

研究報告

應用 ISSR 分子標誌探討台灣產香桂 (樟科) 之遺傳變異¹何坤益²

【摘要】香桂 (*Cinnamomum subavenium* Miq.) 為樟科 (Lauraceae) 樟屬 (*Cinnamomum*) 之重要原生樹種，本研究應用簡單重複序列 (Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR) 分子指紋技術，探討其族群的遺傳變異與親緣關係。分析臺灣自然分佈之 9 地區 72 個樣本，使用了 17 個 ISSR 引子進行聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR) 得到 150 個條帶，其中多型性條帶有 78 條 (52%)。分子變方分析 (AMOVA) 結果，族群間之變方成分是 16.45% ($p < 0.001$)，族群內的變方成分是 83.55% ($p < 0.001$)，族群遺傳變異成分來自於族群內。POPGENE 分析結果顯示，族群 Nei's 基因歧異度值為 0.3944，遺傳分化指數 (Gst) 為 0.3642，基因流 (Nm) 為 0.8730。歸群分析與主座標分析結果無地理親緣關聯，推測為生育環境之差異，族群基因流受限制，具有較高的基因歧異度與遺傳分化現象。

【關鍵詞】遺傳變異、簡單重複序列、分子變方分析、香桂

Research paperGenetic Variation of *Cinnamomum subavenium* Miq. (Lauraceae) in Taiwan Using ISSR Markers¹Kuen-Yih Ho²

【Abstract】*Cinnamomum subavenium* Miq. is an endemically important species in Taiwan belonging to the genus of *Cinnamomum* in Lauraceae family. In the present study as ISSR molecular markers and 17 corresponding primers were applied, 72 individuals collected from 9 sampling sites around Taiwan were studied and resulted in a total of 150 bands. Among them, 78 bands were polymorphic (52%). Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed that the component of variance among populations was 16.45% ($p < 0.001$) and was attributed to the population differentiation. The main variance was counted 83.55% due to differentiation within populations; this main variance within populations was shown to be highly significant ($p < 0.001$). Analysis of the population genetic variances (Popgene) demonstrated that there are remarkable genetic diversity (genetic diversity : 0.3944, Gst : 0.3642) and low level of gene flow (Nm : 0.8730). The results of this analysis were probably due to the influence from the different environment that has not restricted the gene flow

1 本研究為國科會補助計畫之研究成果 (93WIB0205001)，謹此致謝

2 助理教授 嘉義大學森林暨自然資源學系

Assistant Professor, Department of Forestry and Natural Resources, National Chiayi University.

e-mail: kyho@mail.ncyu.edu.tw

but higher promote a higher genetic differentiation. Cluster analysis and Principal Coordinate analysis (PCOA) similarly revealed that the genetic differentiation may be caused by different environments while habitat influences and space order are not be corresponding to the geographical relationships.

【**Key words**】 genetic variation, Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Analysis of molecular variance (AMOVA), *Cinnamomum subavenium* Miq.

一、前言

香桂 (*C. subavenium* Miq.) 為臺灣原生常綠喬木，屬於樟科 (Lauraceae) 樟屬 (*Cinnamomum*) 植物，產於華南及台灣中低海拔 300-2000 m 闊葉林分中之冠層樹種 (劉業經等, 1994)。全株富含單寧成分，有濃烈肉桂香味，尤其是樹皮有辛辣的肉桂香味，可代替肉桂供藥用及香料，俗名假肉桂 (劉棠瑞、廖日京, 1971)。本種於天然林之蓄積、與利用為重要闊葉樹種資源，且為廣泛分佈之物種，然其族群多以孔隙進行更新導致族群基因結構與遺傳分化之變異。

近年來，分子標記 (molecular marker) 廣泛應用在生物的研究，甚至用於生態學、分類學、遺傳學及生物地理學的研究。Zietkiewicz 等人 (1994) 所發展以 PCR (polymerase chain reaction) 技術為基礎之 ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子指紋標記，具操作方便、所需 DNA 樣本量少，但多型性高 (polymorphism)、及再現性 (amplification reproducibility) 明確等優點。已廣泛應用於遺傳連鎖分析及建構遺傳圖譜 (Xie *et al.*, 2005；

