

運用 ISSR 技術分析臺灣葛藤遺傳歧異度⁽¹⁾

蔡佩樺⁽²⁾ 侯金日⁽²⁾ 侯新龍⁽²⁾ 林正斌⁽³⁾ 李姿蓉⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：105 年 6 月 1 日；接受日期：105 年 8 月 8 日

摘 要

臺灣葛藤 (*Pueraria montana*) 為豆科葛屬之多年生藤本植物，為探討其分布在臺灣之情形與遺傳歧異度，因此廣泛自臺灣 18 縣市蒐集共 91 個樣本，利用簡單序列重複區間 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 技術，篩選出 15 條具有多型性之引子參與試驗。經分子變方分析 (AMOVA) 後得知，臺灣葛藤族群於地理區域變方成分佔總變方成分的 10.02%，地理區域內族群間之變方成分佔 14.05%，族群內個體間則佔 75.92%，且各變方成分均達顯著差異。經 POPGENE 3.2 套裝軟體分析結果顯示，總體基因歧異度為 0.3634，族群間遺傳分化係數為 0.4401，基因流為 0.636。UPGMA 歸群分析結果可於相似度 0.23 處將 18 個地區劃分為 5 群，第一群為宜蘭、臺北、桃園與新竹；第二群為臺東、屏東、花蓮、嘉義、臺南、雲林、臺中與高雄；第三群為南投、彰化、苗栗、阿里山；第四群為基隆，第五群為金門，族群地理距離和遺傳距離之關係並無顯著相關。由上述結果可知，臺灣葛藤於各地區之族群遺傳歧異度甚高，且已具有分化之趨勢，其中遺傳漂變在臺灣葛藤族群間分化扮演不可忽視的角色。

關鍵詞：歸群分析、遺傳歧異度、簡單序列重複區間、臺灣葛藤。

緒 言

臺灣葛藤又名山葛，為豆科葛屬之多年生藤本植物。其全株皆覆褐色粗毛，葉互生，為三出複葉，頂小葉菱狀卵形至披針狀卵形，先端銳形；披針形托葉盾狀著生。花為蝶形花，腋生總狀花序，花冠為粉紅色，下方具披針形萼片，於 5 – 11 月開花。莢果為長橢圓形，長 2 – 4 cm，密被褐色剛毛，於 7 – 3 月結果 (溫, 2002)。葛藤為多用途之植物，根富含澱粉可製葛粉、莖皮富纖維、葉則可作為飼料及覆蓋用途，且其全株皆具藥用價值 (葉, 1999)，景觀方面亦可用於綠廊、蔭棚、籬牆美化或地被、邊坡綠化之用。葛藤根部含多種異黃酮類化合物，對於解熱、生津、解酒及抗氧化等具有功效 (Yang *et al.*, 2005)。原住民利用其葉片汁液敷於傷口止血，排灣族則用於製作五年祭時用的藤球 (鐘與楊, 2012)。

植物為適應淘汰壓力，在地區族群間的內部特性或外表性狀會出現顯著差異 (陳等, 2000)。因此，植物遺傳性之鑑定可經由外表型與基因型差異來區分，但植物外表型易受環境影響而改變，不如基因型穩定且適合做為品種鑑定指標。簡單序列重複區間 (inter simple sequence repeat, ISSR) 分子標誌是利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術為基礎來進行 DNA 指紋分析 (finger printing) 以判定基因型間之差異 (Zietkewiz *et al.*, 1994)。因其所需 DNA 量少、實驗操作簡便、花費少，即可得到多型性 (polymorphism) 與再現性 (reproducibility) 高之條帶，所以生物種屬之鑑定、植物遺傳多樣性與親緣關係之研究上，均獲得廣泛的運用。陳等 (2012) 利用 ISSR 分子標誌技術分析臺灣地區之紫色狼尾草 (*Pennisetum purpureum* Schumach)，結果顯示紫色狼尾草於各地區間有明顯分化；而臺灣引種之癩瘋樹 (*Jatropha curcas* L.) 經此技術分析後則顯示無分化 (鄧等, 2014)。學者研究伊朗 10 個野生種群之貫葉連翹 (*Hypericum perforatum* L.)，發現其遺傳歧異度很高 (Morshedloo *et al.*, 2015)。學者們亦利用 ISSR 技術分析葛屬間植物之遺傳歧異度，於中國三峽地區葛藤 (*Pueraria lobata*) 之分析結果指出 6 個樣本間遺傳多樣性甚高；而於中國廣西、雲南、江西、湖北 4 省之 11 份葛藤樣本 (*Pueraria radix*) 則具高遺傳相似度 (Sun *et al.*, 2005; 郭, 2013; 陳等, 2015)。因此，本研究之目的為利用 ISSR 分子標誌分析臺灣地區臺灣葛藤之傳播方式與遺傳歧異度，藉以作為爾後蒐集樣本及調查用與育種工作之參考。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2562 號。

