

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列

牛樟分子指紋標誌物選殖以及資料庫之建立  
Cloning of microsatellites and construction of fingerprint database of  
*Cinnamomum kanehirae*

成果報告



受託單位：國立屏東科技大學 生物資源研究所

計畫主持人：洪國翔 副教授

行政院農業委員會林務局新竹林區管理處委託研究報告

中華民國一零二年八月

## 目錄

表目錄.....	III
圖目錄.....	IV
附錄目錄 .....	V
摘要.....	1
前言.....	3
一. 遺傳多樣性.....	3
二. 分子指紋技術 .....	5
三. 分子指紋技術於物種保育議題之應用 .....	10
四. 牛樟簡介 .....	13
全程目標 .....	15
重要工作項目及實施方法 .....	16
材料與方法 .....	17
一. 樣本採集:.....	17
二. DNA 萃取:.....	18
三. 微衛星 DNA 標誌物之選殖:.....	23

四 微衛星 DNA 標誌物之多型性評估: .....	27
<b>結果</b> .....	39
一. DNA 濃度檢測:.....	39
二. PCR 檢測 DNA 之品質: .....	44
三. 微衛星 DNA 之選殖結果:.....	54
四. 15 組微衛星基因座遺傳歧異度分析: .....	59
五. 微衛星 DNA 之基因型鑑定: .....	68
<b>討論</b> .....	74
一. 殘材 DNA 萃取以及品質之檢測: .....	74
二. 分子指紋在牛樟保育工作的可行性: .....	77
三. 牛樟族群之遺傳組成以及分化程度之探討:.....	81
<b>結論</b> .....	84
<b>建議與未來施行方向</b> .....	85
<b>誌謝</b> .....	88
<b>參考文獻</b> .....	89
<b>附錄</b> .....	94

## 表目錄

表一、牛樟殘材樣本族群之相關採樣與查扣資料 .....	32
表二、研究所使用之 RAPD 引子序列 .....	38
表三. 利用分光光度計以及 Qubit 2.0 螢光計檢測樣本 DNA 濃度 ..	41
表四. 葉綠體、粒腺體以及細胞核 DNA 中所選用三個基因其引子資 料、基因片段大小以及 PCR 反應時黏合溫度條件 .....	45
表五、牛樟微衛星 DNA 基因座之引子序列以及長度 .....	56
表六、牛樟微衛星 DNA 基因座之 PCR 反應成功率 .....	58
表七、15 組基因座的對偶基因數( $A$ )、異型合子觀測值( $H_o$ )、異型合 子期望值( $H_e$ ) .....	64
表八、牛樟族群之對偶基因數( $A$ )、異型合子觀測值( $H_o$ )、異型合子 期望值( $H_e$ ) 以及自交系數( $F_{IS}$ ) .....	65
表九、牛樟將其分為殘材以及葉片之族群對偶基因數( $A$ )、異型合子 觀測值( $H_o$ )、異型合子期望值( $H_e$ ) 以及自交系數( $F_{IS}$ ) .....	65
表十、根據微衛星 DNA 估算之牛樟遺傳分化指數 ( $F_{ST}$ ) .....	66
表十一、SAMOVA 程式之族群最佳分群分析 .....	66
表十二、牛樟衛星 DNA 不同之基因座在個體所顯現之基因型。 ...	70

## 圖目錄

圖一、牛樟殘材樣本之採集點地圖 .....	35
圖二、牛樟殘材樣本 .....	37
圖三、細胞核 DNA 中 ITS 片段電泳膠圖 .....	46
圖四、粒線體 DNA 中 ITS 片段電泳膠圖 .....	48
圖五、粒線體 DNA 中 ITS 片段定序全長，以及 T5、T26 以及 T60 樣本 alignment 後結果 .....	49
圖六、葉綠體 DNA 中 <i>trnL-F</i> 片段電泳膠圖 .....	52
圖七、葉綠體 DNA 中 <i>trnL-F</i> 片段定序全長，以及與 EU338495 、 EU338499 進行 alignment 後結果(*表序列一致) .....	53
圖八、微衛星 DNA 基因座 Cmi-AC-198 片段聚丙烯醯胺膠之電泳膠 圖 .....	63
圖九、STRUCTURE2.3.1 程式分析之結果 .....	58

## 附錄目錄

附錄一、牛樟衛星 DNA 不同之基因座在個體所顯現之基因型原始資料.....	94
附錄二、微衛星 DNA 基因型鑑定之簡易流程圖.....	98
附錄三、微衛星 DNA 基因型鑑定之流程.....	99
附錄四、期中報告意見.....	111
附錄五、期末報告意見.....	112

## 摘要

分子指紋技術近幾年來已廣泛應用於生物保育的範疇，其中廣泛分布於基因體中的微衛星DNA因具有高解析力及高變異性的特性，使得此技術在物種之保育及遺傳多樣性的分析上提供了快速又可靠的工具。本研究針對之物種牛樟為台灣特有物種，亦具有極高的經濟價值，引起許多不肖份子覬覦造成的野外族群受到嚴重的衝擊，本研究針對牛樟物種進行分子指紋標誌物微衛星DNA基因座之選殖並建立分子指紋資料庫。本研究建立從殘材中萃取DNA之流程以及可行性，並利用葉綠體DNA中的*trnL-F*標誌物確保所萃取出DNA內含牛樟DNA分子。微衛星DNA標誌物選殖部分，選殖出15組微衛星標誌物其對偶基因數介於4.000~ 12.000之間，平均對偶基因數為6.800，異型合子觀測值介於0.07353~1.0000，平均為0.49670，整體上顯示牛樟物種具低度遺傳變異，在遺傳分化部分，各族群間存在低度的遺傳分化，其值介於0.06564-0.10564。個體鑑定部分顯示本研究個體皆具有獨特的基因型，亦即具有不同的遺傳組成，兩個不同個體但具有相同基因型的機率值 ( $PNE_{ID}$ )為 $5.47 \times 10^{-14}$ ，其機率值相當小，顯示本15組微衛星DNA之多型性對牛樟而言應可達到個體鑑定之目標。未來此15組微衛星DNA可用於建立牛

樟殘材或生立木個體之分子指紋資料庫以達嚇阻不肖人士的盜採，此外更可用來探討台灣牛樟族群遺傳結構及遺傳歧異度的分析，藉以提供後續牛樟物種種源保育之遺傳資訊。

摘要關鍵詞：分子指紋技術，微衛星 DNA，牛樟，族群遺傳，遺傳歧異度。

# 前言

## 一. 遺傳多樣性

遺傳多樣性意指生物的種或族群所保有的基因型 (genotypes) 及對偶基因 (alleles) 的歧異程度，不同的基因型常會表現出不同的外表型 (phenotypes)，一如人類眼睛、毛髮及皮膚的顏色，及植物花瓣的顏色和不同的花型，新的遺傳突變則常會造成外表性狀及特徵的改變，因此種間及族群間所呈現之外部形態的異同，常受到古老的遺傳祖先型及新的遺傳變異影響。

在 DNA 序列上所呈現的個體間或族群間的差異即代表著不同程度的遺傳變異，DNA 序列的改變如果是在不轉譯的基因區間 (intergenic spacer) 或同義的 (synonymous) 的置換位置，並不會引起胺基酸序列的改變，但可能影響基因體 (genome) 的穩定以及基因的表現程度；相對地，非同義 (nonsynonymous) 的置換則會改變胺基酸的序列以及蛋白質的結構，並造成生化上或是形態上功能的變異，因而影響生物的存活、適應或生殖。

遺傳多樣性的估算，可藉由對多型性 (polymorphism) 的多寡，異型基因合子 (heterozygosity) 的高低，對偶基因歧異度 (allelic

diversity)，或是基因單型歧異度 (haplotype diversity) 加以評估，有些基因可能因為受到強烈的天擇，抑或遺傳漂度 (genetic drift) 影響，趨於固定 (fixed) 而缺乏變異，有的物種或族群則因有較高程度的異交 (outcrossing)，或是大的族群，較高程度的基因交流，而在基因座中保有較高的遺傳歧異程度；因此遺傳歧異度的高低、變異量在族群間的分布、以及分子序列中不同位置的置換模式，常被用來估算天擇的型式，以及族群遺傳的結構和「健康」的程度 (即適應與否)，並提供了保育工作在遺傳學上不可或缺的資訊。近年來，分子生物學技術的神速發展，使得探索野外生物族群的遺傳歧異程度及結構變得不但可行而且快速，其中針對特定基因的分子定序，提供了演化學者在基因分子演化以及稀有或瀕危物種保育等方面提供不可或缺的資訊 (Moritz 1994)。

台灣由於其具特殊之地理區位在加上氣候條件以及複雜地形等因素，使平地至山區的海拔與溫度垂直變化極大，而使得植物在水平及垂直分布上，形成一極為複雜而特殊動植物群落。山地面積佔了全島面積的 75%，平均海拔高度約 660 公尺，高度在 3,000 公尺以上的高山更超過 200 座，密度堪稱世界第一，並享有「高山國」的美譽，這些超過三千公尺以上的高山，氣候更加多變，隨著海拔高度的變化，熱帶、亞熱帶、溫帶及寒帶等各種氣候類型均有，再加上四季

的變化與季風的吹拂，使得台灣的氣候類型得以孕育出各種不同的植物林相，亦造就台灣動植物種具有較高層次的物種多樣性以及遺傳多樣性，同時並孕育許多特有的動植物。近年分子證據研究亦顯示出台灣植物高遺傳歧異度的特質，甚至遠高於整體中國大陸族群遺傳歧異的總和，異常的高遺傳歧異度與台灣的冰河歷史有密不可分的關係，根據現今的植物組成以及化石證據，台灣島嶼的生物大多來自於鄰近的亞洲大陸，這一個由歐亞大陸板塊及菲律賓海板塊擠壓隆起的島嶼，約在距今約 200-300 萬年前，開始有動植物從大陸移入並拓殖 (colonization)，並且歷經多次的冰河週期，其中最後一次冰河擴張距今約 10 萬年前，一直延續到最近的兩萬年前，在冰河擴張時期，因海水水位明顯下降 (約達 120 公尺)，使得連結台灣及大陸間的陸橋從海中裸露出來，提供了動植物移入台灣的管道，加上台灣地處低緯度，在冰河擴張時期，提供了許多生物避難的棲所，因為此一不平常的冰河及地質歷史，使得台灣島嶼保有了許多遺傳的多型性及歧異度 (Chiang and Schaal 2006; Chiang et al., 2006)。

## 二. 分子指紋技術

分子指紋 (fingerprinting) 技術中微衛星指紋 (microsatellite) 提供了幾近於中性 (neutral) 且代表 整個基因組的分子標記 (molecular

marker)，其對偶基因的特性更提供了估算族群中異型基因合子和遺傳變異以及族群間遺傳分化程度的可能，也因此，在保育遺傳學的研究中，分離及利用微衛星指紋基因已成為主流之一。微衛星指紋技術的高變異性，使得不同種類及族群間存在著特殊的電泳條帶型式，對於特有生物的保育、確定造林種源、以及遏止林木被盜採上極有應用性以及學術性，也因此建構本土的微衛星指紋資料庫對特有生物的保育有其必要性及迫切性(Morgante and Olivieri, 1993)。

分子標記 (molecular marker) 是一種以個體間遺傳物質內核苷酸序列變異為基礎的遺傳標記，是 DNA 水平遺傳多態性的直接的反應，相較於其他遺傳標記，例如：形態標記 (morphological marker)、細胞標記 cytological markers)、生化標記 (Biochemical marker)，分子標記更能直接提供有關物種間族群遺傳結構的訊息，讓調查物種間族群結構及歧異度變的更快速。目前常使用的分子標記包括：擴增片段長度多型性 (Amplification Fragment Length Polymorphism, AFLP)、隨機擴增多型性(Random Amplification Polymorphism DNA, RAPD) 限制性長度片段多型性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、胞器 DNA (如粒線體 DNA、葉綠體 DNA)、異構酶 (isozyme)、單核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 及本研究所使用的重複 DNA 分子標記中的微衛星 DNA。

微衛星 DNA 是生物遺傳育種、譜系鑑定和親子鑑定的一項新技術，從以往外表型的選擇進步到基因型的選擇，微衛星 DNA 指的是真核基因組中，存在著大量的連續性重複序列，依重複序列單位的大小，可分為衛星 DNA、小衛星 DNA 及微衛星 DNA，微衛星是指基因組中以 2-4 個核苷酸為單位多次連續重複組成的，其長度可達幾十個核苷酸的序列，其中最常見的是雙核苷酸的重複，如 (AC) $n$ 、(AG) $n$  等，所以又稱為短連續性重複或簡單重複序列 (Single Sequence Repeat, SSR) (Morgante and Olivieri, 1993)。微衛星 DNA 因具有下列優點，因此目前廣泛應用於探討物種保育的相關議題：(一)、微衛星 DNA 的等位基因數量相當多，多型性資訊含量大，數目豐富且廣泛在整個基因中，包含微衛星的基因座不但相對的多，而且一般認為微衛星序列是隨機分布在真核生物的基因體中 (Dib et al., 1996)。(二)、由於微衛星 DNA 序列較短，可以利用兩端的非微衛星 DNA 區域設計引子進行 PCR 擴增特定的微衛星 DNA 區域。(三)、多數微衛星 DNA 在基因組中無功能作用，增加或減少幾個重複性序列的頻率高，使樣本間同一基因座的微衛星 DNA 長度有所差異，因此樣本具有高度變異時，比其他分子標記更具有多型性。(四)、微衛星 DNA 屬於孟德爾共顯性遺傳，可以區別同型合子個體及異型合子個體，為遺傳研究提供了更多可分析的資訊。(五)、多型性 (polymorphism): 微衛星序列在

動物或植物的多樣性都非常高，且其中超過 70% 具有多型性。高變異特性使科學家更容易偵測到近代的族群結構。(六)、高共顯性:微衛星序列可以同時顯現出來父系及母系的遺傳訊息，此一特性為親子關係鑑定及基因交流的研究提供相當有利的工具。(七)、不受天擇淘汰的壓力:目前知道大部分的微衛星序列出現在非轉譯區(non-coding region)，且大都屬於中性淘汰的基因座，符合大部分族群遺傳的理論假設，因此一般認為屬於不受擇汰壓力的分子標誌。(八)、大多數基因座可以適用在相近物種上且操作容易 (Awise, 1994)。

微衛星 DNA 是指真核基因組中，存在大量的連續重複序列。微衛星 DNA 廣泛分布在真核生物的基因組中，而植物體中出現的機率比動物少。與限制性片段長度多型性相比，微衛星 DNA 在生物基因組中為隨機分佈，不僅存在與內含子中，也可存在於編碼區及染色體的任一區域。其原理為將所獲得之 DNA 序列依其兩端非微衛星體進行專一引子設計，並擷取出來。因其具有高度保守性，可依其序列擴增同一物種以致於不同物種之微衛星 DNA 片段 (Oliveira et al., 2006)。此技術對 DNA 的原始品質與含量增加彈性。並可利用自動定序儀，增加分析效能，具鑑別性及資訊度高等優點。數目豐富且廣泛使整個基因中包含微衛星的基因座不但相對的多，且微衛星序列是隨機分布在真核生物的基因體中 (Dib et al., 1996)。多型性

(Polymorphism) 微衛星序列在動物或植物的所呈現出來的多樣性相當高，其中約超過 70% 的比例是具有多型性。也由於這樣高變異特性使科學家更能偵測到近代的族群結構，微衛星序列的高共顯性可同時顯現來自於父、母系的遺傳訊息，因此可做為親子關係鑑定及基因交流研究相當有利的工具(Lynch and Milligan, 1994)。

### 三. 分子指紋技術於物種保育議題之應用

台灣的植物誌具有極高的特有種比例，許多的特有植物甚至有極狹窄的棲地選擇，加上近年來人類對自然棲地的大肆破壞，造成這些種類面臨生存上的危機。遺傳多樣性是否因為人為的干擾以及棲地的消失而大量流失一直是保育工作者最關心的議題之一，微衛星指紋技術不但提供了高度敏感的工具，更提供了物種間相互比對的齊一標準。因此最好的策略是針對亟待保育物種以及其他近緣（同屬）物種一併研究，並建立一有系統屬於台灣專有的資料庫。

近年來因生物多樣性觀念的漸趨成熟，學者開始重視遺傳多樣性熱點（hotspot）的研究，以保育觀點來說，需先探尋保有高度族群遺傳歧異度的地區，瞭解當地物種遺傳結構的組成，進一步給予這些地區採取必要的保育措施及經營管理（Morton and Clegg 1993）。而這些熱點該如何選擇？首先必須建立物種分布與族群大小、數量的相關資料庫，之後利用各種不同的分子標記（尤其是分子指紋）來鑑定遺傳歧異度的保留點。

由於資訊科技的發達與進步，使得數位化生物資源資料庫的建構和利用（Morin 1991, 1992; Raven 1992）更為便利，其中 NCBI（National Center for Biotechnology Information）等數位化資料庫的建立，整合

大量生物資訊及基因體序列等資料，對於生物學的進展有極大貢獻，加上近幾年來網路普及和資料庫發展，使得建構數位化生物資源資料庫成了重要且必須的議題。目前由於玉山國家公園境內由於生態棲地保育完整、生物種類繁多，為生態保育良好典範之一，但也由於物種種類繁多、管理不易，更需加強數位化生物資源資料庫的建立，以提供生態保育方面有用之資訊與建議，近年來玉山國家公園陸陸續續進行公園內珍稀物種之微衛星 DNA 基因座之選殖，其中包含紅檜(Huang et al., 2007)、愛玉子、阿拉伯芥、石松(Huang et al., 2008a) 以及紅豆杉等物種(Huang et al., 2008b)。分子指紋技術已廣泛應用於生物保育上，目前使用率最高的是微衛星 DNA(Microsatellite DNA)，因具高度的解析力及變異性的特性，可尋找出同一物種但不同植株間的 DNA 片段，由於上述所提及的物種遺傳特性因在某些因素下有所差異而產生不同的性狀，如同人類的指紋，在區別差異後建立資料庫，且因台灣森林遭山老鼠嚴重的盜採，例如玉山國家公園內的野生愛玉子為台灣特有藤本植物，因盜採而使野外族群減少，若建立資料庫後便可了解採集來源，遏止非法盜採(Huang et al., 2008a)。本研究也將使用此分子指紋技術來進行相關研究。

台灣由於生態環境及氣候類型多樣化，孕育出許多生物特有種，

但特有種在空間分佈上較廣泛分佈種狹隘，相對地較易受到危害而影響其族群適存度，因此針對特有種的研究及保育更為重要，也因此瞭解台灣特有種的族群演化歷史將有助於台灣特有物種保育策略的建立，紅檜（*Chamaecyparis formosensis* Matsumura）因木材質地良好、不易腐壞等優良條件，適合用於建築加工，為高級建材之一；紅豆杉（*Taxus sumatrana* (Miq.) de Laub）雖不是特有種，但因近年來在藥用醫療上受到高度關切，在紅豆杉屬（*Taxus*）中其植物體萃取物紫杉醇（taxoids）對於部分惡性腫瘤具有療效（Nicolaou and Guy 1996），也由於其經濟上以及醫療上價值，使其大量被砍伐，但近年來此些物種也陸續選殖多型性微衛星 DNA 基因座以利未來能建立其分子指紋資料庫（Huang et al., 2008）。

#### 四. 牛樟簡介

牛樟(*Cinnamomum kanehirae* Hayata)屬於樟科樟屬物種，為台灣特有的常綠闊葉大喬木，名列台灣五種高級闊葉木之一，在森林中是健壯的上層優勢木，生長範圍包括亞熱帶與暖帶雨林，海拔垂直分佈約 450~1800 公尺之間。牛樟多存在於交通不便的中、高海拔山區，呈單株分散且多為逾齡老樹。研究顯示零散分佈不利於昆蟲媒介授粉，再加上鳥類及松鼠喜愛啄食牛樟果實，即使初期樹上結實纍纍，但果實未成熟已被野生動物啄食殆盡，使得牛樟的種子更為稀罕。同時亦發現種子發芽率偏低，這可能是蟲媒授粉不良、天候不利種子發育所致。因天然林中很少看到牛樟的中、小苗，但枯死母樹周邊常見有根株萌蘖的「次代牛樟」出現。近 20 年在牛樟芝熱潮的襲捲下，更讓牛樟面臨嚴峻的生死存亡關頭，牛樟芝主要寄生於牛樟或其他樟屬植株，但牛樟芝的存在並未對牛樟本身的生存造成負面影響，主要是由於近年牛樟芝的療效受到大幅商業宣傳，引起許多不肖份子覬覦，進而嚴重威脅了牛樟的生存！目前根據 IUCN 物種保育等級評估顯示此物種隸屬於瀕臨絕滅(Endangered)，原本全島有大量的分布，由於其材質優良，經濟價值高，大量砍伐及盜伐的結果及其天然更新困

難，導致植群的稀少。這些物種在經濟、醫療應用及觀光上具有極大重要性，因此顯示對於物種族群、生態棲地的保育更為重要，建立此物種的分子指紋資料庫，將有助於嚇阻盜採濫伐等人為破壞。

# 全程目標

## 總目標

本研究主要的目的即在進行牛樟物種微衛星 DNA 基因座選殖，以茲未來能建立牛樟之分子指紋資料庫，並可針對此樹種進行遺傳多樣性評估，並提供可行之保育策略以及未來個體分子指紋鑑定之用。

- 一. 利用分子生物學技術，本研究將根據 Hsu et al. (2004) 方式分離及鑑定牛樟 具多型性微衛星 DNA 基因座。
- 二. 建立珍稀樹木之分子身分證以提供分子鑑定，進而防止盜採濫伐等人為破壞。
- 三. 進行遺傳多樣性評估，並提供未來可行之物種保育策略。

## 重要工作項目及實施方法

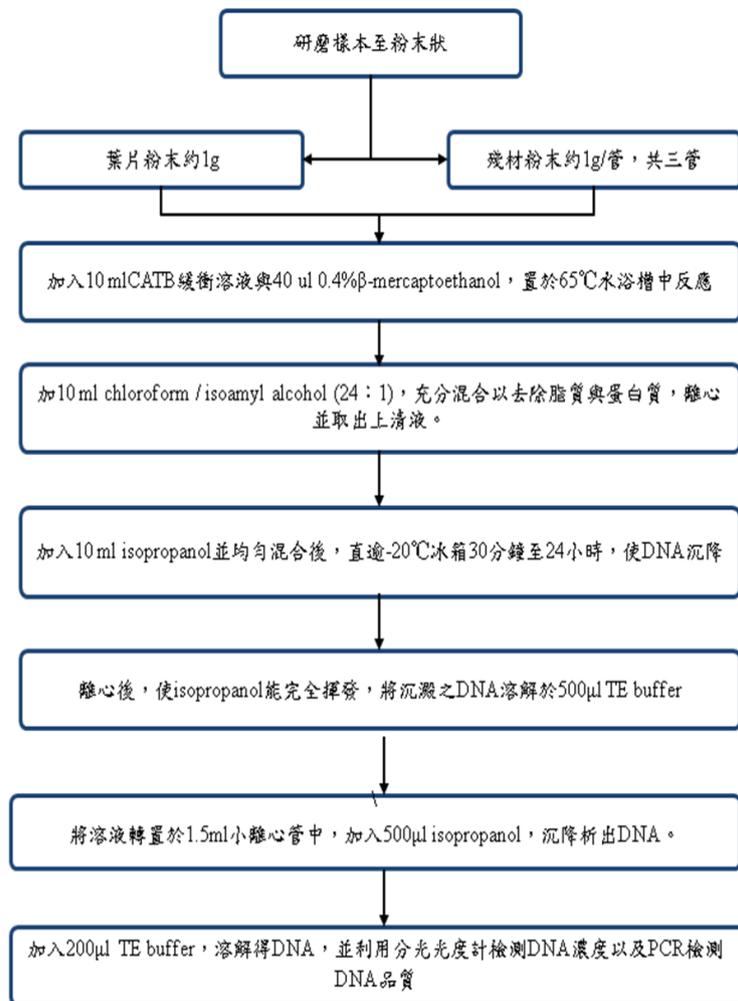
- 一. 前半年度主要進行植物樣本的採集以及 DNA 之萃取，主要採取新竹林管處管理之大湖工作站的植株與殘材共 70 個樣本左右，並確認從殘材中 DNA 萃取的方法與流程，以利後續分子實驗之進行。
- 二. 後半年度則針對選殖 15 組微衛星 DNA 並針對引子的適用性以及多型性進行初步分析，並評估其多樣性。
- 三. 建構遺傳資料庫，提供物種個體鑑定之依據。

