

# STRUKTUR GENETIK *Calliandra calothyrsus* DI INDONESIA MENGGUNAKAN PENANDA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA (RAPD)

*Genetic structure of Calliandra calothyrsus in Indonesia revealed by Random Amplified Polymorphism DNA markers*

I.L.G. Nurtjahjaningsih, Purnamila Sulistyawati, dan Anto Rimbawanto  
Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan  
Jl. Palagan Tentara Pelajar, Km.15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta  
e-mail: iluh\_nc@yahoo.com

Tanggal diterima: 02 Maret 2016, Tanggal direvisi: 22 Maret 2016, Disetujui terbit: 1 Juli 2016

## ABSTRACT

*Calliandra calothyrsus* was introduced to Indonesia from Guatemala in 1930s and had been planted widely throughout Indonesia for fuel wood. Genetic diversity within and among population is an important factor for initiating breeding program. Aim in this study was to evaluate genetic structure of *C. calothyrsus* in Indonesia, to obtain a better understanding of the history of the distribution and efficiency of breeding strategy of this species. Leaf samples were collected in a seedling seed orchard plot from 10 populations. Six RAPD markers consisted of 34 loci were used to analyze genetic diversity and genetic structure. The results showed that genetic diversity was in low to moderate level (mean  $H_E = 0.321$ ). The AMOVA analysis showed that genetic differentiation among geographical sources was significant, also among populations within geographical sources and among individual within populations as well. It was revealed that the 10 populations originated from only two ancestors. The limited number of ancestors resulted low to moderate genetic distances among populations (mean  $D_a = 0.070$ ). In conclusion, *C. calothyrsus* has moderate genetic diversity within population and weak genetic structure among populations. Genetic diversity in population/individual level should be considered as a selection unit in the breeding strategies.

**Keywords:** *exotic species, genetic structure, RAPD markers*

## ABSTRAK

Di Indonesia, *Calliandra calothyrsus* (kaliandra) adalah salah satu tanaman eksotik yang berasal dari Guatemala dan ditanam secara luas di Indonesia sejak 1930-an untuk kayu bakar. Keragaman genetik di dalam dan antar populasi merupakan salah satu pertimbangan penting dalam menyusun suatu strategi pemuliaan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui struktur genetik *C. calothyrsus* di Indonesia. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diperoleh pemahaman sejarah sebaran jenis ini di Indonesia sehingga strategi pemuliaan menjadi lebih efisien. Sampel daun dikumpulkan dari plot kebun benih semai yang terdiri dari 10 populasi, terletak di Wonogiri. Analisis struktur genetik dengan enam penanda RAPD menghasilkan 34 lokus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keragaman genetik populasi kaliandra termasuk dalam nilai rendah sampai sedang (rata-rata  $H_E = 0,321$ ). Analisis molekuler varian (AMOVA) menunjukkan bahwa perbedaan genetik antar pulau menunjukkan nilai yang nyata, juga antar populasi dalam pulau dan antar individu di dalam populasi. Analisis struktur menunjukkan 10 populasi tersebut berasal dari hanya dua daerah asal/ nenek moyang. Terbatasnya jumlah nenek moyang berakibat pada rendah sampai sedang jarak genetik antar popuasi (rata-rata nilai  $D_a = 0,070$ ). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kaliandra yang tersebar di Indonesia, berasal dari nenek moyang yang jumlahnya terbatas, sehingga jenis ini memiliki keragaman genetik di dalam populasi dalam kisaran nilai rendah sampai sedang dan jarak genetik antar populasi bernilai rendah. Keragaman genetik pada tingkat populasi atau individu harus dijadikan pertimbangan sebagai unit seleksi dalam strategi pemuliaan.