(2) 國立嘉義大學農藝學系。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所飼料作物組。

(4) 通訊作者，E-mail：trli@mail.tlri.gov.tw。

材料方法

I. 材料

自全臺灣 18 個縣市廣泛採集 91 個臺灣葛藤之葉片樣本，利用全球衛星定位系統 (Global Positioning System, GPS) 定位及記錄採集地點之經度及緯度，並以 Google earth 軟體繪製成圖 (圖 1)，採集回來之葉片保存於 -80°C 超低溫冷凍櫃中。

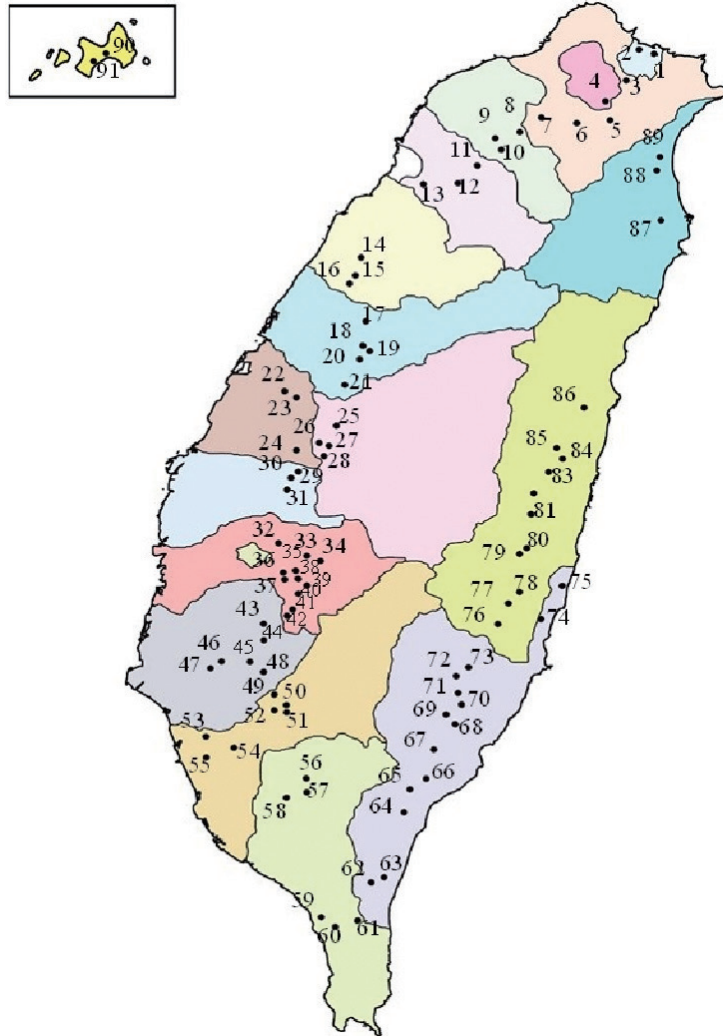


圖 1. 臺灣葛藤 91 個樣本於台灣地區收集位置圖。

Fig. 1 Collected sites of *P. montana* 91 samples in Taiwan area.