## 材料與方法

### 一. 樣本採集:

本研究針對大湖工作站之牛樟殘材進行採樣，同時亦針對被查扣的牛樟殘材進行取樣（表一與圖一）。每一個體以矽膠取幼嫩葉片或殘材固定，並記錄每一個體之經緯度位置及加以編號。目前採樣共 55 個殘材個體，包含 40 個查扣殘材、11 個南庄 13 林班所採樣之個體以及 4 個竹東採樣之個體，至於葉片樣本為採取栽種於大湖工作站之植株 5 棵、2 棵竹東植株以及 8 個大安溪事業區第 48 林班植株，殘材取樣部分則盡量採取靠近殘材外部之部位，若可明顯區分邊材部分，則盡量採取該部位，其體積大小約為 10cm x10 cm x 5cm 如圖二。

## 二. DNA 萃取:



DNA 之萃取主要可分為兩大部分第一部分為新鮮之葉片之 DNA 萃取；第二部分則為野外中以及盜採所回收之殘材 DNA 萃取。

### (一). 葉片之 DNA 萃取:

將野外採回的牛樟新鮮葉片用矽膠充分乾燥後，先放入研钵中再倒入液態氮將樣本組織研磨成粉狀。用 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 方式(Doyle and Doyle, 1987)，將植物組織中的 genomic DNA

分離出來。

CTAB 方式萃取步驟如下：

1. 取乾燥後的葉片組織 1g，置於研鉢中後加入適量液態氮，研磨至粉末狀，之後連同液態氮一起倒入 50ml 離心管內。
2. 加入 10 ml 65°C 之 3X CATB 緩衝溶液與 40 ul 0.4%  $\beta$ -mercaptoethanol，將粉末與緩衝液均勻混合，置於 65°C 水浴槽中反應 90 分鐘，並在反應過程中每 5-10 分鐘充分搖晃離心管一次，使反應完全。
3. 將萃取液倒入 30ml 離心管中，加 10 ml chloroform / isoamyl alcohol (24 : 1)，上下倒轉 50-100 次，充分混合以去除脂質與蛋白質。
4. 在室溫下，於桌上離心機以 8000 rpm 轉速，離心 10 分鐘，將脂質、蛋白質與植物殘渣離心至離心管底部。
5. 將上清液取出，放入新的乾淨離心管中。
6. 重複 3-5 步驟，共兩次
7. 加入 10 ml isopropanol 並均勻混合後，直逾 -20°C 冰箱 30 分鐘至 24 小時，使 DNA 沉降。
8. 在 4°C 下，以 8000 rpm 轉速離心 10 分鐘，倒掉上清液，將離心管倒扣於鐵架上，使 isopropanol 能完全揮發。
9. 將沉澱之 DNA 溶解於 500 $\mu$ l TE buffer，並加入 2 $\mu$ l 的 RNase，於

37°C 的 shaker 中兩小時，去除 RNA。

10. 將溶液轉置於 1.5ml 小離心管中，加入 500 $\mu$ l isopropanol，同步驟 7，沉降析出 DNA。

11. 以 8000 rpm 轉速，離心 10 分鐘後，倒掉上清液。

12. 加入 70% 酒精，輕彈離心管使沉澱物飄起，再以 8000 rpm 轉速，離心 2 分鐘，將鹽類去除。

13. 去除上清液取沉澱物，倒置於鐵架上，等沉澱物內酒精完全揮發乾淨。

14. 加入 200 $\mu$ l 10XTE buffer，溶解得 genomic DNA。

15. 定量所萃取的全基因組 DNA，並將 DNA 稀釋為 2ng/ $\mu$ l 後，保存於 -20°C 冰箱備用。

## **(二). 殘材 DNA 萃取:**

殘材之 DNA 萃取依據 Asif and Cannon (2005) 所發表之步驟進行全基因體 DNA 之萃取，殘材所採取之 DNA 萃取部位為靠近木材外圍之部分，如可區分邊材之位置，則取該部位。所有殘材樣本再研磨前先以 70% 的酒精進行清潔以減少 DNA 於過程中被污染之情形，殘材之 DNA 萃取亦採用 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 方法，並將其步驟以及溶液配方做些微之修改。

溶液:

修改後 CTAB 萃取 buffer 溶液配方如下: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 mM NaCl, 3% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone, 0.2% mercaptoethanol。

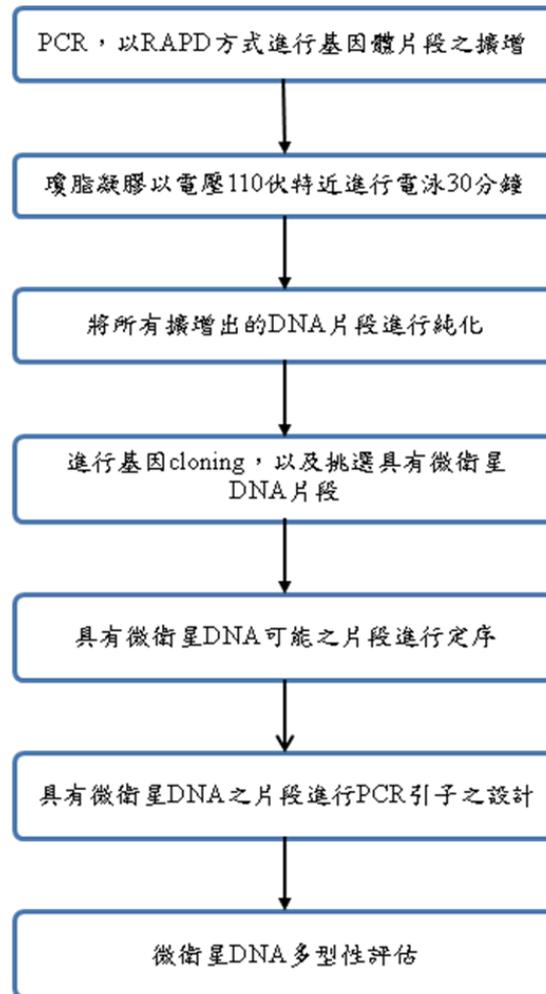
Washing buffer: 76% ethanol, 10 mM ammonium acetate

CTAB 方式萃取步驟如下：

1. 取裁切成小塊的殘材組織約 1 g，置於研鉢中後加入適量液態氮，研磨至粉末狀，之後連同液態氮一起倒入 50ml 離心管內。
2. 加入 10 ml 65°C 之修改後 CATB 緩衝溶液，將粉末與緩衝液均勻混合，置於 65°C 水浴槽中反應至少 120 分鐘，並在反應過程中每 5-10 分鐘充分搖晃離心管一次，使反應完全。
3. 將萃取液倒入 30ml 離心管中，加 10 ml chloroform / isoamyl alcohol (24 : 1)，上下倒轉 50-100 次，充分混合以去除脂質與蛋白質。
4. 在 4°C 下，於桌上離心機以 5000 rpm 轉速，離心 10 分鐘，將脂質、蛋白質與植物殘渣離心至離心管底部。
5. 將上清液取出，放入新的乾淨離心管中。
6. 重複 3-5 步驟，共兩次
7. 加入 10 ml isopropanol 並均勻混合後，直逾 -40°C 冰箱 overnight，使 DNA 沉降。
8. 在 4°C 下，以 5000 rpm 轉速離心 20 分鐘，倒掉上清液，將離心管倒扣於鐵架上，使 isopropanol 能完全揮發。

9. 加入 1 mL washing buffer，輕彈離心管使沉澱物飄起，再以 5000 rpm 轉速移除 washing buffer
10. 重複上述步驟。
11. 加入 70% 酒精，輕彈離心管使沉澱物飄起，再以 5000 rpm 轉速，離心 2 分鐘，移除酒精。
12. 重複上述步驟，並將其沉澱物於室溫下乾燥。
13. 加入 50-100 $\mu$ l 10X TE buffer，溶解得 genomic DNA。
14. 測 DNA 濃度(>2ng/ $\mu$ l)，並將 DNA 濃度稀釋之 2ng/ $\mu$ l，以供後續實驗進行。

### 三. 微衛星 DNA 標誌物之選殖:



簡略流程圖

#### (一). 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR):

利用RAPD隨機引子(100-200組)以 *Taq* polymerase 在溫度循環器擴增出微衛星DNA，在總體積100 $\mu$ l的反應液中加入5U聚合酵素 (*Taq* polymerase)，10 $\mu$ L 10X緩衝液，10 $\mu$ L的dNTP，濃度2 pmole的引子各10 $\mu$ L，最後加入20ng DNA，以無菌水補足100 $\mu$ l。聚合酵素反應在溫度循環機 (Thermal cycler) 進行，共進行31個循環，每個循

環流程為：92°C，45秒，將DNA的雙股變性打開（denaturation）；49°C，1分15秒，使DNA與引子結合（annealing）；72°C，1分30秒，進行DNA延伸反應（extension），最後在72°C作用10分鐘。PCR結束後，取5 $\mu$ l的PCR產物加上1 $\mu$ l 6倍的染色溶液，在1%瓊脂凝膠（agarose gel）中以100伏特電壓跑電泳約30分鐘，經過溴化乙啶螢光染劑（EtBr）處理後，配合所選用的DNA ladder當分子大小的標記，並在紫外線燈下顯色及拍照。

## **(二). DNA片段純化:**

以RAPD引子進行DNA聚合酵素反應(PCR)的產物有時所含的片段相當多，而且有許多離子、dNTP、引子存在，所以必須經過純化。先把PCR所得的產物放在1%瓊脂凝膠，以1X TAE的緩衝液，以100伏特電壓進行電泳，經溴化乙啶螢光染劑染色後，在紫外光燈下將所有DNA片段的膠切下，以Agarose Gel DNA Extraction Kit純化。

## **(三). 基因cloning:**

### **1. DNA分子的連接(ligation)**

將純化後之PCR產物3 $\mu$ l中加5 $\mu$ l ligation buffer，1 $\mu$ l ATP，1 $\mu$ l ligase，1 $\mu$ l T<sub>4</sub>載體(vector)，在4°C水域中反應過夜，使PCR產物連結至載體上。

### **2. 轉形作用(transformation)**

將大腸桿菌以氯化鈣活化後，將與PCR產物連接好之載體加入活化之菌液，放入42°C水浴1分20秒，迅速投入冰水中，使載體進入大腸桿菌中。

### 3. 塗碟

取出含有 Ampicillin (50ng/ml)的 LB 平板培養基，將經過轉型之勝任細胞以 100 µl/plate 的量均勻塗抹於 LB agar 表面，待菌液乾後，置於 37 °C 培養箱中，培養 12~16 小時。

### 4. 劃碟

利用滅過菌之牙籤，在每個菌盤中挑出 3~5 個白色單一菌落，先將單一菌落劃至新鮮的 LB 平板培養基上，再將該牙籤置於 DMSO 2µl 與無菌水 20 µl 的混合溶液中，使牙籤上的殘餘菌種溶於水溶液中，待進行 PCR Check。將新劃之 LB 平板培養基置於 37 °C 培養箱中，培養 12~16 小時後備用。

### 5. PCR – Check

在上述的菌種水溶液中分別加入 3 µl 10X PCR 緩衝溶液、3 µl dNTP、3 µl M13F 引子或 3 µl M13R 引子，分別搭配 (AC)<sub>8</sub>、(AG)<sub>8</sub>、(TC)<sub>8</sub>、(TG)<sub>8</sub>、(AAG)<sub>6</sub>、(AGC)<sub>6</sub>、(GCT)<sub>6</sub> 以及 (GTT)<sub>6</sub>，最後再加入 0.5 µl 聚合酵素 (Taq polymerase) 後，放入溫度循環機內反應，進行 30 個循環，循環流程為：首先以 95 °C 作 3 分鐘反應，再以 94 °C 40 秒、47 °C 50 秒、72 °C 1 分 30 秒反應 30 次，最後再以 72 °C 反應 10 分鐘

後，保存在 4 °C 中。完成上述 PCR 反應後，以 1%瓊脂凝膠跑電泳照相後，確定載體是否成功轉入大腸桿菌中 DNA 片段是否有上述 (AC)<sub>8</sub>、(AG)<sub>8</sub>、(TC)<sub>8</sub>、(TG)<sub>8</sub>、(AAG)<sub>6</sub>、(AGC)<sub>6</sub>、(GCT)<sub>6</sub> 以及 (GTT)<sub>6</sub> 的微衛星 DNA 片段。

#### 6. 萃取質體DNA(plasmid DNA)

將有反應的的大腸桿菌大量培養後，以 lysis buffer 將細菌打破，加入 RNAase 分解 RNA，再以 phenol 及 chloroform / isoamyl (24:1) 將質體 DNA 萃取出。最後以 isopropanol 沈降，酒精洗去鹽類，晾乾，加入 TE 溶解，以進行 DNA 定序。

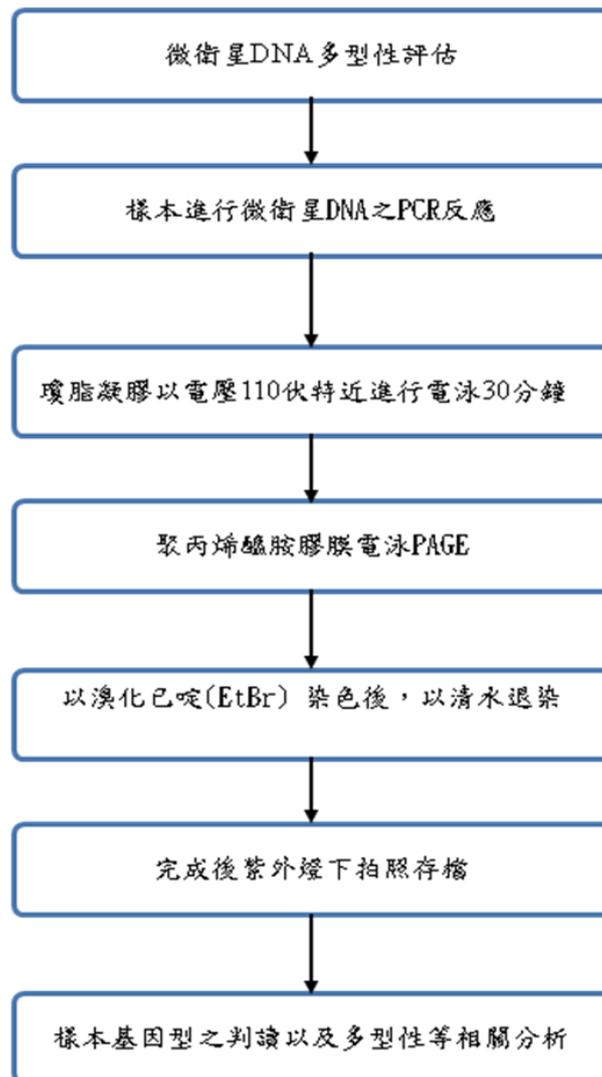
#### 7. DNA 定序

DNA 定序是以雙去氧核苷鏈停止法 (dideoxynucleotide chain termination, Sanger et al., 1977) 定序。利用 ABI PRISM™ 3100 DNA Sequencer (Perkin-Elmer; ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin-Elmer) 進行分子定序。

#### (四). 序列的整理與校對 (alignment)

將所得微衛星 DNA 序列，利用 PRIMER3 軟體設計該衛星 DNA 基因座的專用引子，其所設計的片段大小約介於 100-300bp 之間。

#### 四 微衛星 DNA 標誌物之多型性評估:



簡略流程圖

##### (一). 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR):

在溫度循環器(Thermal cycle)中，利用聚合酵素(*Taq* polymerase)及微衛星 DNA 引子擴增出微衛星 DNA。每份 PCR 反應總體積為 50 $\mu$ l，成分包含模板 DNA(2ng/ $\mu$ l)4.5 $\mu$ l、dNTP(8mM)5 $\mu$ l、10X PCR buffer 5 $\mu$ l、引子(2 pmole)各 5 $\mu$ l、再加入 1 $\mu$ l 的聚合酵素 I(*Taq* polymerase I)

並以 ddH<sub>2</sub>O 補足至總體積 50 $\mu$ l，最後放入溫度循環儀中進行反應。

反應循環流程為：加熱至 95 $^{\circ}$ C，3 分鐘，將模板 DNA 雙股解開；而後降溫至 92 $^{\circ}$ C，30 秒，確保上個步驟完成；再降溫至 48~55 $^{\circ}$ C，50 秒，使引子能夠與模板 DNA 黏合(annealing)；再加熱至 72 $^{\circ}$ C，30 秒，讓酵素進行 DNA 延伸反應(extension)，以上步驟循環 35~40 次，最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，後將溫度降至 4 $^{\circ}$ C，反應完成。接著取產物 5 $\mu$ l 加上約 1 $\mu$ l 的 6X 染色溶液，利用 1.2% 瓊脂凝膠(agarose gel)與 1X TBE buffer，以電壓 110 伏特近進行電泳 30 分鐘以染色，並在紫外線燈下顯色及拍照紀錄。

瓊脂凝膠製作方法：

把 agarose 與 1X TBE buffer 以 1(g)：100(ml)的方式倒入血清瓶中，之後置入微波爐中 5-10 分鐘煮沸溶解，溶解之溶液再以冷水沖洗瓶身數十秒鐘，直到瓶身不燙手後再加入 DNAsafe Nucleic Acid Stain 染色，完成後，倒入鑄模待約 30 分鐘凝固後即可。

## **(二). 聚丙烯醯胺膠膜電泳法 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)**

相較於瓊脂凝膠電泳法，聚丙烯醯胺膠膜電泳法能以更高的解析度判別 DNA 片段之長度，即判別不同基因型分子量的差距，此法能更

準確判別每個個體間的變異程度。

聚丙烯醯胺膠片製作方式如下：

製膠前先將直立式電泳槽所需之玻璃以拭淨紙擦拭乾淨後，將玻璃架至做膠台上備用，製膠時：先加入 10X TBE buffer 12ml、ddH<sub>2</sub>O 39ml、尿素(Urea)50.4g，再加入聚丙烯醯胺溶液(Polyacrylamide)26.7ml 使尿素溶解，待尿素完全溶解後，再加入 10% APS 840μl 及 TEMED 60μl，攪拌混合後，以針筒注入鑄模後，待約 30 分鐘膠體凝固後即可使用。

製膠完成後，倒入 1X TBE buffer 溶液蓋過玻璃作為電流流動之媒介，將 PCR 擴增後之產物加入後，先以 300 伏特之電壓進行約 15 分鐘(確認所加入之 PCR 產物溶液完全進入膠中)，再以 200 伏特之電壓進行 5 小時的電泳，完成後，將膠片以溴化乙啶(Ethidium bromide, EtBr)螢光染劑染色，染色搖晃約 20~25 分鐘，染色之後再以去離子水搖晃約 25~30 分鐘退染，退染後即可在紫外線燈下拍照紀錄每個個體的基因型。

### (三). 資料分析:

#### 1. 基因型的判別與量化

將PAGE的結果照相後存成電子檔，利用Gel-Pro Analyzer軟體依據照片上的ladder片段大小進行基因型分子量長度(bp)判讀，自動計算出電泳條帶大小，以50bp ladder為基準，每50bp為間隔。當樣本只呈現一條亮帶時，則判定該樣本為同型合子；有兩條亮帶時，則為異型合子。

## 2. 遺傳變異以及遺傳結構分析

利用Arlequin 3.6 (Excoffier et al., 2005)以及CERVUS 3.03 (Kalinowski et al., 2007)進行遺傳結構的分析以及 $PNE_{ID}$ 值之計算；項目有平均觀測異質度( $H_0$ )、平均期望異質度( $H_E$ )、分化指數( $F_{ST}$ )。平均觀測異質度( $H_0$ )是每個基因座中包含之異型合子個體(heterozygosity)在族群中實際所佔之比率。平均期望異質度( $H_E$ )則是根據哈溫定律所估算之期望值。

分化指數 $F_{ST}$ ，利用族群間基因上的差異，推估族群間的分化程度，其估算方式如下(Hudson, 1992)：

$$F_{ST}=1-(H_w/H_b)$$

$H_w$ 與 $H_b$ 分別為族群內與族群間平均之基因型差異，其中 $F_{ST}$ 代表族群間遺傳分化程度。 $F_{ST}$ 值的高低可表示不同分化程度；當族群分化程度 $F_{ST}<0.05$ ，表示族群間幾乎沒有遺傳分化，若 $0.05<F_{ST}<0.15$ 時，

表示族群間屬於中度分化，若 $F_{ST} > 0.15$ ，表示族群間屬於高度分化。

利用軟體Arlequin3.5以AMOVA(Analysis of molecular variance)計算樣本的基因變異來源，計算 $F_{ST}$ 和族群距離間的關係。

依據Wright (1931)所提出的島嶼模式之族群結構為基礎，族群分化指數 $F_{ST} = 1/(1+4Nm)$ ，故可以此推估基因交流程度 $Nm$ ，其中 $N$ 代表族群之有效族群量， $m$ 為個體的遷徙能力 (Slatkin, 1985)；若 $Nm$ 值等於1，表示此族群每一世代，有一個個體的交流，以抗衡因為基因漂變 (genetic drift)所失去的基因歧異度。

### 3. 族群結構分析

依照地理區或者各種人為方式的分群，雖然具有遺傳上的意義，但也會包含人為上的誤差。本實驗之研究以程式 STRUCTURE (Pritchard, 2000)從個體層面上分析樣本的基因差異，再從基因差異上的特徵進行模擬分群。利用 MCMC 法 (Markov Chain Monte Carlo) (Guo, 1992)計算其分群數的機率分佈。並從結果的可能性(likelihood)判斷該分群的可信度，選取合理的  $K$  值，最高之 Likelihood 值代表此  $K$  值分析的結果是最可信的，將結果繪成分群成份分析圖。

