

# 黃鈺婷, 王亞男, 王裕文-台灣五葉松之 RAPD 遺傳變異與 族群分化<sup>1</sup>

黃鈺婷<sup>2</sup> 王亞男<sup>3</sup> 王裕文<sup>4</sup>

( 收件日期：民國 92 年 9 月 2 日、接受日期：民國 92 年 9 月 30 日 )

**【摘要】** 利用 RAPD 分子標誌估算台灣五葉松族群之遺傳變異及遺傳結構，以 10 個隨機引子分析 86 個樣本，其中包括華山松與台灣二葉松兩個近緣物種。台灣五葉松平均族群遺傳歧異度 ( $H_s$ ) 為 0.222 經 AMOVA 分析得到  $\Phi_{st}$  值為 0.145，說明台灣五葉松族群有適度的分化現象。在族群遺傳結構方面，AMOVA 分析顯示出遺傳歧異度主要存在族群內，而非族群間，族群間遺傳歧異度佔總遺傳歧異度的比例為 14.47%。

**【關鍵詞】** 台灣五葉松、RAPD、遺傳歧異度。

## RAPD GENETIC DIVERSITY AND POPULATION DIFFERENTIATION OF *PINUS MORRISONICOLA* HAYATA IN TAIWAN<sup>1</sup>

Yu-Ting Huang<sup>2</sup> Ya-Nan Wang<sup>3</sup> Yue-Wen Wang<sup>4</sup>

( Received September 2, 2003; Accepted September 30, 2003 )

**【Abstract】** *Pinus morrisonicola* Hayata is an endemic coniferous species in Taiwan. Plant materials from natural stands were used to estimate the genetic variability and population differentiation using RAPD polymorphism. Genetic diversity of 80 *P. morrisonicola* plants was estimated based on 10 random RAPD primers and the value of expected heterozygosity was 0.222. The  $\Phi_{st}$  value derived by the AMOVA WIN program was 0.145. This value indicated moderate differentiation among populations of *P. morrisonicola*. Most of the genetic variation found was apportioned to the individuals within populations. The genetic variation among populations was 14.47% out of the total genetic variation.

---

<sup>1</sup> 本文為作者碩士論文之一部分。

This paper was a part of the Master Thesis of the first author.

<sup>2</sup> 國立台灣大學森林學系碩士。

Master, Dept. of Forestry, National Taiwan University.

<sup>3</sup> 國立台灣大學森林學系教授，通訊作者。

Professor, Dept. of Forestry, National Taiwan University, Corresponding author.

<sup>4</sup> 國立台灣大學農藝學系助理教授。

Assistant Professor, Dept. of Agronomy, National Taiwan University.

**【Key words】** *Pinus morrisonicola*, RAPD, genetic diversity.

## I、前言

台灣五葉松 (*Pinus morrisonicola* Hayata) 為台灣特有的針葉樹種，在分類上歸屬松科 (Pinaceae) 松屬 (*Pinus*) 之軟木松類 (*Strobus*)，針葉五根一束，種子有翅。天然分佈於北、中、南海拔 300-2300 公尺之山區，多生長於峰崖峭壁之上，蒼勁挺拔，長年蔥鬱 (劉等，1994)。

自古以來，中國人視松樹為長壽、吉祥、堅毅不饒的象徵，在庭園景觀及盆栽觀賞上利用頗多，除此之外，松樹也是藥用植物，根據神農本草經記載：「松葉藥效，促進毛髮生長，定五臟、止饑、延壽，以水及麵飲服之或搗屑丸服，可治惡疾」。台灣民間療法常使用台灣五葉松針葉加檸檬及蜂蜜製成果汁飲用，國外許多研究已經證明松樹具有抗氧化、清除自由基、抑制腫瘤細胞轉移、調節免疫系統的功能，近幾年國內也以台灣五葉松進行相關研究 (盧，2001；徐，2001；黃，2001)，結果顯示其確實具有多種藥性，開發價值高。台灣原生松樹僅有四種，包括台灣五葉松、華山松、馬尾松及台灣二葉松，現存五葉松類的族群數量較少。松樹喜生長於向陽坡地，耐乾瘠土壤，在鬱閉的森林中難有天然更新，台灣五葉松不具萌蘖能力，需完全靠種子進行繁衍及更新，但其毬果無延遲開裂 (serotiny) 的現象，種子成熟後隨即飄散，因此種子易遭星鴉、松鴉啄食或台灣獼猴剝食，多數種子在飄散之前即被吃食 (梁，1998)，這令其繁衍倍受阻礙。

