

# 利用形態性狀及 RAPD、ISSR 分子標誌探討馬祖東引地區換錦石蒜 (*Lycoris sprengeri*) 種原歧異度<sup>1</sup>

蔣順惠<sup>2</sup>、葉志新<sup>2</sup>、蔡錫鍊<sup>3</sup>、曹爾元<sup>3</sup>、廖芳心<sup>2</sup>、傅仰人<sup>2</sup>

## 摘要

本研究針對分布於福建省連江縣（馬祖）東引鄉之換錦石蒜 (*Lycoris sprengeri*) 進行種原蒐集，並調查其形態特性及分析 DNA 分子標誌，探討東引島嶼忠靈堂峽灣及紫澳，與西引島后澳及東澳等四個棲地換錦石蒜族群間及族群內個體遺傳歧異度，以供復育繁殖及育種之參考。現地外觀性狀調查包括：花莖長、小花數、花瓣長、花瓣寬、總花徑、小花徑及花色等，其中花色依淺、中、深及極深分級。另於四個棲地分別對不同花色植株採樣，及相關種金花石蒜 (*L. aurea*) 共 32 個樣品，使用 15 個 RAPD 及 6 個 ISSR 分子標誌進行擴增，並以 NT-SYS 軟體分析繪出樹狀圖，以了解換錦花族群之親緣關係。性狀調查結果顯示，同花色不同棲地間族群花梗長、花瓣長及總花徑等項目表現存在明顯差異。21 個分子標誌分析結果，整體相似度在 0.64-0.85 之間，各棲地族群內具歧異度，對應外觀上棲地內植株具有不同花色的現象，但四個棲地間換錦石蒜並無明顯地理區隔現象。此結果顯示各棲地內具多元的遺傳背景，有利於東引特有的換錦石蒜族群適應自然環境的變遷，此豐富遺傳資源除可應用於育種，更值得積極保育之。

關鍵詞：換錦石蒜、東引、種原歧異度、逢機增幅多型性 DNA、簡單重複序列間多型性

<sup>1</sup> 行政院農業委員會桃園區農業改良場研究報告第 444 號。

<sup>2</sup> 桃園區農業改良場助理研究員(通訊作者, bluebluemoon@tydais.gov.tw)、副研究員、研究員及副場長。

<sup>3</sup> 連江縣政府建設局前技佐及前局長。

## 前 言

換錦石蒜 (*Lycoris sprengeri*) 為石蒜科石蒜屬植物，主要分布於中國大陸安徽及江浙等長江以南地區，棲習環境喜陰、溼，但排水良好的環境。在台灣僅分布於連江縣馬祖東引鄉，早期由連江縣農業改良場暫命名為馬祖石蒜，又名東引捲葉石蒜 (楊，2001)，其具有豐富的花色表現，為特別的原生觀賞球根花卉，亦為甚有發展潛力之藥用植物與其他多重用途 (阮等，2009)。東引鄉由東引及西引兩個島嶼組成，整體屬小丘陵地形。氣候變化上，屬亞熱帶海洋性氣候區，氣溫的表現也隨季風影響變化，夏季以 8 月最熱，平均溫度 27.7°C，冬季 1 月最低，平均 9.6°C。雨量集中於 4-6 月梅雨季及 8 月颱風季，入冬後雨量減少。不過東引鄉在長期海風吹拂下，終年相對溼度仍偏高，符合換錦石蒜生育須濕的生育習性 (東引鄉誌，2002)。

石蒜屬植物具特殊的花形及多樣的花色表現，種原間的親緣關係難以外型直接區分。自 1930 年起，開始有學者以核型作為分類依據 (Inariyama, 1931)，至今採用染色體中節位置分類為中位染色體 (Metacentrics; M 型)、末端染色體 (telocentrics; T 型) 及近末端染色體 (acrocentrics; A 型) 三種石蒜核型 (Kurita, 1986; 張，2007)。目前石蒜屬植物核型組成主要分為 A 核型群、M-T 核型群及 M-T-A 核型群三大類。馬祖的換錦石蒜屬 A 核型群，染色體數  $2n=22A$ ，與中國的換錦石蒜及紅藍石蒜為相近之族群。阮 (2000 年) 曾提到「亞群」的概念，並將 A 核型群分成紅花石蒜、換錦石蒜及東引長葉石蒜亞群，玫瑰石蒜、大陸紅藍石蒜及馬祖換錦石蒜同歸為換錦石蒜亞群。

透過核型分析雖可將屬內的種分成三個群類，而同一核型群內，種間除了型態標誌外，亦可採用 rDNA 基因座位置及數量特性而區分之 (Chang *et al.*, 2009)。但要進一步將種間親緣性或種內的差異區分則受到限制。藉由分子標誌的輔助，利用去氧核糖核酸 (DNA) 序列組成的差異進行遺傳鑑別，較不受環境及外表型的影響。常用的 DNA 分子標誌有 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 及 RAPD (random amplified polymorphic DNA)。其中以 1990 年 Williams 等學者及 Welsh 等學者同時提出之 RAPD 技術操作較為簡單快速，此技術以 PCR (polymerase chain reaction) 為基礎，使用 10 個鹼基構成的單一引子，在目標個體 DNA 上逢機進行黏合及擴增引子間的序列片段，產生多個不同片段大小的條帶 (楊，2001)，經電泳分析後個體間顯示不同片段大小之條帶，該條帶即

