

國立成功大學生物學研究所

Institute of Biology

National Cheng-Kung University

碩士論文

Master Thesis

利用細胞核核糖體 DNA 基因之 ITS 序列和轉譯延長因子重建

台灣沿緣蜉蝣 (*Cloeon marginale* Hagen) 的親緣地理

Phylogeography of *Cloeon marginale* Hagen (Ephemeroptera :
Baetidae) in Taiwan based on nuclear ribosomal DNA and
nuclear translation elongation factor 1 α

研究生：洪龍華

指導教授：蔣鎮宇 博士

王建平 博士

中 華 民 國 九十一 年 六 月

June 2002

國立成功大學

碩士論文

利用細胞核核糖體 DNA 基因之 ITS 序列和轉譯延長
因子重建台灣沼緣蜉蝣 (*Cloeon marginale* Hagen) 的
親緣地理

Phylogeography of *Cloeon marginale* Hagen
(Ephemeroptera : Baetidae) in Taiwain based on nuclear
ribosomal DNA and
nuclear translation elongation factor 1 α

研究 生：洪龍華

本論文業經審查及口試合格特此證明
論文考試委員

彭仁君

吳文寰

王建平

蔣銀宇

指導教授：王建平

蔣銀宇

系(所)主管：李家榮

中 華 民 國 九 十 一 年 六 月 二十一 日

研究摘要

本研究係利用細胞核核糖體 DNA (rDNA) 之 ITS 序列和轉譯延長因子 (EF-1 α) DNA 序列重建台灣沿緣蜉蝣的親緣地理型式，估算族群及族群間的基因流轉，以測驗地理區域間族群遺傳分隔的假說。自全島北、中、南和東部 8 個代表性靜水型沼澤 13 個採樣區取得 130 個樣本，共選殖出 87 個 rDNA haplotypes 和 53 個 EF-1 α haplotypes，以 DnaSP 計算 haplotype diversity 和 nucleotide diversity，其中 rDNA haplotypes diversity 為 0.980，EF-1 α haplotypes diversity 為 0.878，而 nucleotide diversity 分別是 0.133 與 0.114，全島以北部地區和南部地區的 nucleotide diversity 較高。由 neighbor-joining 和 network 親緣分析的結果均獲得 11 個 rDNA lineages (clade A-K) 和 7 個 EF-1 α lineages (clade I-VII)，不僅分佈最廣泛的 lineages 彼此相結合，稀有的 lineages 也有較高的比例和分佈最廣泛的 lineages 結合，卡方檢測顯示全島合一的大族群處於平衡，其中有一些稀有的 lineages 被侷限在少數地理區塊，推測應該是基因相對年輕或遺傳漂變的結果；而兩個基因譜系都建構出一致的親緣地理型式（族群間或地理區域間的遺傳分化低），顯示台灣沿緣蜉蝣發生頻繁的遷移。rDNA 和 EF-1 α 都指出族群間或地理區域間有很高的基因交流，但基因交流的型式並不一致，推測應該是這兩個基因譜系處在 lineage sorting 所導致。從 haplotype 和 nucleotide 歧異度、neighbor-joining tree、network tree 及基因交流值結果均顯示台灣沿緣蜉蝣進行長距離散播，推測這個非預期的結果是由風和水鳥所導致。根據 rDNA 和 EF-1 α 基因譜系推估出整個台灣地區的台灣沿緣蜉蝣是一個逢機配對的族群，所有採樣點是關鍵族群，根據生態資料和遺傳組成推測北部地區、南部地區和中部魚池樣點應該是台灣沿緣蜉蝣的根源地，而 sink 關鍵族群的遺傳組成深受滅絕和再拓殖的影響。

Abstract

To reconstruct the phylogeographic pattern of *Cloeon marginale* Hagen, two DNA markers were sequenced. In total, 87 and 53 haplotypes of the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region (rDNA) and translation elongation factor 1 α (EF-1 α) were identified, respectively, from 130 individuals. Haplotype diversity of 0.980 and 0.878 was estimated, respectively, from rDNA and EF-1 α . The nucleotide diversity of northern and southern regions was higher than that of other areas. Neighbor-joining trees and networks recovered eleven divergent rDNA lineages (clade A-K) and seven EF-1 α divergent lineages (clade I-VII). A chi-square test revealed random associations between rDNA types and EF-1 α types ($X^2=73.586$, $P=0.11176$). Nevertheless, lack of clade-clade consistency between two gene genealogies was probably ascribed to effects of lineage sorting. Two data sets revealed consistent phylogeographic patterns, i.e., low levels of genetic differentiation among regions and among populations, indicating frequent long-distance gene-flow between populations. Typhoons or monsoons carrying mature mayflies across populations and geographical regions may be the mechanism explaining the low levels of population differentiation. Random associations between haplotype of two DNA markers suggested an equilibrium of populations of Taiwan as a whole, and a metapopulation structure that consists of demes linked by different levels of gene flow. Ecological data and high level of intrapopulation variation implicated that northern and southern regions, as well as YU of central region may have been sources for migration into re-colonized populations. The sink demes were highly regulated by extinction-recolonization processes.

誌 謝

這本論文不僅記載著實驗成果，同時也記錄了許多人的熱心協助與指導。首先要感謝諸位老師以不凡的教育方式，帶領我走進科學的殿堂。

「大 人以上，可以語上；大 人以下，不可以語上。」論語第七

感謝指導教授蔣鎮宇博士的引領與提攜，使我有機會深入生物學與搭上分子親緣地理的列車。您與師母在生活上的照顧與包容，以及您在論文完成的過程中，耐心指導文章架構與細節處，細心批閱與斧正內容，使我能完成學業，在此獻上深摯的謝意。

「君子引而不發，躍如也。」孟子

感謝指導教授王建平博士予我充分的自主，在生活上的鼓勵與幫助以及實驗上的關心，謝謝您。

「教之者，長善而救其失者。」學記

感謝母校屏東科技大學彭仁志老師在學業上、生活上的提攜與鼓勵，並在研究上協助實驗材料的採集與支持實驗經費，使我克竟其工，您的恩情銘記在心。

感謝高雄醫學院生物系葉立彬老師惠賜研究相關文獻，使得實驗順利展開。而每位口試委員在百忙中對論文的逐字修正並給予許多寶貴意見，也在此表示由衷的謝意。

實驗室中鎮芳學姊實驗技術的指導；桂菁學姊以及志宏、唯匡在電腦與資料分析上的協助；弘都學長對結果的討論上許多寶貴意見的提供，特此一併敬謝忱。

生活周遭的朋友們，弘都學長、立華學姊、大偉、中偉、鶯鶯、惠櫻、唯匡、志宏、婉琪學姊以及許多教育學程的伙伴們，謝謝你們和我一起分享生活中的喜怒哀樂，對我多所照顧，並在許多重要時刻給我靈感與理性的建議，使我的研究生涯多采多姿。

此外，最要感謝父母親與家人的支持使我無後顧之憂，你們的激勵使我有再突破難關與接受考驗的動力，也將我的喜悅與你們分享。

最後，感謝所有曾經提供助力的老師和朋友，雖然無法在此一一致意，感激的心是一樣深刻的。對上千隻在實驗中犧牲的小生命，致上最高的敬意，並以此論文將他們對族人的貢獻歌詠流芳。

目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
誌謝	III
目錄	V
圖目次	VIII
表目次	IX
壹、前言	
一、親緣地理學	1
二、蜉蝣研究之獻述顧	4
(一) 蜉蝣的生物學	4
(二) 台灣蜉蝣之獻整理	5
(三) 台灣沿緣蜉蝣的研究近況	5
(四) 台灣沿緣蜉蝣是研究親緣地理的適當物種	6
三、核糖體核酸序列的遺傳特性與在昆蟲上之應用	7
四、細胞核轉譯延長因子的遺傳特性與在昆蟲上之應用	9
五、研究目的	11
貳、研究材料及方法	
一、材料採集	12
(一) 採集地點	12
(二) 取樣方法與鑑定	12
二、分子技術	12
(一) DNA 萃取與定量	13
(二) 聚合酵素連鎖反應	13
1. 引子的設計	13

(1) 細胞核核糖體 DNA	13
(2) 細胞核轉譯延長因子	14
2. DNA 擴增反應	14
(1) 細胞核核糖體 DNA 片段增殖	14
(2) 細胞核轉譯延長因子片段增殖	15
(三) 純化	15
(四) T-A cloning	15
(五) 轉型作用	15
1. 製備勝任細胞	15
2. 轉型作用	16
3. 塗碟	16
(六) 微量製備質體 DNA	16
1. 養菌	16
2. 微量抽取	16
(七) DNA定序	16
三、資料分析	17
(一) DNA序列分析與親緣分析	17
1. 序列的整理與校對	17
2. 序列的排列	17
3. 序列特性分析	18
4. 親緣樹的建構	18
(二) 族群遺傳分析	18
(三) 哈溫平衡之檢測	19
參、結果	
一、定序 DNA 模版增殖結果	20

二、DNA 序列特徵	20
(一) 鹼基組成	20
1. 細胞核核糖體 DNA	20
2. 細胞核轉譯延長因子	21
(二) haplotype diversity 和 nucleotide diversity	21
1. 細胞核核糖體 DNA	22
2. 細胞核轉譯延長因子	22
(三) 重組事件和中性測驗	23
1. 細胞核核糖體 DNA	23
2. 細胞核轉譯延長因子	23
三、基因譜系與 rDNA 和 EF-1 α lineage 結合分析	23
1. 細胞核核糖體 DNA	24
2. 細胞核轉譯延長因子	25
四、族群遺傳	26
1. 細胞核核糖體 DNA	26
2. 細胞核轉譯延長因子	27
肆、討論	
一、台灣沿緣蜉蝣的細胞核 ITSs DNA 序列演化特徵	29
二、族群遺傳	30
三、基因譜系與 rDNA 和 EF-1 α lineage 結合分析	33
四、族群動態	34
伍、結論	38
陸、參考文獻	39
柒、附錄	73

圖目次

Fig. 1 Structural features of the rDNA tandem repeat module (drawn to approximate scale) in insects. Black regions indicate internal transcribed spacers, which often differ in length.	48
Fig. 2 <i>Cloeon marginale</i> Hagen sample locations and distribution. Abbreviations of populations are given in Table 1.	49
Fig. 3 The region of rDNA used in the study and location of primers, arrow indicating the direction of PCR amplification. (Modify Whiting <i>et al.</i> , 1997)	50
Fig. 4 Neighbor-joining tree representative sequences (haplotypes) of nuclear rDNA in <i>Cloeon marginale</i> Hagen. Numbers at notes indicate bootstrap values. rDNA types (A-K) are labeled on clades.	51
Fig. 5 Minimum spanning network generated using method of Excoffier and Smouse (1994) for types of nuclear rDNA of populations of <i>Cloeon marginale</i> Hagen. Mutational changes are indicated at nodes.	52
Fig. 6 Neighbor-joining tree representative sequences (haplotypes) of nuclear EF-1 α in <i>Cloeon marginale</i> Hagen. Numbers at notes indicate bootstrap values. EF-1 α types (I-VII) are labeled on clades.	53
Fig. 7 Minimum spanning network generated using method of Excoffier and Smouse (1994) for types of nuclear EF-1 α of populations of <i>Cloeon marginale</i> Hagen. Mutational changes are indicated at nodes.	54
Fig. 8 Frequency of nuclear types (rDNA-EF-1 α associations) in each population is indicated in pie diagrams. Abbreviations of populations are given in Table 1.	55
Fig. 9 Scatter plot of logarithmic scales of Nm and geographical distance between 13 populations of <i>Cloeon marginale</i> Hagen.	57

表 目 次

Table 1. Materials of <i>Cloeon marginale</i> Hagen collected from different populations in Taiwan used for nuclear ribosomal DNA and elongation factor 1 α (EF-1 α) sequencing. Locality, area, sample size, nuclear types (rDNA type and EF-1 α type associations), and aquatic profile of each population are indicated.	58
Table 2. Sequences and position of primers used for the PCR amplification of rDNA and EF-1 α	60
Table 3. Descriptive statistics for separate and combined rDNA partitions.	61
Table 4. Estimates of haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (θ) with populations of <i>Cloeon marginale</i> Hagen based on rDNA sequences. Possible minimum recombination events are inferred using software DnaSP. Testing statistics for neutrality at rDNA. These symbols for populations see Table 1.	62
Table 5. Estimates of haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (θ) with populations of <i>Cloeon marginale</i> Hagen based on EF-1 α sequences. Possible minimum recombination events are inferred using software DnaSP. Testing statistics for neutrality at EF-1 α . These symbols for populations see Table 1.	64
Table 6. Distribution of rDNA types (A-K) among populations of <i>Cloeon marginale</i> Hagen. Regions are indicated: Northern region (N), Central region (C), Southern region (S), and Eastern region (E).	66
Table 7. Distribution of Elongation factor 1 α (EF-1 α) types (I-VII) among populations of <i>Cloeon marginale</i> Hagen. Regions are indicated: Northern region (N), Central region (C), Southern region (S), and Eastern region (E).	67
Table 8. Association Between rDNA types and EF-1 α types of <i>Cloeon marginale</i> Hagen. Distribution region of each type is indicated in square brackets. Percentage of each complex type is indicated in parentheses. W: widespread. Other symbols see	

Table 1.	68
Table 9. Pairwise F_{ST}/Nm estimates between populations based on genetic variation of rDNA.	69
Table 10. Pairwise F_{ST}/Nm estimates between populations based on genetic variation of EF-1 α	70
Table 11. Pairwise F_{ST}/Nm estimates between geographical regions (N, E, S, C) based on genetic variation of nrDNA (below the diagonal) and EF-1 α (above the diagonal).	71
Table 12. Observed number (O) of genotype frequency is compared to expected value (E) based on Chi-Square analysis ($X^2=73.586$, $P=0.11176$).	72

壹、前言

一、親緣地理學 (phylogeography)

生物地理學 (biogeography) 是一門研究生物在地理上分佈的學問，嘗試分析與解釋為何物種 (species) 和較高階分類群 (taxa) 的地理分佈呈現如今所見的型式；該型式是近代或是過去發生的事件；以及何以生物相 (biota) 的歧異度 (diversity) 和分類群組成隨著地區不斷而變化 (Futuyma, 1998)。這一系列從最近代到最古老之生物地理的問題，生物地理學者以歷史性生物地理學 (historical biogeography) 和生態性生物地理學 (ecological biogeography) 兩種不斷的方法解決這些問題 (Cox and Moore, 2000)，這與系統分類學者 (systematist) 和古生物學者 (paleontologist) 只強調前者（例如：大陸板塊漂移），或生態學者 (ecologist) 只強調後者（例如：棲地分佈和種間競爭）是有所區隔的。

Avise *et al.* (1987) 提出的親緣地理學是屬於歷史性生物地理學的新觀念，主要在探討物種的演化（親緣）與地質歷史（如冰河、vicariance 事件等）之間的相關性，同時才區分近代之基因交流以及演化的歷史事件；而近緣物種（強調其來自共同起源的歷史）以及種族群間的研究是親緣地理最主要探討的階層，也因此親緣地理學的研究被視為是族群遺傳 [或稱微演化 (microevolution)] 及巨演化 (macroevolution) 之間的橋樑。

在自然界中，每一個物種幾乎是受限在某種程度的地理範圍內分佈，許多較高分類群則樣地侷限在特定地理區中，然而，也曾發現一些分類群呈現不連續 (discontinuous) 或分離的 (disjunct) 型式分佈在一個以上之生物地理區中；親緣地理學者針對後者提出兩種不斷的解釋，其一，該生物起初也許只存在單一地區，但是藉由分佈區擴張 (range expansion) 或跳躍式散播 (jump dispersal) 越過障壁移植到其他區域，此模式稱為散播假說 (dispersal hypothesis)，是假定這些分佈區在生物佔據之前已經是呈現分離狀態；其二，這些分佈區先前是連續的，而且被現今分離性分佈之物種的祖先佔據，障壁則較晚才出現，將連續性分佈區分割成獨立的單位，該解釋稱為 vicariance hypothesis (Futuyma, 1998)。