長久以來，由於人類對木材的需求，或為了獲得土地以供農業、工業及都市建設之需，對森林進行大面積伐採，過度開發利用的結果使得許多樹種之生存繁衍受到嚴重的威脅，根據近幾年的調查顯示，全球 600 個針葉樹種中超過半數都面臨絕滅的危機 (Newton *et al.* 1999)，這令人觸目驚心的統計值也讓許多森林樹種逐漸成為保育上關心的焦點，進而推動

了遺傳變異研究的快速發展。物種的遺傳歧異度會直接影響其適應環境變遷的能力及永續生存的可能性 (Moritz & Faith, 1998)。本研究主要利用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分子標誌來估算台灣五葉松天然族群之遺傳變異及遺傳結構，為台灣五葉松進行初步的遺傳歧異度偵測，期能對台灣本土松樹有所瞭解，建立起基本的遺傳資料以供將來天然林經營、保育策略擬定或人工種植栽培之參考依據。

## II、材料與方法

### (I) 植物材料

參試材料包括台灣五葉松、華山松及台灣二葉松共三種，台灣五葉松採集自天然林共 7 個地區 (如圖 1)，華山松及台灣二葉松作為試驗對照用，詳細採集地點列於表 1。參試樣本包括 80 個台灣五葉松樣本、3 個華山松樣本及 3 個台灣二葉松樣本，總計 86 個樣本。

### (II) DNA 萃取與 RAPD 反應

台灣五葉松、華山松及台灣二葉松之基因組 DNA 的萃取方法是修改自 Doyle & Doyle

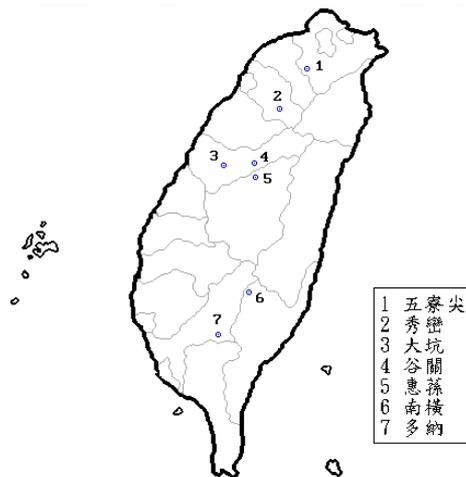


圖 1 台灣五葉松天然族群之採集點

Fig. 1 The sampling locations of *Pinus morrissonicola* populations

表 1 台灣五葉松、華山松、台灣二葉松之採集地點、樣本數行政區域、海拔及經緯度資料

Table 1 The sampling number, collecting area, altitude, latitude of three *Pinus* sp.

採集地點	樣本數	行政區域	海拔(m)	經緯度
台灣五葉松				
多納林道	10	高雄縣茂林鄉	600	22°54' N, 120°43' E
南橫(向陽-利稻)	15	台東縣海端鄉	1700	23°14' N, 120°59' E
谷關	12	台中縣和平鄉	800	24°12' N, 121°00' E
惠蓀林場	15	南投縣仁愛鄉	880	24°05' N, 121°01' E
大坑頭崙山	8	台中縣新社鄉	800	24°10' N, 120°47' E
五寮尖	5	台北縣三峽鄉	300	24°51' N, 121°21' E
秀巒	15	新竹縣尖石鄉	900	24°37' N, 121°17' E
華山松				
關原	3	花蓮縣秀林鄉	2400	24°11' N, 121°20' E
台灣二葉松				
利稻	3	台東縣海端鄉	1200	23°11' N, 121°01' E
總計	86			