為具多型性之遺傳標誌，根據多型性可歸納分析個體間的親源關係，並將同一核型群類中的數個種進行更仔細的分類。另外，1994 年 Zietkiewicz 等人提出 ISSR 分子標誌，主要原理是以 SSR (simple sequence repeat) 為引子設計基礎，以 2 或 3 個核苷酸重覆 7-8 次後，再於 3' 或 5' 端加上 1-4 個核苷酸提高專一性。ISSR 引子總長約 17-22 bp，例 (AT)<sub>8</sub>G，以此引子進行 PCR 擴增兩段 SSR 間之序列，隨著兩段 SSR 間之序列變異或 SSR 本身重覆次數之差異，而擴增出大小不同之條帶，同樣經電泳及條帶多型性分析後，判別其親源關係。目前經 RAPD 分析過的大陸、馬祖、台灣及日本之石蒜約十二個種原，已歸類為四群七亞群，大致符合核型分析及可能的雜交親源關係。其中紅花石蒜、紅藍石蒜、玫瑰石蒜、換錦石蒜、馬祖捲葉石蒜及東引長葉石蒜被歸類為 A 核型群種 (阮，2000)。楊 (2001) 將採集自馬祖之換錦石蒜植株花色粉紅、葉型捲曲且粉質者命名為馬祖捲葉石蒜，並利用 RAPD 分子標誌分析後，所得結果馬祖捲葉石蒜與大陸換錦石蒜兩者遺傳相似度為 0.79，大於與紅花石蒜之遺傳相似度 0.56-0.61。

本試驗主要針對馬祖地區東引鄉內東引島之忠靈堂峽灣、紫澳、西引島之后澳及東澳四個地點，分別進行換錦花採樣、土壤環境及外觀型態調查比較，對照 RAPD、ISSR 分子標誌多型性的分析結果，探討四個棲地族群間種原歧異度及地理阻隔之變異性，供日後換錦石蒜育種研究或復育工作之參考。

## 材料與方法

### 一、馬祖東引地區換錦石蒜棲地環境及開花性狀調查

由中央氣象局資料取得 2010 年馬祖氣象站氣溫及濕度記錄作為周年氣候參考，並針對東引島忠靈堂峽灣及紫澳，與西引島后澳及東澳等四個棲地，分別採取表土 0-15 cm 進行土壤分析。pH 值：土壤與蒸餾水 = 1:1 (w/v)，以 pH meter 測定；EC 值：土壤與蒸餾水 = 1:5 (w/v)，以電導度計測定；土壤有機質含量：Walkley-Black 法測定有機碳 (Nelson and Sommers, 1982)，再換算為有機質含量。有效磷含量：白雷氏第一法抽出並以原子分光光度計定量；有效性鉀、鈣及鎂含量：孟立克氏第一法萃取，以感應耦合電漿原子發射光譜儀 (ICP) 定量。

另外，調查換錦石蒜周年生育情形及開花性狀。主要針對四個棲習地依淺、中、深及極深四個花色分級調查，調查項目包括：花莖長、小花數、花瓣長、花瓣寬、總

花徑及小花徑等，各逢機調查八株，進行同色系不同地點植株間差異之比較。

## 二、統計分析

調查資料以 SAS 統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析 ( $\alpha=0.05$ )，並以 Least significant difference (LSD) test，進行同色系不同地點植株間各項調查平均值之顯著性測驗。其中深色系族群雖分佈於三棲地，但性狀調查僅取得東引島忠靈堂及西引島東澳之資料，則以非成對 t 檢定進行顯著性測驗。

## 三、換錦石蒜遺傳歧異度分析

2010 年 5 月至 8 月間於連江縣東引鄉忠靈堂峽灣、紫澳、后澳及東澳等 4 個棲地，採集不同花色深淺及不同叢之換錦石蒜未成熟花苞，標記其代號如表 1，並以取自桃園區農業改良場台北分場之金花石蒜（代號 L32）為外群。其中在東引島忠靈堂取樣花苞淺色系 3 株、中等色系 2 株、深色系 5 株和極深色系 2 株。東引島紫澳取淺色系 2 株和中等色系 2 株。西引島東澳取樣為淺色系 5 株、中等色系 2 株及深色系 2 株。最後在西引島后澳取樣為淺色系 2 株、中等色系 3 株及深色系 1 株。

DNA 萃取方式為秤取花苞 0.1g，使用 Qiagen 公司之 Mini Kit 植物基因組萃取套組 (plant genomic DNA extraction miniprep system) 進行基因組 DNA 萃取，並利用超微量分光光度計 NanoDrop 測定 OD 260 nm 吸光值，調整其 DNA 濃度為  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ，保存於  $-20^\circ\text{C}$  下備用。

