

研究報告

台灣與鄰近島嶼瓊崖海棠族群遺傳變異 與親緣關係之研究

鄧書麟^{1,3)} 傅昭憲¹⁾ 張坤城²⁾ 楊倩如²⁾ 黃瓊逸¹⁾

摘要

瓊崖海棠(*Calophyllum inophyllum* L.)為藤黃科(Clusiaceae)瓊崖海棠樹屬(*Calophyllum*)植物，廣泛分布於東南亞、印度、琉球、澳洲與太平洋諸島；台灣係位於本種之邊際分布區域，產於恆春半島與蘭嶼等地區。瓊崖海棠為海岸防風樹種之一，種子榨油可為化妝品及藥用，更可研發成生質能源，經濟及國土保安價值高。本研究以取自台灣、蘭嶼、東沙群島與日本琉球群島等共4個地區，8個族群，計79個瓊崖海棠樣株，應用簡單序列重覆分子指紋技術(inter-simple sequence repeat, ISSR)，來探討台灣與鄰近島嶼瓊崖海棠族群之遺傳結構及各族群間的親緣關係，共使用14個引子，獲得159個多型性條帶。POPGENE分析結果總基因歧異度(H)為0.2021，族群間之遺傳分化係數(G_{st})為0.6385，基因流(Nm)為0.2832。由族群分子變方分析(analysis of molecular variance, AMOVA)結果，島嶼間之變方成分為47.87% ($p < 0.001$)，島嶼內族群間之變方成分為14.53% ($p < 0.001$)，族群內個體間之變方成分為37.60% ($p < 0.001$)，顯示在不同島嶼與族群間已有分化趨勢。依歸群及主座標分析結果可區分為4大群，台灣、蘭嶼、東沙群島與日本琉球群島的族群均各自集成群。透過Mantel test結果顯示，族群間地理距離與遺傳距離並不顯著($r = 0.78$, $p = 0.99$)，各族群呈隨機散佈，遺傳漂變在族群分化上扮演重要角色。綜言之，瓊崖海棠族群間基因流並不暢通，不同族群間已呈分化現象，且依歸群分析所得各族群之群聚現象，亦佐證不同島嶼間已有顯著分化，推測應受島嶼隔離之影響，導致基因流受阻並產生遺傳漂變所致。此外，瓊崖海棠族群總體的基因歧異度相較於其他濱海植物相對較低，因此建議除應採取就地保育之措施來保存現有瓊崖海棠族群外，更需進行遷地保育來保護。

關鍵詞：瓊崖海棠、族群遺傳變異、遺傳歧異度、基因流。

鄧書麟、傅昭憲、張坤城、楊倩如、黃瓊逸。2017。台灣與鄰近島嶼瓊崖海棠族群遺傳變異與親緣關係之研究。台灣林業科學32(2):145-57。

¹⁾ 林業試驗所中埔研究中心，60081嘉義市文化路432巷65號 Taiwan Forestry Research Institute, No. 65, Lane 432, Wunhua Rd., Chiayi 60081, Taiwan.

²⁾ 嘉義大學林業暨自然資源研究所，60004嘉義市學府路300號 Department of Forest, National Chiayi University, 300 University Rd., Chiayi 60004, Taiwan.

³⁾ 通訊作者 Corresponding Author, e-mail:dengsl@tfri.gov.tw

2016年4月送審 2016年7月通過 Received April 2016, Accepted July 2016.

Research paper

Population Genetic Variations of *Calophyllum inophyllum* in Taiwan and on Nearby Islands

Shu-Lin Deng,^{1,3)} Chao-Hsien Fu,¹⁾ Kun-Cheng Chang,²⁾
Chien-Ju Yang,²⁾ Chiung-Yi Huang¹⁾

[Summary]

Calophyllum inophyllum L. belongs to the genus *Calophyllum* (Clusiaceae) which is widely distributed in Southeast Asia, India, Okinawa (Japan), Australia, and the Pacific Islands. Taiwan is located at the edge of the species' distribution area, and the species is mainly distributed on the Hengchun Peninsula and Lanyu. *C. inophyllum* is one of the coastal windbreak trees, and its seed oil can be extracted and used for cosmetics and medicinal purposes and also developed into biomass energy; so, it possesses high value for landscaping and economics. In this study, genetic variations and the population genetic structure of 79 individuals sampled from 8 populations in Taiwan, Lanyu, the Pratas Island, and Okinawa (Japan), were examined using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. For a total, 14 primers were used and 159 polymorphic sites were detected. A POPGENE analysis revealed that the total gene diversity (H) was 0.2021, the genetic differentiation index (Gst) was 0.6385, and the gene flow index (Nm) was 0.2832. An analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the variance component between population regions was 47.87% ($p < 0.001$), that of populations within regions was 14.53% ($p < 0.001$), and the among individuals within populations was 37.60% ($p < 0.001$). The results indicated significant genetic differentiation among islands and among population within island. In addition, the Mantel test showed that there was no significant relation between the genetic distance and geographic distance ($r = 0.78, p = 0.99$), pointing to a random distribution among populations. In conclusion, the gene flow among populations was relatively restricted, and populations on different islands showed significant genetic differentiation. Based on results of the UPGMA cluster analysis, the clustering of populations proved significant genetic differentiation among islands. It was speculated that geographic segmentation may be a significant factor in the genetic differentiation among the 4 regions. In addition, the genetic diversity of *C. inophyllum* is relatively low compared to those of other coastal plants. Based on the above findings, both in-situ and ex-situ conservation approaches are necessary for this species.

Key words: *Calophyllum inophyllum* L., population genetic variation, genetic diversity, gene flow.

Deng SL, Fu CH, Chang KC, Yang CJ, Huang CY. 2017. Population genetic variations of *Calophyllum inophyllum* in Taiwan and on nearby islands. *Taiwan J For Sci* 32(2):145-57.

