

利用 AFLP 分子標誌技術探討台灣原生種青脆枝族群之遺傳變異

## Population Genetic Variation of *Nothapodytes foetida* Sleumer in Taiwan Base on AFLP

袁秋英<sup>1</sup>、張育修<sup>2</sup>、蔡巨才<sup>2</sup>

by

Chiou-Ing Yuan<sup>1</sup>, Yu-Hsiou Chang<sup>1</sup>, and Chi-Tsai Tsai<sup>1</sup>

關鍵詞：青脆枝、遺傳變異、增殖片段長度多型性 (AFLP)、分子標誌  
key words: *Nothapodytes foetida*, genetic variation, AFLP, molecular marker

摘要：青脆枝 (*Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer) 為富含喜樹鹼的抗癌植物，為蘭嶼之特有原生種。近年來台灣本島人工栽培的青脆枝族群，於外觀形態已呈現明顯差異，本研究利用增殖片段長度多型性 (Amplified fragment-length polymorphism, AFLP) 方法對青脆枝的遺傳變異進行評估。於蘭嶼、綠島、台東、屏東、高雄及嘉義等地區採集 8 個族群 64 個樣品，共測試 64 個引子，其中 8 組引子可擴增 114 個核酸條帶，101 個多型性條帶。經由分子變異分析 (analysis of molecular variance, AMOVA)，地區間變異佔總變異的 69.55%，地區內的變異佔總變異 30.45%，顯示青脆枝族群於地理區域間變異大於地理區域內之變異，地區間有明顯分化現象。經由遺傳距離的歸群分析及主座標分析結果，可將青脆枝分為 2 大族群：蘭嶼與路竹地區青脆枝各自形成單獨之群落，其餘位於知本、綠島、九如、新港、里港、中埔等地區的青脆枝為遺傳距離相近似的第 I-2 群，於相似度 0.87 處，可再將第 I-2 群分為 4 小群。此 2 大族群內樣品之間的相似度雖可高達 0.90 以上，但是地理距離接近族群，於歸群樹狀圖並未先歸成一類，顯示台灣本島栽培種間之差異與地理隔離無明顯相關性，可能與人為栽種有關。

1. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。公害防治組。植物分子毒理研究室。副研究員。  
Associate Specialist, Plant Molecular Toxicology Lab., Division of Plant Toxicology, Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture
2. 國立嘉義大學生物科技研究所碩士、教授兼所長。  
MS graduate, Professor and Chairman of Department of Molecular Biology and Biochemistry and graduate Institute of Biotechnology.

## 前 言

青脆枝 (*Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer) 為茶茱萸科 (Icacinaceae) 鷹紫花樹屬 (*Nothapodytes* Blume) 常綠灌木或小喬木，樹幹具稜角；葉膜狀革質，葉片卵狀橢圓形至披針狀長橢圓形，被短柔毛；聚繖花序或繖房花序，頂生；小花多數，白色或黃白色；花萼杯狀，兩面被絨毛；核果長橢圓狀卵形或卵圓形 (Chang, 1993)，花期約於 2~4 月，結果期約於 8~10 月。青脆枝主要分佈於南印度、錫蘭、寮國、琉球、中國大陸華南地區及台灣等地，台灣原生種產於蘭嶼及綠島 (Chang, 1993)，根據台灣大學植物標本館之數位資料庫 (<http://tai2.ntu.edu.tw/default.htm>) 顯示，日籍學者 Sasaki 於 1910 年即採集到蘭嶼地區的青脆枝 (標本館號：071304)，顯示此植物於台灣之發生已近百年歷史，最初之人工栽植地為台灣本島的台東縣 (Li, 1977; Liu, 1972)。約 10 餘年前日本派專人來台於台東縣知本地區，租用近百公頃土地栽種及收購青脆枝葉片及果實，研發萃取與製藥技術，並申請專利掌握最大的利益，後續青脆枝於台灣的栽種地區擴增至花蓮、高屏及嘉義地區。

有關青脆枝之組成份及藥理研究，首度由 Govindachari 及 Viswanathan 等人 (1972, 1974) 針對青脆枝的樹皮、莖、根及葉片純化分離出 alkaloids 及 triterpenoid 等化合物，進一步鑑定化學組成，發現其中喜樹鹼 (camptothecin) 含量約為 0.14~0.24% (Aiyama et al., 1988)，較喜樹 (*Camptotheca acuminata*) 的喜樹鹼含量 (0.1%) 更為豐富。喜樹鹼為植物鹼類化合物，最初從喜樹中分離出，矮蛇根草 (*Ophiorrhiza pumila*) 亦含有此成份。經由臨床試驗已證明喜樹鹼具有顯著抗腫瘤活性，包括非小細胞肺癌，子宮頸癌，大腸癌 (Yang et al., 2002)。此外喜樹鹼對其他具有化療敏感度之腫瘤亦有相當效果，如卵巢癌及小細胞肺癌 (Wall and Wani, 1996)，喜樹鹼之衍生物 irinotecan 及 topotecan® 於全球已有 58 個國家廣泛應用於癌症之治療，尤其有效用於大腸癌及直腸癌的治療 (Saito et al., 2001)。因此如何大量生產喜樹鹼，成為近年來重要之研究焦點，包括建立癒傷組織、毛狀根組織培養、細胞懸浮培養條件 (Ciddi and Shuler, 2000; Fulzele et al., 2001, 2002; Saito et al., 2001) 及喜樹鹼生合成主要酵素 strictosidine synthase 之基因表現等研究 (Yamazaki et al., 2003)，探討量產喜樹鹼之可行性。