分析所使用的引子主要包含 (1) RAPD 分析引子由美國 Operon 公司 (Operon Technologies, Alameda, CA.) 所公布之 OPA 及 OPB 序列合成 40 組，並參考前人研究石蒜屬使用之引子合成 OPC-OPL 共 32 組引子 (楊, 2001)。(2) ISSR 引子參考 UBC SSR Primer Oligonucleotide Set100/9 (John Hobbs, NAPs Unit, University of British Columbia, Vancouver, V6T1Z3, Canada) 共計 90 組引子分析，並由其中篩選具多型性條帶且穩定之引子。

花苞經 DNA 萃取後，進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 利用 Applied Biosystems 公司 GeneAmp® TM PCR System 9800 進行反應。反應總體積  $25 \mu\text{L}$ ，內含 1X buffer (50 mM KCl、20 mM Tris-HCl)、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.2 mM dNTPs、0.4  $\mu\text{M}$  逢機引子、100 ng genomic DNA 及 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen)。RAPD PCR 條件為  $94^\circ\text{C}$ ，2 分鐘； $94^\circ\text{C}$ 、 $47^\circ\text{C}$ 、 $72^\circ\text{C}$  (60 秒、30 秒、90 秒)，循環

10 次 (每次循環下降 1°C) ; 94°C、37°C、72°C (30 秒、20 秒、90 秒) , 循環 10 次 ; 72°C 4 分鐘完成反應。ISSR PCR 條件為 94°C , 5 分鐘 ; 94°C 30 秒 , 50°C 30 秒 , 72°C 40 秒 , 循環 40 次 ; 72°C 7 分鐘完成反應。反應產物以 2% Agarose I (Amresco) 進行電泳分析 , 再以 SYBR® Safe DNA gel stain 染色 , 並於 UV 燈下觀察及照相記錄。

表 1. 東引島嶼原生換錦石蒜各樣品採集地、代號及花色

Table 1. Code, flower color, and habitats of collected different *Lycoris spengeri* individuals native in Tungyin islet

棲地位置 habitat	花色 flower color	樣品編號 code of individual
東引島忠靈堂 Chung-ling-tang	淺 light	L01、L20、L21
	中 medium	L22、L23
	深 deep	L02、L03、L04、L24、L25
	極深 extremely deep	L26、L27
東引島紫澳 Tzu-ao	淺 light	L28、L29
	中 medium	L30、L31
西引島東澳 Tung-ao	淺 light	L05、L06、L07、L08、L09
	中 medium	L10、L11
	深 deep	L12、L13
西引島后澳 Hou-ao	淺 light	L14、L15
	中 medium	L16、L17、L18
	深 deep	L19

資料分析以 NT-SYS 軟體計算相似性係數 (index of similarity) (Nei., Li., 1979) , 另以 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 進行群聚分析 (cluster analysis) 及建構相似性樹狀圖 , 遺傳相似度則以 NT-SYS 進行主成分分析 (principle component analysis) , 依前三個主成分繪製分佈圖。

### 結果與討論

#### 一、換錦石蒜生育周期及性狀

忠靈堂峽灣、紫澳、后澳及東澳等四個換錦石蒜棲地分別位於東、西引島北面灣澳山坡上，呈分散的群集（圖 1）。換錦石蒜生育週期及馬祖地區氣候變化如表 2 所示。2010 年春季二月植株葉片進入抽葉期，五月底葉片枯萎，六月初種球進入休眠期。七月中旬至九月中旬為換錦石蒜花季，九月中旬後可採集自然雜交種子。植株至翌年一月底葉片尚未抽出，維持 4 個月左右之無葉期，直到 2 月再度抽出新葉。



圖 1. 東引鄉地圖，紫澳、忠靈堂，西引島后澳及東澳共 4 個棲息地位置。  
 Fig 1. Map of Tungyin. Collected sites of Tzu-ao, Chung-ling-tang, Hou-ao ang and Tung-ao habitats.

表 2. 2010 年換錦花生育週期及馬祖地區月均溫、相對濕度、累積雨量。

Table 2. Average temperature, relative humidity, and accumulative rainfall of each month in 2010 and the corresponding growth period of native *Lycoris sprengeri*.

