

台灣產土肉桂、山肉桂、及胡氏肉桂 (樟科) 之遺傳變異與分類地位

何坤益*

國立嘉義大學森林暨自然資源學系

(收稿日期: 2006.8.4, 接受日期: 2006.12.6)

摘 要

山肉桂 (*Cinnamomum insulari-montanum* Hayata) 胡氏肉桂 (*C. macrostemon* Hayata) 與土肉桂 (*C. osmophloeum* Kanehira) 等為台灣樟科特有種植物, 此三種肉桂類植物在植物分類上一直存有爭議及困難, 本研究應用簡單序列重複 (Inter-Simple Sequence Repeat, 簡稱 ISSR) 分子指紋技術探討其遺傳變異與分類地位關係。研究分析了在臺灣自然分佈之 22 地區 144 個樣本, 試驗共使用 12 個 ISSR 引子進行 PCR 擴增, 產生了 52 個多型性條帶, 遺傳變異分析結果, 分子變方分析 (AMOVA) 顯示種間之變方成分是 27.24% ($p < 0.01$), 而種內之變方成分是 72.67% ($p < 0.001$), 顯示變異來自各種內。根據 POPGENE 分析各種內之遺傳分化程度, 山肉桂與胡氏肉桂可能受到地理隔離影響具有明顯的地理分化, Nm 值分別為 0.5024 及 0.6533; 而土肉桂基因流值為 1.2626, 顯示較低的遺傳分化現象。探討分類地位關係所進行之歸群分析樹狀圖顯示土肉桂、山肉桂與胡氏肉桂族群各自形成三群團, 這樣的結果亦受到主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, PCOA) 之支持。

關鍵詞: 土肉桂、山肉桂、胡氏肉桂、簡單序列重複、遺傳變異、分類地位、分子變方分析

緒 言

肉桂類 (肉桂節) 植物屬樟科 (Lauraceae) 樟屬 (*Cinnamomum*), 樟屬植物全世界約有 250 種, 主要分佈在亞洲熱帶、亞熱帶、太平洋群島及澳洲等, 台灣有 12 種, 其中肉桂類有 7 種, 分別為牡丹葉桂皮 (*C. austro-sinense* H.T.Chang)、山肉桂 (*C. insulari-montanum* Hayata)、蘭嶼肉桂 (*C. kotoense* Kanehira & Sasaki)、胡氏肉桂 (*C. macrostemon* Hayata)、土肉桂 (*C. osmophloeum* Kanehira)、香桂 (*C. subavenium* Miq) 及天竺桂 (*C. tenuifolium* form. *nervosum* Sieb.)。山肉桂、蘭嶼肉桂、胡氏肉桂及土肉桂為台灣特有種; 另外亦有引進之肉桂栽培如肉桂 (*C. cassia* Presl) 及錫蘭肉桂 (*C. verum* Bl.) (Liu *et al.*, 1994, Yang *et al.*, 1999, Liao, 1995, Liao, 1996)。肉桂具有醫藥及食品添加香料等用途, 另外亦有抗菌的作用, 甚具經濟價值。過往研究發現台灣之土肉桂葉部肉桂醛 (cinnamaldehyde) 含量甚高, 極具發展潛力 (Wang, 1987), 但精油的含量與產地有關, 似乎顯示土肉桂族群間已有分化產生的現象 (Yin, 1991)。

土肉桂俗稱假肉桂, 分布由低海拔至 1500 m 闊葉樹林, 全株富含單寧成分, 尤其是樹皮有辛辣的肉桂香味, 可代替肉桂供藥用及香料 (胡大維, 1992)。山肉桂俗名為台灣肉桂或桂枝, 全島雖有分佈, 但族群集中於中部的奧萬大及霧社, 自其樹皮提取之精油, 亦可供藥用或香料 (Liu *et al.*, 1994)。胡氏肉桂則為常綠喬木, 分佈於中、低海拔森林, 族群零散分佈於臺北五指山、翡翠水庫等地區, 本種已列為 IUCN 物種保育等級評估為易受害 (vulnerable) 之稀有植物 (Lu and Chiu, 1994)。雖在植株形態上此三種肉桂在植物分類仍有區別性狀, 如山肉桂之芽無鱗片, 葉為廣橢圓形, 花梗及花被片外有絹毛。土肉桂之芽具鱗片且光滑, 葉為狹長橢圓形, 花梗與花被片光滑。胡氏肉桂之芽具覆瓦狀排列 9 鱗片被毛, 葉為橢圓至披針形, 花梗與花被片白色絹毛; 惟天然林中植株形態常因環境因素, 每有中間形態與變異者, 故其之分類一直有困難。

三種肉桂在植物分類訂正過程中, 僅土肉桂自 Hayata (1913) 命名, 經 Sasaki (1928)、Kanehira (1936)、Li (1963) 等, 一直到 Liao (1988) 訂定為獨立種, 其分類地位較為穩固。然而山肉桂及胡氏肉之命名發表後, 卻一再經分類學家之