(1990) 之 CTAB 萃取法。基因組核酸片段擴增的方法是根據 Williams 等人 (1990) 的方法加以修改而得, PCR (Polymerase Chain Reaction) 反應液的内容物包括 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 0.2mM, 0.4μM 引子, 20ng 基因組 DNA 及 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Biotools, B & M Labs, S.A.), 總體積為 10μl 以 Perkin Elmer Amp 9700 型熱循環反應機進行 PCR 反應, 反應條件設定為 94°C 2 分鐘; 94°C 1 分鐘, \*46°C 30 秒, 72°C 1 分 30 秒, 10 個循環 (\*每循環一次下降 1°C), 再接著 94°C 20 秒, 36°C 20 秒, 72°C 1 分 30 秒, 34 個循環; 最後為 72°C 4 分鐘, 反應結束之

後保存在 4°C。反應完成之 PCR 產物加入 2μl stop dye, 在 2% 瓊脂凝膠 (溶於 0.5XTBE 緩衝液) 於 0.5XTBE 緩衝液中經電泳解析, 先以 60V 電壓 10 分鐘, 再用 110V 電壓進行電泳分離。於膠片兩側會注入 5μl DNA marker (100 bp Ladder) 作分子量對照。電泳結束後膠片以 0.5μl/ml EtBr 染色約 20 分鐘, 再以蒸餾水退染 15 分鐘後置於 UV 燈上觀察並以數位相機拍照存檔。

### (III) 資料分析

判讀 RAPD 電泳結果所獲得之資料, 依條

帶之有無以 1/0 紀錄，利用 TFPGA version 1.3 軟體依 Nei's unbiased heterozygosity (1978)，假定在 Hardy-Weinberg equilibrium 之情況下求得歧異度值。每個分子標誌 (marker) 在各族群的歧異度計算公式如下：

$$h_i = \frac{n(1 - \sum_i p_i^2)}{n-1}$$

$p_i$ ：第  $i$  個標誌 (基因座) 在各族群內的頻率  
 $n$ ：參與分析的樣本數

由所有標誌之平均歧異度 ( $h_i$ ) 可估算出各族群的歧異度 ( $H$ )，各族群的歧異度平均得族群平均歧異度 ( $H_s$ )。以總樣本數作運算可得到總歧異度 ( $H_t$ )。

利用 TFPGA 軟體，依據 Nei's unbiased distance (1978) 以 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) 進行群叢分析並繪製樹狀圖。

刪除近緣物種條帶資料，僅以台灣五葉松資料進行 AMOVA 分析 (Analysis of Molecular Variance)。先利用 AMOVA-PRE version 1.01 軟體運算產生歐幾里德距離矩陣 (Euclidean distance matrix)，再利用 AMOVWIN version 1.55 軟體進行遺傳變異成分分析，可求得自由度 (d.f.)、平方和 (SSD)、均方 (MSD)、變異成分估值、各成分佔總變異之比例 (% Total) 與隨機單獨運算獲得極端值的機率 ( $P$ -value) 與  $\Phi_{st}$  值。

### III、結果

#### (I) 引子篩選與條帶生成

本實驗共篩選 80 個隨機引子，其中 32 個具有多型性，比例為 40%，選取具 10 個條帶生成較清晰明顯且具多型性的隨機引子進行實驗。這 10 個引子在總樣本中共產生 102 個有效條帶，擴增的片段大小介於 250 bp ~ 2000 bp，每個引子平均獲得 10.2 個條帶。扣除近緣種的

條帶資料後，台灣五葉松 163 個樣本共得到 75 個有效條帶，其中 63 個條帶具多型性 (表 2)，比例為 84%。

#### (II) 台灣五葉松與近緣物種之遺傳距離分析

利用 UPGMA 將台灣五葉松、華山松與台灣二葉松族群樣本依 Nei's unbiased distance 進行群叢分析並繪製樹狀圖 (如圖 2)。樹狀圖顯示台灣五葉松與華山松的親緣關係很近，與台灣二葉松的親緣關係較遠。遺傳距離為 0.2378 時，台灣五葉松與華山松可歸為一群，台灣二葉松則在群外；遺傳距離為 0.5127 時，台灣五葉松、華山松與台灣二葉松可歸成一群。

#### (III) 台灣五葉松之遺傳距離分析

刪除兩個近緣物種的條帶資料，僅以多納、南橫、惠蓀林場、大坑頭崙山、谷關、秀巒、五寮尖七個台灣五葉松樣本依 Nei's unbiased distance 進行 UPGMA 群叢分析，由樹狀圖 (如圖 3) 可清楚的將所有族群劃分為三大類群，第一類群包括惠蓀林場、谷關、大坑頭崙山、秀巒共四個族群，遺傳距離為 0.0385