由於青脆枝枝條扦插成活率僅 20~30%，一般人工栽培大都採用種子實生播種，於蘭嶼、綠島的原生種及花蓮、高屏、嘉義地區的栽培種經過世代繁殖，植株外觀形態已產生部份差異，青脆枝族群間的喜樹鹼含量是否也已改變，目前並無相關之研究。分子標誌 (molecular markers) 已普遍被應用於測定生物體核酸序列之變異 (Karp et al., 1996; Patzak, 2001; Yamagishi et al., 2002) 以及中草藥基源植材之鑑定 (Wu et al., 1998; Hosokawa et al., 2000)。目前有四種分子標誌方法使用於植物族群遺傳多型性之分析，包括限制片段長度多型性 (Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)、隨機擴增多型性 (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)、簡單序列重複區間 (Simple sequence repeats, SSR) 或微衛星核酸 (microsatellite DNA) 以及增殖片段長度多型性 (Amplified fragment-length polymorphism, AFLP) (Avisé, 1994; Weising et al., 1995; Vos et al., 1995)。其中 AFLP 技術為較新之技術，適於分析植物遺傳歧異性之多項特性，

包括不需預先知道核酸序列、所需核酸含量低、再現性高、可解析極少量遺傳質差異及可獲得較多資訊 (Mueller and Wolfenbarger, 1999; Vos et al., 1995)，此外 AFLP 技術可檢測族群中或個體間微小的遺傳差異，例如族群結構之變化以及近緣種間之親源遺傳 (Paul et al., 1997; Van Der Hulst et al., 2000)。本研究目的為利用 AFLP 分子標誌技術，探討台灣青脆枝原生及人工栽培族群之遺傳變異，作為篩選優良品系之依據。

## 材料與方法

### 一、植物材料來源

本研究使用之青脆枝為 2003 年 6 月至 12 月，分別於原生地之台東縣蘭嶼鄉 (OI 1~8)、綠島鄉 (GI 3-10) 以及栽培地之台東縣知本鄉 (CIP 1~8)、屏東縣九如鄉 (JU 1~8)、里港鄉 (LG 1~8)、高雄縣路竹鄉 (LC 1~8)、嘉義縣中埔鄉 (CUP1~8)、新港鄉 (HK 1~8) 等地區採集者，各地區 8 個取樣點，共檢測 64 個樣品，採集地點及代號標示於圖 1。

### 二、AFLP 反應

稱取 0.1 克青脆枝之幼葉，利用 Plant Genomic DNA purification (GeneMark, Taichung) 抽取基因組 DNA。以 300 ng/ $\mu$ l DNA 添加 1  $\mu$ l *Mse* I / *Eco*R I、2.5  $\mu$ l 10 X BSA、2.5  $\mu$ l 10 X reaction buffer 總體積為 25  $\mu$ l，於 37°C 進行 2 小時限制酶切割反應。利用 AFLP Analysis System I kit (Invitrogen)，再將反應後之 DNA 添加 2  $\mu$ l 100 mM *Mse* I / *Eco*R I adaptor、1  $\mu$ l T4 Ligase (2 unit /  $\mu$ l)、5  $\mu$ l 10 X T4 Ligase Buffer、2  $\mu$ l ATP 及 15  $\mu$ l 無菌去離子水，總體積為 50  $\mu$ l，於 16°C 反應 14-16 小時。以 TE Buffer 稀釋 10 倍，進行一次 PCR 反應，經接合反應後之 5  $\mu$ l DNA 添加含有 *Mse* I / *Eco*R I 切點序列之 10  $\mu$ M Pre-Amp Primer 各 1  $\mu$ l、5  $\mu$ l dNTP mix、1  $\mu$ l Taq Polymerase (Viogene)、5  $\mu$ l 10 X PCR Buffer、32  $\mu$ l 無菌去離子水，總體積為 50  $\mu$ l，進行 PCR 反應 (Arnheim and Erlich 1992)。反應步驟為：起始變性溫度為 94°C 5 分鐘；變性溫度 94°C 30 秒，煉合溫度 56°C 60 秒，延展溫度 72°C 60 秒，循環 40 週期；最後延展溫度 72°C 7 分鐘。將 PCR 產物稀釋 50 倍，交互選用 8 組具有 *Mse* I 及 *Eco*R I 切點序列之專一性引子 (M1~M8、E1~E8)，以前述條件進行 PCR 反應。取 1  $\mu$ l PCR 產物，注入於含 3.32 ml 30% 聚丙烯醯胺之 4 ml 0.5 X TBE 膠體 (總體積為 20 ml)，以 100 伏特電壓進行電泳分析，時間約 55 分鐘，銀染方法參照 cDNA Silver Sequence<sup>TM</sup> DNA Sequencing System (Promega) 方法修改。由影像分析儀 (Gel-Pro analyzer, Media Cybernetics) 之軟體分析 DNA 擴增的條帶。