緒言

瓊崖海棠(*Calophyllum inophyllum* L.)係屬藤黃科(Clusiaceae)瓊崖海棠樹屬之常綠大

喬木，廣泛分布於東南亞、印度半島、澳洲與太平洋諸島(Liu et al. 1994)。台灣則位於本種

之邊際分布區域，產於恆春半島與蘭嶼等地區，為海岸防風林樹種之一，因樹形優美，樹性強壯耐瘠，亦為良好之園林樹。其木材質地細膩，具有特殊紋理，可用於傢具、建築及造船；種子富含油脂，可作藥物、化妝品之原料及生質燃料(Friday and Okano 2006, Ong et al. 2011)。此外，Patil et al. (1993)從瓊崖海棠中分離的香豆素(coumarins)化合物inophyllum B和inophyllum P，具顯著的抑制HIV (人類免疫缺陷病毒)逆轉錄酶活性；Itoigawa et al. (2001)從瓊崖海棠中分離到的pancibiflavonol等黃酮類化合物也顯示出抗腫瘤活性，故本種實兼具經濟栽培及國土保安之價值。

瓊崖海棠果實能漂浮於水上，和蓮葉桐(*Hernandia nymphiifolia* (Presl) Kubitzki)、棋盤腳樹(*Barringtonia asiatica* Vidal.)及銀葉樹(*Heritiera littoralis* Dryand.)等均屬於海漂植物，其特性可抵抗強風及水淹環境。但近年來由於台灣海岸林遭過度開發及經濟發展利用等因素，不但適生環境遭破壞，原生族群數量也大幅縮減，早已被列為墾丁國家公園內之稀有植物(Hsu et al. 1985)。因此，為加強本物種之保育與推廣，實應就此物種積極建立基礎資料，以供後續研究之參考。

近年來由於DNA指紋分析技術的快速進展，除可檢測遺傳物質的變異外，更可獲致大量遺傳變異訊息，較之以往利用蛋白質序列及化學分析為基礎的方法更佳，更彌補了使用同功酶分析時其基因座數目偏低的缺憾。由Zietkiewicz et al. (1994)所發展的簡單序列重覆分子指紋技術(inter-simple sequence repeat；簡稱ISSR)，所得之產物比逢機擴增多型性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)具更高的重覆性和穩定性，符合Mendelian遺傳定律，因此可得到較高可信度的遺傳多型性資料。加上ISSR在引子設計上比SSR (simple sequence repeats)簡單，無需知道DNA序列即可運用引子進行擴增，且其基因座具中性演化(neutral evolution)內涵，演化速率較快，可提供更高的族群變異估值，故已被廣泛運用於植物遺傳多樣性與親緣關係之研究上(Wei et al.

2008, Deng et al. 2014, Hsieh et al. 2014)。本研究應用ISSR來分析台灣與鄰近島嶼瓊崖海棠族群的遺傳變異，除探討其族群遺傳結構及族群間親緣關係外，同時依據其族群遺傳結構特徵提出有效的保護措施與經營策略，俾供後續研究與保育推廣之參考。

材料與方法

一、植物材料

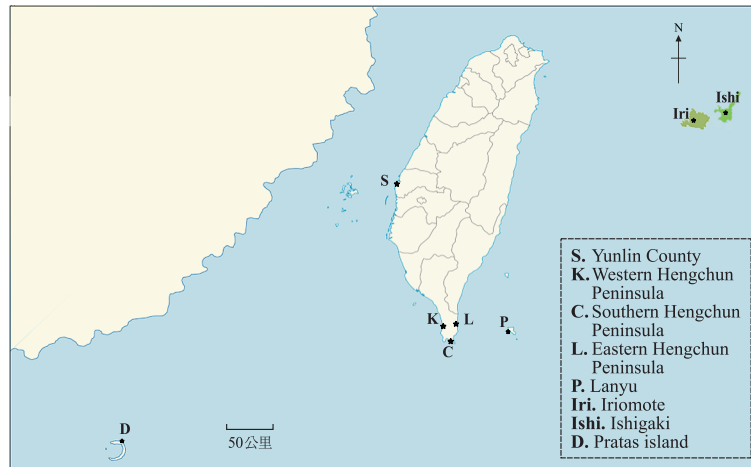
針對台灣、蘭嶼、東沙群島及日本琉球群島等4個地區，計8個瓊崖海棠族群進行取樣，計79個有效樣株，採集已成熟之新生葉片，以供相關分析。取樣時，採逢機取樣，每單株選取無病蟲害之葉子5~10片，樣株與樣株間盡量相隔10 m以上，並避免採集到同源單株及人工栽植之林木。相關採集資訊如表1及圖1。

二、DNA之萃取與ISSR的擴增反應

以乾燥的成熟新生葉片為材料，使用Plant Genomic DNA Mini Kit (Viogene, Taiwan)進行萃取，分離出的DNA加入0.2 ml的TE Buffer (Amresco, USA)保存，並利用分光光度計(Hitachi U-2001, Japan)測定DNA濃度。Polymerase chain reaction (PCR)反應參考Zietkiewicz et al. (1994)的方法進行，ISSR引子取自Operson Tech. (USA)的100個引子(UBC 801 -- 900)，經最佳化測試(optimization)篩選共14個具多型性及再現性高的引子來進行分析(表2)。反應溶液總體積為25 μ l，配方為2.5 mM dNTPs 1 μ l (Protech, Taiwan)，1.0 mM MgCl₂ 0.025 μ l (Protech)，10X buffer 2.5 μ l (Protech)，DNA template 2 μ l，primer (10 ng/ μ l) 2 μ l，1 unit Taq polymerase 0.25 μ l (Protech)，ddH₂O 17.225 μ l，所有反應均在溫度循環儀(thermal cycling machine, ABI 9700, city, ST, USA)進行，反應起始條件(initial denaturing step)為94 $^{\circ}$ C，6分鐘，再以94 $^{\circ}$ C，60秒；50.6~60.5 $^{\circ}$ C，50秒，黏合溫度(annealing temperature)依引子不同而定(表2)；72 $^{\circ}$ C，2分15秒循環35次，最後以72 $^{\circ}$ C，10