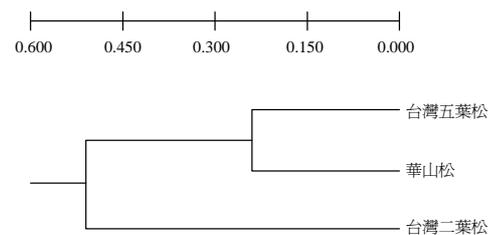


圖 2 台灣五葉松、華山松與台灣二葉松 UPGMA 群叢分析之樹狀圖，註：橫軸表示遺傳距離

Fig. 2 The dendrogram of three *Pinus* genus species with UPGMA. X-axis indicates genetic distances

表 2 RAPD 分析所用之逢機引子與擴增條帶數、多型性條帶數與多型性比例

Table 2 The number of total bands, polymorphic bands and the percentage of polymorphism of different primers by RAPD analysis

primer	sequence	No. of total bands	No. of polymorphic bands	% of polymorphism
OPA-04	AATCGGGCTG	8	5	62.5
OPA-09	GGGTAACGCC	9	8	88.9
OPB-03	CATCCCCCTG	6	5	83.3
OPB-14	TCCGCTCTGG	8	7	87.5
OPB-19	ACCCCCGAAG	11	11	100
OPP-10	TCCCGCCTAC	7	7	100
OPQ-08	CTCCAGCGGA	4	1	25
OPQ-09	GGCTAACCGA	9	8	88.9
OPQ-14	GGACGCTTCA	8	8	100
OPQ-18	AGGCTGGGTG	5	3	60

時可被歸群；第二類群包括多納、南橫兩個族群，遺傳距離為 0.0380 時可被歸群；第三類群僅有五寮尖一個族群。整體而言，惠蓀林場、谷關兩族群間的相似度最高，遺傳距離在 0.0212 時即可被歸群，台灣五葉松七個族群間的遺傳距離皆小於 0.1184，之間的相似度非常高，相似係數 (1-GD) 大於 0.8816。

將台灣五葉松七個天然族群的 Nei's unbiased distance 運算結果列成表 (表 3)，表內顯示出兩兩族群間的地理距離與遺傳距離，其中谷關與惠蓀林場兩族群之間的遺傳距離最近，為 0.0212，而多納與五寮尖兩族群之間的遺傳距離最遠，為 0.1785。再以兩兩族群間的

遺傳距離當作 Y 軸，以兩兩族群間的地理距離當作 X 軸，繪製成 XY 分佈圖 (圖 4)，迴歸線公式為  $Y = 0.00062X + 0.01767$ ，由圖可見兩兩族群間的遺傳距離與地理距離約略呈線性關係，當兩族群間的地理距離愈遠，則遺傳距離愈遠。

(IV) 台灣五葉松之遺傳歧異度分析

依據 Nei's unbiased heterozygosity 估算每個引子在各個族群所偵測到的歧異度 ( $H_j$ )，將全部的引子歧異度 ( $H_j$ ) 加總、平均後可得到族群的歧異度 ( $H$ )，五寮尖的歧異度為 0.1829 最低，而惠蓀的歧異度為 0.2618 最高，

表 3 台灣五葉松七個天然族群的 Nei's unbiased distance

Table 3 The Nei's unbiased distance of seven *Pinus morrisonicola* populations

Population	1	2	3	4	5	6	7
1 多納	*****	42.35	124.85	128.15	134.20	214.50	182.60
2 南橫	0.0380	*****	86.90	95.15	97.35	174.90	143.00
3 惠蓀	0.0682	0.0342	*****	25.30	11.55	90.20	58.30
4 大坑	0.1095	0.0974	0.0334	*****	20.35	94.05	64.90
5 谷關	0.0946	0.0653	0.0212	0.0264	*****	81.40	50.05
6 五寮尖	0.1785	0.1607	0.0799	0.0987	0.1023	*****	33.55
7 秀巒	0.0991	0.0618	0.0342	0.0516	0.0296	0.0903	*****

註 表內顯示出兩兩族群間的遺傳距離，星號以上顯示兩兩族群間地理上的直線距離 (km)。

Below table shows pairs of genetic distances and geographic distances within *Pinus morrisonicola* populations