II. 植物 DNA 萃取

本實驗以 Wizard Genomic DNA Purification Kit (UBS set 9, Promega, USA) 進行植物 DNA 萃取。首先將採集回來之葉片，以水洗淨，再置於研鉢中，加入液態氮磨成粉末。將粉末裝入 1.5 mL 離心管中，加入 600 μL 之 nuclei lysis solution 混合均勻，並置於 65°C 之乾浴鍋加熱 15 分鐘，再加入 3 μL RNase solution 混合均勻，於 37°C 下放置 15 分鐘後取出冷卻 5 分鐘。再加入 200 μL 之 Protein Precipitation Solution 混合均勻，於 4°C 下離心 3 分鐘 (13,200 rpm) (Centrifuge 5415r, Eppendorf, Germany)，離心完畢後取上清液。置入新離心管，並加入 600 μL 異丙醇 (isopropanol, IPA) 混合均勻，再以 13,200 rpm 於 4°C 離心 1 分鐘，倒掉上清液，加入 500 μL 濃度 70% 乙醇清洗，以 4°C 離心 1 分鐘，之後倒掉乙醇，再加入 500 μL 濃度 100% 乙醇清洗 DNA 沉澱物，並於 4°C 離心 1 分鐘，最後去除乙醇，等候沉澱物乾，加入適量 DNA rehydration solution，並保存於 -20°C 冷凍櫃中。

III. DNA 品質檢定與定量

以 genomic DNA 進行電泳來進行 DNA 品質檢定確認，DNA 定量則是取 1 μL 之 genomic DNA 樣品稀釋 200 倍，以分光光度計 (SmartSpec Plus Quick Operating Guide 273BR, Bio Rad, USA) 於波長 260 nm 與 280 nm 下

測其吸光值 (optical density, O.D.)。依每個樣品定量之濃度，稀釋為濃度 100 ng/μL 之工作液 (Working solution)，其餘未稀釋之 DNA 保存於 -20°C 冰箱備用。

IV. ISSR 分析

本試驗使用 UBC (University of British Columbia) set 9 之 ISSR 引子共 100 條，並從中篩選出多型性之 15 條引子 (分別為 UBC 807、808、810、811、812、816、823、834、840、841、846、855、865、890、891) 進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。PCR 反應總體積為 20 μL，以 Bio Rad 之溫度梯度基因擴增儀 (MyCycler™ thermal cycler 580BR, Bio Rad, USA) 進行最佳反應條件測試。溫度條件設定如下：94°C 300 秒進行初裂解；之後以 94°C 30 秒進行 DNA 裂解，於 54°C 下鏈合 (annealing) 60 秒，最後以 72°C 90 秒進行 DNA 延伸 (extension)，並重複循環 33 次；最後以 72°C 300 秒進行最後延伸 (final extension)。PCR 完成後貯放在 4°C，接續進行電泳。

V. 瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳

電泳膠片含有 1.5% agarose。將擴增產物取 5 μL 加入 5 μL 之 TBE 緩衝液，再加入 2 μL 之 loading dye，總體積為 12 μL。將電泳膠片置於 1X TBE 緩衝液中，以電壓 110 伏特進行電泳分離約 90 分鐘，並以 100 base pair DNA ladder 做分子量標記。電泳完畢後，將膠片置於 0.1 μg/mL 之溴化己錠 (ethidium bromide) 中染色，最後置於 UV 光箱中觀察結果，並拍照存檔。

VI. 族群遺傳參數分析

將電泳所得之條帶進行記錄，有條帶出現者紀錄為 1，而未出現者以 0 表示。利用 NTSYS-pc ver. 2.01 套裝軟體 (Rohlf, 1993)，以 Dice 公式計算兩兩樣本間之相似度 (SAB)，並建立相似度矩陣 (Ssm)。SAB = 2 NAB / (2 NAB + NA + NB)，SAB 為樣本兩兩間之相似度。NA 為僅在樣本 A 出現的條帶數。NB 為僅在樣本 B 出現的條帶數。NAB 則是在樣本 A 與在樣本 B 皆出現的條帶數。

採用 POPGENE 3.2 套裝軟體 (Yeh *et al.*, 1999) 進行地區族群間遺傳變異分析，並計算 Nei's 遺傳歧異度指數 [$H = -\sum p_i (\ln p_i)$; p_i 代表某個 DNA 片段出現的頻率 (frequency)] (Nei, 1973) ; Shannon's 多型性指數 (I) (Shannon and Weaver, 1949)。並假設各族群近親交配指數 (Fis) 為 0，以此計算族群間遺傳分化係數 Gst (coefficient of gene differentiation) (Nei, 1973)，再利用 Gst 估算基因流值 [$Nm = 0.5 \times (1-Gst)/Gst$] (Slatkin and Barton, 1989)。