近十年來由於分析觀念與方法的突破，以及分子生物學技術的成熟，使得親緣地理學受到相當程度的重視，分析方式的改進影響親緣地理的研究至為顯著，古典族群結構統計學，例如 F statistics，無法顯現出基因譜系 (gene genealogy) 之演化訊息或指出受試族群處在何種基因交流模式底下 (stepping stone 或 isolation by distance model)，而利用 unrooted haplotype tree 以及 haplotype 頻率進行的 nested clade 分析 (Excoffier and Smouse, 1994; Templeton, 1998) 能將近緣的 haplotypes 彼此連接，並進一步形成高階的 clades，提供了研究分子演化及族群親緣地理上新的詮釋工具。根據 nested clade 所重建的維狀圖，可確認族群遺傳變異在地理上非隨機性的分佈，是受有限的基因交流或是曾經發生過的歷史事件（例如：過去棲地破碎化、拓殖及區域擴張）所導致；也可得知物種的傳播路徑及可能的冰河時期避難所；進一步更可以知道何種 haplotype 是較為古老的，這是傳統的分歧分類學 (cladistics) 分析建構之樹狀圖所無法得知的。1960年代，由於遺傳學 (genetics)、生物化學 (biochemistry)、細胞學 (cytology)、分子生物學 (molecular biology) 等的快速發展，去羣核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 及蛋白質 (protein) 等生物巨分子遂成為研究生物演化的重要對象，提供研究族群遺傳結構和分類群 (taxa) 間親緣關係一廣泛可用的遺傳標示物 (genetic marker)。蛋白質層級上，同工異構酵素 (allozyme) 在過去廣泛被利用於族群遺傳結構分析上；而核酸定序技術在 1977 年發展成功，以及 1987 年聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術問世，縮短了解析分子結構的時間，促使 DNA 與 RNA 變異被推演類緣關係的學者偏好使用 (Hillis *et al.*, 1990)，也得以利用細胞核、粒線體 (mitochondria) 或葉綠體 (chloroplast) 之遺傳物質之變異來探討物種親緣關係和分析族群遺傳結構。

另外，溯源理論 (coalescent theory) 的發展，提供了我們能進一步探討族群的遷移、基因交流 (gene flow)、生殖隔離的效應、雜交 (hybridization)、以及不貳的支系 (lineage) 之分歧分化時間 (divergence time) 的理論基礎。溯源理論依據中性學派，推估遺傳變異的生成及維繫的過程；當一個古老的、具有遺傳多型性之大族群，受到地質事件影響，而造成族群的隔離，形成多個次族群 (subpopulation)，在演化時間不足的情況下，此時次族群間個體的親緣關係為一多起源 (polyphyletic)；而隨着時間的累積再加上遺傳漂變 (genetic drift) 效應分別作用在每個次族群上，使得族群上的

對偶基因逐漸消失，而形成一 paraphyletic 的關係；當時間夠久遠會使得該族群個體
所有對偶基因皆來自一古老的對偶基因，形成單一起源 (monophyletic) 的現象
(Futuyma, 1998)。

二、蜉蝣研究之歷史與

(一) 蜉蝣的生物學

蜉蝣 (mayfly) 屬於昆蟲綱 (Insecta) 蜉蝣目 (Ephemeroptera)，全世界現存並經證實的蜉蝣超過 2,000 種，被歸類為約 19 個科和 200 屬 (Brittain, 1982)。根據化石證據顯示蜉蝣起源於石炭紀 (Carboniferous)，是現存有翅昆蟲中最古老者 (Resh and Solem, 1984)。早在 1675 年，Swammerdam 就以 *Ephemeris vita* 這名字紀錄之 (cf. Brittain, 1982)。而中國對蜉蝣的記錄更可追溯到東周 (公元前 625 年)，詩經記載 “蜉蝣之羽，衣裳楚楚”，再者說林：“蜉蝣不飲不食，三日而終”，乃至明朝本草綱目注云：“蜉蝣水蟲也，狀似蠶蛾，朝生暮死”；這些描述僅止於成年蜉蝣的觀察，直到 1970 年代，才有學者利用有限的化石紀錄和極具變化的外部型態、比較解剖及行羣學的研究來探討蜉蝣目的分類與親緣關係 (Brittain, 1982)。

一般而言，蜉蝣分佈的棲地類型視種別而定；除了極地及一些小型海島未有分佈紀錄外，廣泛地分佈在世界各地。其主要棲息在淡水性水域（河流、湖泊或池塘），但有些種類可以生長在半鹹水的水域，一種南美的蜉蝣 baetid 甚至是半陸生的，在高山樹木生長線以上也有少數種類分佈 (Brittain, 1982)。

蜉蝣一生中大部分的生命都在水中度過，包括卵和稚蟲期。蜉蝣一般為卵生，少數如 *Cloeon dipterum* 及少許 *Callibaetis* 屬的種類具胎生現象。產卵量由數百到數千不等。產卵方式亦不一致，有直接自高空散生於水中者；先產卵成塊於腹下，待卵塊落水後再沖散者 (*Ephemeralla*、*Siphlonurus* 和 *Centroptilum*)；或藉流水沖刷腹末的卵群而分散落於水中者 (*Ephemeridae*、*Heptageniidae* 和 *Leptophlebiidae*)；甚或成蟲潛入水中產於石塊下者 (*Baetis* 屬的某些種)。卵期約 7~14 日，亦有達 1 個月者，孵化期明顯受水溫影響。初孵出之稚蟲 (naiads)，以皮膚呼吸。第一次脫皮後，始具氣管鰓。稚蟲期頗長，雖有些種類僅需 6 週，但通常約 1~3 年；有很多溫帶地區種類甚至普遍存在滯育 (diapause) 的現象。稚蟲期一般脫皮二十餘次始進入成蟲期，脫皮次數受種別及環境因子（例如食物品質和水溫）的影響。蜉蝣稚蟲幾乎為草食性，僅少數為肉食性（例如 *Siphlonuridae*）。和其他昆蟲比較，蜉蝣最特殊的地方是具有兩個有翅的成蟲期，即亞成蟲 (subimago) 和成蟲 (imago)，亞成蟲與成蟲酷似，僅翅

較不透明，生殖器未成熟，行動亦較不活潑。成蟲消化系統不發達，無消化能力，主要靠稚蟲期儲存的體脂維生，並不再進食，因此壽命僅 1~2 小時至數天，但是少數卵胎生種類 (*Callibaetis* 屬) 可存活約兩週左右；只有 *Callibaetis* 的雌性成蟲抱卵活上數週，直到卵孵化才死亡的紀錄。成蟲主要行有性生殖，於薄暮時飛翔交尾，然而也有大約 50 種是行孤雌生殖 (parthenogenesis) 以繁衍後代，例如 *Ameletus ludens*、*Baetis hageni*、*B. macdunnoughi* 及 *Cloeon triangulifer* (Gibbs, 1977; Bernard and Vannote, 1982; Brittain, 1982; Edmunds, 1984; Resh and Solem, 1984; Edmunds, 1988; Barbara *et al.*, 1990; Harker, 1997)。

(二) 台灣蜉蝣的研究整理

台灣地區蜉蝣的研究，都偏重於傳統形態分類學的探討。早期學者主要利用稚蟲或成蟲特徵等分類依據，零星地發表一些台灣產新紀錄種 (Ulmer, 1912; U'eno, 1928; Waltz and McCafferty, 1985, 1987)。近十年來除了新種的陸續發現外，台灣學者致力於普查台灣地區的蜉蝣種類；不僅修正學名，建立屬於台灣蜉蝣目各科、屬及種間的檢索表，他們的研究工作也或多或少解析出各種蜉蝣的分佈地 (張, 1992；康, 1993；康和楊, 1994a, 1994b；康等, 1994；康和楊, 1995；Kang and Yang, 1994a, 1994b, 1994c, 1996a, 1996b)。再者，由於外部形態相似，同胞種 (sibling species) 的鑑定困難，Yeh *et al.* (1997) 嘗試利用分子技術，釐清 *Ephemera* 屬下種間的親緣關係。蜉蝣大多喜棲息於乾淨的水域，近來有報告指出以其為水污染之生物性指標的可行性 (何和楊, 1983；Brittain, 1982; Hilsenhoff, 1987)，蜉蝣族群生態學的研究始被重視。研究水域生態的學者著手建立河川溪流蜉蝣之種類和族群變化量，以評估水質污染程度 (洪等, 1986；林等, 1988；楊等, 1990；徐和楊, 1997)，另外有彭等 (1999) 於南仁山古湖溼地調查 *Cloeon marginale* Hagen 稚蟲的族群動態和環境因子的相關性等等。但是，對於台灣沿緣蜉蝣的基本生物學研究至今依舊闕如。

(三) 台灣沿緣蜉蝣的研究近況

台灣沿緣蜉蝣 (*Cloeon marginale* Hagen) 在傳統分類上的地位經康 (1993) 證實是蜉蝣目四節蜉科 (Baetidae) *Cloeon* 屬的成員。台灣沿緣蜉蝣的體型較其他科的成員為小，且成圓筒狀，複眼位於頭部側面，觸角長度為頭寬的四倍。後胸不具後翅芽，

中胸背板自側面觀呈明顯的拱起。各腹節兩側後緣沒有尖銳突起；腹鰓成荷葉狀，共七對，豎立在腹部側緣，第一到第六對為雙葉，第七對為單葉；近似透明，鰓緣不細裂成羽毛狀，其上著生短細毛，鰓脈管發達呈掌狀分佈。腹部末端的尾絲 (caudal filaments) 具有兩根外側尾毛 (cerci) 和一根中央尾絲 (terminal filament)，尾毛長度大於中央尾絲；尾毛自外側基部起具長細毛，而中央尾絲兩側皆有長毛列生。

台灣沿緣蜉蝣廣泛分佈台灣本島和蘭嶼（張，1992），其稚蟲大量繁殖生長於靜水型 (lentic) 或緩流之水質良好沼澤溼地，水域水生植物區是稚蟲群聚主要棲息的場所，主要攝食藻類和有機碎屑，具有初級消費者的角色（張，1992；彭等，1999）。

羽化是蜉蝣由水生的幼蟲期轉變成陸生亞成蟲的一個臨界階段。溫度和光度是羽化最主要的限制因子；在寒冷的溫帶地區或極地，處於低溫下的蜉蝣受限於生理潛能，羽化期侷限在夏季月份；但是在熱帶或大部分的海洋氣候區，幾乎整年都有羽化發生 (Brittain, 1982; Edmunds, 1984)。成功羽化後的成熟個體在有限生命裡最主要的任務是交配和產卵。Brittain (1982) 和 Resh *et al.* (1984) 指出蜉蝣絕大部分是單日同步型羽化 (synchronized daily emergence) 且雌雄個體是群聚性 (swarming) 出現，此羽化模式在行有性繁殖的蜉蝣種類中，有助於提高族群世代成功延續的機率。台灣沿緣蜉蝣位處熱帶和亞熱帶氣候的台灣島嶼，夏秋兩季的羽化時刻集中在黃昏天將暗的短暫時期，兩性個體短時間集體同步羽化，羽化後的成蟲約可存活一週左右。台灣沿緣蜉蝣可全年羽化，且在野外觀察中發現台灣沿緣蜉蝣之初齡和末齡稚蟲全年皆有出現，顯示其終年可繁殖（彭，個人聯絡）。

（四）台灣沿緣蜉蝣是研究親緣地理的適當物種

有翅型昆蟲主要藉著飛翔以進行散播，當然分散的方向性和距離也大受風力的影響。有翅類中的直翅目（蝗蟲）、雙翅目（非洲瘧蚊）和鱗翅目（蝶）中的一些種類有上千公里的遷徙能力 (Johnson, 1966)；例如：北美洲的大樺斑蝶 (monarch butterflies; *Danaus plexippus*)，以落磯山脈 (Rocky Mountain) 分為東西兩個族群。每年秋季，原本散佈在北美各地的大樺斑蝶，開始逐漸集群，大規模地往南遷徙，越過北美洲渡冬。落磯山脈東方的族群遷移到墨西哥中部的 Transvolcanic Range 避難所，在此以成蝶渡冬；西方族群則沿著加州的西部海岸線一帶，成小集團分散越冬，隔年春季，於避

難所繁殖的新一代大樟斑蝶，則南北飛行，回到原來活動區；年年遞而復始，這段旅程長達三千公里 (Avise, 1994)。最早，Eanes and Koehn (1978) 利用胰島素分析泛東方分佈之族群，得到其遺傳結構呈現極低度之地理分化的結果 (cf. Avise, 1994)；Brower and Boyce (1991) 利用粒線體 (mitochondria) DNA 限制切點，沒有偵測到落機山脈東方和西方族群間具有任何遺傳分化，這暗示東方和西方族群曾發生廣泛性及近代地歷史性接觸。

成年蜉蝣由於體質弱和短壽命，限制其長距離的擴散 (Brittain, 1982; Edmunds, 1984; Resh and Solem, 1984)，加上台灣地勢多山，尤其東西部之間橫亘著中央山脈，可能更增添其遷徙的困難性。而從族群遺傳學的角度，族群内部體的遺傳變異程度，受族群成長 (population demography)、交配模式 (systems of mating) 及遷移等因素左右。快速的世代時間，導致族群大幅變動，而基因交流傾向使族群間因為選擇 (natural selection) 及基因漂變所累積的差異性降低，如果交流範圍夠廣，會使得鄰近的族群有相似的遺傳結構，亦即遺傳同質化 (genetic homogenization)；反之，族群遺傳結構的歧異度會增加；因此，地區性族群間基因交流的強度，會影響基因分化的程度 (Slatkin, 1987)。沼澤性水域或非永久性水域，蜉蝣往往是處女地最早建立群落的動物 (Brittain, 1982)，今日台灣沿緣蜉蝣分佈地的動物相豐富 (彭，個人聯絡)，顯示其已存活在該棲地很長的一段時間，一年多世代的生活史及其有限的遷徙能力是否造成族群基因交流長期不順暢，產生族群遺傳分化的現象？基於上述疑問，本研究提出台灣沿緣蜉蝣現今所呈現的不連續分佈是符合 vicariance hypothesis 解釋的假說。

三、核糖體核酸序列的遺傳特性與在昆蟲上之應用

真核生物細胞核核糖體核酸基因 (nuclear ribosomal RNA gene; nrRNA gene) 通常是具許多完全相似序列 (identical sequence)，以縱列重複排列 (clusters of tandemly repeated units) 的方式存在於一條或數條染色體上的核仁組成區 (nucleolus organizer)，是細胞轉錄作用 (transcription) 主要產物，佔細胞中核酸總量的 80-90%。nrRNA gene 重複拷貝單位之數量與散佈形式在不同物種的基因組 (genome) 中有極大的變化，在原核生物 (prokaryotes) 是 7 重複，而真核生物如某些哺乳類和昆蟲有