月份 month	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
觀察項目 Observation												
無葉期 Non-foliage	—								—	—	—	—
休眠期 Dormancy						—	—					
抽葉期 Foliaceous peried		—	—	—	—							
開花期 Flowering period							—	—	—			
月均溫(°C) Average of temperature	10.5	11.4	12.6	14.5	19.6	23.1	27.1	28.1	27.1	21.4	17	13.5
相對濕度(%) Relative humidity	88	91	85	88	90	89	89	85	85	77	78	75
累積雨量(mm) Precipitation	41.3	154.9	170.0	293.0	141.7	208.9	5.9	19.7	59.8	50.7	19.2	41.1



換錦石蒜在東引鄉之當地族群依紅色系花色底色的深淺分為淺色、中等、深色及極深四類型（圖 2-5）。其中以淺色及中等色系 2 類型分布最廣，散布在四個棲地，深色類大部分分布於東引島忠靈堂峽灣及東澳，極深紅者僅分布在忠靈堂峽灣。比較相同色系換錦石蒜在不同地區其它園藝性狀之差異，調查結果如表 3。



圖 2. 換錦花淺色系  
Fig 2. Light red flower color



圖 3. 換錦花中等色系  
Fig 3. Medium red flower color



圖 4. 換錦花深色系  
Fig 4. Deep red flower color



圖 5. 換錦花極深色系  
Fig 5. Extremely deep red flower color



表 3. 換錦石蒜四棲地不同花色種原開花性狀調查

Table 3. Flowering characters of different petal colors plants in 4 habitats

調查項目 Object	花莖長 Length of scape	小花數 No. of floret	花瓣長 Length of petal	花瓣寬 Width of petal	總花徑 Spreading of Cyme	小花徑 Width of floret
淺色系 light red	---- cm ----	-- No.--	----- cm -----			
東引忠靈堂 Chung-ling-tang	61.9b <sup>y</sup>	4.6a	7.4a	1.4a	15.2a	6.7a
東引紫澳 Tzu-ao	82.8a	5.0a	7.4a	1.3a	15.4a	6.9a
西引東澳 Tung-ao	51.3c	4.5a	5.8b	1.3a	16.1a	7.7a
西引后澳 Hou-ao	67.5b	4.8a	7.1a	1.2a	15.7a	7.6a
LSD(5%)	6.89	--	0.79	--	--	--
中等色系 medium red						
東引忠靈堂 Chung-ling-tang	64.1a	5.4a	7.7a	1.3a	17.0a	7.0a
東引紫澳 Tzu-ao	68.8a	5.0a	6.9a	1.3a	14.9bc	6.6a
西引東澳 Tung-ao	66.5a	4.3a	5.5b	1.4a	15.9ab	7.0a
西引后澳 Hou-ao	55.4a	4.9a	6.5ab	1.3a	14.0c	7.4a
LSD(5%)	--	--	1.36	--	1.68	--
深色系 deep red						
東引忠靈堂 Chung-ling-tang	55.1a	5.4a	6.4a	1.3a	14.8a	5.8a
西引東澳 Tung-ao	57.6a	5.6a	6.6a	1.3a	15.1a	6.3a
t- test 臨界值	--	--	--	--	--	--
極深色系 extremely deep red						
東引忠靈堂 Chung-ling-tang	65.1	6.9	5.2	1.0	13.9	6.3

<sup>y</sup> 不同色系內同行英文字母相同者表示最小顯著差異測驗 (LSD) 在 5% 水準差異不顯著。  
Mean values within column followed the same letter in the same petal colors are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% probability level.

淺色系換錦石蒜之平均花莖長及花瓣長等性狀棲地間呈顯著差異，以東引紫澳棲地花莖長 82.8 cm 較長，西引東澳棲地僅 51.3 cm 較短，相差達 31.6 cm；花瓣長以西引東澳棲地 5.8 cm 較短，其他棲地皆在 7 cm 以上。中等色系換錦石蒜之花瓣長及總花徑等性狀棲地間亦呈顯著差異，西引后澳棲地花莖長 55.4 cm、花瓣長 6.5 cm 及總花徑 14.0 cm，其單株外觀形態偏小，與其他棲地單株具明顯差異。而深色系換錦石蒜所調查之園藝性狀，棲地間無顯著差異。極深色族群僅分佈於東引忠靈堂峽灣，其花莖長與其他花色類型相似，但花瓣長、寬、總花徑及小花徑較小且小花數較多。

就整體外觀型態而言，馬祖換錦石蒜族群，同花色不同棲地內的植株花莖長、花瓣長及總花徑等性狀具明顯差異，顯示同花色類型植株各棲地間具歧異性，且同棲地內同色系植株花型亦具有明顯差異，如寬瓣杯狀型（圖 6）及細瓣裂狀花型（圖 7）。



圖 6. 小花完全開放後，呈喇叭型且花被略寬  
Fig 6. The flower was trumpet-shape and the petals were wider as compared to the others



圖 7. 小花花被間較為分離且花被略窄  
Fig 7. The space between petals was larger, and the width of petals was narrower

## 二、換錦石蒜遺傳歧異度

本試驗先初步篩選可成功擴增條帶之 RAPD 及 ISSR 引子，分別獲得 26 個 RAPD 引子及 12 個 ISSR 引子。再依各引子擴增條帶之解析度及穩定再現性，去除產物訊號較弱的引子，選擇 15 個 RAPD（表 4）及 6 個 ISSR（表 5）反應產物清晰穩定之引子，進行 PCR 偵測全部 32 個石蒜樣品。試驗結果顯示，15 個 RAPD 引子可獲得 185 條