依 Excoffer *et al.* (1992) 所發表兩族群間之距離公式，求得遺傳距離矩陣 [$D = N(1 - Ssm) = N(1 - M/N)$; $M =$ 兩樣本間相同條帶數 ; $N =$ 多型性條帶總數]，以 Excoffer *et al.* (1992) 所開發之以 AMOVA ver. 1.55 程式進行 (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) 分析，已得到各地區族群遺傳變異成分，之後用 9999 次之隨機重排列檢定 (random permutation test)，測驗各變方成分之顯著性，並繪製成不同層級之分析歸納表。

將上述之相似度矩陣，利用配對不加權算數平均值法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 進行歸群分析 (cluster analysis) 並建立歸群圖 (Sokal and Michener, 1958) ; 同時運用主座標分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 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)。

結果與討論

為了得知臺灣地區之臺灣葛藤其族群基因結構與分化情形，本試驗依照採集縣市將臺灣葛藤分為 18 個族群進行 POPGENE 分析 (表 1)。臺灣葛藤各族群間之基因歧異度值以金門族群 (0.0525) 最小；而臺東族群 (0.3180) 最大；Shannon's 多型性指數則介於 0.0767 (金門族群) 至 0.4714 (臺東族群)。然而，總體基因歧異度 (H) 為 0.3634；遺傳分化係數 (Gst) 為 0.4401；Shannon's 多型性訊息指數 (I) 為 0.5425；基因流 (Nm) 為 0.636。

一般而言，蟲媒花之異交植物基因歧異度平均值為 0.211 (Hamrick *et al.*, 1992)，而臺灣葛藤之總體基因歧異度 (0.3634) 高於一般蟲媒花異交植物。但是，金門與基隆族群之基因歧異度 (H 值分別為 0.0525 與 0.0758) 相較於其他族群變異較小，推測金門族群應是受到海峽及島嶼之區隔，而混雜較少故基因歧異度值較小。基隆族群則可能是採集區域受到環境與人為干擾因素小，因此基因歧異度與其他族群間不同。Wright (1969) 認為當 Nm 值大於 1 時，基因流足可抵制遺傳漂變 (genetic drift) 的作用，並防止族群分化的發生，但如 Nm 值小於 1 則相反。而臺灣葛藤 Nm 值則為 0.636，表示臺灣地區之葛藤間基因流並不流通，且已有分化之趨勢。本試驗族群間遺傳分化係數 (Gst) 為 0.4401，前人研究指出當 Gst 大於 0.25 則此族群為分化明顯 (Buso *et al.*, 1987)，此代表臺灣葛藤族群間彼此基因流

並不流通，但族群內已有明顯分化。

將本試驗之 18 個臺灣葛藤族群劃分為臺灣北部、中部、南部、東部、離島與山區等 6 個族群來進行 AMOVA 分析 (表 2)。結果顯示臺灣葛藤族群於地理區域 (among groups) 變方成分佔總變方成分的 10.02%，地理區域內族群間 (among populations within groups) 之變方成分佔 14.05%，族群內個體間 (among populations) 則佔 75.92%，且各變方成份均達顯著水準，此結果顯示臺灣葛藤於各地區已有分化之趨勢，且大部分變異係存在於族群內個體間。Sun *et al.* (2005) 之分子變方分析結果也同樣指出 *P. montana* 族群內個體間之變方 (62.2%) 較族群間的變方 (37.8%) 高，且大部分變異係存在於族群內個體間。

表 1. 臺灣葛藤 POPGENE 分析結果

Table 1. POPGENE analysis of *P. montana* based on ISSR DNA markers

	N	H	I	Gst	Nm
Yilan	3	0.1513	0.2240		
Taipei	5	0.2793	0.4150		
Keelung	2	0.0758	0.1107		
Taitung	14	0.3180	0.4714		
Hualien	11	0.2746	0.4147		
Taichung	5	0.2298	0.3359		
Nantou	4	0.1714	0.2506		
Miaoli	3	0.1545	0.2264		
Taoyuan	3	0.1673	0.2413		
Yunlin	3	0.1553	0.2283		
Hsinchu	3	0.1775	0.2609		
Changhua	3	0.1609	0.2365		
Chiayi	7	0.2611	0.3875		
Kaohsiung	7	0.2519	0.3783		
Tainan	6	0.2704	0.4074		
Pingtung	6	0.3012	0.4494		
Kinmen	2	0.0525	0.0767		
Alishan	4	0.2248	0.3275		
Total	91	0.3634	0.5425	0.4401	0.636

N = number of samples.

