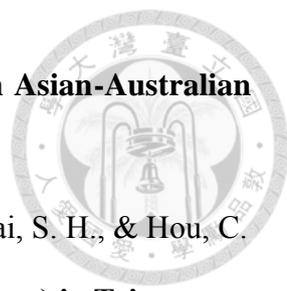
Keller I, Seehausen O (2012) **Thermal adaptation and ecological speciation.** *Molecular Ecology*, 21, 782-799.

- 
- Laurance, W. F., Nascimento, H. E., Laurance, S. G., Andrade, A., Ewers, R. M., Harms, K. E. Ribeiro, J. E. (2007). **Habitat fragmentation, variable edge effects, and the landscape-divergence hypothesis.** PLoS One, 2(10), e1017.
- Legendre P, Mi XC, Ren HB, Ma KP, Yu MJ, Sun I-F, He FL. (2009). **Partitioning beta diversity in a subtropical broad-leaved forest of China.** Ecology 90:663–674
- Li C-F, Chytrý M, Zelený D. (2013). **Classification of Taiwan forest vegetation.** Applied Vegetation Science, 16, 698-719.
- Liew PM, Kuo CM, Huang SY, Tseng MH. (1998). **Vegetation change and terrestrial carbon storage of eastern Asia during the last glacial maximum as indicated by new pollen records of northern Taiwan.** Glob Planet Change. 16:85-94.
- Lowe, A. J., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C. F., Navarro, C. (2005). **Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees.** Heredity (Edinb), 95(4), 255-273.
- Mabberley, D. J. (1997). **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants.**
- Manel S, Gugerli F, Thuiller W, Alvarez N, Legendre P, Holderegger R, Gielly L, Taberlet P, IntraBioDiv Consortium. (2012). **Broad-scale adaptive genetic variation in alpine plants is driven by temperature and precipitation.** Mol Ecol 21:3729–2738
- Manel S, Poncet BN, Legendre P, Gugerli F, Holderegger R. (2010). **Common factors drive adaptive genetic variation at different spatial scales in Arabis alpina.** Molecular Ecology, 19, 3824-3835.
- Mark A. Beaumont, R. A. N. (1996). **Restricted access Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure.** Published 22 December 1996.
- Michel, A. P., Sim, S., Powell, T. H., Taylor, M. S., Nosil, P., Feder, J. L. (2010).



- Widespread genomic divergence during sympatric speciation.** Proc Natl Acad Sci U S A, 107(21), 9724-9729.
- Nosil, P., D. J. FUNK, and D. ORTIZ-BARRIENTOS, 2009, **Divergent selection and heterogeneous genomic divergence:** Molecular Ecology, v. 18, p. 375-402.
- Nicotra, A. B., D. L. Segal, G. L. Hoyle, A. W. Schrey, K. J. F. Verhoeven, and C. L. Richards, 2015, **Adaptive plasticity and epigenetic variation in response to warming in an Alpine plant: Ecology and Evolution,** v. 5, p. 634-647
- Nosil, P., Harmon, L. J., & Seehausen, O. (2009). **Ecological explanations for (incomplete) speciation.** Trends Ecol Evol, 24(3), 145-156.
- Ono, A., I. Dohzono, and T. Sugawara. (2008). **Bumblebee pollination and reproductive biology of Rhododendron semibarbatum (Ericaceae): Journal of Plant Research.** v. 121, p. 319-327.
- PATRIK, N. (2008). Speciation with gene flow could be common. Molecular Ecology, 17(9), 2103-2106. x
- Poncet BN, Herrmann D, Gugerli F, Taberlet P, Holderegger R, Gielly L, Rious D, Thuiller W, Aubert S, Manel S. (2010). **Tracking genes of ecological relevance using a genome scan in two independent regional population samples of Arabis alpina.** Mol Ecol 19:2896–2907
- Porrás-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, A., & Lareu, M. V. (2013). **An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software.** Front Genet, 4, 98.
- Quiroga MP, Premoli AC. (2007). **Genetic patterns in Podocarpus parlatorei reveal the long-term persistence of cold-tolerant elements in the southern Yungas.** J Biogeogr 34:447–455
- Rossi, A. A., de Oliveira, L. O., Venturini, B. A., dos Santos Silva, R. (2009). **Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian**