表一、牛樟殘材樣本族群之相關採樣與查扣資料。

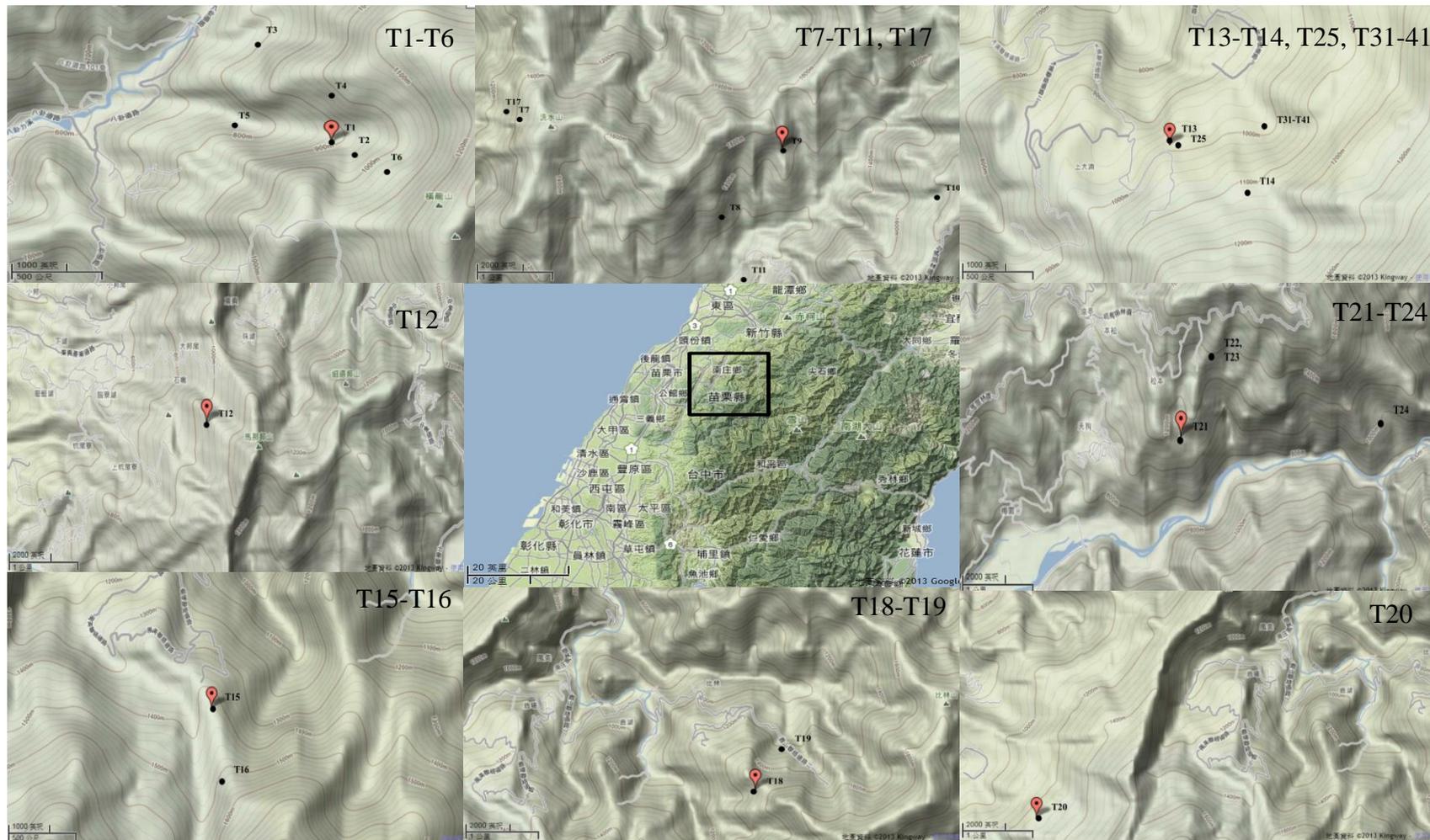
代碼	地點	查扣編號	查扣(採集)日期	二度分帶座標	經緯度
<b>查扣殘材</b>					
T1	大湖 16 林班	-	98、08、07	x245648,y2709377	120°57'25", 24°29'26"
T2	大湖 15 林班	81	100 年 9 月	x245727,y2710285	120°57'28", 24°29'56"
T3	大湖 15 林班	89	100 年 9 月	x245253,y2710009	120°57'11", 24°29'47"
T4	大湖 16 林班	240-226	98、02、06	x245648,y2709653	120°57'25", 24°29'35"
T5	大湖 16 林班	240-147	98、02、06	x245055,y2709495	120°57'04", 24°29'30"
T6	大湖 16 林班	T2-8	98、08、07	x245964,y2709061	120°57'36", 24°29'16"
T7	大湖 46 林班	-	101、01、18	x245390,y2703246	120°57'16", 24°26'07"
T8	大湖 53 林班	-	101、02、11	x247815,y2701711	120°58'42", 24°25'17"
T9	大湖 54 林班	-	98、07、26	x248767,y2702862	120°59'16", 24°25'55"
T10	大湖 58 林班	6	101、06、04	x250864,y2702227	121°00'30", 24°25'34"
T11	大湖 61 林班	-	98、07、28	x248088,y2700832	120°58'52", 24°24'49"
T12	大湖 67 林班	-	98、05、27	x240541,y2696142	120°54'24", 24°22'16"
T13	南庄 10 林班	7	101、05、15	x248028,y2712997	120°58'49", 24°31'24"
T14	南庄 10、13、14 林班	101-415-°-3	101 年 4~5 月	x248490,y2712687	120°59'06", 24°31'14"
T15	南庄 39 林班	-	101、05、04	x252563,y2713229	121°01'31", 24°31'31"
T16	南庄 39 林班	18	100、08、12	x252619,y2712718	121°01'33", 24°31'15"
T17	南庄 46 林班	-	101、01、18	x245390,y2703246	120°57'16", 24°26'07"
T18	南庄 48 林班	-	100、04、26	x255543,y2713744	121°03'16", 24°31'48"

代碼	地點	查扣編號	查扣(採集)日期	二度分帶座標	經緯度
T19	南庄事業區 48 林班	97-431-21	97、09、05	x256029,y2714314	121°03'34", 24°32'07"
T20	南庄分駐所領回	-	101、07、14	x249366,y2712875	120°59'37", 24°31'20"
T21	大安溪 28、29	9	99 年 1 月	x248914,y2698577	120°59'21", 24°23'35"
T22	大安溪 28、29	47	99 年 10 月	x249530,y2699477	120°59'43", 24°24'05"
T23	大安溪 28、29 林班	-	99 年 10 月	x249530,y2699477	120°59'43", 24°24'05"
T24	大安溪 28 林班	-	99、08、05	x251804,y2698719	121°01'04", 24°23'40"
T25	南庄事業區 10 林班	18	99、09、24	x248146,y2713000	120°58'54", 24°31'24"
T26	板橋	-	-	-	-
T27	未知	-	98、07、28	-	-
T28	未知	-	101、08、09	-	-
T29	未知	04、459	-	-	-
T30	未知	10、23	-	-	-
<b>現場殘材</b> T31-T41	南庄事業區 13 林班		-	x248733,y2713099	120°59'14", 24°31'27"
T42	竹東事業區 107 林班		102.05.03	x272769,y2727701	121°13' 29",24°39' 21"
T43	竹東事業區 107 林班		102.05.03	x272769,y2727701	121°13' 29",24°39' 21"
T44	竹東事業區 108 林班		102.05.03	x272769,y2727701	121°13' 29",24°39' 21"
T45	竹東事業區 108 林班		102.05.03	x272809,y2727573	121°13' 31",24°39' 17"
T46	竹東事業區 90 林班	399	102.05.14	x269331,y2726520	121°11' 27",24°38' 43"
T47	竹東事業區 90 林班	402	102.05.14	x269331,y2726520	121°11' 27",24°38' 43"
T48	竹東事業區 114 林班	452	102.04.02	x277835,y2729305	121°16' 30",24°40' 13"
T49	竹東事業區 114 林班	459	102.04.02	x277859,y2729290	121°16' 30",24°40' 13"

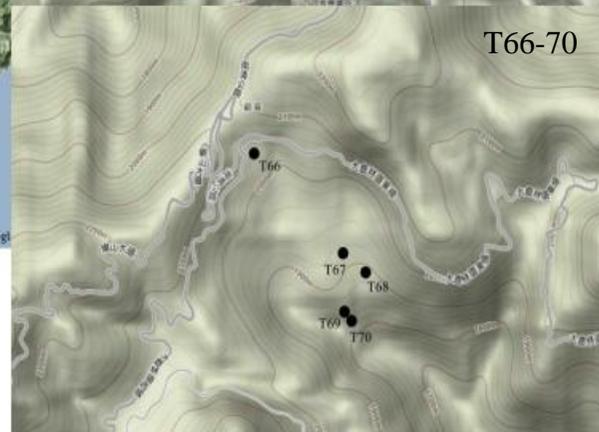
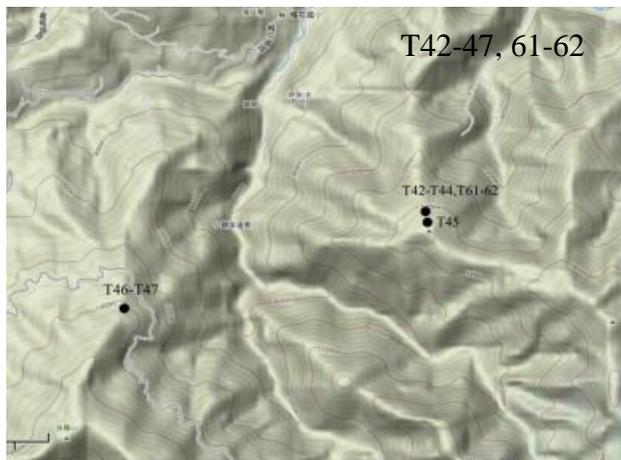
代碼	地點	查扣編號	查扣(採集)日期	二度分帶座標	經緯度
T50	竹東事業區 114 林班	460	102.04.02	x277859,y2729290	121°16' 30",24°40' 13"
T51	竹東事業區 114 林班	479	102.04.17	x277752,y2729537	121°16' 27",24°40' 21"
T52	竹東事業區 114 林班	481	102.04.17	x277752,y2729537	121°16' 27",24°40' 21"
T53	竹東事業區 114 林班	495	102.04.29	x277773,y2729442	121°16' 27",24°40' 18"
T54	五峰鄉清石產業道路	520	102.04.30	-	-
T55	五峰鄉清石產業道路	529	102.04.30	-	-
新鮮葉片 T56-T60	大湖工作站栽種植株 <sup>註1</sup>	-	-	-	-
T61	竹東事業區 107 林班	-	102.05.03	x272769,y2727701	121°13' 29",24°39' 21"
T62	竹東事業區 107 林班	-	102.05.03	x272769,y2727701	121°13' 29",24°39' 21"
T63	大安溪事業區第48林班	-	-	x261669,y2710894	121°6' 54", 24°30' 10"
T64	大安溪事業區第48林班	-	-	x261685,y2710893	121°6' 55",24°30' 15"
T65	大安溪事業區第48林班	-	-	x262235,y2710353	121°7' 14",24°29' 58"
T66	大安溪事業區第48林班	-	-	x 262220,y2710372	121°6' 55",24°30' 15"
T67	大安溪事業區第48林班	-	-	x 262242,y2710388	121°7' 14",24°29' 59"
T68	大安溪事業區第48林班	-	-	x 262359,y2710316	121°7' 18",24°29' 57"
T69	大安溪事業區第48林班	-	-	x 262254,y2710088	121°7' 15", 24°29' 49"
T70	大安溪事業區第48林班	-	-	x 262259,y2710059	121°7' 15",24° 9' 48"

註 1: T56-T62 為野外萌櫟 苗移植回大湖工作站栽種。

註 2: T31-T45 為野外採集之殘材。

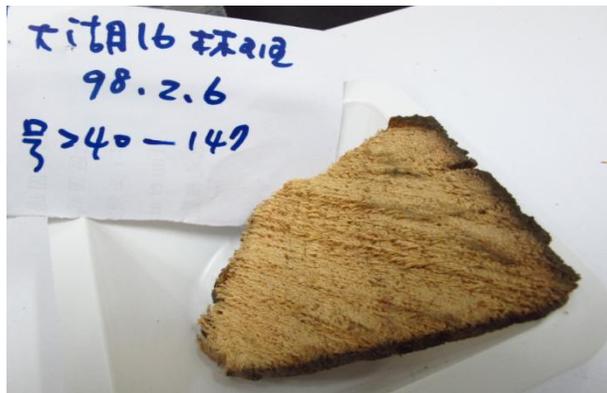


圖一、牛樟殘材樣本之採集點地圖。

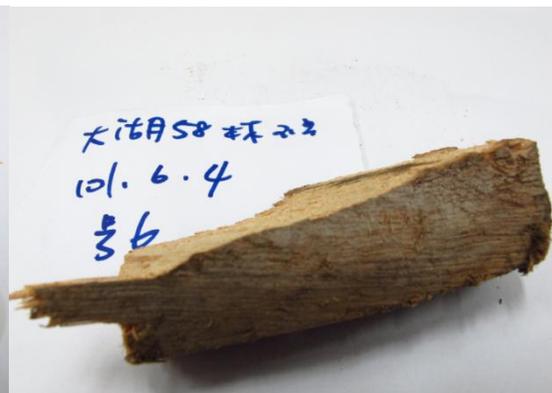


續圖 一

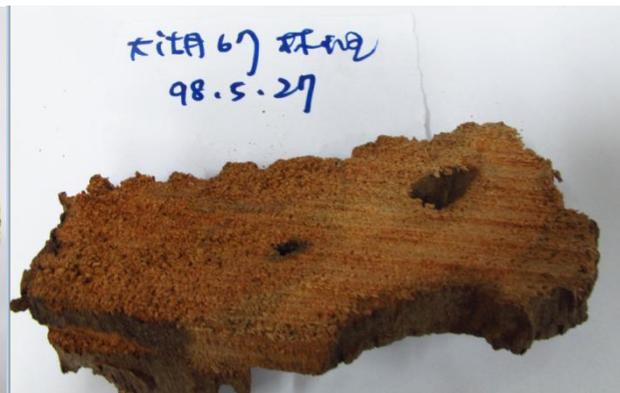
a) T5 樣本



b) T10 樣本



c) T12 樣本



d) T30 樣本



e) T31 樣本



f) T40 樣本



圖二、牛樟殘材樣本。

表二、研究所使用之 RAPD 引子序列。

Primer 名稱	序列 5'-3'	Primer 名稱	序列 5'-3'	Primer 名稱	序列 5'-3'
RAPD1	CGCCTGGACC	RAPD35	GATGGTAAGG	RAPD69	GAATTA AACG
RAPD2	CGCGTGGGAA	RAPD36	ATGAGTATCT	RAPD70	CTACTTATCT
RAPD3	GACTAACTGG	RAPD37	TTGCCAGTGG	RAPD71	CCTGTGCGGG
RAPD4	AGGTTGGCCC	RAPD38	AACACCTTGT	RAPD72	TCACCCAAGT
RAPD5	TTGCCACCTG	RAPD39	ATGGCGGCTT	RAPD73	GTGTTTTGAA
RAPD6	CCTGTCAATT	RAPD40	GTAAATCAGC	RAPD74	ACGGCAACAT
RAPD7	ATTGGGACGA	RAPD41	ATTCGTGTAG	RAPD75	CGTTCCGACG
RAPD8	GAATGAGGGC	RAPD42	GTTTCGTCCGT	RAPD76	AGCCTATGGG
RAPD9	TTTCGCCTTC	RAPD43	TTTAGCTACG	RAPD77	AACTGGTTTG
RAPD10	ATTACGTAAA	RAPD44	TAAGGTCGGG	RAPD78	TAACAACCTT
RAPD11	GCCGAGCGAC	RAPD45	ACTCATCCTC	RAPD79	GTGAAGTATG
RAPD12	AATGAGACCA	RAPD46	CATTTCCCGG	RAPD80	TAACAAACCG
RAPD13	CCCCATCCGC	RAPD47	GTTTTGGAGC	RAPD81	CTGCATGCGA
RAPD14	TATAATGAGT	RAPD48	GTGTGCTACG	RAPD82	CGTTATATTA
RAPD15	CGAATTAACA	RAPD49	GTAGCTCCAT	RAPD83	TTATTACTGG
RAPD16	GCCCCCGTTT	RAPD50	TTCATACAAG	RAPD84	TGTCGCACCC
RAPD17	CCAGACATTG	RAPD51	GGAAGATGGA	RAPD85	ATGAGTTAGG
RAPD18	AATGCAGGGA	RAPD52	CTCCGAGTCT	RAPD86	CTTCAGAGAA
RAPD19	GTGTGTTATC	RAPD53	ATGCAGGGGC	RAPD87	CTGCTGAGCC
RAPD20	ATGTCATTAG	RAPD54	ATACTACATT	RAPD88	ATGTTGGCCA
RAPD21	ACGCCCGCTA	RAPD55	GACAGCAGCA	RAPD89	TGTATCGAGG
RAPD22	CGGCATCCTT	RAPD56	CGGGATCCAC	RAPD90	GCTCATGTGC
RAPD23	ACTTTCTTCC	RAPD57	GCGAAAAGTC	RAPD91	CAGATGGATG
RAPD24	TTTCGGAGAA	RAPD58	GTGGACTTCG	RAPD92	ACCGTGAGTG
RAPD25	GCGGTTACGA	RAPD59	ACCAACATAC	RAPD93	TAATGACAAC
RAPD26	AGACTCTCGA	RAPD60	TTCTTAAAGC	RAPD94	ATTATTTGCG
RAPD27	TATGTACACA	RAPD61	GTGCTGAGGG	RAPD95	CCGACCCTGC
RAPD28	ACCGCGACTG	RAPD62	GGCTTAAAAT	RAPD96	AAACTGTGTA
RAPD29	GGATCTAGAC	RAPD63	TCCCGAAGAG	RAPD97	CTATATAAGG
RAPD30	TTGCCCATTC	RAPD64	GAAATCCTTA	RAPD98	AGGCTAGATA
RAPD31	TATCGCGAGA	RAPD65	ACATGCAACT	RAPD99	AGTCTACATA
RAPD32	GGTAACGTAC	RAPD66	TCCTGGGTGC	RAPD100	CGGTACAACA
RAPD33	TAACGGACGC	RAPD67	CCCACACAAA		
RAPD34	CCACATGATT	RAPD68	AGCAGGGGGC		

## 結果

### 一. DNA 濃度檢測:

本研究目前使用傳統 CTAB 方式進行 DNA 的萃取工作，以期望能萃取出 DNA。首先利用傳統 CTAB 方式進行殘材 DNA 部分，所採取的殘材位置主要採取接近靠近木頭外圍部分，如可區分出邊材部分，則取該部位進行實驗，其中針對 T30 樣本有進行邊材附近、心材附近殘材以及木屑分別進行 DNA 萃取，利用分光光度計偵測以及電泳確定 DNA 濃度時皆無法偵測到，顯示此方式萃取所得到的 DNA 可能濃度過低亦或者為零，至於葉片部分所萃取出來的 DNA 濃度約介於 9.12-833.5 ng/ $\mu$ L 之間(表二)，顯示新鮮葉片於快速乾燥後在萃取出來較為容易，且濃度較高，但對於殘材個體而言，其 DNA 濃度仍過低。此方式進行兩次試驗後，皆得到相似的結果，因此殘材部分則進一步參考 Asif and Cannon (2005)所建立之 CTAB 方式進行殘材中 DNA 萃取，同樣與傳統的方式結果一樣，利用分光光度計偵測以及電泳確定 DNA 濃度時，都呈現 DNA 濃度過低現象，在分光光度計中所得之數值皆為 0，顯示所萃取出來的 DNA 濃度相當低(表二)，因此為了進一步確認所取出的 DNA 濃度是否真正為零亦或者是濃度過低導致於儀器無法檢測出來，因此則進一步利用 Qubit<sup>®</sup> 2.0 螢光計

進行檢測(僅檢測 T1 至 T41 樣本)，此儀器具有高度的靈敏度，能檢測出 10 pg/ $\mu$ l 的 DNA 濃度，檢測後結果如表二，殘材樣本中共有 44% (18/41)能偵測出 DNA 濃度，其餘樣本約 56% (21/41)則濃度可能小於 10 pg/ $\mu$ l 以至於無法偵測出。其中針對 T30 樣本有進行木頭靠近外圍部分(邊材)、靠近內圍部分(心材)附近殘材以及木屑分別進行 DNA 萃取，結果發現靠近木頭外圍之部分具有較高的 DNA 濃度約 1.15 ng/ $\mu$ l，而內圍部分則略低約 0.42 ng/ $\mu$ l，木屑部分則應小於 10 pg/ $\mu$ l。由於本研究初期所萃取出 DNA 濃度均偏低，因此現階段則利用濃縮方式進行 DNA 萃取，其方式主要是將 3 管內含 1g 殘材粉末分別進行 DNA 萃取，並於最後過程將其混合濃縮，利用此方式所得到的殘材 DNA 濃度較高且僅需一般分光光度計則可偵測，其值介於 0.4-260.25 ng/ $\mu$ l，其中 T1、T2、T3、T30(內)的樣本 DNA 濃度低於 2 ng/ $\mu$ l，其他個體皆高於此數值，且大部分殘材樣本 DNA 濃度皆高於 10 ng/ $\mu$ l。此外利用多管濃縮方式顯示 T30 樣本靠近木頭外圍部分(邊材)具有較高的 DNA 濃度約 4.65 ng/ $\mu$ l，而靠近內圍部分(心材)則略低約 0.85 ng/ $\mu$ l，木屑部分則為 3.65 ng/ $\mu$ l。

表三. 利用分光光度計以及 Qubit 2.0 螢光計檢測樣本 DNA 濃度。

代碼	地點	O.D.(ng/μl)	Qubit 2.0 螢 光計(ng/μl)	O.D.(ng/μl) (多管濃縮)
殘材	T1 大湖 16 林班	0	6.72	1.15
	T2 大湖 15 林班	0	0.54	0.4
	T3 大湖 15 林班	0	0.592	0.85
	T4 大湖 16 林班	0	2.84	260.25
	T5 大湖 16 林班	0	0	16
	T6 大湖 16 林班	0	1.64	10.35
	T7 大湖 46 林班	0	0	19.25
	T8 大湖 53 林班	0	1.50	8.0
	T9 大湖 54 林班	0	0	24.25
	T10 大湖 58 林班	0	0.472	22.0
	T11 大湖 61 林班	0	2.22	26.5
	T12 大湖 67 林班	0	0	207.5
	T13 南庄 10 林班	0	0	15.65
	T14 南庄 10、13、14 林班	0	0	49.5
	T15 南庄 39 林班	0	0	8.85
	T16 南庄 39 林班	0	0.784	51.5
	T17 南庄 46 林班	0	0	31.5
	T18 南庄 46 林班	0	0	86.5
	T19 南庄事業區 48 林班	0	0.584	141.75
	T20 南庄分駐所領回	0	0	16.4
	T21 大安溪 28、29	0	3.32	44.25
	T22 大安溪 28、29	0	0	16.4
	T23 大安溪 28、29 林班	0	1.68	39.5
	T24 大安溪 28 林班	0	0	118
	T25 南庄事業區 10 林班	0	0	87.25
	T26 板橋	0	0	4.15
	T27 未知	0	0	62.75
	T28 未知	0	1.02	19.25
	T29 未知	0	6.08	45.75
	T30 未知 (內)	0	0.42	0.85
	(外)	0	1.15	4.65
	(木屑)	0	0	3.65
	T31 南庄事業區 13 林班	0	0	81.75
	T32 南庄事業區 13 林班	0	1.10	92.5

代碼	地點	O.D.(ng/μl)	Qubit 2.0 螢 光計(ng/μl)	O.D.(ng/μl) (多管濃縮)
T33	南庄事業區 13 林班	0	0	33.25
T34	南庄事業區 13 林班	0	0	12.05
T35	南庄事業區 13 林班	0	1.48	48.75
T36	南庄事業區 13 林班	0	0	4.4
T37	南庄事業區 13 林班	0	7.96	16.3
T38	南庄事業區 13 林班	0	0	8.15
T39	南庄事業區 13 林班	0	0	50
T40	南庄事業區 13 林班	0	0	41
T41	南庄事業區 13 林班	0	0	9.2
T42	竹東事業區 107 林班	-	-	243
T43	竹東事業區 107 林班	-	-	43.8
T44	竹東事業區 108 林班	-	-	20.5
T45	竹東事業區 108 林班	-	-	12.1
T46	竹東事業區 90 林班	-	-	18.3
T47	竹東事業區 90 林班	-	-	17.8
T48	竹東事業區 114 林班	-	-	8.2
T49	竹東事業區 114 林班	-	-	4.05
T50	竹東事業區 114 林班	-	-	37.5
T51	竹東事業區 114 林班	-	-	8.65
T52	竹東事業區 114 林班	-	-	42
T53	竹東事業區 114 林班	-	-	10.4
T54	五峰鄉清石產業道路	-	-	37
T55	五峰鄉清石產業道路	-	-	85.8
葉片 <sup>註1</sup>	T56 種植於大湖工作站植株 <sup>註2</sup>	10.74	9.12	-
	T57 種植於大湖工作站植株 <sup>註2</sup>	15.05	12.21	-
	T58 種植於大湖工作站植株 <sup>註2</sup>	13.55	10.84	-
	T59 種植於大湖工作站植株 <sup>註2</sup>	9.12	8.23	-
	T60 種植於大湖工作站植株 <sup>註2</sup>	16.58	13.12	-
	T61 竹東事業區 107 林班	1097.5	-	-
	T62 竹東事業區 107 林班	950.5	-	-
	T63 大安溪事業區第 48 林班	247.5	-	-
	T64 大安溪事業區第 48 林班	12.0	-	-
	T65 大安溪事業區第 48 林班	833.5	-	-
	T66 大安溪事業區第 48 林班	104.5	-	-