*通信作者: 何坤益 (Kuen-Yih Ho); FAX: 886-5-2717467; E-mail: kyho@mail.ncyu.edu.tw

訂正與不同分類處理，此亦可見其族群之變異由來已久（潘富俊，1992）。山肉桂最早由 Hayata (1913) 命名，Kanehira (1936) 將之處理為土肉桂之異名；Li (1963) 將之併於日本香桂 (*C. japonicum*)，直到 Liu and Liao (1971) 才又將土肉桂自日本香桂分離出來，山肉桂目前國內分類處理雖趨於一致，如 Liu et al., (1988) 及 Liao (1988) 視為獨立種，惟 Li (1984) 所編著之中國植物誌並未列本種仍將處理為日本香桂。胡氏肉桂亦為 Hayata (1913) 所命名，發表後一直受到質疑，Kanehira (1936) 認為應與山肉桂同種。Li (1963) Chang (1976) 與 Li (1984) 之中國植物誌未列胡氏肉桂。Liu and Liao (1971) 將胡氏肉桂列為日本肉桂之異名。最近 Lu and Yang (1986) 根據芽鱗之排列，及其上之褐色毛等特徵肯定此種之分類地位。但隨後 Liao (1988) 再將胡氏肉桂處理成山肉桂之異名。因此，除土肉桂之命名被訂定為獨立種分類地位較為穩固外，胡氏肉桂與山肉桂，則從其命名與後續訂正過程即可見其爭議。

近年來，分子標記廣泛應用在生物種內、種間、族群內、族群間的研究。Ziekiewicz et al. (1994) 發展的簡單序列重複 (Inter-Simple Sequence Repeat, 簡稱 ISSR) 分子指紋技術，不須事先知道材料 DNA 的序列，且由相同單元組成的 ISSR 可以出現在親緣很遠的分類群間，使得這項技術可以同時放大許多個基因座，且同一個引子可以應用到不同的分類群研究上。加上 ISSR 引子能提高專一性，分析結果更可靠，其操作簡單、不需特殊設備與大量的 DNA，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。目前 ISSR 被應用到遺傳變異的偵測 (Ge et al., 2003, Li et al., 2002, Li and Ge, 2001, Qian et al., 2001) 品種品系之區分 (Prevost and Wilkinson, 1999) 自然族群雜交現象之研究 (Hollingsworth et al., 1998, Wolfe et al., 1998) 等。

由於台灣各地海拔、氣候變化與生育地環境差異，是否因生育地的不同而族群間產生遺傳變異與形態之分化，本研究即應用 ISSR 分子標記，探討三種肉桂之遺傳變異與分類地位。

材料與方法

一、材料

本研究針對山肉桂、胡氏肉桂及土肉桂等三

種肉桂類植物之天然族群進行取樣，採得產於台灣之 22 個自然分佈地區 (Table 1 及 Fig.1)，每區取 3-10 個樣株，並避免採集自同源母樹，共採得 144 單株，每株選取無病蟲害 5-10 葉片，以矽膠乾燥劑脫水乾燥。

二、方法

(一) DNA 之萃取及定量：

採用 Doyle and Doyle (1987) CTAB 萃取法，分離 genomic DNA，利用分光光度計進行 DNA 濃度測定。

(二) ISSR 的擴大反應：

參考 Ziekiewicz et al. (1994) 的方法加以修改，方法如下：

1. 反應溶液總體積為 25 μ L，其反應試劑濃度為：10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.0 mM MgCl, 0.1% gelatin (w/v), 1% Triton X-100 (w/v), 10 ng template DNA, 100 μ M dNTPs, 0.2 μ M primer, and 0.5 units Taq polymerase (HT Biotechnology, England)
2. 溫度循環機 (thermocycler; Perkin Elmer Geneamp PCR System 9700) 進行 PCR 程式：94 6 min (initial denaturing step), 39 次循環：50 50 sec, 72 2 min, 及 72 7 min (final elongation step), 最後降溫至 4 備用。
3. 電泳：以 1.5% agarose (GIBCO BRL), 將擴增的 DNA 產物進行電泳。
4. 染色及照相：使用 ethidium bromide 染色，並以 Polaroid 667 拍照記錄。

三、統計分析

(一) 記錄多型性條帶與計算相似度 (similarity)：

讀取清晰、亮度大且具多型性之條帶，以代碼 1 (出現) 和 0 (不出現) 記錄條帶出現狀況。利用 NTSYS-pc ver 2.0 套裝軟體 (Rohlf, 1993)，以 Simple Matching 公式計算兩兩樣本間之相似度矩陣 (SSM)，另以 Dice (Dice, 1945) 公式計算兩兩樣本間之相似度 (SAB) 矩陣：