Table 1. List of *Calophyllum inophyllum* populations used in this study

Population code	Region	Sampling sites	Number of sample individuals
S	Taiwan	Huwei, Sihhu (Yunlin County)	14
K		Shanghai, Hongchaikeng, Baisha (western Hengchun Peninsula)	12
C		Kenting Youth Activity Center (southern Hengchun Peninsula)	10
L		Jiupeng, Nantian (eastern Hengchun Peninsula)	13
P	Lanyu	Lanyu (Taitung County)	14
Iri	Ryukyu Islands	Iriomote	5
Ishi		Ishigaki	5
D	Pratas Island	Pratas Island	6
Total		8	79

**Fig. 1. Map showing locations of the 8 sampled *Calophyllum inophyllum* populations among the nearby regions Lanyu, Pratas Island, Okinawa, and Taiwan. Population codes are the same as in Table 1.**

分鐘結束反應，反應結束降溫至4°C保存反應產物。

三、電泳、染色與照相

配製2% Agarose (SIA, city, ST, USA)，將PCR產物及分子量標記(100 bp Ladder DNA Marker II, YEA, city Taiwan)注入後，放入0.5x Tris base, boric acid and EDTA (TBE)緩衝液之水平電泳槽(KODAK HR2025, city, ST, USA)，以電壓150 V進行電泳分離，約2~2.5小時。完

成電泳的膠片以溴化乙錠(ethidium bromide) (Sigma Aldrich Fluka, city, ST, USA)染色6分鐘，退染8分鐘後，置於260 nm波長的UV燈上顯影觀察條帶，並以紫外燈照相系統(Vilber Lourmat CN-100, city Franch)拍照記錄。

四、族群遺傳參數分析

(一) 記錄強度較強且清晰的條帶，有條帶出現者記錄為1，無條帶者為0。利用 NTSYS-pc ver. 2.01套裝軟體(Rohlf

Table 2. Properties of 14 ISSR primers used in this study

Primer	Sequence 5'→3'	Annealing temperature (°C)	GC (%)	Number of monomorphic fragments	Number of polymorphic fragments	Percentage of polymorphic fragments
UBC807	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GT-3'	50.4	47.1	16	8	50.0
UBC810	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AT-3'	50.4	47.1	18	12	66.7
UBC818	5'-CAC ACA CAC ACA CAC AG-3'	52.8	52.9	12	10	88.8
UBC823	5'-TCT CTC TCT CTC TCT CC-3'	52.8	52.9	16	15	93.8
UBC825	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CT-3'	50.4	41.7	11	4	36.4
UBC827	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CG-3'	52.8	52.9	16	12	75.0
UBC842	5'-GAG AGA GAG AGA GAGA(CT)G-3'	54.8	52.8	16	15	93.8
UBC844	5'-CTC TCT CTC TCT CTC T(AG)G-3'	54.8	52.8	14	13	92.9
UBC848	5'-CAC ACA CAC ACA CAC A(AG)G-3'	54.8	52.8	15	14	93.3
UBC865	5'-ATG ATG ATG ATG ATG ATG-3'	74.2	100	14	14	100
UBC886	5'-(AGC)(AGT)(AGC)CTC TCT CTC TCT CT-3'	51.9	50.9	14	6	42.9
UBC887	5'-(AGT)(AGC)(AGT)TCT CTC TCT CTC TC-3'	51.1	48.9	12	12	100
UBC889	5'-(AGT)(GCT)(AGT)ACA CAC ACA CAC AC-3'	51.1	48.9	12	8	66.7
UBC890	5'-(AGC)(ACT)(AGC)GTG TGT GTG TGT GT-3'	51.9	50.9	17	16	94.1
Total				203	159	
Average						78.33

1993)，建立相似度矩陣(Ssm)，另以 Dice (1945)公式計算兩兩樣本間之相似度(S_{AB})。S_{AB} = 2N_{AB} / (2N_{AB} + N_A + N_B)。S_{AB} = 兩兩樣本間之相似度。N_A = 僅在樣本A出現的條帶數。N_B = 僅在樣本B出現的條帶數。N_{AB} = 在樣本A與在樣本B皆出現的條帶數。

- (二) 將各族群之條帶記錄以POPGENE vers. 1.31套裝軟體(Yeh et al. 1999)計算族群間的遺傳變異資料，包含Nei's基因歧異度(Nei's gene diversity; H) (Nei 1973)，Shannon's多型性訊息指數(I) (Shannon and Weaver 1949)。另假設各族群近親交配指數(Fis)為0，則可計算族群間遺傳分化係數Gst (coefficient of gene differentiation)，再利用Gst估算基因流 (gene flow)值(Nm)，Nm = 0.25 × (1 - Gst) / Gst (Slatkin and Barton 1989)。
- (三) 依Excoffer et al. (1992)所發表兩兩族群的距離公式求得距離矩陣D。D = N (1 - Ssm) = N (1 - M/N); M = 兩兩樣本相同條帶數；N = 多型性條帶總數。將距

離矩陣以analysis of molecular variance (AMOVA) vers. 1.55程式進行AMOVA分析，求得地區間、地區內、族群間、族群內個體間之變方成分值及各變方成分所佔總變方成份的百分比，並用9999次之隨機重排列檢定，測驗各變方成分之顯著性。

- (四) 依前述所建立之相似度矩陣，利用配對不加權算數平均值(Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages, UPGMA)的方法進行歸群分析(cluster analysis)並建立個體歸群圖(dendrogram) (Sokal and Michener 1958)；同時運用主座標分析 (principal coordinate analysis, PCoA)來繪製樣本分布圖。此外，透過Mantel test (Mantel 1967)來檢測遺傳距離矩陣 (Φ_{st})與相對地理矩陣間的相關性(r)。