Chuang *et al.*, 2004)、研究物種族群遺傳變異 (何坤益, 2006；Li and Xia, 2005)、和區分種內或栽培種 (王昭月等, 2005；賴瑞聲等, 2005) 及研究自然族群的雜交現象 (鄧書麟等, 2005；Ho *et al.*, 2005) 等。

台灣之香桂族群廣泛分布於中低海拔地區，範圍包括北部、中部、南部及東部地區之天然闊葉林主要組成冠層樹種，為探討環境與遺傳變異關係，本研究應用 ISSR 分子指紋技術，嘗試建立分子遺傳資料，提供資源保育及族群變異等研究參考，然有限人力及時間，實無法兼顧全島之族群變異，故僅就所採得樣本進行分析與討論。

二、材料與方法

(一) 材料

本研究自 2004 年 9 月起進行各地族群之收集，至 2005 年 4 月僅採集 9 處自然香桂分佈地區 (如表 1 及圖 1)，每區採取 3-12 個樣株，採得 72 單株，每株選取無病蟲害 5-10 葉片，以矽膠乾燥劑脫水乾燥，2006 年初完成相關試驗分析。

表 1. 香桂之試驗編號、採樣地點、海拔高度與樣本數目

Table 1. Sources Code, collected site, elevation, sample size of *C. subavenium*.

試驗編號	採樣地點	海拔高度 (m)	樣本數目
A	廬山：南投縣廬山	1400	10
B	扇平：高雄縣扇平	1400	10
C	福山：宜蘭縣福山	1600	5
D	阿玉西峰：宜蘭縣阿玉西峰	800	5
E	谷關：台中縣谷關	500	6
F	北插：台北縣北插天山	500	9
G	北德拉曼：新竹縣北德拉曼	300	12
H	屯野生台山：新竹縣屯野生台山	400	12
I.	拔刀爾山：台北縣拔刀爾山	850	3

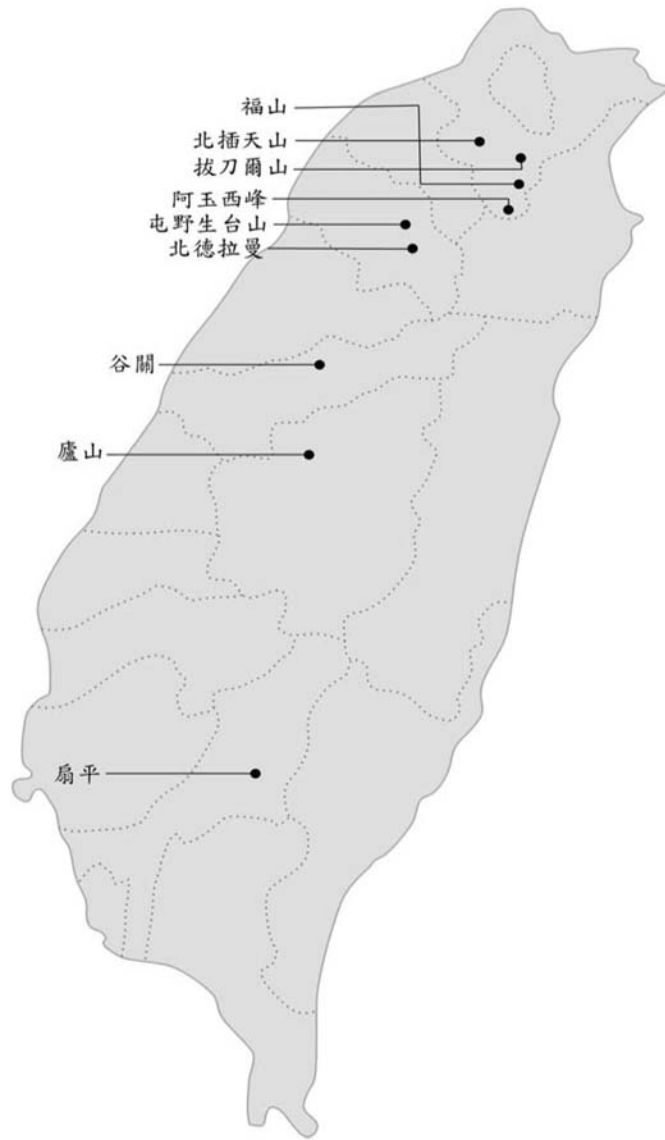


圖 1. 香桂之採集地理位置圖

Fig. 1. Geographic locations of the studied of *C. subavenium*.

