

國立臺灣大學生物資源暨農學院森林環境暨資源學系

碩士論文

School of Forestry and Resource Conservation

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis



以質體基因組重建太平洋構樹的傳播

Reconstructing Pacific paper mulberry transport using  
plastome sequences

莊嘉瑤

Chia-Rong Chuang

指導教授：鍾國芳 博士

Advisor: Kuo-Fang Chung, Ph.D.

中華民國 110 年 1 月

January 2021

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員審定書



以質體基因組重建太平洋構樹的傳播

Reconstructing Pacific paper mulberry transport using plastome  
sequences

本論文係莊嘉瑢君(R07625013)在國立臺灣大學森林環境暨資源學系完成之碩士學位論文，於民國 110 年 1 月 22 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

口試委員：

鍾國芳

(指導教授)

張至善


劉世慧

李承毅

系主任、所長：

曲書華

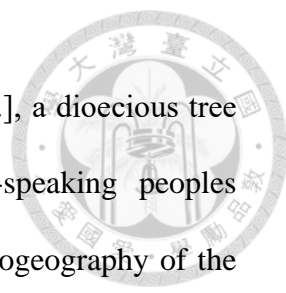
## 摘要



構樹 [ *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent., paper mulberry ] 為雌雄異株之喬木，纖維強韌可作為造紙用途，在南島語族的文化當中，是製作樹皮布的重要材料，因此隨著南島語族的遷徙而傳播出原生地範圍。近年來，隨著更多的考古學、語言學、古 DNA 基因體學等證據逐漸發表，南島語族最早的原鄉可追溯至臺灣。然而各家學者爭論不休的是南島語族為何冒險遷徙，是因為農業發展，造成人口上升後被迫向外遷徙的農業/語言擴張假說；還是為了貿易而展開長距離的遷徙？鑒於構樹在太平洋地區完全由人為傳播，且為無性繁殖，加之其為原生於大陸東南與臺灣，因此可從構樹的親緣地理學，推論南島語族的遷徙，並檢測南島語族遷徙的動力是否符合農業/語言擴張假說。本研究利用次世代定序的基因略讀策略與標靶基因獲取 (Bait capture)，取得構樹完整的質體基因組序列，並藉由重建最大似然性的親緣關係及基因單倍型網絡圖，推敲太平洋構樹的傳播路徑。據分析，構樹自臺灣被攜出後，經過蘇拉威西向東傳至巴布亞新幾內亞，再經由東加、斐濟與薩摩亞，最後到達夏威夷與復活節島。藉由分析質體基因組，發現太平洋群島的構樹可分為三群：近大洋洲、遠大洋洲的東、西半部。親緣關係分析結果中，夏威夷的構樹具有三群結構，推測為三次不同引入歷史造成，分別為夏威夷最原始的構樹，與馬克薩斯群島親緣關係接近；與東加、斐濟、薩摩亞相近的近代引入構樹；以及可能由夏威夷當時外來勞動力所引入的構樹，其基因單倍型為 cp41。而夏威夷 cp41 與中國 cp28 與 cp32 關係接近，依據親緣關係分析，推測為自中國大陸東南沿海一帶引入。依據構樹質體基因組的親緣關係分析，再次印證了出臺灣說，亦支持迫使南島語族向外遷徙的動力為農業擴張假說。

**關鍵字：**南島語族遷徙、出臺灣說、農業擴張假說、共生物種、次世代定序、質體基因組、構樹

## Abstract



Paper mulberry [*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent.], a dioecious tree native to East Asia, is a cultural necessity of Austronesian-speaking peoples (Austronesians) for making barkcloth (tapa). By studying the phylogeography of the Pacific paper mulberries, the migration path of the Austronesians can be deduced. Recent linguistic, archaeological, and paleogenomic studies support Taiwan as the Austronesian ancestral homeland, though the ultimate causes of Austronesian migration remain debated. The Farming/Language Dispersal Hypothesis posits that population growth triggered by the adoption of agricultural lifestyle had led to increased competition for land and thus forcing outward migration. Alternatively, some argued that maritime trade had motivated Austronesians' epic migration. Paper mulberry, clonally propagated for making barkcloth, provide an ideal commensal species for testing hypotheses of Austronesian expansion and migrations. This study employed the strategies of genome skimming and bait-capture of the Next-generation sequencing technique to assemble complete plastome sequences of paper mulberry and reconstruct routes of paper mulberry's transportation in the Pacific based on maximum likelihood tree, dated phylogeny, and haplotype networks. Our analyses revealed that the Pacific paper mulberry was originated in Taiwan and transported into Pacific islands via Sulawesi, New Guinea, Fiji, Tonga, and Samoa, with Hawaii and Rapa Nui as the final destination. Our data also show three independent origins of the Hawaiian paper mulberry, including the ancient introduction by Polynesian voyagers from Marquesas, recent reintroduction from Tonga, Fiji, and Samoa for the revival of barkcloth culture, and likely a recent introduction from southeastern China likely associated with recent immigrants. Our data is highly congruent with the routes of Austronesian migration proposed by the "Out of Taiwan" hypothesis and supports that paper mulberry has been

propagated since the ancient time in the Pacific, further attesting the Farming/Language  
Dispersal Hypothesis.



**Key word:** Austronesians migration, Farming/Language Dispersal Hypothesis, NGS,  
Plastome, paper mulberry



## 目錄

口試委員審定書.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract .....	iii
目錄.....	v
圖目錄.....	vii
壹、前言.....	1
一、構樹與樹皮布文化.....	1
二、南島語族與其遷徙假說.....	2
三、利用構樹推測南島語族文化的起源與傳播路徑.....	5
四、標本材料的利用.....	10
五、次世代定序與標靶基因獲取.....	12
六、研究目標.....	13
貳、材料與方法.....	14
一、樣本的選取及收集.....	14
二、DNA 萃取.....	15
三、圖書庫製備.....	18
四、標靶基因獲取與定序.....	19
五、定序資料處理.....	20
六、親緣關係分析.....	24
七、分子定年.....	25
參、結果.....	26
一、在 Chang <i>et al.</i> , 2015 中基因單倍型群體的關係.....	27
二、太平洋群島個體與臺灣個體親緣關係最接近，且個體變異小.....	27
三、夏威夷 cp41、日本 cp28 與中國 cp32 的親緣關係.....	28
四、基因單倍型 cp17 可分為四大群.....	28

五、分子定年結果.....	28
肆、討論.....	36
一、由構樹親緣地理關係印證南島語族遷徙為農業擴張.....	36
二、構樹在印尼的親緣關係.....	37
三、巴布亞新幾內亞與索羅門群島構樹的親緣關係.....	39
四、遠太平洋群島構樹的親緣關係與夏威夷構樹的多次引入歷史.....	39
五、分子定年結果與南島語族推測遷徙時間.....	40
伍、結論.....	42
陸、參考文獻.....	43
附錄、構樹採集資訊一覽表.....	52



## 圖目錄

圖一、大洋洲三大地理區劃分示意圖 .....	4
圖二、南島語族遷徙路徑示意圖 .....	4
圖三、太平洋地區構樹性別分布 .....	8
圖四、 <i>ndhF-rpL32</i> 基因單倍型分布與親緣關係網絡圖 .....	9
圖五、比夏博物館所收藏之構樹標本 .....	11
圖六、取樣分布圖 .....	15
圖七、構樹質體基因組示意圖 .....	22
圖八、質體基因組構形 .....	23
圖九、質體基因組基因單倍型網絡圖 .....	29
圖十、Maximum Likelihood 親緣關係樹全圖 .....	31
圖十一、太平洋構樹之 Maximum Likelihood 親緣關係樹 .....	32
圖十二、SplitTree 親緣關係樹全圖 .....	33
圖十三、太平洋構樹之 SplitTree 親緣關係樹 .....	34
圖十四、分子定年結果 .....	35
圖十五、印尼蘇拉威西的 malo 照片 .....	38
圖十六、太平洋構樹傳播示意圖 .....	41



## 壹、前言



### 一、構樹與樹皮布文化

構樹〔*Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent., paper mulberry〕為桑科 (Moraceae) 構樹屬 (*Broussonetia*) 植物，中文俗名有鹿仔樹、楮樹等，為中喬木，樹高可達20公尺。構樹為雌雄異株的植物，雄花組成圓柱狀之葇荑花序，雌花為柱狀花絲所組成球狀之頭狀花序，子房具肉質柄，成熟時由綠色轉為橘紅色的球狀聚合果 (Liao, 1996; Zhou and Gilbert, 2003)，果肉可食用，受到許多小型哺乳類喜愛。構樹葉面滿披絨毛，葉緣鋸齒狀，葉形具有高度變異，從全緣、淺三至五裂，乃至撕裂狀的深三至五裂皆有，甚至在同一植株便可看見豐富的葉形變化。構樹原生、廣泛分布在中國、韓國、臺灣與中南半島 (Chung *et al.*, 2017)，因其用途廣泛而被人為引入日本、太平洋群島、島嶼東南亞、大洋洲與美洲。在原生地如中國，構樹可作為飼料、造紙、入藥等，為用途廣泛的重要經濟作物。引入地如日本，在公元七世紀作為造紙原料而引入構樹 (Peng *et al.*, 2019)。除了造紙外，構樹的樹皮也可作為樹皮布的原料，而樹皮布是南島語族文化中相當重要的物質文化，在西元前便因此隨著南島語族的遷徙傳播至太平洋許多島嶼 (Seelenfreund *et al.*, 2010)。

樹皮布為一種非紡織布，不須經過紡織，而是樹皮經由一系列的捶打而製成。各地製作樹皮布所使用的樹種多元，但以桑科為主，如麵包樹屬 (*Artocarpus*)、榕屬 (*Ficus*) 植物，以及島嶼東南亞和太平洋地區最常使用的構樹 (Howard, 2006) 等。各地製作樹皮布的方法大同小異，多半只在細節處有所差異。首先，在種植構樹時會不斷地移除側枝，以免側枝的生成會造成樹皮破洞。待樹幹直徑約3~6公分時，砍下樹幹並剝下樹皮，去除外層樹皮僅保留白色的內層樹皮，將

內層樹皮浸水後以石製或木製拍打棒拍打、槌氈，最終製成樹皮布。

然而樹皮布的製作過程繁瑣，且舒適度相較紡織布低，在紡織布傳入太平洋各地後，樹皮布文化便逐漸式微 (Meilleur *et al.*, 1997)。甚至有些地區的樹皮布文化曾一度失傳，如臺灣、夏威夷等，直到近代因為民族意識興起，有志者依照當地耆老、文獻記載、異地考察等方式，重新找回樹皮布的製作方式。而有些地區將樹皮布文化作為當地的觀光資源，相對完整地保留了樹皮布文化，如東加、斐濟等地。

## 二、南島語族與其遷徙假說

南島語族 (Austronesian-speaking peoples, 簡稱 Austronesian) 是一群以語言劃分的族群，其人種組成複雜可能包含不只一種。分布範圍廣泛，北至臺灣，南至紐西蘭，西至馬達加斯加，東至復活節島(圖一)。目前南島語系的語言約有 1250 種，是一個只分布在島嶼上的語系 (Bellwood *et al.*, 1995)。

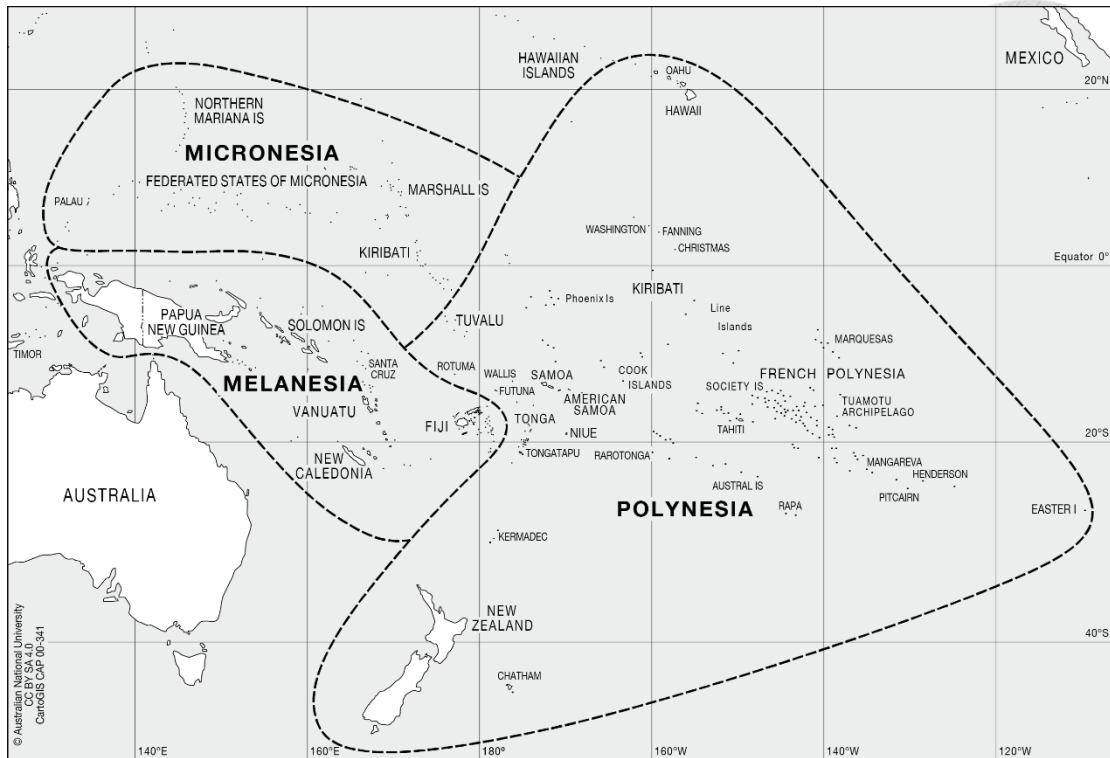
過往地理學者將大洋洲各群島劃分為密克羅尼西亞 (Micronesia)、美拉尼西亞 (Melanesia) 與玻里尼西亞 (Polynesia) 三個地理區，然而，近年來人類學者倡議依據更新世晚期(約40,000 年前)人類已居住的島嶼為界，將大洋洲劃分為近大洋洲 (Near Oceania) 與遠大洋洲 (Remote Oceania) (Green, 1991)。近大洋洲的東界至所羅門群島，包含了部分美拉尼西亞。遠大洋洲則包含了近大洋洲以東、以北的所有太平洋島群。遠大洋洲最早的人類族群是約在西元500年時，由南島語族遷徙至此而建立 (Kayser *et al.*, 2008; Kayser, 2010)，也是新石器時代人類史上最後拓殖的版圖 (Gibbons, 2001; Kirch, 2010; Matisoo-Smith, 2007)。人類學者認為，遠近大洋洲的界線可能是由於遠大洋洲內各島嶼間的距離較長，需要更高超的航海技術才可以到達下一座島嶼。同時，遠大洋洲許多島嶼為環礁，可能是在南島語族遷徙前始露出海面 (Kayser, 2010)。



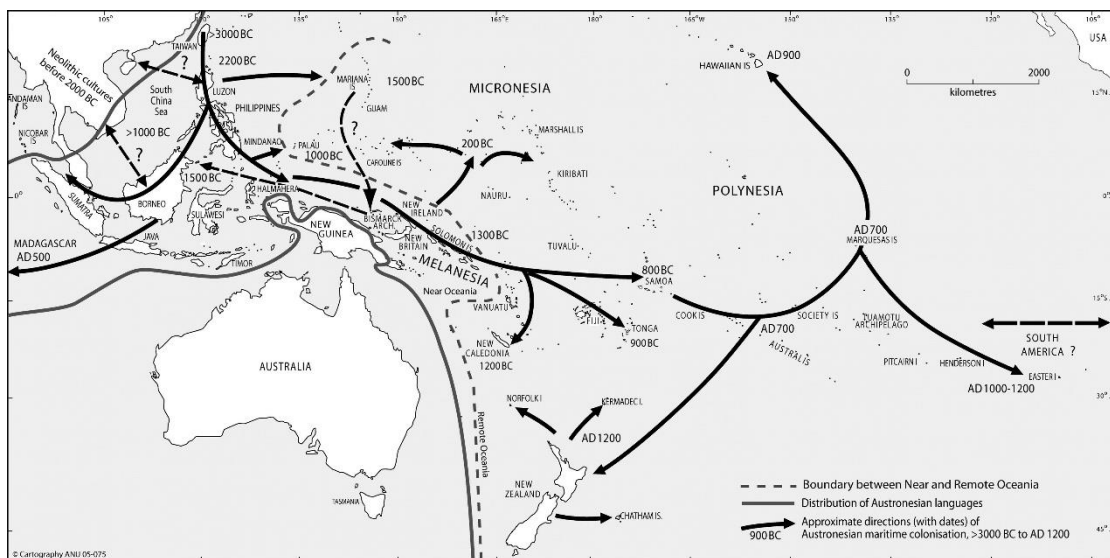
學者根據語言學、考古學、人類學、生物學、古DNA基因體學等證據，對於南島語族遷徙的路徑提出了許多假說。目前語言學、考古學與古基因體學等證據，都支持南島語族可追溯的最早的原鄉為臺灣 (Bellwood, 2017)，符合由語言學家 Blust (1988) 與考古學家 Bellwood (1988) 提出的「出臺灣說 (Out of Taiwan Hypothesis)」。

該假說推測在距今約5,000 年前，南島語族的先民(或可稱為先南島語族; pre-Austronesian)由中國大陸東南渡海來到臺灣，並在臺灣停留將近1,000 年的時間，直到距今約4,200 年前，由臺灣東南部再往南遷徙至菲律賓定居，在距今約3,500~3,000 年前重新啟航，繼續向南遷徙。南遷至印尼時兵分二路，分別往東西邁進，往東到達近大洋洲。在近大洋洲停留大約1,000 年的時間 (Gray *et al.*, 2009)，才再度往東遷徙，將族群擴張至遠大洋洲 (Blust, 1988; Diamond, 1988; Matisoo-Smith, 2007)，最遠到達夏威夷與復活節島等地(圖二)，同時這也是人類最後一次進行長距離的遷徙 (Diamond, 2000)。

然而是什麼原因促使南島語族進行如此長距離的遷徙？農業/語言擴張假說 (Farming/Language Dispersal Hypothesis) (Bellwood, 2003) 認為，當新石器時代人類由採集狩獵轉變為農業社會後，由於糧食的生產與累積致使人口增加，激化土地的競爭。在人口增加與土地競爭的雙重壓力下，原居住在中國南方的先南島語族被迫遷徙至臺灣，並在台灣發展出原始南島語 (proto-Austronesian)，而原始南島語族在臺灣經過近 1,000 年的發展後，再次面臨人口增加與土地競爭的壓力，使得南島語族再次展開遷徙。而由於南島語族為農業民族，在其遷徙時，由豬、雞、狗、太平洋小鼠等動物，以及麵包樹、山藥、芋頭、構樹等約 70 種植物組成的農業包裹 (agriculture package) 也隨著南島語族的遷徙被帶至大洋洲各島嶼。考古人類學者以轉移地景 (transported landscape) 來形容南島農業的擴張，而轉移地景也被認為是南島語族成功拓殖遠大洋洲的關鍵 (Matisoo-Smith, 2009; Kirch, 2010)。



圖一、大洋洲三大地理區劃分示意圖。〔圖片取自澳洲國立大學亞洲與大洋洲學院地理圖資網站 (CartoGIS Services, ANU College of Asia and the Pacific, The Australian National University, accessed in November 16, 2020)。〕



圖二、南島語族遷徙路徑示意圖。〔圖片取自澳洲國立大學亞洲與大洋洲學院地理圖資網站 (CartoGIS Services, ANU College of Asia and the Pacific, The Australian National University, accessed in November 16, 2020)。〕