結果

- 一、瓊崖海棠多型性ISSR引子之篩選
共測試Operson Tech. 100個隨機引子

(UBC 801-900)，並從中選取14個具多型性及再現性高的引子來進行分析，共獲得159個多型性條帶(表2)，個別引子多型性條帶比例介於36.4~100%，平均78.33%，各引子中以UBC 890獲得的多型性條帶最多(16個)，UBC 825最少(4個)；多型性條帶比例最高是UBC 865 (100%)，最低為UBC 825 (36.4%)。

二、瓊崖海棠族群間遺傳歧異度、遺傳分化係數、基因流之分析

依據ISSR分析所得之條帶整理為0、1的數值矩陣，並假設各族群自交指數(Fis)為0，以POPGENE分析瓊崖海棠族群的遺傳變異與多型性訊息指數(表3)，結果顯示瓊崖海棠總體基因歧異度(H)為0.2021；Shannon's多型性訊息指數(I)為0.3192；族群間遺傳分化係數(Gst)為0.6385，基因流(Nm)為0.2832。各族群間之基因歧異度值(H)從蘭嶼的族群(0.1259)至石垣島的族群(0.0322)，Shannon's多型性指數(I)則介於0.1870 (蘭嶼族群)至0.0479 (石垣島族群)。

三、瓊崖海棠族群親緣關係與族群遺傳結構

依據ISSR分析所得之數值矩陣，以NTSYS-PC軟體進行個體間相似度矩陣計算，並運用

UPGMA進行歸群分析建構個體間之親緣關係圖(圖2)，經比對遺傳距離矩陣與樹狀圖關係矩陣，得到協表相關係數(cophenetic correlation coefficient)為0.9503，其結果可於相似度0.79處區分為4群，由台灣、蘭嶼、琉球群島及東沙群島之族群各自集成群，而在台灣島內不同族群間的個體則呈現不同程度的交錯現象，並形成樹形圖上的小分枝。此結果再經主座標分析(PCoA)後亦呈現出相似情況(圖3)。至於瓊崖海棠族群遺傳距離(Φ_{st})與地理距離相關性(r)之關係，經Mantel test檢定結果並無顯著相關($r = 0.78$, $p = 0.99$)。參考歸群結果將瓊崖海棠8個族群依台灣、蘭嶼、琉球群島及東沙群島等4個區域進行AMOVA分析，結果指出瓊崖海棠族群於地理區域變方成分佔總變方成分的47.87% ($p < 0.001$)，地理區域內族群間之變方成分佔14.53% ($p < 0.001$)，族群內個體間則佔37.60% ($p < 0.001$)，顯示地理區域(島嶼)間的分化程度較高(表4)。

討論

一、族群的遺傳多樣性

遺傳多樣性是生物適應多變環境的基

Table 3. POPGENE analysis of genes, genetic differentiation, and gene flow of *Calophyllum inophyllum*

POP	N	Na	Ne	H	I	np	pp (%)	Gst	Nm
1. Yunlin County	14	1.2611	1.1712	0.0972	0.1433	53	26.11		
2. Western Hengchun Peninsula	12	1.2266	1.1367	0.0794	0.1186	46	22.66		
3. Southern Hengchun Peninsula	10	1.2611	1.1764	0.1006	0.1469	53	26.11		
4. Eastern Hengchun Peninsula	13	1.2167	1.1477	0.0837	0.1228	44	21.67		
5. Lanyu	14	1.3448	1.2170	0.1259	0.1870	70	34.48		
6. Iriomote	5	1.1527	1.1189	0.0645	0.0928	31	15.27		
7. Ishigaki	5	1.0887	1.0566	0.0322	0.0479	18	8.87		
8. Pratas Island	6	1.1576	1.1153	0.0632	0.0918	32	15.76		
1-4 Taiwan	49	1.3941	1.2191	0.1289	0.1950	80	39.41	0.2983	1.1762
6-7 Ryukyu Islands	10	1.1872	1.1192	0.0690	0.1024	38	18.72	0.2996	1.1690
Total	79	1.7833	1.3207	0.2021	0.3192	159	78.33	0.6385	0.2832

N, number of samples; Na, observed number of alleles; Ne, effective number of alleles; H, Nei's (1973) gene diversity; I, Shannon's information index; np, the number of polymorphic loci; pp, the percentage of polymorphic loci; Gst, proportion of the total diversity among populations; Nm, gene flow.