代碼	地點	O.D.(ng/μl)	Qubit 2.0 螢 光計(ng/μl)	O.D.(ng/μl) (多管濃縮)
T67	大安溪事業區第 48 林班	116.5	-	-
T68	大安溪事業區第 48 林班	101.0	-	-
T69	大安溪事業區第 48 林班	391.0	-	-
T70	大安溪事業區第 48 林班	428.0	-	-

註 1: 葉片部分則無利用多管濃縮方式。

註 2: T56-T62 為野外萌櫟苗移植回大湖工作站栽種。

註 3: T31-T45 為野外採集之殘材。

## 二. PCR 檢測 DNA 之品質:

保存過程較差的樣本往往會遇到的首要問題在於 DNA 的品質太差，主要由於樣本 DNA 常常會斷裂成小片段，即使有辦法萃取出 DNA，常因 DNA 斷裂成小片段而導至於後續相關的分子實驗較難進行。此外殘材樣本由於處於野外惡劣的環境樣本本身往往會有黴菌，細菌等微生物生長其中，為了確保所萃取出來的 DNA 內含牛樟 DNA 以及 DNA 本身品質，故進一步利用 PCR 方式來檢測。本研究則選用三段 DNA 標誌物進行檢測，分別為葉綠體 DNA 中的 *trnL-F* 片段、粒線體 DNA 中的核糖體 DNA 內轉錄間隔區(ITS) 以及細胞核核糖體 DNA 內轉錄間隔區進行檢測，其相關基本資料如表四。

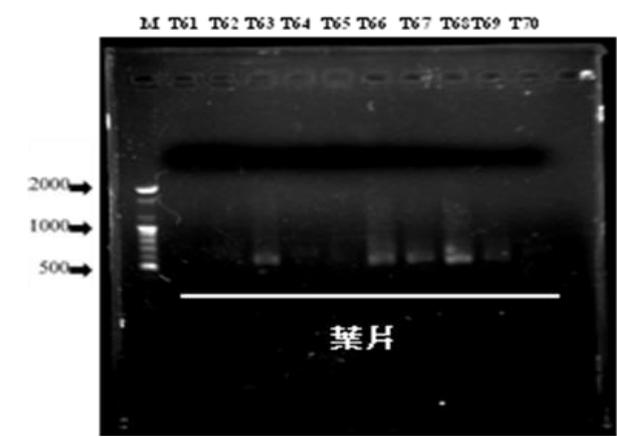
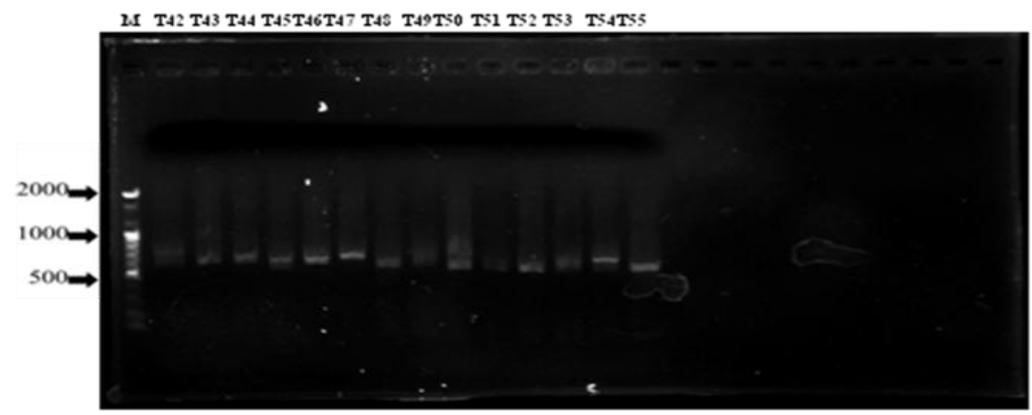
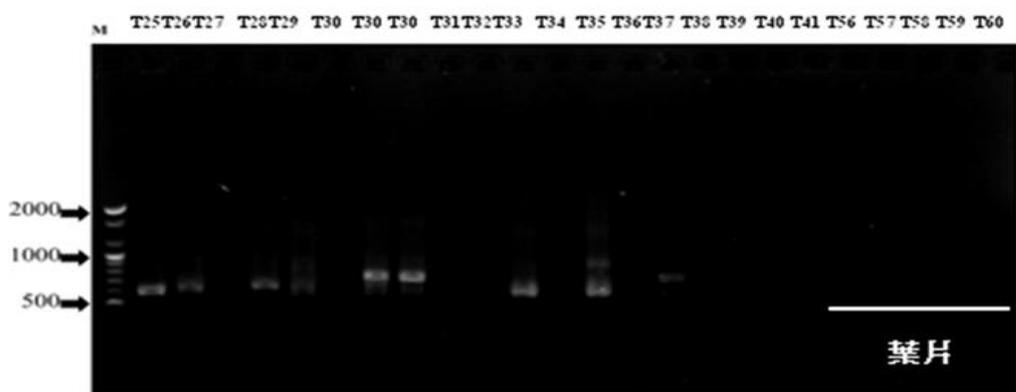
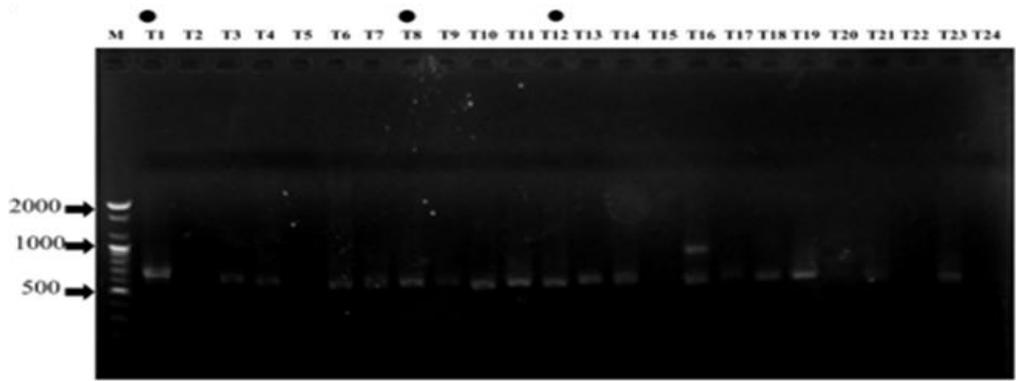
### 一. 細胞核 ITS 部分

在細胞核 ITS 部分,PCR 所得到結果顯示樣本中約有 62.9% (44/70) 個體有條帶，37.1% (36/70)無條帶，但是葉子樣本皆無條帶，但是在殘材樣本中雖然有 PCR 結果，但是條帶大小似乎沒有一致性(圖三)，這可能由於 ITS 引子的專一性不夠，為了確保殘材樣本中所擴增出之條帶，是否為牛樟之 ITS 片段，因此進一步進行 ITS 基因之選殖，其中共選三個個體進行後續基因選殖實驗，分別為 T1、T8 以及 T12，但是定序出來後於 NCBI 資料庫中進行比對發現三個個體內所擴增出

來的 ITS 片段，其中 T1 以及 T12 皆隸屬於 *Ascomycete* sp. (子囊菌綱物種)；然而 T8 則為 *leurostomophora richardsiae* (亦屬於子囊菌綱物種)，顯示殘材內具有許多真菌類生物生長其中，再加上此段 ITS 基因片段亦存在於真菌類以及細菌等微生物中，而且也相當容易以 PCR 反應擴增出來，因此干擾此片段 PCR 擴增之效率，未來如要利用此片段進行殘材中牛樟 DNA 品質檢測，則必須選用葉子樣本先進行該 ITS 基因的選殖，進一步設計適用的引子以增加專一性以及效率。

表四. 葉綠體、粒腺體以及細胞核 DNA 中所選用三個基因其引子資料、基因片段大小以及 PCR 反應時黏合溫度條件。

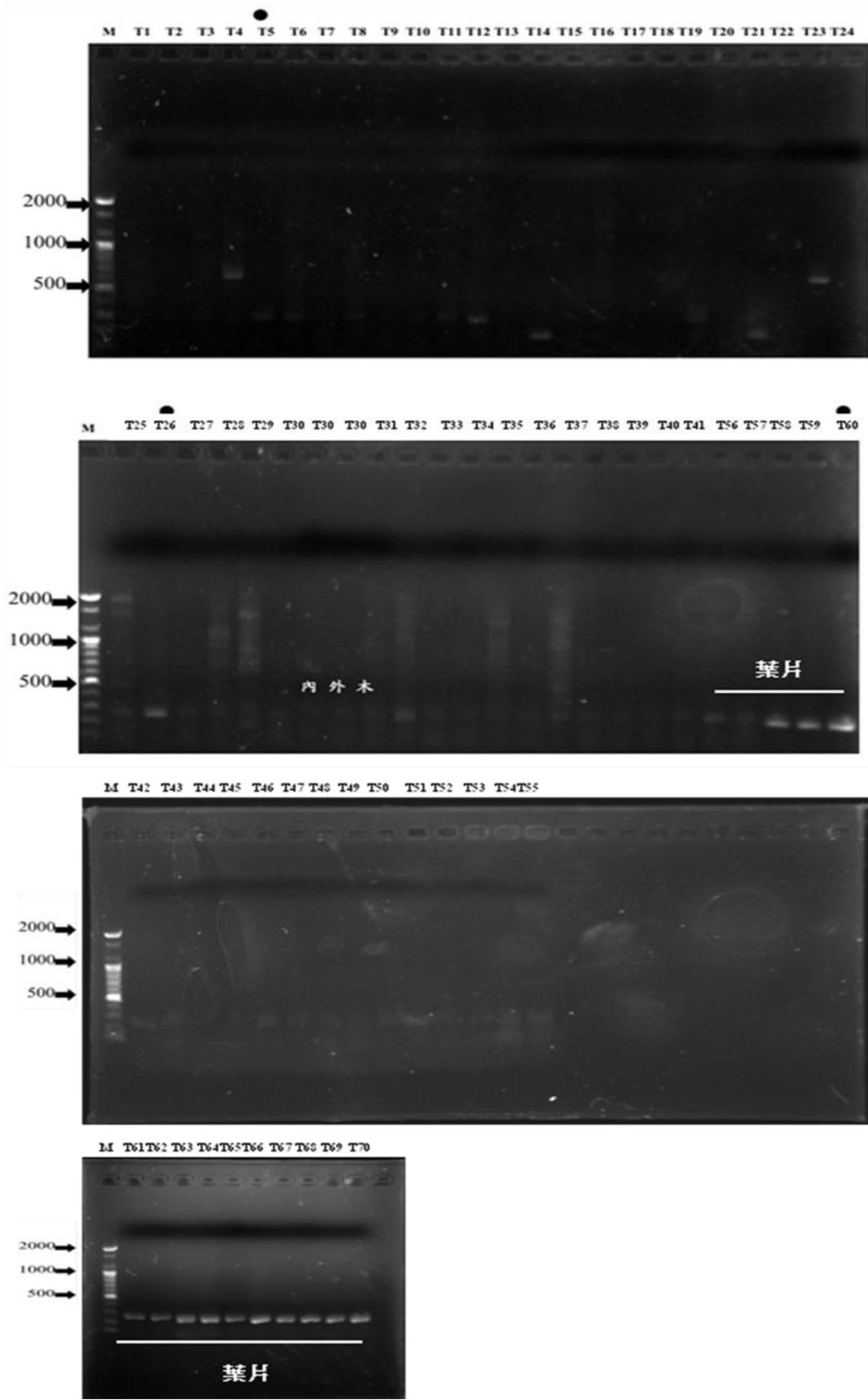
	基因名稱	序列	長度	黏合溫度 °C
葉綠體	<i>trnL</i> -F	F: CTATCCCCAATAAAAAGAA R: GCTATCCCGACCATTCCGGA	400 bp	51
粒腺體	Mito-ITS	F: GTGAAGTCGTAACAAGGTAGC R: TCGAGGTCGGAATGGGATCGG	250 bp	52
細胞核	ITS	F: GGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGG R: TCCTCCGCTATAATGATATGC	700 bp	50



圖三、細胞核 DNA 中 ITS 片段電泳膠圖。M:ladder, ●: 定序之個體。

## 二. 粒線體 DNA ITS 部分

然而在粒線體 DNA ITS 部分，PCR 所得到結果顯示樣本中約有 64.3% (45/70)個體有條帶，35.7% (25/70)無條帶，且所有葉子樣本中皆有條帶出現，其中 T58、T59 以及 T60 的條帶較為明顯，至於殘材樣本部分，雖然有 PCR 結果有非目標條帶出現的，但是大部分條帶皆座落在 200-300bp 左右，顯示相對於細胞核中 ITS 區域具有較高的一致性(圖四)，而且在葉子樣本中僅僅只有單一條帶出現，暗示著此條代即有可能為粒線體 DNA 中的 ITS 區域，為了進一步確認該條帶是否為粒線體 DNA 中的 ITS 區域，則進行基因選殖過程，其中選取 T5、T26、以及 T60 個體進行後續基因選殖，結果則知此片段正確長度為 240bp，定序後於 NCBI 資料庫中進行比對發現三個個體內所擴增出來的基因片段皆隸屬於植物的粒線體 DNA 的中 ITS 片段，T5、T26 以及 T60 三樣本經比對後與 *Daucus carota* subsp. *sativus* (紅蘿蔔)、*Carica papaya*(木瓜)、*Dunnia sinensis*(繡球茜)、*Oenothera berteriana*(月見草屬物種)等物序列相似度較高約 85%-100%，顯示 PCR 所擴增出的此片段為正確之粒線體 DNA 的 ITS 基因片段。後續將三個個體 DNA 片段進行比對是否有遺傳變異存在，經過 alignment 後顯示三個個體所得到之序列皆為一致，無變異存在(圖五)。



圖四、粒線體 DNA 中 ITS 片段電泳膠圖。M:ladder, ●: 定序之個體。

```

T5      GTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGTGGCTGGATTGAATCCTTCGCGATGGAAAT
T60     GTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGTGGCTGGATTGAATCCTTCGCGATGGAAAT
T26     GTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGTGGCTGGATTGAATCCTTCGCGATGGAAAT
*****
T5      GCCCTCTTCCATGGACCTGCAAGCACGTCGGGCCGAGTCAATGCTGAAAAGCCGTTGCTT
T60     GCCCTCTTCCATGGACCTGCAAGCACGTCGGGCCGAGTCAATGCTGAAAAGCCGTTGCTT
T26     GCCCTCTTCCATGGACCTGCAAGCACGTCGGGCCGAGTCAATGCTGAAAAGCCGTTGCTT
*****
T5      GCTTGGGCCGAGTAATAAAAAAAAAAAGAGTTCCATTTTCCTTCTTGTTCATCAATCGGAAA
T60     GCTTGGGCCGAGTAATAAAAAAAAAAAGAGTTCCATTTTCCTTCTTGTTCATCAATCGGAAA
T26     GCTTGGGCCGAGTAATAAAAAAAAAAAGAGTTCCATTTTCCTTCTTGTTCATCAATCGGAAA
*****
T5      GAAAGAGAAACCGGGCACTACGGTGAGACGTGAAAACACCCGATCCCATTCCGACCTCGA
T60     GAAAGAGAAACCGGGCACTACGGTGAGACGTGAAAACACCCGATCCCATTCCGACCTCGA
T26     GAAAGAGAAACCGGGCACTACGGTGAGACGTGAAAACACCCGATCCCATTCCGACCTCGA
*****

```

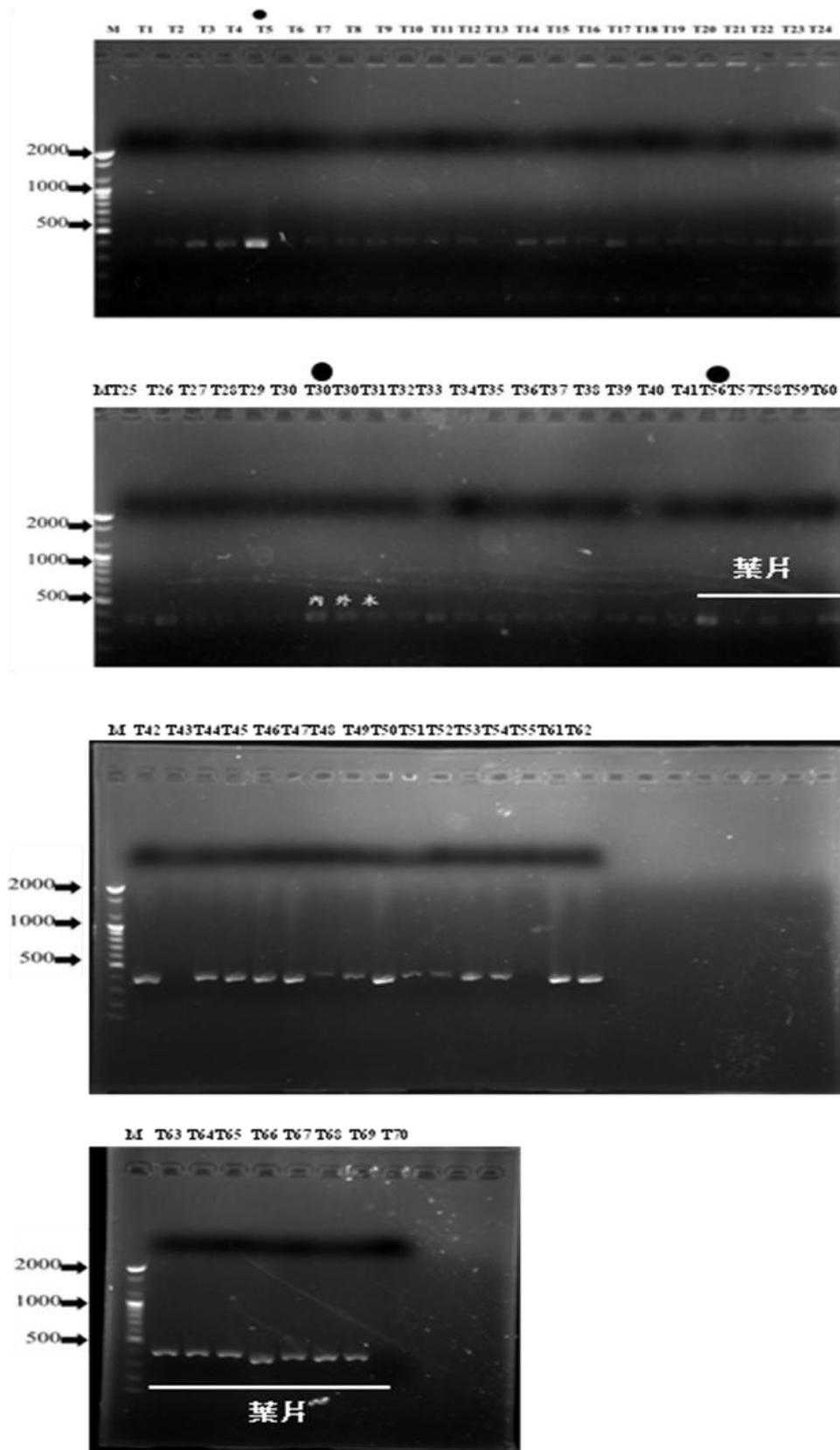
圖五、粒線體 DNA 中 ITS 片段定序全長，以及 T5、T26 以及 T60

樣本 alignment 後結果(\*表序列一致)。

### 三. 葉綠體的 *trnL-F* 部分

然而在葉綠體的 *trnL-F* 部分，PCR 所得到結果顯示樣本中約有 90.0%(63/70)個體有條帶，10.0%(7/70)無條帶，另外幾乎所有葉子樣本中皆有條帶出現 (T70 個體除外)，至於殘材樣本部分，相對於粒線體 DNA 中 ITS 片段的 PCR 所擴增結果，此片段具有較高擴增效率，幾乎所有個體皆有條帶出現，條帶大小皆座落在 350-400bp 左右，與所預期之大小一致 (圖六)，而且在所有擴增出來的樣本中都僅僅只有單一條帶出現，暗示著此條帶即有可能為葉綠體 DNA 中的 *trnL-F* 區域，同樣為了進一步確認該條帶是否為葉綠體 DNA 中的 *trnL-F* 區域，則進行基因選殖過程，其中選取 T5、T30、以及 T42 個體進行後續基因選殖，結果則知此片段長度為 346bp，定序出來後於 NCBI 資料庫中進行比對發現三個個體內所擴增出來的基因片段皆隸屬於葉綠體 DNA 中的 *trnL-F* 區域，樣本中 T5、T30 以及 T56 三個個體經比對後與 NCBI 資料庫中的牛樟(*Cinnamomum kanehirae*)的資料有比對上，其相似度較高約 100%，然而於其他樟科物種 *Neolitsea aciculata* 相似度則有 99%，顯示 PCR 所擴增出的此片段確定為葉綠體 DNA 中的 *trnL-F* 區域。同樣的後續將三個個體 DNA 片段進行比對是否有遺傳變異存在，經過 alignment 後顯示三個個體所得到之序列皆為一致 (圖七)。另外與 NCBI 資料庫中所存在之牛樟該基因片段進行比對發

現，所定序出來的 T5、T30、以及 T42 序列與 EU338495 、EU338499 序列一致，可能顯示此片段具較低的傳變異以及較高度保守，故較適合用來檢測殘材中是否具有牛樟 DNA 分子。