幾百次重複數，在植物甚至可達上千次 (Long and Dawid, 1980)。Arnheim (1983) 曾提到非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 幾百個 nrRNA gene 重複位在單一染色體上，而人類者可在 5 對染色體上發現。Indik and Tartof (1980) 利用電子顯微鏡 (electron microscope) 分析 rDNA-rRNA hybrid 的研究指出，果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 單倍數基因組 (haploid genome) 中具有 200 個拷貝數，是位在 X 和 Y 染色體上。昆蟲每一重複單位由高度保守的密碼序列 (coding sequence) 和短而多變異的非密碼間隔序列區 (noncoding spacer regions) 構成。如圖一所示，密碼序列包括 18S、5.8S 和 28S rRNA gene，非密碼間隔序列區則是指可進行轉錄的 ITS (internal transcribed spacer)：ITS1 和 ITS2；分別位於 18S、5.8S rRNA gene 之間和 5.8、28S rRNA gene 之間。各重複單位被 IGS (intergenic spacer) 分隔，IGS 又位在啟動子 (promotor) 與 18S gene 之間的 ETS (external transcribed spacer) 及無法進行轉錄的 NTS (nontranscribed spacer) 所組成 (Gerbi, 1985)。

細胞核小核糖體 DNA (rDNA) 之重複單位並非如單次拷貝基因 (single-copy gene) 一般獨自進行演化，而是以一致性演化 (concerted evolution) 進行，並導致種內獨特性序列的同質性 (homogeneity) 相對地高 (Hills and Dixon, 1991; Fritz *et al.*, 1994; Vogler and DeSalle, 1994)。在 1960 年代中期到 1970 年代中期，大量 DNA 的重新黏合 (reannealing) 與雜交研究解析出真核生物基因組的結構和組成，發現多細胞生物的基因組不僅由單一拷貝序列組成，也帶有大量重複序列家族 (repeated-sequence family)，而且這些家族在種內彼此是極度相似的，Brown *et al.* (1972) 最早提出核糖體 DNA 的重複單位進行一致性演化的現象 (cf. Graur and Li, 2000)。他們從非洲爪蟾 *X. laevis* 和 *X. borealis* 的 nrRNA gene 比對中，除了發現不令人驚訝的結果；兩物種的整個 18S 和 28S genes 非常相似；但是 NTS 區域卻極相異。然而，NTS 區域在每個體內以及種內體間是非常類似，Brown *et al.* 認為同質性是受水平演化 (horizontal evolution) 機制所維持，突變能水平分散到多基因家族的每個成員中，因此提出 NTS 區域在每個物種內是曾經共存演化，而在種間曾快速地分化的結論。陸續有學者以術語 “sequence coevolution” (Edelman and Cally, 1970) 和 “coincidental evolution” (Hood *et al.*, 1975) 表示此現象，但是 concerted evolution (Zimmer *et al.*, 1980) 最常被立獻引用 (cf. Graur and Li, 2000)。

真核生物的 rDNA 是所有細胞的組成份，因此總萃取量高，再者，它擁有縱列重複的基因、可進行轉錄區的二級結構與 spacer regions、有不斷演化速率的 coding sequences 以及一致性演化等特性，因此有顯現門 (phyla) 階層到族群 (population) 階層以生物體間親緣關係的潛力 (Tautz *et al.*, 1987)。

rDNA 中 noncoding spacer regions 通常被視為是功能性低的 DNA 片段，演化速度較快。ITSs 位在 rRNA gene 之間，而 rRNA gene 高保守性的序列普遍存在各類生物，因此易於藉由廣泛性的引子 (universal primers) 將 ITSs 擴增出來 (amplify) (George, 1996)。因此檢測 ITSs 的歧異度，日益成為探討近親分類群間親緣關係 [例如：同胞種 (sibling species) (Wesson *et al.*, 1993; Christian *et al.*, 1994; Vogler and DeSalle, 1994) 或隱身種 (cryptic species) (Cornel *et al.*, 1996)] 與族群分化 (Malafronte *et al.*, 1999; Manguin *et al.*, 1999; Mukabayire *et al.*, 1999) 之偏好使用遺傳標誌物。

四、細胞核轉譯延長因子的遺傳特性與在昆蟲上之應用

細胞核轉譯延長因子基因 (nuclear translation elongation factor gene) 在 *Drosophila* 的基因組中包括 EF-1 α 1 (EF 1 alpha 1) 和 EF-1 α 2 兩種型式 (paralogous copies)，分別位在 chromosome 2R 和 3R 上；這兩型的氨基酸 (amino acid) 序列在種間的差異程度約 10% 與種間歧異程度類似 (Hovemann *et al.*, 1988)。Danforth and Ji (1998) 曾提出蜜蜂和螞蟻的 EF-1 α 同樣具有兩型，認為這一舊古老基因是在種化事件之前發生 gene duplication 事件，並推測這兩型 EF-1 α 可能廣泛分佈在全變態昆蟲 (Homometabola) 中。

EF-1 α 是構成 EF 1 三個成分之一的部分，其氨基酸序列在不同物種間是相當保守的，例如：honey bee *Apis mellifera* 和甲殼綱 (crustacean) 的 *Artemia salina*，雖然已分歧 5.5 百萬年之久，但是氨基酸序列和 nucleotide 序列仍然分別高達 89% 和 73% 的相似度 (cf. Cho *et al.*, 1995)。另外，其在靠近 N-terminus 以及 Ala-92、Lys-244、Lys-273 鄰近區域的序列，種間相似度高，一般認為 N-terminus 和後三者分別是 GTP (guanosine triphosphate) 與 tRNA 的結合位置 (Walldorf *et al.*, 1985)。

在 RNA 轉譯成蛋白質的過程中，氨基醯 tRNA (aminoacyl-tRNA; aa-tRNA) 要和核糖體 (ribosome) 的 aminoacyl site 結合需要 GTP 提供能量，此時，EF-1 α 會先與 GTP 結合，再與 aa-tRNA 形成三元複合體 (ternary complex)，以輔助 aa-tRNA 和核糖體的結合，促使 polypeptide chain 延長 (Maroni, 1993; Palumbi, 1996)。另外，這個蛋白質和一些細胞骨架蛋白 (cytoskeletal protein) 有交互作用，特別是肌動蛋白 (actin) (Durso and Cyr, 1994)。Webster (1985) 提到 EF-1 α 的含量在生物成長後有降低的趨勢，似乎在老化的過程中參與作用 (cf. Maroni, 1993)，不過，成年女性比男性高出 5-10 倍的含量 (Walldorf *et al.*, 1985)。相反地，在藉由操控 heat-shock promoter 導致壽命延長的情況下，EF-1 α 表現量會增加。

以往分子系統分類學者喜愛利用高度保守、低拷貝數的 protein-coding nuclear gene 推論分化時間久遠之生物的親緣系統 (phylogeny)，並普遍認同可信賴之分子親緣推論需要多個未連鎖基因序列的資訊。是以，這一條大約 1.4 kb 的 EF-1 α coding 序列常獨自 (Danforth and Ji, 1998; Danforth *et al.*, 1999) 或和 nrDNA (Hemiptera: Membracidae, Cryan *et al.*, 2000) 結合，用來分析較高階層物種間的親緣關係。但是，Cho *et al.* (1995) 認為這類基因具有快速演化的同義置換 (synonymous substitution) 和 intron 片段，應該帶有大量的親緣訊息，可應用於低階分類群。他們曾經利用 EF-1 α 重建近代分化的夜蛾亞科 (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothine) 的親緣系統，所得分群結果與前人的型態以及功能異構酵素研究結果一致。雖然 EF-1 α 受到功能限制，序列相對保守，但是許多分子系統分類學者提到，其本身 paralogous copy 的特性可能將混亂物種間的親緣關係 (Friedlander *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1995; Danforth and Ji, 1998)。

二、研究目的

本研究利用分子生物技術進行選殖與定序台灣沿緣蜉蝣細胞核 rDNA 和 EF-1 α 兩 DNA 片段，並進行序列的分析，以了解片段的遺傳變異和分子演化。藉由族群遺傳結構評估族群間基因交流，以偵測台灣沿緣蜉蝣長距離擴散的可能性與程度。再者，重建台灣沿緣蜉蝣的親緣地理型式 (phylogeographical pattern) 及評估地理區域間族群遺傳分隔的假說。最後評估 rDNA 和 EF-1 α 所呈現的親緣是否具一致性。

二、材料與方法

一、材料採集

(一) 採集地點

本研究之初，將台灣依中央山脈的區隔分成東、西兩半部，而西部依地理上的分隔可劃分為三個地區：一、中央山脈北段和苗栗台地之間的北部地區；二、苗栗台地和玉山山脈之間的中部地區；以及三、玉山山脈以南的南部地區。

Horn (1978) 提到，昆蟲學者在野外很難正確地界定一群只和群外個體而沒有和群外個體交配的昆蟲群 (insect groups) 之實際大小，因此，一般將一群進行交配的區域性蟲群 (local group) 當作是一個族群。台灣沿緣蜉蝣大量分佈於本島西部低海拔且水質良好之沼澤濕地。本研究的材料採集自全省 13 個採樣點，分別屬於北、中、南、東共 8 個代表性靜水型沼澤，並將每個採樣點的沿緣蜉蝣定為一個族群。台灣北部有三個採樣區共 4 個採集點，分別為宜蘭雙連埤 [2 個；大池 (LP) 和小池 (MP)]、桃園大溪沼澤濕地 (TH) 及新竹大埔水庫地區沼澤濕地 (TP)；中部有兩個採樣區共 2 個採集點，為魚池 (YC) 和日月潭 (JY)；南部只有南仁山一個採樣區共 5 個採集點，分別為古湖 (KU)、大宜蘭潭 (TI)、3.7 km 小潭 (LA)、4 km 小潭 (LB) 和大水域 (TS)；東部有兩個採樣區共 2 個採集點，為花蓮吉安 (CA) 和壽豐 (SF)。這些採集點中，有大溪、吉安和壽豐三點是屬於暫時性的水域，只有在春夏季才保持濕地狀態，其餘時節都處於乾燥狀態；剩餘樣點均屬於永久性水域。採集點的詳細資料和採樣區的位置如表一和圖二所示。

(二) 取樣方法與鑑定

在每一個研究樣點之適當距離再取 3 個採樣點，使長 12 cm、寬 10 cm、300 μm 細孔之細撈網撈取水生昆蟲，將獲者置入裝有 95% 酒精的容器內固定保存。蟲體帶回實驗室後，主要根據張 (1992)、康 (1993) 和 康等 (1994) 檢索表，在解剖顯微鏡下挑出沿緣蜉蝣並置於 1.5 ml 的離心管中，馬上進行 DNA 萃取或保存在 -70°C 冰箱備用。

二、分子技術

(一) DNA 萃取與定量

DNA 萃取技術主要參考自 Hunt (1997)，首先將整隻沼緣蜉蝣置於液態氮中研磨至粉末狀，加入 extraction buffer (2X CTAB 和 β -mercapto-ethanol 以 10 ml:40 μ l 比例配成) 600 μ l 混合均勻，放入 55°C 水浴 30 分鐘。加入氯仿及異丙醇之混合有機溶液 (chloroform:isoamyl alcohol = 24:1) 600 μ l 上下翻轉混合進行萃取，混均後室溫下 8,000 rpm 離心 10 分鐘 (Sigma 2K15, Nr. 12143 rotor)，取出上清液再一次重複氯仿及異丙醇之混合有機溶液 600 μ l 萃取步驟。最後再一次得到的上清液，加入 0.1 倍體積之 3 M NaOAc 翻轉混合，再加入等倍體積 isopropanol，置於 -20°C 沉降 DNA 30 分鐘或隔夜。4°C、8,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液並瀝乾後，加入 200 μ l TE/RNase buffer [RNase: 1 X TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH = 8.0) = 0.01:1] 溶解 DNA，再於 37°C 水浴 30 分鐘。0.1 倍體積之 3 M NaOAc 翻轉混合，再加入等倍體積 isopropanol，置於 -20°C 沉降 DNA 30 分鐘或隔夜。4°C、8,000 rpm 離心 10 分鐘，倒棄 isopropanol 後沿管壁加入 500 μ l 70% 酒精將鹽類洗淨，再以 4 °C、8,000 rpm 離心 2 分鐘，倒棄酒精並風乾後，將 DNA 溶於 TE buffer。利用不知量的 uncut λ DNA，定量所萃取之基因組 DNA (genomic DNA) 後，置於 -20 °C 冰箱中保存待用。

(二) 聚合酵素連鎖反應

1. 引子 (primer) 的設計

(1) rDNA

搜尋登錄在 GenBank 和 EMBL (European Molecular Biology Laboratory) 核酸序列資料庫上有關蜉蝣目 rRNA 基因序列資料，只得到 18S rDNA (accession number U65107) 和 28S rDNA (accession number U65167) 部分序列各一筆資料的結果，在缺乏最近緣種相關序列參考下，本研究利用 Turbeville *et al.* (1991) 已完成定序之節肢動物門 18S rDNA 序列，以及其他學者 (Tautz *et al.*, 1987; Pashley *et al.*, 1993; Whiting *et al.*, 1997) 陸續發表之眾多昆蟲目的 18S 及 28S rDNA 序列；包括蜻蛉目 (Odonata)、脈翅目 (Neuroptera)、長翅目 (Mecoptera)、毛翅目 (Trichoptera)、鱗翅目 (Lipidoptera)、鞘翅目 (Coleoptera)、撫翅目 (Strepsiptera)、膜翅目 (Hymenoptera)、

雙翅目 (Diptera) 和蠎目 (Siphonaptera)，具高保守性之 18S 3' 端及 28S 5' 端 rDNA 序列，如圖三箭頭所示區域，設計合成一對非種別特異性 ITS 引子：I1 和 I2；以台灣沼緣蜉蝣基因組 DNA 為模板，進行 PCR 擴增其 rDNA 序列。此引子擴增出一段長約 2200 個鹼基對 (base pairs; bp)，包含 18S 和 28S rDNA 部分序列及完整的 ITS region 序列 (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) 的 DNA 片段。為縮短 18S 和 28S rDNA 部分序列片段長度及取得 major band，近一步從多個台灣沼緣蜉蝣個體之 rDNA 序列中重新設計出專一性引子：I3 和 I4。參與反應之引子與其分子序列、位置，列於表二。

(2) 細胞核轉譯延長因子

利用 Palumbi (1996) 提出之 universal primer EF1 和 EF2 作為本研究之用。引子分子序列、位置列於表二。

2. nuclear DNA 擴增反應

(1) rDNA 片段增殖

將先前萃取所得之 genomic DNA 約 120 ng、10 μl 10X 緩衝液 (reaction buffer) 和 10 μl 的氯化鎂放入 PCR 反應管，再以無菌水補足到體積 70 μl，混均後，滴兩滴礦物油於混液表面，接著放反應管於溫度循環機 (Thermal cycler PTC 100) 上進行 DNA 的雙股變性反應 (denaturation)：95°C，4 分鐘，1 個循環。反應結束迅速將管子插在冰上 2 分鐘。取 10 μl 的 dNTP，濃度 2 pmole 的引子 (I3/I4) 各 10 μl 及 0.8 μl 聚合酵素 (*Taq* Polymerase, Promega, Madison, USA) 加入礦物油面下的反應液中，將總體積 100 μl 的反應液進行 touchdown PCR 反應 (Don *et al.*, 1991)；反應自第一個黏合溫度 (annealing, 57°C) 開始。Palumbi (1996) 曾建議如果合適的引子在 PCR 反應過程中仍擴增出其他非主流片段，可利用高度緊縮的黏合溫度步驟去除這類干擾，本研究 touchdown PCR 詳細溫度循環流程如附錄1。PCR 結束後，取 5 μl 的 PCR 產物，加上 1 μl 6 倍的染色溶液 (dye) 和已知分子量 DNA 標記物 (DNA ladder) 於一塊 1% 琼脂糖凝膠 (agarose gel, Amresco) 中進行 100 伏特電壓的電泳反應，經過溴化乙啶螢光染劑 (ethidium bromide; EtBr, 0.5 μg/ml) 處理 30 分鐘後，