礎，因此在探討物種保育與其合理利用時，實有賴於能了解其遺傳多樣性的分布、分化 (differentiation) 及其影響因子 (Solbrig 1991)。

遺傳多樣性越高，適應環境的能力就越強，越容易擴展其分佈範圍和開拓新的環境。一般而言，廣泛分布物種趨向於擁有較高之遺傳多樣

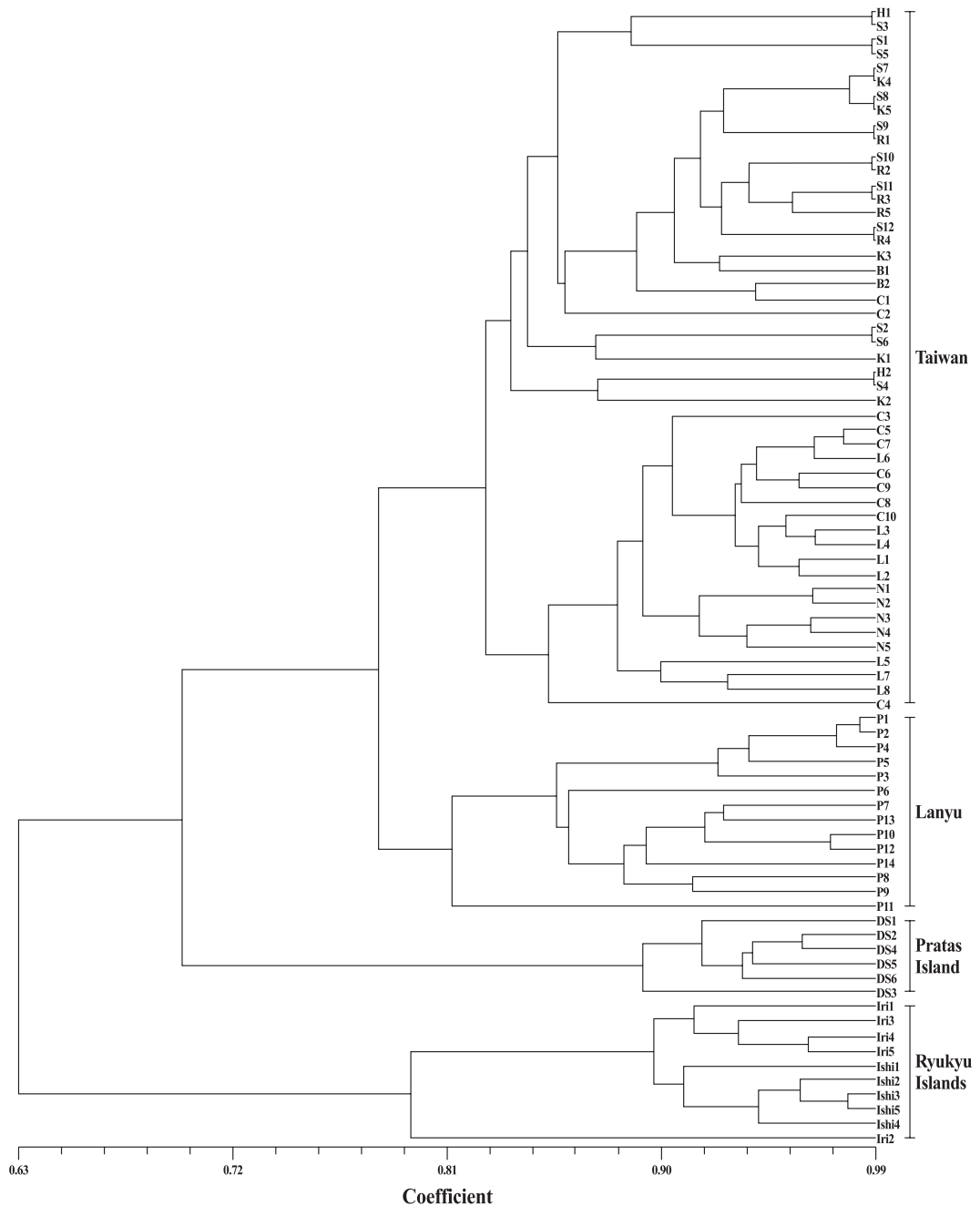


Fig. 2. UPGMA dendrogram based on 159 polymorphic ISSR bands of 79 individuals of *Calophyllum inophyllum*.

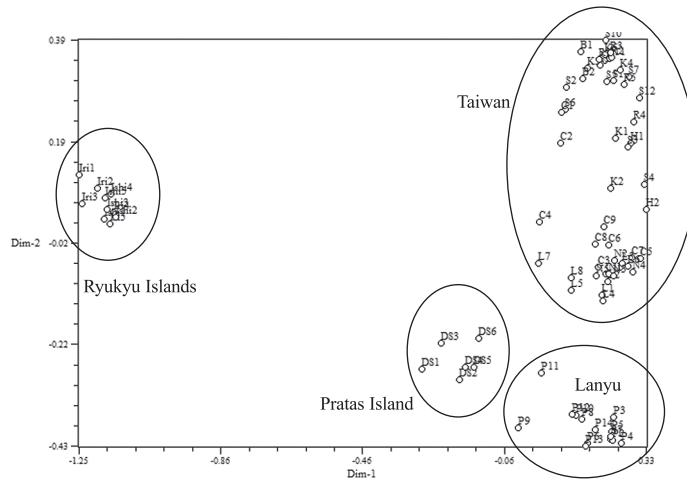


Fig. 3. Results of 2-dimensional principal coordinate analysis based on ISSR of 79 *Calophyllum inophyllum* L. individuals studied.

Table 4. Analysis of molecular variance for the 8 populations of *Calophyllum inophyllum*

Source of variation	df	Ssd	Msd	Variance components	% Total variance	<i>p</i> -value
Nest analysis						
Variance among regions	3	802.72	267.57	14.68	47.87	< 0.001
Variance among populations within regions	4	231.29	57.82	4.45	14.53	< 0.001
Variance within populations	71	818.40	11.53	11.52	37.60	< 0.001

df, degrees of freedom; Ssd, sum of squares; Msd, mean squares; *p*-value, probability.

性(Hamrick et al. 1991)。此外，物種在有生存壓力的環境下也會導致遺傳多樣性的增高(Nevo 1998)。本樹種透過ISSR分析結果顯示，8個瓊崖海棠族群所獲得的多型性條帶平均百分比為78.33%，此數值相較於其他濱海植物運用ISSR分析的結果，低於銀葉樹之83.6% (Deng et al. 2009)，土沉香(*Excoecaria agallocha* Hayata.)的87.21% (Zhang et al. 2005)，但高於苦楝(*Melia azedarach* Linn.)的66.67% (Ho and Ko 2010)及棋盤腳樹的66.67% (Deng et al. 2011)。相較結果顯示瓊崖海棠各自族群間的遺傳多樣性並不高，推測可能歸因於本研究範圍內之族群係位於本物種天然分布上的邊緣區域，由於環境逆境較高，加上濱海地區常年遭人為破壞，遂導致該樹種於本研究調查範圍內之有效族群數量過低所致。