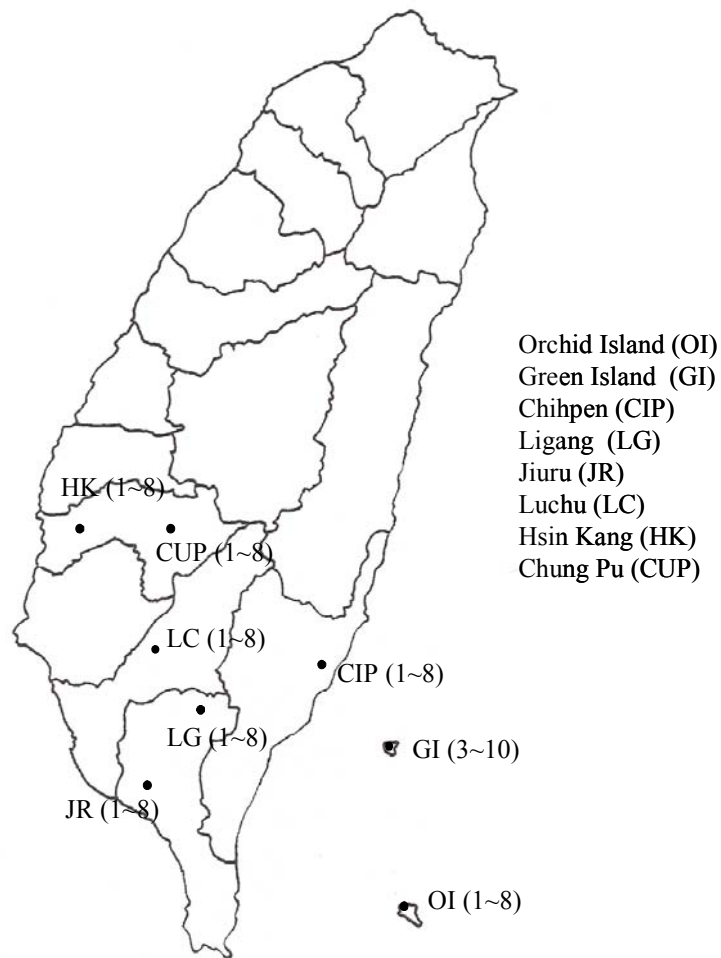


圖 1. 臺灣地區青脆枝之取樣位置圖。取樣點代號為台東縣蘭嶼鄉 (OI 1~8)、台東縣綠島鄉 (GI 3~10)、台東縣知本鄉 (CIP 1~8)、屏東縣里港鄉 (LG 1~8)、屏東縣九如鄉 (JR 1~8)、高雄縣路竹鄉 (LC 1~8)、嘉義縣新港鄉 (HK 1~8) 及嘉義縣中埔鄉 (CUP 1~8)。

Fig. 1. The sampling locations of *Nothapodytes foetida* in Taiwan. The abbreviations of sampling sites are: Orchid Island (OI 1~8), Green Island (GI 3~10), Chihpen (CIP 1~8), Ligang (LG 1~8), Jiuru (JR 1~8), Luchu (LC 1~8), Hsin Kang (HK 1~8), Chung-Pu (CUP 1~8).

### 三、AFLP 條帶資料分析

#### (一) 遺傳相似度 (Genetic similarity) 與歸群分析 (Cluster analysis)

利用 NTSYS-PC ver.2.0 套裝軟體 (Rohlf, 1997)，以 Dice (1945) 相似度公式計算兩兩樣本間的相似度 ( $S_{AB}$ )，建立相似度矩陣 ( $S_m$ )， $S_m = M/N$ ， $M$  為兩兩樣本相同條帶數， $N$  為多型性條帶總數。再以不加權算數平均值 (Unweighted Pair-group Mean Analysis, UPGMA) 進行歸群分析，並繪成樹狀圖 (Dendrogram)。DICE 相似度公式如下：

$$S_{AB} = 2N_{AB} / (2N_{AB} + N_A + N_B)$$

$S_{AB}$ ：A 及 B 兩樣品間的相似度

$N_A$ ：只有樣品 A 出現的條帶數目

$N_B$ ：只有樣品 B 出現的條帶數目

$N_{AB}$ ：樣品 A 與 B 皆出現的條帶數目

#### (二) 族群間之遺傳距離及歸群分析

將 Microsoft Excel 所算出的族群間遺傳距離矩陣 ( $\Phi_{st}$ )，以 NTSYS-PC ver.2.0 之 UPGMA 方法進行歸群分析，並繪製成樹狀圖 (Dendrogram)，並根據 UPGMA 歸群後的樹形圖矩陣 (Cophenetic matrix) 和原距離矩陣  $\Phi_{st}$  做比較，得到協表相關係數  $r$  (Cophenetic correlation coefficient)，表示樹形圖與原距離矩陣的扭曲程度 ( $r \geq 0.9$  表示一致性非常高； $0.9 > r \geq 0.8$  表示一致性良好； $0.8 > r \geq 0.7$  表示一致性不佳； $0.7 > r$  表示一致性差)。

#### (三) 主座標分析 (Principal coordinates analysis, PCA)

將 Microsoft Excel 所算出的族群間遺傳距離矩陣 ( $\Phi_{st}$ )，以 NTSYS-PC ver.2.01c 的 double center 方程式轉換距離矩陣而得各主座標軸，再進行主座標分析，求出各族群在三維空間上的立體分布關係圖。

## 結 果

### 一、利用 AFLP 分析青脆枝多型性核酸條帶

青脆枝之試驗材料，經由 AFLP 分析，共篩選 64 對含有 *EcoR* I 及 *Mse* I 切位的引子組，由電泳分析及銀染圖譜顯示，其中 23 對引子組可於樣品間產生多型性條帶，以代號 E2M3、E2M6、E3M6、E3M8、E5M4、E5M7、E6M3 及 E7M36 等 8 對引子組效果較佳，擴增的總條帶數共 114 條，其中多型性條帶 101 條，佔總條帶數之 88.6%，各樣品的多型性條帶 8-17 條，以 E3M8 引子組擴增的多型性條帶數最多 (表 1、圖 2)。

青脆枝各地區樣品可擴增之專一性條帶列於表 2，以 E2M3 引子組反應，其中僅蘭嶼地區樣品 (OI) 於 120 及 155 bp 處無擴增條帶。以 E2M6 引子組反應，僅蘭嶼 (OI)、中埔 (CUP) 及新港地區樣品 (HK) 於 220 bp 處無擴增條帶。以 E3M6 引子組反應，僅路竹 (LC) 及蘭嶼 (OI) 於 120 bp 處、九如 (JR) 於 130 bp 處以及路竹地區樣品 (LC) 於 220 bp 處無擴增條帶。以 E3M8 引子組

反應，僅路竹 (LC) 及蘭嶼 (OI) 於 180 bp 處；路竹 (LC)、蘭嶼 (OI)、知本 (CIP) 及新港 (HK) 於 290 bp 處有擴增條帶，唯有路竹地區樣品 (LC) 於 1000 bp 處無擴增條帶。以 E5M4 引子組反應，僅路竹 (LC)、蘭嶼 (OI) 與知本地區樣品 (CIP) 於 90 bp 處，以及路竹地區樣品 (LC) 於 800 bp 處無擴增條帶。以 E5M7 引子組反應，蘭嶼 (OI)、里港 (LG) 與中埔 (CUP) 於 380 bp 處，路竹 (LC) 與蘭嶼 (OI) 於 200 及 390 bp 處，以及路竹地區樣品 (LC) 於 110 及 410 bp 處無擴增條帶。以 E6M3 引子組反應，僅路竹地區樣品 (LC) 可於 210 及 300 bp 處擴增專一性條帶，其他地區之青脆枝樣品則否。以 E7M3 引子組反應，僅知本 (CIP)、中埔 (CUP) 及新港地區樣品 (HK) 於 220 及 400 bp 處無擴增條帶。

表 1. AFLP 引子擴增之青脆枝核酸多型性片段。

Table 1. Number of polymorphic fragments obtained with eight AFLP primer pairs in *Nothapodytes foetida*.