於紫外線燈上拍照，以檢測 PCR 擴增產物的片段之正確性與質量。

(2) 細胞核轉譯延長因子片段增殖

增殖此片段的反應條件與 rDNA 片段增殖墨貳，只是將引子換成 EF1 和 EF2，並以下列 PCR 循環溫度取代 touchdown 條件。92°C，35 秒；56°C，1 分 30 秒；72°C，1 分 30 秒，以上條件連續 2 次；再以下列條件連續 30 次重複：92°C，35 秒；54°C，1 分 30 秒；72°C，1 分 30 秒；最後，再以 72°C，反應 10 分鐘。PCR 產物檢測步驟如 rDNA 所述。

(三) 純化

DNA PCR 反應的產物有時所含的片段並不只有一段，而且有許多離子、dNTP、引子存在，所以必須經過純化。當 PCR 產物不只一段或不乾淨時，先將所得的 PCR 產物放在 1% 琼脂凝膠，以 1X TAE 的緩衝液，進行 70 伏特電壓之電泳，經溴化乙啶螢光染劑染色後，在紫外光燈下，切下含有正確分子量之 DNA 條紋的膠塊，以 agarose gel DNA extraction kit 純化。如果 PCR 產物十分乾淨，則直接用 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) 純化。

(四) T-A cloning

取 50 ng 純化後之 PCR 產物於 0.5 ml 離心管中，加入 5 μl 2X ligation buffer，0.4 μl T-vector DNA (Promega) 及 1 μl T4 ligase，利即無菌水調整反應總體積至 10 μl。混合均勻後，置於 4°C 水浴槽中反應過夜，使 PCR 產物連結至載體上。

(五) 轉型作用 (transformation)

1. 製備噬菌體細胞 (competent cell)

吸取 500 μl 已隔夜培養之大腸桿菌菌液至含 30 ml LB 中，於 37°C shaker 培養 2 小時。隨後取出 25 ml 菌液注入預先冷卻的離心管中，於 4°C 下以 4,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，再加入 20 ml 預冷之 50 mM CaCl₂ solution，輕搖至沉澱菌種溶解，冰浴 30 分鐘以上，使大腸桿菌活化、沉澱。之後再於 4°C 下以 4,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，再加入 4 ml CaCl₂ solution，輕搖至沉澱菌種溶解，

並置於 4°C 冰浴中，以備進行質體轉殖。

2. 轉型作業

取 200 μ l 已活化之菌液加入 5 μ l 已經與 PCR 產物連接好之載體溶液，均勻混合後冰浴 40 分鐘，接著放入 42°C 水浴 1 分 30 秒後，迅速投入冰水中，使載體進入大腸桿菌中並待塗碟。

3. 塗碟

取出含有 ampicillin (50 μ g/ml) 的 LB 平板培養基，塗上 20 μ l X-gal (50 mg/ml) 與 100 μ l IPTG (100 mM)，靜置 30 分鐘待藥品吸收，將經過轉型之勝任細胞以 100 μ l/plate 的量均勻塗抹於 LB agar 表面，待菌液乾後，置於 37°C 培養隔夜。

(六) 微量製備質體 DNA

1. 培菌

將經過培養並呈白色的菌落轉接到含 50 μ g/ml ampicillin 之 5 ml LB 溶液中，於 37°C 隔夜培養，以備抽取質體 DNA。

2. 微量抽取

取 1.5 ml 隔夜培養之菌液，13,000 rpm 離心 1 分鐘後，倒棄上層液，加入 100 μ l 預冷之 solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA)，震盪後靜置室溫 5 分鐘。接著加 200 μ l solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)，上下翻轉並置於冰上 5 分鐘，加入 150 μ l 冷卻的 solution III (3 M KOAc, pH 4.8)，混合後冰浴 5 分鐘，接著以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液加入 800 μ l 95% 酒精，混合後靜置 5 分鐘，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，倒棄酒精並風乾後，加入 50 μ l RNase/TE buffer (10 μ g/ml)，輕拍混合後保存於 4°C。

(-) DNA 定序

DNA 定序是依 Sanger *et al.* (1977) 提出之雙去羣核苷鏈終止法 (dideoxynucleotide chain termination, 所用藥品為 Cycle Sequencing Ready Reaction

Kit (Perkin Elmer)，以步驟（六）製備完成之質體 DNA 為模板，加入 Taq DNA sequencing polymerase (Amersham) 及放射性 ^{33}P -dNTP 做標示物，依據 Sequencing Kit 所提供之定序步驟；每個試樣分成 G、A、T、C 四管以進行 PCR 的反應，反應溶液每管總體積為 20 μl ，PCR 溫度循環儀條件設定為 95°C，3 分，將 DNA 的雙股變性打開，之後共進行 29 個循環：95°C，30 秒；57°C，30 秒；70°C，1 分。將 stop solution 加入反應後產物，在 6% 的 polyacrylamide-7 M urea gel 上進行電泳，將膠體轉附到 3 MM 濾紙上，再將膠片烘乾，以 BioMax X-ray film (Kodak) 感光，自動放射顯影 48-72 小時後，沖片，判讀 DNA 序列。

核酸序列自動定序由成大醫院病理部暨病理研究中心完成 (ABI PRISM™ 337 DNA Sequencer, Perkin-Elmer; ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin-Elmer)

三、資料分析

(一) DNA序列分析 (sequence analysis) 與親緣分析 (phylogenetic analysis)

1. 序列的整理與校對

利用網際網路將台灣沿緣蜉蝣 DNA 序列上傳至 GCG (Genetics Computer Group, Version 10.0, Madison, Wisconsin) 基因資料庫中，以 FASTA 程式進行比對搜尋，確定定序所得序列是昆蟲之 rDNA 片段。

2. 序列的排列 (alignment)

正確的分子序列先以 Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) 程式完成排列及比對差異之工作，再經人為整理。並根據先前出版的果蠅 (*Drosophila melanogaster*, accession number M21017; *D. yakuba*, Z28416) 與亞洲蟑螂 (Asian cockroach; *Blattella asahinai*, AF321253) rDNA 序列次序作為模式參考，而且以位在 18S 和 5.8S rDNA 之間為 ITS1；5.8S 和 28S rDNA 之間為 ITS2 的定義，逐一定義出台灣沿緣蜉蝣 rDNA coding 和 spacer 之相關位置。編排 spacer 時由於此區鹼基變異較大，因此逐一將 spacer 挑出進行初步排序，再依序源性的原理逐一檢視與修正。

3. 序列特性分析

利用 DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution, Version 4.10) (Xia and Xie, 2001) 來計算獨特性 haplotypes 序列的數量 及 其鹼基組成的百分比，並初步分析置換是否已達到飽和程度。再以 MEGA 2.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 2.0) (Kumar *et al.* 2001) 套裝軟體先比較彼此間鹼基對替換 (transition; 兩個嘌呤或嘧啶間的突變，A/G 或 T/C 突變) 及 鹼基對顛換 (transversion; 嘌呤與嘧啶間的突變，TC/AG 突變) 的發生頻率及比值，來計算台灣沼緣蜉蝣序列彼此的變化。

4. 親緣樹的建構

以 Kimura (1980) 雙參數模式 (two-parameter model) 的方法計算鹼基替代率及遺傳距離，完成 haplotypes 的 neighbor-joining (NJ) 分析 (Saitou and Nei, 1987)。NJ tree 中每一個 group 之可信度利用不加權重、重複一千次 bootstrapping (Felsenstein, 1985) 分析檢測；bootstrap 數值大於 0.7 相當於統計學上 95% 信心水準支持 (Hillis and Bull, 1993)。此時亦計算兩兩比較 (pairwise comparison) DNA 基因型 (genotypes) 間的突變數，所得數據以 MINSPNET 軟體 (Excoffier and Smouse, 1994) 建構 minimum spanning network (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier, 1993)，藉以追溯 haplotypes 間的親緣關係與演化歷史。

(二) 族群遺傳分析 (population genetic analysis)

利用 DnaSP (DNA Sequence Polymorphism, Version 3.0, Rozas and Rozas, 1999) 計算族群內、族群間及地理區間的遺傳歧異度 (genetic diversity)，以 haplotype diversity (h) (Nei and Tajima, 1983) 和 nucleotide divergence (θ) (Jukes and Cantor, 1969) 來量化顯示族群的遺傳歧異度。

最小遺傳重組事件 (minimum recombination events)、基因轉變 (gene conversion)、中性測驗 (neutrality test) 及評估族群間及地理區間的基因交流 (Nm) 程度，均利用此軟體運算； Nm 表示每個世代族群間遷徙個體數，此值可用来间接評估基因流傳的大小 (Slatkin, 1985)。若 Nm 值等於 1，表示在地區性族群間每一個世代，

有一個個體交流，此足以防止藉由個別族群基因漂變所產生的基因分化。因此，當 Nm 值大於 1，即代表族群間會有較強基因交流。根據 $F_{ST} = 1/(1+4Nm)$ 的公式，估計遺傳分化程度，其中 N 表示族群中有放族群量， m 表示個體遷徙速率。 F_{ST} 是族群間遺傳分化指數，主要是判斷族群間遺傳分化 (genetic differentiation) 的情形，若 $F_{ST} < 0.05$ ，則代表族群間幾乎沒有遺傳分化，若 $0.05 < F_{ST} < 0.15$ ，則表示族群間的分化程度中等，若 $0.15 < F_{ST} < 0.25$ ，代表族群間是高度分化，若 $F_{ST} > 0.25$ 時，表示族群間分化程度非常高 (Wright, 1978)。此時，測驗 Nm 值與地理距離間的相關，並以測試 isolation by distance，並以 SAS 統計程式中之 F test 測試其可信度。最後以 D* statistic 測試分子序列是否受天擇影響 (Fu and Li, 1993)。

(三) 哈溫平衡之檢測

在一個沒有遷移的族群且具大量的組成個體、個體間行有性生殖且交配方式為逢機配對，此時此族群沒有發生突變及不受天擇作用的情況下，此一族群的遺傳型式應符合哈溫定律 (Hardy-Weinberg equilibrium)，並稱為一理想族群 (Hedrick, 1983, 1984)；但是，大部份的生物族群，常會受到不屈的演化機制影響，包括族群過小而使得族群發生遺傳漂變效應，以及天擇 (selection)、突變、基因流傳、交配型式 (system of mating) 或遷移 (migration) 的影響而偏離哈溫定律，造成從這一世代到下一世代，族群中基因頻度或基因型頻度的改變，就是微演化 (microevolution) 的發生 (Hedrick, 1984)。台灣沿緣蜉蝣現生族群是否處於哈溫平衡的狀態，將利用 χ^2 (chi-square) 檢定。

參、結果

一、定序 DNA 模版增殖結果

引子 I3 和 I4 可成功地以 PCR 技術擴增台灣沿緣蜉蝣之完整 ITS region 片段及部分 18S 和 28S rRNA 部分序列，在 1% 洋菜膠上顯示主要產物大約為 900 餘基對，少數個體另外有微量約 1.5 kb 之產物。引子 EF1 和 EF2 可成功地以 PCR 技術增殖台灣沿緣蜉蝣 EF-1 α 部分序列，在 1.5% 洋菜膠上顯示單一主要產物大約為 200 餘基對，僅有少數個體另外有大約為 350 餘基對之產物。上述非主產物之片段，經純化、定序並以 FASTA 程式比對搜尋 GenBank 核酸資料庫後，得到非 rDNA 片段序列或 EF-1 α 序列，因此不影響親緣分析。

二、DNA 序列特徵

前人以 rDNA 片段做為遺傳標示物對昆蟲做分子層次探討時 (Crabtree *et al.*, 1995; Cornel *et al.*, 1996)，每個個體會挑取至少 2 clones 做定序，以檢測個體間的變異。本研究隨機挑選總數 1/8 的個體送 2 clones 做定序，沒有偵測到個體間變異。Danforth and Ji (1998) 發現蜜蜂個體間存在非同源性的拷貝才沒有在台灣沿緣蜉蝣的 EF-1 α 基因中發現。

(一) 餘基組成

1. rDNA

本研究共定序 130 個個體，發現其 rDNA 序列長度呈現高度的多型性，依片段長度大致可區分成三型：SeqI 約 850 bp、SeqII 885 bp 及 SeqIII 892 bp。排序後得到一致性長度 979 個餘基，許多 1~5 個餘基之 *indel* (insertion/deletion) 分散在其中，SeqI 另外在 189-206 與 238-254 排序位置上發生兩個大片段的 *indel*。昆蟲的 noncoding DNA 普遍存在重複序列 (repetitive DNA) (Hoy, 1994)，台灣沿緣蜉蝣的 rDNA 片段以不完整重複序列 (imperfect repeat sequence) (AG)n、(AT)n、(TC)n 和 (GT)n，n = 2~3、出現 2~5 次為主要類型。根據先前出版的果蠅及亞洲蟑螂 rDNA 序列，而且以位在 18S 和 5.8S rDNA 之間為 ITS1；5.8S 和 28S rDNA 之間為 ITS2 的定義，本研究定序出台灣沿緣蜉蝣約 145 bp 的 18S rDNA、110 bp 的 ITS1、155

bp 的 5.8S rDNA、172 bp 的 ITS2 以及 299 bp 的 28S rDNA（表三）；5.8S 長度和大部分的真核生物（約 160 nt）一致（Hills and Dixon, 1991）。整段 rDNA 具有 597 個變異位置（variable sites），其中 86% (514) 是帶有親緣訊息位置（parsimonious informative sites），變異位置和親緣訊息的分佈比例分別是 ITS2 > ITS1 > 5.8S > 28S > 18S 區域（表三），亦即 rDNA 的組成片段中以 ITS2 變異最大。整段 rDNA 序列變異中，大部分的變異是由於 nucleotide substitution，點突變為 64%，rRNA genes 更高達 83% 以上，而鹼基對替換及顛換的比值 (ts/tv) 是 0.96 (0.073/0.076)，此值大於期望值 0.5，顯示此 DNA 序列仍持續演化中（Graur and Li, 2000）；而 *indel* 佔序列所有變異 36%，於 ITSS 中更出現 55% 以上。利用 DAMBE 軟體分析台灣沼緣蜉蝣 rDNA 序列，nucleotide 頻率的異質性（heterogeneity）無顯著地個體間差異存在 ($P = 0.0619$)，是一段以 A/T (58%) 為主的序列，rDNA 各個組成片段的鹼基，A+T（表三）均高達 54% 以上；ITS1/ITS2 甚至有 71%/60%，這符合大部分 noncoding 區域是 AT rich 的特徵（cf. Graur and Li, 2000）。根據 nucleotides 間鍵結能量的原則所推論之 DNA 演化速率，台灣沼緣蜉蝣 rDNA 基因尚處於快速演化的階段；DAMBE 套裝軟體初步分析置換飽和程度顯示 rDNA 序列已達到低度飽和（Little Substantial, significant difference）。ITS region (ITS1-5.8S-ITS2) 的鹼基組成、突變率和所帶訊息均與整段 rDN 相似（表三）。

2. EF-1 α

細胞核 EF-1 α 共定序得 63 個胺基酸，根據 DnaSP 分析，這 189 個 DNA 序列皆能轉譯，沒有 nonsense codon 存在。其具有 94 個不存在 *indel* 之變異位置，而親緣訊息位置（parsimonious informative sites）幾乎散佈在整個序列中，分別是胺基酸第一個位置帶有 24 個 (29%)、第二個位置 15 個 (18%) 及第三個位置 44 個 (53%)。鹼基對替換及顛換的比值是 0.93 (0.055/0.059)，此值大於期望值 0.5，顯示此 DNA 序列仍持續演化中。利用 DAMBE 軟體分析台灣沼緣蜉蝣 EF-1 α 序列，nucleotide 頻率的異質性（heterogeneity）無顯著地個體間差異存在 ($P = 0.0737$)，鹼基 A+T 的組成比例是 42.9%；初步分析置換飽和程度顯示此基因是處於低度飽和。