**Kata kunci:** *jenis eksotik, struktur genetik, penanda RAPD*

## I. PENDAHULUAN

Sifat tanaman eksotik di antaranya memiliki kemampuan yang tinggi untuk beradaptasi terhadap seleksi alam pada

lingkungan yang baru, menyebar secara luas dan cepat, sehingga cenderung bersaing dengan tanaman lokal bahkan mampu membentuk populasi tersendiri (bersifat invasif) (Lee, 2002; Martin et al., 2014). Keragaman genetik

tanaman eksotik dipengaruhi oleh struktur genetik di sebaran alamnya, jumlah yang diintroduksi dan jumlah individu yang ditemukan di lingkungan barunya (Shirk et al., 2014). Karakter sebaran tanaman jenis eksotik tidak terlepas dari peran manusia (Kurokochi et al., 2013; Martin et al., 2014). Pada umumnya, individu yang memiliki kemampuan beradaptasi tinggi jumlahnya terbatas/sedikit. Seperti pada tanaman hias eksotik di Jepang, *Allianthus altissima* yang didatangkan dari Cina bagian Timur, menunjukkan bahwa individu yang tersebar berasal dari sumber sebaran yang terbatas (Kurokochi et al., 2013), kemudian disebarkan ke seluruh wilayah di Jepang. Konsekuensi dari keterbatasan jumlah sumber benih ini menyebabkan rendahnya jarak genetik antar populasi.

Salah satu tanaman eksotik di Indonesia adalah kaliandra (*Calliandra calothyrsus* Meisn.). Kaliandra termasuk jenis tanaman cepat dan mudah tumbuh, mempunyai nilai ekonomi tinggi untuk kayu bakar (Chamberline, 2000). Penyerbukan pada jenis ini dibantu oleh serangga, burung dan kelelawar. Meskipun pembungaannya kurang serempak, namun kaliandra menghasilkan biji dalam jumlah banyak, yaitu 100 g per pohon (Chamberline, 2000). Sebaran alam kaliandra ada di Amerika Tengah dan Meksiko. Menurut Chamberlain (1998), kaliandra di Indonesia berasal dari Guatemala; pertama kali ditanam di Jawa oleh Perhutani pada tahun 1936. Karena mudah berkembang biak, baik dengan biji maupun secara vegetatif, jenis ini dibudidayakan dan disebarkan oleh masyarakat ke seluruh pulau di Indonesia.

Strategi pemuliaan jenis kaliandra sudah dimulai sejak tahun 2010 dengan membangun uji keturunan dan melibatkan 10 populasi kaliandra yang tersebar di Indonesia (Hendrati, data tidak dipublikasi). Apabila sumber materi genetik kaliandra yang tersebar di Indonesia berasal dari tempat yang terbatas di sebaran alamnya, maka kemungkinan kaliandra memiliki nilai keragaman dan jarak genetik

rendah. Apabila hal tersebut terbukti benar, maka untuk efisiensi strategi pemuliaan jenis kaliandra, tidak perlu melibatkan seluruh populasi yang ada.

Kajian keragaman genetik kaliandra sudah dilaporkan menggunakan penanda jenis isozim (Chamberlain, 1998). Penanda isozim merupakan penanda berbasis enzim sehingga memerlukan sampel uji yang masih segar. Penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) adalah salah satu jenis penanda berbasis DNA yang dicirikan dengan panjang 10-15 basa. Penanda RAPD bersifat dominan yaitu melacak alel dominan dan resesif. Penanda RAPD telah diterapkan untuk memperbaiki status taksonomi pada sembilan jenis Kaliandra (Mattagajasingh et al., 2006).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui struktur genetik kaliandra yang ada di Indonesia menggunakan penanda RAPD. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai pertimbangan dalam menyusun strategi pemuliaan jenis ini.

## II. BAHAN DAN METODE

### A. Waktu dan Lokasi

Penelitian ini dilakukan selama dua bulan dari bulan Agustus hingga September 2015. Untuk analisis DNA, sampel daun diambil dari sebuah kebun benih semai kaliandra, terletak di Wonogiri, Jawa Tengah. Kebun benih tersebut menggunakan 10 populasi kaliandra (Tabel 1 dan Gambar 1). Sampel daun dikemas menggunakan amplop kertas dan diberi silika gel untuk mengurangi kadar air dalam daun sehingga tidak mudah membusuk.