H = Nei's (1973) genetic diversity.

I = Shannon's information index.

Gst = genetic differentiation.

Nm = gene flow.

表 2. 18 個臺灣葛藤族群之分子變方分析結果

Table 2. The result of AMOVA on 18 populations of *P. Montana*

Source of variation	DF	SSD	MSD	VC	Total Variance (%)	P-value
Among groups	5	479.56	95.871	3.3539	10.02	< 0.0001
Among populations within groups	12	579.54	48.295	4.7031	14.05	< 0.0001
Within populations	73	1854.71	25.407	25.4070	75.92	< 0.0001

DF: degree of freedom, SSD: sum of squares, MSD: mean squares, P-value: more extreme random value, VC: variance components.

將 ISSR 分析之條帶整理後，以 NTSYS-PC 建立相似度矩陣，進行臺灣葛藤族群間 UPGMA 歸群分析 (圖 2)。分析結果可於相似度 0.23 處劃分為 5 群，第一群為宜蘭、臺北、桃園與新竹；第二群為臺東、屏東、花蓮、嘉義、臺南、雲林、臺中與高雄；第三群為南投、彰化、苗栗、阿里山；第四群為基隆，第五群為金門，在主座標分析之結果與歸群分析結果相似 (圖 3)，且其 3 維解釋能力達 88.75%。根據臺灣葛藤 18 個族群之遺傳距離矩陣結果顯示，臺東地區與屏東地區之遺傳距離最近，彰化地區與基隆地區之遺傳距離最遠，數值介於 0.0638 到 0.4566 之間 (表 3)，阿里山地區與嘉義地區地理距離最近，而金門與宜蘭距離最遠，數值分別為 12.0 與 350 公里。至於臺灣葛藤族群地理距離和遺傳距離之關係經 Mantel 檢定的結果並無顯著相關。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 (Fischer *et al.*, 2000)。

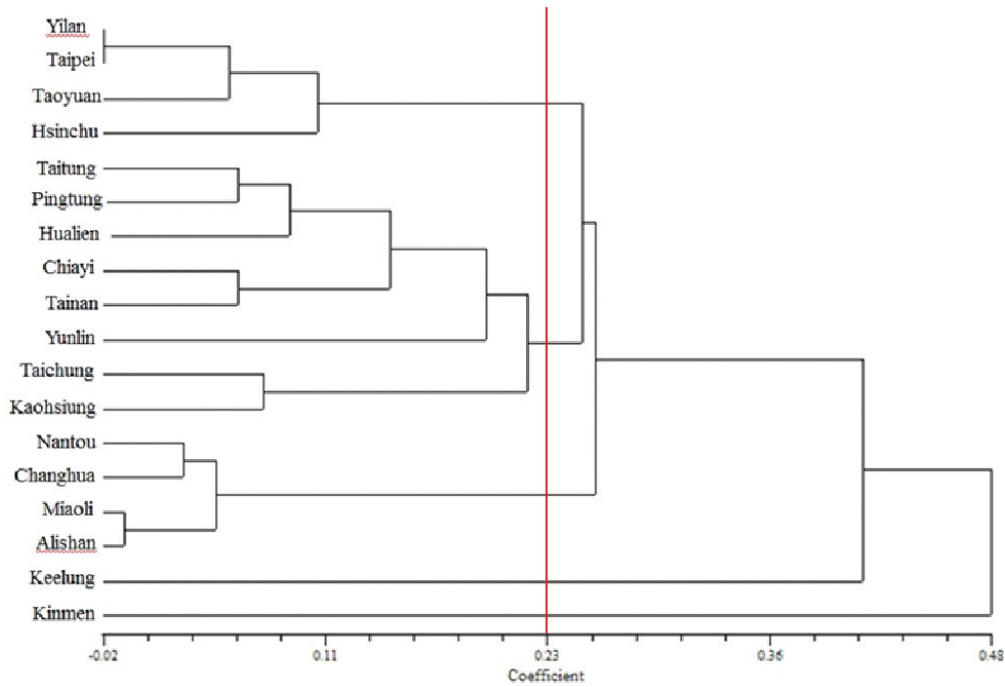


圖 2. 臺灣葛藤 18 個族群間之樹狀圖。
Fig. 2. The dendrogram of 18 population of *P. montana*.