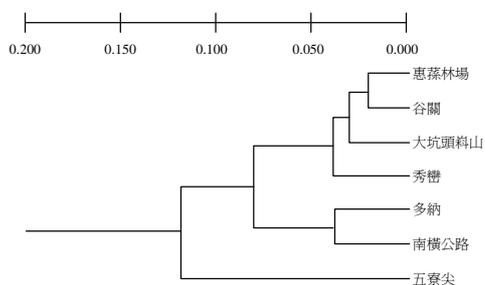


圖 3 七個台灣五葉松族群 UPGMA 群叢分析之樹狀圖，註：橫軸表示遺傳距離  
Fig. 3 The dendrogram of seven *Pinus morrissonicola* populations with UPGMA. X-axis indicates genetic distances

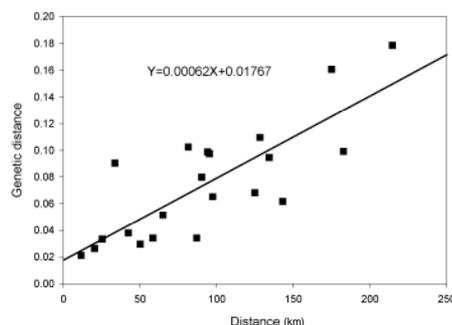


圖 4 台灣五葉松兩兩族群間之遺傳距離與地理距離 (km) 之關係圖  
Fig. 4 The curve of genetic distances vs. geographic distances (km) between *Pinus morrissonicola* populations

族群平均歧異度 ( $H_s$ ) 為 0.2220。台灣五葉松七個天然族群共 80 個樣本的總歧異度 ( $H_t$ ) 為 0.2710。

分別將七個台灣五葉松族群的歧異度值當作 Y 軸，以各族群的緯度資料當作 X 軸 (表 4)，繪製分佈曲線圖 (圖 5)，由圖可見歧異度值 ( $H_e$ ) 最大的兩個族群其緯度範圍介於北緯 23.23° 至北緯 24.08° 間，分別是南橫與惠蓀林場；歧異度的次高峰介於北緯 24.20° 至北緯 24.62° 間，分別是谷關與秀巒。整體而言，惠蓀林場的歧異度最大，為 0.2618。

#### (V) AMOVA 分析

遺傳變異成分分析結果如表 5 所示，族群間的遺傳變異佔總變異的 14.47%，族群內的遺傳變異佔總變異的 85.53%，兩者皆達 0.1% 顯著水準，顯示遺傳變異主要存在族群內，而非族群間。 $\Phi_{st}$  值為 0.145， $\Phi_{st}$  值類似於  $F_{st}$  值，值愈小表示族群間的遺傳相似度愈高，研究中七個台灣五葉松族群 (包括惠蓀林場、秀巒、谷關、大坑頭崙山、多納、南橫、五寮尖) 之間的遺傳相似度高，有適度分化現象。

利用 75 個 RAPD 標誌對七個台灣五葉松族群共 80 個單株進行 AMOVA 分析。自由度、平方和、均方、變異成分估值、各成分佔總變異之比例與隨機單獨運算獲得極端值的機率均顯示於表 5。

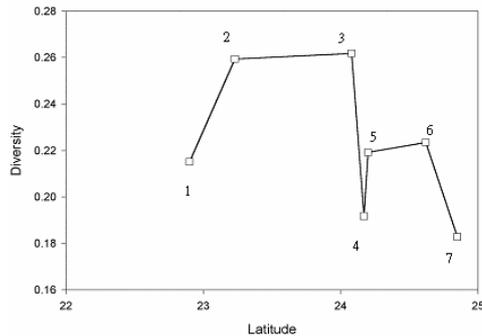


圖 5 七個台灣五葉松族群之歧異度值與緯度之曲線圖。註：由左至右分別為 1.多納、2.南橫、3.惠蓀林場、4.大坑頭崙山、5.谷關、6.秀巒、7.五寮尖

Fig. 5 The curve of diversity values and latitude according to seven populations of *Pinus morrisonicola*. The numbers indicates seven different sites