### B. Metode Penelitian

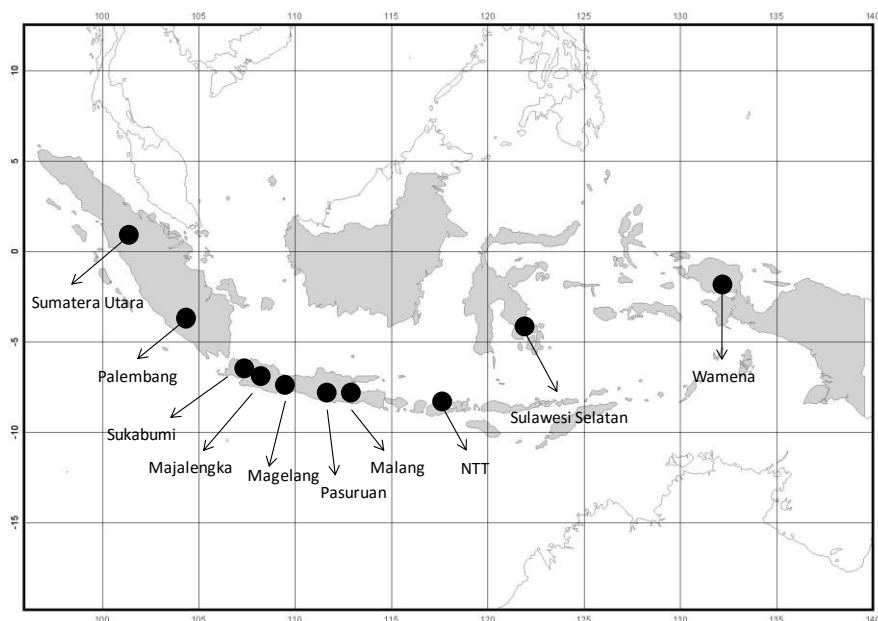
Isolasi DNA dilakukan dengan cara menimbang sampel daun seberat 50 mg dan diekstraksi menggunakan metode CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) (Shiraishi & Watanabe, 1995). Analisis genetik menggunakan penanda RAPD adalah salah satu analisis DNA berdasarkan proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Untuk

mendukung terjadinya penempelan penanda pada DNA target agar dapat diamati variasi pitanya, maka proses PCR memerlukan larutan dan kondisi mesin PCR (*thermal cycler*) yang sesuai. Larutan PCR terdiri dari 5 ng/ $\mu$ L DNA, 10 pmol primer RAPD, 5x KAPATaq Extra Buffer (tanpa  $Mg^{2+}$ ), 0,3 mM dNTP, 1,75 mM  $MgCl_2$ , 1,25 U/50 $\mu$ L KAPATaq Extra Hot-start DNA Polymerase (Kapabiosystems). Kondisi mesin *thermal cycler* (9700) terdiri dari 3 tahap; tahap I adalah tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit; tahap II adalah tahap penempelan (*annealing*) dilakukan dalam 45

siklus pada suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, suhu penempelan 37°C selama 30 detik, dan pemanjangan 72°C selama 1,5 menit; tahap III merupakan tahap pemanjangan terakhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Penelitian ini menggunakan 6 primer RAPD dengan panjang 10 basa (Operon Technologies, USA; Tabel 2). Elektroforesis hasil PCR dilakukan pada 1,2% gel agarose yang dialiri listrik 120 Voltage. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan alat visualisasi yang dilengkapi dengan kamera dan lampu UV (Hitachi).

Tabel 1. Nama, wilayah, jumlah sampel, koordinat letak lintang dan bujur kaliandra

Nama Populasi	Wilayah	Jumlah sampel	Lintang Utara/Selatan	Bujur Timur
Sumatera Utara	Sumatera	10	1°18'11.30"U	99°21'17.40"
Palembang	Sumatera	10	2°59'27.99"S	104°45'24.24"
Sukabumi	Jawa	6	6°55'17.15"S	106°55'33.04"
Majalengka	Jawa	8	6°50'00.00"S	108°10'00.00"
Magelang	Jawa	15	7°26'29.00"S	110°12'30.00"
Pasuruan	Jawa	7	7°40'53.00"S	112°38'17.00"
Malang	Jawa	6	8°00'35.20"S	112°35'52.90"
Nusa Tenggara Timur	Nusa Tenggara	11	9°51'37.30"S	124°16'38.60"
Sulawesi Selatan	Sulawesi	14	3°06'30.50"S	119°52'05.60"
Wamena	Papua	9	4°05'51.28"S	138°57'09.55"