- 
- populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae).** *Genetica*, 136(1), 57-67.
- Rundle, H. D., & Nosil, P. (2005). **Ecological speciation.** *Ecology Letters*, 8(3), 336-352.
- Schluter, D. (2001). **Ecology and the origin of species.** *Trends Ecol Evol*, 16(7), 372-380.
- Schlüter, P. M. (2013). **FAMD - Fingerprint Analysis with Missing Data 1.31.**
- Sheng-You Lu, Yuen-Po Yang (1989). **A Revision of *Rhododendron* (Ericaceae) of Taiwan (English Summary).** Taiwan Forest Res. Inst.
- Shumpei P. Yasuda, P. V. K. T. (2005). **Phylogeographic patterning of mtDNA in the widely distributed harvest mouse (*Micromys minutus*) suggests dramatic cycles of range contraction and expansion during the mid- to late Pleistocene.**
- Smith, A. F. M. a. R., G.O. (1993). **Bayesian computation via the Gibbs sampler and related Markov chain Monte Carlo methods.** *Journal of the Royal Statistical Society B*, 55: 3-24.
- Stout, J. C. (2007). **Reproductive biology of the invasive exotic shrub. *Rhododendron ponticum* L. Ericaceae, v. 155, p. 373 - 381.**
- Strasburg JL, Sherman NA, Wright KM, Moyle LC, Willis JH, Rieseberg LH. (2012). **What can patterns of differentiation across plant genomes tell us about.** *Phil Trans R Soc B* 367:364–373
- Stucki, S., P. Orozco-terWengel, B. R. Forester, S. Duruz, L. Colli, C. Masembe, R. Negrini, E. Landguth, M. R. Jones, M. W. Bruford, P. Taberlet, and S. Joost. (2017). **High performance computation of landscape genomic models including local indicators of spatial association.** *Molecular Ecology Resources*, v. 17, p. 1072-1089.
- Su, Y., Y. Chang, S. Lee, and I. Tso. (2007). **ORIGINAL ARTICLE: Phylogeography**

- 
- of the giant wood spider (*Nephila pilipes*, Araneae) from Asian-Australian regions.** *Journal of Biogeography*, v. 34, p. 177-191.
- Tsai, C. C., Huang, S. C., Chen, C. H., Tseng, Y. H., Huang, P. L., Tsai, S. H., & Hou, C. H. (2015). **Genetic relationships of *Rhododendron* (Ericaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA.** *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(2), 234-240.
- Tsukada, M. (1966). **Late pleistocene vegetation and climate in taiwan (formosa).** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55(3), 543-548.
- Vekemans, Xavier. (2002) (A). **AFLP-SURV 1.0, A program for genetic diversity analysis with AFLP (and RAPD) population data.**
- Vekemans, Xavier. (2002) (B). **Aflp-Surv Version 1.0. Distributed by the Author.** Laboratoire De Génétique Et Ecologie Végétale, Université Libre De Bruxelles, Belgium. .
- Via, S. (2012). **Divergence hitchhiking and the spread of genomic isolation during ecological speciation-with-gene-flow.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1587), 451-460.
- Wei KY. (2000). **Environmental changes during the late quaternary in Taiwan and adjacent seas: an overview of recent results of the past decade (1990-2000).** *West Pac Earth Sci* 2002, 2:149-160.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). **Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure.** *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- Wiens, J. J. (2004). **what is speciation and how should we study it.**
- Williams, G. C. (1966). **Adaptation and Natural Selection ; A Critique of Some Current Evolutionary Thought.**
- Yaqian Guo, T. H., Robert Tibshirani. (2018). **Shrunken Centroids Regularized**

Discriminant Analysis.

Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). **The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants.** *Trends Ecol Evol*, 11(10), 413-418.

黃啟俊, 徐再文. (2005). 玉山杜鵑與森氏杜鵑之地理親緣。

黃士穎, 徐國凱. (2001). 應用葉綠體 trnF-trnL 核酸序列探討臺灣八種杜鵑花之分子親緣關係。

梁博凱. (2011). 玉山杜鵑複合群物種于更新世冰期過後之族群退縮與物種分歧。