圖六、葉綠體 DNA 中 *trnL-F* 片段電泳膠圖。M:ladder，●: 定序之個體。

```

T56      -----TGCATCGCCCTATTAGAGGACTGGGGTCTATGTCAATTAA
EU338495_cpD  ACTATCCCGACCATTCCGGATGCATCGCCCTATTAGAGGACTGGGGTCTATGTCAATTAA
T30      -----TGCATCGCCCTATTAGAGGACTGGGGTCTATGTCAATTAA
T5       -----TGCATCGCCCTATTAGAGGACTGGGGTCTATGTCAATTAA
EU338499_cpF  GCTATCCCGAGCATTCCGGATGCATCGCCCTATTAGAGGACTGGGGTCTATGTCAATTAA
          *****

T56      AGAAACCCCAAAAGTCTTACAAAATCTTACCTAGGCCTTGGAGTTTCTTGGATCTTCAA
EU338495_cpD  AGAAACCCCAAAAGTCTTACAAAATCTTACCTAGGCCTTGGAGTTTCTTGGATCTTCAA
T30      AGAAACCCCAAAAGTCTTACAAAATCTTACCTAGGCCTTGGAGTTTCTTGGATCTTCAA
T5       AGAAACCCCAAAAGTCTTACAAAATCTTACCTAGGCCTTGGAGTTTCTTGGATCTTCAA
EU338499_cpF  AGAAACCCCAAAAGTCTTACAAAATCTTACCTAGGCCTTGGAGTTTCTTGGATCTTCAA
          *****

T56      AAGAAGACTTTGTCAGTGTAAAGTAATGATATGGACTGTGAATTATTTAATAATGGAAA
EU338495_cpD  AAGAAGACTTTGTCAGTGTAAAGTAATGATATGGACTGTGAATTATTTAATAATGGAAA
T30      AAGAAGACTTTGTCAGTGTAAAGTAATGATATGGACTGTGAATTATTTAATAATGGAAA
T5       AAGAAGACTTTGTCAGTGTAAAGTAATGATATGGACTGTGAATTATTTAATAATGGAAA
EU338499_cpF  AAGAAGACTTTGTCAGTGTAAAGTAATGATATGGACTGTGAATTATTTAATAATGGAAA
          *****

T56      TTCCTTGCCATATATGTTTCATTTGTAAGTATATCGTATCTATAGACTTGTGATAAGAGA
EU338495_cpD  TTCCTTGCCATATATGTTTCATTTGTAAGTATATCGTATCTATAGACTTGTGATAAGAGA
T30      TTCCTTGCCATATATGTTTCATTTGTAAGTATATCGTATCTATAGACTTGTGATAAGAGA
T5       TTCCTTGCCATATATGTTTCATTTGTAAGTATATCGTATCTATAGACTTGTGATAAGAGA
EU338499_cpF  TTCCTTGCCATATATGTTTCATTTGTAAGTATATCGTATCTATAGACTTGTGATAAGAGA
          *****

T56      GAAAGGTTTCTGTCCGGATCCGTTTGTGAAAGAGTAGAGTGAATAAGAAACATAACTAAT
EU338495_cpD  GAAAGGTTTCTGTCCGGATCCGTTTGTGAAAGAGTAGAGTGAATAAGAAACATAACTAAT
T30      GAAAGGTTTCTGTCCGGATCCGTTTGTGAAAGAGTAGAGTGAATAAGAAACATAACTAAT
T5       GAAAGGTTTCTGTCCGGATCCGTTTGTGAAAGAGTAGAGTGAATAAGAAACATAACTAAT
EU338499_cpF  GAAAGGTTTCTGTCCGGATCCGTTTGTGAAAGAGTAGAGTGAATAAGAAACATAACTAAT
          *****

T56      TTGGAACCGATGACGAAATAAAGAGGTTAGGTAGTAAAACGGGCTCTTTTCTTTTATTG
EU338495_cpD  TTGGAACCGATGACGAAATAAAGAGGTTAGGTAGTAAAACGGGCTCTTTTCTTTTATTG
T30      TTGGAACCGATGACGAAATAAAGAGGTTAGGTAGTAAAACGGGCTCTTTTCTTTTATTG
T5       TTGGAACCGATGACGAAATAAAGAGGTTAGGTAGTAAAACGGGCTCTTTTCTTTTATTG
EU338499_cpF  TTGGAACCGATGACGAAATAAAGAGGTTAGGTAGTAAAACGGGCTCTTTTCTTTTATTG
          *****

T56      GGGATA-
EU338495_cpD  GGGATAG
T30      GGGATA-
T5       GGGATA-
EU338499_cpF  GGGATAG
          *****

```

圖七、葉綠體 DNA 中 *trnL-F* 片段定序全長，以及與 EU338495、EU338499 進行 alignment 後結果(\*表序列一致)。

### 三. 微衛星 DNA 之選殖結果:

微衛星 DNA 之選殖部分，本研究主要依據 Hsu et al. (2004) 所提之方式進行選殖，此方是主要先利用 RAPD 方式先進行植物基因體片段的隨機擴增，在此階段，共選用 100 組 RAPD 引子進行基因體片段的隨機擴增，其詳細引子序列如表二，將 PCR 所得之所有片段進行轉殖，並選取所有轉殖成功之菌株，進行後續相關實驗，共選取 1000 個菌株，檢視所轉殖片段是否具有微衛星 DNA 片段，確定載體是否成功轉入大腸桿菌中 DNA 片段，主要是利用下列微衛星 DNA 片段與載體內引子進行 PCR 反應，以偵測是否上述菌落中具有  $(AC)_8$ 、 $(AG)_8$ 、 $(TC)_8$ 、 $(TG)_8$ 、 $(AAG)_6$ 、 $(AGC)_6$ 、 $(GCT)_6$  以及  $(GTT)_6$  的微衛星 DNA 基因座片段。

實驗共選殖出 15 組具有多型性的微衛星 DNA 片段(表五)，分別為 Cik3、Cik5、Cmi-AC-31、Cmi-AG-51、Cmi-AC-54、Cmi-AG-60、Cmi-AG-100、Cmi-AG-108、Cmi-AG-113、Cmi-AG-147、Cmi-AG-159、Cmi-AC-179、Cmi-AC-198、Cmi-AG-221 以及 Cmi-AC-269，其重複序列模式分別為， $(GAA)_6(GCA)_8\dots(GA)_{12}$ 、 $A_6(GAAAA)_4$ 、 $(GA)_{17}$ 、 $(GA)_{18}$ 、 $(GA)_{16}$ 、 $(TC)_{16}$ 、 $(TC)_{17}$ 、 $(CT)_{14}(GT)_3(GC)_6(GT)$ 、 $(CT)_{16}$ 、 $(AG)_{24}$ 、 $(AG)_{16}$ 、 $(CCT)_4(CT)_7(GT)_8$ 、 $(TC)_{15}$ 、 $(TC)_{13}(AC)_6$  以及  $(CT)_{26}$ ，由其重複模式可以看出主要的重覆

模式以(GA)以及(TC)為最主要，大部分重複模式屬於完美重複 (perfect repeats)，其中有四組微衛星 DNA 片段屬於複合型重複 (compound repeats)。選殖出 15 組具有多型性的微衛星 DNA 片段其長度大小多介於 108-248bp，另外 PCR 反應時黏合溫度介於 48-59.5 °C，以 Cik3 溫度最低，Cmi-AG-54 溫度最高，其詳細資料如表五所示。

表五、牛樟微衛星 DNA 基因座之引子序列以及長度。

基因座		引子序列	重複序列	黏合溫度 °C	長度
Cik3	F	AGGCAGTGAAATTCCTAAAA	(GAA) <sub>6</sub> (GCA) <sub>8</sub> ...(GA) <sub>12</sub>	48	200-234
	R	GCACCCCACTCCCTTAAATA			
Cik5	F	GGAGGCAAGGTGATGAGAGA	A <sub>6</sub> (GAAAA) <sub>4</sub>	57	198-220
	R	GGTGCACCGGACATCTAAG			
Cmi-AC-31	F	ACTTGGGCCATGTATGTTTG	(GA) <sub>17</sub>	50	128-162
	R	AACCAAAGTGAAGTTGTTGG			
Cmi-AG-51	F	TGTTTTGGTTCAGAGGGTGG	(GA) <sub>18</sub>	58.5	108-140
	R	AAGGCCAAAGGGCATCTCTC			
Cmi-AC-54	F	TCAGTGAGCTCTACTGTTGG	(GA) <sub>16</sub>	59.5	204-210
	R	AAAGCTGTCCCTGGGTAATC			
Cmi-AG-60	F	GGGTCTGCAAATCTGAACAG	(TC) <sub>16</sub>	58	176-206
	R	TACATTGAGATGGGCGTGAG			
Cmi-AG-100	F	CCATCTAGAATCAAGGAGTG	(TC) <sub>17</sub>	54	170-178
	R	TAACCTTCCCTTGCAATAGG			
Cmi-AG-108	F	ATTAGTTGGTACACACAAGG	(CT) <sub>14</sub> (GT) <sub>3</sub> (GC) <sub>6</sub> (GT)	55	168-212
	R	CCAAGTATGCAACTGAATTC			
Cmi-AG-113	F	ATCATGCCCTCATTGCATTC	(CT) <sub>16</sub>	58	120-148
	R	AGCAGCACAGTGACATAAG			
Cmi-AG-147	F	TTCAATATTCCTCACTCAAC	(AG) <sub>24</sub>	54	152-160
	R	TGCGAGTTCAGTCATGAAAG			
Cmi-AG-159	F	GTTTGCCTATGACACATCG	(AG) <sub>16</sub>	58.5	174-186
	R	ACTCTTCCCTTTCCAATC			
Cmi-AC-179	F	ATCTGATGGCCTTTGGGAAC	(CCT) <sub>4</sub> (CT) <sub>7</sub> (GT) <sub>8</sub>	50	178-192
	R	AGCTGCTATGACAAGTCTCC			
Cmi-AC-198	F	TGCTTCAGGTACATGTCAG	(TG) <sub>16</sub>	55.8	160-196
	R	AAAGGGAAGTTGGTGGCAAC			
Cmi-AG-221	F	ATTAGAATGAAAGGGGAGGC	(TC) <sub>13</sub> (AC) <sub>6</sub>	50	222-248
	R	AGAGGTCAAAGCAAATCCAG			
Cmi-AC-269	F	ATTACATAGTCAACCCACAG	(CT) <sub>26</sub>	50	140-174
	R	AGTTCACGTTGTTTCATCAG			

本研究所選殖出的 15 組具有多型性的微衛星 DNA 片段皆能順利擴增出包括殘材以及葉子的樣本(表六)，本研究利用 15 組微衛星 DNA 檢測 70 個樣本，其中葉片樣本微衛星 DNA 片段的成功率如下，Cik3 成功率為 100%、Cik5 成功率為 33.3%、Cmi-AC-31 成功率為 53.3%、Cmi-AG-51 成功率為 100%、Cmi-AC-54 成功率為 73.3%、Cmi-AG-60 成功率為 100%、Cmi-AG-100 成功率為 100%、Cmi-AG-108 成功率為 100%、Cmi-AG-113 成功率為 73.3%、Cmi-AG-147 成功率為 93.3%、Cmi-AG-159 成功率為 100%、Cmi-AC-179 成功率為 100%、Cmi-AC-198 成功率為 93.3%、Cmi-AG-221 成功率為 100%以及 Cmi-AC-269 成功率為 100%，葉片樣本部分以 Cik5 成功率最低。

殘材樣本微衛星 DNA 片段的成功率如下，Cik3 成功率為 90.0%、Cik5 成功率為 64.3%、Cmi-AC-31 成功率為 90.0%、Cmi-AG-51 成功率為 100%、Cmi-AC-54 成功率為 92.7%、Cmi-AG-60 成功率為 94.5%、Cmi-AG-100 成功率為 89.1%、Cmi-AG-108 成功率為 98.2%、Cmi-AG-113 成功率為 74.5%、Cmi-AG-147 成功率為 98.2%、Cmi-AG-159 成功率為 100%、Cmi-AC-179 成功率為 92.7%、Cmi-AC-198 成功率為 98.2%、Cmi-AG-221 成功率為 100%以及 Cmi-AC-269 成功率為 98.2%，其中以 Cik5 以及 Cmi-AG-113 成功率最低。將所有

樣本(葉片以及殘材)計算平均成功率，以 Cmi-AG-51、Cmi-AG-159 以及 Cmi-AG-221 的 100% 成功率最高，以 Cik5 最低、Cmi-AG-113 次低，其餘微衛星 DNA 片段成功率皆大於 85% (表六)，從上述結果顯示這 15 組微衛星 DNA 片段在牛樟樣本中都有相當高的反應成功率。

表六、牛樟微衛星 DNA 基因座之 PCR 反應成功率。

基因座	成功率		
	葉片	殘材	總和
Cik3	15/15 (100%)	49/55 (89.1%)	63/70 (90.0%)
Cik5	5/15 (33.3%)	41/55 (74.5%)	45/70 (64.3%)
Cmi-AC-31	8/15 (53.3%)	55/55 (100%)	63/70 (90.0%)
Cmi-AG-51	<b>15/15 (100%)</b>	<b>55/55 (100%)</b>	<b>70/70 (100%)</b>
Cmi-AC-54	11/15 (73.3%)	51/55 (92.7%)	62/70 (88.6%)
Cmi-AG-60	15/15 (100%)	52/55 (94.5%)	67/70 (95.7%)
Cmi-AG-100	15/15 (100%)	49/55 (89.1%)	64/70 (91.4%)
Cmi-AG-108	15/15 (100%)	54/55 (98.2%)	69/70 (98.6%)
Cmi-AG-113	11/15 (73.3%)	41/55 (74.5%)	52/70 (74.3%)
Cmi-AG-147	14/15 (93.3%)	54/55 (98.2%)	68/70 (91.4%)
Cmi-AG-159	<b>15/15 (100%)</b>	<b>55/55 (100%)</b>	<b>70/70 (100%)</b>
Cmi-AC-179	15/15 (100%)	51/55(92.7%)	66/70 (94.3%)
Cmi-AC-198	14/15(93.3%)	54/55 (98.2%)	68/70 (97.1%)
Cmi-AG-221	<b>15/15 (100%)</b>	<b>55/55 (100%)</b>	<b>70/70 (100%)</b>
Cmi-AC-269	15/15 (100%)	54/55 (98.2%)	69/70 (98.6%)

#### 四.15 組微衛星基因座遺傳歧異度分析:

本實驗研究使用 15 組微衛星 DNA 基因座引子(表 5),利用高解度的聚丙烯醯胺膠(PAGE)定出序列長度之後(圖八),將所得的原始數據輸入 ARLEQUIN3.6 進行遺傳變異集結構分析,並且列出 15 組基因座的對偶基因數(Number of Alleles)、異型合子觀測值( $H_o$ )以及異型合子期望值( $H_e$ )。而由表七可以知道 15 組引子當中以 Cmi-AC-31 的對偶基因數目(Alleles)最高,有 12 個對偶基因,最低的則為 Cik5 以及 Cmi-AC-54,只有 4 個對偶基因,平均 6.800 個對偶基因,若從異型合子觀測值( $H_o$ )來看,最高為 Cmi-AG-51 以及 Cmi-AG-108 的 1.00000,最低為 Cmi-AC-179 的 0.07353,平均異型合子觀測值( $H_o$ )為 0.49670。異型合子期望值( $H_e$ )來看,最高為 Cmi-AG-113 的 0.81451,最低為 Cmi-AC-198 的 0.42769,平均異型合子期望值( $H_e$ )為 0.69729。從上述結果顯示牛樟除了 Cik3、Cik5、Cmi-AG-147、Cmi-AC-179 以及 Cmi-AC-269 大部分個體為同型合子之外,其他基因座均有較高之異型合子比例,其中 Cmi-AG-51、Cmi-AG-60、Cmi-AG-108、Cmi-AG-159 以及 Cmi-AG-221 其異型合子觀測值(0.88571-1.00000)大於異型合子期望值(0.72840-0.81398),其餘基因座則異型合子觀測值小於異型合子期望值。

所有牛樟個體樣本,依據採集地點共分為大湖、南庄、大安溪以

及竹東事業區等四個族群，在此四個族群的比較（表八），各族群之對偶基因介於 3.733-4.200，其中以大安溪事業區最低，南庄地區最高；異型合子觀測值則介於 0.44460-0.50630，其中以南庄地區最低，竹東事業區最高；異型合子預測值則介於 0.56375-0.65313，其中以竹東事業區最低，大湖地區最高。可以發現所有族群異型合子觀測值皆小於異型合子預測值。在自交系數  $F_{IS}$  評估部分顯示所有數值皆為正值，介於 0.070863 與 0.303224 之間，整體估算亦顯示  $F_{IS}$  為正值 (0.220357) 且顯著，顯示牛樟族群交配模式可能偏向近親交配。

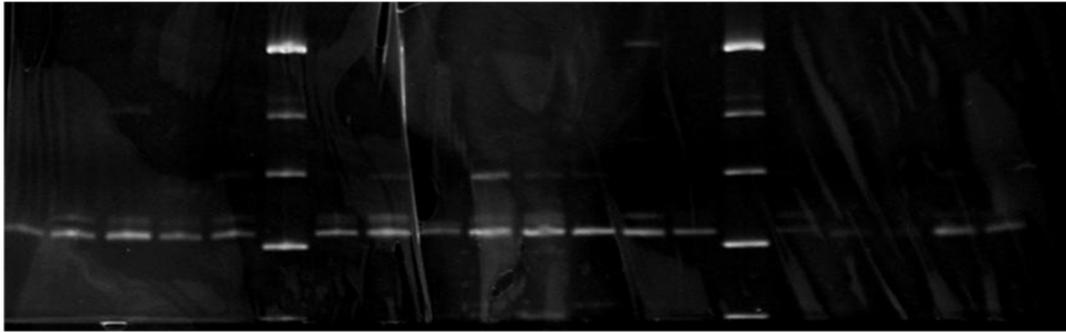
接著將殘材以及葉片樣本分開計算(表九)，顯示殘材中的對偶基因數目為 5.600 大於葉片的對偶基因數目 4.113，但是殘材樣本的異型合子觀測值 0.50347 約略大於葉片樣本的異型合子觀測值 0.47243。其中殘材部分顯示各族群之對偶基因介於 2.267-4.200，其中以大安溪事業區最低，南庄地區最高；異型合子觀測值則介於 0.44460-0.59409，其中以南庄地區最低，竹東事業區最高；異型合子預測值則介於 0.51238-0.62964，其中以大安溪事業區最低，南庄地區最高。其中竹東事業區以及大安溪事業區之異型合子觀測值大於異型合子預測值，其餘族群則皆小於異型合子預測值。在自交系數  $F_{IS}$  評估部分顯示除大湖與南庄地區為正值外其餘族群皆為負值，整體估算亦顯示  $F_{IS}$  為正值(0.28871)且顯著，顯示牛樟族群交配模式可能偏向

近親交配。

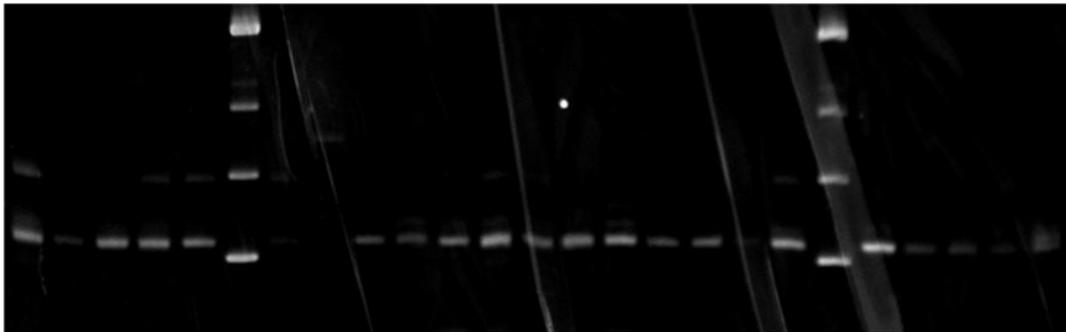
葉片部分顯示各族群之對偶基因介於 1.133-2.467，其中以竹東事業區最低，大安溪事業區最高；異型合子觀測值則介於 0.46269-0.56666，其中以大安溪事業區最低，竹東事業區最高；異型合子預測值則介於 0.33333-0.46713，其中以竹東事業區最低，大安溪事業區最高。其中大湖地區以及竹東事業區之異型合子觀測值大於異型合子預測值。在自交系數  $F_{IS}$  評估部分顯示大安溪事業區族群皆為正值，其餘族群為負值，整體估算亦顯示  $F_{IS}$  為正值(0.19976)且顯著，顯示牛樟族群交配模式可能偏向近親交配。

在族群分化指數 ( $F_{ST}$ ) 上 (表十)，顯示大部分族群間分化程度多屬於低度分化介於 0.06564-0.10564，其中以竹東事業區與大安溪分化程度最高為 0.10564。同時亦利用 SAMOVA 程式來計算最佳的分群(表十一)，其分群結果如下，分為(大安溪)(大湖，南庄)(竹東事業區)等三大分群，顯示大湖以及南庄地區遺傳組成較為相近，與大安溪以及竹東事業區遺傳組成較不相似。同時利用 STRUCTURE 軟體分析族群組成，利用程式 STRUCTURE2.3.1 分析之 likelihood 值與  $\Delta K$  值，在  $K=4$  時  $\Delta K=5.838647$  為最大值， $K=9$  時  $\Delta K=2.863922$  則次之，因此這次研究採用  $K=4$  與 9 進行分析與討論(圖九)， $K=4$  時亦可以發現大湖以及南庄兩族群遺傳組成上較為相近，另外與大安溪以及竹東

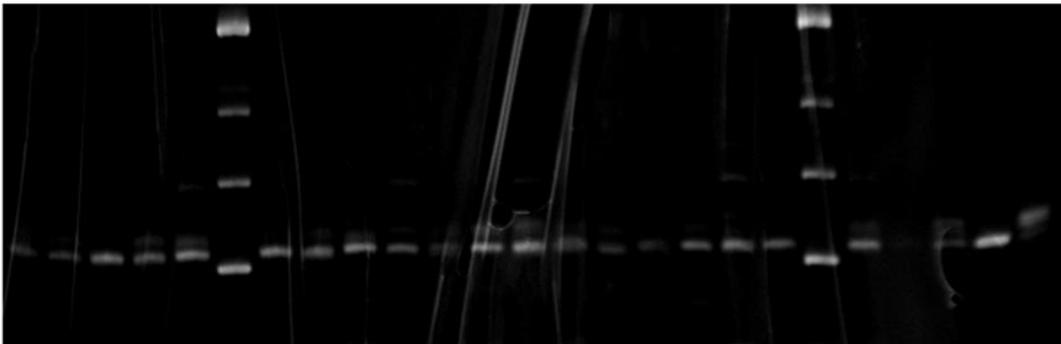
事業區的遺傳組成較遠，這樣的結果與利用 SAMOVA 程式分析呈現一致，亦可發現在所分析的四個族群中以竹東事業區基因型較為獨特。在  $K=9$  時顯示研究所分群的 4 個族群中仍具有亞族群結構存在，如大湖族群則可再細分為 4 個不同亞族群結構等，大安溪以及竹東事業區仍具有比較獨特之基因組成。



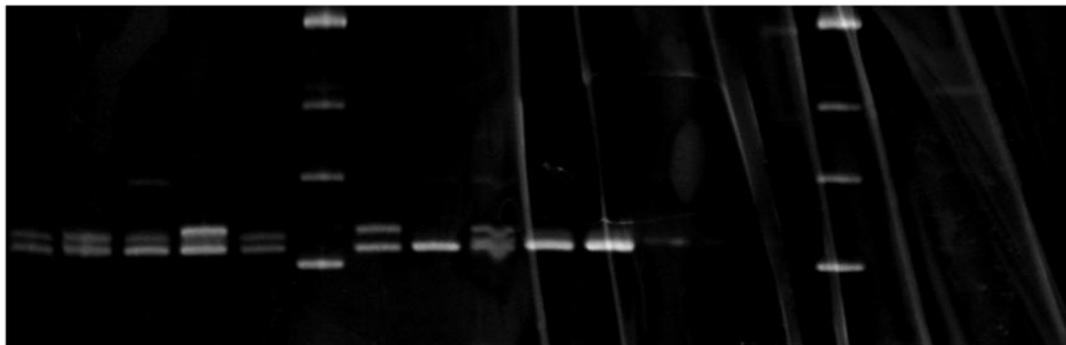
T1 T2 T3 T4 T5 M T6 T7 T8 T9 T10 T11 T12 T13 M T14 T15 T16 T17 T18



T19 T20 T21 T22 T23 M T24 T25 T26 T27 T28 T29 T30 T30 T30 T31 T32 T33 T34 M T35 T36 T37 T38 T39



T40 T41 T42 T43 T44 M T45 T46 T47 T48 T49 T50 T51 T52 T53 T54 T55 T56 T57 M T58 T59 T60 T61 T62



T63 T64 T65 T66 T67 M T68 T69 T70

圖八、微衛星 DNA 基因座 Cmi-AC-198 片段聚丙烯醯胺膠之電泳膠圖。

表七、15 組基因座的對偶基因數( $A$ )、異型合子觀測值( $H_o$ )、異型合子期望值( $H_e$ )。

基因座	對偶基因數 ( $A$ )	異型合子觀測值 ( $H_o$ )	異型合子期望值 ( $H_e$ )
Cik3	8	0.13636	0.69223
Cik5	4	0.10417	0.50197
Cmi-AC-31	12	0.28571	0.71937
Cmi-AG-51	7	1.00000	0.78419
Cmi-AC-54	4	0.31250	0.61565
Cmi-AG-60	7	0.92647	0.75011
Cmi-AG-100	5	0.59091	0.78314
Cmi-AG-108	8	1.00000	0.72840
Cmi-AG-113	8	0.52727	0.81451
Cmi-AG-147	5	0.11594	0.67259
Cmi-AG-159	5	0.91667	0.77807
Cmi-AC-179	5	0.07353	0.61471
Cmi-AC-198	6	0.42029	0.42769
Cmi-AG-221	8	0.88571	0.81398
Cmi-AC-269	10	0.15493	0.76276
平均值	6.800±2.274	0.49670±0.36232	0.69729±0.11411