（二）haplotype diversity 和 nucleotide diversity

1. rDNA

利用 DnaSP 軟體分析發現 130 個 rDNA 序列存在 87 個獨特的 haplotypes，haplotype diversity (h) 總平均值為 0.980 ± 0.006 ，而 nucleotide diversity (θ) 是 0.133 ± 0.013 (表四)，ITS region 及 rRNA genes 有相似歧異度 (表三)，但是 ITSs 呈現較低的 haplotype diversity (尤其是 ITS1, $h = 0.469$) 和高度顯著的 nucleotide diversity ($0.2383/0.2317$)，這說明 ITSs 所受到的分子趨力 (molecular drive) 遠大於 rRNA 基因。若從族群的層次來看 (表四)，這 130 個個體分散到 13 個族群中，共產生 108 個獨特的 haplotypes，除了南仁山的 4 km 湖區 (LB) 因採樣數過少，有採樣誤差之虞不計外，族群內的遺傳變異以南仁山的大水域樣區 (TS) 相對較低外 ($h = 0.700 \pm 0.218$, $\theta = 0.063 \pm 0.037$)，其餘族群的 haplotype diversity 均高達 0.900 (0.891~1.000) 以上，nucleotide diversity 範圍在 0.003~0.261。再從地理區層次來看 (表四)，北、東、南和中部族群 haplotype diversity 均高達 0.950 以上，北部和東部的 nucleotide diversity ($0.148/0.216$) 高於南部與中部的族群 ($0.065/0.034$)。獨特性 haplotypes 隨著地理區的擴大有漸減的趨勢，顯示有許多遺傳組成相應的個體分散在不同的族群內或地理區域內，再者，大部分族群內的 haplotype 和 nucleotide diversity 高於族群間或地理區間，這些結果暗示 dispersal 的發生。

2. EF-1 α

利用 DnaSP 軟體分析發現 (表五) 130 個 EF-1 α 序列存在 53 個獨特的 haplotypes，haplotype diversity 總平均值為 0.878 ± 0.025 ，而 nucleotide diversity 是 0.114 ± 0.010 。若從族群的層次來看，這 130 個個體分散到 13 個族群中，共產生 78 個獨特的 haplotypes，除了南仁山的 4 km 湖區 (LB) 因採樣數過少，有採樣誤差之虞不計外，族群內的遺傳變異範圍大，haplotype diversity 從 0.286 (南仁山 3.7 km 湖區；LA) ~0.978 (南投魚池；YC)；nucleotide diversity 範圍在 0.002 (南仁山 3.7 km 湖區；LA) ~0.221 (桃園大溪；TH)。再從地理區層次來看，北、東、南和中部族群 haplotype diversity 分別是 0.823、0.949、0.714 和 0.781；nucleotide diversity 是 0.148、0.056、0.097 與 0.089。獨特性 haplotypes 隨著地理區的擴大有漸減的趨勢，顯示有許多遺傳組成相應的個體分散在不同的族群內或地理區域內，再者，大部分族群內的 haplotype 和 nucleotide diversity 高於族群間或地理區間，這些結果暗示

dispersal 的發生。

綜合 rDNA 和 EF-1 α 在不同分群層次的 haplotype diversity/nucleotide diversity，rDNA 的歧異度均比 EF-1 α 來高，顯然地，EF-1 α 的分子演化是比 rDNA 片段受限。另外，這兩種分子標誌物均指出宜蘭雙連埤大池 (LP) 族群的 nucleotide diversity 是相對高的，而宜蘭雙連埤小池 (MP)、南仁山古湖 (KU)、南仁山 3.7 km 湖區 (LA) 和南投日月潭水庫 (JY) 均相對低。再者，北部地理區和南部地理區的族群 nucleotide diversity 是相對高的。最後，族群內的遺傳歧異度大多高於族群間或地理區域間，意謂著 dispersal 的發生。

(三) 重組事件和中性測驗

1. rDNA

以 DnaSP 軟體檢測 rDNA 序列最少的重組事件和測驗中性假說 (表四)，得到 130 個序列至少發生 52 次重組事件，而在族群層次和地理區族群層次各發生 79 次和 96 次，這些重組事件以 ≤ 5 bp 片段為主 (35.4%)，而 ≤ 10 bp 片段有 18.9%， ≤ 15 bp 片段有 16.6%， ≤ 20 bp 片段有 10.3%， ≤ 25 bp 片段有 6.3%， ≤ 50 bp 片段有 5.1%， > 50 bp 片段有 7.4%。Tajima's 和 Fu and Li's D* statistic 偵測到南部地理族群和大埔樣點 (TP)、雙連埤小池 (MP)、吉安 (CA)、南仁山大水域 (TS) 等族群顯著偏離中性假說，但是全部樣本並沒有偏離中性。

2. EF-1 α

以 DnaSP 軟體檢測 EF-1 α 序列最少的重組事件和測驗中性假說 (表五)，得到 130 個序列至少發生 19 次重組事件，而在族群層次和地理區族群層次各均發生 32 次，這些重組事件以 ≤ 5 bp 片段為主 (57.8%)，而 ≤ 10 bp 片段有 21.9%， ≤ 15 bp 片段有 4.7%， ≤ 20 bp 片段有 1.6%， ≤ 25 bp 片段有 3.1%， ≤ 50 bp 片段有 9.4%， > 50 bp 片段有 1.6%。Tajima's 和 Fu and Li's D* statistic 偵測到南仁山大水域 (TS) 族群顯著偏離中性假說，但是全部樣本並沒有偏離中性。

三、基因譜系與 rDNA 和 EF-1 α lineage 結合 (association) 分析

1. rDNA

利用 DAMBE 軟體剔除非獨特性序列，將所得 109 個獨特性 haplotypes 輸入 MEGA 2.0 軟體，選取軟體中 neighbor-joining method 建構 unrooted haplotype tree，由重建的台灣沿緣蜉蝣親緣演化樹（圖四）結果顯示，所有台灣沿緣蜉蝣族群之個體樣本的親緣無明顯依地理區分群，親緣關係較近的個體在地理上彼此並沒有距離較短，應是 dispersal。由親緣樹形圖顯示所有台灣沿緣蜉蝣 rDNA haplotypes 應可分成七個大群，其中包括 11 個 (A-K) 小類群 (clades)，每一群均達統計上 95% 的信心水準，組成 clade 的個體來源與數量如表六所示。第一群 bootstrap 值為 87，包括 clade A-E，是由 75% 個體樣本組成；clade A 包括了 TP24 等 34 個 haplotypes，clade B 包括 CA13 等 5 個 haplotypes，clade C 包括 TH25 等 22 個獨特 haplotypes，clade D 包括 SF15 等 4 個 haplotypes，clade E 包括了 LB11 等 14 個 haplotypes；clades A-C 皆由來自各地理區的個體組成，clade D 的組成個體只缺北部族群，clade E 的組成個體只缺東部族群。第二群由 clade F 組成，只包括一個 TH17 個體。第三群是由 clade G 組成，只包括一個 LA22 個體。第四群 bootstrap 值為 100，由 clade H 組成，包括 YC11 等 4 個 haplotypes，組成個體只缺南部族群。第五群由 clade I 組成，只包括一個 TS11 個體。第六群 bootstrap 值為 100，由 clade J 組成，包括 TI15 等 10 個 haplotypes，組成個體只缺中部族群。第七群 bootstrap 值為 100，由 clade K 組成，包括 SF22 等 13 個 haplotypes，組成個體來自北部和東部族群。

為了探討不同 haplotypes 的演化歷史，並藉以推估台灣沿緣蜉蝣的遺傳結構，本實驗根據 rDNA 基因譜系，利用 MINSPNET 軟體依據 haplotype 間變異的鹼基位置，建構 minimum spanning network 以重建台灣沿緣蜉蝣的親緣地理型式，並依據兩項原則來探討最有可能的演化路徑，其一、新的 haplotypes 是從古老的 haplotypes 衍生而來；其二、若缺少基因交流，則新的突變可能被局限在原來的族群。Castelloe and Templeton (1994) 以中性學派的論點提出在 nested clade 圖形中，內部的 clades 是比尖端的 clades 古老 (cf. Templeton *et al.*, 1995)。由圖五所示，clade A-E 位於網狀圖內部，故其所攜帶的 haplotypes 為相對古老的，clade F-K 與古老者相互連結為相對新的 haplotypes。由表六 rDNA types 在地理上分佈的統計結果，可

以發現古老的基因型 (genotype) 散佈在本研究的各樣區當中，這些基因型和地理區沒有相關性，且經統計 (表六) 古老基因型占所有序列 75%，在比例上是相對高的；然而約 23% 新的基因型有被侷限在部分地理區的現象，例如：clade H 只出現在台灣北、東和中部，clade J 只出現在台灣北、東和南部，clade K 只出現在北部和東部，另外三個稀有的基因型 F、G 和 I 分別只分佈在 TH (0.8%)、LA (0.8%) 和 TS 族群 (0.8%) 中。基因型的分佈型式是受到基因相對年齡、基因漂變或是基因交流受限的影響所致？這部分將於討論章節中說明。

2. EF-1 α

利用 DAMBE 軟體剔除非獨特性序列，將所得 53 個獨特性 haplotypes 輸入 MEGA 2.0 軟體，選取軟體中 neighbor-joining method 建構 unrooted haplotype tree，由重建的台灣沿緣蜉蝣親緣演化樹 (圖六) 結果顯示，所有台灣沿緣蜉蝣族群之個體樣本的親緣也無明顯依地理區分群，親緣關係較近的個體在地理上彼此並沒有距離較短，應是 dispersal。由親緣樹形圖顯示所有台灣沿緣蜉蝣 EF-1 α haplotypes 應可分成五個大群，其中包括 7 個 (I-VII) 小類群 (clades)，每一群均達統計上 95% 的信心水準，組成 clade 的個體來源與數量如表七所示。第一群 bootstrap 值為 100，包括 clade I-III，是由 70% 個體樣本組成；clade I (bootstrap 值為 85) 包括了 SF26 等 15 個獨特 haplotypes，clade II 包括 SF27 等 16 個 haplotypes，clade III (bootstrap 值為 84) 包括 YC11 等 3 個 haplotypes；clades I-II 皆由來自各地理區的個體所組成，clade III 的組成個體只來自中部族群。第二群 bootstrap 值為 100，由 clade IV 組成，包括 LP25 等 4 個 haplotypes，組成個體只缺東部族群。第三群是 bootstrap 值為 70，由 clade V 組成，包括 TP15 等 9 個 haplotypes，由來自各地理區的個體所組成。第四群 bootstrap 值為 100，由 clade VI 組成，包括 LB21 等 3 個 haplotypes，組成個體只缺東部族群。第五群 bootstrap 值為 100，由 clade VII 組成，包括 TP12 等 3 個 haplotypes，只由北部族群構成。

為了探討不同 haplotypes 的演化歷史，並藉以推估台灣沿緣蜉蝣的遺傳結構，本實驗根據 EF-1 α 基因譜系，利用 MINSPNET 軟體依據 haplotype 間變異的鹼基位置，建構 minimum spanning network 以重建台灣沿緣蜉蝣的親緣地理型式。根據 network 原則，圖七顯示 clade I-III 所攜帶的 haplotypes 為相對古老的，clade

IV-VII 與古老者相互連結為相對新的 haplotypes。由表七 EF-1 α types 在地理上分佈的統計結果，可以發現古老的基因型散佈在本研究的各樣區當中，這些基因型和地理區沒有相關性，且經統計（表七）古老基因型占所有序列 70%，在比例上是相對高的；然而 6.2% 新的基因型有被局限在部分地理區的現象，例如：clade IV 只出現在台灣北、中和南部；再者，稀有的基因型 clade VI (2.3%) 只出現在 TH、YC 和 LB 族群中，而 clade VII (5.4%) 只分佈在北部 TP 與 TH 族群中。基因型的分佈型式是受到基因相對年齡、基因漂變或是基因交流受限的影響所致？這部分將於討論章節中說明。

本研究所利用的細胞核遺傳標示物之基因譜系都重建出一致的台灣沿緣蜉蝣親緣地理型式，顯示 haplotypes 隨機分佈在地理位置上，但是不論是親緣樹狀圖或網狀圖都顯示 rDNA 和 EF-1 α 並沒有存在共同組成的 clade，例如，雖然大部分 rDNA type K 序列 (60%) 相當於 EF-1 α type I，但是 type K 的 CA11 和 LP15 序列卻分別與 EF-1 α type II 和 V 結合（圖四 vs. 圖六）。不過，大部分之古老的 rDNA types (A-E) (77%) 和大部分之古老的 EF-1 α types (I-III) (75%) 結合，而新的 types 20% 和古老的 types 結合，新的 types (IVK, VJ, VK) 彼此結合只有 3.1%（表八），這符合數學機率原則，頻率高的彼此結合的機率最大，反之亦然，這顯示 rDNA types 和 EF-1 α types 之間是隨機結合的；此結果也符合孟德爾的遺傳原則，哪個基因和哪個基因配成一對，完全是隨機偶然發生的，屬於 linkage equilibrium，說明這兩個細胞核遺傳標示物是非連鎖的。各族群之細胞核基因型（rDNA types 與 EF-1 α types 結合）分佈組成與頻率分別如表一和圖八所示，type IA 廣泛存在族群中，type IE 主要存在北部 (TP、TH、MP) 和南部族群 (LA、TI)、type IH 主要存在北部族群（只有 TH 無）；各族群均具特有之 types，例如：TP 的 VIIA，TH 的 IF、VIIB 與 VIIC，LP 的 VK，CA 的 IIIH，SF 的 VJ，LA 的 IG，LB 的 IIE，TS 的 II，JY 的 IIIC 等。

四、族群遺傳

1. rDNA

以 DnaSP 測驗基因交流及遺傳分化的結果如表九。13 個族群間的基因交流值

(0.10~59.49) 和遺傳分化值 (0.004~0.863) 指出大部分族群彼此有頻繁的交流且遺傳呈現中度的分化，族群的基因交流值與地理距離的線性回歸分析圖（圖九）顯示基因交流程度和地理距離沒有相關 ($R^2 = 0.0000006$)，即不符合 isolation by distance。另外以同一個地理區的族群間結果來看，北部地理區內族群間 MP 和 TP、TH 是不分化的 ($F_{ST} < 0.05$)，基因交流度最高 ($Nm > 5$)。根據 Wright 島嶼模式，當族群間的 Nm 小於 1，則可能因基因漂變的作用而形成區域性分化，若 Nm 大於 1 時，基因漂變的力量不足以造成基因分化 (Slatkin, 1985); Hartl and Clark (1989) 也提出若 Nm 大於 4 時，此族群可能為一逢機交配的族群。東部地理區內 SF 和 CA 間具中度分化 ($F_{ST} = 0.118$)。南部地理區內除了 LB 族群可能因採樣數過少產生誤差而排除外，各族群間大多呈現中度分化且基因交流值均大於 1。中部地理區內 YC 和 JY 族群有高度分化 ($F_{ST} = 0.384$) 情形。再以同一個地理區為同一個族群來分析（表十一），除了東部和中部外，不論地理區族群間 Nm 均大於 1，表示地理區族群間基因交流順暢，不受阻礙，而北部和東部族群基因交流值更高達 4 以上，暗示它們是逢機交配的族群。