清晰條帶，其中 182 條具有多型性，而對照種特有條帶有 23 個，每個引子擴增條帶數 8-20 條（平均為 12.3 條，表 5 及圖 8），6 個 ISSR 引子可獲得 60 條清晰條帶，其中 60 條具有多型性，而外群特有條帶有 5 個，每個引子擴增條帶數 6-12 條（平均為 10 條，表 5 及圖 9）。

表 4. 15 組入選之 RAPD 引子序列及擴增條帶數目

Table 4. Quantity of amplicons and primer sequences of RAPD markers

引子 Primer name	序列 Primer sequence	擴增條帶數 Number of band	多型性條帶數 Polymorphic band	外群特有 Unique band for out-group
OPA02	TGCCGAGCTG	13	13	2
OPA04	AATCGGGCTG	14	14	1
OPA08	GTGACGTAGG	11	10	0
OPA10	GTGATCGCAG	15	15	2
OPA19	CAAACGTCGG	11	11	1
OPA20	GTTGCGATCC	9	9	0
OPB08	GTCCACACGG	11	11	2
OPB10	CTGCTGGGAC	19	18	2
OPE14	TCCGCTCTGG	8	8	0
OPF05	CCGAATTCCC	13	13	0
OPF06	GGGAATTCGG	20	20	5
OPJ14	CACCCGGATG	8	8	1
OPK19	CACCCGGATG	11	11	5
OPL03	CCAGCAGCTT	11	11	2
OPL12	GGGCGGTACT	11	10	1
總和 Total		185	182	23

表 5. 6 個入選之 ISSR 引子序列及擴增條帶數目

Table 5. Quantity of amplicons and primer sequences of ISSR markers

引子 primer	序列 sequence	擴增條帶數 Number of band	多型性條帶數 Polymorphic band	外群特有 Unique band for out-group
824	(TC) <sub>8</sub> G	12	12	0
827	(AC) <sub>8</sub> G	6	6	0
833	(AT) <sub>8</sub> YG	10	10	1
844	(CT) <sub>8</sub> RC	10	10	3
845	(CT) <sub>8</sub> RG	11	11	1
867	(GGC) <sub>6</sub>	11	11	0
總和 Total		60	60	5