### 三、利用構樹推測南島語族文化的起源與傳播路徑

隨著南島語族的遷徙與擴張，組成農業包裹的生物因為與人類的密切的共生 (commensal) 關係，其地理分布也因此被改變。1994年，生物人類學家 Matisoo-Smith 首先提出利用太平洋小鼠的親緣地理推測南島語族遷徙路徑，開創了太平洋共生生物研究的先河。在這之後，學者們紛紛透過共生物種來建構南島語族遷徙路徑，如麵包樹 (Zerega *et al.*, 2004)、豬 (Larson *et al.*, 2007)、雞 (Storey *et al.*, 2012)、甘藷 (Denham, 2013) 等。

構樹為南島語族製作樹皮布的重要材料，樹皮布又為南島語族具代表性的物質文化之一 (Cameron, 2008; Howard, 2006)，再加上構樹的原生地與南島語族的原鄉相符合，因此可作為共生物種來推敲南島語族的遷徙路徑。

樹皮布在過去廣泛使用在日常生活當中，可製成服飾、被單、蚊帳、房間隔幕等生活用品，在各類慶典中亦是相當重要的存在。即使在現代各類布製生活用品已被紡織品取代，但因其具有文化意涵，許多地區的樹皮布文化仍舊被保存下來。再加上許多島嶼因應觀光需求、民族意識復興等，開始復振包含樹皮布文化在內的傳統文化。時至今日蘇拉威西、東加、斐濟、薩摩亞與夏威夷等地，仍有許多人從事樹皮布的製作。臺灣的樹皮布文化曾一度消逝，但因民族意識興起，許多部落開始重新製作樹皮布(張至善，2012)。樹皮布文化的存留，也意味者當地的構樹被保留下來。

許多的證據都說明了構樹是由南島語族攜帶出原生地，傳播至東南亞，再到大洋洲生根 (Matthews, 1996)。構樹為風媒花，果實與種子皆不利於海漂，加上島嶼東南亞與大洋洲地區的構樹並無開花結果或是有性繁殖的紀錄，再經由分子標記鑑定，大洋洲除了夏威夷地區外的所有構樹皆為雌株(圖三) (Penailillo *et al.*, 2016)，可以推定這些地區的構樹是經由如扦插等無性繁殖。又部分大洋洲島嶼的構樹因為缺乏人為照顧而逐漸絕跡，可得知構樹完全依賴人為傳播與種植

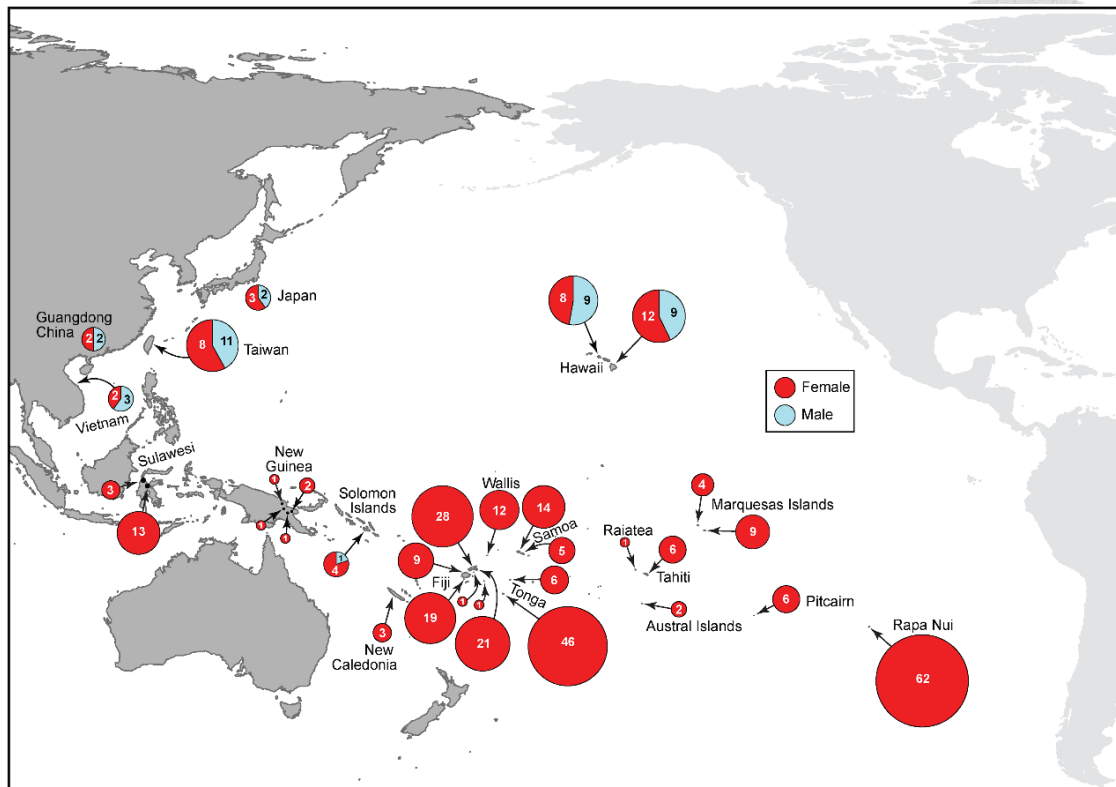
(Matthews, 1996; Seelenfreund *et al.*, 2010)。因此可藉由構樹的親緣地理關係，推得南島語族遷徙的路徑。

Chang *et al.* (2015) 使用葉綠體 *ndhF-rpL32* 基因間區隔 (intergenic spacer) 重建構樹親緣地理及族群遺傳結構(圖四)，研究取樣完整，成功以構樹親緣地理重現南島語族的遷徙路徑。但有鑑於 Chang *et al.* (2015) 僅使用單一分子標記，且 *ndhF-rpL32* 基因間區隔在太平洋地區的構樹間完全無變異，基因單倍型全部皆為cp17，幾乎沒有親緣關係解析度。而夏威夷為太平洋地區唯一的例外，同時具有兩種基因單倍型，cp17與cp41，而cp41與cp28及cp32親緣關係較接近，cp28只出現在日本，cp32則出現在中國廣東地區，因此推測夏威夷cp41的來源地很可能為二者其一。在圖三中，夏威夷也是太平洋地區中唯一出現構樹雄株的地區，而且不只是現生構樹有雄株，連早在1971年採集的構樹標本也具有雄花序(張至善，2016)。而後李宜軒(2018)以限制酶位點標定之核酸定序法 (Restriction-site Associated DNA sequencing, RADseq) (Baird *et al.*, 2008; Emerson *et al.*, 2010; Hohenlohe *et al.*, 2010) 研究構樹的親緣地理。研究所得結果大致上與 Chang *et al.* (2015) 相同，同時也藉由親緣關係樹的分析，發現夏威夷cp41與中國廣西cp32的個體親緣關係最為接近，與日本cp28關係較遠，推測夏威夷cp41很可能是來自中國廣西地區。

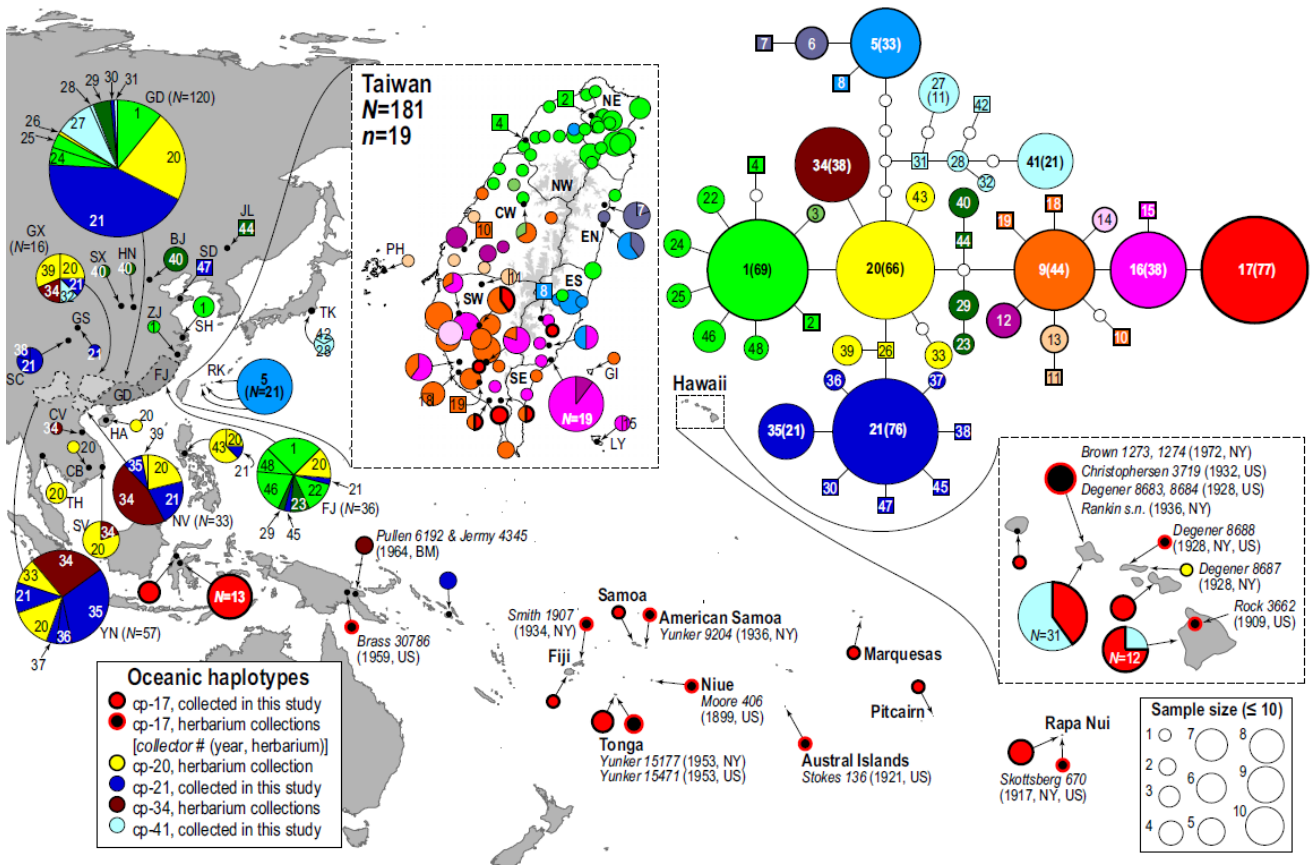
根據 Meilleur *et al.* (1997) 的記載，夏威夷具有多次的引入歷史。第一次為南島語族遷徙時引入夏威夷 (Meilleur *et al.*, 1997)。張至善(2016)藉由 Odo and Sinoto (1985) 的記載推測，在19世紀晚期的夏威夷，引入了許多來自中國及日本的勞動力來栽培甘蔗，這些來自中國與日本的勞動力，為了改善飲食，從自己的國家中引入許多作物至夏威夷，而構樹在中國與日本用途多廣，可作為藥材、造紙、繩索等，推測構樹很可能在當時隨著其他作物一同被帶入夏威夷，此為構樹第二次引入夏威夷。於此同時，夏威夷樹皮布的製作與使用已消失在夏威夷各島

(Meilleur *et al.*, 1997)，一直到1970年代左右，夏威夷民族意識興起，有志者開始復振包含樹皮布文化在內的夏威夷傳統文化，夏威夷的樹皮布文化才再次出現在夏威夷 (Kaepler, 1980)。這些有志者，如 Malia Solomon、Pua Van Dorpe 等人，自中玻里尼西亞島嶼，如東加、斐濟、薩摩亞等，重新學習傳統的製作方式，並將當地所種植的構樹帶回夏威夷以製作樹皮布 (Tanahy, 2008)，此一事件為夏威夷構樹第三次引入歷史。

在前述兩篇研究當中，Chang *et al.* (2015) 的研究所使用的分子標記在太平洋地區缺乏解析度，無法再進一步推測南島語族更為詳細的遷徙路徑。而李宜軒 (2018) 使用的 RADseq 所得的結果在太平洋群島中有很高的解析度，可以推得南島語族較為詳盡的遷徙路徑，但 RADseq 技術需要極高品質的DNA來進行實驗。然而有許多太平洋島嶼的構樹，已經消失在歷史洪流當中，現在已經沒有構樹的分布，或是有些島嶼受限於交通等條件而難以到達，幸運的是部分島嶼有標本的紀錄。於是這些島嶼的樣本收集，就需要仰賴構樹標本的利用。但由於植物標本的DNA受損嚴重，無法適用 RADseq。因此本研究同樣使用次世代定序技術 (Next Generation Sequencing, NGS)，但改以標靶基因獲取 (Bait capture)，希望能得到以 RADseq 為基礎的基因資訊，以及完整的質體基因組序列。




圖三、太平洋地區構樹性別分布。紅色為雌株，淺藍色為雄株；圓形大小與樣本數成正比。(圖片取自 Penailillo *et al.*, 2016)



圖四、*ndhF-rpL32* 基因單倍型分布與親緣關係網絡圖。圓形大小與樣本數成正比，方形表示該基因但倍型僅有單一個體。標本材料於地圖中標示為：採集號(年份; 標本館)。BJ, 北京; CB, 柬埔寨; CV, 中越; FJ, 福建; GD, 廣東; GI, 綠島; GS, 甘肅; GX, 廣西; HA, 海南; HN, 河南; JL, 吉林; LY, 蘭嶼; NV, 北越; PH, 澎湖; RK, 琉球; SC, 四川; SD, 山東; SH, 上海; SV, 南越; SX, 山西; TH, 泰國; TK, 東京; YN, 雲南; ZJ, 浙江。(圖片取自 Chang *et al.* 2015)

#### 四、標本材料的利用



大約自 400 年前起，生物多樣性及其相關的研究興起了製作標本的風氣，不論是在生物種的研究或是親緣地理的研究上，標本都是相當重要的參考。標本的重要性在如今已不言而喻，從早期缺乏相關的保存知識，到現在對其研究越來越多，保存的條件與方式也越來越嚴苛，且現存的標本，大多數都保存在標本館中。截至 2019 年 12 月為止的統計顯示，世界上一共有超過 3,300 座運作中的標本館，藏有各類標本將近 4 億份 (Thiers, 2020)。如此大量的標本所攜帶的資訊無法簡單的進行估算，所能應用的面向亦相當廣泛。從基本的分類學、解剖學、生態學、形態學、民族植物學，到保育生物學、古生物學、教育等，標本在其中的研究應用不盡相同 (Funk, 2004)。而標本上所記錄的資訊，除了人為記載的採集資訊，如採集地點、生境地環境資訊等，還包含了標本本身攜帶的資訊，如形態特徵、基因資訊等。隨著時間流逝、環境變遷、人類活動範圍變化，許多自然棲地有所更迭或是受到迫害，造成棲地變遷、破碎化，甚至是棲地就此消失，使得在其中棲息的生物亦不見蹤跡。許多標本的採集地在如今可能因故而難以到達，或是早已不復存在。亦有許多標本所記錄的物種瀕臨滅絕或是已然滅絕。這些令人扼腕的事不斷的發生，也更顯得標本材料的彌足珍貴 (Hart *et al.*, 2016; Särkinen *et al.*, 2012)。

在太平洋的各小島都有著屬於自己的文化歷史，在南島語族的遷徙歷史中，南島語族先民到底有沒有成功在當地成功種植構樹，現代的我們無從得知。但從樹皮布對文化的重要意涵，我們可以大膽假設這些南島語族先民會盡其所能地在當地種植構樹，又就構樹生長力強盛的特性而言，可以預期種植成功的機率極高。但在南島語族繼續向外遷徙後、紡織布進入當地後，再經過不同的政治歷史，許多島嶼的樹皮布文化可能式微，構樹也不再具有重要的文化地位，當地居民不再種植構樹。隨著時間流逝，缺乏照料的構樹開始死亡，逐漸絕跡在這些島上。這些


事件對構樹在太平洋各島間傳播路徑與親緣關係的研究相當不利。於是本研究取樣加入標本館的構樹標本，期望能得到更加全面的取樣範圍，尤其是構樹已經消失的島嶼，或是受限於條件、能力而無法到達的地區，如皮特肯群島、南方群島中的魯魯圖 (Rurutu) 等，在本研究中都只有來自於標本館的個體。標本個體同時也可以提供歷史基因資訊，對於傳播路徑的重建大有益處。本研究成功取得質體基因組序列的標本中，採集年代最早為 1920 年在夏威夷所採集的構樹(圖五)，距今已有 100 年的歷史。在夏威夷地區的應用分析上，標本材料也可作為標準品，輔助判斷夏威夷 cp17 的個體為史前時引入或是近代引入個體。

然而標本材料的利用固然可以增加歷史基因資訊，但標本中所含的基因體 DNA 會隨著時間降解，各標本館對於標本的處理方式、保存狀況亦不相同，標本 DNA 可能會因為外在因素減緩或是加速降解，也容易受到其他物種的污染 (Zeng *et al.*, 2018)，加深了研究的困難性。鑒於上述標本的特殊性，本研究在實驗設計上與現生構樹材料做出區隔 (Gilbert *et al.*, 2005)，同時在次世代定序處理上，採用標靶基因獲取的方式，以期最大程度減少污染的可能性，同時最大化目標基因獲取量。




圖五、比夏博物館所收藏之構樹標本。(照片由鍾國芳教授提供。)

## 五、次世代定序與標靶基因獲取



次世代定序技術自發明以來日新月異，發展迅速，時至今日越趨成熟，越來越多的研究利用次世代定序，解決了許多從前無從得知之事 (Straub *et al.*, 2012)。也因為發展迅速、技術成熟，價格與技術門檻逐漸降低，相對應的實驗與分析技術也在蓬勃發展。從定序前的樣品處理，到定序後的資料處理與分析，也越來越多的專家學者投入心力開發，如不同的樣本庫 (library) 製備方法、不同的資料分析軟體等等。次世代定序最大的特點便是以相較低廉的價格，在短時間內獲得大量的定序資料，再以大量的短片段序列組裝完整基因體，或是進行相關的分析研究。但並非每個研究都有充足的經費進行全基因體定序，也因此發展出了許多簡化基因組的方法，例如基因略讀 (genome skimming) 與標靶基因獲取 (Bait capture)。

而不同的基因簡化方法對於樣本 DNA 的品質要求不一，像是李宜軒(2018)所使用的 RADseq，利用限制酶切位來簡化基因組。因為需要使用限制酶將基因體 DNA 剪切成小片段 DNA，利用限制酶切位序列進行樣本庫製備後，最後再進行定序。如此獲得的序列資料就會受限於樣本是否具有限制酶的切位，也會因此而產生許多缺值。而且經限制酶剪切後的 DNA，還需要篩選 DNA 片段大小，只保留特定大小的片段。因此 RADseq 對於樣本 DNA 的品質要求相當嚴苛，對破碎的 DNA 容忍度極低，像是標本 DNA 基本上就不適用於 RADseq。於是本研究使用另外一種基因組簡化的方法—標靶基因獲取，以與目標片段互補的 RNA baits 抓取目標片段，將目標片段增幅後再進行定序，以達簡化基因組的目的。標靶基因獲取的方式對於 DNA 的品質要求大幅降低，需要的起始 DNA 量也較少，相當適合標本 DNA 的研究。2016 年 Hart *et al.* 便是以標靶基因獲取的方式，獲取了豆科 (Fabaceae) 印加屬 (*Inga*) 植物標本的基因組資訊，並研究其種內親緣關係與分類地位。然而標靶基因獲取的方法需要先建立參考基因組，才能夠以此