(二) 方法

1. Genomic DNA 之萃取及定量：參考 Kobayashi 等 (1998) CTAB 萃取法，以分光光度計測定 DNA 濃度。
2. 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction ; PCR)：參考 Doyle 和 Doyle (1987) 方法，ISSR 引子取自 UBC (University of British

- Columbia) 之 100 組引子，經最佳化測試 (optimization) 篩選共 17 組最合適之引子。進行 PCR 反應，設定：
- (1) 前期變性 (primary denaturation)：94°C，5 min；雙股 DNA 充分變性單股。
 - (2) 變性 (denaturation)：94°C，30 sec。
 - (3) 引子黏合 (annealing)：52°C-60°C，50 sec；

引子間有不同之最適黏合溫度。

(4)延伸 (extension) : 72°C, 2 min; 此溫度為 Taq DNA 聚合酶最適進行 DNA 複製延伸之溫度。上述 2、3、4 步驟反覆循環 35 次, 維持 72°C, 7 min。

3. 電泳 (electrophoresis) : PCR 擴增之產物以 1.5% Agarose 膠體電泳分離產物。電泳緩衝液為 0.5×TBE buffer, 電壓為 200V 分離 100min。

4. 染色與照相: 以溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色, 於 UV 燈下顯影拍照紀錄。

(三) 分子性狀統計分析

1. 分子性狀紀錄: 記錄強度較強且較清晰的條帶並以代碼 0 或 1 代表條帶出現之與否, 利用 NTSYS 軟體 (Rohlf, 1993), 以 Simple Matching 公式計算兩兩樣本間之相似度, 建立相似度矩陣 (Dice, 1945)。

2. AMOVA 分析 (Analysis of Molecular Variance) : 利用 AMOVA 軟體進行分析 (Excoffier *et al.*, 1992), 計算族群間、族群內個體間之變方成分值及其所佔總變方成分之百分比, 並計算出各族群間的遺傳距離 (Φ_{st}) 矩陣。

3. POPGENE 分析: 以 POPGENE 軟體計算族群遺傳變異 (Yeh *et al.*, 1997), 假設各族群達哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium), 遺傳歧異度指數 (Nei's gene diversity, H 值; Nei, 1973)、遺傳分化係數 (genetic differentiation G_{st} 值; Nei, 1973) 及遺傳距離 (Nei, 1978), 利用 G_{st} 估算基因流 (gene flow) Nm 值。

4. 歸群分析 (Cluster analysis) : 利用 NTSYS-UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages) 分別進行歸群分析建立樹狀圖。再進行主座標分析, 以三維變異最大變異軸繪成座標圖, 求出族群變異的空間分布關係。

三、結果

(一) 引子與條帶記錄

測試 100 個隨機序列引子, 經選取擴大效果佳, 條帶亮度強, 產生的條帶具有多型性及再現性的引子, 共選用個 17 引子, 得到 150 個條帶 (表 2), 多型性條帶有 78 個 (52%), 單型性條帶有 72 個。

表 2. 香桂之 ISSR 引子與多型性條帶數條帶記錄

Table 2. ISSR primers with number of polymorphic bands (pb) of *C. subavenium*.

編號	序列 (5'~3')	條帶數	多型性條帶	單型性條帶	比例 (%)
UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	10	6	4	60.00
UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	9	5	4	55.56
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	8	5	3	65.50
UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	10	6	4	60.00
UBC830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	7	5	2	71.23
UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	8	5	3	62.50
UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	10	5	5	50.00
UBC856	TGTGTGTGTGTGTGTGRT	12	5	7	41.17
UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	10	4	6	40.00
UBC861	ACCACCACCACCACCACC	11	4	7	36.36
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	9	4	5	44.44
UBC865	CCGCCGCCGCCGCCGCCG	7	4	3	57.14
UBC866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	9	4	5	44.44
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	6	4	2	66.67
UBC888	BDBCACACACACACACA	11	4	7	36.36
UBC889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	7	4	3	57.14
UBC891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	6	4	2	66.67
		150	78	72	52