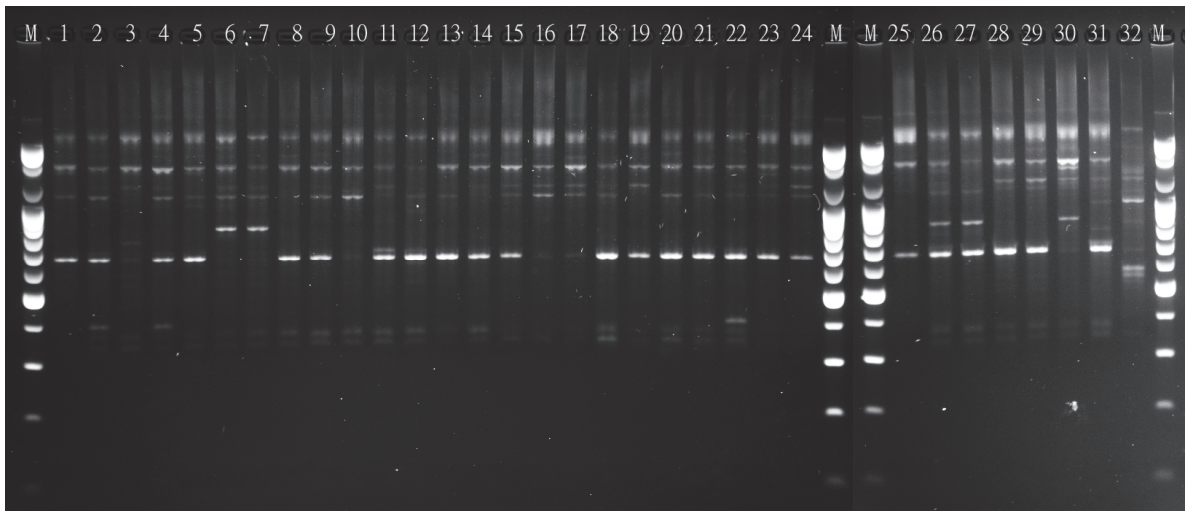


圖 8. RAPD 引子 OPB-10 所擴增之條帶

Fig 8. Amplified bands of RAPD marker OPB-10

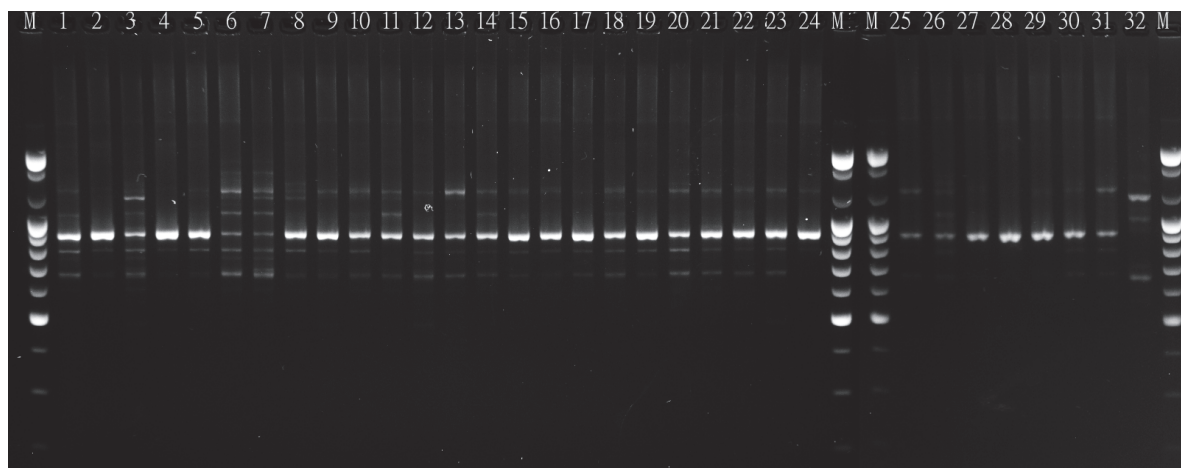


圖 9. 845 引子所擴增之 ISSR 條帶

Fig 9. Amplified bands of ISSR marker 845

將每個條帶當作一個獨立性狀以 NT-SYS 計算相似性指標 (index of similarity) (Nei and Li, 1979), 另以 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) 進行群聚分析 (cluster analysis), 並建構相似性樹狀圖 (圖 10) 及主成分分析圖 (圖 11)。結果如圖 10 顯示馬祖東引地區換錦石蒜的相似度在 0.64-0.85 之間, 金花石蒜與換錦石蒜僅有 0.53 的相似度。96.8%換錦石蒜取樣個體在相似度 0.70 為分界點時可分成三群, 第一群包括 L1-L4 (東引島忠靈堂)、L6-L13 (西引島東澳)、L14、L18、L19 (西引島后澳) 及 L20-L22 (東引島忠靈堂)。第二群包括 L25-L27 (東引島忠靈堂) 及 L28-L31 (東引島紫澳)。第三群包括 L15-L17 (西引島后澳)、L23 及 L24 (東引島忠靈堂)。

依主成分分析結果 (圖 11) 換錦花可區分為三群, L25-L27 (東引島忠靈堂) 及 L28-L31 (東引島紫澳) 為第一群; L16-L17 (西引島后澳) 與 L23-L24 (東引島忠靈堂) 為第二群; L01-L03 (東引島忠靈堂)、L07-L13 (西引島東澳)、L14、L18、L19 (西引島后澳) 及 L20-L22 (東引島忠靈堂) 為第三群, L04 (東引島忠靈堂)、L05、L06 (西引島后澳) 及 L15 (西引島后澳) 介於第二群及第三群之間。經比對樣品採集地及初步分群結果後, 除東引島紫澳樣品間 (L28-L31) 相似度高達 0.8 以上, 族群內歧異度較小外。其他三處棲地各族群內個體間具有一定歧異程度, 整體而言各棲地族群間無法按採集地點明確分群。

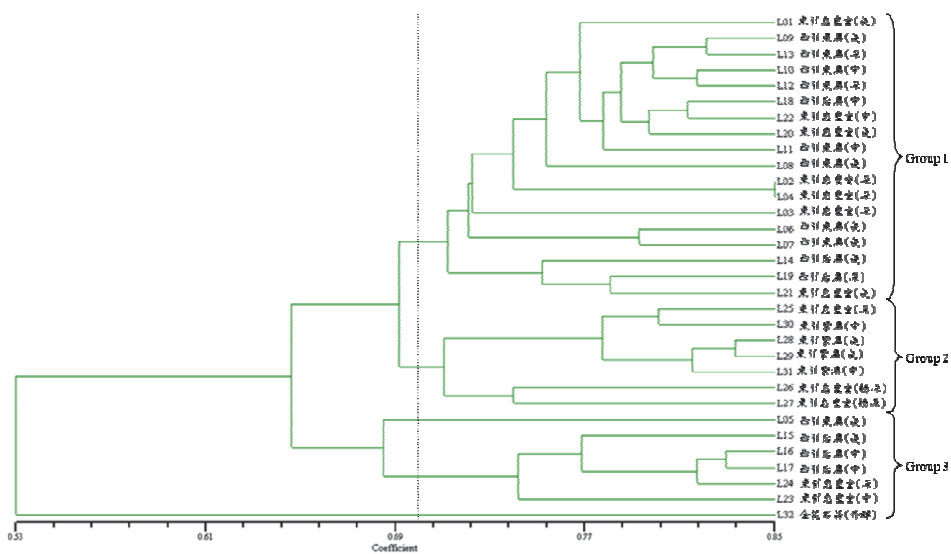


圖 10. 以 182 個 RAPD 條帶與 60 個 ISSR 條帶分析換錦花相似係數之樹狀圖  
 Fig 10. Similarity tree of *Lycoris sprengeri* individuals constructed by analysis of 182 RAPD and 60 ISSR amplicons