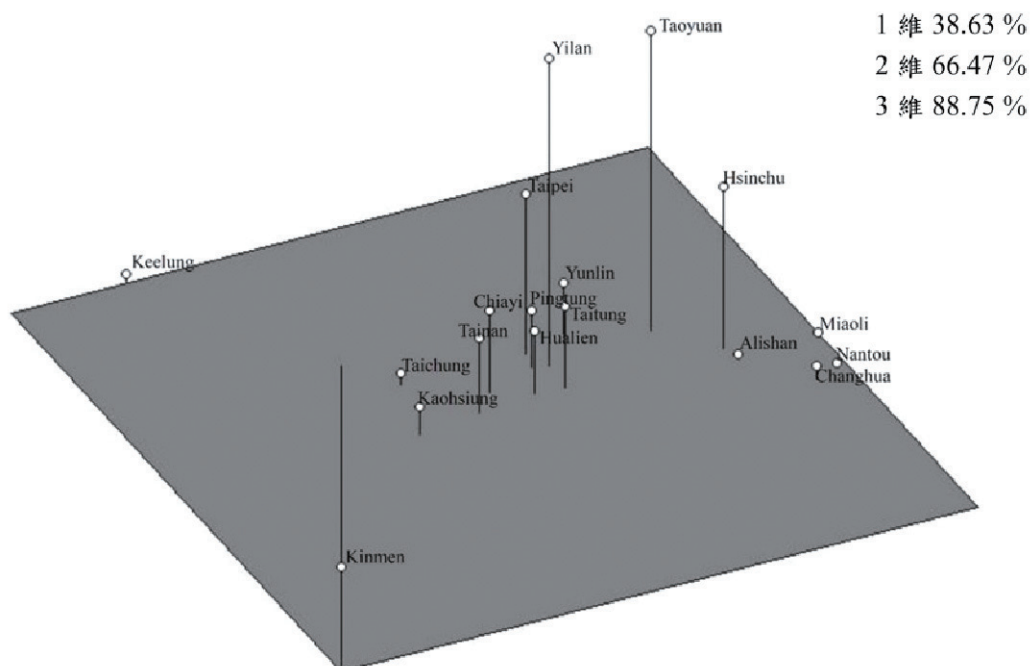


圖 3. 臺灣葛藤三維主座標分析圖。
Fig. 3. Three-dimensional principle coordinate analysis among 18 populations of *P. montana*.

表 3. 臺灣葛藤遺傳變異分析之遺傳距離矩陣 (左下) 與地理矩陣 (單位: km, 右上)

Table 3. Genetic distance matrix (Φ_{st}) (below diagonal) and geographical distance (unit: km, above diagonal) on ISSR data of *P. montana*