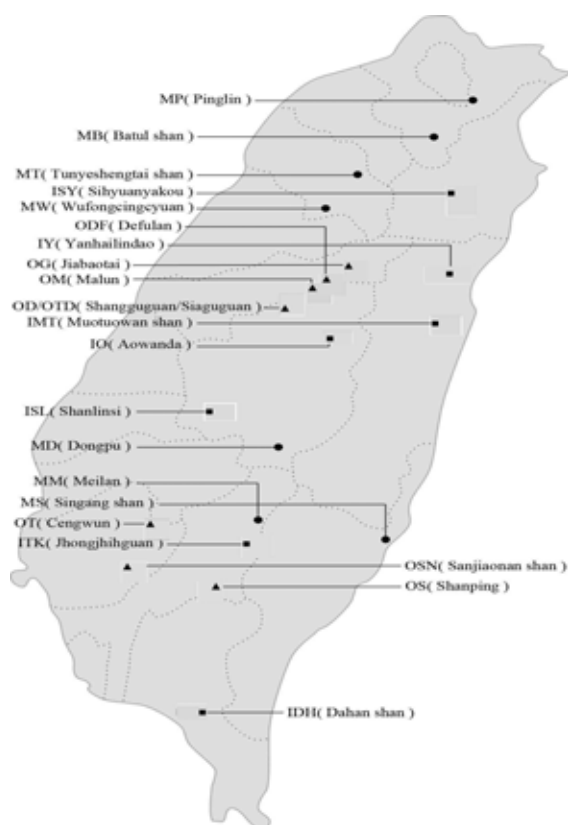
$S_{SM} = m/n$ ；m：兩兩樣本一致出現及一致不出現條帶數，n：多型性條帶總數

$S_{AB} = 2N_{AB} / (2N_{AB} + N_A + N_B)$ N_A ：樣本 A 出現但樣本 B 不出現的條帶數； N_B ：樣本 B 出現但樣本 A 不出現的條帶數； N_{AB} ：樣本 A 與樣本 B 皆出現的條帶數。

表一、試驗編號、採樣地點、海拔高度與樣本數目。

Table 1. Sources Code, Taxon, Collected site, Elevation, Sample size.

Prov.code	Taxon	Collected site	Elevation (m)	Sample size
1.OS	<i>C. osmophloeum</i>	Shanping (高雄扇平)	1400	8
2.OM	<i>C. osmophloeum</i>	Malun (台中馬崙山)	1600	5
3.OG	<i>C. osmophloeum</i>	Jiabaotai (台中佳保台)	800	6
4.OD	<i>C. osmophloeum</i>	Shangguguan (台中上谷關)	500	8
5.OTD	<i>C. osmophloeum</i>	Siaguguan (台中下谷關)	500	2
6.OT	<i>C. osmophloeum</i>	Cengwun (台南曾文)	300	10
7.ODF	<i>C. osmophloeum</i>	Defulan (台中德芙蘭)	400	12
8.OSN	<i>C. osmophloeum</i>	Sanjiaonan shan (台南三腳南山)	800	5
9.MP	<i>C. macrostemon</i>	Pinglin (台北坪林)	500	7
10.MB	<i>C. macrostemon</i>	Batul shan (台北拔刀爾山)	850	9
11.MS	<i>C. macrostemon</i>	Singang shan (台東新港山)	650	6
12.MD	<i>C. macrostemon</i>	Dongpu (台中東埔)	800	10
13.MM	<i>C. macrostemon</i>	Meilan (高雄梅蘭)	1300	8
14.MT	<i>C. macrostemon</i>	Tunyeshengtai shan (新竹屯野生台山)	1900	9
15.MW	<i>C. macrostemon</i>	Wufongcingyuan (新竹五峰清泉)	1000	3
16.IMT	<i>C. insulari-montanum</i>	Motuowan shan (花蓮莫托灣山)	1600	4
17.IDH	<i>C. insulari-montanum</i>	Dahan shan (高雄大漢山)	1400	8
18.IY	<i>C. insulari-montanum</i>	Yanhailindao (花蓮研海林道)	1100	7
19.ITK	<i>C. insulari-montanum</i>	Jhongjihguan (高雄中之關)	1700	3
20.IO	<i>C. insulari-montanum</i>	Aowanda (南投奧萬大)	1200	8
21.ISL	<i>C. insulari-montanum</i>	Shanlinsi (南投杉林溪)	1500	3
22.ISY	<i>C. insulari-montanum</i>	Sihyuanyakou (宜蘭思源啞口)	2000	3



(二) AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 與 POPGENE 分析：

將 S_{SM} 相似度矩陣轉換成 Excoffier *et al.* (1992) 發表的 D 距離矩陣。

$D = n(1 - S_{SM})$; n=多型性條帶總數

求出距離矩陣後,以 AMOVA v1.55 程式(Excoffier *et al.*, 1992) 進行分析, 計算族群間、族群內個體間的變方成分值及所佔總變方成分之百分比, 並以 9999 次隨機重排測驗各變方成分的顯著性。並計算出族群間的遺傳距離 (F_{ST}) 矩陣。

以 POPGENE v.1.31 (Yeh *et al.*, 1997) 套裝軟體計算族群間遺傳資料, 假設各族群達哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium), 則可計算 Nei's 遺傳歧異度指數 (H) (Nei, 1973); 假設各族群之近親交配指數 (F_{IS}) 為 0, 則可計算族群間遺傳分化係數 G_{ST} [coefficient of gene differentiation (Nei, 1973)], 再利用 G_{ST} 估算基因流傳值 N_m

圖一、三種肉桂之採集地理位置圖。

Figure 1. Geographic locations of the studied of three *Cinnamomum* species.