表八、牛樟族群之對偶基因數(A)、異型合子觀測值( $H_o$ )、異型合子期望值( $H_e$ ) 以及自交系數( $F_{IS}$ )。

族群	對偶基因數 (A)	異型合子觀 測值( $H_o$ )	異型合子期 望值( $H_e$ )	自交系 數 $F_{IS}$
大湖	4.067	0.48897	0.65313	0.25618*
南庄	4.200	0.44460	0.62964	0.30322*
大安溪	3.733	0.47585	0.60875	0.25115*
竹東事業區	4.000	0.50630	0.56375	0.07086
<b>全部</b>	<b>6.800</b>	<b>0.49670</b>	<b>0.69729</b>	<b>0.07583*</b>

\* $P < 0.05$

表九、牛樟將其分為殘材以及葉片之族群對偶基因數(A)、異型合子觀測值( $H_o$ )、異型合子期望值( $H_e$ ) 以及自交系數( $F_{IS}$ )。

族群	對偶基因 數(A)	異型合子 觀測值 ( $H_o$ )	異型合子 期望值 ( $H_e$ )	自交系數 $F_{IS}$
<b>殘材</b>	<b>5.600</b>	<b>0.50347</b>	<b>0.67534</b>	<b>0.28871*</b>
大湖	3.067	0.48384	0.56686	0.13578
南庄	4.200	0.44460	0.62964	0.30322*
大安溪	2.267	0.53332	0.51238	-0.09095
竹東事業區	3.600	0.59409	0.54056	-0.02384
<b>葉片</b>	<b>4.133</b>	<b>0.47243</b>	<b>0.61244</b>	<b>0.19976*</b>
大湖	2.067	0.48666	0.45228	-0.04607
大安溪	2.467	0.46269	0.46713	0.17801
竹東事業區	1.133	0.56666	0.33333	-0.19444*

\* $P < 0.05$

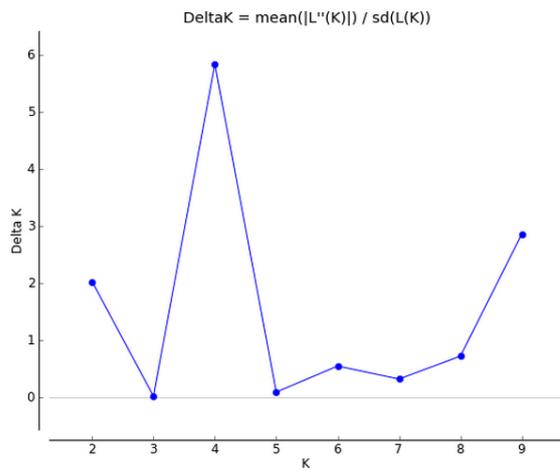
表十、根據微衛星 DNA 估算之牛樟遺傳分化指數 ( $F_{ST}$ )。

	大湖	南庄	大安溪	竹東事業區
大湖	0.00000			
南庄	0.07084	0.00000		
大安溪	0.08690	0.09457	0.00000	
竹東事業區	0.06973	0.06564	0.10564	0.00000

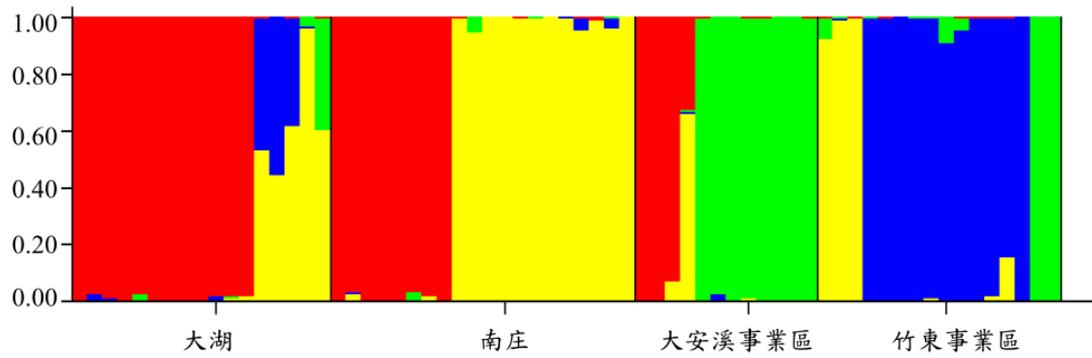
表十一、SAMOVA 程式之族群最佳分群分析。

分群	族群	$F_{CT}$	P
2	(大湖, 南庄, 大安溪)(竹東事業區)	0.38095	0.00000
3	(大安溪)(大湖, 南庄)(竹東事業區)	0.42370	0.00000

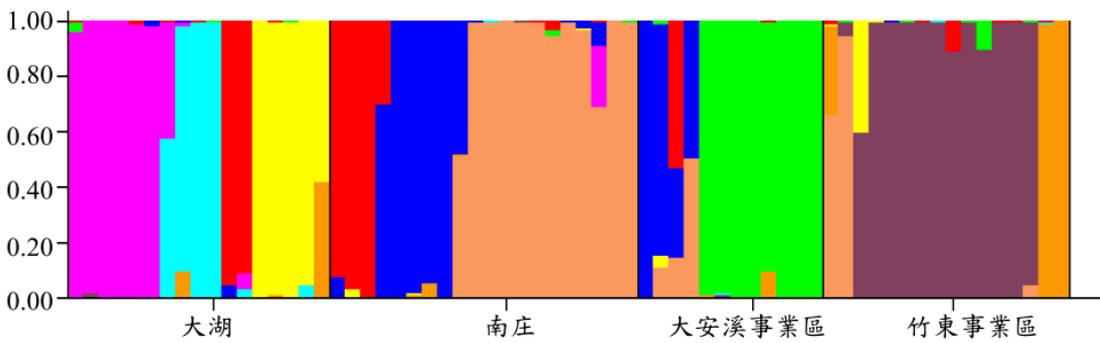
a)



b)



c)



圖九、STRUCTURE2.3.1 程式分析之結果。a)  $\Delta K$  值; b)  $K=4$  時所模擬之族群遺傳結構分析圖; c)  $K=8$  時所模擬之族群遺傳結構分析圖。

## 五.微衛星 DNA 之基因型鑑定:

將所有樣本所的微衛星DNA片段基因型分析，檢視15組微衛星DNA片段在所有樣本中是否具有相同基因型或者具有個體特異性，雖然並非所有個體的在15組微衛星DNA片段皆能得到反應結果，其中只有Cmi-AG-51、Cmi-AG-159以及Cmi-AG-221的100%成功率，以Cik5最低、Cmi-AG-113次低，其餘微衛星DNA片段成功率皆大於85% (表六)，並且利用Cervus 3.03軟體進行non-exclusion probability of identity (PNE<sub>ID</sub>)計算，顯示其值為 $5.47 \times 10^{-14}$ ，代表當有 $5.47 \times 10^{14}$ 個體時才有顯示兩個不同個體具有相同的基因型，這樣的機率顯示此15組微衛星DNA可以用來進行個體鑑定。其中若將PCR反應成功率較低的兩組微衛星DNA基因座Cik5以及Cmi-AG-113剔除，計算non-exclusion probability of identity (PNE<sub>ID</sub>)，顯示其值為 $2.56 \times 10^{-12}$ ，顯示兩個不同個體具相同基因型的機率仍將當低只有 $2.56 \times 10^{-12}$ ，仍可達到個體鑑定之目的。從基因型鑑定的結果(表十二)得知所有樣本中皆具有獨特的基因型，其中只有C30-1、C30-2、C30-3基因型相同，由於其為來至同一樣本，只是進行不同部位DNA萃取分析，故顯示相同基因型。雖然並非所有個體在所有基因座上皆能得到結果，但是結果得知所有樣本中皆具有獨特的基因型，故在未來上利用微衛星

DNA片段進行個體鑑定應具有可行性。

表十二、牛樟衛星 DNA 不同之基因座在個體所顯現之基因型。(I~XII 表示同一基因座之不同基因型，?表 missing 資料)。

個體/基因型	Cik3	Cik5	AC 31	AG51	AC54	AG60	AG100	AG108	AG113	AG147	AG159	AC179	AC198	AG221	AC 269
T1	V	II	II	I	VII	III	?	III	VIII	II	V	II	IV	VIII	III
T2	V	II	IV	I	IV	III	I	III	IX	II	V	II	IV	VIII	III
T3	V	II	II	I	IV	III	I	III	VIII	II	V	II	IV	VIII	IV
T4	V	II	II	I	IV	III	I	III	VIII	III	V	?	IV	VIII	IV
T5	V	II	II	I	IV	III	I	III	IX	III	V	II	IV	VIII	V
T6	V	II	I	I	II	III	I	III	IV	III	V	II	IV	VIII	V
T7	V	II	III	II	II	III	III	III	VIII	III	V	II	IV	VIII	?
T8	V	II	III	II	V	V	III	III	IX	III	III	III	I	VIII	V
T9	V	II	III	II	V	V	III	III	IX	III	V	III	IV	VII	V
T10	V	II	IV	II	II	V	III	I	IX	III	V	III	IV	VII	IV
T11	V	IV	I	II	VII	V	III	III	V	III	VI	III	I	VII	VI
T12	V	I	II	II	III	V	III	III	V	?	VI	III	IV	VII	IV
T13	V	I	IV	II	III	V	III	III	V	II	VI	III	I	VII	VI
T14	V	I	I	II	III	V	III	III	V	II	II	III	I	VII	IV
T15	V	I	I	I	III	V	III	III	V	II	II	III	I	IX	VI
T16	V	IV	I	I	IV	V	?	III	V	VI	II	III	I	III	IV
T17	V	IV	I	I	IV	III	?	III	V	II	II	III	I	IV	V

個體/基因型	Cik3	Cik5	AC 31	AG51	AC54	AG60	AG100	AG108	AG113	AG147	AG159	AC179	AC198	AG221	AC 269
T18	V	I	I	I	IV	III	I	III	V	II	VI	III	I	IV	VII
T19	V	IV	I	I	IV	?	III	III	IV	II	VI	II	V	IV	VII
T20	V	I	II	I	IV	III	?	III	IV	II	II	II	I	V	V
T21	V	I	I	I	IV	III	?	III	IV	II	II	II	V	IV	X
T22	V	I	III	I	VI	?	?	III	IV	II	II	II	V	IV	IV
T23	V	I	III	I	III	III	V	III	XI	II	VI	III	V	V	IV
T24	V	I	?	III	IV	III	V	III	X	III	II	II	?	IV	IV
T25	V	I	II	III	IV	VII	V	III	VI	III	VI	II	?	IV	XI
T26	V	I	II	III	IV	III	V	III	X	III	VI	II	II	IV	III
T27	V	I	II	III	IV	III	V	III	X	III	II	II	II	IV	III
T28	V	I	II	III	VII	III	V	III	X	III	VI	II	I	IV	III
T29	V	III	V	III	IV	III	V	III	XII	III	VI	II	I	IV	III
T30(内)	V	I	III	III	IV	II	VII	V	XII	III	VI	II	I	IV	III
T30(外)	V	I	III	III	IV	II	VII	V	XII	III	VI	II	I	IV	III
T30(木)	V	I	III	III	IV	II	VII	V	XII	III	VI	II	I	IV	III
T31	V	I	II	III	VII	II	VII	V	?	III	VI	II	I	V	III
T32	IV	II	II	III	VII	II	VII	V	?	III	II	II	I	V	III
T33	IV	II	II	III	IV	II	VII	V	?	III	II	III	I	V	III
T34	IV	I	III	III	IV	III	VII	V	?	III	IV	III	I	V	III
T35	IV	I	VI	III	VII	III	VII	V	?	I	IV	II	I	V	III
T36	IV	I	?	III	IV	III	VII	V	?	I	IV	II	I	V	IV

個體/基因型	Cik3	Cik5	AC 31	AG51	AC54	AG60	AG100	AG108	AG113	AG147	AG159	AC179	AC198	AG221	AC 269
T37	IV	I	II	III	II	III	VII	V	?	I	IV	II	I	V	V
T38	IV	II	V	III	II	III	VII	V	?	I	IV	II	I	V	V
T39	IV	II	V	III	II	III	VII	III	?	I	IV	II	III	V	IV
T40	IV	II	V	III	II	III	VII	V	?	I	IV	II	I	V	IV
T41	IV	I	II	III	II	III	VII	V	XI	I	II	II	III	V	IV
T42	III	?	VIII	III	II	III	VII	V	?	I	IV	III	I	IV	VI
T43	?	?	III	III	II	III	VII	V	XI	I	III	?	III	IV	V
T44	?	?	III	III	VI	IV	VII	III	IV	I	III	?	III	IV	IV
T45	?	?	XI	I	IV	IV	VII	III	IX	II	III	III	I	V	IV
T46	VI	?	III	I	IV	IV	VII	III	VII	II	III	III	I	V	IV
T47	?	?	VII	I	VI	IV	VII	III	VII	II	III	III	I	VIII	IV
T48	VII	?	VII	I	?	IV	VII	III	III	II	III	III	I	VIII	IV
T49	?	?	XI	III	?	IV	VII	III	III	?	III	III	I	VIII	IV
T50	?	?	X	III	?	IV	VII	III	IV	II	II	III	III	VIII	IV
T51	VII	?	XII	III	VI	IV	VII	III	?	II	II	III	III	VIII	XII
T52	VII	?	III	IV	IV	IV	VII	III	?	II	II	?	I	VIII	V
T53	VII	?	VI	IV	IV	IV	VII	III	XI	II	II	IV	I	VII	V
T54	VII	?	III	IV	?	V	VII	III	XI	II	II	III	I	VII	V
T55	VII	?	III	IV	VII	V	VII	?	XI	II	II	III	I	VIII	V
T56	IV	I	III	IV	VII	VI	VI	III	?	I	II	II	I	VI	III
T57	IV	I	?	IV	VII	VI	VI	III	VI	II	II	II	I	IV	III

個體/基因型	Cik3	Cik5	AC 31	AG51	AC54	AG60	AG100	AG108	AG113	AG147	AG159	AC179	AC198	AG221	AC 269
T58	IV	I	?	III	VII	V	I	III	VI	II	II	II	III	IV	III
T59	VIII	I	?	III	?	V	III	III	?	I	III	II	?	IV	III
T60	VIII	I	?	III	?	IV	I	II	IV	I	II	II	III	IV	III
T61	III	?	VIII	III	?	IV	IV	II	IX	I	I	III	I	?	V
T62	III	?	XII	III	?	I	IV	II	IV	V	I	III	VI	?	V
T63	II	?	III	III	VII	IV	I	IV	?	IV	I	I	III	I	I
T64	II	?	III	III	VII	IV	I	IV	IX	IV	II	V	III	I	I
T65	I	?	III	III	VII	IV	II	IV	III	IV	I	I	III	I	I
T66	II	?	III	III	III	IV	I	VI	I	III	I	V	IV	I	I
T67	II	?	III	III	VII	IV	III	IV	?	?	I	I	III	I	II
T68	II	?	?	III	IV	IV	I	IV	II	IV	VI	V	IV	I	I
T69	I	?	?	III	I	IV	I	IV	II	IV	VI	V	I	II	IX
T70	II	?	?	III	II	IV	I	IV	IX	IV	I	V	III	II	VIII

## 討論

### 一.殘材 DNA 萃取以及品質之檢測:

本研究殘材樣本多處在野外惡劣的環境中，易造成 DNA 分子斷裂成小片段，進而使後續分子實驗難以進行，因此本研究首要任務必須確保能於殘材中萃取出濃度高與品質皆高的 DNA，這樣才能以利後續相關分子實驗之進行。本研究主要採取傳統 CTAB 方式(Doyle and Doyle, 1987)進行 DNA 萃取，此方式應用於葉片 DNA 萃取較無問題，但是在殘材 DNA 萃取部分則面臨濃度過低的問題，因此為了解決此濃度過低之問題，則進一步利用多管濃縮方式並採取 Asif and Cannon (2005) 所修飾過後之 CTAB 方式進行 DNA 萃取，結果顯示相對於單管 DNA 萃取，採用多管濃縮汁方式可得到較高濃度的殘材 DNA 濃度(表三)，但是仍有少部分個體 DNA 濃度略低，如:T2、T3、T30(內)的樣本，其 DNA 濃度低於 2 ng/ $\mu$ l，未來於實驗中若遇此種情形將可再增加濃縮 DNA 的管數(>3 管)以期得到較高濃度之 DNA，此外亦有針對殘材外圍部分(邊材)以及內圍部分(心材)進行 DNA 萃取，結果顯示外圍部分 DNA 濃度上約略高於內圍部分，Rachmayanti et al. (2009)曾針對 20 多物種進行木頭 DNA 萃取以及品質檢測之研究，顯示大部分的物種其邊材部分較容易萃取 DNA 且品質較好，然

而本研究亦顯示靠近邊材部分 DNA 濃度略大於靠近心材部分，統合上述結果於未來牛樟殘材 DNA 萃取建議採取接近靠近木頭外圍部分，如可區分出邊材部分，則取該部位進行 DNA 萃取，以期能得到較高濃度的 DNA 分子。

保存過程較差的樣本往往會遇到的首要問題在於 DNA 的品質太差，主要由於樣本 DNA 常常會斷裂成小片段，即使有辦法萃取出 DNA，常因 DNA 斷裂成小片段而導至於後續相關的分子實驗較難進行。此外殘材樣本由於處於野外惡劣的環境樣本本身往往會有黴菌，細菌等微生物生長其中，為了確保所萃取出來的 DNA 內含牛樟 DNA 以及品質較好的 DNA 分子，故進一步利用 PCR 方式來檢測。本研究則選用三段 DNA 標誌物進行檢測，分別為葉綠體 DNA 中的 *trnL-F* 片段、粒線體 DNA 中的核糖體 DNA 內轉錄間隔區(ITS) 以及細胞核核糖體 DNA 內轉錄間隔區，從上述三個不同遺傳標誌物分析結果顯示，其中所選用的粒線體 DNA ITS 以及葉綠體 DNA 中的 *trnL-F* 基因片段較適合在未來進行殘材樣本相關分子鑑定分析時，先用來檢測所萃取出之 DNA 中是否具有牛樟 DNA 分子，其中主要以 *trnL-F* 基因片段為最佳選擇。然而細胞核核糖體 DNA 內轉錄間隔區不適合做為檢測所萃取出之 DNA 中是否具有牛樟 DNA 分子，最主要的原因在於所萃取的 DNA 中亦含微生物之 DNA，因此無法有效用細胞核的

分子標誌物檢測。故未來利用 PCR 方式檢測牛樟 DNA 分子可彌補利用分光光度計以及螢光計僅能測量濃度之缺點，而無法得知是否真正具有目標物種之 DNA 分子，此外雖然所萃取出 DNA 因殘材樣本保存環境惡劣，因此造成萃取出 DNA 含量以及品質較低，但是從 PCR 結果得知在較短片段的基因標誌物選殖過程中，仍可利用 PCR 技術擴增出來，亦確保未來利用微衛星 DNA 進行分子鑑定之可行性，主要微衛星 DNA 片段大小多介於 100-300bp 之間，亦是屬於短片段的遺傳標誌物，故應可以順利擴增微衛星 DNA 片段，進行後續遺傳資料庫之建立，然而 Rachmayanti et al. (2009) 的研究亦支持短片段 DNA 較易利用 PCR 技術擴增出來。

## 二. 分子指紋在牛樟保育工作的可行性:

近年來分子生物學蓬勃發展，提供了學者生物學的嶄新視野，並解決過往許多困擾生物學者的棘手問題，在物種親緣的研究上，系統分類學者以分子序列如 DNA、蛋白質等遺傳物質，因源來自於共同祖先之同源特徵，重建物種親緣並顯現物種演化的歷史(Graur and Li, 2000)，另外在分子技術的快速發展如聚合酵素連鎖反應(PCR)技術、基因選殖(cloning)及分子定序技術(sequencing)的成熟等，也使得分子生物學成為生物學的主流之一，而分子技術如隨機擴增多型性 DNA(RAPD)、限制性片段長度多形性 DNA(RFLP)、增擴片段長度多形性 DNA(AFLP)、同功酵素(isozyme)和微衛星 DNA(microsatellite DNA)等多被用於研究物種親緣或族群遺傳研究(Goldstein and Schlötterer, 1999)，其中根據 DNA 序列之片段多型性所發展出來之分子指紋技術(DNA fingerprinting)更被廣泛利用及重視。

分子標誌物亦被廣泛用於醫學分析和刑事案件。在大多數情況下，皆可以準確的識別 DNA 的來源，例如血緣鑑定，也因為分子標誌物的準確性高，近年來植物和動物應用分子標誌物的研究也迅速增加(Rachmayanti et al., 2009, Jolivet and Degen, 2012)，森林擁有豐富的生物資源，其大多數樹種的遺傳變異跟其他生物體比較是較高的，森

林基因多樣性是最豐富的生物群體，但由於近年來因氣候變遷，全球暖化的影響，造成全球的生物多樣性降低，尤其是在開發中國家為了經濟利益林木開採情況特別嚴重，造成森林的基因多樣性逐漸減少。所以分子標記之應用在未來對於林木的保育具有很高的重要性，其中更相信可以在木材的貿易及盜採上提供一個準確的證據。分子指紋技術廣泛應用於生物保育上，目前使用率最高的是微衛星 DNA(Microsatellite DNA)，主要是因具高度的解析力及變異性的特性，可尋找出同一物種但不同植株間的 DNA 片段，亦即所謂的"個體間差異"，由於上述所提及的物種遺傳特性因某些因素下有所差異而產生不同的性狀，如同人類的指紋，在區別差異後建立相關資料庫，可供以後資料比對之用，近年來台灣森林的植株屢遭山老鼠嚴重的盜採，常常使野外的族群數量減少，這樣會危害該物種的生存如:玉山國家公園內的野生愛玉子等物種。相信若藉由建立分子指紋資料庫後便可了解採集來源，故可有效遏止非法盜採，更可提供以後物種種源之保育。

本研究亦使用此分子指紋技術來進行分析。微衛星 DNA (microsatellite DNA)，又稱為 simple sequence repeats (SSRs)，早在 1970 年即被發現並因普遍存在於各類生物體遺傳訊息中而隨即受到重視，而在 1991 年第一次從植物基因體中篩選出微衛星 DNA

(Weising et al. 1991; Beyermann et al. 1992)，在研究初期，一般認為和動物基因組相比較，其在植物體基因組中豐富度較低，但近年來隨著研究技術成熟、相關資料豐富，證實在植物基因組之豐富度較原先預測來的高 (Candle et al. 2000; Morgante et al. 2002)，微衛星 DNA 是由 1-6 個核苷酸組成之重複序列，在動物基因體中最常見之重複序列主要為 (A)<sub>n</sub>、(CA)<sub>n</sub> 及其互補股 (Aitman et al. 1991; Beckmann and Weber, 1992; Jurka and Pethiyahoda 1995)，在植物基因體中則為 (A)<sub>n</sub>、(AT)<sub>n</sub>、(GA)<sub>n</sub> 及 (GAA)<sub>n</sub> (Cardle et al. 2000; Morgante et al. 2002 Toth et al. 2000)，而在植物葉綠體基因組中則常見 (A)<sub>n</sub> 或 (T)<sub>n</sub> 單一重複序列 (Powell et al. 1995a; 1995b)。Wang et al. (2009) 亦選殖 *Intsia palembanica* (Leguminosae) 微衛星 DNA 以暨能用來追蹤此物種木頭的來源是否有來自於不合法的伐木區的個體。Lowe et al. (2010) 亦利用微衛星 DNA 來檢測 *Intsia palembanica* 木材的來源，發現其中 27 個樣本可能來自於非法的伐木區。Jolivet and Degen (2012) 亦利用為衛星 DNA 來探討 *Entandrophragma cylindricum* 物種的伐木來源，是否有非法伐木的情形發生。