此外，瓊崖海棠之基因歧異度(*H*)為0.2021；Shannon's多型性訊息指數(*I*)為0.3192，此數值相較於其他濱海植物運用ISSR分析的結果，其基因歧異度值(*H*)顯然較低，如銀葉樹為0.2888 (Deng et al. 2009)、土沉香為0.2150 (Zhang et al. 2005)、苦楝為0.3930 (Ho and Ko 2010)、相思樹(*Acacia confusa* Merr.)為0.4512 (Liu et al. 2007)及全緣冬青(*Ilex integra* Thunb.)為0.2220 (Leng et al. 2005)。另也低於Deng et al. (2009)所整理的裸子植物平均值*H* = 0.2362，*I* = 0.3599及異交木本被子植物的平均值*H* = 0.2764，*I* = 0.3883。綜言之，瓊崖海棠的基因歧異度相對其他濱海植物而言並不高，顯示各族群應歷經嚴重的瓶頸效應(bottleneck effect)，推測同樣與本研究範圍內之族群係位於本物種天然分布上的邊緣區域，加上濱海地

區常年遭人為破壞嚴重，致族群數量銳減，致使族群歧異度呈現偏低的情況。此結果與 Aranaud-Haond et al. (2006) 運用 SSR 來比較海茄苳位於分布邊緣區域和核心區域族群的遺傳多樣性之結果相似，同樣以位居分布邊緣區域的族群之遺傳多樣性較低，其原因推測可能歸因於分布邊緣的族群，由於在分布邊緣上其有效族群大小組成過低且缺乏有效傳粉昆蟲，加上太高的環境逆境所致。

二、族群的遺傳分化

族群遺傳結構常受到許多因素的影響，如繁殖系統、分布範圍、基因流、以及花粉與種子的傳播機制等 (Schaal et al. 1998, Ge et al. 2003)。族群的遺傳分化則能反應出物種的長期進化歷史、基因突變、遺傳漂變 (genetic drift)、交配系統及基因流等不同過程之相互作用 (Schaal et al. 1998)。瓊崖海棠總體之遺傳分化係數 (G_{st}) 為 0.6385，此數值相較於其他濱海植物運用 ISSR 分析結果，高於土沉香族群的 G_{st} 值 0.2210 (Zhang et al. 2005)、苦楝的 G_{st} 值 0.4153 (Ho and Ko 2010) 及海南草海桐 (*Scaevola hainanensis* Hance.) 族群的 G_{st} 值 0.1720 (Ho et al. 2005)。此外，亦較 Deng et al. (2009) 整理所得濱海植物的 G_{st} 平均值 0.2606 為高，顯見族群間已存有一定程度之遺傳變異。

族群的遺傳變異主要係受到三種自然力之左右，分別為基因流、天擇 (natural selection) 與遺傳漂變，其中基因流 (N_m) 是重要的演化媒介，它決定一個族群的地方性 (endemic) 遺傳分化程度 (Huang 1991)。遺傳變異是進化的動力，故進化過程勢必伴隨著大小不一的遺傳變異，是種化的重要關鍵 (Grant 1981)。瓊崖海棠為異交植物，其果實可藉海水漂流散佈繁殖，並藉由適應新環境而長成植株，拓展其族群。據 Wright (1969) 的觀點，若 $N_m > 1$ ，基因流就足以克服遺傳漂變的作用，防止族群分化的發生，如 $N_m < 1$ 則反之；若依據 Ellstrand and Elam (1993) 的意見， N_m 只要大於 0.5 則就被認為足以克服隨機遺傳漂變所造成的分化。由於植物族群間的基因流傳是借助於花粉、種子、

孢子或營養體的遷移來進行，尤以花粉和種子的擴散與傳播為主 (Harmrick et al. 1991)，當異交率越高的植物其基因流傳強度將越大，如為自交植物則其基因交流為零。本研究瓊崖海棠族群之基因流指數為 0.2832 ($N_m < 0.5$)，無論依據 Wright (1969) 或 Ellstrand and Elam (1993) 較嚴格的意見，均說明本樹種各族群間的基因流並不通暢。若依此數值與其他濱海植物運用 ISSR 分析結果相比，不僅低於土沈香的 N_m 值 0.8840 (Zhang et al. 2005)、苦楝的 N_m 值 0.7040 (Ho and Ko 2010) 及海南草海桐的 N_m 值 2.4000 (Ho et al. 2005)，同時與 Deng et al. (2009) 整理所得濱海植物的平均值 ($N_m = 1.4459$) 與異交木本植物的平均值 ($N_m = 1.2905$) 相較結果亦較低。雖然瓊崖海棠果徑約 2~3 cm，外有硬脆質之果皮，不但能阻隔海水滲入，並能漂浮於海水上進行傳佈 (Liu et al. 1994)；但限於瓊崖海棠難以忍受低溫的逆境，當最冷月份平均溫度 $< 12^{\circ}\text{C}$ 時即無法生長 (Friday and Okano 2006)，故其傳播距離與效率遂受限制，近距離族群間的傳播可能性較大。Duke (1995) 亦提出雖然很多紅樹植物均具可藉海流傳播的種子或繁殖體，但其長距離傳播的能力值得懷疑，尤其是廣泛分布的紅樹植物。因此，類此海漂植物如要跨越島嶼間的遠距離仍有困難，並非所有種子均可順利著陸且適應環境而長成植株。

另本樹種的授粉媒介主要係透過昆蟲來完成，如蜜蜂及甲蟲類等 (Wahyuni et al. 2012)，由於透過弱飛行能力的動物授粉和靠種子遷移的植物其族群間的遺傳分化會較顯著 (Avisé 1994)，主要限於島嶼間飛行能力，島嶼間的傳粉過程受阻礙，導致族群間的基因流受阻，加上海洋的阻礙與人為的破壞，因此在不同島嶼間呈現出分化之現象。此結果與 Kwon and Morden (2002) 認為島嶼間地理隔離會限制花粉及種子傳播的有限範圍相吻合，換言之，瓊崖海棠實際傳播距離和效率均受限制。

另由個體間親緣關係圖 (圖 2) 顯示，於相似度 0.79 處劃分時台灣、蘭嶼、琉球群島及東沙群島等地區的族群各自聚為一群，以上 4 群的親緣關係以台灣與蘭嶼的族群較接近先聚為一