Primer pairs	Fragment length (bp)	No. of fragments	No. of polymorphic fragments
E2M3 ( <i>EcoR</i> I-AAG/ <i>Mse</i> I-CAG)	60-1500	14	13
E2M6 ( <i>EcoR</i> I-AAG/ <i>Mse</i> I-CTC)	80-250	12	10
E3M6 ( <i>EcoR</i> I-ACA/ <i>Mse</i> I-CTC)	70-650	17	16
E3M8 ( <i>EcoR</i> I-ACA/ <i>Mse</i> I-CTT)	80-1500	18	17
E5M4 ( <i>EcoR</i> I-ACG/ <i>Mse</i> I-CAT)	80-1000	15	12
E5M7 ( <i>EcoR</i> I-ACG/ <i>Mse</i> I-CTG)	80-1200	14	11
E6M3 ( <i>EcoR</i> I-ACT/ <i>Mse</i> I-CAG)	100-500	9	8
E7M3 ( <i>EcoR</i> I-AGC/ <i>Mse</i> I-CAC)	60-1300	15	14
Totals		114	101

表 2. AFLP 引子擴增青脆枝 DNA 之專一性核酸片段數目。

Table 2. Number of specific DNA fragments obtained with eight AFLP primer pairs in *Nothapodytes foetida*.

Primer	DNA fragment (bp)	LC <sup>1)</sup>	OI	GI	CIP	JR	LG	CUP	HK
E2M3	155	1 <sup>2)</sup>	0	1	1	1	1	1	1
	120	1	0	1	1	1	1	1	1
E2M6	220	1	0	1	1	1	1	0	0
	220	0	1	1	1	1	1	1	1
E3M6	130	1	1	1	1	0	1	1	1
	120	0	0	1	1	1	1	1	1
	120	0	0	1	1	1	1	1	1
E3M8	1000	0	1	1	1	1	1	1	1
	290	1	1	0	1	0	0	0	1
	180	1	1	0	0	0	0	0	0
E5M4	800	0	1	1	1	1	1	1	1
	90	0	0	1	0	1	1	1	1
E5M7	410	0	1	1	1	1	1	1	1
	390	0	0	1	1	1	1	1	1
	380	1	0	1	1	1	0	0	1
	200	0	1	1	1	1	1	1	0
	110	1	1	1	1	1	1	1	0
E6M3	300	1	0	0	0	0	0	0	0
	210	1	0	0	0	0	0	0	0
E7M3	400	1	1	1	0	1	1	0	0
	220	1	1	1	0	1	1	0	0

1) The abbreviations of samples are as those listed in Fig. 1.

2) 1-Fragment present. 0-Fragment absent.

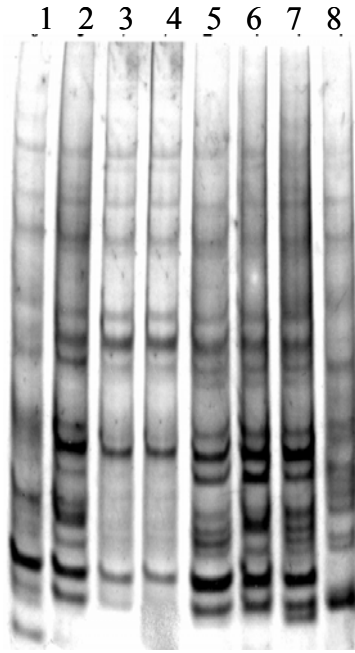


圖 2.以 E5M7 引子擴增青脆枝族群 DNA 之 AFLP 圖譜. 第 1 條為蘭嶼-8、第 2 條為綠島-3、第 3 條為里港-7、第 4 條為中埔-7、第 5 條為新港-2、第 6 條為九如-4、第 7 條為知本-4、第 8 條為路竹-4。

Fig. 2. AFLP profile of *Nothapodytes foetida* species amplified from the primer E5M7. Lane 1, OI-8, lane 2, GI-3, lane 3, LG-7, lane 4, CUP-7, lane 5, HK-2, lane 6, JR-4, lane 7, CIP-4, lane 8, LC-4.

## 二、青脆枝遺傳相似性及親源樹狀圖分析

利用 DICE 相似度公式，將多型性條帶之結果換算為樣品間之相似度 ( $S_{AB}$ )，建立相似度矩陣 ( $S_{DAB}$ )，再依據不加權算數平均值 (UPGMA)，進行歸群分析，並繪製成樹狀圖 (圖 3)。根據樹狀圖結果顯示，青脆枝 64 個樣品於相似度約 0.80 處可分為 2 群：第 I 群再分為兩小群，第 I-1 群包括蘭嶼地區 8 樣品，第 I-2 群包括綠島、知本、九如、中埔等地區 48 個樣品，第 II 群包括高雄地區 8 樣品，第 I-2 群依據樹狀圖相似度 0.87 處，可再分為 4 小群。此 4 小群內樣品間之相似度高達 0.90 以上，平均相似度為 0.95。