(二) 分子變方分析 (AMOVA) 分析與 POPGENE 分析

分子變方分析結果，族群間變方成分是 16.45% ($p < 0.001$)，族群內變方成分是 83.55% ($p < 0.001$) (表 3)，顯示族群已有分化傾向，但大部分變異仍在族群內。

POPGENE 分析結果 Nei, s 基因歧異度值為 0.3944 (表 4)，各地區族群為 0.1289-0.3303，以屯野生台山最高 0.3303；拔刀爾山最低 0.1289。族群間之遺傳分化係數為 0.3642，以 Gst 估算基因流為族群基因流為 0.8730。

表 3. 香桂 ISSR 遺傳變異分析之分子變方成分分析表

Table 3. Analysis of Molecular Variance based on ISSR bands of *C. subavenium*.

Source of variation	df	SSD	MSD	Variation component	Total var. (%)	p-value
Variance among populations	8	278.73	34.84	2.6951	16.45	< 0.001
Variance within populations	63	862.63	13.69	13.6925	83.55	< 0.001

表 4. 香桂 ISSR 遺傳變異分析之 POPGENE 分析結果

Table 4. POPGENE analysis of genetic diversities, genetic differentiation, and gene flow based on ISSR bands of *C. subavenium*.

試驗代號	採集地點	基因歧異度	遺傳分化	基因流 (Nm ⁴)
A	廬山	0.3190		
B	扇平	0.3134		
C	福山	0.1588		
D	阿玉西峰山	0.2375		
E	谷關	0.2373		
F	北插天山	0.2575		
G	北德拉曼山	0.2646		
H	屯野生台山	0.3303		
I	拔刀爾山	0.1289		
合計	合計	0.3944	0.3642	0.8730

¹⁾ H = (1973) genetic diversity.

²⁾ G_{st} = genetic differentiation.

³⁾ Nm = gene flow.

(三) 歸群與主座標分析

族群遺傳分析計算兩兩族群之遺傳距離矩陣 (表 5)，經比對遺傳距離矩陣與相似度矩陣所得之協表相關係數 (cophenetic correlation coefficient) 為 0.7779，顯示此歸群圖尚未扭曲可表現真實之群團狀態；由歸群圖所呈現親緣

關係 (圖 2)，發現族群間之分佈地理關聯不顯著。主座標分析 (PCOA) 結果，第一維可解釋 56.36%，第二維可解釋 26.20%，第三維可解釋 9.74%，三維座標共解釋 92.30%；由三維 (圖 3) 及二維座標圖 (圖 4) 明顯看出族群間並無地理親緣關係。

表 5. 香桂之 ISSR 遺傳變異分析之遺傳距離 (Φ_{st}) 矩陣Table 5. Nei's genetic distance (Φ_{st}) based on ISSR bands of *C. subavenium*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A	0.0000								
B	0.1522	0.0000							
C	0.1810	0.0569	0.0000						
D	0.0587	0.2826	0.2513	0.0000					
E	0.1859	0.0816	0.1779	0.2547	0.0000				
F	0.1781	0.1967	0.2776	0.2756	0.2155	0.0000			
G	0.0520	0.2244	0.229	0.0451	0.2263	0.2049	0.0000		
H	0.0916	0.169	0.1705	0.1331	0.1683	0.1188	0.0953	0.0000	
I	0.0910	0.2632	0.3589	0.1438	0.2742	0.2241	0.1286	0.0448	0.0000