群，再與東沙群島歸為一群；而以琉球群島的遺傳距離最遠。但就台灣島內不同族群間其個體的群聚關係而言，並無單一族群的所有個體可共同歸於同一支系下，不同族群間的個體係以不等程度的交錯情況形成小分支；另依主座標分析(PCoA)結果(圖3)，同樣也呈現出一致結果，顯示台灣島內不同族群間無明顯差異；惟在不同島嶼間的族群有較明顯的差異。據此再將瓊崖海棠族群依島嶼區分為台灣、蘭嶼、琉球群島及東沙群島等4個地區來進行AMOVA分析，結果各變方成分均達顯著水準，亦佐證瓊崖海棠在島嶼間及各族群間已有分化趨勢，其中族群地理區域間變方成分(佔47.87%)較族群內個體間(37.60%)為大，顯示族群在地理島嶼間的分化程度更加顯著。此應與小族群較易受到遺傳漂變導致基因的喪失及基因流的受限，致使族群間的分化程度增加有關(Elstrand and Elam 1993)，此外瓊崖海棠分布範圍包括東南亞、印度、琉球、澳洲與太平洋諸島等地區，相對於本研究範圍實係屬本種之邊際分布區域，故亦受分布極限、邊緣效應之影響(Aranaud-Haond et al. 2006)。

另以Mantel test檢定族群間的遺傳距離(Φ_{st})與地理距離(r)，結果兩者之間並無顯著相關($r = 0.78, p = 0.99$)，據Fisher et al. (2000)認為當遺傳距離與地理距離之間缺乏顯著相關性時，意味著遺傳漂變在族群間的分化上扮演不可忽視之力量，當一個族群與其他族群相互隔離時，遺傳漂變成為影響族群遺傳結構和族群間遺傳變異的重要因素。由於海岸林的開發破壞，生育地縮減致使現存族群太少，如隔離時間長，可能會因近交衰退，加上島嶼地理位置封閉基因無法交流而遺傳漂變造成某些基因的喪失而降低族群的遺傳變異。至於琉球群島族群與其他族群差異較大之原因，推測係受到島嶼隔離與海流方向之影響，由於黑潮(Kuroshio)的海流方向主要沿菲律賓東岸向北流，經呂宋海峽由台灣東岸外海經過(Wessells and Hopson 1988)，基於海流之不可逆遂限制琉球群島族群與其他族群的交流。此外，加上黑潮於日本的東或東北方與由極地南流的親潮(Oyashio)相

會，因受寒冷洋流的限制，琉球群島的族群遂成為本物種天然分布的最北限亦有關聯(Friday and Okano 2006, Hanaoka et al. 2014)；至於東沙島的族群與台灣族群較接近之原因，主要是黑潮流經呂宋海峽時部份海流轉向北南海，並於台灣南端流出再重新注入黑潮，但仍有部份海流會繼續流入南海或經台灣海峽流入東海，因此黑潮終年可經呂宋海峽流入南海，再藉由大陸的沿岸流與台灣西岸的族群進行交流(Wessells and Hopson 1988)。

結論

就物種保育而言，瞭解族群各項特徵為最基礎且必要之工作，而瞭解族群的遺傳結構則有利於了解基因庫大小、遺傳變異及分化程度等，對後續保育策略的擬訂，可提供一個有效的參考依據。本研究分析瓊崖海棠族群遺傳訊息顯示，本樹種的基因歧異度(H)相較於其他濱海植物而言並不高，此應與瓊崖海棠現存各族群之生育地較小且遭嚴重破壞，導致遺傳歧異度偏低所致。從族群遺傳變異與遺傳結構分析(表3與4)亦顯示其族群間已有遺傳分化產生，族群間的基因流並不通暢，不同島嶼間呈現明顯分化現象。族群散布之情形，依Mantel test的結果，其族群為隨機之散佈，故遺傳漂變在族群分化上扮演重要角色，不同島嶼間所呈現分化現象，推測仍係受到島嶼隔離、分布極限及海流方向等因素之影響。瓊崖海棠雖為廣泛分布的物種，但由於人為的破壞、生育地惡化甚至喪失等因素，造成在海岸地區形成片斷化分布，漸成狹隘分布的單一小族群；由於種群內個體數量的減少，遂導致族群瓶頸效應顯著，進而造成基因流傳的下降和遺傳漂變的產生。因此，有關瓊崖海棠族群的保育策略，考量島嶼與族群間已存有明顯遺傳分化，因此單獨保護其中任一個族群對保護整個物種的遺傳變異顯有不足，除採取就地(*in situ*)保育之措施來保存所有的族群外，並應實施遷地(*ex situ*)保育措施來加以保存，其種源的蒐集應涵蓋現有之族群。