根據上述研究可以得知，只要能夠順利解決從木材中萃取之 DNA 之問題，微衛星基因座則可有效的對於木材的來源或個體進行辨識，牛樟殘材以及木頭可用於培養牛樟芝，因此具有高度的經濟價值，導

致野外非法採伐的問題日益嚴重，因此本研究針對牛樟殘材進行微衛星基因座的篩選，共篩選 15 組微衛星基因座，主要的重覆模式以(GA)以及(TC)為最主要，大部分重複模式屬於完美重複 (perfect repeats)，且利用表十二可以得知，本研究所有 70 個個體不論葉片或殘材樣本不同之個體均擁有獨特之基因型 (表十二)，雖然並非所有個體在所有基因座中皆能進行 PCR 以及個體基因型判定，主要是由於殘材 DNA 的品質無法一致，故導致此種現象，但依此研究結果顯示仍可以達到個體鑑定之目的。從本研究、Wang et al. (2009) 以及 Lowe et al. (2010)證實林木之木頭以及殘材等組織亦可利用分子指紋應用之可行性，藉由微衛星 DNA 所建構之分子指紋資料將可分辨牛樟殘材或葉片不同個體以及族群。

物種個體間不管在型態上或遺傳組成方面是具有獨特表現形及基因型，藉由此特性，不同微衛星基因座所累積個體間遺傳變異可明確且快速以電泳膠條帶區分，以不同微衛星 DNA 差異建立專屬於個體之分子身份證，獨特之分子身份證，配合個體分布棲地、特性所建構之分子指紋資料庫將可廣泛運用於物種及個體鑑定，說明利用微衛星分子指紋技術建立資料庫是可行的。

### 三. 牛樟族群之遺傳組成以及分化程度之探討:

估算遺傳歧異度可由對多型性(Polymorphism)的數目，異型合子(Heterozygosity)的高低，對偶基因歧異度(Alleles diversity)或是基因單型歧異度(Haplotype diversity)來加以評估。而在這其中，有些基因可能受到天擇亦或是遺傳漂變(Genetic drift)的強烈影響，基因型趨於固定而使得變異較為缺乏；另外有的族群或者是物種則是因為族群個體間有高度的異交情況(Outcrossing)，或是因族群數量較大，擁有較高程度的基因交流，使得在基因座中保有較高的遺傳歧異度。故此遺傳歧異度的高低和變異量在族群間的分佈，與分子序列中不同位置的置換模式，常常被用來估算天擇的型式，以及族群遺傳的結構和「健康」的程度，意即為此物種或族群目前的適應情況，並且提供了保育工作在遺傳學上極為重要的資訊。

本研究利用 15 組微衛星基因座(表七)估算牛樟之遺傳多樣性，牛樟的對偶基因數( $A=6.800$ )與八角金盤物種相比，可看出如日本八角金盤(14.500)、台灣八角金盤(10.000)、小笠原八角金盤(9.167)、台灣芒屬族群(9.250) (吳，2010)、玉山圓柏(16.92) (邱，2010)、台灣穗花杉 (8.13)以及廣東穗花杉(10.80) (柯，2012)皆高於本研究對象牛樟的對偶基因數目，但牛樟對偶基因數目卻高於馬尾松物種台灣族群

(1.636)以及大陸族群(4.273)，亦高於稀有物種雲南穗花杉(2.53)與越南穗花杉(2.33) (柯，2012)，從上述結果顯示出本物種應具較低至中度遺傳歧異度。

在異型合子分析部分發現牛樟的平均異型合子觀察值為0.49670，低於平均異型合子期望值0.69729，顯示牛樟之異型合子觀察值偏低，在加上  $F_{IS}=0.07583$  ( $P<0.05$ )顯示牛樟族群有明顯近親交配的情形，進而導致於牛樟族群多樣性下降。在分別分析殘材以及葉片個體部分發現殘材個體的遺傳多樣性約略高於葉片個體，殘材對偶基因數  $A=5.600$  大於葉片的 4.113，異型合子觀察值部分殘材  $H_o=0.50347$  亦大於葉片的 0.47243，這樣的結果顯示過往牛樟族群應該相對於現今具有較高的遺傳多樣性且穩度，主要殘材樣本可以代表過往的族群個體，而葉片樣本則代表現今族群。

林務局於1975年曾設置牛樟母樹林計973株至1996年則只上下為449株，鍾等人(2012)有針對這些母樹林是否能生產種子進行評估以及野外觀察，結果發現野外牛樟母樹林可以採到的種子很少，牛樟是藉由昆蟲授粉，一般認為昆蟲傳粉的植物有較高機會近親交配，牛樟種子屬於大粒種子，種子傳播能力較差，因此種子容易掉落在其母樹附近，造成其族群之近親繁殖機會必然大增。本研究利用自交系數  $F_{IS}=0.07583$  ( $P<0.05$ )，亦支持這樣的結果。牛樟野外族群大部分都呈

現群聚狀，而其生長森林鬱閉也導致牛樟種子傳播之困難，阻礙族群間的基因交流，進而造成同型合子結合機率很高，而同質結合過多的現象亦會造成物種近親衰敗情形，而使牛樟生存以及生殖率降低之影響，研究也發現牛樟物種落果情形非常嚴重而且授粉不易(鐘 等人，2012)，此些因素皆是造成牛樟物種多樣性較低的原因。此外棲地受到破壞以及因經濟價值高而受到人為的開發盜採等因素，亦會導致此物種生存困難。

由於牛樟為昆蟲傳粉之物種在加上種子傳播能力較差，因此預期牛樟物種在族群間應具有較高的分化情形，本研究結果顯示遺傳分化值介於 0.06564-0.10564 屬於低度分化，造成此現象最主要原因可能在於族群可能仍保有古老的多型性所以及研究的族群多屬於同一地理區，故造成族群間仍具有較低的的分化程度。在族群分群部分，不論 SAMOVA 以及 STRUCTURE 分析都可以發現大湖與南庄遺傳組上較其他族群相近。這樣低度的遺傳歧異度以及分化程度有可能是由於本研究研究地區僅針對苗栗以及新竹縣，取樣上較為狹隘以及不足而造成，如要更確切了解以及探討台灣牛樟族群之遺傳多樣性，未來宜再進行較為廣泛的取樣分析。

## 結論

近年來分子生物學蓬勃發展，提供了學者生物學的嶄新視野，並解決過往許多困擾生物學者的棘手問題，其中分子指紋技術更提供物種在保育工作之可行性，微衛星 DNA 多被用於研究物種親緣或族群遺傳研究，但近年來相關技術則廣泛應用於血緣或個體鑑定以及刑事鑑定，本研究利用微衛星 DNA 分子標誌物來建立牛樟殘材之分子身分證以提供未來分子鑑定之用，同時亦希望達到嚇阻盜採濫伐等人為破壞。本研究以建立牛樟殘材中萃取 DNA 之可行性以及相關流程，並選殖出 15 組微衛星 DNA 基因座以進行牛樟個體之基因型鑑定，結果顯示所有個體皆具有獨特之基因型並無重複之個體，亦確認此些標誌物在牛樟個體分子鑑定之可行性；同時亦利用以此些標誌物進行多樣性之評估顯示牛樟物種具低度的遺傳變異，這樣的低變異可能與牛樟個體授粉不易、結實率低、棲地破壞以及人為盜採等因素影響。相信未來藉由此 15 組遺傳標誌物將能有效利用來建立牛樟族群之分子指紋資料庫，藉由此些資料庫建立，冀望能達到嚇阻人為盜採的行為，以減低野外牛樟族群降低的危害。

## 建議與未來施行方向

一. 本研究確認從牛樟殘材中萃取 DNA 之可行性以及分子鑑定之相關流程，以及選殖出 15 組微衛星 DNA 基因座以進行牛樟個體之基因型鑑定，於未來在建構牛樟分子指紋資料庫時有以下幾點建議：

(一). 由於牛樟野外殘材數量甚多，無法於短期間內完整建構分子指紋資料庫，建議可先從牛樟生立木著手先行建構分子指紋資料庫，將可避免現生植株遭受砍伐之命運，亦將能維持目前牛樟野外族數量以及遺傳多樣性。

(二). 牛樟殘材部分則可先行建構盜伐猖獗之地點之殘材，最後則希望能將所有牛樟植株以及殘材個體等皆能完成分子指紋資料庫之建立，以利未來能應用於實務端。

(三). 並於建立分子指紋資料之地區張貼告示告知本地區之牛樟殘材以完整建立分子指紋資料庫，希望達到嚇阻之效果。

二. 15 組微衛星 DNA 基因座所計算出的  $PNE_{ID}$  (兩個不同個體但具有相同基因型的機率值) 為  $5.47 \times 10^{-14}$ ，亦即當族群大到  $5.47 \times 10^{14}$  時才有可能實際上為不同個體但具有相同的基因型，但現今牛樟野外植株數目約略 3 萬至 4 萬，遠小於  $5.47 \times 10^{14}$ ，因此顯示本 15 組微衛星 DNA 之多型性對牛樟而言應可達到個體鑑定之目標。由於 15 組基因

座中有 Cik5 以及 Cmi-AG-113 兩組 PCR 反應率成功率低，將其剔除計算 non-exclusion probability of identity ( $PNE_{ID}$ )，顯示其值為  $2.56 \times 10^{-12}$ ，顯示不同個體但具有相同基因型的機率仍相當低只有  $2.56 \times 10^{-12}$ ，因此即使只有 13 組微衛星 DNA 基因座仍可達到鑑定之目的。

三. 從本研究顯示牛樟物種相對於其他物種而言具有低度遺傳變異，這也暗示牛樟的保育行動是迫切需要的，研究亦顯示牛樟族群內個體積配模式偏向於近親交配引起近親衰敗現象，包含結實率低、或發芽率低的問題導致野外牛樟族群數量不易擴張，於未來則希望建構母樹林等種源中心，其建構將可供應育苗造林所需之植株，也使其牛樟遺傳資源基礎更加寬廣，遺傳歧異度更高。而本研究微衛星 DNA 亦提供一良好遺傳工具評估牛樟遺傳多樣性以及種源。

(一). 再建構母樹林初期須從遺傳層面了解所收集之植株的種源，這樣才能有效減少近親交配之可能性。

(二). 此外亦可評估現今牛樟母樹林之遺傳多樣性以及其價值性，是否種源來源多樣化亦或者母樹林內之個體在遺傳上是否有較為近緣之個體存在，一旦有近親個體存在，後續之苗木將可能面臨近親衰敗之現象，將無法達到母樹林建構之目的。

四. 本研究計劃案於未來希望能應用於牛樟盜採之案件上，提供相關種源證據，但是為了能達到此目標，則必須完整建構牛樟分子指紋資

料庫，以及必須評估往後相關鑑定所需之費用以及技術之轉移方式。

(一). 完整建構牛樟分子指紋資料庫則可依上述之先後順序陸續建構。

(二). 個體鑑定費用之部分初步評估從 DNA 之萃取到完成 15 組微衛星 DNA 粗估工作時間約一周內，每個樣本 2,000-2,500 元左右，但如果貴單位能先進行相關分子反應能成本壓低至 1,000-1,500 元左右。

(三). 本人可協助前期相關資料庫之建立以及相關分子鑑定技術之轉移，由於分子指紋之資料庫之建立有其重要性，可提供後續個體比對之用，具有急迫性須先行建構。另外於計畫書中亦有相關分子鑑定之 SOP 提供貴單位參考。但至於未來後續相關實務端可能貴單位須加以謹慎思索如何建構，是否相關鑑定工作仍須委外進行亦或者貴單位人員能依照 SOP 施行相關之分子鑑定工作以減輕成本之負擔。

## 誌謝

感謝 中山大學 江友中教授、新竹林區管理處 朱懿千課長、朱劍鳴主任、魏展斌主任、謝光普以及陳正倫等人對於本計畫執行期間所給予之指正與協助。感謝研究生林家弘以及曾婉瑄等實驗室同仁執行或協助本研究計畫進行。

## 參考文獻

- 吳泰翰 (2010) 以微衛星基因座探討芒屬之族群遺傳結構。國立成功大學生物多樣性研究所碩士論文。
- 邱其德 (2010) 以微衛星 DNA 基因座序列探討台灣玉山圓柏芝族群遺傳結構。國立成功大學生命科學研究所碩士論文。
- 柯雅筑 (2012) 穗花杉複合群之族群遺傳與保育研究。國立中山大學生物科學所碩士論文。
- 鍾振德、簡慶德、蔡佳彬 (2012) 牛樟母樹林與種子園。林業研究專訊 19(4): 21-25。
- Asif M. J., and C. H. Cannon (2005) DNA Extraction From Processed Wood: A Case Study for the Identification of an Endangered Timber Species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Molecular Biology Reporter* 23: 1–8.
- Avise, J. C. (1994) Molecular marker, natural history and evolution. Chapman and Hall. New York.
- Chiang, T. Y., and B. A. Schaal (2006) Phylogeography of plants in Taiwan and the Ryukyu Archipelago. *Taxon* 55: 3–41.
- Chiang, Y.C., K. H. Hung, B. A. Schaal, X. J. Ge, T. W. Hsu, and T. Y. Chiang (2006) Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchensis* complex. *Molecular*

*Ecology* **15**: 765–779.

Dib, C., S. Faure, C. Fizames, et al. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380**: 152–154.

Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.

Goldstein D. B., and C. Schlötterer (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press.

Graur D., and W. H. Li (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution* 2nd. Sinauer Associates, Inc., USA.

Hamrick, J. L. and R. W. Allard (1972) Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **69**: 2100–2140.

Huang, C.C., C.Y. Lin, K.H. Wang, et al. (2007) Microsatellite fingerprinting of *Chamacyparis formosensis* in Yuan-Shan National Park. *Journal of National Park* **17**:17–32.

Huang, Y.W., T.Y. Chiang, and W. L. Chiou (2008a) Isolation and characterization of microsatellite loci of *Lycopodium fordii* Bak. (Lycopodiaceae, Pteridophyta). *Conservation Genetics* **9**: 775–777.

Huang C. C., T. Y. Chiang, and T. W. Hsu (2008b) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Taxus sumatrana* (Taxaceae) using PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Conservation Genetics*.**9**: 471–473.

Hsu K. C., J. P. Wang, W. L. Chen, and T. Y. Chiang (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Acrossocheilus paradoxus*

- (Cyprinidae) using PCR-based isolation of microsatellite arrays(PIMA). *Conservation Genetics*. **5**:1–3.
- Jolivet C., and B. Degen. (2012) Use of DNA fingerprints to control the origin of sapelli timber (*Entandrophragma cylindricum*) at the forest concession level in Cameroon. *Forensic Science International: Genetics* **6**: 487–493.
- Kalinowski S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**: 1099–1006.
- Lowe A. J., K. N. Wong, Y. S. Tiong , S. Iyerh, and F.T. Chew (2010) A DNA method to verify the integrity of timber supply chains confirming the legal sourcing of Merbau timber from logging concession to Sawmill. *Silvae Genetica* **59**:263–268.
- Morgante, M., and A.M. Olivieri (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* **3**:175–182.
- Morin, N. R. (1991) Beyond the hardcopy: databasing Flora of North America information. In Proceedings of the International Congress for Systematic and Evolutionary Biology IV. (Portland) , pp. 973–980.
- Morin, N. R. (1992) The Importance of Computerization in National Biological Surveys. In C.-I Peng (ed.), *The Biological Resources of Taiwan: A Status Report*. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series **11**: 13–24.

- Moritz, C. (1994) Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **9**:373–375.
- Nicolaou, K.C. and K. R. Guy (1996) Taxoids: New weapons against cancer. *Scientific American*. **274**: 94–98.
- Powell W., M. Morgante, R. McDevitt, G. G. Vendramin, and J. A. Rafalski (1995a) Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **92**:7759–7763.
- Powell W. M. Morgante, C. Andre, J. W. McNicol, G. C. Machray, J. J. Doyle, S. V. Tingey, and J. A. Rafalski (1995b) Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology* **5**: 1023–1029.
- Rachmayanti Y., L. Leinemann, O. Gailing, and R. Finkeldey (2009) DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing the isolation success. *Forensic Science International: Genetics* **3**: 185–192.
- Raven, P.H. 1992. The importance of national biological inventory. In C.-I Peng (ed.) , *The Biological Resources of Taiwan: A Status Report*. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series **11**: 1–12.
- Sanger, F. G., G. Nickle, and A. R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **74**: 5463–5467.
- Schneider, H., K. M. Pryer, R. Cranfill, A. R. Smith, and P. G. Wolf (2002)

Evolution of vascular plant body plans: a phylogenetic perspective,  
pages 330-364 in Q. C. B. Cronk, R. M. Bateman, and J. A. Hawkins,  
editors, *Developmental Genetics and Plant Evolution*. Taylor &  
Francis, London.

## 附錄

附錄一、牛樟衛星 DNA 不同之基因座在個體所顯現之基因型原始資料。(數字為序列長度大小,?為 missing 資料)。

樣本	Cik3	Cik5	AC 31	AG51	AC54	AG60	AG100	AG108	AG113	AG147	AG159	AC179	AC198	AG221	AC269															
T1	230	230	220	220	138	138	108	130	208	210	176	196	?	?	170	180	128	142	154	154	176	184	180	180	160	170	224	246	158	158
T2	230	230	220	220	128	138	108	130	208	208	176	196	170	170	170	180	132	142	154	154	176	184	180	180	160	170	224	246	158	158
T3	230	230	220	220	138	138	108	130	208	208	176	196	170	170	170	180	128	142	154	154	176	184	180	180	160	170	224	246	160	160
T4	230	230	220	220	138	138	108	130	208	208	176	196	170	170	170	180	128	142	156	156	176	184	?	?	160	170	224	246	160	160
T5	230	230	220	220	138	138	108	130	208	208	176	196	170	170	170	180	132	142	156	156	176	184	180	180	160	170	224	246	162	162
T6	230	230	220	220	136	136	108	130	206	206	176	196	170	170	170	180	142	142	156	156	176	184	180	180	160	170	224	246	162	162
T7	230	230	220	220	140	140	110	132	206	206	176	196	174	174	170	180	128	142	156	156	176	184	180	180	160	170	224	246	?	?
T8	230	230	220	220	140	140	110	132	204	206	178	200	174	174	170	180	132	142	156	156	174	184	182	182	160	160	224	246	162	162
T9	230	230	220	220	140	140	110	132	204	206	178	200	174	174	170	180	132	142	156	156	176	184	182	182	160	170	224	244	162	162
T10	230	230	220	220	128	138	110	132	206	206	178	200	174	174	168	176	132	142	156	156	176	184	182	182	160	170	224	244	160	160
T11	230	230	200	218	136	136	110	132	208	210	178	200	174	174	170	180	146	146	156	156	176	186	182	182	160	160	224	244	140	160
T12	230	230	218	218	138	138	110	132	210	210	178	200	174	174	170	180	146	146	?	?	176	186	182	182	160	170	224	244	160	160
T13	230	230	218	218	128	138	110	132	210	210	178	200	174	174	170	180	146	146	154	154	176	186	182	182	160	160	224	244	140	160
T14	230	230	218	218	136	136	110	132	210	210	178	200	174	174	170	180	146	146	154	154	174	182	182	182	160	160	224	244	160	160
T15	230	230	218	218	136	136	108	130	210	210	178	200	174	174	170	180	146	146	154	154	174	182	182	182	160	160	226	246	140	160
T16	230	230	200	218	136	136	108	130	208	208	178	200	?	?	170	180	146	146	154	160	174	182	182	182	160	160	222	240	160	160

様本	Cik3	Cik5	AC 31	AG51	AC54	AG60	AG100	AG108	AG113	AG147	AG159	AC179	AC198	AG221	AC269															
T17	230	230	200	218	136	136	108	130	208	208	176	196	?	?	170	180	146	146	154	154	174	182	182	182	160	160	222	242	162	162
T18	230	230	218	218	136	136	108	130	208	208	176	196	170	170	170	180	146	146	154	154	176	186	182	182	160	160	222	242	144	162
T19	230	230	200	218	136	136	108	130	208	208	?	?	174	174	170	180	142	142	154	154	176	186	180	180	160	196	222	242	144	162
T20	230	230	218	218	138	138	108	130	208	208	176	196	?	?	170	180	142	142	154	154	174	182	180	180	160	160	222	244	162	162
T21	230	230	218	218	136	136	108	130	208	208	176	196	?	?	170	180	142	142	154	154	174	182	180	180	160	196	222	242	162	160
T22	230	230	218	218	140	140	108	130	206	208	?	?	?	?	170	180	142	142	154	154	174	182	180	180	160	196	222	242	160	160
T23	230	230	218	218	140	140	108	130	210	210	176	196	172	176	170	180	132	148	154	154	176	186	182	182	160	196	222	244	160	160
T24	230	230	218	218	?	?	110	138	208	208	176	196	172	176	170	180	132	146	156	156	174	182	180	180	?	?	222	242	160	160
T25	230	230	218	218	138	138	110	138	208	208	206	196	172	176	170	180	148	148	156	156	176	186	180	180	?	?	222	242	160	172
T26	230	230	218	218	138	138	110	138	208	208	176	196	172	176	170	180	132	146	156	156	176	186	180	180	162	162	222	242	158	158
T27	230	230	218	218	138	138	110	138	208	208	176	196	172	176	170	180	132	146	156	156	174	182	180	180	162	162	222	242	158	158
T28	230	230	218	218	138	138	110	138	208	210	176	196	172	176	170	180	132	146	156	156	176	186	180	180	160	160	222	242	158	158
T29	230	230	198	218	130	138	110	138	208	208	176	196	172	176	170	180	146	148	156	156	176	186	180	180	160	160	222	242	158	158
T30	230	230	218	218	140	140	110	138	208	208	178	178	172	176	172	182	146	148	156	156	176	186	180	180	160	160	222	242	158	158
T30	230	230	218	218	140	140	110	138	208	208	178	178	176	178	172	182	146	148	156	156	176	186	180	180	160	160	222	242	158	158
T30	230	230	218	218	140	140	110	138	208	208	178	178	176	178	172	182	146	148	156	156	176	186	180	180	160	160	222	242	158	158
T31	230	230	218	218	138	138	110	138	208	210	178	178	176	178	172	182	?	?	156	156	176	186	180	180	160	160	222	244	158	158
T32	228	228	220	220	138	138	110	138	208	210	178	178	176	178	172	182	?	?	156	156	174	182	180	180	160	160	222	244	158	158
T33	228	228	220	220	138	138	110	138	208	208	178	178	176	178	172	182	?	?	156	156	174	182	182	182	160	160	222	244	158	158
T34	228	228	218	218	140	140	110	138	208	208	176	196	176	178	172	182	?	?	156	156	176	182	182	182	160	160	222	244	158	158
T35	228	228	218	218	132	140	110	138	208	210	176	196	176	178	172	182	?	?	152	152	176	182	180	180	160	160	222	244	158	158