2. EF-1 α

以 DnaSP 測驗基因交流及遺傳分化的結果如表十。族群間的基因交流值 (0.02~ ∞) 和遺傳分化值 (0.013~0.935) 指出大部分族群彼此有頻繁的交流且遺傳呈現中度的分化，族群的基因交流程度和地理距離沒有相關，即不符合 isolation by distance。以同一個地理區的族群間結果來看，北部地理區內族群間 TP 和 TH 是不分化的 ($F_{ST} = 0.013$)，基因交流度最高 ($Nm = 19.36$)；LP 與 TP、TH 及 MP 呈中度分化 ($F_{ST} = 0.063\sim0.131$)。東部地理區內 SF 和 CA 不分化 ($F_{ST} = 0.032$)。南部地理區內除了 LB 族群可能因採樣數過少產生誤差而排除外，各族群間大多呈現中度分化且基因交流值均大於 1。中部地理區內 YC 和 JY 族群有高度分化 ($F_{ST} = 0.207$) 情形。再以同一個地理區為同一個族群來分析（表十一），不論地理區族群間 Nm 均大於 1，表示地理區族群間基因交流順暢，不受阻礙，而北部和南部族群基因交流值更高達 4 以上，暗示它們是逢機交配的族群。

rDNA 和 EF-1 α 都重建出一致的台灣沿緣蜉蝣遺傳分化和基因交流程度，顯示出族群間或地理區域間的遺傳分化低，兩個遺傳標示物同時指出中部地理區內 YC

和 JY 族群有高度分化，但是不同階層的遺傳分化或基因交流程度會因遺傳標示物差異而呈現不同結果，例如：rDNA 顯示北部地理區內族群間 MP 和 TP、TH 是不分化的 ($F_{ST} < 0.05$)，基因交流度最高 ($Nm > 5$)，而且北部和東部族群是逢機交配的族群 ($Nm = 4.73$)，但是 EF-1 α 顯示 MP 和 TP、TH 是高度分化的 ($F_{ST} = 0.238\sim0.353$)，而且北部和南部才是逢機交配的族群 ($Nm = 11.71$)。

三、討論

一、台灣沿緣蜉蝣的細胞核 ITSs DNA 序列演化特徵

所有的生物彼此都有相似之處，同時，也存在相異之處，而生物體之間的共通點就是以核酸為遺傳物質，因此，Ridley (1993) 認為，現存生物在 3-4 百萬年之前是共用來源；在所有現存生物體中 rRNA 基因都具有相似功能，Gerbi (1985) 因此推論，在演化發生之前，rRNA 基因即已存在於生物體上；在各演化路徑上一直是高度保留的基因 (Lewin, 1994)。從演化的觀點視之，具功能的 rDNA 部位，在功能限制 (functional constraint) 的壓力下，受到高度保留，雖然經過數百萬年的歷史，序列的變異有限，但是 ITS1 和 ITS2 區域因不受功能限制，可保留較多的突變。

許多學者定序 rDNA 片段發現，ITS 序列在真核生物中，自低階到高階分類群，有逐漸增加長度的趨勢 (Torres *et al.*, 1990; Baldwin, 1992)，並推測可能的機制是小片段序列重複地插入 ITSs，而在 ITS2 還可能會有較長片段的插入 (Torres *et al.*, 1990)；ITS 不受功能限制，隨著演化路徑加長，保留大量的突變量，而導致 ITSs 序列加長的結果；Gardes *et al.* (1991) 和 Kasuga *et al.* (1993) 的研究報告中也指出在真菌 (fungi) 的世界裡，ITSs 序列長度變異也是普遍存在的。

在現在的昆蟲分類體系中，一般支持古生翅群 (Paleoptera，例如蜉蝣、蜻蛉) 比今生翅群 (Neoptera，例如膜翅目、雙翅目) 古老，而 Whiting *et al.* (1997) 利用 18S 及 28S rDNA 序列和型態特徵的親緣推論也支持這個論點，蜉蝣是位在最基部的 clade。台灣沿緣蜉蝣 rDNA ITS1 的長度顯著短於半翅目者 (accession number AJ315798, AJ315821~22) (378~522 bp) 的四倍和雙翅目 (accession number M21017, Z28416, AF189691) (726~831 bp) 的八倍，而是和蜻蛉目 (accession number AY082597) (280 bp) 相似度高，另外在 ITS2 長度上，台灣沿緣蜉蝣樣和蜻蛉目 (accession number AJ458982) (211 bp) 較相似，與遍佈美國南部的瘧蚊 (*Anopheles quadrimaculatus* complex) (287~329 bp) (Cornel *et al.*, 1996) 差異大，這些序列長度差異是否因為隨著演化路徑加長，保留大量的突變量，而導致 ITSs 序列加長的結果，可能需再取得更多序列來加以探討。不過，值得注意的是台灣沿緣蜉蝣 ITS 長度與序列特徵和 GenBank 上公布的真菌 (accession number AF345950, AF368799,

AF393702) 也有很高的相似度 (75%)，其機制需再深入研究。

ITSs 間序列之 G+C%，在大多數的物種存在 G+C% 平衡 (balance) 共同演化 (coevolution) 的現象，雖然其在不同物種間的範圍從 20% (果蠅和酵母菌 *S. pombe*) 到 90% (原生動物 *G. lamblia*)，但是 ITS1 序列的 G+C% 量與 ITS2 幾乎相等 (Torres *et al.*, 1990)。根據表三的結果顯示，台灣沿緣蜉蝣 ITSs 符合 G+C% 平衡共同演化的現象，和 *D. melanogaster* ITSs 一般是富含 AT 的片段。如果 G+C% 平衡共同演化的現象是真核生物 (哈密瓜約 58%；綠豆 60%；蕃茄 70%；稻米 75%；大鼠 73%；小鼠 78%；爪蟾 82%) (cf. Torres *et al.*, 1990) ITSs 序列演化的方向，可以預期 *D. melanogaster* 和台灣沿緣蜉蝣 ITSs 序列演化會朝增加 G+C% 量的方向進行。Goldman *et al.* (1983) 認為 G+C% 量的增加有助於 ITSs 形成二級結構 (cf. Torres *et al.*, 1990)，Torres *et al.* (1990) 則推測是 5-methylcytosine 發生去氨基 (deamination)，使胞嘧啶 (cytosine) 替換 (transition) 成嘧啶胸腺 (thymine)，導致 GC 平衡共同演化；此外，Nazar *et al.* (1987) 提出 G+C% 增加，可能是生物體對環境的一種適應現象，植物的研究結果似乎符合這項推測。目前對 ITSs 序列達到平衡共同演化的機制以及高階真核生物如何維持 ITSs 序列 GC 平衡，均尚未很清楚。

二、族群遺傳

自階層性基因交流值分析得到台灣沿緣蜉蝣的遺傳分化程度並沒有如預期地呈現地理區間大於族群間的型式，有早期國外以後功異構酵素電泳法 (allozyme) 針對蜉蝣 dispersal 的研究成果支持本研究結果；例如：Bunn and Hughes (1997) 在澳洲收集溪流上下游及不同溪流之 *Baetis* 幼齡個體，利用後功異構酵素電泳法檢測溪流間及地理區域族群間遺傳分化程度，結果顯示小區域溪流間或流域間族群之遺傳呈現不分化狀態，亦即族群間基因交流順暢，雖然有某些 loci (*Pgi*, *Pgm*, *Pepc*, *Acon*) 指出溪流個體遷移不順暢，上下游個體呈現顯著遺傳分化 (F_{ST} 0.005~0.47) 的情形，但是作者推測這可能是溪流族群過份細分 (reach scale 是不必要的分群單位) 或與雌性繁殖體偏好不同的微棲地產卵等因素而造成的结果。相對地，有其他研究成果和本研究結果相異；例如：Sweeney *et al.* (1987) 分析北美東部王個溪流性蜉蝣物

種共 40 個族群，*脂*功異構酵素 (*Mpi, Lap-2, Est-4*) 電泳結果顯示族群間具有高度分化的遺傳距離 ($D > 1$)，地理族群間 $F_{ST} = 0.04\sim0.15$ ，大部分族群基因交流有限，甚至在每個種內族群間已存在近親交配事件。而 Sweeney and Funk (1991) 利用澱粉凝膠 (starch gel) *脂*功異構酵素電泳法分析南卡羅來納州 (Carolina)、阿拉巴馬州 (Alabama) 及佛羅里達州 (Florida) 之 borrowing mayfly *Dolania americana* 的族群遺傳結構，結果指出同一群個體 (cohorts) 並無顯著遺傳分化，但是南卡羅來納州及佛羅里達州族群間則存在顯著性遺傳分化 ($F_{ST} = 0.000\sim0.097$)。

在分子生物學的演進過程中，蛋白質電泳分析法是一個重要的分子工具，於 1990 年代幫助許多學者解析系統分類學及族群遺傳與演化等研究上的問題，但隨著分子技術解析力的精進與分析方法的突破，它逐漸被淘汰。May (1992) 提到幾項此分子技術不合宜之處，包括：一般蛋白質原本就比 DNA 難以操控，即使在 -70°C 下冷凍保存，某些蛋白質還是很容易變性 (degradation)，而難以得到萃取物；此方法乃利用 *脂*功異構酵素分子形態和電荷數目之改變，在電泳膠體上產生不同條帶的原理，以評估基因型，而這需要大量蛋白質的存在，才能在一般的蛋白質偵測系統中被探測到；另外，一些蚜蟲 (aphid) 與膜翅目的研究指出某些基因座可能受到選擇的作用，導致族群間實際的遺傳分化程度被低估或甚至無法被偵測到，而需轉以其他分子工具 (cf. Hoy, 1994)。蜉蝣的個體小，總體蛋白質萃取量少，有些 allozyme 甚至只存在特定的組織中，而這些限制影響到使用 allozyme 可檢測的次數，每個蜉蝣個體檢驗次數少應該會偏估其族群間真正的遺傳分化程度。因此蜉蝣散播潛能的研究是 case by case，或是受檢測方法上的誤導？或是如 Bunn and Hughes (1997) 研究結果所提蜉蝣的散播會受行羣的影響，似乎沒有絕對的定論。

族群間的基因交流程度與彼此間遷移個體數成正相關，而個體或族群傳播的距離除了和主動能力有關，也受到被動傳播因子左右，當探討有翅昆蟲的傳播潛能時，風及輔助傳播者 (例如水鳥或其他動物) 的存在所產生的效應是必須考慮的。Hershey (1993) 利用 ^{15}N 標定食物 (水藻) 的方式，追蹤阿拉斯加州 (Alaska) Kuparuk River 中數量豐富的 *Baetis* 屬未成熟蜉蝣個體漂流和成體飛翔動態的研究中指出，成年的蜉蝣 (尤其是雌性個體) 具有從溪流下游往上游飛翔約 2 km 的能力。根據石炭紀 (Carboniferous) 和二疊紀 (Permian) 化石紀錄中蜉蝣翅膀和胸部特徵的證據，

Wootton and Kukalova-Peck (2000) 曾提出飛翔能力是蜉蝣古老的特徵，而現存蜉蝣已大大降低飛翔能力 (cf. Thomas *et al.*, 2000)。現今的蜉蝣翅膀上依然保留飛行的特徵，亦即具有豐富的橫脈 (cross vein)，以及蜉蝣雖然身具短薄的翅膀和軟弱飛行肌肉卻能在水面上停留或飛行 (skimming)，這似乎說明蜉蝣能有目的地利用空氣動力學來進行移動，而這應該有助於其散播潛能 (Thomas *et al.*, 2000)。Figuerola and Green (2002) 曾指出大部分的水生生物雖然缺乏主動能力傳播到鄰近流域，但是很多物種受到遷徙性水鳥的幫助而存在頻繁地廣泛性分佈；水鳥被動地運送水生無脊椎動物和植物的繁殖個體，這在野外或至少在地區上，是物種發生內部或外部傳播的重要影響因素與過程。

東亞和東南亞沿海地帶之大氣環流型態具有持久性之氣候特徵，此即季風氣候，冬季盛行東北季風，夏季盛行東南季風和西南季風。台灣位於歐亞大陸板塊和太平洋交界處，因此在氣候上於七月開始吹拂東北季風，於十月以後開始加強，秋末冬春之際是其強勁時刻，此季風長達七八個月之久；又因中央山脈自南至北貫穿全島之中央，秋冬雨季節裡，東北季風越過中央山脈南段造成強勁的落山風，南部恆春半島飽受其吹拂；而夏秋全島則受到東南季風、西南季風和海陸風的侵襲，全島各地的氣象因著中央山脈、複雜地形及風向與山脈走向相交等效應而有顯著差異 (劉，1996)。根據中央氣象局統計台灣本島在 1897~1982 年間颱風發生次數的資料，近一百年間共有 300 次颱風，平均每年 3.5 次。台灣本島雖然被近約 4000 公尺的中央山脈分隔成東西兩半部，但是東西窄 (約 140 公里)，腹地小，島上的有翅昆蟲 (例如蜉蝣) 的傳播受到颱風或季風輔助的效應應該比腹地廣的大陸性地區強，這可能降低了生物地理隔離效應，促使主動傳播能力不強的昆蟲發生大地理區域的基因交流。另外，台灣野外鳥類觀察家發現高翹行為鳥 (*Himantopus himantopus*)、棕沙燕 (*Riparia paludicola*) 這類水鳥具有在靜水型淡水濕地活動及取食的習性，而且有跨越中央山脈的能力 (翁義聰，個人聯絡)，這類遷移能力強的鳥類很可能在理羽或涉水的過程黏附區域上的水生無脊椎動物 (卵或幼齡蟲) 做域內或域外的傳播。所以，台灣沿緣蜉蝣區域族群間具高度基因交流，推測可能受到風和水鳥兩項因素之幫助，以 jump dispersal 方式越過地理障壁的結果。

研究地理區域間族群基因交流程度的方法一般可區分成直接生態觀察法和間接

遺傳分析法 (George, 1996)；前者是實際觀察地理區間個體的遷移量，後者是以族群間遺傳分化程度來評估之。有時候非長期性的觀察結果會導致散播者傳播能力與程度上的誤判，尤其是當觀察具有長距離遷移之個體時，散播者最後的命運是難以估量的。遷移者既使在地理區域間進行交流，於當地難以找到配偶甚或適合的棲地之情況下，生殖成功率低於當地個體，其基因型是否能被保留在當地族群才無法評估。直接方法雖然有這些缺點，但是，實際觀察能提供發生散播事件的頻率與動向，當研究人員對物種（特別是昆蟲）的遷移 (migration) 能力不清楚，而其族群之遺傳分化程度又和預期相反時，生物的生態資料對欲充分瞭解族群間個體交換程度與數量就更顯得重要。因此，欲進一步證實台灣沿緣蜉蝣散播模式則有賴直接生態遷徙路線監測和調查颱風運送遷移者的程度。

三、基因譜系與 rDNA 和 EF-1 α lineage 結合分析

許多電腦模擬及理論支持基因交流不順暢的一項特質是 haplotype/clade 的年齡與地理分佈的範圍有強烈的相關性，因為年輕的 haplotype/clade 出現的相對年齡小，在基因交流有限且一再發生的情形下，較古老的 haplotypes/clades 基本上在地理上是更廣泛地分佈，而年輕者相對上是受限的 (Templeton *et al.*, 1995)。本研究基因交流值和遺傳分化值結果（表九～表十一）顯示台灣沿緣蜉蝣基因交流順暢且不符合 isolation by distance，有長距離的散播的潛能，所以較新的 clade (F-K/IV-VII) 若被侷限在特定地理區域，推測年輕 clade 出現的時間還不夠久，攜帶這些新的 haplotypes 的個體數少，雖然基因交流順暢，但是其隨機散播的機率相對偏低，故仍侷限在特定地理區域；再者，對於經由短距離或跳躍式傳播方式遷移的物種而言，許多生態因子的變動，包括嚴苛的物理環境 [physical condition，例如：水質酸度 (acidity) (Peterson and Eeckhaute, 1992)；水溫 (Watanabe *et al.*, 1999)；水中溶氧度 (Wang *et al.*, 2001)]、合適食物的缺少 (Sweeny *et al.*, 1986; Rosillon, 1988; Fuller and Desmond, 1997) 或是競爭者與捕食者的存在 (Culp *et al.*, 1991) 都將抑阻他們在當地建立新族群；攜帶這些新的 haplotypes 個體或許也有可能在台灣特定區域的適應性差，即使能到達該處，不過存活率或生殖成功率遠不如當地的個體，以致於 rDNA types F-K 個體在中部地區或 EF-1 α types IV-VII 個體在東部地區被捕捉到的機率相對減少，其真正的原