Gambar 1. Lokasi 10 populasi kaliandra yang digunakan dalam penelitian ini

Hasil PCR akan terlihat sebagai pita monomorfik dan polimorfik; hanya pita yang polimorfik yang akan dianalisis. Analisis genetik menggunakan data biner. Kisaran ukuran pita polimorfik ditunjukkan pada Tabel 2.

### C. Analisis data

Parameter keragaman genetik di dalam populasi diukur sebagai jumlah alel ( $N_A$ ), jumlah alel privat ( $P_A$ ; alel yang ada dalam satu populasi saja), jumlah alel langka ( $R_A$ ; alel dengan frekuensi  $<0,05\%$ ) dan keragaman genetik harapan ( $H_E$ ). Perbedaan keragaman genetik di dalam dan antar populasi serta wilayah dianalisis menggunakan AMOVA (*analysis of molecular variance*). Pembagian wilayah didasarkan pada perbedaan pulau. Parameter keragaman genetik di dalam populasi dan AMOVA dianalisis menggunakan piranti lunak GenAlex (Peakall & Smouse, 2012). Dendrogram ditampilkan untuk mengetahui hubungan genetik antar populasi dan dihitung menggunakan piranti lunak TreeView (Takezaki

et al., 2014). Struktur genetik menggunakan piranti lunak Structure (Pritchard et al., 2010).

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil

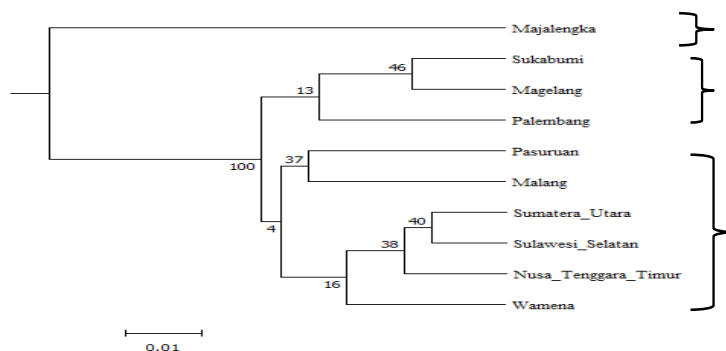
Enam penanda RAPD yang digunakan pada penelitian ini cukup polimorfik dengan total sejumlah 34 alel polimorfik (Tabel 2). Selanjutnya enam penanda RAPD tersebut digunakan untuk analisis keragaman genetik populasi kaliandra.

Nilai rerata keragaman genetik 10 populasi kaliandra termasuk sedang (Rerata  $H_E=0,321$ ; Tabel 3). Pengelompokan populasi dalam satu kelompok (klaster) tidak berhubungan dengan kedekatan letak geografis masing-masing populasi (Gambar 2). Meskipun dalam nilai kecil (3%), perbedaan pulau pada sebaran populasi kaliandra memberikan perbedaan keragaman genetik yang nyata (Tabel 4). Populasi kaliandra yang tersebar di Indonesia berasal dari hanya 2 daerah asal/nenek moyang (Gambar 3).

Tabel 2. Nama dan sekuen primer RAPD, jumlah lokus polimorfik dan ukurannya (pasangan basa-bp)

No.	Nama primer RAPD	Sekuen (5'-3')	Jumlah lokus polimorfik	Ukuran lokus polimorfik (bp)
1	OPA07	GAAACGGGTG	7	350, 450, 490, 700, 1000, 1050, 1100
2	OPG10	AGGGCCGTCT	3	890, 980, 1000
3	OPG12	CAGCTCACGA	6	890, 900, 1050, 1800, 1500, 2200
4	OPK10	GTGCAACGTG	7	400, 580, 700, 800, 900, 1000, 1050
5	OPK15	CTCCTGCCAA	5	300, 590, 600, 700, 1800
6	OPP06	CCACGGGAAG	6	500, 630, 790, 800, 1200, 1300