($Nm = 0.5 \times (1 - G_{st}) / G_{st}$) (Slakin and Barton, 1989)。

(三) 歸群分析 (Clustering analysis) 與主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, PCOA) :

將 NTSYS-pc ver 2.0 所計算出之各樣本間 Dice 相似度矩陣及 AMOVA 所算出之地區間距離 (st) 矩陣, 以 NTSYS-pc v.2.0 的 SAHN (Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested clustering method) 程式、UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages) 方法進行各地區的歸群分析建立樹狀圖 (dendrogram), 及進行主座標分析, 以三維所佔變異最大的主要軸繪成立體圖及平面圖, 求出各地區在三維空間上族群的分佈關係。

結 果

一、引子與條帶記錄

經試 125 個隨機序列的引子 (University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada), 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引子, 共選用 12 引子, 得到 52 個多型性條帶 (Table 2)。

表二、ISSR 引子與多型性條帶數條帶記錄。

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

UBC Primer No.	Sequence (5'~3')	Number of polymorphic fragments	Number of monomorphic fragments	Percentage of polymorphic fragments (%)
UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	7	3	70
UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	4	4	50
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	6	1	85.7
UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	5	2	71.4
UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	4	1	80
UBC848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	3	2	60
UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	6	1	85.7
UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	6	4	60
UBC864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	4	3	57.1
UBC866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	4	1	80
UBC889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	2	2	50
UBC891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	3	2	60

表三、分子變方成分分析表 (分子變方成分分析)。

Table 3. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA).

Source of variation	df	SSD	MSD	Variation component	Total var. (%)	p-value
Analysis among species						
Variance among species	2	326.47	168.17	3.27	27.24	< 0.001
Variance within specie	141	1231.70	8.74	8.74	72.67	< 0.001

二、族群之遺傳多樣性

(一) 分子變方分析 (Analysis of Molecular Variance, 簡稱 AMOVA) :

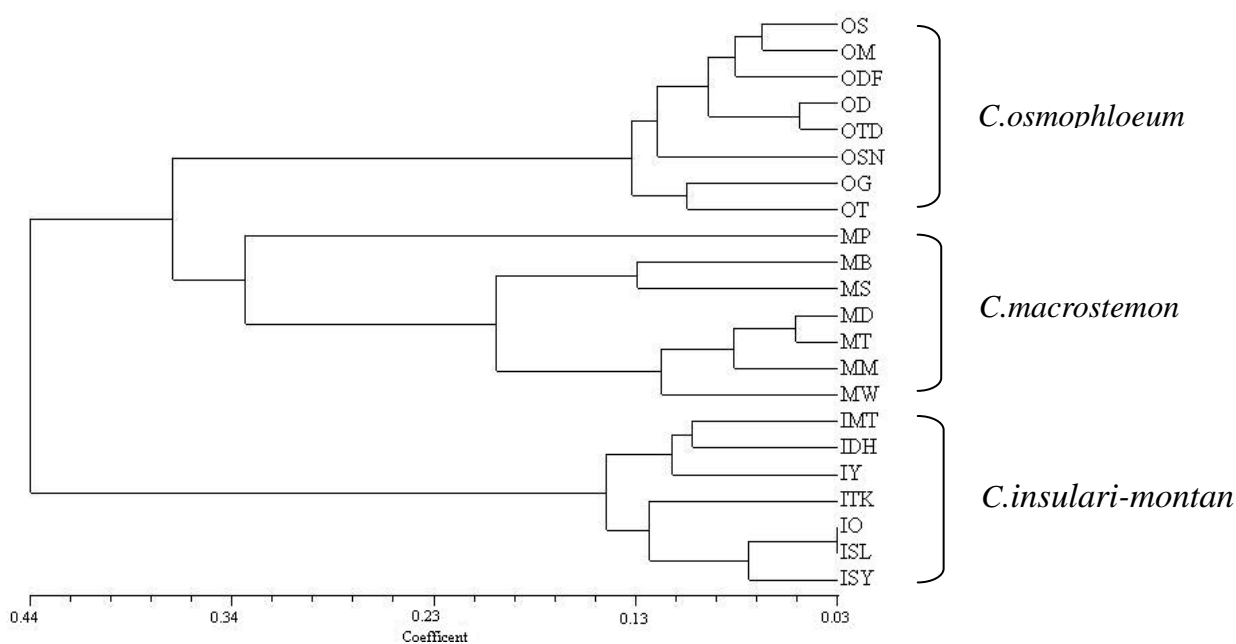
經由分子變方分析 (AMOVA) 9999 次隨機重排後的結果, 顯示三種肉桂植物間之變方成分是 27.24% ($p < 0.01$), 在種內之變方成分是 72.67% ($p < 0.001$), 顯示變異來自各種內 (Table 3)。

(二) 遺傳分化差異 (POPGENE 分析) :

POPGENE 計算族群間遺傳分化, 假設各族群之近親交配指數 (F_{is}) 為 0, 所計算 Nei's 遺傳分化係數結果 (Table 4), 山肉桂其遺傳分化係數值 (G_{st}) 為 0.2837, 胡氏肉桂為 0.4219, 土肉桂為 0.4988。再由分化係數換算得基因流 (Nm), 山肉桂基因流值為 0.5024、胡氏肉桂為 0.6533、土肉桂為 1.2626。

三、族群之遺傳變異與分類地位關係

進行歸群分析 (Clustering analysis) 經計算兩兩族群之遺傳距離 (Table 5), 進行族群歸群分析, 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