表 4 台灣五葉松七個天然族群之歧異度值

Table 4 The diversity values of seven *Pinus morrisonicola* populations

族 群	樣本數	歧異度 ( He )	緯 度	行政區域
多納林道	10	0.2152.	N 22.90°	高雄縣
南橫 ( 向陽至利稻 )	15	0.2594	N 23.23°	台東縣
惠蓀林場	15	0.2618	N 24.08°	南投縣
大坑頭崙山	8	0.1918	N 24.17°	台中縣
谷關	12	0.2192	N 24.20°	台中縣
秀巒	15	0.2235	N 24.62°	新竹縣
五寮尖	5	0.1829	N 24.85°	台北縣
總樣本	80	0.2710	*****	*****
平均	*****	0.2220	*****	*****

表 5 台灣五葉松七個天然族群 AMOVA 分析結果

Table 5 AMOVA for seven *Pinus morrisonicola* populations

Source of variance	d.f.	SSD	MSD	Variance component	% Total	P-value
Among populations	6	165.321	27.553	1.607	14.47	<0.001
Within populations	73	693.417	9.499	9.499	85.53	<0.001

#### IV、討論

利用 RAPD 標誌分析台灣五葉松七個族群之基因組，所得之遺傳距離樹狀圖 ( 如圖 3 ) 顯示出族群的群叢現象與地理位置有關聯性存在。其中惠蓀林場、谷關、大坑頭崙山與秀巒

之間的遺傳距離很近，屬同一類群，這四個族群分別位在南投縣、台中縣與新竹縣，皆為鄰近之行政區域，同樣屬於雪山山脈系，這可能暗示著這幾個族群來自相同的始祖，當冰河撤退，氣溫上升之後，原始的台灣五葉松族群逐漸移往高海拔山區，並在各個山頭蔓延開來。另外的原因可能是由於這些族群地理位置接

近，授粉季節時因為季風的影響，藉由盛行風攜帶花粉，造成這些族群基因流傳量大，因此族群間的分化程度不明顯。南部的兩個族群也同樣有群聚現象，屬同一類群，南橫族群與多納族群皆位於中央山脈南段，兩族群的遺傳距離很近。位在台北縣的五寮尖則獨自歸為第三類群，與中部、南部之族群明顯有所區隔。另一方面，由圖 4 可發現兩兩族群間的遺傳距離與地理距離約略呈線性關係，當兩族群間的地理距離愈遠，遺傳距離則有愈遠的趨勢，因此推測當地理距離增加時可能導致基因流傳量下降。

利用族群的歧異度值 ( $H_e$ ) 與緯度資料來觀察兩者之間的相關性發現 (如圖 5)，族群最大歧異度之緯度範圍介於北緯  $23.2^\circ \sim 24.1^\circ$  間，歧異度的次高峰在北緯  $24.2^\circ \sim 24.6^\circ$  間，族群歧異度最大的惠蓀位在南投縣，證實族群分佈的緯度與歧異度之間有關連性存在，與前人文獻之論述相符合 (Lin, 2001)。

在族群遺傳結構方面，AMOVA 分析顯示出台灣五葉松的遺傳歧異度主要是存在族群內，而非族群間。 $\Phi_{st}$  值可用來估算分析樣本中的變異成分，類似於  $F_{st}$  值，表示的是族群間分化的程度， $F_{st}$  值愈小，則族群間的分化程度低，反之， $F_{st}$  值大則表示族群間差異度大，分化明顯。台灣五葉松天然族群的  $\Phi_{st}$  值為 0.145，根據 Wright (1978) 對  $F_{st}$  值闡述可說明台灣五葉松族群有適度的分化現象。在探討植物族群的遺傳結構時，繁殖體系亦是需要納入考慮的重要因子，Hamrick & Godt (1989) 研究顯示，異交型植物的族群間遺傳變異普遍介於 10% 至 20% 之間，如果是自交型物種，族群間遺傳變異平均高達 50%。本研究由 AMOVA 分析估算出族群間的變異為 14.47%，所以可推測出台灣五葉松的交配體系應該是以異交為主，與 Loveless & Hamrick (1984) 指出針葉樹大多是異交交配型的理論相符合。