設計研究所需要的目標基因座 (loci)，這也限制了很多非模式物種的研究。而本研究希望可以與李宜軒(2018)的 RADseq 資料合併分析，同時也希望得到質體基因組資訊，因此 Bait 套裝 (set) 的設計一共分為兩個部分。一部分使用李宜軒(2018)的 RADseq 資料，進行一連串的篩選後設計；另一部分以構樹的質體基因組序列設計。最終一共設計了 8,000 個基因座，希望能重建太平洋構樹的親緣關係。由 RADseq 所設計的基因座序列將由本研究室另一位研究生林弘進行相關分析研究，而本篇研究則使用質體基因組序列進行分析，希望能以高解析度的遺傳資料，了解太平洋構樹的親緣關係，同時重建構樹在太平洋各島間的傳播途徑，以推測南島語族太平洋地區的遷徙路徑。

## 六、研究目標

本研究利用構樹質體基因組，期望能以高解析度之基因體資料，達到以下幾個研究目標：

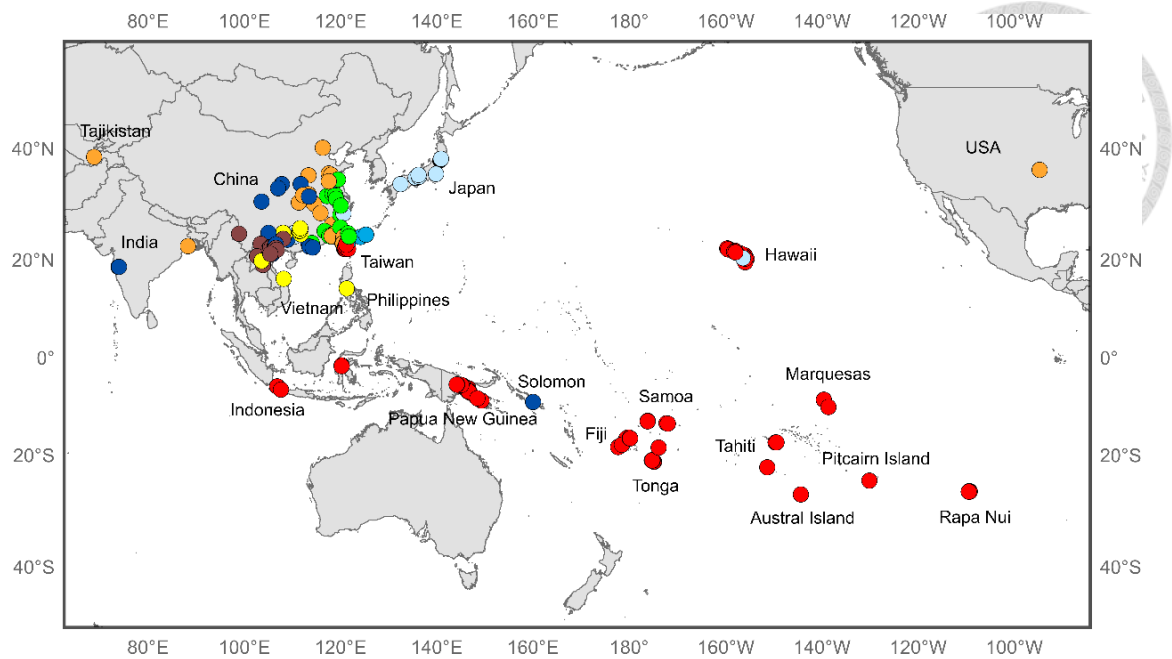
1. 重建構樹經由人類遷徙傳播出臺灣後的路徑
2. 檢視太平洋各群島間構樹的親緣關係
3. 釐清夏威夷構樹的引入歷史
4. 推測太平洋構樹傳播時間
5. 以太平洋構樹的傳播路徑再次驗證南島語族「出台灣說」

## 貳、 材料與方法



### 一、樣本的選取及收集

本研究取樣範圍廣泛，從構樹的原生範圍，中國東南、臺灣、中南半島，到人為引入範圍，印尼、巴布亞新幾內亞至太平洋各島，如夏威夷、復活節島等皆有收集樣本(圖六)。新鮮矽膠乾燥樣本部分由鍾國芳博士親自前往採集，如巴布亞新幾內亞、夏威夷、日本等地。部分新鮮矽膠乾燥樣本則由研究室合作學者，如張至善博士、李攀師兄、Seelefreund 博士等人提供來自各地的構樹樣本。部分臺灣、印尼蘇拉威西的樣本由筆者分別與研究室其他研究生(林弘、蔡俐葳、蔡維欣)以及研究室時任研究助理黃郁嵐一同前往當地採集。標本館材料則分別由鍾國芳博士、合作學者 Seelefreund 博士等人取自臺灣國立自然科學博物館植物標本館 (Department of Botany, National Museum of Natural Science, TNM)、日本國立科學博物館(National Museum of Nature and Science, TNS)、夏威夷比夏博物館 (Bishop Museum, BISH)、夏威夷國立熱帶植物園 (National Tropical Botanical Garden, PTBG)、巴布亞新幾內亞林務局 (Papua New Guinea Forest Research Institute, LAE)。本研究最終一共定序 479 個構樹個體，包含了 56 個標本個體、423 個新鮮矽膠乾燥個體，以及 2 個小構樹 (*Broussonetia monoica*) 與 2 個雜交構樹 (*Broussonetia kazinoki*)。再加入研究室先前研究中以基因略讀方法，已組裝完成的 25 個質體基因組，共有 24 個構樹個體與 1 個小構樹個體。



圖六、取樣分布圖。樣點僅繪出最終納入分析之個體。樣點顏色參考 Chang *et al.* (2015) 使用 *ndhF-rpL32* 基因間隔區所定義之基因單倍型群體(圖四)繪製。綠色為 cp01 群體，包含 cp01、cp03、cp22、cp53；藍色為 cp05 群體，包含 cp05、cp06；紅色為 cp17 群體，包含 cp16、cp17、cp49、cp51、cp55；黃色為 cp20；深藍色為 cp21 群體，包含 cp21、cp35、cp39、cp47、cp61；淺藍色為 cp28 群體，包含 cp28、cp31、cp41；咖啡色為 cp34 群體，包含 cp34、cp59、cp77；橘色為 cp09、cp13、cp40、cp54。

## 二、DNA 萃取

因為從標本館所取得的標本材料具有特殊性，其帶有採集當下的 DNA 資訊。所以在實驗處理上需要與現生材料分開處理，以避免所有在操作中可能與現生材料產生的污染。又因為標本保存等問題，使標本材料所帶有的 DNA 含量減少與破碎化，故在實驗處理上必須要與現生材料分開。


兩種樣本材料皆使用 CTAB 法 (Doyle, 1990) 萃取基因體 DNA (gDNA)，實

際操作步驟皆有所調整，以取得最佳 DNA 品質。而標本館材料依照 Payacan *et al.* (2017) 所記載方法再進行調整。詳細步驟如下：

1. 新鮮矽膠乾燥材料：以鑷子選取面積約  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  的構樹葉片(優先使用幼葉)，置入 2 mL 微量離心管中，同時放入 3 顆 2.3 mm 組織研磨珠。將樣本置於  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中隔夜，或是在開始實驗前以液態氮冷卻。接著以組織研磨器 (tissue lyser) 設定頻率 30 Hz 震盪 1 分鐘，再將震盪盒上下翻轉後以 30 Hz 震盪 1 分鐘。確認乾燥葉片皆為粉末狀後，加入 1,000  $\mu\text{L}$  事先預熱  $65^\circ\text{C}$  30 分鐘之 CTAB 溶液 [ 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, 250 mM NaCl, 2% CTAB, 2% PVPP, 0.5%  $\beta$ -Mercaptoethanol ]，而後放入乾浴槽中加熱  $65^\circ\text{C}$  30 分鐘。接著取出離心管，加入 600  $\mu\text{L}$  PCI 混合溶液 (Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol, 25: 24: 1 mixture, pH 8.0)，放置在混合機上輕柔混勻 15 分鐘。接著以 16,000 g 離心 10 分鐘，將上層水溶液(約 850  $\mu\text{L}$ )移至新的 2 mL 微量離心管中，加入 10  $\mu\text{L}$  RNase A 溶液(濃度為 100 mg/ $\mu\text{L}$ )，於  $37^\circ\text{C}$  中培養 30 分鐘。取出離心管後再加入 600  $\mu\text{L}$  CI 混合溶液 (Chloroform: Isoamyl alcohol, 24: 1 mixture)，放置在混合機上輕柔混勻 15 分鐘。接著以 16,000 g 離心 10 分鐘，將上層水溶液(約 730  $\mu\text{L}$ )移至新的 1.5 mL 微量離心管中。此步驟須檢視剛離心完的兩層溶液是否有混合層，若有明顯混合層，表示仍有蛋白質殘留，則需要再加入 600  $\mu\text{L}$  CI 混合溶液，放置在混合機上輕柔混勻 15 分鐘。接著以 16,000 g 離心 10 分鐘，將上層水溶液(約 610  $\mu\text{L}$ )移至新的 1.5 mL 微量離心管中。接著加入十分之一體積之 3M 醋酸鈉 (sodium acetate)，再加入一倍體積之冰異丙醇 (isopropanol)，將溶液翻轉混勻後放置至少 10 分鐘待 DNA 析出。接著離心 16,000 g 10 分鐘，小心將溶液倒出，避免沉澱物流失。接著以 800  $\mu\text{L}$  冰 75% 酒精清洗沉澱物，上下翻轉數次後以 16,000 g 離心 10 分鐘，小心移除液體。再重複以 800  $\mu\text{L}$  冰 75% 酒精清洗一次，以 16,000 g 離心 10 分鐘，小心移除液體。接著打開上蓋，將微量離心管置入乾

浴槽中加熱 65°C 3~10 分鐘，將 DNA 沉澱物乾燥。而後加入 100  $\mu$ L Nuclease-free Water 並蓋緊上蓋，將離心管置於乾浴槽中加熱 65°C 10~30 分鐘以溶解 DNA。接著以 Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5  $\mu$ g) (NEB, Ipswich MA, USA) 純化樣本 DNA，分別取 1  $\mu$ L DNA 溶液進行 1.5% 洋菜膠電泳分析，與 Qubit™ fluorometer 4 (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) 進行定量。

2. 標本館材料：先以矽膠再次乾燥至少三天，再進行萃取，且萃取使用之實驗室、實驗各項器材、藥品皆與新鮮乾燥材料區隔開，以避免與現生材料汙染 (Gilbert *et al.*, 2005)。除去有機溶劑的操作在化學抽氣櫃中進行，其他步驟皆在無菌操作臺中進行。以鑷子秤取 15~16 mg 的構樹葉片(優先使用幼葉)，以研鉢研磨至細粉狀，加入 1,000  $\mu$ L CTAB 溶液 [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, 250 mM NaCl, 2% CTAB, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol]，盡量將液體完全移入 2 mL 微量離心管中。而後將微量離心管置於混勻機中，調整轉速使其緩慢混勻，再放入培養箱中加熱 60°C 至隔夜(約 16~20 小時)。接著取出離心管，加入 600  $\mu$ L PCI 混合溶液 (Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol, 25: 24: 1 mixture, pH 8.0)，放置在混合機上輕柔混勻 15 分鐘。接著以 16,000 g 離心 10 分鐘，將上層水溶液(約 850  $\mu$ L)移至新的 2 mL 微量離心管中，再加入 600  $\mu$ L CI 混合溶液 (Chloroform: Isoamyl alcohol, 24: 1 mixture)，放置在混合機上輕柔混勻 15 分鐘。接著以 16,000 g 離心 10 分鐘，將上層水溶液(約 730  $\mu$ L)移至新的 1.5 mL 微量離心管中。此步驟須檢視剛離心完的兩層溶液是否有混合層，若有明顯混合層，表示仍有蛋白質殘留，則需要再加入 600  $\mu$ L CI 混合溶液，放置在混合機上輕柔混勻 15 分鐘。接著以 16,000 g 離心 10 分鐘，將上層水溶液(約 610  $\mu$ L)移至新的 1.5 mL 微量離心管中。接著加入十分之一體積之 3M 醋酸鈉 (sodium acetate)，再加入一倍體積之冰異丙醇 (isopropanol)，將微量離心管置於混勻機中，調整轉

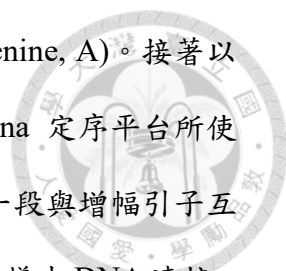


速使其緩慢混勻，再放進冰箱中隔夜以待 DNA 析出。取出離心管後離心 16,000 g 10 分鐘，小心將溶液倒出，避免使沉澱物流失。接著以 600  $\mu$ L 冰 75% 酒精清洗沉澱物，上下翻轉數次後以 16,000 g 離心 10 分鐘，小心移除液體。再重複以 800  $\mu$ L 冰 75% 酒精清洗一次，以 16,000 g 離心 10 分鐘，小心移除液體。接著打開上蓋，將微量離心管置入乾燥箱中加熱 60°C 3~10 分鐘，將 DNA 沉澱物乾燥。而後加入 100  $\mu$ L Nuclease-free Water 並蓋緊上蓋，將離心管置於培養箱中加熱 60°C 10~30 分鐘以溶解 DNA。接著可視情況使用 Agencourt® AMPure® XP system (Beckman Coulter, Brea CA, USA)，以樣本 1.8 倍體積進行 DNA 純化。分別取 1  $\mu$ L DNA 溶液進行 1.5% 洋菜膠電泳分析，與 Qubit™ fluorometer 4 (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) 進行定量。

### 三、圖書庫製備

次世代定序法在定序前需要先將樣本製備為圖書庫 (library)，圖書庫中的序列兩端會接上不同的分子條碼，供定序時識別，亦方便在定序完後區分個體。本研究使用 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, Ipswich MA, USA) 進行此圖書庫製備。詳細操作步驟按照其說明書步驟進行，並稍作調整，以下為簡略步驟說明：

1. 樣品 DNA 隨機斷裂：每個樣本取 3,000 ng 配製為 100  $\mu$ L 溶液，使用超音波震盪器 Bioruptor® Pico B01060010 (Diagenode, Liège, Belgium)，將 DNA 隨機斷裂為長度約 200~300 bp 的片段。超音波設定為開啟：關閉時間為 30 秒：30 秒，視洋菜膠電泳分析結果，震盪 1~8 個循環，再取 1  $\mu$ L DNA 溶液進行 1.5% 洋菜膠電泳分析，確認最終獲得片段長度為 200~300 bp。
2. DNA 片段隨機擴增：先將隨機斷裂的 DNA 片段兩端由黏性端 (sticky end)



修復成平坦端 (blunt end)，同時於 3' 端接上多個腺嘌呤 (Adenine, A)。接著以 T4 DNA ligase (NEB, Ipswich MA, USA) 在腺嘌呤後接上 Illumina 定序平台所使用的 adaptor。Adaptor 為一髮夾形 (hairpin) DNA 片段，具有一段與增幅引子互補的 DNA 片段，兩端分別以腺嘌呤及胸腺嘧啶 (Thymine, T) 與樣本 DNA 連接。迴轉處有一尿嘧啶 (Uracil, U)，使用 USER™ Enzyme (NEB, Ipswich MA, USA) 移除後，使 adaptor 由原本的髮夾形變為 Y 字形，露出與增幅引子互補之片段。接著以 Agencourt® AMPure® XP system (Beckman Coulter, Brea CA, USA) 篩選片段大小，留下最終長度介於 300~400 bp 間的 DNA 片段。最後加入帶有分子條碼的引子，進行 PCR 增幅 DNA，擴增循環數以說明書上建議之最低循環數進行增幅。最後以 0.9 倍總反應體積之 Agencourt® AMPure® XP system (Beckman Coulter, Brea CA, USA) 進行純化。分別取 1 µL 完成反應之 DNA 溶液進行 1.5% 洋菜膠電泳分析，與 Qubit™ fluorometer 4 (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) 進行定量。反應終產物片段大小為 300~400 bp，DNA 總量應超過 500 ng。

#### 四、標靶基因獲取與定序

圖書庫製備完成後再進行標靶基因獲取，篩選出標靶基因後再次進行增幅，使研究所需要的特定片段大量增加，大幅減少其他非研究目標的片段被定序的可能。本研究使用 MYcroarray (Ann Arbor, Michigan, U.S.A.) 生產之 myBaits® target capture kits，並依照 MYbaits protocol v.4.01 之產品公開說明書進行實驗。簡略實驗步驟如下：

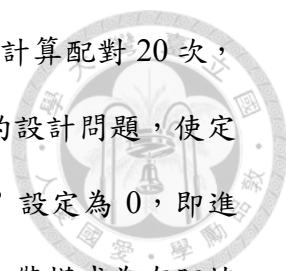
每 8 個樣本之圖書庫為一組，製備為 DNA 總量 3,000 ng、體積 7 µL 之溶液。加入 baits 進行雜交反應，將 baits 接在目標片段上，反應溫度設定為 60°C，反應時間為 46~48 小時。反應完成後，利用磁珠將 baits 吸附住，洗去其他不被磁珠

吸附之非目標片段，只留下目標片段。而後進行 PCR 增幅，再次擴增目標片段，DNA 延伸時間設定為 30 秒，PCR 循環數為 12~14。最後再以 0.9 倍總反應體積之 Agencourt® AMPure® XP system (Beckman Coulter, Brea CA, USA) 進行純化。分別取 1  $\mu$ L 完成反應之溶液進行 1.5% 洋菜膠電泳分析，與 Qubit™ fluorometer 4 (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) 進行定量。最終產物片段大小為 300~400 bp，DNA 總量應超過 625 ng。

接著將 6~8 個完成雜交反應的樣本庫合併為一個 lane，交由中央研究院生物多樣性研究中心次世代定序核心實驗室 (NGS High Throughput Genomics Core) 進行定序。本研究前後包含測試一共有四批定序資料，皆使用 Illumina HiSeq 2,500 次世代核酸定序服務平臺 (Illumina, San Diego, CA, USA)。前三批樣本以雙端定序 (paired end) 150 bp，HiSeq Rapid Mode 進行定序。第四批樣本則以雙端定序 (paired end) 150 bp，HiSeq High-Throughput Mode 進行定序。

## 五、定序資料處理

定序完成後，由次世代定序核心實驗室完成以分子標記分離個體資料，故所得定序資料皆為已分離之個體雙端序列資料。資料分析使用本研究室所架設之 Linux 系統伺服器。原始資料先以 Gunzip 解壓縮，再以 Fastqc (Andrews, 2010) 檢視定序資料品質。接著以 Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) 進行資料修剪 (trim)，剔除定序品質不佳之定序讀序 (reads)。修剪過後再次以 Fastqc 檢視定序資料品質，確認讀序品質皆達到標準。有鑑於標本材料 DNA 會隨著時間而出現損壞與變異，故標本材料在確認讀序品質達到標準後，再使用 mapDamage2 (Jonsson *et al.*, 2013) 檢視 DNA 損壞與變異程度，避免在後續的親緣關係分析上出現偏差。接著所有序列皆使用 GetOrganelle (Jin *et al.*, 2020) 以 *De novo*