圖二、三種肉桂 ISSR 遺傳變異分析之歸群分析 (UPGMA) 樹狀圖。

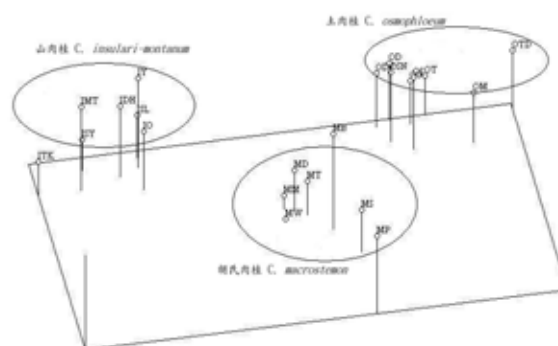
Figure 2. UPGMA dendrogram based on ISSR bands of three *Cinnamomum* species.

coefficient) 為 0.8143, 顯示該歸群圖未扭曲可表現出真實之群團狀態。由樹狀圖所呈現三群歸群關係 (Fig. 2), 顯示出三種肉桂類植物之遺傳分化。主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, PCOA) 分析結果之三維空間分佈座標圖亦支持三群團關係 (Fig. 3)。

討論

一、遺傳多樣性及族群分化

經由 AMOVA 分析結果 (Table 3), 顯示三種肉桂植物間之變方成分是 27.24% ($p < 0.01$), 在種內之變方成分是 72.67% ($p < 0.001$), 主要變異來自各種內, 同時顯示三種肉桂植物間之顯著分化。同時, 以 POPGENE 計算三種肉桂族群間之遺傳分化程度 (Nei, 1973), 土肉桂之 Nei's 基因歧異度介於 0.1074 - 0.2771, 總 Nei 基因歧異度為 0.2213; 胡氏肉桂之 Nei's 基因歧異度介於 0.1226 - 0.3250, 總 Nei 基因歧異度為 0.2250; 山肉桂之 Nei's 基因歧異度介於 0.0292 - 0.1964, 總 Nei 基因歧異度為 0.1639 (Table 3) 依據 Hamrick *et al.* (1992) 研究所做的 Isozyme 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。因此, 三種肉桂植物與同樣



圖三、三種肉桂 ISSR 分析之主座標分析座標圖。

Figure 3. Results of 3-dimensional principal coordinate analysis based on ISSR bands of three *Cinnamomum* species.

為木本植物且具有蟲媒花、種子由風傳播等物種之遺傳歧異度特性相比有偏高現象。Cheng (2003) 應用 ISSR 研究玉山杜鵑 (*Rhododendron psudochrysanthum* Hay.) 之族群遺傳變異結果 Nei's 基因歧異度介於 0.1868 - 0.2924, 表現族群具較度之遺傳歧異度之結構; Chen (2005) 應用 ISSR 研究唐杜鵑 (*Rhododendron simsii* Planch) 之族群遺傳變異, 其 Nei's 基因歧異度為介於 0.0647 - 0.2389 間表現族群具高度之遺傳歧異度, 參考上述相關研究所得之結果, 土肉桂與胡氏肉桂自然分佈族群具較高遺傳歧異度, 山肉桂

表四、POPGENE 分析表。

Table 4. POPGEN analysis of genetic diversities, Shannon's information index, genetic differentiation, and gene flow.

Prov. code	Genetic diversity ($H^{1)}$)	Information index ($I^{2)}$)	Genetic differentiation ($Gst^{3)}$)	Gene flow ($Nm^{4)}$)
1.OS	0.2771	0.4057		
2.OM	0.2189	0.3206		
3.OG	0.2023	0.2999		
4.OD	0.2365	0.3417		
5.OTD	0.1074	0.1568		
6.OT	0.2284	0.3301		
7.ODF	0.2613	0.3798		
8.OSN	0.2386	0.3510		
<i>C. osmophloeum</i>	0.2213	0.5746	0.2837	1.2626
9.MP	0.1226	0.1798		
10.MB	0.2988	0.4401		
11.MS	0.2537	0.3739		
12.MD	0.3250	0.4748		
13.MM	0.2080	0.3027		
14.MT	0.2452	0.3595		
15.MW	0.1348	0.1968		
<i>C. macrostemon</i>	0.2250	0.3313	0.4219	0.6533
16.IMT	0.1202	0.1744		
17.IDH	0.1503	0.2199		
18.IY	0.1861	0.2748		
19.ITK	0.0292	0.0429		
20.IO	0.1964	0.2827		
21.ISL	0.1132	0.1677		
22.ISY	0.0945	0.1362		
<i>C. insulari-montanum</i>	0.1639	0.2393	0.4988	0.5024

¹⁾ H = Nei's (1973) genetic diversity.

²⁾ I = Shannon's information index

³⁾ Gst = genetic differentiation.

⁴⁾ Nm = gene flow.