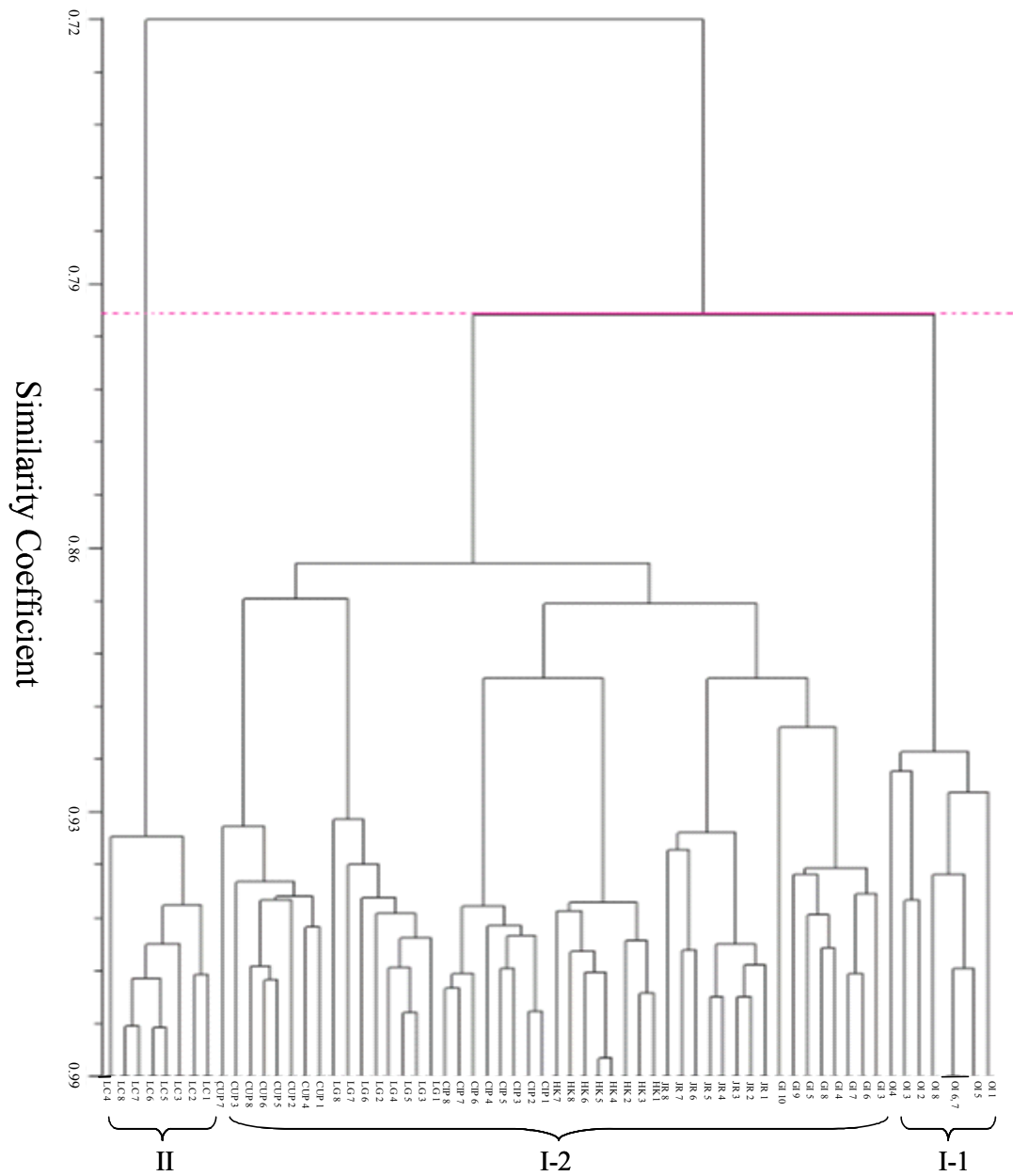


圖3. 利用 AFLP 檢測 64 個青脆枝族群之多型性條帶差異，經 UPGMA 群叢分析之樹狀關係圖。樣品代號參考圖 1。

Fig. 3. Phylogenetic tree based on AFLP in 64 samples of *Nothapodytes foetida* by UPGMA. The abbreviations of samples are as those listed in Fig. 1.

### 三、青脆枝族群之 AMOVA 及主座標分析

利用 AMOVA 分析青脆枝族群並將所得之各變方成分經 9,999 次隨機重排列，各變方成分均達顯著水準（表 3），分別將綠島及蘭嶼之自生種原與台灣本島之栽培種，依據地區間（原生種與栽培種間）及地區內種原間（各種原間）二階層變方分析，結果青脆枝 8 地區 64 個樣品於地理區域之差異性，顯示地區間的變方成分為 69.55% ( $p < 0.001$ )，地區內的變方成分為 30.45% ( $p < 0.001$ )。將所有樣品多型性條帶資料，以 AMOVA 軟體計算出族群遺傳距離 ( $\Phi_{st}$ ) 矩陣，各地區間遺傳距離樹狀圖呈現於圖 4，九如及里港與綠島地區樣品之遺傳距離最近、新港與知本相近，路竹與其他族群較遠(圖 4)。再利用 NTSYS 軟體轉換距離矩陣，經由主座標分析，解析各族群於空間之對應。遺傳變異主座標分析的結果顯示，可將青脆枝族群分為 3 群：蘭嶼與路竹地區的青脆枝各自形成單獨之群落，其餘位於知本、綠島、九如、新港、里港、中埔等地區的青脆枝為遺傳距離相近似的第 3 群（圖 5）。

表3. 利用AMOVA分析青脆枝族群之遺傳變異.

Table 3. Hierarchical analysis of molecular variance in 64 samples of *Nothapodytes foetida* by AMOVA analysis.