因需要進一步調查上述生態關鍵因子來加以證實；然而新的 clade (F-K/IV-VII) 被侷限在特定地理區域的另一項重要原因，推測可能是基因漂變效應導致，此部分將於族群動態章節中討論。

rDNA 和 EF-1 α 重建出一致的台灣沿緣蜉蝣親緣地理型式結果，顯示出 haplotypes 隨機分佈在地理位置上，而且這兩個遺傳標示物彼此是隨機配對的，從遺傳學的角度觀之，意謂著這兩個遺傳標示物在細胞核內是非連鎖的。而每一個不同的基因，尤其未連鎖的基因，也許有不相同的演化歷史，根據溯祖理論的觀點，當基因未達到 monophyletic，會呈現 lineage sorting，亦即不相同的基因譜系所呈現的族群遺傳結構會有所差異。族群過小、基因漂變和正面選擇 (positive selection) 會加速基因達到 monophyletic，而大的族群、基因交流、平衡選汰 (balance selection)、基因突變和重組事件等效應則會延遲基因達到 monophyletic。另外，alleles 因年齡差異可能擁有不相同的演化歷史，才會使基因呈現 lineage sorting。從台灣沿緣蜉蝣 rDNA 和 EF-1 α lineages 所呈現的基因交流形式不是很一致的情況，例如：rDNA lineages 顯示北部地區族群和東部地區族群是隨機交配的 ($Nm > 4$)，但是 EF-1 α lineages 是顯示南部地區族群和東部地區族群才是隨機交配的，推測這是由於基因交流流暢及發生多次基因重組 (表四和表五) 等效應，或是因 alleles 年齡之不一致，而導致 rDNA lineages 以及 EF-1 α lineages 皆尚處於 lineage sorting 的結果。

四、族群動態

根據生態觀察，台灣沿緣蜉蝣因體弱、壽命短且族群受山系阻隔，其族群間基因交流應該有限，並應符合 vicariance hypothesis 之隔離的型式，但是本研究之分子親緣樹和族群分化值證據並未支持此一假說，並呈現台灣沿緣蜉蝣有長距離交流的潛能，那麼在此旺盛的基因交流情況下，族群 (deme) 該如何定義呢？Futuyma (1998) 曾提到，將 deme 過份細割 (subdivision) 成許多小族群時，這些小族群內的異型合子頻率 (heterozygous frequency) 會偏離哈溫定律，同型合子頻率 (homozygous frequency) 會增加，這稱為 Wahlund effect，此效應的發生主要是由於統計上出現誤差所造成的。本研究所得細胞核基因型 (rDNA types 與 EF-1 α 結合) 在不同階層排

列組合分析中，例如：A-B × I-III、A-B × I-VII、A-E × I-III、A-E × I-IV、A-E × I-V、A-E × I-VII、A-K × I-VII 等等，基因型頻率在族群間分佈的異質性卡方分析結果（表十二）指出，所有本研究的台灣沿緣蜉蝣樣點族群（A-K × I-VII）是一個隨機交配的族群（deme） $(X^2 = 73.586, P = 0.11176)$ ，是最符合哈溫定律之理想族群；而一個在地理上連續性分佈的族群由於受到棲地破碎化被分裂成數個 local populations，這些 local populations 稱為 metapopulation (Hanski, 1999)；因此，本研究的樣點族群只是台灣沿緣蜉蝣全島大族群的 metapopulation。卡方分析結果加上族群不符合 isolation by distance 之基因交流模式，進一步說明台灣沿緣蜉蝣進行長距離傳播。

Futuyma (1998) 曾提到化石紀錄、生物相歧異度或是親緣關係等證據均可支持生物散播假說的可能性及可能的根源地 (source)，例如：從生物化石最早期記錄只分佈在一個區域，而其他區域的記錄是後期才出現的；犰狳的化石記錄在南美洲是橫跨整個第三紀 (Tertiary)，在北美只有第三紀的鮮新世 (Pliocene) 和第四紀的洪積世 (Pleistocene)，因此推測北美犰狳是在巴拿馬地峽形成前從南往北遷徙的。再者，由該地的生物相歧異度呈現高度失衡 (unbalanced) 推測此地區的物種是經由散播而移入的；最典型的區域是島嶼 (island)，島嶼和大陸間存在海洋隔離，對兩生類、爬蟲類和無法飛行之哺乳類而言這是一個嚴重的遷徙障礙，因此天然且古老的島嶼上一般只存在散播能力強的昆蟲、魚類、鳥類和哺乳類，也因而導致島上生物相失衡。另外，外群 (outgroup) 與分類群的地理親緣訊息結合可獲得該分類群最原始的 (primitive)（位在親緣樹中最基部的）成員，一般推測最原始的成員所在地是該物種的根源地。

本研究是利用 unrooted haplotype tree 重建台灣沿緣蜉蝣的親緣關係（圖四與圖六），無法看出最原始的類群，而辨狀親緣樹形圖（圖五與圖七）顯示古老成員散佈在各地區，因此欲以親緣關係推測台灣沿緣蜉蝣的根源地似有困難。雖然如此，但根據生態資料及地理區域採樣點族群間 nucleotide diversity (表四和表五) 的結果推測北部地區 [尤其是新竹大埔樣點 (TP)、宜蘭雙連埤大汎 (LP) 與小汎 (MP)]、整個南部地區和中部魚汎 (YC) 等樣點是台灣沿緣蜉蝣的根源地，北部大溪樣點 (TH)、東部壽豐 (SF)、吉安 (CA) 和中部日月潭 (JY) 樣點是 sinks。從生態資料顯示 (彭，個人聯絡)，北部地區 TP、LP 及 MP、南部地區各樣點和中部 YC 經年都維持有水的狀態，這些棲地的生物歧異度全年均很高，顯示環境穩定；更重要地是棲地中豐

富之李氏禾草 (*Leersia hexandra*) 或其他水生植物，對蜉蝣而言，這具有提供避難所、聚集有機碎屑和作為微小藻類附生之基質等功能 (Britain, 1980)；更得以獲取豐富的食物—有機碎屑和水藻。北部地區的大溪樣點是一個廢耕農地，每年春末及夏季有一具有高水位(約 0.5~2.0 公尺)的沼澤濕地，適合水生無脊椎生物居住，其餘時節則處於不利棲息的微濕或乾枯狀態。東部地區的吉安樣點是一個沈澱小水池，在夏天因蓄積量不及蒸發量而呈現乾枯狀，屬於暫時性的棲地，另外的壽豐樣區則是一個農田，雖然終年有水，但農忙季節施撒的農藥可導致水生生物死亡，所以每年該樣點將只有數月時間可供台灣沿緣蜉蝣棲息。中部地區的日月潭樣點雖然長年有水，但是水質能見度高，推測日月潭並不是一個水生無脊椎動物合適的棲地。

暫存性棲地（例如：大溪、吉安、壽豐及日月潭樣點）每年幾乎定期經歷衰敗（乾枯或農藥傷害），衰敗其間惡劣的環境品質造成域外水生無脊椎動物大量減少或滅絕以及抑制域外遷徙者的建立或擴張，然而當環境品質恢復，殘存的生物再次建立和擴張，這過程的同時也促使外來生物的遷入及允許其發展。棲地衰敗與再恢復的過程，會造成當地原生物種演替中斷且改變演替進行方式，有助長新種或新族群入侵與據據於此。棲息在暫存性棲地的台灣沿緣蜉蝣族群應有較高機率定期經歷滅絕和再拓殖的過程 (extinction-recolonization)，而 metapopulation 經歷滅絕和再拓殖的過程也許會提高或降低 local population 的遺傳分化 (Dybdahl, 1994)，當地族群的遺傳變異大大地受拓殖者的遺傳組成左右，若拓殖者是一群奠基者 (founder)，滅絕和再拓殖的過程將加強分化的程度。日本研究族群間基因交流的結果，顯示當地族群彼此交流順暢，因此，sink 在經歷族群再拓殖時，應是接受四方 sources 的個體，所以推測奠基者效應 (founder effect) 對台灣沿緣蜉蝣族群的影響較低，各族群遺傳組成歧異度的結果 (表四與表五) 支持這個論點，sinks 之 haplotype diversity 近似 sources 者，且兩者遺傳組成多樣性類似。從細胞核基因型在族群間分佈結果 (圖八)，發現具有永久性水域和棲地多樣性等特點的 source 確實比 sink 能夠保留較多新的基因型，例如：75% clade H 出現在 TP、LP、MP 和 YC 等 sources 區域；clade I 只出現在 TS；88% clade IV 出現在 LP、YC 和 TS；67% clade VI 出現在 YC 和 LB。當然，也有 sinks 保留較多新的基因型的情形，例如：有 75% clade J 出現在暫時性水域 CA 和 SF，推測這是因為滅絕和再拓殖的事件造成瓶頸效應 (bottleneck effect) 或

是遺傳漂變的結果，例如：族群受到瓶頸效應，殘存的有放族群量因過少，在隨機採集原則的過程中，攜帶新基因型個體被隨機放大，或是當地攜帶新基因型個體在事件後迅速擴增，導致採集到較高比例之帶有新基因型個體。族群若由於某種因素而大規模減少，使得流存下來的基因庫發生了結構性的改變，此種情形稱為瓶頸效應，其會造成族群裡的遺傳變異偏低。偶爾環境物理和化學因子的劇烈變動或毀滅性改變，例如：農藥的施用、突然乾枯、水位暴漲或其他因素，很可能對主動趨避危險能力低的蜉蝣 sink 族群產生瓶頸效應。同樣從細胞核基因型組成來看（表一），北、中和南部 source 中只有宜蘭 LP 和 MP 樣點不具有稀有基因型 (F/G/I × VI/VII)，而且族群遺傳組成呈現低度的異質性，強烈暗示族群曾經歷歷史性的瓶頸效應，推測這可能是受水位變動所導致。蘭陽平原由於整個地勢呈三角形，東北季風自東海和太平洋進入蘭陽平原時，便被中央山脈和高空（三千公尺以上）山脈或山南脈阻擋，如此地形使得颱風雨和東北季風常常合流在這個喇叭形的蘭陽平原上，造成特大的雨災和水災（劉，1996）。根據許多河流水生昆蟲的洄游研究，河水流速變快會使蜉蝣等水生昆蟲往下分散之數量增加 (Ciborowski *et al.*, 1977)，而台灣沿緣蜉蝣為靜水型生長之蜉蝣，因此，在梅雨季與夏季豪雨期間，當降雨量變大時，大量之雨水匯集至沼澤區，沼澤區快速高漲之大量流水，可能會將台灣沿緣蜉蝣幼蟲沖出，這除了導致蜉蝣幼蟲密度會維持在低密度水平（彭等，1999），也可能使得族群歧異度降低。綜合而言，台灣沿緣蜉蝣 sink 和 source 族群均有可能遭受瓶頸效應或是遺傳漂變。

五、結論

本研究鑑定出 11 個 rDNA lineages (clade A-K) 和 7 個 EF-1 α lineages (clade I-VII)，卡方檢測顯示全島合一的族群處於平衡，其中有一些稀有的 lineages 被侷限在少數地理區塊，推測應該是基因相對年輕或遺傳漂變的結果；而兩個基因譜系都建構出一致的親緣地理型式（族群間或地理區域間的遺傳分化低），顯示台灣沿緣蜉蝣發生頻繁的遷移。rDNA 和 EF-1 α 都指出族群間或地理區域間有很高的基因交流，但基因交流的型式並不一致，推測應該是這兩個基因譜系處在 lineage sorting 所導致。台灣沿緣蜉蝣進行長距離散播應該是受風和水鳥輔助所導致。根據 rDNA 和 EF-1 α 基因譜系推估出整個台灣地區的台灣沿緣蜉蝣是一個逢機配對的族群，所有採樣點是關鍵族群，北部地區、南部地區和中部魚池樣點應該是台灣沿緣蜉蝣的根源地，而 sink 遺傳組成深受滅絕和再拓殖的影響，再者，sink 和 source 族群均有可能遭受瓶頸效應或是遺傳漂變。

陸、参考文献

- Arnheim, N. 1983. Concerted evolution of multigene families. Pp. 38-61. In: Evolution of Genes and Proteins. Nei, M., and R. K. Koehn (eds.), Sinauer, Sunderland, MA.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball Jr., E. Bermingham, T. Lamb, E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall Press, New York.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 3-16.
- Barbara, L. P., P. R. Fraissinet, M. A. Penton, and D. J. Conklin, Jr. 1990. Ephemeroptera. Pp. 20-40. Freshwater macroinvertebrates of Northeastern North America. Cornell University, USA.
- Bernard, W. S. and R. L. Vannote. 1982. Population synchrony in mayflies: a predator satiation hypothesis. *Evolution* 36: 810-821.
- Brittain, J. E. 1982. Biology of mayflies. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 119-47.
- Brower, A. V. Z. and T. M. Boyce. 1991. Mitochondrial DNA variation in monarch butterflies. *Evolution* 45: 1281-1286.
- Brown, D. D., P. C. Wensink, and E. Jordan. 1972. A comparison of the ribosomal DNAs of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: Evolution of tandem genes. *J. Mol. Biol.* 63: 57-73.
- Cho, S., A. Mitchell, J. C. Regier, C. Mitter, R. W. Poole, T. P. Friedlander, and S. Zhao. 1995. A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: Elongation factor-1 α recover morphology-based tree for Heliothine moths. *Mol. Biol. Evol.* 12: 650-656.
- Christian, S., M. T. Hauser, A. V. Haeseler, and D. Tautz. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 11: 513-522.
- Ciborowski, J. H., P. J. Pointing, and L. D. Corkum. 1977. The effect of current velocity and sediment on the drift of the mayfly *Ephemerella subvaria* McDunnough. *Freshwater Biol.* 7: 567-572.
- Cornel, A. J., C. H. Porter, and F. H. Collins. 1996. Polymerase Chain Reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae)

- based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J. Med. Entomol.* 33: 109-116.
- Cox, C. B., and P. D. Moore. 2000. Biogeography: an ecological and evolutionary approach. 6th ed. Blackwell Science Ltd. USA.
- Crabtree, M. B., H. M. Savage, and B. R. Miller. 1995. Development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay for the identification of Culex vectors of St. Louis encephalitis virus based on interspecies sequence variation in ribosomal DNA spacers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 105-109.
- Cryan, J. R., B. M. Wiegmann, L. L. Deitz, and C. H. Dietrich. 2000. Phylogeny of the treehoppers (Insecta: Hemiptera: Membracidae): Evidence from two nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17: 317-334.
- Culp, J. M., N. E. Glozier, and G. J. Scrimgeour. 1991. Reduction of predation risk under the cover of darkness-Avoidance responses of mayfly larvae to a benthic fish. *Oecologia* 86: 163-169.
- Danforth, B. N., and S. Ji. 1998. Elongation factor-1 α occurs as two copies in bees: Implications for phylogenetic analysis of EF-1 α sequences in insects. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15: 225-235.
- Danforth, B. N., H. Sauquet, and L. Packer. 1999. Phylogeny of the bee genus Halictus (Hymenoptera: Halictidae) based on parsimony and likelihood analysis of nuclear EE-1 α sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13: 605-618.
- Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, and J. S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 4008.
- Durso, N. A., and R. J. Cyr. 1994. Beyond translation: elongation factor 1 α and the cytoskeleton. *Protoplasma* 180:99-105.
- Edmunds, G. F., Jr. 1984. Ephemeroptera. Pp. 94-125. In: An Introduction to the Aquatic Insects of North America. Merritt, R. W., and K.W. Cummins (eds.), 2nd ed. Kendall/Hunt Publ. Co., Dubuque, Iowa.
- Edmunds, G. F., Jr. 1988. The mayfly subimago. *Annu. Rev. Entomol.* 33: 509-530.
- Excoffier, L. 1993. Analysis of Molecular Variance. Version 1.55. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics*, 131: 479-491.