致謝

本研究承行政院農業委員會林業試驗所科技計畫(104農科-13.1.2-森-G2)經費補助，特此致謝。

引用文獻

- Arnaud-Haond S, Teixeira S, Massa SI, Billot C, Saenger P, Coupland G, et al. 2006.** Genetic structure at range edge: low diversity and high inbreeding in Southeast Asian mangrove (*Avicennia marina*) populations. *Mol Ecol* 15(12):3515-25.
- Avise JC. 1994.** Molecular markers, natural history, and evolution. New York: Chapman Hall. 511 p.
- Deng SL, Lu FY, Hsui YR, Lin YD, Wu HC. 2009.** Population genetic variation of *Heritiera littoralis* among Taiwan, Iriomote-Island and Hong Kong. *Q J Chin For* 42(4):503-18. [in Chinese with English summary].
- Deng SL, Hsui YR, Lu FY, Chang KC, Chang YH, Wu HC. 2011.** Population genetic variation of *Barringtonia asiatica* between Hengchun Peninsula and Lanyu. *J Agric Assoc Taiwan* 12(4):364-81. [in Chinese with English summary].
- Deng SL, Yu HM, Hsui YR, Hwong JL. 2014.** Introduction of genetic variation of *Jatropha curcus* germplasm resources to Taiwan. *J Agric Assoc Taiwan* 15(1):76-93. [in Chinese with English summary].
- Dice LR. 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302.
- Excoffer L, Smouse PE, Quattro LM. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-91.
- Ellstrand NC, Elam DR. 1993.** Population genetics consequence of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24:217-42.
- Fisher M, Husi R, Prati D, Peintinger M, Kleunen M, Schmid B. 2000.** RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *Am J Bot* 87(8):1128-37.
- Friday JB, Okano D. 2006.** Species profiles for Pacific island agroforestry: *Calophyllum inophyllum* (Kamani). Hawaii, USA: Permanent Agriculture Resources.
- Ge XJ, Yan Y, Zhao NX, Chen HS, Qi WQ. 2003.** Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae). *Biological Conservation* 111:427-34.
- Grant V. 1981.** Plant speciation, 2nd edition. New York: Columbia Univ. Press. p 149-80.
- Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991.** Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk DA, Holsinger KE, editors. Genetics and conservation of rare plants. New York: Oxford Univ. Press. p 75-86.
- Hanaoka S, Chien CT, Chen SY, Watanabe A, Setsuko S, Kato K. 2014.** Genetic structures of *Calophyllum inophyllum* L., a tree employing sea-drift seed dispersal in the northern extreme of its distribution. *Ann For Sci* 71(5): 575-84.
- Ho KY, Deng SL, Chang YH, Tsai CS, Kao MF, Hsiao JY. 2005.** Genetic variation of endangered *Scaevola hainanensis* (Goodeniaceae) in the Jiangiun Stream mouth. *Taiwan J For Sci* 20(3):193-202.
- Ho KY, Ko NY. 2010.** Genetic diversity among *Melia azedarach* L. populations at different climatic regions in Taiwan. *Crop Environ Bioinform* 7:195-211. [in Chinese with English summary].

- Hsieh KH, Lin SJ, Wu YP. 2014.** Genetic diversity of Zingiberaceae crop. *J Taiwan Agric Res* 63(3):235-48. [in Chinese with English summary].
- Hsu KS, Lin TT, Lu SY, Chiou WL. 1985.** Investigation and report of the rare plants of the Kenting National Park. Taipei, Taiwan: Taiwan Forestry Research Institute. 101 p. [in Chinese].
- Huang S. 1991.** Gene flow and population differentiation. *Chin Biosci* 34(2):19-32. [in Chinese with English summary].
- Itoigawa M, Ito M, Tan HT, Kuchide M, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H. 2001.** Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Cancer Lett* 169(1):15-19.
- Kwon JA, Morden CW. 2002.** Population genetic structure of two rare tree species (*Colebrina oppositifolia* and *Alphitonia ponderosa*, Rhamnaceae) from Hawaiian dry and mesic forests using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol Ecol* 11(6):991-1001.
- Leng X, Wang Z, An S, Feng J, Liu Y, Wang G. 2005.** ISSR analysis of genetic diversity of *Ilex integra*, an insular endemic plant. *Chinese Biodiversity* 13(6):546-54. [in Chinese with English summary].
- Liu YC, Lu FY, Ou CH. 1994.** Trees of Taiwan. City, Taiwan; College of Agriculture, National Chung-Hsing University. Monographic Publication no. 7. 925 p. [in Chinese].
- Liu YY, Liao YK, Hu TK. 2007.** Study of genetic variation among the populations of *Acacia confusa* at west regions in Taiwan. *J Agric For (NCYU)* 4(2):32-46. [in Chinese with English summary].
- Mantel NA. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27(2):209-20.
- Nei M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321-3.
- Nevo E. 1998.** Molecular evolution and ecological stress at global, regional and local scales: the Israeli perspective. *J Exp Zool* 282(1-2): 95-119.
- Ong HC, Mahlia TIM, Masjuki HH, Nor-hasyima RS. 2011.** Comparison of palm oil, *Jatropha curcas* and *Calophyllum inophyllum* for biodiesel: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15(8):3501-15.
- Patil AD, Freyer AJ, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Bean MF, Taylor PB, et al. 1993.** Inophyllins novel inhibitor of HIV-reverse transcriptase isolated from Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *J Med Chem* 36(26):4131-8.
- Rohlf FJ. 1993.** NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Vers. 1.55. New York: Exeter Software. 7 p.
- Shannon CE, Weaver W. 1949.** The mathematical theory of communication. Urbana: Univ. of Illinois Press. 54 p.
- Schaal BA, Haywdrth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA. 1998.** Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7:465-74.
- Slatkin M, Barton NH. 1989.** A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349-68.
- Solbrig OT. 1991.** From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity. Cambridge IUBS. 124 p.
- Sokal RR, Michener CD. 1958.** A statistical method for evaluation systematic relationships. *Univ. Kans Sci Bull* 38:1409-38.
- Wahyuni R, Handoko C, Agustarini R. 2012.** Preliminary study on the flowering and fruiting behaviors of Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.). *J For Res* 9(1):1-10.
- Wessells NK, Hopson JL. 1988.** Biology. New York: Random House. 1251 p.
- Wright S. 1969.** Evolution and the genetics

of populations, Vol. 2. The theory of gene frequencies. Chicago: Univ. of Chicago Press.

Wei X, Cao HL, Jiang YS, YE WH, Ge XJ, Li F. 2008. Population genetic structure of *Camellia nitidissima* (Theaceae) and conservation implications. *Bot Stud* 49:147-53.

Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. POPGENE Vers. 1.31: Microsoft Windows-based Free-ware for Population Genetic Analysis. Quick user's guide. City Canada; Univ. of Alberta.

Zhang ZH, Tang T, Zhou RC, Wang YG, Jian SG, Zhong CR, Shi SH. 2005. Effects of divergent habitat on genetic structure of population of *Excoecaria agallocha*, a mangrove associate. *Acta Gene Sin*32(12):1286-92. [in Chinese with English summary].

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20(2):176-83.