	Yilan	Taipei	Keelung	Taoyuan	Hsinchu	Miaoli	Taichung	Nantou	Chunghua	Yunlin	Chiayi	Tainan	Kaohsiung	Pintung	Taitung	Hualian	Kinmen	Alishan
Yilan		43.2	40.8	58.8	76.0	93.6	124.8	131.0	140.0	177.6	188.0	249.6	272.8	260.0	224.8	84.8	350.0	185.6
Taipei	0.1091		16.2	22.4	60.8	87.6	130.4	152.4	144.4	186.0	201.2	260.8	292.0	277.6	252.8	115.2	336.0	199.2
Keelung	0.3963	0.2397		53.3	76.2	117.3	138.2	168.3	173.3	192.7	222.0	260.0	287.0	306.1	178.1	270.4	347.5	215.1
Taoyuan	0.1633	0.1269	0.4278		39.6	67.2	112.8	125.0	146.8	168.0	184.8	245.6	279.2	266.0	244.0	114.0	300.0	175.4
Hsinchu	0.2427	0.1702	0.3956	0.1893		30.0	78.8	100.0	90.4	134.0	152.4	212.8	247.2	236.0	224.0	111.2	280.0	155.0
Miaoli	0.3624	0.2377	0.3797	0.3069	0.1603		49.6	67.5	60.8	103.2	123.2	183.6	218.4	208.0	199.2	103.2	247.0	112.5
Taichung	0.2975	0.2038	0.2305	0.3125	0.2785	0.3065		24.8	15.6	87.2	195.6	134.0	169.2	159.2	157.6	97.2	253.8	85.4
Nantou	0.3341	0.2270	0.4118	0.2807	0.1602	0.1187	0.2438		22.5	38.0	50.0	111.2	145.6	134.4	134.0	94.0	236.7	49.0
Chunghua	0.3492	0.2555	0.4556	0.3173	0.1773	0.1406	0.2974	0.1282		75.2	64.0	123.2	160.8	152.0	156.0	108.8	234.2	60.8
Yunlin	0.3938	0.2946	0.4079	0.3225	0.2727	0.3775	0.3270	0.2737	0.3170		26.0	80.8	120.0	113.6	131.2	128.8	236.1	32.0
Chiayi	0.2607	0.1673	0.2540	0.2333	0.2189	0.2383	0.1440	0.2033	0.2622	0.2777		60.8	96.0	88.8	107.2	128.0	256.9	12.0
Tainan	0.2661	0.1744	0.2744	0.2709	0.2648	0.2670	0.1521	0.2365	0.2790	0.3280	0.0806		43.2	46.0	102.4	180.4	258.4	46.4
Kaohsiung	0.2740	0.2026	0.2567	0.2951	0.2607	0.2804	0.0903	0.2364	0.2877	0.2988	0.0854	0.1204		19.2	88.0	198.0	270.0	57.6
Pintung	0.2643	0.1498	0.2529	0.2583	0.1551	0.2159	0.1691	0.1902	0.2031	0.1743	0.1055	43.2	0.1335		68.0	180.8	321.3	110.1
Taitung	0.2270	0.1213	0.2602	0.2151	0.1825	0.2173	0.1596	0.1752	0.2076	0.2046	0.1279	0.1163	0.1357	0.0638		143.2	331.8	84.4
Hualian	0.2753	0.1572	0.2635	0.2667	0.2100	0.2357	0.1819	0.2046	0.2191	0.2627	0.1195	0.1300	0.1424	0.0879	0.0489		322.2	73.4
Kinmen	0.3442	0.2805	0.4066	0.4163	0.3677	0.4196	0.2933	0.3276	0.3336	0.4282	0.2391	0.2615	0.2016	0.2569	0.2172	0.2326		260.1
Alishan	0.2876	0.1993	0.3685	0.3129	0.2130	0.1228	0.2287	0.1105	0.1561	0.3186	0.1795	0.2096	0.2008	0.1553	0.1643	0.1908	0.3724	

結 論

本試驗研究結果顯示臺灣葛藤族群具有甚高之遺傳歧異度 (0.3634)。基因流值 (0.636) 與遺傳分化係數 (0.4401) 都指出臺灣地區之葛藤已有明顯分化之現象，且大部分變異係存在於族群內個體間 (75.92%)。主座標分析與歸群分析之結果可於相似度 0.23 處劃分為 5 群，除去金門與基隆 2 群，其他三群可依地理區域來劃分，分別為北部、中部，以及南部加東部三群。最後由地理距離和遺傳距離關係檢定結果，得知遺傳漂變在族群間的分化上極為重要，且不可忽視。

致 謝

本研究由行政院農業委員會提供計畫經費補助 (103 農科 -2.1.7- 畜 L1 (8))，及承蒙國立嘉義大學土木與水資源工程學系陳錦焉老師提供分析軟體、行政院農業委員會林業試驗所鄧書麟博士、國立嘉義大學森林暨自然資源學系何坤益博士提供試驗分析上之建議，特此致謝。