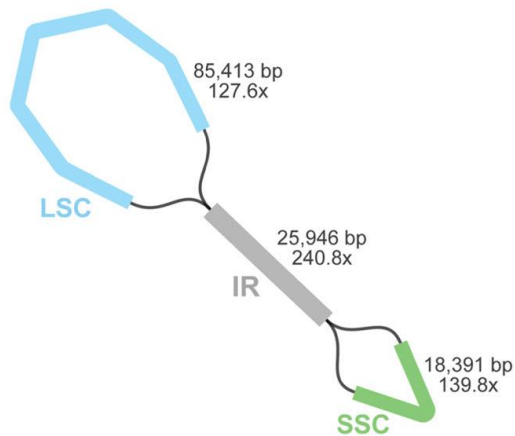
Assembly 的方式組裝質體基因組。參數設定分別為“-R”重複計算配對 20 次；“-K”K mer 21,35,45,55,65,75,85,95,105,115,121；由於 bait set 的設計問題，使定序出現大量的重複序列，為使重複序列不會被重複計算，“-P”設定為 0，即進行組裝序列時重複序列只採用 1 次。“-F”為 embplant\_pt，即組裝模式為有胚植物質體基因組，再加入“-S”使用本研究室已發表之構樹質體基因組序列 (NCBI, Accession: MH189570) 為參考序列。

組裝完的結果分為兩種情況，一為完整質體基因組(圖七)，一共會產生兩個完整序列檔案，為質體基因組中 IR region 不同方向的結果，因為無法確認哪一個 IR region 的方向才是在細胞中的真實情況，故全部選擇相同方向的結果進行後續分析。完整組裝的質體基因組再使用 Bandage v0.8.1 (Wick *et al.*, 2015) 軟體，檢視質體基因組構形(圖八)，其結果應與典型質體結構相同，同時可檢視組裝的讀序覆蓋率 (coverage)。而另一種組裝情況則是無法藉由 *De novo* Assembly 的方式組裝成完整的質體基因組，僅產生 contig，進一步使用 Geneious Prime v2020.2.4 (<https://www.geneious.com>) 軟體，將 contig 的檔案以 Map to reference 的方式進行組裝，所使用的參考序列仍舊為 MH189570。若是有任一片段的讀序覆蓋率為零，則剔除該樣本，不納入後續親緣關係分析。



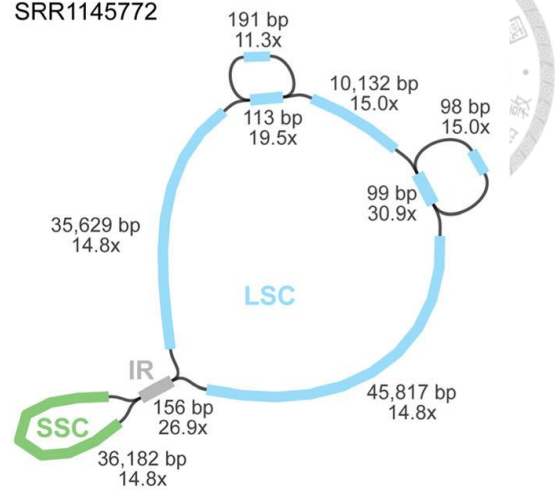
**A) Typical quadripartite structure**

SRR5602575



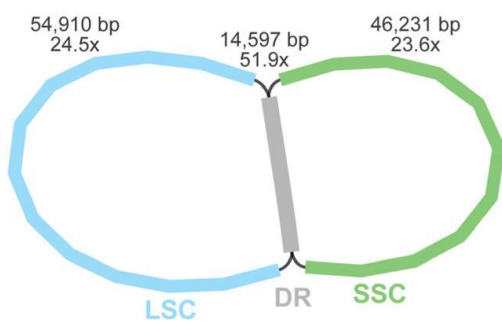
**B) Quadripartite structure with contracted IRs**

SRR1145772



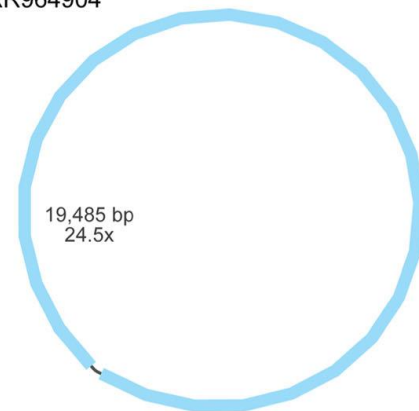
**C) Quadripartite structure with large DRs**

SRR2037123



**D) No large repeats**

ERR964904




圖八、質體基因組構形。典型的質體基因組構形共可分完四個部分 Large Single-Copy (LSC)、Small Single-Copy (SSC) 與兩個重複序列區 (Inverted Repeats, IR)，兩個 IR 區域序列相同但方向相反，因此一般在構形上會相結合。圖 A，典型的質體基因組構形。圖 B，四個部分出現額外的重複序列。圖 C，兩個 IR 區域序列直接相同。圖 D，缺乏大片段的重複序列。(圖片取自 Jin *et al.*, 2020)

## 六、親緣關係分析

以上述方式一共組裝完成超過 250 個個體的質體基因組序列，剔除相似度極高的個體後，一共分析 237 個個體，再加入研究室舊有、以基因略讀方式所組裝完成之構樹質體基因組序列，包含前述所使用之參考序列，一共 25 個個體。全數匯入 Geneious Prime v2020.2.4 軟體後，以 MAFFT Alignment 進行序列比對 (Alignment)，接著刪除其中一個 IR 區域，避免高估遺傳距離。確認比對完成後輸出為 Fasta 及 Nexus 兩種不同格式之檔案以供後續分析。另外再萃取出 *ndhF-rpl32* 基因間隔區，匯出成 Nexus 格式檔案，使用 tcs1.21 (Clement *et al.*, 2000) 軟體進行基因單倍型的分析，以便與先前的研究進行比對分析。將質體基因組序列比對之 Fasta 檔案，在線上伺服器 CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*, 2010) 上，透過 RAxML v8.2.12 (Stamatakis, 2014) 以最大似然性 (maximum likelihood) 方法重建親緣關係樹。使用 GTR+GAMMA 作為演化模型，並進行 1,000 次重複隨機取樣 (bootstrap) 以驗證樹形 (topology)，最終結果以 FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) 檢視、編輯並匯出圖檔。將 Nexus 檔案使用 SplitsTree5 (Huson and Bryant, 2006) 軟體重建親緣關係樹，並以不同的樹形呈現。接著將取樣簡化後，以 PopART v1.7 (Leigh and Bryant, 2015) 軟體分析 Nexus 檔案，以 TCS 為演算法，建立基因單倍型網絡圖 (haplotype network)，以檢視各基因單倍型間的演化關係。

## 七、分子定年



使用質體基因組推估核苷酸變異速率，配合分子取代模型，進行分子定年，並藉此推估構樹到達太平洋各島嶼的時間。取樣上以臺灣 cp16 作為外群，加上包含臺灣在內的太平洋群島 cp17 個體，一共選用 66 個個體。定年使用 BEAST v2.6.3 (Bouckaert *et al.*, 2019) 軟體進行運算。於 BEAUti v2.6.3 軟體中進行參數設定，使用 Gamma Site Model (Yang, 1996) 為分子取代模型，分子時鐘模型使用 Strick Clock，並設定起始核苷酸變異速率為  $1.0E-9$ 。Prior 設定中，以臺灣 cp17 與其他太平洋個體分歧的時間點為 4200 年 (Bellwood, 2017) 作為基準點 (criteria point)，機率為常態分佈 (normal)，數值為：mean=4200、sigma=1.0、offset=1.0。樹形設定臺灣 cp17 為一單系群，所有 cp17 個體為一單系群，以及所有太平洋個體，不包含臺灣個體為一個單系群。最後設定 MCMC 長度為 50,000,000，每第 10,000 次運算進行一次取樣。總共運行 10 次 MCMC。運算完畢後使用 Tracer v2.6.3 查看運算結果及節點資料，確認 ESS 值 (有效樣本量，effective sample size) 均大於 200，最後以 TreeAnnotator v2.6.3 輸出一致性樹 (consensus tree)，再使用 FigTree v1.4.4 軟體檢視、編輯並轉為圖檔。

## 參、 結果

本研究組裝並分析 237 個質體基因組，平均讀序覆蓋率 (coverage) 為 104.8X (sdev 36.7, 27.4~337.7X)，組裝完成的質體基因組長度平均為 160,162 bp (160,062~160,855 bp)。質體基因組組裝完成後，先萃取出 *ndhF-rpL32* 基因間隔區，用以判定 Chang *et al.*, 2015 研究中的基因單倍型。而完整質體基因組在不同的基因單倍型間的基因單倍型網絡圖(圖九)中，與 Chang *et al.*, 2015 研究中僅使用單一分子標記所繪製的基因單倍型網絡圖(圖四)架構有些不同，也出現了先前並未記錄的基因單倍型，為了方便與先前研究所使用的基因單倍型合併討論，將這些未記錄過的基因單倍型統一標示為 cpN，並在 cpN 後加入其最接近的基因單倍型群體，例如 cpN17，N 表示其為先前未記錄過的基因單倍型，17 表示在以 *ndhF-rpL32* 基因間隔區所繪製的基因單倍型網絡圖中最靠近 cp17 群體。組裝完的質體基因組序列以 Geneious 軟體檢視，包含以基因略讀法組裝完成的質體基因組一共匯入並分析 263 個個體，其中包含兩個小構樹與兩個雜交構樹，將質體基因組序列排比後去除一個 IR 區域，再進行後續分析。其中以小構樹及雜交構樹做為外群，排比所有樣本的排比序列長度為 138,104 bp，一共具有 4,385 個變異位點 (variable sites)，其中有 3,298 個變異位點具有簡約意義 (parsimony-informative characters)。而以臺灣 cp16 作為外群，排比所有太平洋構樹個體的排比序列長 134,614 bp，僅有 232 個變異位點，其中有 149 個變異位點具有簡約意義。再以排比序列進行親緣關係分析，得到一最大似然性親緣關係樹(圖十)。為了更好呈現太平洋群島間的親緣關係，另外將太平洋 cp17 萃取出後，計算其親緣關係結果(圖十一)。兩種取樣方式再分別以 SplitsTree5 軟體呈現不同親緣關係樹形(圖十二、十三)。最後為探討構樹藉由南島語族遷徙傳播至太平洋各島的時間，以南島語族遷徙出臺灣的時間為 4,200 年作為基準點，以質體基因組序列進行分子定年，結果如圖十四。分析結果如下：

## 一、在 Chang *et al.*, 2015 中基因單倍型群體的關係

在圖十的親緣關係樹中，Chang *et al.*, 2015 研究中歸納為相同基因單倍型群體的個體，除了 cp20 與橘色的 cp09 基因單倍型群體不為單系群 (monophyletic group) 外，其他所有的基因單倍型群體皆自成一個單系群。表示以 *ndhF-rpl32* 基因間隔區所區分的基因單倍型群體內較群體間親緣關係接近，顯示 *ndhF-rpl32* 基因間隔區作為分子標記，在構樹的質體基因組上，具有相當良好的鑑別力，以 *ndhF-rpl32* 基因間隔區所定義的基因單倍型在質體基因組上具有代表性。

## 二、太平洋群島個體與臺灣個體親緣關係最接近，且個體變異小

不論是在親緣關係樹(圖十、十一)或是 SplitTree 的結果(圖十二、十三)當中，都可以看見太平洋群島的個體都與臺灣個體親緣關係最為接近，且臺灣與太平洋群島個體形成一高支持度單系群。而且在圖九中可以看見，太平洋群島的個體所帶有的基因單倍型是由臺灣個體所帶有的基因單倍型所延伸出。比對圖十與圖十一可以發現太平洋群島間的親緣關係略有不同，很可能是因為個體間變異小，且兩親緣關係樹在太平洋群島個體的部分支持度都不高。但仍可得知各地理區間的關係：印尼來自蘇拉威西與爪哇島的個體分為兩個不同的單系群，且在太平洋群島中與臺灣個體的親緣關係最接近。新幾內亞的個體則可分為三個單系群，而三個不同單系群內的個體地理位置接近，顯示其親緣關係遠近與地理分布相關。東加、斐濟、薩摩亞與華萊士島等遠大洋洲西部的島嶼，加上部分夏威夷個體成為一個大單系群。遠大洋洲中部的島嶼，皮特肯群島、南方群島、馬克薩斯群島、大溪地，一部分與遠大洋洲東部的復活節島成為一個單系群，另一部分與北部的夏威夷成為單系群。大部分親緣關係的結果與先前兩篇研究 (Chang *et al.*, 2015；李宜軒，2018)皆相吻合。

### 三、夏威夷 cp41、日本 cp28 與中國 cp32 的親緣關係

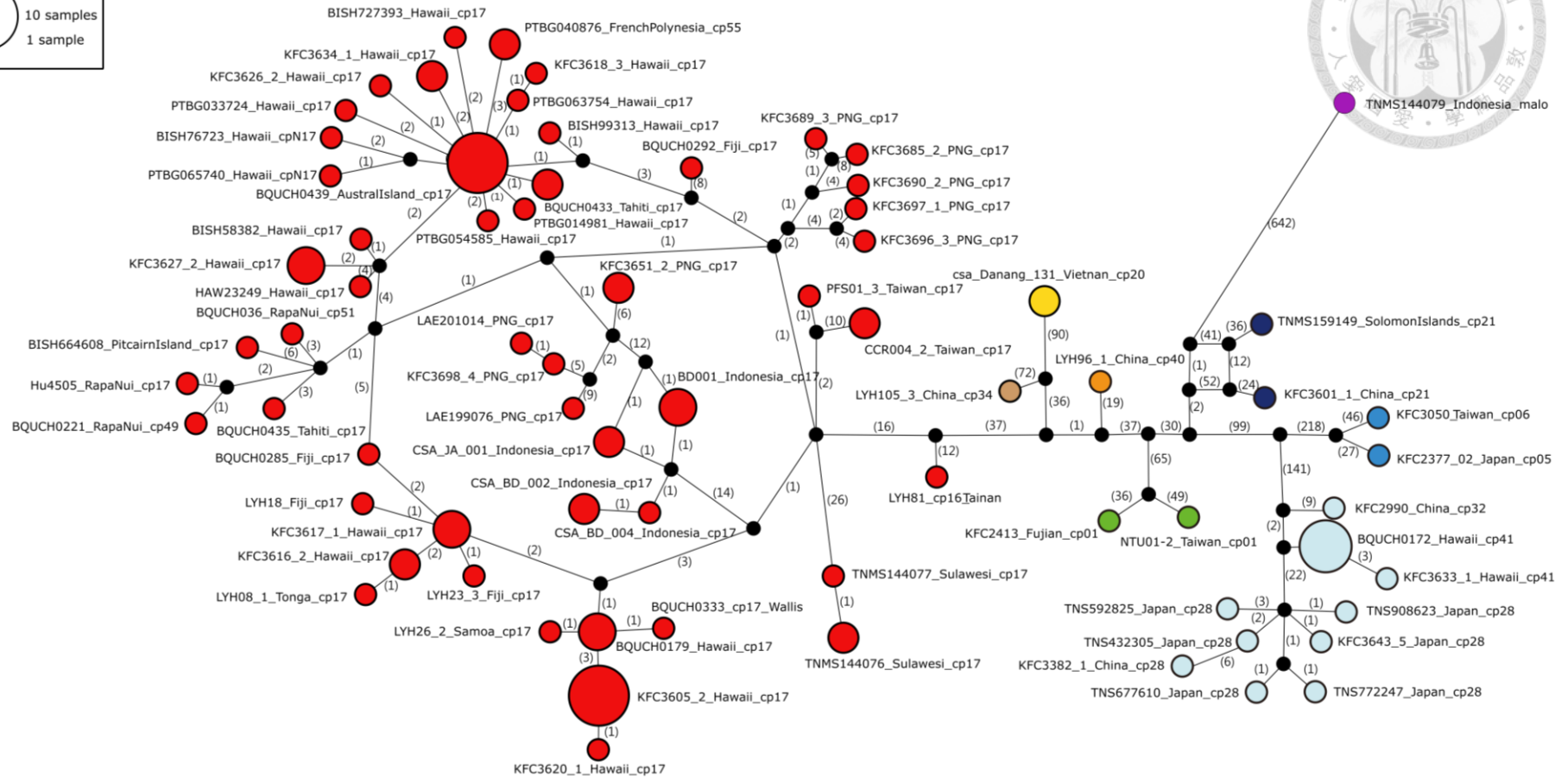
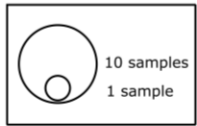
在基因單倍型網絡圖(圖九)中，可以看見日本 cp28 與夏威夷 cp41 都是由中國 cp32 所衍生出，且夏威夷 cp41 與中國 cp32 距離最接近。在親緣關係樹(圖十)上可發現日本 cp28 與中國 cp28 為單系群，親緣關係最為接近，推測日本 cp28 很可能是由中國所引入。而夏威夷 cp41 與 cp28 單系群關係最為接近，而與中國 cp32 的親緣關係較遠。而在圖十二中日本與中國的 cp28、中國 cp32 與夏威夷 cp41，關係相當緊密，最先分歧的為中國 cp32。

### 四、基因單倍型 cp17 可分為四大群

圖十三中可將所有 cp17 的構樹個體分為四大群。分別是由臺灣 cp16 與 cp17、印尼以及新幾內亞的個體所組成的 A 群。B 群主要由遠大洋洲西部的東加、斐濟、薩摩亞與部分夏威夷個體所組成。C 群是由遠大洋洲東部的復活節島與中部的大溪地、皮特肯群島的個體組成。最後 D 群則是由遠大洋洲北部的夏威夷與中部的大溪地及馬克薩斯群島個體所組成。其中夏威夷的標本個體僅有兩個在 B 群，其他全部都在 D 群當中。

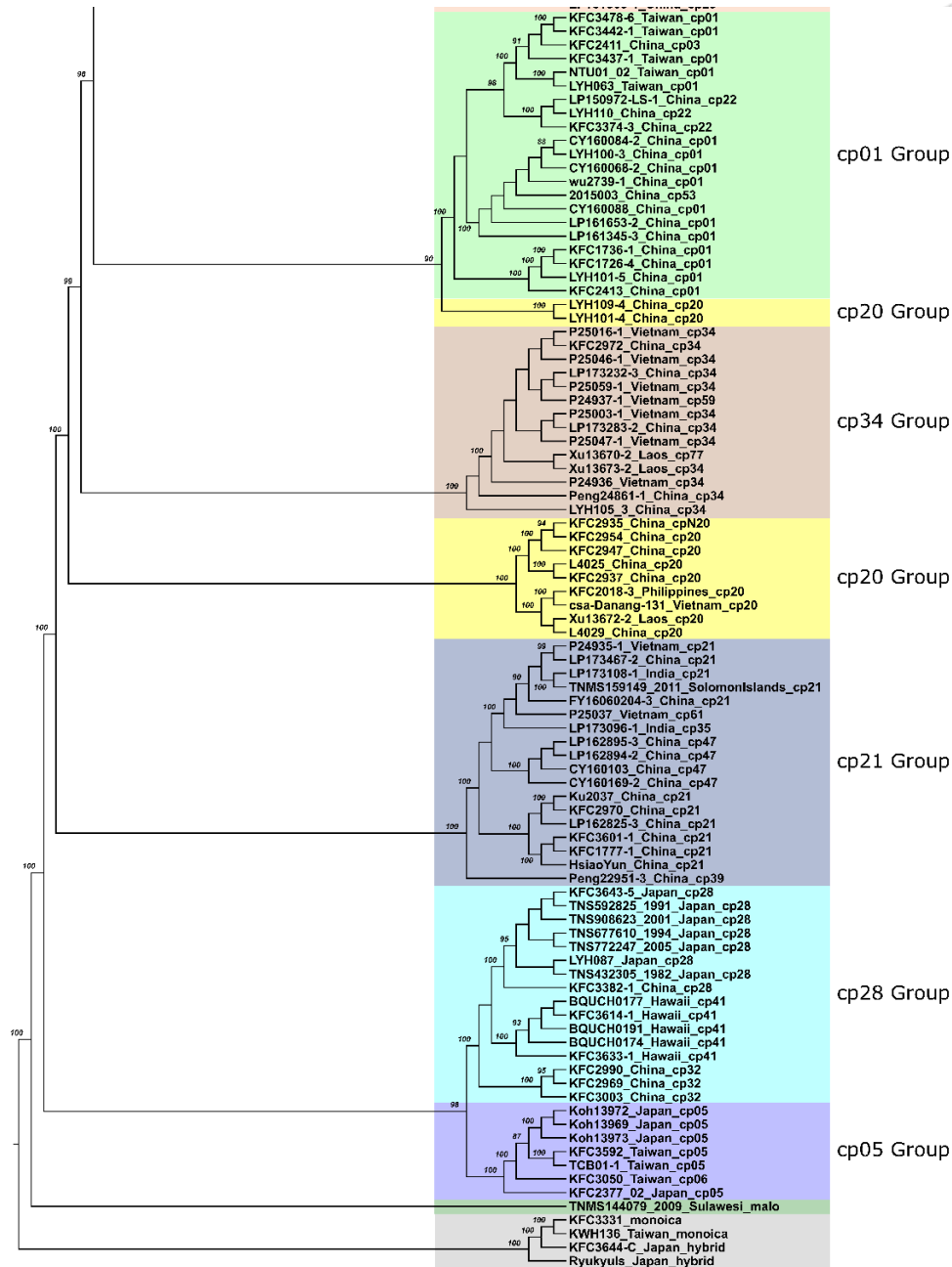
### 五、分子定年結果

以質體基因組進行分子定年結果如圖十四，可以得知印尼與臺灣個體的分歧時間約為 3,911 年前，新幾內亞的分歧時間約為 2,749 年前，遠大洋洲西部個體分歧的時間約為 2,516 年前，遠大洋洲東部個體分歧的時間約為 1,718 年前，最後是遠大洋洲北部個體的分歧時間約為 881 年前。