Variation	df	SSD	MSD	Variance components	Total variance (%)	<i>p</i> -value
within population	7	432.67	61.82	7.33	69.55	<0.001
among population	56	179.63	3.21	3.21	30.45	<0.001

df: degree of freedom, SSD: sum of squares, MSD: mean squares, *p*-value: more extreme random value

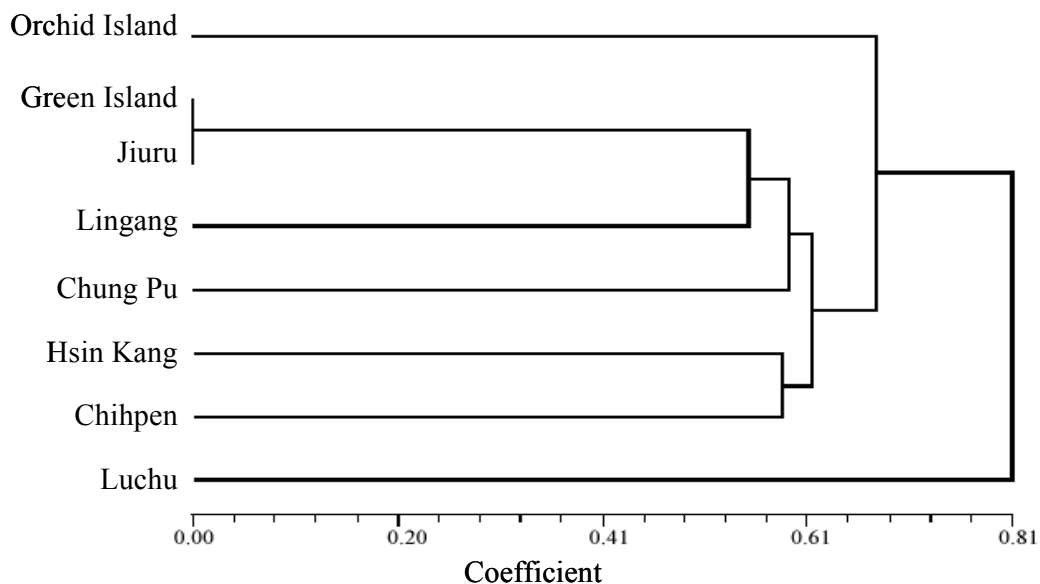


圖 4. 青脆枝 8 個地區族群之遺傳距離樹狀圖.

Fig. 4. UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance showing the relationships in eight populations of *Nothapodytes foetida*.

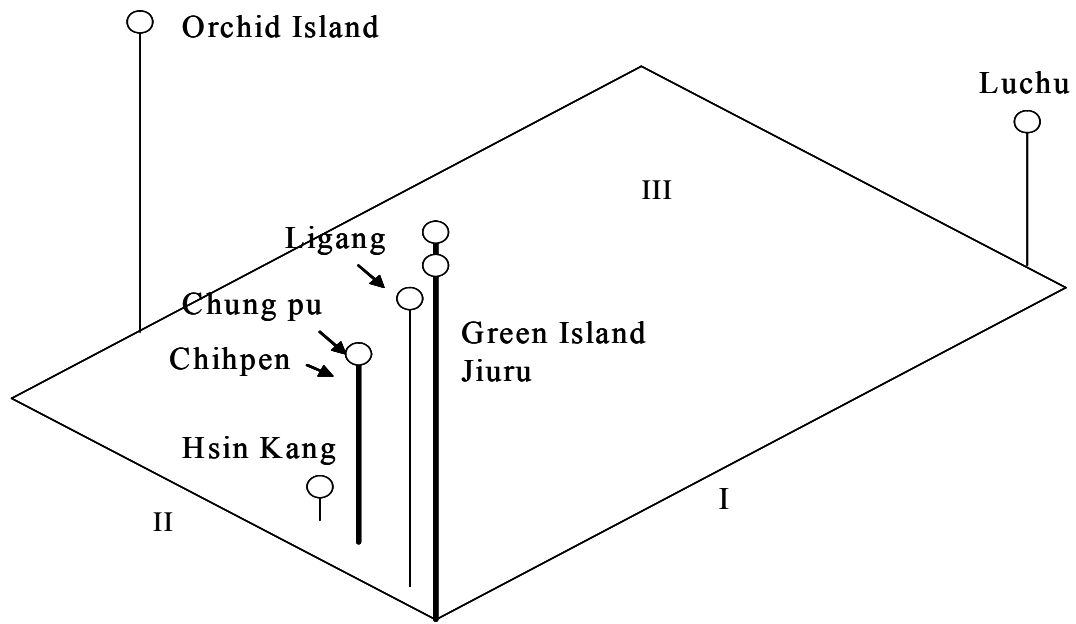


圖5. 青脆枝8個地區族群之主座標分析.

Fig. 5. Principal coordinate analysis in eight populations of *Nothapodytes foetida* based on AFLP markers.

## 討 論

本研究經由 AFLP 分析，64 個引子組可於青脆枝族群樣品間產生多型性條帶，擴增的總條帶數共 114 條，多型性條帶 101 條，佔總條帶數之 88.6%。路竹地區樣品以 E6M3 引子組反應，可於 210 及 300 bp 處擴增專一性條帶；僅蘭嶼地區樣品經 E2M3 引子組反應，於 155 及 120 bp 處無擴增條帶；僅路竹地區樣品經 E3M8 及 E5M7 引子組反應，於 1000 及 410 bp 處無擴增條帶；僅屏東地區樣品經 E3M6 引子組反應，於 130 bp 處無擴增條帶，因此蘭嶼、路竹及屏東地區之青脆枝樣品，可經由 AFLP 引子組擴增後產生專一性條帶與否加以區別。

經由 AMOVA 分析探討青脆枝遺傳變異成分，青脆枝 8 地區 64 個樣品之分析結果，地區間變方成分為 69.55%，地區內的變方成分為 30.45%，顯示青脆枝族群於原生種與栽培種之變異大於各種原間之變異，種原間亦有明顯分化現象。大陸地區特有植物沙鞭之族群分析研究顯示，不同地區間的變異（87.46%）亦大於同一地區內的變異（12.54%）。硬粒小麥（durum wheat）應用 AFLP 方法分析，結果顯示各族群之間皆有 85% 以上的變異，而族群內只有 15% 以下的變異（Soleimani et al., 2002）。一般多年生木本植物的歧異度大部份發生於族群內的個體之間，台灣玉山竹族群經過 RAPD 技術之研究及 AMOVA 分析，於地區間、地區內、個體間的變異分別為 12.00%、9.05% 及 78.95%，顯示由於產地不同只造成些微地理的差異（Hsiao, 1994）。