之基因歧異度較前兩者為低之現象。

再由其遺傳分化係數 Gst 之差異，以土肉桂遺傳分化係數為 0.2837 最低，而胡氏肉桂與山肉桂遺傳分化係數比較高分別為 0.4219 及 0.4988；由遺傳分化係數換算得基因流值，山肉桂與胡氏肉桂基因流值比較低分別為 0.5024 及 0.6533，而土肉桂基因流值則為 1.2626。Li *et al.* (2002) 以 RAPD 研究瀕危植物 *Vatica guangxiensis* X.L.Mo 發現族群間存有高度分化的現象，而其 Gst 為 0.3764；Ge *et al.* (2003) 以 ISSR 研究植物 *Tetraena mongolica* Maxim 其 Gst 為 0.169；本研究胡氏肉桂、山肉桂之族群之遺傳分化係數超過 *V. guangxiensis* 與 *T. mongolica* 遺傳分化，顯然兩者族群遺傳分化值偏高。

根據 Hamrick *et al.* (1989) 自交植物具有最高的 Gst 值 (平均 0.51)，異交的風媒花植物之 Gst 值最低 (平均 0.143)，異交的蟲媒花植物之 Gst 值

介於中間 (平均 0.197)，由此可見胡氏肉桂、山肉桂之族群之遺傳分化係數極高，幾乎趨近於自交植物。而與其他 ISSR 研究相比，Tsai (2001) 研究發現台灣地區水柳族群 (*Salix warburgii* O. Seem) 之 Gst 為 0.182，Cheng (2003) 研究玉山杜鵑 (*Rhododendron pseudochrysanthum* Hay.) 之遺傳分化指數 (Gst) 為 0.2659，Chen (2005) 研究唐杜鵑之遺傳分化指數 (Gst) 為 0.5081，可知胡氏肉桂、山肉桂之族群之遺傳分化係數上明顯偏高，然而土肉桂遺傳分化係數為 0.2837，由遺傳分化係數換算得基因流值，土肉桂基因流值則為 1.2626，表現族群之遺傳基因流傳順暢，即依據 Wright (1931) 分析族群間的基因流值若大值小於 1 則表示基因流可能受到地理阻礙，由於基因流傳是族群遺傳結構分化的主因之一，若基於 1，易使遺傳結構傾向均值化，反之，若 Nm 因流使兩個地方性族群的基因庫 (gene pool) 產

表五、三種肉桂遺傳變異分析之 Nei's 遺傳距離 (Φ_{st}) 矩陣。Table 5. Nei's genetic distance (Φ_{st}) based on ISSR data of three *Cinnamomum* species.

	OS	OM	OG	OD	OTD	OT	ODF	OSN	MP	MB	MS	MD	MM	MT	MW	IMT	IDH	IY	ITK	IO	ISL	ISY	
OS	0																						
OM	0.09	0																					
OG	0.21	0.14	0																				
OD	0.11	0.10	0.16	0																			
OTD	0.17	0.13	0.19	0.08	0																		
OT	0.15	0.14	0.12	0.11	0.14	0																	
ODF	0.10	0.10	0.12	0.09	0.11	0.10	0																
OSN	0.12	0.17	0.23	0.16	0.16	0.18	0.13	0															
MP	0.52	0.54	0.64	0.59	0.65	0.64	0.59	0.57	0														
MB	0.27	0.37	0.37	0.40	0.42	0.43	0.34	0.28	0.22	0													
MS	0.31	0.38	0.44	0.48	0.55	0.46	0.38	0.31	0.31	0.16	0												
MD	0.23	0.29	0.28	0.32	0.43	0.31	0.28	0.29	0.37	0.17	0.14	0											
MM	0.33	0.35	0.33	0.35	0.45	0.33	0.34	0.35	0.41	0.32	0.21	0.09	0										
MT	0.27	0.30	0.32	0.34	0.41	0.33	0.27	0.27	0.34	0.21	0.11	0.07	0.11	0									
MW	0.43	0.39	0.38	0.42	0.48	0.45	0.41	0.44	0.46	0.38	0.29	0.16	0.14	0.12	0								
IMT	0.51	0.63	0.54	0.49	0.67	0.61	0.50	0.48	0.62	0.40	0.54	0.41	0.45	0.42	0.44	0							
IDH	0.46	0.50	0.43	0.43	0.65	0.49	0.43	0.48	0.58	0.38	0.54	0.32	0.35	0.38	0.45	0.12	0						
IY	0.39	0.49	0.49	0.43	0.58	0.49	0.39	0.37	0.63	0.31	0.49	0.31	0.40	0.36	0.47	0.12	0.13	0					
ITK	0.62	0.69	0.59	0.52	0.74	0.60	0.50	0.56	0.64	0.55	0.59	0.36	0.34	0.39	0.43	0.23	0.19	0.21	0				
IO	0.41	0.52	0.46	0.43	0.56	0.45	0.37	0.40	0.56	0.32	0.41	0.23	0.29	0.26	0.36	0.17	0.12	0.11	0.11	0			
ISL	0.38	0.50	0.45	0.45	0.57	0.46	0.33	0.39	0.71	0.39	0.44	0.26	0.30	0.28	0.36	0.20	0.15	0.15	0.17	0.05	0		
ISY	0.51	0.57	0.55	0.48	0.66	0.53	0.44	0.47	0.72	0.48	0.50	0.32	0.28	0.33	0.36	0.15	0.12	0.15	0.14	0.08	0.11	0	