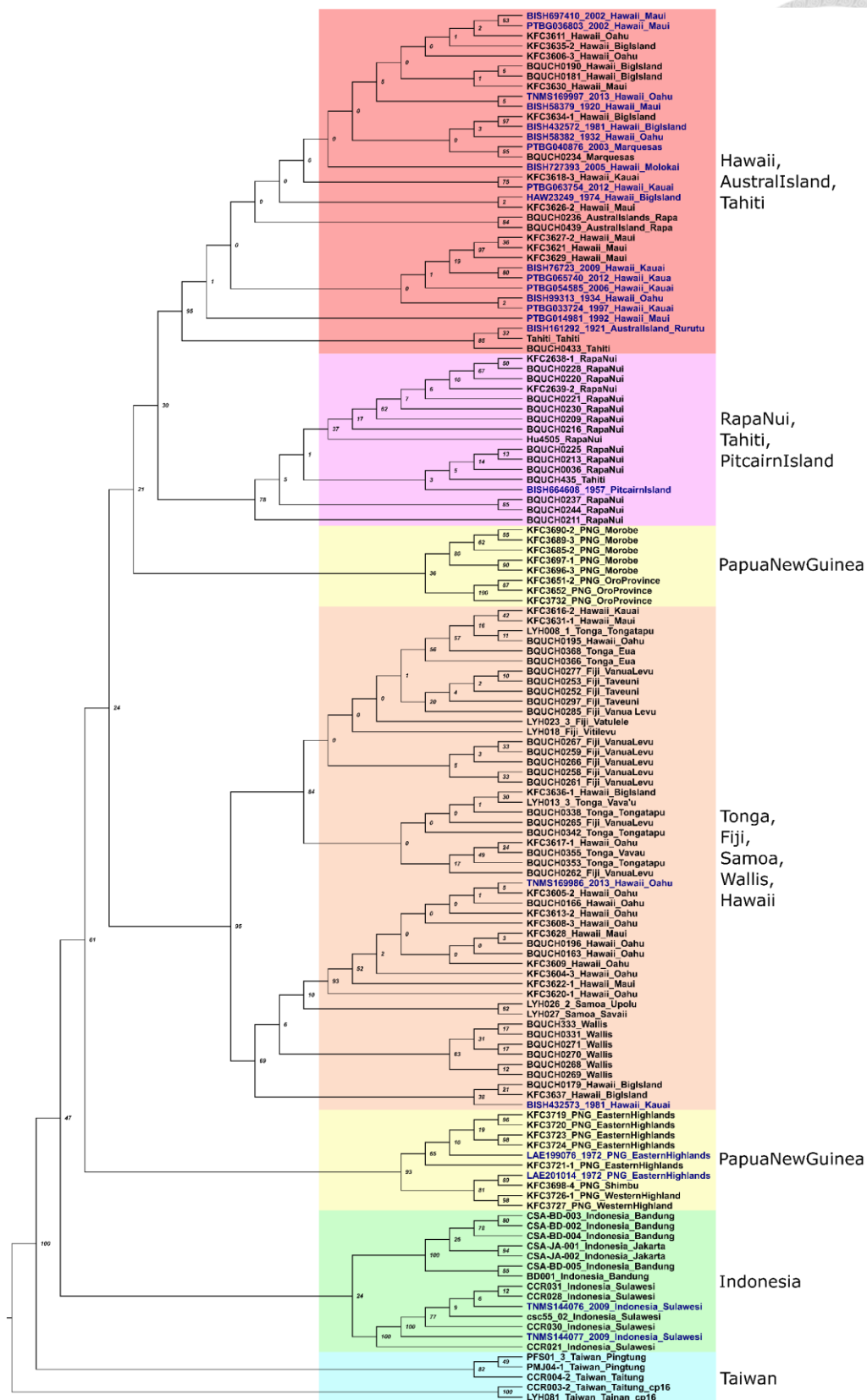


圖九、質體基因組基因單倍型網絡圖。套色參考 Chang *et al.*, 2015 基因單倍型網絡圖(圖四)。圓形大小與個體數成正比，兩基因單倍型間以括號表示相差的核苷酸數量。

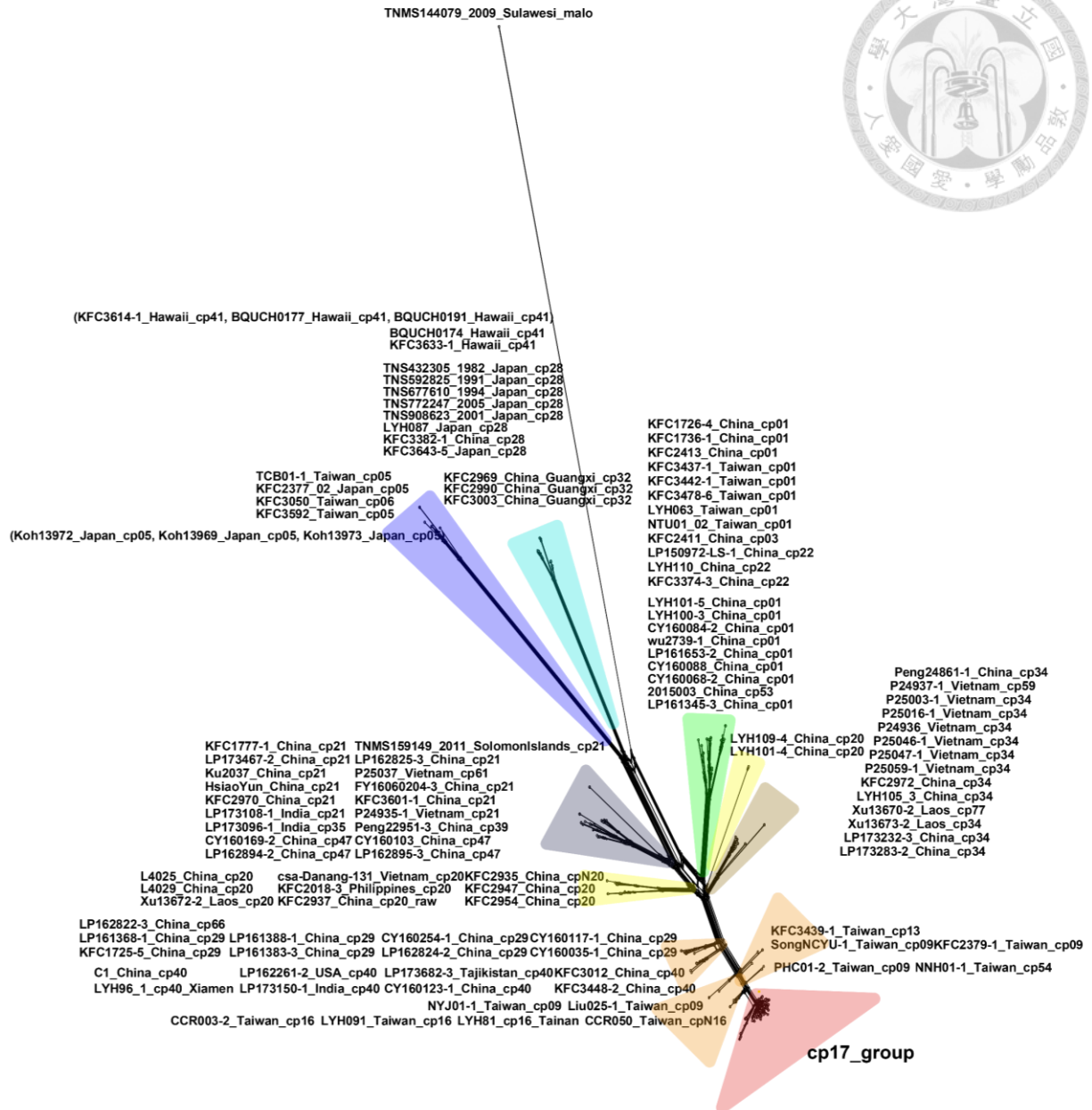




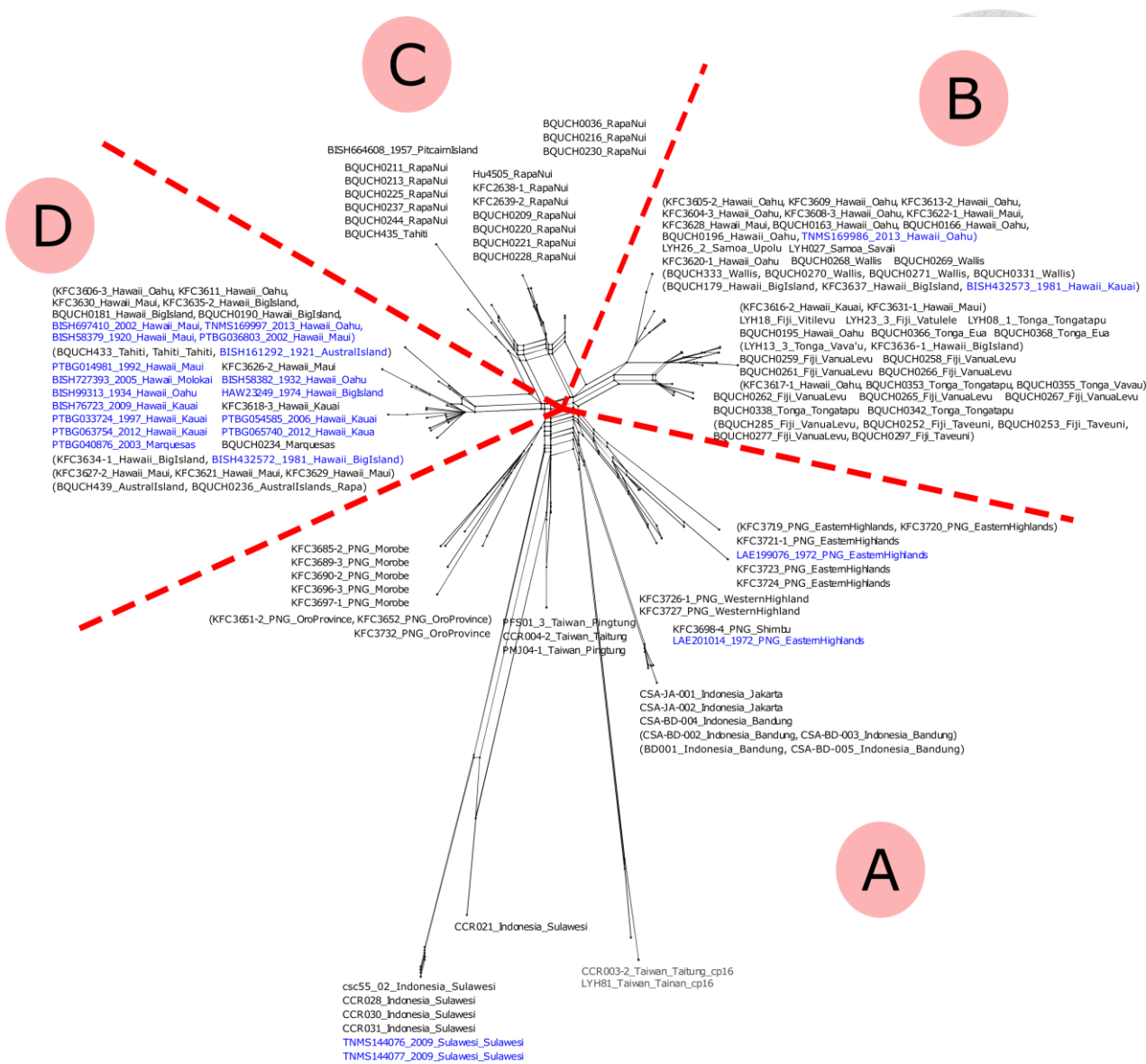
圖十、Maximum Likelihood 親緣關係樹全圖。指定小構樹與雜交構樹作為外群。色塊參考圖四之基因單倍型繪製，灰色為外群，深綠色為蘇拉威西的 malo 個體，而 cp17 群體再依照地理區域，以藍色虛線隔開。支持度僅標示大於 85。



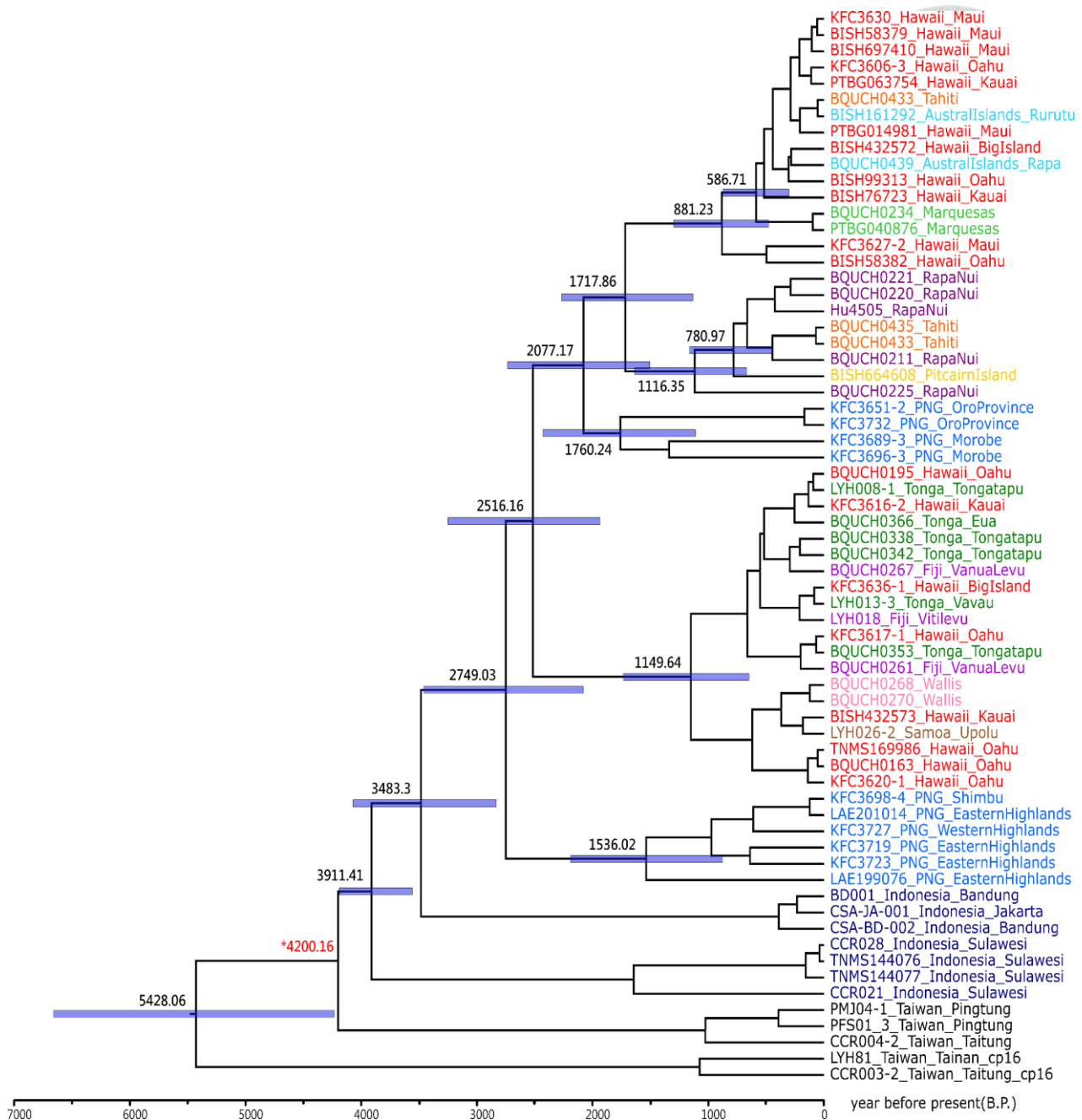
圖十一、太平洋構樹之 Maximum Likelihood 親緣關係樹。指定臺灣的 cp16 個體作為外群。以色塊區分不同地理區形成之單系群，藍色字體為標本個體。



圖十二、SplitTree 親緣關係樹全圖。色塊參考圖四之基因單倍型繪製，綠色為 cp01 群體，藍色為 cp05 群體，紅色為 cp17 群體，黃色為 cp20；深藍色為 cp21 群體，淺藍色為 cp28 群體，咖啡色為 cp34 群體，橘色為 cp09、cp13、cp16、cp40、cp54。



圖十三、太平洋構樹之 SplitTree 親緣關係樹。依照分歧程度可分為 A、B、C、D 四大群。藍色字體為標本個體。相同節點的個體以括號表示。



圖十四、分子定年結果。各節點旁標記分歧時間，藍色條帶表示 95% 最高密度事後概率區間 (95% HPD interval)。字體顏色按照地區上色，黑色為臺灣，深藍色為印尼，藍色為新幾內亞，紅色為夏威夷，棕色為薩摩亞，粉紅色為華萊士島，紫色為斐濟，綠色為東加，黃色為皮特肯群島，深紫色為復活節島，橘色為大溪地，淺綠色為馬克薩斯群島，淺藍色為南方群島。