參考文獻

- 陳皇丞、林明村、李姿蓉、侯金日、林正斌。2012。利用 ISSR 分子標誌檢測臺灣紫色狼尾草 (*Pennisetum purpureum* Schum) 遺傳歧異度。中華民國雜草學會會刊 33：77-90。
- 陳俊意、譚麗、張謙、管勤、楊延音、田樹高、楊治國、朱照靜、徐莉。2015。三峽庫區葛根遺傳多態性及葛根素含量差異研究。西南農業學報 28：2334-2336。
- 陳紫淵、胡澤寬、黃秋蘭、吳詩都、曾富生。2000。臺灣地區百慕達草 (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) 種內變異之研究。農林學報 49：19-31。
- 郭艷艷、成春燕、黃靜麗、楊旭東、盧家仕、王愛勤、何龍飛、姜伯樂、黃榮韶。2013。不同來源葛根遺傳多樣性 ISSR 分析。大眾科技 15：134-136。
- 葉茂生。1999。臺灣山地作物資源彩色圖鑑。臺灣省政府農林廳。南投。p. 31。
- 溫致群。2002。泰葛成分抗細胞增殖活性及葛屬植物成分定量之研究。中國醫藥學院藥物化學研究所碩士論文。臺中市。p. 67。
- 鄧書麟、游漢明、許原瑞、黃正良。2014。臺灣引種瘋樹種源之遺傳變異。臺灣農學會報 15：76-93。
- 鍾明哲、楊智凱。2012。臺灣民族植物圖鑑。晨星出版社 p. 398-399。
- Buso, G. S. C, P. H. Rangel and M. E. Ferreira. 1987. Analysis of genetic variability of south American wild rice population (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. Mol. Ecol. 7: 107-117.
- Excoffier, L. P., E. Smouse and L. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.
- Fischer, M., R. Husi, D. Prati, M. Peintinger, M. Van Kleunen and B. Schmid. 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculu reptans* (Ranunculaceae). Am. J. Bot. 87: 1128-1137.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt and S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forest. 6: 95-124.
- Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 2: 209-220.
- Morshedloo, M. R., M. R. F. Moghadam, A. Ebadi and D. Yazdani. 2015. Genetic relationships of Iranian *Hypericum perforatum* L. wild populations as evaluated by ISSR markers. Plant Syst. Evol. 301: 657-665.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Applied Biostatistics Inc.
- Shannon, C. E. and W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. Urbana: Univ. of Illinois Press.
- 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 C. D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. 38: 1409-1438.

- Sun, J. H., Z. C. Li, D. K. Jewett, K. O. Britton, W. H. Ye and X. J. Ge. 2005. Genetic diversity of *Pueraria lobata* (kudzu) and closely related taxa as revealed by inter-simple sequence repeat analysis. *Weed Res.* 45: 255-260.
- Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations. Vol. 2: The theory of gene frequencies.* Chicago: The University of Chicago Press, USA.
- Yang, C. Y., C. C. Chen, S. J. Lin, C. C. Chen and H. L. Lay. 2005. Component analysis of isoflavonoids in *Pueraria montana* and *Pueraria lobata* by high performance liquid chromatography. *Crop Env. Bioinform.* 2: 115-122.
- Yeh, F. C., R. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE version1.31: microsoft windows based freeware for population genetic analysis. A quick user's guide. A joint project developed by centre for international forestry research and university of Alberta, Canada.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

The analysis of genetic diversity of *Pueraria montana* in Taiwan revealed by ISSR method ⁽¹⁾

Pei-Hua Tsia ⁽²⁾ Shin-Lon Ho ⁽²⁾ Chin-Jin Hou ⁽²⁾ Jeng-Bin Lin ⁽³⁾ and Tzu-Rung Li ⁽³⁾⁽⁴⁾

Received: Jun.1, 2016; Accepted: Aug. 8, 2016

Abstract

Pueraria montana is widely in Taiwan area. Which roots can be used for food and make wine, stem can make ropes and leave can feed animals. This study investigated the genetic diversity among 91 samples collected from 18 areas in Taiwan. UBC inter-simple sequence repeat (ISSR) of the markers to distinguish gene structure for using. According to ISSR analysis, 15 primers were polymorphic from the results. The results of AMOVA showed those of the variance component between population regions, variance component between population within regions and the variance component among individuals within the population were 10.02%, 14.05% and 75.92%, respectively. The value of total gene diversity (H), genetic differentiation index (Gst) and gene flow index (Nm), were 0.3634, 0.4401 and 0.636 respectively. Cluster analysis and principal coordinate analysis revealed that the population could be divided into five groups by genetic distance 0.23. First group includes Taipei, Taoyuan, Hsinchu and Yilan. Second group includes Taichung, Pintung, Yunlin, Kaohsiung, Hualian, Taitung, Chiayi and Tainan. Third group includes Miaoli, Nantou, Changhua and Alishan. Fourth group includes Keelung, and the last one includes Kinmen. There is not significant relationship between genetic and geographical distance of populations. In conclusion, *Pueraria montana* has been the trend of differentiation, and genetic drift played an important role on the differentiation between groups.

Key word: Cluster analysis, Genetic diversity, ISSR, *Pueraria montana*.

(1) Contribution no. 2562 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Agronomy Department National Chiayi University, Chiayi, 600, Taiwan, R.O.C.

(3) Division of Forage Crops, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 712 Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: trli@mail.tlri.gov.tw.