根據 Liston 等人 (1999) 利用核醣體 DNA 的 ITS 序列來探討松屬物種之種系發生學 (Phylogenetics) 與 Wang 等人 (1999) 利用葉綠體 DNA 的 *rbcL*、*matK* 序列來研究歐亞大陸松樹之親緣關係，都顯示軟木松類 (*strobus*) 與硬木松類 (*pinus*) 可明顯劃分為兩大群。台灣原生的軟木松類包括華山松與台灣五葉松，硬木松類包括馬尾松與台灣二葉松。本研究以華山松及台灣二葉松作為近緣物種對照，發現華山松與台灣五葉松的遺傳距離很近，而台灣二葉松與華山松、台灣五葉松的遺傳距離則較遠 (如圖 2)。根據化石證據推測在白堊紀時松屬已經分化為兩個亞屬 (Millar, 1993; Miller, 1977)，因此台灣二葉松與軟木松類的親緣關係較遠亦符合松屬植物的演化歷程。

## V、結論

利用 RAPD 標誌分析台灣五葉松北、中、南地區共七個族群之基因組，所得之遺傳距離樹狀圖顯示族群的群叢現象與地理位置有關聯性，主要可劃分為三大類群，第一類群包括惠蓀林場、谷關、大坑頭崙山、秀巒共四個族群為中部類群，遺傳距離為 0.0385；第二類群包括多納、南橫兩個南部類群遺傳距離為 0.0380；第三類群僅有五寮尖一個族群，屬於北部類群。此外，兩兩族群間的遺傳距離與地理距離約略呈線性關係，當兩族群間的地理距離愈遠，遺傳距離則愈遠。

在族群遺傳結構方面，AMOVA 分析顯示台灣五葉松的遺傳歧異度主要在族群內，而非族群間。台灣五葉松天然族群的  $\Phi_{st}$  值為 0.145，說明台灣五葉松族群有適度的分化現象。AMOVA 分析估算出族群間的變異為 14.47%，推論台灣五葉松的交配體系應該以異交為主。

本研究以華山松及台灣二葉松作為近緣物種對照，顯示華山松與台灣五葉松的遺傳距離

很近，而台灣二葉松與華山松、台灣五葉松的遺傳距離較遠，符合松屬植物的演化歷程。

## VI、致謝

本研究感謝林試所洪聖峰先生協助採集材料，試驗期間潘富俊主任之協助與指導使得本試驗能順利完成。

## VII、參考文獻

徐德瑞 ( 2001 ) 台灣五葉松抗氧化及對血癌細胞 U937 存活之研究。屏東科技大學食品科學系碩士論文。

梁立明 ( 1998 ) 關刀溪森林生態系台灣二葉松與台灣五葉松之物候現象及其在干擾地之天然更新。國立中興大學植物學系碩士論文。

黃雯雯 ( 2001 ) 松針及蜂膠抽提物抑制人類血癌細胞株生長之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文。

劉業經、呂福原、歐辰雄 ( 1994 ) 台灣樹木誌。國立中興大學農學院叢書。

盧信芳 ( 2001 ) 台灣五葉松松針免疫活性之探討。屏東科技大學食品科學系碩士論文。

Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Hamrick J. L. and M. J. W. Godt (1989) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*, pp. 43-63 Sinauer Associates, Sunderland.

Lin T. P. (2001) Allozyme variations in *Michelia formosana* (Kanehira) Masamune (Magnoliaceae), and the inference of a glacial refugium in Taiwan. *Thero. Appl. Genet.* 102: 450-457.

Liston A, W. A. Robinson, D. Pinero and E. R.

Alvarez-Buylla (1999) Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 95-109.

Loveless M. D. and J. L. Hamrick (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 15: 65-95.

Moritz C and P. F. Daniel (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol. Ecol.* 7: 419-429.

Miller C. N. (1977) Mesozoic conifers. *Bot. Rev.* 43: 217-280.

Millar C. I. (1993) Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus* L. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 80: 471-498.

Newton A. C., T. R. Allnutt, A. C. M. Gillies, A. J. Lowe and R. A. Ennos (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *TREE* 14(4): 140-145.

Wang X-R, Y. Tsumura, H. Yoshimaru, K. Nagasaka and A. E. Szmidt (1999) Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequence. *American Journal of Botany*, 86(12): 1742-1753.

Wright S. (1978) Variability within and among natural populations In: *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago, IL.

Williams J. G. K., R. K. Anne, J. L. Kenneth, R. J. Antoni and V. T. Scott (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22): 6531-6535.