## 肆、討論



### 一、由構樹親緣地理關係印證南島語族遷徙為農業擴張

近幾年的研究經過考古學、語言學的證據支持，可以確認南島語族的可追溯最早的原鄉為臺灣 (Bellwood, 1988; Bellwood, 2017)，但具體的遷徙路徑則因研究的材料不同，而有不同的推測。但南島語族究竟的遷徙動力究竟為何？已知遷徙前的南島語族在臺灣具有農耕技術，但南島語族是為了找尋更廣袤、可耕作的農地而遷徙 (Bellwood, 2003)，抑或是為了貿易而遷徙，始終無法定論。在構樹研究出現以前，使用南島語族攜帶出的農業包裹作為推測遷徙路徑的材料，像是豬 (Larson *et al.*, 2007)、雞 (Storey *et al.*, 2012)、麵包樹 (Zerega *et al.*, 2004)、甘藷 (Denham, 2013)等，原生地都不包含臺灣，推測並非南島語族在遷徙出臺灣時最早的農業包裹，而較可能是南島語族遷徙至各地後逐步加入農業包裹中一併被帶出原生地。也因此透過這些共生物種的研究，無法支持臺灣為南島語族的原鄉。而南島語族的共生物種中，構樹是少數原生地包含臺灣的物種之一，加上構樹為製作樹皮布的重要原料，且樹皮布在南島語族文化佔有一席之地 (Cameron, 2008; Howard, 2006)，使構樹在南島語族遷徙之初便作為農業包裹中的一員被攜帶出臺灣，最後再加上構樹在非原生地的傳播完全仰賴人為的無性繁殖 (Matthews, 1996; Seelenfreund *et al.*, 2010)，構樹親緣地理所推測的傳播路徑也吻合了南島語族的遷徙路徑 (Chang *et al.*, 2015; 李宜軒, 2018)。綜合所有條件，構樹的相關研究足以佐證為南島語族遷徙假說為出臺灣說，證實臺灣為南島語族最早的原鄉，而構樹持續被南島語族種植至今日，顯示南島語族遷徙至太平洋各島嶼時，仍舊有農業行為，可以做為支持農業/語言擴張假說的證據。

## 二、構樹在印尼的親緣關係



由圖十可以看見印尼的構樹一共分為三群，分別是離外群最近的蘇拉威西 malo 個體、與臺灣個體關係接近的蘇拉威西、爪哇島個體。蘇拉威西與爪哇島分為兩個群體，但兩地的個體不為單系群，推測可能是南島語族先遷徙至蘇拉威西後，分別朝著東西兩邊遷徙，造成此一結果。同時兩座島嶼上的構樹在傳播至當地後，很可能就沒有基因交流，使兩地族群分隔明顯。但在圖十中蘇拉威西與爪哇島又成為了單系群，可見兩座島嶼之間的分化時間尚短，不足以累積高度變異，因此兩者間的親緣關係並不穩定。而蘇拉威西的 malo 個體，在當地被稱為“malo”（圖十五），並被當地居民認為是與構樹不同種的存在。依據張至善(2016)的描述，與筆者 2019 年時親自前往印尼蘇拉威西當地的田野經驗，malo 與構樹在分類特徵上非常相似，不易區分，需要仔細觀察才能看見細微差異。構樹葉序互生、葉形多有開裂、葉片較小，而 malo 葉序幾近對生、葉形幾乎無開裂、葉片較大，甚至可以大於一張 A4 紙，筆者在臺灣也從未見過葉片如 malo 一般大小之構樹。當地樹皮布工作者表示以構樹製成的樹皮布品質最佳，而 malo 製成的樹皮布則次之，malo 的成品顏色較偏向米黃色，質地略硬，且纖維分布較不均勻。而構樹的成品顏色較白，質地較柔軟，用途較多廣。同時受訪者也都表示，構樹幾乎都是自家祖輩便開始種植，不然就是確切知道是由其他製作樹皮布的工坊中取得走莖後，在自家庭院或是工作坊附近種植，在野外從來不曾看見構樹蹤跡。然而 malo 卻是從叢林當中取得，甚至在 Tuare 的受訪者表示，在當地的山林裡有一大片野生的 malo。再者，蘇拉威西當地的構樹從未見過任何的花或是果，而 malo 則是只見果不見花。筆者在當地田野調查時，有幸看見受訪者口中 malo 的果實，外觀與構樹的雄花序一模一樣，才發現受訪者因為缺乏相關知識，而誤將雄花序認作是果實。但這一發現，使得 malo 的定位更加模糊，再加上在圖十與圖十二中可以看見 malo 與其他構樹都相差甚遠。於是再更進一步將

malo 的 *ndhF* 基因萃取出來，與桑科植物一同進行分析，發現 malo 與構樹為單系群，且與構樹屬中其他物種親緣關係較遠，因此推測 malo 與構樹應為同一物種，但來源為何、為什麼與其他構樹在質體基因組上有如此巨大的變異，仍舊是無法釐清的問題。



圖十五、印尼蘇拉威西的 malo 照片。左上角為 malo 的樹幹，右上角為 malo 的雄花序，下方為矗立在稻田間、開著雄花的 malo。照片由黃郁嵐於印尼中蘇拉威西 Tuare 拍攝。

### 三、巴布亞新幾內亞與索羅門群島構樹的親緣關係

索羅門群島個體的基因單倍型為 cp21(圖十一)，與印度的 cp21 個體為單系群(圖十一)，對比其歷史背景，所羅門群島的構樹可能為近代引入，但 cp21 大多數都分布在中國或是中南半島北方與中國接壤處，推測從印度引入的機率較低。在巴布亞新幾內亞的構樹亦有與印尼相似的情形，分成了三個不同的單系群，分群與地理分布相關，顯示巴布亞新幾內亞不同地理區的構樹基因交流少，彼此間已有所區隔。

### 四、遠太平洋群島構樹的親緣關係與夏威夷構樹的多次引入歷史

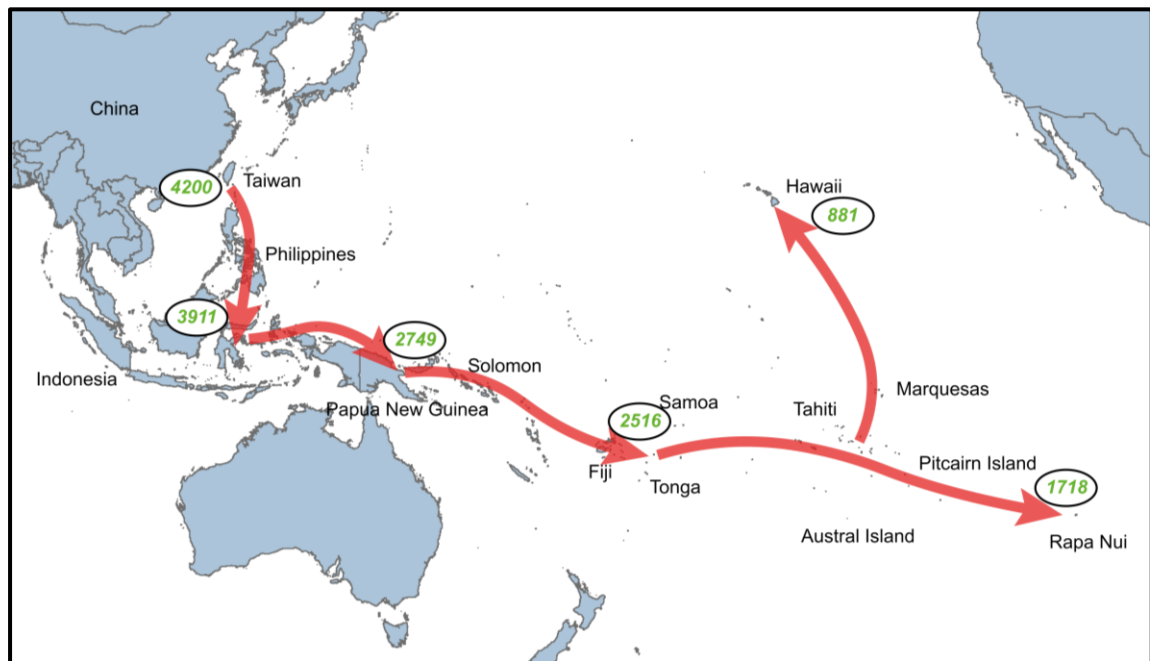
在親緣關係樹(圖十一)中，遠太平洋群島的個體可分為三大單系群，紅色單系群以夏威夷為主，且有約一半是標本個體，含有零星遠大洋洲中部的大溪地與馬克薩斯群島的個體。紫色單系群由遠大洋洲東部的復活節島與中部的大溪地與皮特肯群島所組成。橘色單系群包含了遠大洋洲西部的東加、斐濟、薩摩亞等地，與一部分的夏威夷個體。根據文獻記載，夏威夷有著多次的引入歷史 (Meilleur *et al.*, 1997)。第一次為南島語族遷徙至夏威夷時 (Meilleur *et al.*, 1997)，將構樹引入當地種植，並將其作為製作樹皮布的原料，此次引入的構樹族群可對應至紅色單系群。第二次為張至善(2016)推測可能由日本或中國所引入夏威夷的 cp41 個體，但缺乏明確的文獻記載，此一部分的構樹族群可對應至圖十的 cp28 群體。依據李宜軒(2018)的分析，夏威夷 cp41 與中國的 cp32 親緣關係接近，而夏威夷 cp41 的個體與日本 cp28 個體親緣關係較遠，因此推測夏威夷 cp41 是來自中國廣西地區。而在本研究親緣關係分析當中，得到了不同的結果，在圖九中可以看見夏威夷 cp41 與日本 cp28 都是由中國 cp32 延伸而來，且夏威夷 cp41 與中國 cp32 的距離較為接近。夏威夷 cp41 與日本 cp28 的親緣關係較中國 cp32 接近(圖

十),同時與日本 cp28 最接近的個體並非中國廣西的 cp32,而是中國浙江的 cp28。日本 cp28 與中國浙江 cp28 為單系群,並與夏威夷 cp41 為姊妹群,最近源為中國廣西 cp32。這樣不盡相同的分析結果,很可能是因為質體基因組為母系遺傳,而 RADseq 的資料帶有核基因,可以同時呈現父系與母系遺傳資訊,使得兩筆資料在親緣關係分析上會有所不同。再加上在原生地的取樣中並沒有取樣到 cp41,所以不論是以哪筆資料分析親緣關係,都無法輕易斷定夏威夷 cp41 的來源地,只能綜合兩個研究結果推測很可能是來自中國。但若是擴大取樣,能取樣到 cp41 或是關鍵的基因單倍型,就更能夠肯定夏威夷 cp41 與日本 cp28 的來源地。夏威夷的第三次的引入歷史為 1970 年代,夏威夷開始文化復振時,由鄰近、仍有製作樹皮布的島嶼,東加、斐濟與薩摩亞重新引入構樹來製作樹皮布 (Tanahy, 2008)。此部分引入的構樹族群與橘色單系群的結果吻合,夏威夷、東加、斐濟與薩摩亞的親緣關係接近。而以標本個體作為標準品,也可以輔助判斷夏威夷 cp17 個體是南島語族遷徙而帶入夏威夷,或是近代由東加、斐濟與薩摩亞等地引入的。在橘色單系群中只有兩個夏威夷標本材料,採集年代分別為 1981 年與 2013 年,都不早於 1970 年代,推測該標本採集的構樹個體為當時重新引入的構樹族群。而在紅色單系群中有近一半的個體為標本,且包含採集時間早於 1970 年代的個體,分別是在 1920、1921、1932 與 1934 年採集,因此可以推測紅色單系群中新鮮採集的個體為夏威夷最早引入的構樹。

##### 五、分子定年結果與南島語族推測遷徙時間


根據溯祖理論 (coalescent theory)(Kingman, 1982)可藉由演化樹尋找最近源的共同祖先,也就是說,在太平洋構樹的親緣關係樹上,越先分歧出支序者為構樹越先分布之處。根據圖十四可以得知,先分歧出支序的為印尼的個體,時間大約為 3,911 年前,接著是新幾內亞的分歧時間約為 2,749 年前,再來是遠太平洋

群島西部的東加、斐濟與薩摩亞等地，分歧時間大約為 2,516 年前，接著分別是遠大洋洲中部的皮特肯群島、大溪地及東部的復活節島，時間約為 1,718 年前，還有馬克薩斯群島與夏威夷等地的分歧時間約為 881 年前。這些分歧的時間點也代表著構樹到達該島嶼的時間點(圖十六)，而構樹在當時是由南島語族遷徙所帶出臺灣，因此構樹傳播至當地的時間也代表著南島語族到達當地的時間點。而藉由構樹分子定年的結果所推測出的時間軸，結果與 Bellwood (1988; 2017) 所提出的出臺灣說中南島語族遷徙的時間軸相當接近。



圖十六、太平洋構樹傳播示意圖。紅色箭頭表示構樹傳播方向。綠色數字為傳播推測時間點，時間標註依據圖十四，單位：年前。

## 伍、 結論



本研究與 Chang *et al.* (2015)、李宜軒(2018) 的研究相吻合，太平洋群島的構樹為自臺灣攜出，經過蘇拉威西後，傳至巴布亞新幾內亞、所羅門群島，再至東加、斐濟與薩摩亞等群島，最後到達最北端的夏威夷與最東端的復活節島。同時因為構樹為人為無性扦插繁殖，太平洋群島所有個體變異極小，應為體細胞突變累積形成。透過構樹質體基因組，可獲得較多變異位點，得到較高演化解析度，從以推論構樹被攜出臺灣後的傳播路徑，最後利用分子定年推論構樹傳播的時間。再次證實所有太平洋構樹皆來自臺灣，而太平洋構樹為南島語族在四千多年前從台灣所攜出，因此可佐證南島語族最早可追溯的原鄉為臺灣。而重建構樹傳播至太平洋群的路徑，也與語言學及考古學所提出的南島語族遷徙假說—出臺灣說相互呼應，因此藉由構樹的親緣地理學研究，可以再次印證出臺灣說。再加上以考古學推論出臺灣的時間為基準點，進行構樹質體基因組的分子定年，推算出構樹到達太平洋群島的時間軸也與考古學推論的時間軸相當接近，顯示太平洋構樹為南島語族遷徙時所傳播至當地。而構樹做為農業包裹的一員，並且在被攜帶出臺灣後持續有被種植，顯示南島語族在遷徙過程中仍舊從事農耕，並保有自己的物質文化，可以作為支持南島語族遷徙動力為農業/語言擴張假說的證據。

然而本研究所使用的分子定年基準點，是建立在太平洋構樹為南島語族所傳播的基礎下，因此所推測出的時間軸也容易接近考古學及語言學所推論的時間軸。因此仍需要再次以其他確切的考古證據，如太平洋構樹的化石等，作為基準點，再往回推測臺灣 cp17 個體與太平洋個體分歧的時間點，將兩個以不同基準點所推測得出的時間軸相互比對，才能更加確認構樹在太平洋地區的傳播時間軸。再加上構樹傳播至太平洋島嶼的時間應不超過五千年，依賴體變異所能累積的變異量有限，使得親緣關係樹的研究結果，無法獲得高支持度，也無法針對太平洋構樹的親緣關係進行確切的解析。即使本研究仍有許多細部問題尚未解決，但以母

系遺傳的質體基因組序列，仍是強而有力的分子證據，能夠解析太平洋構樹的親緣關係。在未來的相關研究中，也希望能開發出單一分子標記，提供夏威夷樹皮布製作者，鑑別其所使用的構樹是否為夏威夷最古老、最傳統的構樹，使文化復振後從事樹皮布製作的人們，對於其所使用的構樹是否為當地傳統構樹有所依據。

## 陸、 參考文獻

張至善，2012。談樹皮布與構樹。林業研究專訊，19, 62-66。

張至善，2016。樹皮布文化與太平洋構樹親緣地理研究。國立東華大學自然資源與環境學系學位論文。

李宜軒，2018。以限制酶位點標定之核酸定序法檢視太平洋構樹之親緣地理。國立臺灣大學森林環境暨資源學系學位論文。

Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS One*, 3(10), 7. doi:10.1371/journal.pone.0003376

Bellwood, P. (1988). A hypothesis for Austronesian origins. *Asian Perspectives*, 26 (1), 107-117.

Bellwood, P., Fox, J.J. and Tryon, D. (1995). The Austronesians in history: Common origins and diverse transformations. In *The Austronesians: historical and comparative perspectives*. P. Bellwood, J.J. Fox and D. Tryon (eds.), Australian National University Press, Canberra, pp. 1-16.

Bellwood, P. and Renfrew, C. (2003). 'Farmers, foragers, languages, genes: the genesis of agricultural societies', in P. Bellwood and C. Renfrew (eds) *Examining the Farming/ Language Dispersal Hypothesis*, pp. 17–28, Cambridge: McDonald Institute for Archaeological Research.

Bellwood, P., Chambers, G., Ross, M. and Hung, H.C. (2011). Are “cultures” inherited? Multidisciplinary perspectives on the origins and migrations of Austronesian-speaking peoples prior to 1000 BC. In *Investigating Archaeological Cultures: Material Culture, Variability, and Transmission*. B.W. Roberts and M.V. Linden (eds.), Springer Science and Business Media, New York, pp. 321-354.

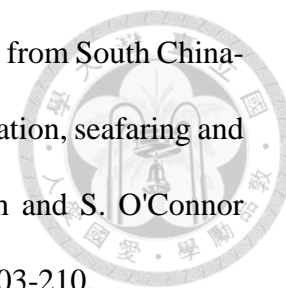
Bellwood, P. (2017). *First Islanders: Prehistory and Human Migration in Island Southeast Asia*. Oxford: John Wiley and Sons.

Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170

Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchene, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kuhnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F. K., Muller, N. F., Ogilvie, H. A., du Plessis, L., Poppinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., Suchard, M. A., Wu, C. H., Xie, D., Zhang, C., Stadler, T., Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *Plos Computational Biology*, 15(4), 28. doi:10.1371/journal.pcbi.1006650

Blust R. (1984). The Austronesian homeland: a linguistic perspective. *Asian Perspectives*, 26(1), 45-67

Cameron, J. (2008). Trans-oceanic transfer of bark-cloth technology from South China-Southeast Asia to Mesoamerica? In *Islands of inquiry: colonisation, seafaring and the archaeology of maritime landscapes*. G. Clark, F. Leach and S. O'Connor (eds.), Australian National University ePress, Bangkok, pp. 203-210.



Chang, C.S., Liu, H.L., Moncada, X., Seelenfreund, A., Seelenfreund, D., Chung, K.F. (2015). A holistic picture of Austronesian migrations revealed by phylogeography of Pacific paper mulberry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), 13537-13542. doi:10.1073/pnas.1503205112

Chung, K. F., Kuo, W. H., Hsu, Y. H., Li, Y. H., Rubite, R. R., Xu, W. B. (2017). Molecular recircumscription of *Broussonetia* (Moraceae) and the identity and taxonomic status of *B. kaempferi* var. *australis*. *Botanical Studies*, 58, 12. doi:10.1186/s40529-017-0165-y

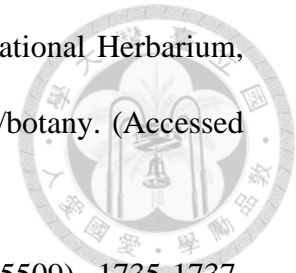
Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657-1659. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x

Denham, T. (2013). Ancient and historic dispersals of sweet potato in Oceania. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), 1982-1983. doi:10.1073/pnas.1221569110

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

Emerson, K. J., Merz, C. R., Catchen, J. M., Hohenlohe, P. A., Cresko, W. A., Bradshaw, W. E., Holzapfel, C. M. (2010). Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16196-16200. doi:10.1073/pnas.1006538107

Funk, V. (2004). 100 uses for an herbarium (well at least 72). National Herbarium, Smithsonian Institution. <https://naturalhistory.si.edu/research/botany>. (Accessed in November 16, 2020.)



Gibbons, A. (2001). The Peopling of the Pacific. *Science*, 291(5509), 1735-1737. doi:10.1126/science.291.5509.1735

Gilbert, M. T., Bandelt, H. J., Hofreiter, M., and Barnes, I. (2005). Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(10), 541-544. doi:10.1016/j.tree.2005.07.005

Gray, R. D., Drummond, A. J., Greenhill, S. J. (2009). Language Phylogenies Reveal Expansion Pulses and Pauses in Pacific Settlement. *Science*, 323(5913), 479-483. doi:10.1126/science.1166858

Green, R.C. (1991). The Lapita cultural complex: current evidence and proposed models. *Bulletin of the Indo-Pacific Prehistory Association*, 11, 295-305.