生交流，則會降低族群分化程度 (Slatkin 1987)，Ho *et al.* (2002) 研究木賊葉木麻黃 (*Casuarina equisetifolia* Forst.) 發現了原生族群間基因流傳低，受遺傳漂變影響族群間的分化程度趨於明顯。因此，胡氏肉桂、山肉桂之族群具較高之遺傳分化係數，可能是受到地理隔離影響，而使基因流傳受到阻礙；土肉桂族群間之遺傳分化較低，可能是目前族群廣泛分佈與數量多而較順暢繁衍機制，使其基因流傳未受限制之結果。

二、族群之遺傳變異與分類地位關係

探討三種肉桂類植物族群之遺傳變異與分類地位關係，族群歸群分析之歸群圖所呈現族群親緣關係 (Fig. 2)，其遺傳距離座標值介於 0.03 到 0.44 之間，在距離 0.20 處可將三種肉桂類植物族群進行分類，第一群由土肉桂族群間之族群組成；第二群是胡氏肉桂之族群，惟其中台北坪林 (MP) 之介於與土肉桂群團之間，由於 Nei's 基因歧異度為胡氏肉桂族群中較低者，其變異分化相對明顯，顯示土肉桂與胡氏肉桂族群間之可能有中間型之族群，因此兩群先合併再與第三群合併，而第三群是山肉桂之族群。

整體而言三種肉桂之族群歸成三群團，土肉桂、胡氏肉桂與山肉桂各自形成一群團，表現其遺傳間之親緣關係。主座標分析結果其三維空間座標圖 (Fig. 3)，支持此三種肉桂族群遺傳變異之關聯性。同時，族群間之自然分佈範圍亦多有分隔趨勢，土肉桂族群如台中縣馬崙、台中縣佳

保台、台中縣上谷關之族群則歸成一類，其間除南投縣奧萬大、杉林溪等族群分佈位置相鄰而表現密切關聯，餘族群於廣泛之地理區域。胡氏肉桂在台北縣坪林、拔刀爾山族群等其間地理位置十分相近。山肉桂則以台中縣東埔、高雄縣梅蘭、新竹縣屯野野生台山、新竹縣五峰清泉趨於成一類，亦反映族群分佈之群聚關聯。

植物群落在不同環境選擇壓力下，外表形態往往會顯出差異，由於三種肉桂族群自然分佈於臺灣各生育地間，可能與當地環境發生地理分化或生態變異，經由 AMOVA 分析結果，顯示三種肉桂植物間之遺傳分化明顯；歸群及主座標分析結果印證了三種肉桂群團之分類趨勢，胡氏肉桂之分類處理與 Lu and Yang (1986) 之處理吻合，同時反映一般辨識肉桂植物的特徵，如山肉桂的芽鱗是包被的且呈圓形，土肉桂的芽是裸露的呈尖狀；雖胡氏肉桂與土肉桂外觀形態較相似，但其頂芽芽鱗及葉、樹皮無肉桂味等明顯與山肉桂特徵相似，故處理成另一類較為適宜。本研究以三種肉桂之遺傳變異與其分化趨勢，處理成三個分類群，即土肉桂 (*C. osmophloeum*) 山肉桂 (*C. insulari-montanum*)、胡氏肉桂 (*C. macrostemon*)。

誌謝

本研究承行政院國科會 (93-2313-B-054-013) 計畫補助，林業試驗所育林組簡慶德博士

提供部分樣品，蓮華池研究中心黃主任正良及同仁等，中埔研究中心沈主任勇強等同仁全力協助，謹致最大謝忱。

參考文獻

- 胡大維。1992。土肉桂專論--土肉桂的分佈、營養系收集與營養系庫的建立。林業試驗所林業叢刊第 38 號 1-6。
- 潘富俊。1992。土肉桂專論--土肉桂的分類地位。林業試驗所林業叢刊第 38 號 7-13。
- Chang CE. 1976. Lauraceae in Li et al. Fl. Taiwan, Taipei : Epoch Pub.Co. 2 : 406-68.
- Cheng JW. 2003. Genetic Variation of *Rhododendron pseudochrysanthum* Based on ISSR Markers . [MSc thesis]. Tai Chung, Taiwan : National Chung Hsing University. 78 p. [in Chinese with English summary].
- Chen YJ. 2005. Genetic Variation of *Rhododendron simsii* Based on ISSR Markers [MSc thesis]. Tai Chung, Taiwan: National Chung Hsing University. 90 p. [in Chinese with English summary].
- Dice LR. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem Bull 19:11-5.
- Ge XJ, Yu Y, Zhao NX, Chen HS and WQ QI. 2003. Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena Mongolia* Maxim. (Zygophyllaceae) . Biological Conservation 111: 427-34.
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes : Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131: 479-91.
- Hamrick JL and Godt MJW. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, eds. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 43-63.
- Hamrick JL, Godt MJW and Sherman-Broyles SL. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests 6: 95-124.
- Hayata B. 1913. Icones plantarum formosamarum .166-167, Bureau of Productive Industries, Government of Formosa.
- Ho KY, Ou CH, Yang JC and Hsiao JY. 2002. An assessment of DNA polymorphisms and genetic relationships of *Casuarina equisetifolia* using RAPD markers. Bot Bull Acad Sin 43: 93-8.
- Hollinsworth ML, Hollinsworth PM, Jenkins GI, Bailey JP and Ferris C. 1998. The use of molecular markers to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae) . Molecular Ecology 7: 1681-91.
- Kanehira R. 1936. Formosan trees. rev. ed. Dept. Forestry, Government Research Institute.
- Li A and Ge S. 2001. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. Annals of Botany 87: 585-90.
- Li HL. 1963. Woody Flora of Taiwan. Livingston Publication Co. Pennsylvania.
- Li HW. 1984. FLORA. Science Press. Beijing. Tomus31: 166-228.
- Li Q, Xu Z and He T. 2002. Ex situ genetic conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China. Biological Conservation 106:151-6.
- Liao JC. 1988. The taxonomic revisions of the family Lauraceae in Taiwan. Department of Forestry, College of Agriculture, National Taiwan University.
- Liao JC. 1995. The taxonomic revisions of the family Lauraceae in Taiwan (ED) . Department of Forestry, College of Agriculture, National Taiwan University.
- Liao JC. 1996. Lauraceae. In Flora of Taiwan Editorial Committee[eds.]. Flora of Taiwan. 2st edition. Vol.2: p.437-48.
- Liu TS and Liao JC. 1971. A revision of the family Lauraceae in Taiwan. Annual of Taiwan Museum.14 (1-28) .
- Liu YC, Lu FY and Ou CH. 1988. Trees of Taiwan. College of Agriculture, National Chung-Shing University. Monographic Publication No.7. No.7. p.105-13.
- Liu YC, Lu FY and Ou CH. 1994. Trees of Taiwan (ED) . College of Agriculture, National Chung-Shing University. Monographic