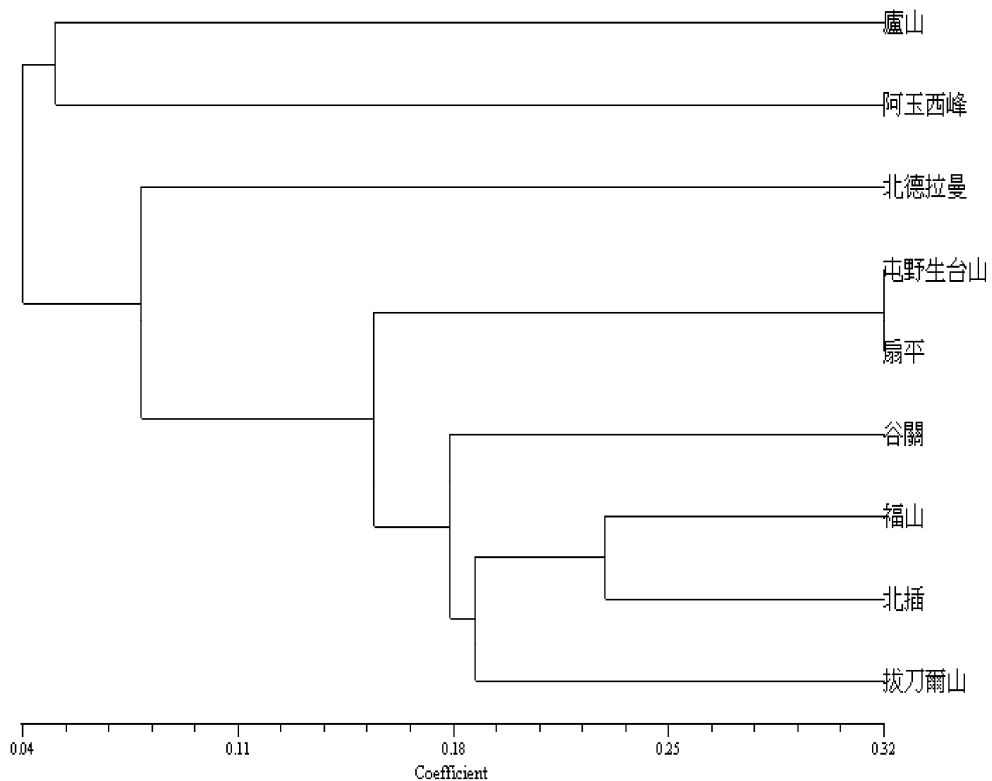


圖 2. 香桂 ISSR 遺傳變異分析之歸群分析 (UPGMA) 樹狀圖

Fig. 2. UPGMA dendrogram based on ISSR bands of *C. subavenium*.

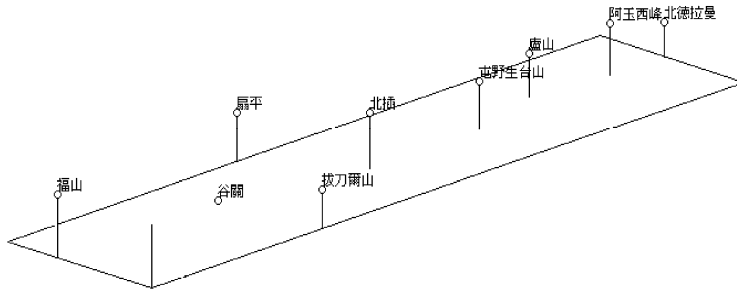


圖 3. 香桂 ISSR 分析之主座標分析座標圖

Fig. 3. Results of 3-dimensional principal coordinate analysis based on ISSR bands of *C. subavenium*.

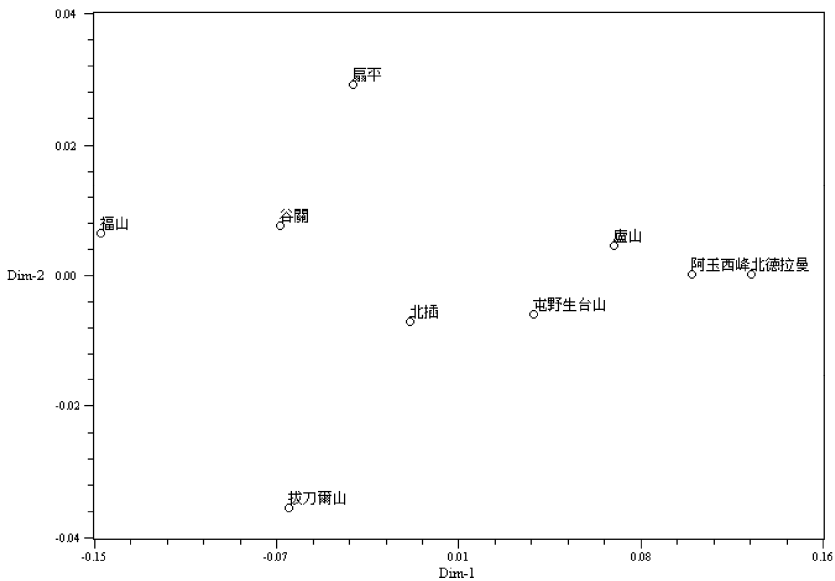


圖 4. 香桂 ISSR 分析之二維主座標分析座標圖

Fig. 4. Results of 2-dimensional principal coordinate analysis based on ISSR bands of *C. subavenium*.