Green, R.C. (1991). Near and remote oceania: disestablishing "Melanesia" culture history. In *Man and a Half: Essays in Pacific Anthropology and Ethnobiology in Honour of Ralph Bulmer*. A. Pawley (ed.), The Polynesian Society, Auckland, pp. 491-502.

Green, R. C., Jones, M., Sheppard, P. (2008). The reconstructed environment and absolute dating of SE-SZ-8 Lapita site on Nendo, Santa Cruz, Solomon Islands. *Archaeology in Oceania*, 43(2), 49-61. doi:10.1002/j.1834-4453.2008.tb00030.x

Greiner, S., Lehwark, P., & Bock, R. (2019). OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W59-W64.

doi:10.1093/nar/gkz238

Hart, M. L., Forrest, L. L., Nicholls, J. A., Kidner, C. A. (2016). Retrieval of hundreds of nuclear loci from herbarium specimens. *Taxon*, 65(5), 1081-1092.

doi:10.12705/655.9

Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Etter, P. D., Stiffler, N., Johnson, E. A., Cresko, W. A. (2010). Population Genomics of Parallel Adaptation in Threespine Stickleback using Sequenced RAD Tags. *Plos Genetics*, 6(2), 23.

doi:10.1371/journal.pgen.1000862

Howard, M.C. (2006). Bark-cloth in South East Asia. White Lotus Co.: Bangkok.

Huson, D. H., Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254-267.

doi:10.1093/molbev/msj030

Jin, J. J., Yu, W. B., Yang, J. B., Song, Y., dePamphilis, C. W., Yi, T. S., Li, D. Z. (2020). GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. *Genome Biology*, 21(1), 31. doi:10.1186/s13059-020-02154-5

02154-5

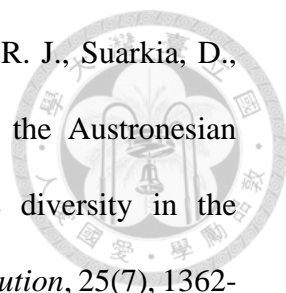
Jonsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L. F., Orlando, L. (2013). mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics*, 29(13), 1682-1684.

doi:10.1093/bioinformatics/btt193

Kaeppler, A. L. (1980). Kapa: Hawaiian bark cloth. Boom Books. Hilo Bay, Hawaii.

Kayser, M. (2010). The Human Genetic History of Oceania: Near and Remote Views of Dispersal. *Current Biology*, 20(4), R194-R201.

doi:10.1016/j.cub.2009.12.004

- 
- Kayser, M., Choi, Y., van Oven, M., Mona, S., Brauer, S., Trent, R. J., Suarkia, D., Schiefenhovel, W. Stoneking, M. (2008). The impact of the Austronesian expansion: Evidence from mtDNA and Y chromosome diversity in the Admiralty Islands of Melanesia. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1362-1374. doi:10.1093/molbev/msn078
- Kingman J.F.C. (1982). The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*, 13(3): 235-248. Doi:10.1016/0304-4149(82)90011-4.
- Kirch, P. V. (2010). Peopling of the Pacific: A Holistic Anthropological Perspective. In D. Brenneis P. T. Ellison (Eds.), *Annual Review of Anthropology*, 39:131-148. Palo Alto: Annual Reviews.
- Larson, G., Cucchi, T., Fujita, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Anderson, A., Rolett, B., Spriggs, M., Dolman, G., Kim, T. H., Thuy, N. T. D., Randi, E., Doherty, M., Due, R. A., Bollt, R., Djubiantono, T., Griffin, B., Intoh, M., Keane, E., Kirch, P., Li, K. T., Morwood, M., Pedrina, L. M., Piper, P. J., Rabett, R. J., Shooter, P., Van den Bergh, G., West, E., Wickler, S., Yuan, J., Cooper, A., Dobney, K. (2007). Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in island southeast Asia and Oceania. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 4834-4839. doi:10.1073/pnas.0607753104
- Leigh, J. W., and Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116. doi:10.1111/2041-210x.12410
- Liao, J.C. (1996). Moraceae. *Flora of Taiwan*. Editorial Committee of the Flora of Taiwan: Taipei, 140-143 p.

Matisoo-Smith, E. (2007). *The peopling of Oceania*. Cambridge University Press: New York.

Matthews, P.J. (1996). Ethnobotany, and the origins of *Broussonetia papyrifera* in Polynesia: An essay on tapa prehistory. In *Oceanic culture history: Essays in honour of Roger Green*. J.M. Davidson, G.J. Irwin, B.F. Leach, A. Pawley and D. Brown (eds.), *New Zealand Journal of Archaeology Special Publication*, Dunedin North, pp. 117-132.

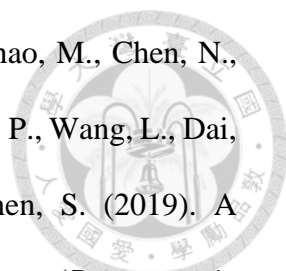
Meilleur, B. A., Maigret, M. and Manshardt, R. (1997). *Hala and Wauke in Hawaii*. Vol. 7. Bishop Museum Press.

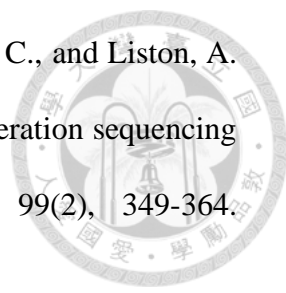
Miller, M.A., Pfeiffer, W. Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 gateway computing environments workshop (GCE)*. pp. 1–8.

Odo, F. and Sinoto, K. (1985). *A Pictorial History of Japanese in Hawaii, 1885-1924*. Bishop Museum Press, Honolulu, HI.

Payacan, C., Moncada, X., Rojas, G., Clarke, A., Chung, K. F., Allaby, R., Seelenfreund, D., Seelenfreund, A. (2017). Phylogeography of herbarium specimens of asexually propagated paper mulberry *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Her. ex Vent. (Moraceae) reveals genetic diversity across the Pacific. *Annals of Botany*, 120(3), 387-404. doi:10.1093/aob/mcx062

Penailillo, J., Olivares, G., Moncada, X., Payacan, C., Chang, C. S., Chung, K. F., Matthews, P. J., Seelenfreund, A., Seelenfreund, D. (2016). Sex Distribution of Paper Mulberry (*Broussonetia papyrifera*) in the Pacific. *PLoS One*, 11(8), e0161148. doi:10.1371/journal.pone.0161148

- 
- Peng, X., Liu, H., Chen, P., Tang, F., Hu, Y., Wang, F., Pi, Z., Zhao, M., Chen, N., Chen, H., Zhang, X., Yan, X., Liu, M., Fu, X., Zhao, G., Yao, P., Wang, L., Dai, H., Li, X., Xiong, W., Xu, W., Zheng, H., Yu, H., Shen, S. (2019). A Chromosome-Scale Genome Assembly of Paper Mulberry (*Broussonetia papyrifera*) Provides New Insights into Its Forage and Papermaking Usage. *Molecular Plant*, 12(5), 661-677. doi:10.1016/j.molp.2019.01.021
- Sarkinen, T., Staats, M., Richardson, J. E., Cowan, R. S., Bakker, F. T. (2012). How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens. *PLoS One*, 7(8), e43808. doi:10.1371/journal.pone.0043808
- Seelenfreund, D., Clarke, A. C., Oyanedel, N., Pina, R., Lobos, S., Matisoo-Smith, E. A., Seelenfreund, A. (2010). Paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) as a commensal model for human mobility in Oceania: anthropological, botanical and genetic considerations. *New Zealand Journal of Botany*, 48(3-4), 231-247. doi:10.1080/0028825x.2010.520323
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033
- Storey, A. A., Athens, J. S., Bryant, D., Carson, M., Emery, K., deFrance, S., Higham, C., Huynen, L., Intoh, M., Jones, S., Kirch, P. V., Ladefoged, T., McCoy, P., Morales-Muniz, A., Quiroz, D., Reitz, E., Robins, J., Walter, R., Matisoo-Smith, E. (2012). Investigating the Global Dispersal of Chickens in Prehistory Using Ancient Mitochondrial DNA Signatures. *PLoS One*, 7(7), 11. doi:10.1371/journal.pone.0039171

- 
- Straub, S. C. K., Parks, M., Weitemier, K., Fishbein, M., Cronn, R. C., and Liston, A. (2012). Navigating the tip of the genomic iceberg: next-generation sequencing for plant systematics. *American Journal of Botany*, 99(2), 349-364. doi:10.3732/ajb.1100335
- Tanahy, D. (2008). Modern Hawaiian kapa History. <http://www.kapahawaii.com/about-hawaiian-tapa.html>. (Accessed in November 16, 2020.)
- Thiers, B. 2020. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>. (Accessed in November 24, 2020.)
- Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J., Holt, K. E. (2015). Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics*, 31(20), 3350–3352. doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383
- Yang, Z. H. (1996). Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. *Journal of Molecular Evolution*, 42(5), 587-596. doi:10.1007/bf02352289
- Zhou, Z. and Gilbert, M.G. 2003. Moraceae. *Flora of China*. Z.Y. Wu, P.H. Raven and D.Y. Hong (eds.), Science Press and Missouri Botanical Garden Press, Beijing.
- Zeng, C. X., Hollingsworth, P. M., Yang, J., He, Z. S., Zhang, Z. R., Li, D. Z., Yang, J. B. (2018). Genome skimming herbarium specimens for DNA barcoding and phylogenomics. *Plant Methods*, 14, 14. doi:10.1186/s13007-018-0300-0
- Zerega, N. J. C., Ragone, D., Motley, T. J. (2004). Complex origins of breadfruit (*Artocarpus altilis*, Moraceae): Implications for human migrations in Oceania. *American Journal of Botany*, 91(5), 760-766. doi:10.3732/ajb.91.5.760

## 附錄、構樹採集資訊一覽表



各個體標本採集號、採集地點、採集年份、*ndhF-rpl32* 基因型、經緯度資訊、定序種類。表格由上至下依序以國家、地區、採集號排列，字母由A至Z，數字由小至大。Type 表示簡化基因組方法，GS，基因略讀法；B，標靶基因獲取。

AccessionNumber	Date	Country	HigherGeography	Locality	Latitude	Longitude	Type	Haplotype
KFC3331							GS	monoica
KWH136		Taiwan	Chiayi	Fengshan	23.586403	120.759678	B	monoica
KFC3644-C	2018	Japan	Prefecture Miyagk	Shiroishi	38°00'50.4"N	140°37'37.7"E	B	hybrid
RyukyuIs		Japan	Ryukyu Island				B	hybrid
BQUCH0236	2013	Austral Islands	Rapa		-27.617958	-144.335304	B	cp17
BQUCH439	2014	Austral Islands	Rapa		-27.618891	-144.335815	GS	cp17
BISH161292	1921	Austral Islands	Rurutu, Vaiaiea Unaa		22°28'45.8"S	151°20'19.0"W	B	cp17
Hu4505	2019	Chile	Rapa Nui	Ahu Vinpau	27°08'51.3"S	109°25'42.3"W	B	cp17
BQUCH0225	2012	Chile	Rapa Nui	Hanga Oteo	-27.057963	-109.375693	B	cp17
BQUCH0220	2012	Chile	Rapa Nui	Invernadero CONAF Mataveri	-27.164471	-109.439113	B	cp49
BQUCH0237	2013	Chile	Rapa Nui	Maria Atan Pakarati's garden	-27.145404	-109.426246	B	cp17
BQUCH0244	2013	Chile	Rapa Nui	Maria Atan Pakarati's garden	-27.145404	-109.426246	B	cp17
BQUCH0209	2012	Chile	Rapa Nui	Putoki Toki	-27.094100	-109.310315	B	cp49
BQUCH0228	2012	Chile	Rapa Nui	Roiho	-27.114353	-109.403226	B	cp49
KFC2638-1	2014	Chile	Rapa Nui	Sector Ana Te Pahu	27°07'02.4"S	109°24'09.0"W	B	cp49
KFC2639-2	2014	Chile	Rapa Nui	Tia Berta, Atamu Tekena	27°09'06.9"S	109°25'50.9"W	B	cp49

BQUCH0230	2012	Chile	Rapa Nui		-27.111946	-109.405389°	B	cp49
BQUCH0216	2012	Chile	Rapa Nui	Vai Tara Kai Ua	-27.063112	-109.349697	B	cp17
BQUCH036		Chile	Rapa Nui		-27.12322	-109.42089	GS	cp51
BQUCH0211	2012	Chile	Rapa Nui		-27.123224	-109.420892	B	cp17
BQUCH0213	2012	Chile	Rapa Nui		-27.133846	-109.297944	B	cp17
BQUCH221	2012	Chile	Rapa Nui		-27.1812284	-109.4362657	GS	cp49
LP161653-2	2016	China	Anhui		31.839188	117.176222	B	cp01
wu2739-1	2017	China	Anhui		32.288764	118.287411	B	cp01
KFC3012	2015	China	Beijing		25°12'59.39"N	110°35'10.12"E	B	cp40
KFC3448-2		China	Beijing	Haidian	39.9863	116.3006	B	cp40
KFC2411		China	Fujian	Fuzhou	26.0873	119.2291	B	cp03
KFC2413		China	Fujian	Fuzhou	26.0873	119.2291	GS	cp01
KFC1725-5		China	Fujian	Longyan	26.6835	118.1846	B	cp29
KFC1726-4		China	Fujian	Longyan	25.4537	116.6705	B	cp01
LYH105-3		China	Fujian	Quanzhou	24.9146	118.5798	GS	cp34
LYH109-4		China	Fujian	Quanzhou	24.8784	118.5781	B	cp20
LYH110		China	Fujian	Xiamen	24.4455	118.0986	B	cp22
LYH100-3		China	Fujian	Zhangzhou	24.4773	117.7351	B	cp01
LYH101-4		China	Fujian	Zhangzhou	24.5174	117.6269	B	cp20
LYH101-5		China	Fujian	Zhangzhou	24.5174	117.6269	B	cp01
HsiaoYun		China	Guangdong	Sun Yat-sen University	23°06'04.3"N	113°18'13.4"E	B	cp21
KFC1736-1		China	Guangdong	Huizhou	23.1789	113.9756	B	cp01
KFC1777-1		China	Guangdong	Zhongshan	22.4464	113.5255	B	cp21
KFC2969	2015	China	Guangxi		24°26'38"N	110°19'49"E	B	cp32

KFC2970	2015	China	Guangxi		24°31'34"N	109°4'19"E	B	cp21
KFC2972	2015	China	Guangxi		24°20'15"N	107°54'30"E	B	cp34
KFC2990	2015	China	Guangxi		25°2'24"N	110°11'59"E	GS	cp32
KFC3003	2015	China	Guangxi		25°12'59"N	110°35'10"E	B	cp32
Ku2037	2008	China	Guangxi		23°45'43"N	108°53'15"E	B	cp21
L4025	2009	China	Guangxi		24°41'56"N	108°20'10"E	B	cp20
L4029	2009	China	Guangxi		25°8'51"N	108°2'46"E	B	cp20
Peng22951-3		China	Guangxi	Chongzuo	22.4238	106.6433	B	cp39
Peng24861-1		China	Guangxi	Duan	23.9348	108.0246	B	cp34
LP173467-2	2017	China	Guizhou		25.135927	104.956768	B	cp21
C1		China	Henan	Jiaozuo	35.4758	113.3361	B	cp40
CY160169-2	2016	China	Henan		33.939748	111.70667	B	cp47
KFC3601-1	2017	China	Hongkong		22.271472	114.148667	B	cp21
LP161368-1	2016	China	Hubei		32.227995	113.284332	B	cp29
LP161383-3	2016	China	Hubei		31.323567	113.541752	B	cp29
LP161388-1	2016	China	Hubei		30.505818	114.436571	B	cp29
LP162822-3	2016	China	Hubei		30.737011	111.306854	B	cp66
LP162824-2	2016	China	Hubei		32.058691	112.147673	B	cp29
LP162825-3	2016	China	Hubei		31.79038	113.41166	B	cp21
KFC2935	2015	China	Hunan		24°53'29"N	111°42'38"E	B	cpN20
KFC2937	2015	China	Hunan		25°29'42"N	111°24'43"E	B	cp20
KFC2947	2015	China	Hunan		25°34'60"N	111°28'23"E	B	cp20
KFC2954	2015	China	Hunan		25°57'32"N	111°33'52"E	B	cp20
2015003		China	Jiangsu	Nanjing	32.0814	118.8205	B	cp53

CY160068-2	2016	China	Jiangsu		34.770779	119.452811	B	cp01
CY160084-2	2016	China	Jiangsu		34.770779	119.452811	B	cp01
CY160103		China	Jiangsu	Lianyungang	34.572	118.7713	B	cp47
LP161345-3	2016	China	Jiangsu		31.352024	119.034496	B	cp01
CY160254-1	2016	China	Jiangxi		28.791771	115.757432	B	cp29
LP162894-2	2016	China	Shaanxi		33.933376	107.740101	B	cp47
LP162895-3	2016	China	Shaanxi		33.212988	106.981619	B	cp47
CY160035-1		China	Shandong	Taian	35.7395	117.4912	B	cp29
CY160123-1		China	Shandong	Linyi	35.5445	117.967	B	cp40
FY16060204-3	2016	China	Sichuan		30.849172	103.576189	B	cp21
LYH096-1		China	Xiamen		24.47065618	118.1145879	GS	cp40
LP173232-3	2017	China	Yunnan		24.920921	98.879734	B	cp34
LP173283-2	2017	China	Yunnan		23.016306	103.348322	B	cp34
CY160088		China	Zhejiang	Lianyungang	34.7272	119.4492	B	cp01
CY160117-1		China	Zhejiang	Xuzhou	34.4139	117.5123	B	cp29
KFC3374-3		China	Zhejiang	Lishui	28.4435	119.8746	B	cp22
KFC3382-1		China	Zhejiang	Taizhou	28.7419	120.5632	B	cp28
LP150972-LS-1		China	Zhejiang	Hangzhou	30.1213	120.0346	B	cp22
BQUCH0258	2013	Fiji	Vanua Levu	Natewa Village	-16.591498	179.734691	B	cp17
BQUCH0259	2013	Fiji	Vanua Levu	Natewa Village	-16.591498	179.734691	B	cp17
BQUCH0261	2013	Fiji	Vanua Levu	Natewa Village	-16.591498	179.734691	B	cp17
BQUCH0262	2013	Fiji	Vanua Levu	Natewa Village	-16.591498	179.734691	B	cp17
BQUCH0265	2013	Fiji	Vanua Levu	Natewa Village	-16.591498	179.734691	B	cp17
BQUCH0266	2013	Fiji	Vanua Levu	Natewa Village	-16.591498	179.734691	B	cp17