- Publication No.7. p.107-12.
- Lu SY, and Yang YP. 1986. Determination of the *Cinnamomum macrostemon* Hayata. Quarterly journal of Chinese forestry 19 (4) : 113-7.
- Lu SY and Chiu WL. 1994. Rare and endangered plants in Taiwan. The Council of Agriculture.p: 162
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Nat Acad Sci USA 70: 3321-3.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-90.
- Prevost A and Wilkinson MJ. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet. 98: 107-12.
- Qian W, Ge S and Hong DY. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 102: 440-9.
- Rohlf FJ. 1993. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York:Applied Biostatistics. 256p
- Sasaki S. 1928. List plants formosa. Natural History Society of Formosa Taihoku. P 192.
- Shukla J, Tuteja U, Ratnaparkhe MB and Batra HV. 2001. Inter-simple-sequence repeat (ISSR) -PCR for the identification of saprophytic strains of *Leptospira*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 17 (5) : 529-33.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236: 787-92.
- Tansley SA and Brown CR. 2000. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae) : implications for their conservation. Biological conservation 95: 39-48.
- Tsai CS. 2001. Genetic variation of *Salix warburgii* and *S. kusanoi* based on ISSR markers [MSc thesis].Tai Chung, Taiwan : National Chung Hsing University. 89 p. [in Chinese with English summary].
- Wang CL. 1987. The yields and composition analyses of essential oils from planting *Cinnamomum osmophloeum* Taiwan For Res Inst New Series, 2 (2) : 129-44.
- Wolfe AD, Xiang QY and Kephart SR. 1998. Assessing hybridization in natural populations of penstemon (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. Molecular Ecology 7: 1107-25.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics 16: 97-159.
- Yang YP, Liu HY and Lu SY. 1999. Manual of Taiwan vascular plants. The Council of Agriculture Executive Yuan. Vol.2 : 131-4.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH and Mao JX. 1999. POPGENE 3.2, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton.
- Yin HW. 1991. Yield and composition variation of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira clones in Taiwan. Quarterly Journal of Chinese Forestry 24 (1) : 83-104.
- Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification. Genomic 20: 176-88.

Genetic Variation and Taxonomic Relationship of *Cinnamomum osmophloeum*, *C. macrostemon* and *C. insulari-montanum* (Lauraceae) in Taiwan

Kuen-Yih Ho*

Department of Forestry and Natural Resouerces, National Chiayi University
Chiayi, Taiwan

(Received: 4 August 2006, accepted: 6 December 2006)

ABSTRACT

Cinnamomum insulari-montanum Hayata, *C. macrostemon* Hayata and *C. osmophloeum* Kaneh. are endemic species of the Lauraceae in Taiwan. Taxonomy of these closely related species remains unclear. In this study, ISSR fingerprinting using 12 microsatellite primers was employed to investigate the taxonomic status of the tree species and intraspecific diversity and differentiation. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed 27.24% variance residing among species($P < 0.001$), while 72.67% variance distributed within species ($P < 0.001$). Significant structuring exists in *C. Insulari-montanum* and *C. macrostemon*; while gene flow ,as indicated by $N_m = 1.26$, was detected in *C. osmophloeum*. Both clustering and principal coordinates analyses Identified three major clusters that correspond to each species and revealed a close Phonetic relations between *C. Insulari-montanum* and *C. macrostemon*.

Key words: *C. insulari-montanum*, *C. macrostemon*, *C. osmophloeum*, ISSR, genetic variation, taxonomic relationship, analysis of molecular variance (AMOVA)