34

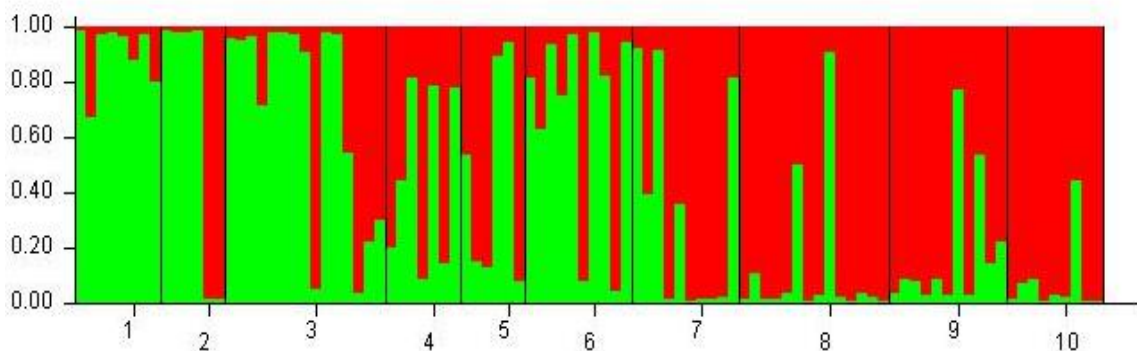


Gambar 2. Analisis kluster menunjukkan hubungan genetik antar populasi kaliandra berdasarkan nilai jarak genetik tidak bergantung pada posisi geografis

Tabel 3. Parameter keragaman genetik dalam populasi kaliandra menggunakan 6 penanda RAPD

Nama populasi	N	Jumlah alel	Jumlah alel privat	Jumlah alel langka	$H_E$ (SE)
Sumatera Utara	10	35	0	0	0,307 (0,024)
Palembang	10	34	0	0	0,310 (0,029)
Sukabumi	6	32	0	0	0,360 (0,029)
Majalengka	8	35	0	0	0,329 (0,030)
Magelang	15	35	0	0	0,407 (0,022)
Pasuruan	7	32	0	0	0,305 (0,032)
Malang	6	33	0	0	0,351 (0,031)
Nusa Tenggara Timur	11	33	0	0	0,282 (0,029)
Sulawesi Selatan	14	35	0	0	0,284 (0,028)
Wamena	9	29	0	0	0,275 (0,031)
Total/ Rata-rata	96	33,3	0	0	0,321 (0,009)

N: Jumlah alel,  $H_E$ : heterozigositas harapan, SE: standar error



Gambar 3. Struktur genetik antar 10 populasi kaliandra yang tersebar di Indonesia

## B. Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai keragaman genetik populasi kaliandra yang tersebar di Indonesia, termasuk pada nilai sedang (rerata  $H_E = 0,321$ ), apabila dibandingkan dengan nilai keragaman genetik di sebaran alamnya yaitu di Amerika Tengah dan Meksiko (rerata  $H_E = 0,075$ ) (Chamberlain, 1998). Pada umumnya, tanaman eksotik memiliki keragaman genetik rendah karena hanya

beberapa individu pohon saja yang bertahan hidup dengan daya adaptasi tinggi; keterbatasan jumlah individu tersebut berakibat pada rendahnya nilai keragaman genetik. Selain itu, individu dengan keragaman genetik rendah tersebut disebarkan oleh manusia untuk memenuhi kebutuhannya, sehingga jenis eksotik mempunyai kekerabatan yang tinggi (Kurokochi et al., 2013).