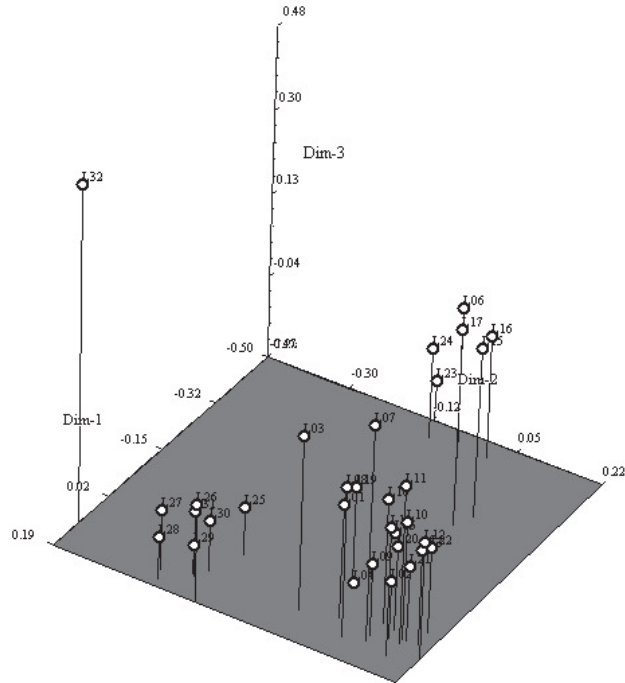


圖 11. 以 182 個 RAPD 條帶與 60 個 ISSR 條帶分析換錦花之 3D 主成分分析圖  
 Fig 11. 3D result of principal coordinates analysis of *Lycoris sprengeri* individuals constructed by analysis of 182 RAPD and 60 ISSR amplicons

比較外觀性狀與 RAPD 及 ISSR 分子標幟分析結果，顯示相同花色並無明顯分群現象。同色系單株未因同棲地有較高相似性而被分至同群中，顯示各棲地族群內個體具高度歧異性，此結果與外觀形態性狀略有不同，推論原因為各棲地內存在不同型態的單株，且其間可互相雜交，甚至與紅花石蒜 (*Lycoris radiata*) 天然雜交，因此，群內植株具變異性。多元的遺傳背景有助於東引的換錦石蒜族群適應自然環境的變遷。此結果也顯示，單就花色等少數外觀性狀的差異，無法明確區分植株間親緣關係。透過 RAPD 及 ISSR 等分子標幟的輔助可清楚了解植株間的歧異度，有利於日後復育或育種工作策略訂定及進行，以維持換錦花族群多樣化的景緻與品種創新。

## 參考文獻

- 中央氣象局。氣候統計，每月氣象資料。2012。
- 李宗翰、羅秋雄。2012。農田土壤地力及生產力增進實務。農田土壤地力及生產力增進研討會論文集。p.44-54。
- 阮明淑。2000。金花石蒜及相關種遺傳歧異性分析及核型重塑之研究。國立台灣大學園藝所博士論文。
- 阮明淑、李紅曦、許圳塗。2009。地中型球根植物石蒜(*Lycoris*)專利分析初探。園藝作物遺傳資源利用與組織培養應用研討會專集。p.148-175。國立臺灣大學園藝學系及行政院農委會農糧署出版。
- 張清榮。2007。石蒜及雙核型雜種 45S rDNA 基因與近同源重組變異研究。國立台灣大學園藝所碩士論文。
- 楊斯惟。2001。石蒜種原遺傳歧異性及親緣性之 RAPD 分析。國立台灣大學園藝所碩士論文。
- 陳泓偉。2007。石蒜雙核型雜種幼花序培養再生作用及小植株建立。國立台灣大學園藝所碩士論文。
- 陳寶銘。2002。東引鄉誌。連江縣東引鄉公所。
- Bose, S. and W. S. Flory. 1963. Phylogeny and karyotype evolution in *Lycoris*. *Nucleus* 6:141-156.
- Chang, Y.C., C.T. Shii and M.C. Chung. 2009. Variation in ribosomal RNA gene loci in spider lily (*Lycoris* ssp.) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134:567-573.



- Inariyama, S. 1931. Cytological studies in the genus *Lycoris* (Preliminary notes). Bot. Mag. Tokyo 45:11-24.
- Kurita, S. 1986. Variation and evolution in the karyotype of *Lycoris*, Amaryllidaceae. 1. General karyomorphological characteristics of the genus. *Cytologia* 51: 803-815.
- Nelson, D. W. and L. E. Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In A. L. Page et al (ed.) Methods of soil analysis, part 2. 2nd ed. Agronomy Monograph no.9, p.539-579.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 76:5129-5273.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids research. 18:6531-6535.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176-183.