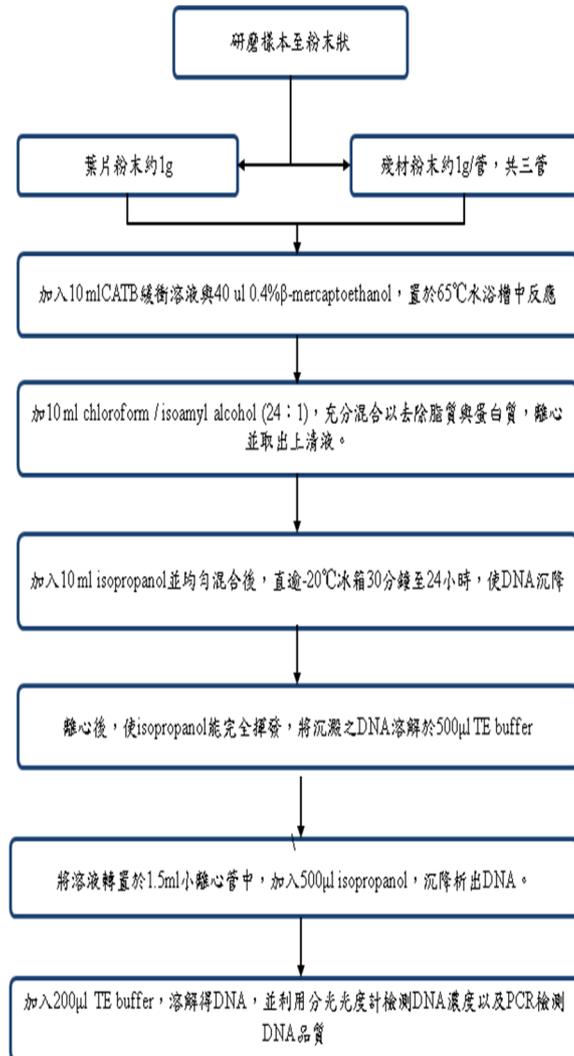
様本	Cik3	Cik5	AC 31	AG51	AC54	AG60	AG100	AG108	AG113	AG147	AG159	AC179	AC198	AG221	AC269															
T36	228	228	218	218	?	?	110	138	208	208	176	196	176	178	172	182	?	?	152	152	176	182	180	180	160	160	222	244	160	160
T37	228	228	218	218	138	138	110	138	206	206	176	196	176	178	172	182	?	?	152	152	176	182	180	180	160	160	222	244	162	162
T38	228	228	220	220	130	138	110	138	206	206	176	196	176	178	172	182	?	?	152	152	176	182	180	180	160	160	222	244	162	162
T39	228	228	220	220	130	138	110	138	206	206	176	196	176	178	170	180	?	?	152	152	176	182	180	180	160	166	222	244	160	160
T40	228	228	220	220	130	138	110	138	206	206	176	196	176	178	172	182	?	?	152	152	176	182	180	180	160	160	222	244	160	160
T41	228	228	218	218	138	138	110	138	206	206	176	196	176	178	172	182	132	148	152	152	174	182	180	180	160	166	222	244	160	160
T42	224	224	?	?	140	152	110	138	206	206	176	196	176	178	172	182	?	?	152	152	176	182	182	182	160	160	222	242	140	160
T43	?	?	?	?	140	140	110	138	206	206	176	196	176	178	172	182	132	148	152	152	174	184	?	?	160	166	222	242	162	162
T44	?	?	?	?	140	140	110	138	206	208	176	200	176	178	170	180	142	142	152	152	174	184	?	?	160	166	222	242	160	160
T45	?	?	?	?	140	156	108	130	208	208	176	200	176	178	170	180	132	142	154	154	174	184	182	182	160	160	222	244	160	160
T46	200	224	?	?	140	140	108	130	208	208	176	200	176	178	170	180	120	136	154	154	174	184	182	182	160	160	222	244	160	160
T47	?	?	?	?	140	142	108	130	206	208	176	200	176	178	170	180	120	136	154	154	174	184	182	182	160	160	224	246	160	160
T48	226	234	?	?	140	142	108	130	?	?	176	200	176	178	170	180	136	136	154	154	174	184	182	182	160	160	224	246	160	160
T49	?	?	?	?	140	156	110	138	?	?	176	200	176	178	170	180	136	136	?	?	174	184	182	182	160	160	224	246	160	160
T50	?	?	?	?	140	154	110	138	?	?	176	200	176	178	170	180	142	142	154	154	174	182	182	182	160	166	224	246	160	160
T51	226	234	?	?	140	162	110	138	206	208	176	200	176	178	170	180	?	?	154	154	174	182	182	182	160	166	224	246	162	174
T52	226	234	?	?	140	140	116	140	208	208	176	200	176	178	170	180	?	?	154	154	174	182	?	?	160	160	224	246	162	162
T53	226	234	?	?	132	140	116	140	208	208	176	200	176	178	170	180	132	148	154	154	174	182	184	184	160	160	224	244	162	162
T54	226	234	?	?	140	140	116	140	?	?	178	200	176	178	170	180	132	148	154	154	174	182	182	182	160	160	224	244	162	162

様本	Cik3	Cik5	AC 31	AG51	AC54	AG60	AG100	AG108	AG113	AG147	AG159	AC179	AC198	AG221	AC269															
T55	226	234	?	?	140	140	116	140	208	210	178	200	176	178	?	?	132	148	154	154	174	182	182	182	160	160	224	246	162	162
T56	228	228	218	218	140	140	116	140	208	210	180	202	174	176	170	180	?	?	152	152	174	182	180	180	160	160	224	242	158	158
T57	228	228	218	218	?	?	116	140	208	210	180	202	174	176	170	180	148	148	154	154	174	182	180	180	160	160	222	242	158	158
T58	228	228	218	218	?	?	110	138	208	210	178	200	170	170	170	180	148	148	154	154	174	182	180	180	160	166	222	242	158	158
T59	224	228	218	218	?	?	110	138	?	?	178	200	174	174	170	180	?	?	152	152	174	184	180	180	?	?	222	242	158	158
T60	224	228	218	218	?	?	110	138	?	?	176	200	170	170	168	180	142	142	152	152	174	182	180	180	160	166	222	242	158	158
T61	224	224	?	?	140	150	110	138	?	?	176	200	170	174	168	180	132	142	152	152	176	176	182	182	160	160	?	?	162	162
T62	224	224	?	?	140	162	110	138	?	?	176	176	170	174	168	180	142	142	152	158	176	176	182	182	180	180	?	?	162	162
T63	220	220	?	?	140	140	110	138	208	210	176	200	170	170	172	180	?	?	152	156	176	186	178	178	160	166	246	246	152	152
T64	220	220	?	?	140	140	110	138	208	210	176	200	170	170	172	180	132	142	152	156	174	182	178	192	160	166	246	246	152	152
T65	218	218	?	?	140	140	110	138	208	210	176	200	172	172	172	180	136	136	152	156	176	176	178	178	160	166	246	246	152	152
T66	220	220	?	?	140	140	110	138	210	210	176	200	170	170	198	212	132	132	156	156	176	176	178	192	160	170	246	246	152	152
T67	220	220	?	?	140	140	110	138	208	210	176	200	174	174	172	180	?	?	?	?	176	176	178	178	160	166	246	246	154	154
T68	220	220	?	?	?	?	110	138	208	208	176	200	170	170	172	180	134	134	152	156	176	186	178	192	160	170	246	246	152	152
T69	218	218	?	?	?	?	110	138	204	204	176	200	170	170	172	180	134	134	152	156	176	186	178	192	160	160	248	248	152	156
T70	220	220	?	?	?	?	110	138	206	206	176	200	170	170	172	180	132	142	152	156	176	176	178	192	160	166	248	248	152	154



附錄三、微衛星 DNA 基因型鑑定之流程。

## 一. DNA 之萃取



### (一). 葉片之 DNA 萃取:

將野外採回的牛樟新鮮葉片用矽膠充分乾燥後，先放入研钵中再倒入液態氮將樣本組織研磨成粉狀。用 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 方式(Doyle and Doyle, 1987)，將植物組織中的 genomic DNA 分離出來。

CTAB 方式萃取步驟如下：

1. 取乾燥後的葉片組織 **1g**，置於研鉢中後加入適量液態氮，研磨至粉末狀，之後連同液態氮一起倒入 50ml 離心管內。
2. 加入 10 ml 65°C 之 3X CATB 緩衝溶液與 40 ul 0.4%β-mercaptoethanol，將粉末與緩衝液均勻混合，置於 65°C 水浴槽中反應 90 分鐘，並在反應過程中每 5-10 分鐘充分搖晃離心管一次，使反應完全。
3. 將萃取液倒入 30ml 離心管中，加 10 ml chloroform / isoamyl alcohol (24：1)，上下倒轉 50-100 次，充分混合以去除脂質與蛋白質。
4. 在室溫下，於桌上離心機以 8000 rpm 轉速，離心 10 分鐘，將脂質、蛋白質與植物殘渣離心至離心管底部。
5. 將上清液取出，放入新的乾淨離心管中。
6. 重複 3-5 步驟，共兩次
7. 加入 10 ml isopropanol 並均勻混合後，直逾 -20°C 冰箱 30 分鐘至 24 小時，使 DNA 沉降。
8. 在 4°C 下，以 8000 rpm 轉速離心 10 分鐘，倒掉上清液，將離心管倒扣於鐵架上，使 isopropanol 能完全揮發。
9. 將沉澱之 DNA 溶解於 500μl TE buffer，並加入 2μl 的 RNase，於 37°C 的 shaker 中兩小時，去除 RNA。

10. 將溶液轉置於 1.5ml 小離心管中，加入 500 $\mu$ l isopropanol，同步驟 7，沉降析出 DNA。
11. 以 8000 rpm 轉速，離心 10 分鐘後，倒掉上清液。
12. 加入 70% 酒精，輕彈離心管使沉澱物飄起，再以 8000 rpm 轉速，離心 2 分鐘，將鹽類去除。
13. 去除上清液取沉澱物，倒置於鐵架上，等沉澱物內酒精完全揮發乾淨。
14. 加入 200 $\mu$ l 10XTE buffer，溶解得 genomic DNA。
15. 定量所萃取的全基因組 DNA，並將 DNA 稀釋為 2ng/ $\mu$ l 後，保存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱備用。

## **(二). 殘材 DNA 萃取:**

殘材之 DNA 萃取依據 Asif and Cannon (2005) 所發表之步驟進行全基因體 DNA 之萃取，殘材所採取之 DNA 萃取部位為接近邊材之位置。所有殘材樣本再研磨前先以 70% 的酒精進行清潔以減少 DNA 於過程中被污染之情形，殘材之 DNA 萃取亦採用 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 方法，並將其步驟以及溶液配方做些微之修改。

溶液:

修改後 CTAB 萃取 buffer 溶液配方如下: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0),

20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 mM NaCl, 3% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone, 0.2% mercaptoethanol。

Washing buffer: 76% ethanol, 10 mM ammonium acetate

CTAB 方式萃取步驟如下(若需多管濃縮，則分成 3-5 管重複以下步驟)：

1. 取裁切成小塊的殘材組織約 **1 g**，置於研鉢中後加入適量液態氮，研磨至粉末狀，之後連同液態氮一起倒入 50ml 離心管內。
2. 加入 10 ml 65°C 之修改後 CATB 緩衝溶液，將粉末與緩衝液均勻混合，置於 65°C 水浴槽中反應至少 120 分鐘，並在反應過程中每 5-10 分鐘充分搖晃離心管一次，使反應完全。
3. 將萃取液倒入 30ml 離心管中，加 10 ml chloroform / isoamyl alcohol (24 : 1)，上下倒轉 50-100 次，充分混合以去除脂質與蛋白質。
4. 在 4°C 下，於桌上離心機以 5000 rpm 轉速，離心 10 分鐘，將脂質、蛋白質與植物殘渣離心至離心管底部。
5. 將上清液取出，放入新的乾淨離心管中。
6. 重複 3-5 步驟，共兩次
7. 加入 10 ml isopropanol 並均勻混合後，直逾 -40°C 冰箱 overnight，使 DNA 沉降。
8. 在 4°C 下，以 5000 rpm 轉速離心 20 分鐘，倒掉上清液，將離心管倒扣於鐵架上，使 isopropanol 能完全揮發。

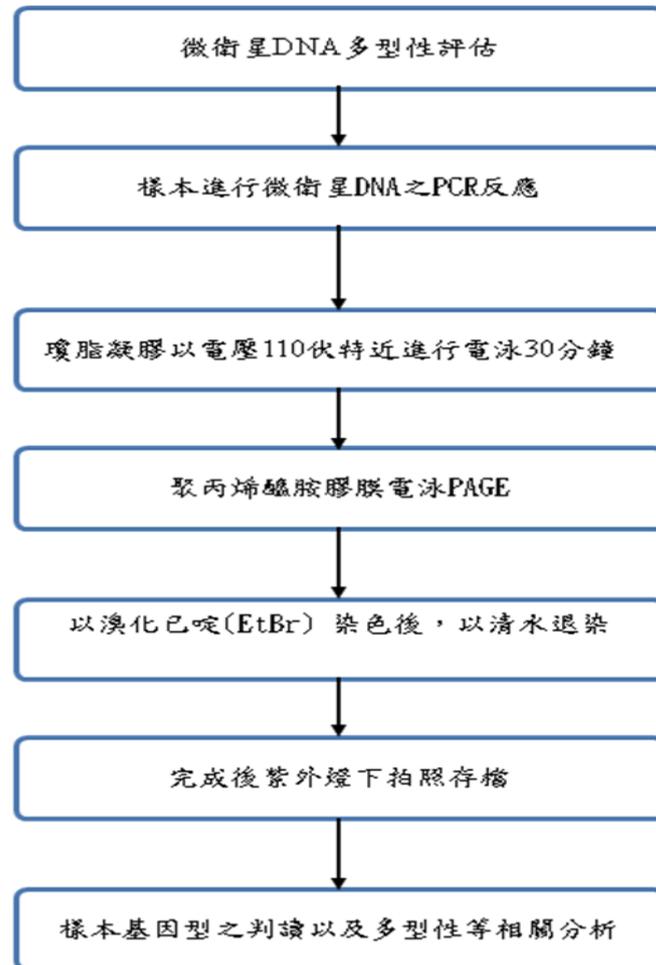
9. 加入 1 mL washing buffer，輕彈離心管使沉澱物飄起，再以 5000 rpm 轉速移除 washing buffer
10. 重複上述步驟。
11. 加入 70% 酒精，輕彈離心管使沉澱物飄起，再以 5000 rpm 轉速，離心 2 分鐘，移除酒精。
12. 重複上述步驟，並將其沉澱物於室溫下乾燥。
13. 加入 50-100 $\mu$ l 10X TE buffer，溶解得 genomic DNA (若進行多管濃縮則平均總 TE 量，如：一開始進行 3 管則每管約加入 30 $\mu$ l，總體積共 90 $\mu$ l)。
14. 測 DNA 濃度(>2ng/ $\mu$ l)，並將 DNA 濃度稀釋之 2ng/ $\mu$ l，以供後續實驗進行

### (三).殘材樣本牛樟 DNA 之檢測

#### 1.聚合酵素連鎖反應 (PCR): *trnL-F* 基因片段擴增

在溫度循環器(Thermal cycle)中，利用聚合酵素(*Taq* polymerase)及微衛星 DNA 引子擴增出微衛星 DNA。每份 PCR 反應總體積為 50 $\mu$ l，成分包含模板 DNA(2ng/ $\mu$ l)4.5 $\mu$ l、dNTP(8mM)5 $\mu$ l、10X PCR buffer 5 $\mu$ l、*trnL-F* 引子(2 pmole)(表四) 各 5 $\mu$ l、再加入 1 $\mu$ l 的聚合酵素 I(*Taq* polymerase I)並以 ddH<sub>2</sub>O 補足至總體積 50 $\mu$ l，最後放入溫度循環儀中進行反應。反應循環流程為：加熱至 95 $^{\circ}$ C，3 分鐘，將模板 DNA 雙股解開；而後降溫至 92 $^{\circ}$ C，30 秒，確保上個步驟完成；再降溫至 51 $^{\circ}$ C，50 秒，使引子能夠與模板 DNA 黏合(annealing)；再加熱至 72 $^{\circ}$ C，30 秒，讓酵素進行 DNA 延伸反應(extension)，以上步驟循環 35~40 次，最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，後將溫度降至 4 $^{\circ}$ C，反應完成。接著取產物 5 $\mu$ l 加上約 1 $\mu$ l 的 6X 染色溶液，利用 1.2% 瓊脂凝膠(agarose gel) 與 1X TBE buffer，以電壓 110 伏特近進行電泳 30 分鐘以染色，並在紫外線燈下顯色及拍照紀錄，並確認條代片段大小，是否為 400bp。

### 三. 個體基因型鑑定(傳統)



#### (一). 聚合酵素連鎖反應 (PCR):

在溫度循環器(Thermal cycle)中，利用聚合酵素(*Taq* polymerase)及微衛星 DNA 引子擴增出微衛星 DNA。每份 PCR 反應總體積為 50 $\mu$ l，成分包含模板 DNA(2ng/ $\mu$ l)4.5 $\mu$ l、dNTP(8mM)5 $\mu$ l、10X PCR buffer 5 $\mu$ l、引子(2 pmole)各 5 $\mu$ l、再加入 1 $\mu$ l 的聚合酵素 I(*Taq* polymerase I)並以 ddH<sub>2</sub>O 補足至總體積 50 $\mu$ l，最後放入溫度循環儀中進行反應。

反應循環流程為：加熱至 95 $^{\circ}$ C，3 分鐘，將模板 DNA 雙股解開；而後降溫至 92 $^{\circ}$ C，30 秒，確保上個步驟完成；再降溫至 48~55 $^{\circ}$ C，50

秒，使引子能夠與模板 DNA 黏合(annealing)；再加熱至 72°C，30 秒，讓酵素進行 DNA 延伸反應(extension)，以上步驟循環 35~40 次，最後在 72°C 作用 10 分鐘，後將溫度降至 4°C，反應完成。接著取產物 5 $\mu$ l 加上約 1 $\mu$ l 的 6X 染色溶液，利用 1.2% 瓊脂凝膠(agarose gel)與 1X TBE buffer，以電壓 110 伏特近進行電泳 30 分鐘以染色，並在紫外線燈下顯色及拍照紀錄。

瓊脂凝膠製作方法：

把 agarose 與 1X TBE buffer 以 1(g)：100(ml)的方式倒入血清瓶中，之後置入微波爐中 5-10 分鐘煮沸溶解，溶解之溶液再以冷水沖洗瓶身數十秒鐘，直到瓶身不燙手後再加入 DNAsafe Nucleic Acid Stain 染色，完成後，倒入鑄模待約 30 分鐘凝固後即可。

## (二).聚丙烯醯胺膠膜電泳法:

相較於瓊脂凝膠電泳法，聚丙烯醯胺膠膜電泳法能以更高的解析度判別 DNA 片段之長度，即判別不同基因型分子量的差距，此法能更準確判別每個個體間的變異程度。

聚丙烯醯胺膠片製作方式如下：

製膠前先將直立式電泳槽所需之玻璃以拭淨紙擦拭乾淨後，將玻璃

架至做膠台上備用，製膠時：先加入 10X TBE buffer 12ml、ddH<sub>2</sub>O 39ml、尿素(Urea)50.4g，再加入聚丙烯醯胺溶液(Polyacrylamide)26.7ml 使尿素溶解，待尿素完全溶解後，再加入 10% APS 840 $\mu$ l 及 TEMED 60 $\mu$ l，攪拌混合後，以針筒注入鑄模後，待約 30 分鐘膠體凝固後即可使用。

製膠完成後，倒入 1X TBE buffer 溶液蓋過玻璃作為電流流動之媒介，將 PCR 擴增後之產物加入後，先以 300 伏特之電壓進行約 15 分鐘(確認所加入之 PCR 產物溶液完全進入膠中)，再以 200 伏特之電壓進行 5 小時的電泳，完成後，將膠片以溴化乙啶(Ethidium bromide, EtBr)螢光染劑染色，染色搖晃約 20~25 分鐘，染色之後再以去離子水搖晃約 25~30 分鐘退染，退染後即可在紫外線燈下拍照紀錄每個個體的基因型。

### (三). 資料分析

#### 1. 基因型的判別與量化

將 PAGE 的結果照相後存成電子檔，利用 Gel-Pro analyzer 軟體 (Syngene, USA) 依據照片上的 ladder 片段大小進行基因型分子量長度 (bp) 判讀，自動計算出電泳條帶大小，以 50bp ladder 為基準，每 50bp 為間隔。當樣本只呈現一條亮帶時，則判定該樣本為同型合子；有兩

條亮帶時，則為異型合子。

#### 四. 個體基因型鑑定(螢光標定)

僅需要進行 PCR 反應以及後續基因型判定，電泳定序列長度則交由生技公司進行 (如基龍米克斯與明欣生物科技...等生技公司)。

##### (一). 微衛星 DNA 基因座擴增

在溫度循環器(Thermal cycle)中，利用聚合酵素(*Taq* polymerase)及微衛星 DNA 引子擴增出微衛星 DNA。每份 PCR 反應總體積為 50 $\mu$ l，成分包含模板 DNA(2ng/ $\mu$ l)4.5 $\mu$ l、dNTP(8mM)5 $\mu$ l、10X PCR buffer 5 $\mu$ l、引子(2 pmole) (表五)各 5 $\mu$ l、再加入 1 $\mu$ l 的聚合酵素 I(*Taq* polymerase I)並以 ddH<sub>2</sub>O 補足至總體積 50 $\mu$ l，最後放入溫度循環儀中進行反應。反應循環流程為：加熱至 95 $^{\circ}$ C，3 分鐘，將模板 DNA 雙股解開；而後降溫至 92 $^{\circ}$ C，30 秒，確保上個步驟完成；再降溫至 48~58 $^{\circ}$ C，50 秒，使引子能夠與模板 DNA 黏合(annealing)；再加熱至 72 $^{\circ}$ C，30 秒，讓酵素進行 DNA 延伸反應(extension)，以上步驟循環 35~40 次，最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，後將溫度降至 4 $^{\circ}$ C，反應完成。

接著取產物 5 $\mu$ l 加上約 1 $\mu$ l 的 6X 染色溶液，利用 1.2% 瓊脂凝膠 (agarose gel)與 1X TBE buffer，以電壓 110 伏特近進行電泳 30 分鐘以染色，並在紫外線燈下顯色及拍照紀錄，確認是否有目標條帶(表五)。

**PS. PCR 兩條引子其中之一則需利用螢光標定，不同基因座則利用不同螢光色標定。**

## (二). 基因型鑑定與資料分析:

確認 PCR 的產物為正確之片段大小後，PCR 樣本送件至生技公司分析，以 ABI Prism 3730 自動定序儀 (Applied Biosystems) 進行毛細管電泳反應毛細管電泳反應，再以 GeneMapper v3.0 (Applied Biosystems) 軟體進行基因型的判定。

#### 附錄四、期中報告意見

期中報告意見	處理情形
江委員意見: (1)樣本係採取自殘材內、中、外部，請於報告中敘述。	遵照辦理，於 P.12 說明
(2)採取樣本進行 DNA 萃取須多少量，請於報告中敘述。	遵照辦理，於 P.14 與 P. 16 說明
(3)目前研究結果顯示，殘材中萃取 DNA 的濃度均很低，見意未來可大量萃取後再濃縮，以利後續多型性分析。	遵照辦理
魏委員意見: 目前僅採取 1 株生立木葉片樣本進行牛樟 DNA 萃取，樣本似乎太少。建議應採取多株牛樟生立木樣本，本處竹東工作站轄區內牛樟生立木亦可採取攻研究之用。	遵照辦理
朱委員意見: 請受委託單位於本研究研末報告中建立 SOP，以利本處未來實務上之應用。	遵照辦理，於 P.80-89 說明。
陳技正意見: 本研究報告中所稱大湖事業區第 13 林班，應更正為南庄事業區第 13 林班。	遵照辦理

附錄五、期末報告意見

期末報告意見	處理情形
本研究成果未來如何實際運用於林管處查緝實務？請受委託研究單位，就單一樣本分析所需時間及經費，於研究成果中敘明，作為未來應用之參考。	遵照辦理，於P.85-87說明
本研究採樣樣本中，係取自於邊材或心材？請受委託單位再予釐清，並予以定義。	遵照辦理
依本研究結果，未來資料庫之建立相當龐大，請受委託單位就資料庫建置之內容及成本提出意見供本處參考。	遵照辦理，於P.85-87說明
有關本研究後續之應用及延續性之作為，請受委託單位應依本次會議各委員所提之意見與討論內容論述。	遵照辦理，於P.85-87說明