探討青脆枝種原之親源關係，經由 AFLP 分析結果之基因片段，進行頻度分析（Nei, 1973），計算種原間之遺傳距離，再進行歸群分析，經比對遺傳距離矩陣與樹狀圖關係矩陣，得協表相關係數  $r$  值為 0.96，顯示該歸群圖可呈現高可信度之群團狀態。經由遺傳距離的歸群分析結果，可明顯區分為蘭嶼、高雄路竹與

其他地區 2 大群。其中綠島原生種與屏東九如及里港地區的栽培種連結成主要群團，顯現其親源關係較親近，而且表示屏東、嘉義及台東地區之栽培種原可能來自於綠島原生種，而與高雄路竹地區之遺傳距離最遠。此現象與何等人 (2004) 研究木賊葉木麻黃及山木麻黃栽培種原遺傳關聯類同，其栽培種可能來自於共祖的效應，而與其中自生種原歸成一群表現親緣關聯。此 2 大族群內樣品之間的相似度雖可高達 0.90 以上，但是地理距離接近的青脆枝，於歸群樹狀圖並未先歸成一群，顯示台灣本島栽培種間之差異與地理隔離無明顯相關性，可能與人為長期栽種有關。

同一植物族群內不同基因組所表現之不同異型結合 (heterozygosity)，可能由於天擇、遺傳漂變或是突變等演化因子所引起 (Nei, 1973; Schaal et al., 1996; Slatkin, 1987)。本試驗中由於蘭嶼及綠島地區的青脆枝為原生種，未經人工栽培管理，其遺傳組成的變異因屬自然演化之結果，由樣品個體間遺傳相似度仍維持於 90% 以上之現象，顯示自然演化之變異緩慢，可能之繁殖系統為近親交配 (inbreeding)，遺傳歧異度則可藉由族群中偶發之異交 (outcrossing) 維持。然而由主座標分析結果，可明顯區隔蘭嶼與綠島及其他地區的距離，顯示可能為地理隔離之故。蘭嶼位於台灣東南方，由於經年高溫、高濕、多雨，具有熱帶雨林的特性 (劉、林, 1978)，蘭嶼的地理位置與台灣本島的恆春半島十分相近，不論溫度、雨量或是颱風及東北季風的影響均非常類似，但是蘭嶼地區的植物種類與恆春半島南仁山永久樣區及天池樣區的植物種類，僅有 28 及 21% 之相似度，顯示除環境條件之因子外，其他因子如森林形成的時間長短及生物間的交互關係等，均可能是造成蘭嶼森林樹種組成獨特的原因之一 (Severinghaus, 1989)。

綠島與台東、屏東及嘉義等地區的青脆枝具有相近的遺傳距離，綠島是由火山岩及珊瑚礁構成，故土壤成分均由其風化而來，除海濱地帶為高鈣鹼之特性外，其餘均屬酸性土質，與台灣本島的土質具明顯差異，綠島早期原住民對於植物之利用，未有太大之破壞。台東、屏東及嘉義等地區人工栽培管理的青脆枝，遺傳距離近似於綠島地區，是否由於植材取自於綠島品系之故，仍有待進一步證實。至於高雄路竹地區的青脆枝與其他地區者具有顯著差異，可能種源經由實生繁殖時發生變異，造成遺傳組成與其他地區者產生明顯差異，此現象亦待證實。近年來，蘭嶼與綠島地區在過度的耕作與開墾下，原始林區正逐漸減少，植物生態已發生極大變化，因此欲維繫青脆枝原生種品系之遺傳組成，實為刻不容緩的重要課題。

## 結 語

青脆枝為台灣蘭嶼原生種之常綠灌木或小喬木。目前日本委託台灣栽植之種苗皆以種子實生播種繁殖，易發生遺傳質變異，由栽種地區之訊息得知蘭嶼、台東縣知本鄉及屏東縣為第一、二代實生苗；嘉義縣中埔鄉及新港鄉為第三、四代種子；高雄縣路竹鄉、旗山鎮及屏東縣里港鄉為第五、六代種子。經過多次世代間繁殖，在田間種苗歧異度更高，本研究結果顯示青脆枝族群於地理區域間有明顯分化現象，種苗之變異是否影響喜樹鹼成份之含量，為目前仍不明確之疑慮。因此利用分子生物標誌，配合青脆枝形態、喜樹鹼含量分析、生育習性及優良農業操作 (Good Agriculture Practice, GAP) 栽培管理系統，進行初步觀察與試驗，可供爾後篩選優良健康種源，大面積栽培或提高產能設計之參考，故原生種青脆枝之保種工作應持續加強及受重視。

## 引用文獻

- 何坤益、楊政川、鄧書麟、陳財輝. 2004. 應用 ISSR 解析山木麻黃國際種原之遺傳變異與種原關係. 台灣林業科學. 19 (1):79-88.
- Ho, K. Y., J. C. Yang, S. L. Deng, and T. H. Chen. 2004. Assessment of Genetic Variation and Relationships of International Provenances of *Casuarina junghuhniana* using ISSR. Taiwan J For Sci. 19(1):79-88.
- 劉小如、楊曼妙、楊正澤、孫義方、謝宗欣. 2000. 蘭嶼森林生物多樣性. 2000 年海峽兩岸生物多樣性與保育研討會論文集. pp.71-79. 周延鑫 謝豐國 吳聲華 周文豪 編 國立自然科學博物館 2000 年 12 月。台中，台灣
- Liu, C. R., M. M. Yang, Z. Z. Yang, Y. F. Sun, and Z. X. Xie. 2000. Forest biological diversity in Orchid Island. .p.71-79. Proceedings of the 2000 Mainland China –Taiwan Conference on Biological Diversisty and Conservation. National Museum of Natural Science Press, Dec. 2000. Taichung, Taiwan.
- 劉崇瑞、林則桐. 1978. 台灣天然林之群落生態研究（四）蘭嶼植群與植相之研究. 省立博物館科學年刊 21:1-80.
- Aiyama, R., H. Nagai, K. Hokata, C. Shinohara and S. Sawada. 1988. Acamptothecin derivation from *Nothapodytes foetida*. Phytochemistry 27:3663-3664.
- Arnheim, N. and H. Ehrlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. Ann. Rev. Biochem. 61:131-56.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall. New York, London.
- Chang, C. E. 1993. Icacinaceae, *In* Huang, C. T. (ed.-in chief), Flora of Taiwan. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 3. p.674-679. Editorial Committee of the Flora of Taiwan. Taipei.
- Ciddi, V. and M. L. Shuler. 2000. Camptothecin from callus cultures of *Nothapodytes foetida*. Biotechnol. Lett. 22:129-132.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302.