## 附錄、馬祖東引地區換錦石蒜棲地土壤調查

東引鄉基岩構成大部份為花崗岩，且採樣點為野生棲地環境，未人工施肥或土壤改良，風化的土壤呈現酸性反應，且電導度低。土壤理化性質如附表 1 所示，整體而言，東引島棲地土壤 pH 值 < 5.0 偏酸性，西引島棲地東澳及后澳土壤 pH 值分別為 5.5 及 5.7 偏微酸性；電導度偏低，介於 0.09 至 0.12 dS m<sup>-1</sup> 之間；有機質含量以西引島東澳 71 g kg<sup>-1</sup> 較高，其餘介於 46 至 52 g kg<sup>-1</sup> 間。由於棲地土壤偏酸性，鐵、鋁離子活性高，磷易與其作用成不溶形態，有效性磷含量偏低(李, 2012)，介於 4.5-9.5 mg kg<sup>-1</sup> 間。

有效性鉀含量以西引島后澳 166 mg kg<sup>-1</sup> 較高，東引島紫澳 89 mg kg<sup>-1</sup> 較低。有效性鈣含量以西引島東澳 740 mg kg<sup>-1</sup> 較高，東引島忠靈堂 248 mg kg<sup>-1</sup> 較低。鎂含量範圍在 552 mg kg<sup>-1</sup> 至 199 mg kg<sup>-1</sup> 之間，以西引島東澳較高，東引島忠靈堂附近較低。雖然鉀、鈣及鎂等鹽基在強酸性土壤下易受雨水之淋洗而流失(李, 2012)，但該四棲地土壤仍保有較高含量之有效性鎂，推測其原因應與棲地長年受含高量氯化鎂海水及海風吹襲有關。整體而言，其原生環境土壤磷較為缺乏，鉀及鎂含量足夠，且地表植被及腐化的有機質可提供換錦花種球陰涼多濕的生長環境。

附表 1. 東引島嶼四個棲地土壤理化性質。

Appendix table 1. Physical and chemical properties of soil in 4 habitats locate at Tungyin islet.

棲地地點 habitat	酸鹼值 pH (1 : 5)	電導度 EC (1 : 5)	有機質 O.M	Bray-1 磷 P	可萃取鉀 Mehlich-1. K	可萃取鈣 Mehlich-1. Ca	可萃取鎂 Mehlich-1 Mg
		dS m <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>		----- mg kg <sup>-1</sup> -----		
東引島紫澳 Tzu-ao	4.7	0.09	52	9.4	89	252	266
東引島忠靈堂 Chung-ling-tang	4.5	0.11	46	9.5	95	248	199
西引島后澳 Hou-ao	5.7	0.10	52	8.2	166	556	457
西引島東澳 Tung-ao	5.5	0.12	71	4.5	163	740	552

## Genetic Diversity of *Lycoris sprengeri* in Ma-Tzu Using Phenotype, RAPD and ISSR Molecular Markers<sup>1</sup>

Shun- Hui Chiang<sup>2</sup>, Chih-Hsin Yeh<sup>2</sup>, Shi-Lian Tsai<sup>3</sup>, Er-Yuan Tsau<sup>3</sup>,  
Fang-Shin Liao<sup>2</sup>, and Yang-Jen Fu<sup>2</sup>

### Abstract

The purpose of this research was discussing genetic diversities within groups and between groups of four habitants of *Lycoris sprengeri* native in Tung-yin Township in Ma-tzu. Through collection of genetic resource and phenotype data of *Lycoris sprengeri* in Tung-yin, the relationship between individuals in different habitants was figured and useful for the following work of restoration and breeding. The investigation included morphological and molecular marker analysis. Phenotypes included length of scape and petal, width of petal, floret number, size of floret and cyme. In molecular marker analysis, DNA samples of *Lycoris sprengeri* collected from 4 habitats was analyzed with 15 RAPD markers and 6 ISSR markers. Through genetic similarity matrix and Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean conducted by NT-SYS, the genetic diversity of *Lycoris sprengeri* in Tung-yin was estimated by similarity tree and principle coordinates analysis results. As a result, there were significant differences in length of scape, length of petal and diameter of cyme between individuals of the same color types in different habitants. On the other hand, the similarity coefficient of the collected samples was ranged in 0.64-0.85, and there was no obvious grouping among individuals in the same habitats. However, diversities was existed in each habitats. The results benefited *Lycoris sprengeri* adapting to environmental changes and work of restoration and breeding program we want. It is worth to preserve the diversely genetic resources in the small island that could be considered as secondary center of diversity.

Key words: *Lycoris sprengeri*, Tung-yin Township, genetic diversity, RAPD, ISSR

---

<sup>1</sup>. Contribution No.444 from Taoyuan DARES., COA.

<sup>2</sup>. Assistant Researcher (Corresponding author, bluebluemoon@tydais.gov.tw), Associate Researcher, Researcher and Vice Director, respectively, Taoyuan DARES, COA.

<sup>3</sup>. Former Technical Specialist and former Chief, Bureau of Construction, Lienchiang County Government.