四、討論

分子變方分析 (AMOVA) 結果族群間之變方成分是 16.45% ($p < 0.001$), 族群內的變方成分是 83.55% ($p < 0.001$), 顯示其族群已有分化之傾向, 但大部分之變異仍存在於族群內 (表 3)。Ge 等 (2003) 以 ISSR 研究稀有植物 *Tetraena mongolica* Maxim 其變方成分分析結

果, 顯示 15.2% 的變方成分存在於族群間, 84.8% 存在於各地區族群; 蔡依綺 (2004) 應用 ISSR 研究中高海拔植物刺柏 (*Juniperus formosana* Hayata) 之族群遺傳變異, 其變方成分 22.79% 存在於族群間, 77.03% 存在於各地區族群, 說明其族群已有分化之傾向。此結果符合 Bartish 等 (1999) 研究指出, 分布廣泛且

異交的多年生木本植物，其遺傳變異大多存在於族群內個體間的結果，本種自然分布之族群亦已有分化傾向，且如 *T. mongolica* 與刺柏等族群，雖部分變異存在於各族群樣本內，但族群有明顯的分化趨勢。即香桂自然分布之族群已有分化之傾向，且大部分變異存在於族群內。

相關研究顯示不同植物間之遺傳結構差異，如台灣特有種杜鵑中玉山杜鵑 (*Rhododendron pseudochrysanthum* Hayata) 分布最廣泛也是海拔最高的杜鵑種類，Nei's 基因歧異度為 0.3371，顯示地區間及族群間分化顯著 (遺傳分化指數為 0.2659)，唯其繁殖授粉無法打破距離限制，而導致地區間族群無法有較頻繁的基因交流 (基因流為 1.38)，以及適應不同環境所產生之地區天擇有關 (鄭之煒，2003)。刺柏 (*Juniperus formosana* Hayata) 原生柏屬植物，為台灣高山植物群落社會初生或次生演替的代表灌叢樹種，Nei's 基因歧異度為 0.3536，族群間的分化程度則高於一般針葉樹平均 (遺傳分化係數為 0.2177)，族群變異受到族群生育環境的影響 (基因流為 1.797) (蔡依錡，2004)。唐杜鵑 (*R. simsii* Planch.) 在台灣呈現特殊的南北分佈，個體變異極大，Nei's 基因歧異度值為 0.3423，族群變異受到地理距離的影響 (基因流為 0.4841) (陳硯茹，2005)。而香桂族群雖為廣泛分布種類，但族群之 Nei's 基因歧異度為 0.3944，遺傳分化指數為 0.3642，已達玉山杜鵑、刺柏或唐杜鵑等之水準；依照 Hamrick 等 (1992) 研究所做的 Isozymeg 數據之統計結果，蟲媒花異交植物之 Nei's 基因歧異度值平均為 0.211，特有種到廣泛分佈種之 Nei's 基因歧異度值為 0.078-0.257，自交植物具有最高的族群遺傳分化 (G_{st} 值平均 0.51)，異交的風媒花植物最低 (0.143)，異交的蟲媒花植物之介於中間 (平均 0.197)，而與同樣為木本植物具有蟲媒花、種子由風傳播等遺傳歧異度特性相比具有較高之基因歧異度，同時介乎異交的蟲媒花植物與自交植物之間；由以上顯示其基因歧異度偏高，族群遺傳結構之已有分化。目前所

收集之樣本族群顯示其中以屯野生台山地區之 Nei's 基因歧異度為 0.3303 最高，可能是位於樣區族群間而與各地基因交流而增加歧異度 (圖 3 及圖 4)；而拔刀爾山地區最低此或與採得之個體數量稀少尚未充分反應族群基因歧異度有關 (表 1 及表 4)。