BQUCH0267	2013	Fiji	Vanua Levu	Natewa Village	-16.591498	179.734691	B	cp17
BQUCH0277	2013	Fiji	Vanua Levu	Buca Village	-16.650785	179.842347	B	cp17
BQUCH285	2013	Fiji	Vanua Levu	Naidi Village	-16.79643016	179.3663553	GS	cp17
LYH023-3		Fiji	Vatulele	Ekubo	-18.525	177.6425	GS	cp17
LYH018		Fiji	Vitilevu	Suva	-18.0939	178.4597	GS	cp17
BQUCH0297	2013	Fiji	Taveuni	Somo Somo Village	-16.774681	-179.972182	B	cp17
BQUCH0252	2013	Fiji	Taveuni	Bauma District, Waitabu Village	-16.820591	-179.871356	B	cp17
BQUCH0253	2013	Fiji	Taveuni	Bauma District, Waitabu Village	-16.820591	-179.871356	B	cp17
LP173096-1	2017	India	Pune	Agharkar Research Institute	18.520932	73.831613	B	cp35
LP173108-1	2017	India	Pune	Botanical Survey of India	18.532794	73.917253	B	cp21
LP173150-1	2017	India	West Bengal		22.558563	88.290708	B	cp40
CSA-JA-001	2016	Indonesia	Jakarta		-6.188109	106.809645	B	cp17
CSA-JA-002	2016	Indonesia	Jakarta		-6.188109	106.809645	B	cp17
CCR030	2019	Indonesia	Sulawesi	Lengkeka, Bada Valley	-1.870333	120.2115	B	cp17
CCR031	2019	Indonesia	Sulawesi	Lengkeka, Bada Valley	-1.870333	120.2115	B	cp17
TNMS144076	2009	Indonesia	Sulawesi	Lengkeka	01°52'18"S	120°12'38"E	B	cp17
TNMS144077	2009	Indonesia	Sulawesi	Gintu	01°52'42"S	120°14'41"E	B	cp17
TNMS144079	2009	Indonesia	Sulawesi	Bewa	-1.868611	120.262222	B	malo
csc55-2		Indonesia	Sulawesi	Tengah	-1.8715	120.2105	GS	cp17
CCR021	2019	Indonesia	Sulawesi	Hanggira, Besoa Valley	-1.715389	120.207667	B	cp17
CCR028	2019	Indonesia	Sulawesi	Tuare, Bada Valley	-1.903139	120.165278	B	cp17
BD001	2016	Indonesia	West Java	Bandung	-6.866847	107.616915	GS	cp17
CSA-BD-002	2016	Indonesia	West Java	Bandung	-6.866847	107.616915	B	cp17
CSA-BD-003	2016	Indonesia	West Java	Bandung	-6.866847	107.616915	B	cp17

CSA-BD-004	2016	Indonesia	West Java	Bandung	-6.866847	107.616915	B	cp17
CSA-BD-005	2016	Indonesia	West Java	Bandung	-6.866847	107.616915	B	cp17
KFC2377-2		Japan	Okinawa	Yaeyama	24.3335	124.0909	GS	cp05
Koh13969	2012	Japan	Okinawa	Kurima Island	24°43'27.18"N	125°15'13.8"E	B	cp05
Koh13972	2012	Japan	Okinawa	Kurima Island	24°43'27.18"N	125°15'13.8"E	B	cp05
Koh13973	2012	Japan	Okinawa	Kurima Island	24°43'27.18"N	125°15'13.8"E	B	cp05
TNS908623	2001	Japan	Pref. Kyoto (京都府)		35°01'32.6"N	135°34'12.3"E	B	cp28
TNS592825	1991	Japan	Pref. Kyoto (京都府)		35°04'02.3"N	135°33'41.1"E	B	cp28
KFC3643-5	2018	Japan	Prefecture Miyagk	Taihaku-Ku, Sendai	38°14'19.4"N	140°52'17.8"E	B	cp28
TNS677610	1994	Japan	Prefecture Shiga (滋賀縣)		35°14'45"N	136°16'15"E	B	cp28
TNS772247	2005	Japan	Prefecture Shiga (滋賀縣)		35°30'47"N	136°09'40"E	B	cp28
LYH087		Japan	Tokyo	Bunkyo	35.7117	139.7621	B	cp28
TNS432305	1982	Japan	Yamaguchi		33°56'05.3"N	132°26'29.1"E	B	cp28
Xu13673-2	2019	Laos	Bolikhamxay	Thathom city	18°50'32.74"N	103°48'54.43"E	B	cp34
Xu13670-2	2017	Laos	LuangPrabang	Nongkhiaw city	20.58166667	102.5952778	B	cp77
Xu13672-2	2017	Laos	XiengKhouang	Muang Kham city	19.67250833	103.5900111	B	cp20
BISH709092	2003	Marquesas		Ua Huka, Papuaeiekaha	8°55'17.0"S	139°33'50.4"W	B	cp55
PTBG040876	2003	Marquesas		Ua Huka, Papuaeiekaha	08°55'17"S	139°33'49"W	B	cp55
BQUCH0234	2012	Marquesas	Fatuhiva	Omoa	-10.491008	-138.646171	B	cp55
KFC3652	2018	Papua New Guinea	Oro Province	Lelioa Village	9°5.4230'S	149°18.6580'E	B	cp17
LAE199076	1972	Papua New Guinea	Eastern Highlands		6°40'S	146°E	B	cp17
LAE201014	1972	Papua New Guinea	Eastern Highlands		6°07'S	145°00'E	B	cp17
KFC3720	2019	Papua New Guinea	Eastern Highland Province	Obura Wonenara Dist.	6°33'07"S	146°28'16"E	B	cp17
KFC3719	2019	Papua New Guinea	Eastern Highland Province		6°33'07"S	146°28'16"E	B	cp17

KFC3721-1	2019	Papua New Guinea	Eastern Highland Province		6°18'08.4"S	145°44'09.4"E	B	cp17
KFC3723	2019	Papua New Guinea	Eastern Highland Province		6°04'59"S	145°23'13"E	B	cp17
KFC3724	2019	Papua New Guinea	Eastern Highland Province		6°00'40"S	145°19'59"E	B	cp17
KFC3685-2	2018	Papua New Guinea	Morobe		7°4.6000'S	146°36.1970'E	B	cp17
KFC3689-3	2018	Papua New Guinea	Morobe		7°22.7560'S	146°46.7630'E	B	cp17
KFC3690-2	2018	Papua New Guinea	Morobe		7°21.8820'S	146°46.0430'E	B	cp17
KFC3696-3	2018	Papua New Guinea	Morobe		7°14.4990'S	146°28.4290'E	B	cp17
KFC3697-1	2018	Papua New Guinea	Morobe		7°13.2620'S	146°37.8320'E	B	cp17
KFC3651-2	2018	Papua New Guinea	Oro Province		9°5.3940'S	149°18.7750'E	B	cp17
KFC3698-4	2018	Papua New Guinea	Shimbu		5°51.4810'S	145°6.1980'E	B	cp17
KFC3726-1	2019	Papua New Guinea	Western Highlands Province		5°49'23"S	144°13'35"E	B	cp17
KFC3727	2019	Papua New Guinea	Western Highlands Province		5°50'11"S	144°07'01"E	B	cp17
KFC3732	2019	Papua New Guinea	Oro Province		-8.672696	148.412748	B	cp17
KFC2018-3		Philippines	Luzon	Laguna	14.1687	121.2428	B	cp20
BISH664608	1957	Pitcairn Island			25°04'04.5"S	130°05'58.6"W	B	cp17
LYH027		Samoa	Savaii	Palauli	-13.7565	-172.3044	B	cp17
LYH026-2		Samoa	Upolu	Faleolo	-13.8313	-171.9849	GS	cp17
TNMS159149	2011	Solomon Islands	Guadalcanal, Honiara	Kukum Hwy	09°25'48"S	159°56'52"E	B	cp21
BQUCH433	2014	Tahiti			-17.63216	-149.613516	GS	cp17
BQUCH435	2014	Tahiti			-17.63216	-149.613516	GS	cp17
Tahiti		Tahiti			-17.64	-149.42	B	cp17
KFC3439-1		Taiwan	Changhua	Pitou	23.8828	120.4995	B	cp13
SongNCYU-1		Taiwan	Chiayi	East	23.4701	120.4829	B	cp09
KFC3050		Taiwan	Hualien		23.91753333	121.5312944	GS	cp06

KFC3478-6	2016	Taiwan	Mazu		26.147739	119.914742	B	cp01
KFC3442-1		Taiwan	Miaoli	Tongluo	24.464	120.7812	B	cp01
KFC3437-1		Taiwan	Nantou		23.9192	120.6835	B	cp01
KFC3592		Taiwan	Nantou	Sun Moon Lake	23.86355556	120.9393056	B	cp05
Liu025-1		Taiwan	Nantou	Ren'ai	24.0378	121.1451	B	cp09
PFK02-2		Taiwan	Pingtung	Fenggang	22.2106	120.704	B	cp17
PFS01-3	2016	Taiwan	Pingtung	Fangshan	22.24262	120.66648	GS	cp17
PHC01-2		Taiwan	Pingtung	Hengchun	21.9925	120.7347	B	cp09
PMJ04-1		Taiwan	Pingtung	Manjhou	22.0267	120.8365	B	cp17
KFC2379-1		Taiwan	Taichung	Qingshui	24.3084	120.5496	B	cp09
LYH081		Taiwan	Tainan	Zuozhen	23.0563	120.4004	GS	cp16
NNH01-1		Taiwan	Tainan	Nanhua	23.0811	120.4955	B	cp54
NYJ01-1		Taiwan	Tainan	Yujing	23.117	120.4696	B	cp09
NTU01-2		Taiwan	Taipei		25.0177	121.5429	GS	cp01
CCR004-2	2019	Taiwan	Taitung	Luyeh	22.8579349	121.1297017	B	cp17
CCR003-2	2019	Taiwan	Taitung	Luyeh	22.896984	121.112994	B	cp16
CCR006-1	2019	Taiwan	Taitung	Guanshan	23.0202574	121.1533484	B	cp17
CCR036	2019	Taiwan	Taitung	Daren	22.288824	120.839718	B	cp17
CCR050	2019	Taiwan	Taitung	Daren	22.463826	120.924668	B	cpN16
Liu074-1		Taiwan	Taitung	Guanshan	23.0196	121.1533	B	cp17
LYH091		Taiwan	Taitung	Lanyu	22.0278	121.5534	B	cp16
TCB01-1		Taiwan	Taitung	Changbin	23.2812	121.4172	B	cp05
TTD01-1		Taiwan	Taitung	Taitung	22.7952	121.1174	B	cp16
LYH063		Taiwan	Yilan	Nan'ao	24.4276	121.6953	B	cp01

LP173682-3	2017	Tajikistan	Dushanbe		38.565917	68.798917	B	cp40
BQUCH0366	2013	Tonga	Eua	Haaluma	-21.450952	-174.911529	B	cp17
BQUCH0368	2013	Tonga	Eua	Houma	-21.363550	-174.954642	B	cp17
BQUCH0353	2013	Tonga	Tongatapu	Liahona	-21.147801	-175.328411	B	cp17
BQUCH0338	2013	Tonga	Tongatapu	Nukualofa, Friends Café	-21.134029	-175.200031	B	cp17
BQUCH0342	2013	Tonga	Tongatapu	Alaki Fonua	-21.193323	-175.132457	B	cp17
LYH008-1		Tonga	Tongatapu	Liahona	-21.1608	-175.2807	GS	cp17
BQUCH0355	2013	Tonga	Vava'u	Neiafu	-21.174313	-175.249061	B	cp17
LYH013-3		Tonga	Vava'u	Mangia	-18.6245	-173.9561	GS	cp17
BQUCH0177	2012	USA	Hawaii	Big Island	20.041949	-155.654753	B	cp41
BQUCH179	2012	USA	Hawaii	Big Island	20.041949	-155.654753	GS	cp17
BQUCH0190	2012	USA	Hawaii	Big Island	19.636867	-155.990128	B	cp17
BQUCH0191	2012	USA	Hawaii	Big Island	19.636867	-155.990128	B	cp41
BQUCH0181	2012	USA	Hawaii	Big Island, Waimea, Roen Hufford's garden	20.041949	-155.654753	B	cp17
KFC3613-2	2018	USA	Hawaii	Bishop Museum	21°19'59.5"N	157°52'19.0"W	B	cp17
KFC3614-1	2018	USA	Hawaii	Bishop Museum	21°19'58.2"N	157°52'17.5"W	B	cp41
KFC3633-1	2018	USA	Hawaii	Amy B.H. Greenwell Ethnobotanical Garden	19°29.460'N	155°54.686'W	B	cp41
KFC3634-1	2018	USA	Hawaii	Amy B.H. Greenwell Ethnobotanical Garden	19°29.440'N	155°54.686'W	B	cp17
KFC3635-2	2018	USA	Hawaii	Amy B.H. Greenwell Ethnobotanical Garden	19°29.446'N	155°54.687'W	B	cp17
KFC3636-1	2018	USA	Hawaii	Amy B.H. Greenwell Ethnobotanical Garden	19°29.446'N	155°54.687'W	B	cp17
KFC3637	2018	USA	Hawaii	Pu'uhonua o Honaunau National Historical Park	19°25.301'N	155°54.622'W	B	cp17
PTBG065740	2012	USA	Hawaii	Kaua	22.084145	-159.613663	B	cpN17
BISH76723	2009	USA	Hawaii	Kauai	22.085768	-159.633438	B	cpN17
PTBG033724	1997	USA	Hawaii	Kauai	22°05'16.8"N	159°34'36.3"W	B	cp17

PTBG054585	2006	USA	Hawaii	Kauai	22°07'56.0"N	159°38'03.1"W	B	cp17
KFC3616-2	2018	USA	Hawaii	Kauai, National Tropical Botanical Garden	21°54'22.0"N	159°30'30.0"W	B	cp17
KFC3618-3	2018	USA	Hawaii	Kauai, National Tropical Botanical Garden	21°54'24.2"N	159°30'26.9"W	B	cp17
PTBG063754	2012	USA	Hawaii	Kauai, National Tropical Botanical Garden	21.906111	-159.508331	B	cp17
BISH432573	1981	USA	Hawaii	Kohala, Lapakahi State Park	20°10'28.7"N	155°53'49.8"W	B	cp17
BISH432572	1981	USA	Hawaii	Lapakahi State Park	20°10'40.0"N	155°53'53.1"W	B	cp17
BISH697410	2002	USA	Hawaii	Maui	20°50'N	156°17'W	B	cp17
PTBG036803	2002	USA	Hawaii	Maui	20°50'58"N	156°17'21"W	B	cp17
KFC3629	2018	USA	Hawaii	Maui, Kahanu Garden	20°48'09.1"N	156°02'09.8"W	B	cp17
KFC3630	2018	USA	Hawaii	Maui, Kahanu Garden	20°48'09.1"N	156°02'09.8"W	B	cp17
KFC3622-1	2018	USA	Hawaii	Maui, Kula	20°45'00.6"N	156°19'13.6"W	B	cp17
KFC3626-2	2018	USA	Hawaii	Maui, Kula	20°45'00.6"N	156°19'13.6"W	B	cp17
KFC3628	2018	USA	Hawaii	Maui, Kula	20°45'01.1"N	156°19'09.3"W	B	cp17
KFC3621	2018	USA	Hawaii	Maui, Mau Nui Botanical Gardens	20°53'36.4"N	156°29'08.9"W	B	cp17
KFC3627-2	2018	USA	Hawaii	Maui, Mau Nui Botanical Gardens	20°53'36.4"N	156°29'08.9"W	B	cp17
PTBG014981	1992	USA	Hawaii	Maui, National Tropical Botanical Garden	20°47'57.2"N	156°02'17.1"W	B	cp17
KFC3631-1	2018	USA	Hawaii	Maui, Pi'ilanihale Heiau	20°48'13.8"N	156°02'19.5"W	B	cp17
BISH58379	1920	USA	Hawaii	Maui, Waiopai, S. slope of Haleakala	20°37'31.2"N	156°12'34.8"W	B	cp17
BISH727393	2005	USA	Hawaii	Molokai	21°09'26"N	156°50'33"W	B	cp17
HAW23249	1974	USA	Hawaii	North Kohala District	20°10'40.0"N	155°53'53.1"W	B	cp17
BISH58382	1932	USA	Hawaii	Oahu	21°27'55.5"N	158°09'20.3"W	B	cp17
BISH99313	1934	USA	Hawaii	Oahu	21°18'23.0"N	157°51'32.3"W	B	cp17
BQUCH0174	2012	USA	Hawaii	Oahu	21.332928	-157.801561	B	cp41
BQUCH0195	2012	USA	Hawaii	Oahu	21.639735	-158.062671	B	cp17

BQUCH0196	2012	USA	Hawaii	Oahu	21.639735	-158.062671	B	cp17
KFC3609	2018	USA	Hawaii	Oahu	21°28'31.7"N	158°13'05.3"W	B	cp17
KFC3611	2018	USA	Hawaii	Oahu	21°28'31.7"N	158°13'05.3"W	B	cp17
TNMS169986	2013	USA	Hawaii	Oahu, Bishop Museum	21.332845	-157.870724	B	cp17
BQUCH0163	2012	USA	Hawaii	Oahu, Honolulu, Bishop Museum garden	21.332818	-157.870729	B	cp17
BQUCH0166	2012	USA	Hawaii	Oahu, Honolulu, Lyon's Arboretum	21.332928	-157.801561	B	cp17
KFC3617-1	2018	USA	Hawaii	Oahu, Leeward Community College	21°23'30.0"N	157°59'09.5"W	B	cp17
KFC3620-1	2018	USA	Hawaii	Oahu, Leeward Community College	21°23'30.0"N	157°59'09.5"W	B	cp17
TNMS169997	2013	USA	Hawaii	Oahu, UH 校園	21°18'00"N	157°48'51"W	B	cp17
KFC3604-3	2018	USA	Hawaii	Oahu, University of Hawaii at Manoa	21°18'05.5"N	157°48'54.2"W	B	cp17
KFC3605-2	2018	USA	Hawaii	Oahu, University of Hawaii at Manoa	21°17'53.8"N	157°49'18.9"W	B	cp17
KFC3606-3	2018	USA	Hawaii	Oahu, University of Hawaii at Manoa	21°17'44.0"N	157°48'47.2"W	B	cp17
KFC3608-3	2018	USA	Hawaii	Oahu, University of Hawaii at Manoa	21°17'51.0"N	157°48'52.5"W	B	cp17
LP162261-2	2016	USA	Oklahoma	Lake Eucha Park	36.373388	-94.748937	B	cp40
csa-Danang-131	2018	Vietnam	Danang		16.147958N	E108.135292	B	cp20
P24935-1	2016	Vietnam			21°2'30"N	105°47'31"E	B	cp21
P24936	2016	Vietnam			22°1'11"N	105°6'27"E	B	cp34
P24937-1	2016	Vietnam			22°21'8"N	105°25'9"E	B	cp59
P25003-1	2016	Vietnam			22°25'19"N	105°38'13"E	B	cp34
P25016-1	2016	Vietnam			22°45'39"N	106°18'47"E	B	cp34
P25037	2016	Vietnam			22°54'43"N	106°33'2"E	B	cp61
P25046-1	2016	Vietnam			22°11'2"N	106°31'30"E	B	cp34
P25047-1	2016	Vietnam			21°48'46"N	106°45'54"E	B	cp34
P25059-1	2016	Vietnam			21°5'2"N	105°22'53"E	B	cp34

BQUCH0270	2013	Wallis & Futuna	Wallis	south of Mata Utu roadside	-13.301258	-176.183584	B	cp17
BQUCH0271	2013	Wallis & Futuna	Wallis	south of island, roadside	-13.344260	-176.215083	B	cp17
BQUCH0331	2013	Wallis & Futuna	Wallis	south of Mata Utu	-13.301258	-176.183584	B	cp17
BQUCH0268	2013	Wallis & Futuna	Wallis	Utufua, Mikaele Tui's garden	-13.342034	-176.194499	B	cp17
BQUCH0269	2013	Wallis & Futuna	Wallis	Utu Fua roadside	-13.32599456	-176.1917365	B	cp17
BQUCH0333	2013	Wallis & Futuna	Wallis		-13.34425977	-176.2150831	GS	cp17