- Fulzele, D. P., R. K. Satdive, and B. B. Pol. 2001. Growth and production of camptothecin by cell suspension cultures of *Nothapodytes foetida*. *Planta Med.* 67:150-2.
- Fulzele, D. P., R. K. Satdive, and B. B. Pol. 2002. Untransformed root cultures of *Nothapodytes foetida* and production of camptothecin. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69: 285-288.
- Govindachari, T. R. and N. Viswanathan. 1972. Alkaloids of *Mappia foetida*. *Phytochemistry* 11:3529–3531.
- Govindachari, T. R., K. R. Ravindranath, and N. Viswanathan. 1974. Isolation and structure of mappicine. *J. Chem. Soc. Perkin* 1:1215-1221.
- Hosokawa, K., M. Minam, K. Kawahara, I. Nakamura, and T. Shibata. 2000. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers. *Planta Med.* 66:270-272.
- Hsiao, J. Y. and L. H. Rieseberg. 1994. Population genetic structure of *Yushania niitakayamensis* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan. *Mol. Ecol.* 3:201-208.
- Karp, A., O. Seberg, and M. Buiatti. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot.* 78:143-149.
- Li, H. L. 1977. Icacinaceae, *In* Huang, C. T. (ed.-in chief), *Flora of Taiwan*. Vol. 3. p.646-649. Editorial Committee of the Flora of Taiwan. Taipei.
- Liu, Y. C. 1972. *Ligneous Plants of Taiwan*, p. 500. National Chung-Shing University, Taiwan.
- Mueller, U. G. and L. L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol.* 14:389-394.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3321-3323.
- Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.) *Euphytica* 121:9-18.
- Paul, S., F. N. Wachira, W. Powell, and R. Waugh. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L) O.Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 94:255-263.
- Rohlf, F. J. 1997. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Saito, K., H. Sudo, M. Yamazaki, M. Koseki-Nakamura, M. Kitajima, H. Takayama, and N. Aimi. 2001. Feasible production of camptothecin by hairy root culture of

*Ophiorrhiza pumila*. Plant Cell Rep. 20:267-271.

- Severinghaus, L. L. 1989. The status and conservation of Lanyu Scops Owl *Otus elegans botelensis*. p. 423-431. *In*: Raptors in the Modern World. Eds. Meyburg, B. U. and R. D. Chancellor. WWGBP: Berlin, London & Paris.
- Schaal, D. W., M. P. McDonald, M. A. Miller, and M. P. Reilly. 1996. Discrimination of methadone and cocaine by pigeons without explicit discrimination training. *J. Exp. Anal. Behav.* 66:193-203.
- Soleimani, V. D., B. R. Baum, and D. A. Johnson. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) *Theor. Appl. Genet.* 104:350-357.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- Van Der Hulst, R.G., T. H. Mes, J. C. Den Nijs, and K. Bachmann. 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal that population structure of triploid dandelions (*Taraxacum officinale*) exhibits both clonality and recombination. *Mol. Ecol.* 9:1-8.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleejer, M. Reijans, T. V. D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Wall, M. E. and M. C. Wani. 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J. Ethnopharmacol.* 51:239-254.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA Fingerprinting in Plant and Fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Wu, P., K. Y. Zhou, L. S. Xu, and J. C. Teng. 1998. Molecular identification of the Chinese drugs turtle shells. *Acta Pharmaceutica Sinica* 33:304-309.
- Yamagishi, M., H. Abe, M. Nakano, and A. Nakatsuka. 2002. PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. *Scientia Hort.* 96:225-234.
- Yamazaki, Y., A. Urano, H. Sudo, M. Kitajima, H. Takayama, M. Yamazaki, N. Aimi, and K. Kitajima. 2003. Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants. *Phytochemistry* 62:461-470.
- Yang, L. X., X. Pan, and H. J. Wang. 2002. Novel camptothecin derivatives. Part 1 : oxyalkanoic acid esters of camptothecin and their in vitro and in vivo antitumor activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:1241-1244.

## Abstract

*Nothapodytes foetida* Sleumer is an indigenous species of Icacinaceae in Taiwan, known only from Orchid Island and Green Island. Amplified fragments length polymorphism (AFLP) markers was employed to characterize the genetic variation of *N. foetida* populations, collected from Orchid Island, Green Island, Chihpen, Jiuru, Luchu, Hsin Kang and Chung-Pu areas. There were 101 polymorphic bands produced by 8 selected AFLP primers. Based on AMOVA analysis, the variance components among and within populations were 69.55% and 30.45% respectively, indicating a significant genetic differentiation within populations. Similar results were obtained with unweighted pair group method with arithmetic (UPGMA) and principal coordinate analysis (PCA) separating populations into three large groups, Orchid Island, Luchu and the others populations. *N. foetida* sampled from Luchu constitute gene pools that are clearly different from native plants, despite some geographical pattern of genetic differentiation among cultivated *N. foetida* populations exists. Results from AFLP markers showed highly significant correlations in genetic variation among populations.