香桂族群之遺傳分化係數估算基因流值 N_m ，族群基因流為 0.8730。依 Wright (1931) 認為族群間的基因流值若大於 1，則易使遺傳結構均質化，反之，若值小於 1 則表示基因流受到部份地理阻礙，由於基因流傳是族群遺傳結構分化的主因之一，若基因流使兩個地方性族群的基因庫 (gene pool) 產生交流，則族群分化程度降低 (Slatkin. and Barton, 1989)。因此，香桂族群基因流顯然受到地理限制；由 AMOVA 分析亦呈現此趨勢 (族群間變方成分為 16.45%)，加上族群所具較高之遺傳歧異度與遺傳分化係數，其族群間可能已有分化趨勢。

香桂為台灣天然闊葉樹林分冠層樹種，族群更新苗卻多在於林緣或孔隙處出現，並以孔隙種方式進行族群更新，隨其林緣或孔隙微氣候以持續生長；林文智等 (2004) 於台灣南部多納針闊葉林土壤庫與森林更新之調查；及張乃航等 (1998) 調查福山地區之次生闊葉林土壤種子庫及幼苗動態，所發現本種為冠層優勢樹種，更新多存活於林緣或孔隙處所證實；同時依洪富文等 (1994) 研究福山次生樟櫛林孔隙更新的關係，發現光度與養分對於其持續發育有密切影響，隨林緣或孔隙更新而產生族群消長。各地區之林下幼苗之持續成長發育，與各生育環境有密切關係，同時遺傳變異來自於族群內之各個體間，此由 AMOVA 分析亦呈現此趨勢 (族群內之各個體間變方成分為 83.55%)，可能引起族群分化之重要原因。

香桂族群歸群分析之結果，由歸群圖所呈現族群關係，發現族群間並無地理分佈之關聯 (圖 2)；為瞭解族群之親緣關聯，再進行主座標分析 (PCOA)，結果由三維 (圖 3) 及二維座標圖 (圖 4) 明顯看出族群間並無地理親緣關係。

一般之族群分化起源有多種模式，如隨環境梯度變化而成漸變模式，或是不同生態環境造成分化而不會對應空間分布，以及地理距離的隔離造成分化，或者不同的族群發育歷程造成分化等 (Sokal and Oden, 1978)。本研究結果香桂族群遺傳變異並無地理間關聯，可能主要由生育地生態環境差異而導致於遺傳分化，因此未對應於地理空間之關係，乃致於各地區族群並無關聯。本種為台灣闊葉樹林之重要樹種，且蓄積量大之森林資源，推測由於其族群廣泛分布，族群間基因流傳可經由授粉傳導交流，卻為孔隙更新之生育環境汰選，增加使其族群內因適應環境之遺傳變異，由現有生育環境差異、地形與氣候變化複雜，逐漸導致族群間遺傳分化之趨勢；唯目前族群其繁殖系統尚順暢，表現於遺傳之多樣化，可持續維持族群發育。

五、結論

香桂為台灣闊葉樹林之重要樹種，過去未曾探討其族群遺傳變異，本研究應用 ISSR 分子標誌進行遺傳變異分析，由族群分子變方分析 (AMOVA) 顯示族群已有分化之傾向，但大部分之變異成分仍存在於族群內；族群遺傳變異分析結果具有較高之基因歧異度與族群分化，顯然由於遺傳分化趨勢，而基因流傳較低之現象；同時各地區族群遺傳變異之歸群與主座標分析結果，其族群遺傳變異未對應於地理位置，推測可能與更新期處於林緣或孔隙，苗木受氣候等生育環境變動之較大於族群遺傳分化之影響所致。

目前族群基因流傳雖受到限制，但為台灣闊葉樹林之重要優勢族群並廣泛分佈，經由授粉媒介充分基因交流，故以孔隙更新繁衍，受氣候環境差異之汰選影響，使其族群適應而增加遺傳分化，表現於遺傳多樣性之結構而可持續維持發育。