Tabel 4. Hasil AMOVA pada 10 populasi kaliandra yang terbagi menjadi 5 pulau, 10 populasi dan 96 individu pohon

Sumber ragam	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Varian (%)
Antar pulau	4	67,789	3*
Antar populasi dalam satu pulau	5	58,877	6**
Antar individu dalam satu populasi	86	658,209	91***
Total	95	748,875	100

Keterangan: \* Berbeda nyata pada taraf uji 5%  
 \*\* Berbeda nyata pada taraf uji 1%  
 \*\*\* Berbeda nyata pada taraf uji 0,1%

Rendahnya nilai keragaman genetik kaliandra di sebaran alamnya lebih disebabkan oleh gangguan manusia (pembakaran hutan, pembuatan jalan dan sebagainya), dibandingkan dengan gangguan faktor lingkungan (Chamberlain, 1998). Selain itu, nilai keragaman genetik di dalam populasi berkebalikan dengan curah hujan (Chamberlain, 1998); hal ini berkaitan dengan pembungaan yang tidak serempak di daerah kering dan populasi terfragmentasi, menyebabkan terbatasnya pergerakan gen, turunya jumlah individu dalam suatu populasi, laju silang dalam yang tinggi atau ketidaksesuaian sistem perkawinan antar individu.

Populasi Magelang menunjukkan nilai keragaman genetik tertinggi di antara populasi lainnya. Hutan tanaman kaliandra pertama kali diperkenalkan di Indonesia oleh Perhutani (Chamberlain, 1998) dan kemungkinan penanaman dengan ukuran luas difokuskan di Magelang kemudian disebarkan ke seluruh wilayah di Indonesia.

Penelitian menunjukkan bahwa 10 populasi kaliandra di Indonesia terbagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok 1 terdiri dari populasi Magelang dan kelompok 2 terdiri dari 9 populasi selain Magelang. Sembilan populasi tersebut mengelompok menjadi dua sub kelompok yaitu populasi Palembang dan Jawa, dan sub kelompok lain terdiri dari populasi Sumatera dan populasi di luar populasi Jawa dan Palembang.

Pengelompokan populasi tersebut didukung oleh hasil analisis struktur genetik yang menunjukkan bahwa 10 populasi tersebut berasal dari hanya 2 daerah asal/ nenek moyang. Hasil ini juga dibuktikan dengan nilai jarak genetik antar 10 populasi yang rendah ( $D_A=0,070$ ). Kurokochi et al. (2013) melaporkan bahwa *Alianthus* spp., jenis tanaman hias eksotik di Jepang, berasal dari sumber garis ibu (*maternal line*) yang terbatas. Sebaliknya nilai perbedaan genetik antar populasi kaliandra dari sebaran alam yang

lebih luas termasuk dalam nilai tinggi ( $F_{ST}=0,802$ ) (Chamberlain, 1998).

Analisis varian molekuler (AMOVA) menunjukkan perbedaan keragaman genetik yang nyata antar wilayah (dalam hal ini tingkat pulau), antar populasi di dalam wilayah dan antar individu di dalam populasi. Selain itu, analisis prinsip komponen (PCA) menunjukkan bahwa kedekatan genetik tidak mencerminkan kedekatan secara geografis. Hal ini menunjukkan bahwa kaliandra menyebar di seluruh wilayah Indonesia secara acak. Hal ini juga menunjukkan bahwa kaliandra digunakan dan ditanam secara aktif sejak jaman dulu.

Seperti disebutkan di atas bahwa kaliandra di Indonesia berasal dari Guatemala yang dibawa oleh ahli botani dari Belanda pada tahun 1936 (Chamberlain, 1998). Pada saat itu, kaliandra digunakan sebagai pohon peneduh kopi menggantikan jenis legum lainnya seperti *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Chamberline (1998) menggunakan penanda RAPD melaporkan bahwa populasi Madiun membentuk sub kluster yang sama dengan salah satu populasi Guatemala ( $H_E$  Santa Maria de Jesus=0,117) dan membentuk satu kluster yang sama dengan Meksiko dan Kenya. Selain itu, ada alel yang menunjukkan berasal dari daerah lain di Guatemala ( $H_E$  Patulul=0,080). Oleh karena itu, Chamberlain (1998) menduga bahwa kaliandra yang dibawa ke Indonesia, berasal dari lebih dari satu wilayah di Guatemala. Hal ini juga diperkuat dengan hasil yang diperoleh dari penelitian ini; analisis struktur genetik menunjukkan bahwa kaliandra yang tersebar di Indonesia berasal dari dua daerah asal/ nenek moyang. Rendahnya populasi Madiun yang dilaporkan oleh Chamberline (1998), disebabkan oleh individu di Madiun berasal dari kumpulan berbagai populasi namun jumlah sampel yang diambil terbatas. Oleh karena budidaya kaliandra termasuk mudah, baik secara generatif maupun vegetatif, dari Jawa kemudian tersebar ke seluruh wilayah di