誌謝

本研究承行政院農業委員會林業試驗所生物組 鐘詩文博士提供部分樣品，中埔研究中心沈勇強主任等全力協助，謹致最大謝忱。

六、參考文獻

- 王昭月、張有明、沈百奎、王毓華、劉邦基 (2005) 利用 RAPD 與 ISSR 分子標誌鑑定西瓜品種。台灣農業研究 54 : 257-269。
- 何坤益 (2006) 台灣產土肉桂、山肉桂及胡氏肉桂之核酸多型性遺傳變異。台灣生物學報 41 (2) : 93-102。
- 林文智、郭耀綸、陳泳修、張乃航、洪富文、馬復京 (2004) 台灣南部多納針闊葉林土壤庫與森林更新。台灣林業科學 19 (1) : 33-42。
- 洪富文、程煒兒、游漢明、馬復京 (1994) 光度與養分對於福山次生樟儲林苗木生長的影響。林業試驗所研究報告季刊 9 (3) : 257-265。
- 張乃航、馬復京、游漢明、許原瑞 (1998) 福山地區次生闊葉林土壤種子庫及幼苗動態。台灣林業科學 13 (4) : 279-289。
- 陳硯茹 (2005) 應用 ISSR 研究唐杜鵑之族群遺傳變異。國立中興大學生命科學系碩士論文。85 頁。
- 蔡依綺 (2004) 應用 ISSR 研究刺柏之族群遺傳變異。碩士論文。國立中興大學生命科學系碩士論文。63 頁。
- 賴瑞聲、高瑞隆、林義恭、胡敏夫、劉新裕 (2005) 山藥種原外表形態及分子標記之變異研究。台灣農業研究 54 : 195-206。
- 鄧書麟、呂福原、何坤益 (2005) 台灣鬼針屬 *Bidenspilosa* 種群遺傳變異之研究。中華林學季刊 38 (4) : 397-408。
- 鄭之煒 (2003) 應用 ISSR 研究玉山杜鵑之族群遺傳變異。國立中興大學生命科學系碩士論文。76 頁。
- 劉棠瑞、廖日京 (1971) 台灣樟科植物之訂正。

- 台灣省立博物館科學年刊 14 : 1-28。
- 劉業經、呂福原、歐辰雄 (1994) 臺灣樹木誌。國立中興大學農學院出版委員會。第 107-112 頁。
- Bartish, I. V., N. Jeppsson, and H. Nybom. (1999) Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by RAPD markers. *Molecular Ecol.* 8 : 791-802.
- Chuang, H. Y., S. J. Tsao, Lin, J. N., K. S. Chen, T. D. Liou, M. Chung, and Y. W. Yang (2004) Genetic diversity and relationship of non-heading Chinese cabbage in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45 : 331-337
- Dice, L. R. (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26 : 297-302
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull.* 19 : 11-15.
- Excoffier, L., P. E. smouse, and J. M. Quattro. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes : Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131 : 479-491.
- Ge, X. J., Y. Yu, N. X. Zhao, H. S. Chen, and W. Q. Qi. (2003) Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Teteaena mongolica* Maxim. (*Zygophyllaceae*). *Biological Conservation* 111 : 427-434.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, and S. L. Sherman-Broyles. (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6 : 95-124.
- Ho, K. Y., S. L. Deng, Y. H. Chang, C. S. Tsai, M. F. Kao, and J. Y. Hsiao, (2005) Genetic variation of endangered *Scaevola hainanensis* (*Goodeniaceae*) in the Jiangjun Stream mouth, Taiwan. *Taiwan J. For. Sci.* 20 (3) : 193-202.
- Kobayashi, N., T. Horikoshi, H. Katsuyama, T. Handa, and K. Takayanagi. (1998) A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 4 : 76-80.
- Li, F. and N. Xia. (2005) Population structure and genetic diversity of an endangered species, *Glyptostrobus pensilis* (*Cupressaceae*). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46 : 155-162.
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70 : 3321-3323.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 89 : 583-90.
- Rohlf, F. J. (1993) *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Applied Bio-statistics Inc., New York.
- Slatkin, M. and N. H. Barton. (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution.* 43 : 1349-1368.
- Sokal, R. R. and N. L. Oden. (1978) Spatial auto correlation in biology. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biological Journal of the Linnean society.* 10 : 229-249.
- Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian population. *Genetics.* 16 : 94-157.
- Xie, G. W., D. L. Wang, T. M. Yuan, and X. J. Ge. (2005) Population Genetic Structure of *Monimopetalum chinense* (*Celastraceae*), an Endangered Endemic Species of Eastern China. *Annals of Botany* 95 (5) : 773-777
- Yeh, F. C., R. C. Yang, T. B. J. Boyle, Z. H. Ye, and J. X. Mao, (1997) POPGENE 3.2, the user-friendly shareware for population

genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda,

(1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome*. 20 : 176-183.