Indonesia. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sangat beralasan kalindra didatangkan dari sumber benih yang terbatas di Guatemala dan disebarkan di seluruh wilayah di Indonesia sehingga memiliki keragaman genetik di dalam populasi yang sedang dan antar populasi yang rendah.

#### IV. KESIMPULAN

Sepuluh populasi kaliandra yang digunakan pada penelitian mempunyai nilai keragaman genetik rendah sampai sedang. Kaliandra yang tersebar di Indonesia berasal dari hanya dua daerah asal/ nenek moyang, hal ini menyebabkan keragaman genetik didalam dan antar populasi rendah.

Hasil penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya bahwa kaliandra di Indonesia berasal dari dua daerah di sebaran alamnya. Namun demikian, penelitian ini belum dapat menjelaskan bagaimana pergerakan populasi dari Jawa ke luar Jawa. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mengetahui pergerakan populasi dari Jawa ke luar Jawa secara lebih jelas.

Untuk melibatkan populasi dalam suatu strategi pemuliaan, maka disarankan untuk menggunakan populasi yang memiliki keragaman tinggi, populasi yang berbeda pulau, dan tidak direkomendasikan populasi yang secara geografis berdekatan karena belum tentu berbeda secara genetik.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Dr. Rina Laksmi Hendrati dan tim yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan pengambilan sampel daun di kebun benih semai kaliandra di Wonogiri. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Y. Triyanta dan Wahyuni Sari yang telah banyak membantu kegiatan penelitian DNA di Laboratorium Genetika Molekuler.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Chamberlain, J. R. (1998). Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae): Its implications for species delimitation and conservation. *American Journal of Botany*, 85(1), 37-47.
- Chamberline, J. R. (2000). *Improving seed production in Calliandra calothyrsus: A field manual for researchers and extension workers*. Oxford: Oxford Forestry Institute, University of Oxford.
- Kurokochi, H., Saito, Y., Chuman, M., & Ide, Y. (2013). Low chloroplast diversity despite phylogenetically divergent haplotypes in Japanese populations of *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae). *Botany*, 91, 148-154.
- Lee, C. E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 17(8), 386-391.
- Martin, M. D., Zimmer, E. A., Olsen, M. T., Foote, A. D., Gilbert, M. T. P., & Brush, G. S. (2014). Herbarium specimens reveal a historical shift in phylogeographic structure of common ragweed during native range disturbance. *Molecular Ecology*, 23, 1701-1716.
- Mattagajasingh, I., Acharya, L., Mukherjee, A. K., Panda, P. C., & Das, P. (2006). Genetic relationships among nine cultivated taxa of *Calliandra* Benth. (Leguminosae: Mimosoideae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Scientia Horticulture*, 110, 98-103.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research -an update. *Bioinformatics Applications Note*, 28(19), 2537-2539.
- Pritchard, J. K., Wen, X., & Falush, D. (2010). *Documentation for structure software: Version 2.3*. Retrieved from <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>
- Shiraishi, S., & Watanabe, A. (1995). Identification of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb et Zucc and *P. thumbergii* Parl based on the polymorphism in *rbcL* gene. *Journal of Japanese Forestry Society*, 77, 429-436.
- Shirk, R. Y., Hamrick, J. L., Zhang, C., & Qiang, S. (2014). Pattern of genetic diversity reveal multiple introductions and recurrent founder effects during range expansion in invasive populations of *Geranium carolinianum* (Geraniaceae). *Heredity*, 112, 497-507.

- Takezaki, N., Nei, M., & Tamura, K. (2014).  
POPTREEW: Web version of POPTREE  
for constructing population trees from allele  
frequency data dan computing some other  
quantities. *Molecular Biology Evolution*,  
31(6), 1622-1624.