- Excoffier, L., and P. E. Smouse. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: Molecular variance parimony. *Genetics* 136: 343-359.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Friedlander, T. P., J. C. Regier, and C. Mitter. 1992. Nuclear gene sequences for higher level phylogenetic analysis: 14 promising candidates. *Syst. Biol.* 41: 483-490.
- Fritz, G. N., J. Conn, A. Cockburn, and J. Seawright. 1994. Sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from population of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Mol. Biol. Evol.* 11: 406-416.
- Fu, Y. X., and W. H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-704.
- Fuller, R. L., and C. Desmond. 1997. Influence of food type on the growth of early and late instars of 3 mayfly (Ephemeroptera) species. *Archiv Fur Hydrobiologie* 141: 1-11.
- Futuyma, D. J. 1998. The geography of evolution. In: Evolutionary biology, 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. U. S. A.
- Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns, and J. W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69: 180-190.
- Gerbi, S. A. 1985. Evolution of ribosomal DNA. Pp. 419-517. In: Molecular Evolutionary Genetics. MacIntyre R. J. (ed.), Plenum, New York.
- George, K. P. 1996. Geogaphic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 325-352.
- Gibbs, K. E. 1977. Evidence for obligatory parthenogenesis and its possible effect on the emergence period of *Cloeon triangulifer* (Ephemeroptera: Baetidae). *Can. Entomol.* 109: 337-340.
- Graur, D., and W. H. Li. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Association, Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Hanski, I. 1999. Metapopulation Ecology. Oxford University Press. New York.
- Harker, J. E. 1997. The role of parthenogenesis in the biology of two species of mayfly (Ephemeroptera). *Freshwater Biol.* 37: 287-297.
- Hedrick, P. W. 1983. Genetics of Populations. Science books international, Inc. Boston, Massachusetts.

- Hedrick, P. W. 1984. Population Biology. Jones and Bartlett Publishers, Inc.
- Hershey, A. E. 1993. Stable isotopes resolve the drift paradox for *Baetis* mayflies in an arctic river. *Evolution* 74: 2315-2325.
- Hillis, D. M., A. Larson, S. K. Davis, and E. A. Zimmer. 1990. Nucleic acids III: Sequencing. Pp. 318-370. In: Molecular Systematics. Hillis, D. M., and C. Moritz, (eds.), Sinauer Association, Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Hillis, D. M., and M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Hillis, D. M., and J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 41: 182-192.
- Hilsenhoff, W. L. 1987. An improved biotic index of organic stream. *Great Lakes Entomol.* 20: 31-39.
- Horn, D. J. 1978. Population ecology. Pp. 286-291. In: Biology of Insects. W. B. Saunders Company. London.
- Hovemann, B., S. Richter, U. Walldorf, and C. Cziepluch. 1988. Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1alpha (EF-1alpha) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucl. Acids Res.* 16: 3175-3194.
- Hoy, M. A. 1994. Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications. Academic Press, San Diego.
- Hunt, G. J. 1997. Chapter II. Insect DNA extraction protocol. In: Fingerprint methods based on arbitrarily primed PCR. Micheli, M. R., and R. Bova (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Indik Z. K., and K. D. Tartof. 1980. Long spacers among ribosomal genes of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 284: 477-479.
- Johnson, C. G. 1966. A functional system of adaptive dispersal by flight. *Ann. Rev. Entomol.* 11: 233-260.
- Jukes, T. H., and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21-132. In: Mammalian Protein Metabolism. Munro, H. N. (ed.), Academic Press, New York.
- Kasuga, T., C. Woods, S. Woodward, and K. Mitchelson. 1993. *Heterobasidion annosum* 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence: Rapid identification of European intersterility groups by ribosomal DNA restriction polymorphism. *Curr. Genet.* 24: 433-436.
- Kang, S. C., and C. T. Yang. 1994a. Caenidae of Taiwan (Ephemeroptera). *Chinese J.*

- Entomol.* 14: 93-113.
- Kang, S. C., and C. T. Yang . 1994b. Three new species of the Genus *Ameletus* from Taiwan (Ephemeroptera: Siphlonuridae). *Chinese J. Entomol.* 14: 261-269.
- Kang, S. C., and C. T. Yang. 1994c. Ephemeroidea of Taiwan (Ephemeroptera). *Chinese J. Entomol.* 14: 391-399.
- Kang, S. C., and C. T. Yang. 1996a. A new Species of *Caenis* Stephens (Ephemeroptera: Caenidae) from Taiwan. *Chinese J. Entomol.* 16: 55-59.
- Kang, S. C., and C. T. Yang. 1996b. Two new species of *Baetis* Leach (Ephemeroptera: Baetidae) from Taiwan. *Chinese J. Entomol.* 16: 61-66.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Bioinformatics.
- Lewin, B. 1994. GeneV. Oxford University Press, Inc., New York, USA.
- Long, E. O., and I. B. Dawid. 1980. Repeated sequences in eukaryote. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 727-764.
- Malafronte, R. S., M. T. Marrelli, and O. Marinotti. 1999. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 36: 631-634.
- Manguin, S., R. C. Wilkerson, J. E. Conn, Y. Rubio-Palis, J. A. Danoff-Burg, and D. R. Roberts. 1999. Population structure of the primary vector in south America, *Anopheles Darlingi*, using isozyme, Random Amplified Polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. *Am. J. Trop. Hyg.* 60: 364-376.
- Maroni, G. 1993. Elongation factor gene: Ef1 α 1, Ef1 α 2. Pp. 126-134. In: An Atlas of *Drosophila* Genes Sequences and Molecular Features, Oxford University Press, Inc. New York.
- Mukabayire, O., D. Boccolini, L. Lochouarn, D. Fontenille, and N.J. Besansky. 1999. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol. Ecol.* 8: 289-297.
- Nei, M., and F. Tajima. 1983. Maximum likelihood estimation of number of nucleotide substitution from restriction site data. *Genetica* 105: 207-217.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: The Polymerase Chain Reaction. Pp. 205-247. In: Molecular Systematics 2nd. Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable, (eds.), Sinauer

- Association, Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Pashley, D. P., B. A. McPheron, and E. A. Zimmer. 1993. Systematics of holometabolous insect orders based on 18S ribosomal RNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2:132-142.
- Peterson, R. H. and L. Van Eeckhaute. 1992. Distribution of Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of three maritime catchments differing in pH. *Freshwater Biol.* 27: 65-78.
- Pleyte, K. A., S. D. Duncan, and R. B. Philips. 1992. Evolutionary relationships of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 223-230.
- Resh, V. H., and J. O. Solem. 1984. Phylogenetic relationships and evolutionary adaptation of aquatic insects. Pp. 66-75. In: An introduction to the aquatic insects of North America. Merritt, R. W., and K.W. Cummins (eds.), 2nd ed. Kendall/Hunt Publ., Co., Dubuque, Iowa.
- Rosillon, D. 1988. Food preference and relative influence of temperature and food quality on life history characteristics of a grazing mayfly, *Ephemerella ignita* (Poda). *Can. J. Zool.* 66: 1474-1481.
- Rozas J., and R. Rozas. 1999. DnaSP version 3.0: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS* 74: 5463-5467.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mt gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 394-430.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Sweeney, B. W., R. L. Vannote, and P. J. Dodds. 1986. Effects of Temperature and food quality on growth and development of a mayfly, *Leptophlebia intermedia*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 43: 12-18.

- Sweeney, B. W., D. H. Funk, and R. L. Vannote. 1987. Genetic variation in stream mayfly (Insecta: Ephemeroptera) populations of eastern North America. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 80: 600-612.
- Sweeney, B. W., and D. H. Funk. 1991. Population genetic of the burrowing mayfly *Dolania americana*: geographic variation and the presence of a cryptic species. *Aquatic Insects* 13: 17-27.
- Tautz, D., C. Tautz, D. Webb, and G. A. Dover. 1987. Evolutionary divergence of promoters and spacers in the rDNA family of four *Drosophila* species: implications for molecular coevolution in multigene families. *J. Mol. Biol.* 195: 525-542.
- Templeton, A. R., E. Routman, and C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381-397.
- Thomas, M. A., K. A. Walsh, M. R. Wolf, B. A. McPheron, and J. H. Marden. 2000. Molecular phylogenetic analysis of evolutionary trends in stonefly wing structure and locomotor behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS* 97: 13178-13183.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 24: 4876- 4882.
- Torres, R. A., M. Ganal, and V. Hemleben. 1990. GC balance in the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J. Mol. Evol.* 30: 170-181.
- Turbeville J. M., D. M. Pfeifer, K. G. Field, and R. A. Raff. 1991. The phylogenetic status of Arthropods, as inferred from 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 8: 669-686.
- U'eno, M. 1928. Some Japanese mayfly nymphs. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Univ., B.* 4: 19-63.
- Ulmer, G. 1912. H. Sauter's Formosa-Ausbeute. Ephemeroptera. *Entomol. Mitt. Zool. Stinst. Zool. Mus. Hamburg* 1:369-375.
- Vogler, A. P., and R. DeSalle. 1994. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Mol. Biol. Evol.* 11: 393-405.
- Walldorf, U., B. Hovemann, and E. K. F. Bautz. 1985. F1 and F2: Two similar genes regulated differently during development of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS* 82: 5795-5799.

- Waltz, R. D., and W. P. McCafferty. 1985. A new species of *Procloeon* from Taiwan (Ephemeroptera: Baetidae). *Oriental Insects* 19: 121-123.
- Waltz, R. D., and W. P. McCafferty. 1987. Systematics of *Pseudocloeon*, *Acentrella*, *Baetiella*, and *Liebebiella*, new genus (Ephemeroptera: Baetidae). *J. N. Y. Entomol. Soc.* 95: 553-568.
- Watanabe, N. C., I. Mori, and I. Yoshitaka. 1999. Effect of water temperature on the mass emergence of the mayfly, *Ephoron shigae*, in a Japanese river (Ephemeroptera: Polymitarcyidae). *Freshwater Biol.* 41: 537-541.
- Wesson, D. M., D. K. McLain, J. H. Oliver, and J. Piesman. 1993. Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS* 90: 10221-10225.
- Whiting, M. F., J. C. Carpenter, Q. D. Wheeler, and W. C. Wheeler. 1997. The strepsiptera problem: Phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 46: 1-68.
- Wright, S. 1978. Evolution and genetics of populations, Vol. 4. Variability within and among natural populations. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Xia, X., and Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92:371-373.
- Yeh, W. B., C. T. Yang, and S. C. Kang. 1997. Identification of two sibling species, *Ephemera formosana* and *E. sauteri* (Ephemeroptera: Ephemeridae), based on mitochondrial DNA sequence analysis. *Chinese J. Entomol.* 17: 1-12.
- 何鑑光、楊平世。1983。水生昆蟲，p27-53。台灣河川污染指標生物。台灣省水污所出版。53頁。
- 林曜松、楊平世、曾晴賢。1988。雙溪河域魚類之復育暨設置溪釣場規劃經營管理之研究（二）。行政部營建署陽明山國家公園管理處。112頁。
- 洪正中、張嵩林、楊平世。1986。以底棲生物當作本省河川污染生物指標之研究。台灣環境保護 3：82-93。
- 徐崇斌、楊平世。1997。應用水棲昆蟲生物指標評估基隆河水質之研究。中華昆蟲 17：152-162。
- 康世昌。1993。台灣的蜉蝣目（四節蜉蝣科除外）。國立中興大學博士論文。233頁。
- 康世昌、張先正、楊仲圖。1994。台灣的四節蜉屬（蜉蝣目，四節蜉科）。台灣省

立博物館半年刊 47(2)：9-44。

康世昌、楊仲圖。1994a。台灣的褐蜉科（蜉蝣目）。台灣省立博物館半年刊 47(1)：1-3。

康世昌、楊仲圖。1994b。台灣的前蜉科（蜉蝣目）。台灣省立博物館半年刊 47(1)：5-36。

康世昌、楊仲圖。1995。台灣的小蜉蝣科（昆蟲綱,蜉蝣目）。自然科學博物館學報 5：95-116。

張先正。1992。台灣細蜉科（蜉蝣目：細蜉總科）。國立中興大學碩士論文。111 頁。

彭仁君、施希建、王建平。1999。南仁山古湖溼地水生節蜉蝣 *Cloeon marginale* Hagen (Ephemeroptera : Baetidae) 之稚蟲分佈與其密度消長。中華昆蟲 19：217-227。

楊平世、黃國靖、謝森和。1990。北勢溪之水棲昆蟲資源及生態研究 (I) 水棲昆蟲相及其相關生態。中華昆蟲 10：209-224。

劉昭民。1996。台灣的氣象與氣候。常民文化出版。

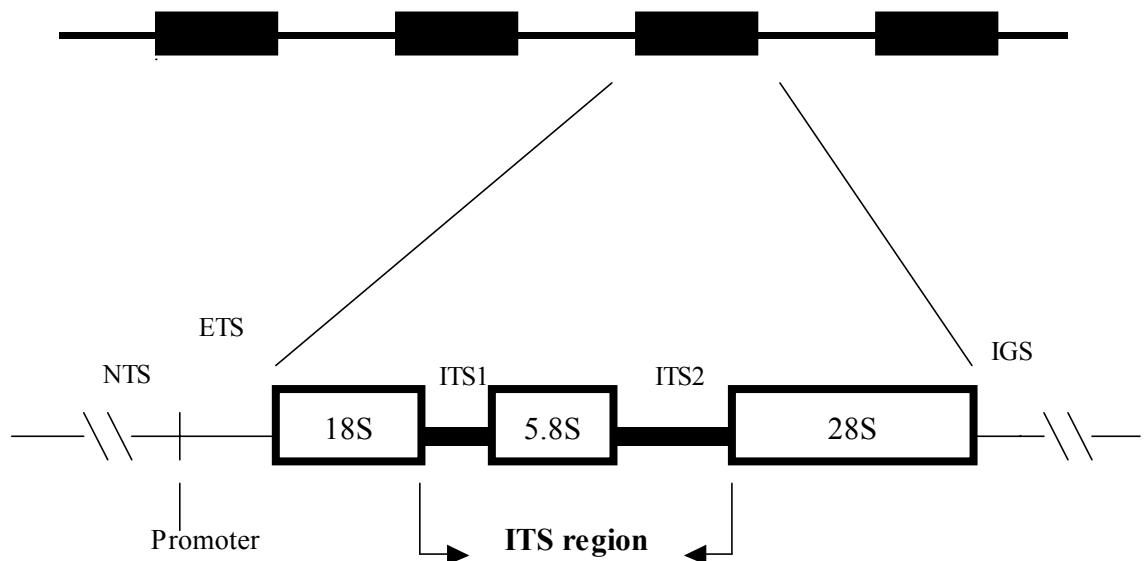


Fig. 1 Structural features of the rDNA tandem repeat module (drawn to approximate scale) in insects. Black regions indicate internal transcribed spacers, which often differ in length.

- a. ETS : external transcribed spacer
- b. NTS : nontranscribed spacer
- c. IGS (intergenic spacer) = ETS + NTS
- d. A ITS region indicated by arrows ; ITS region = ITS1-5.8S rDNA-ITS2

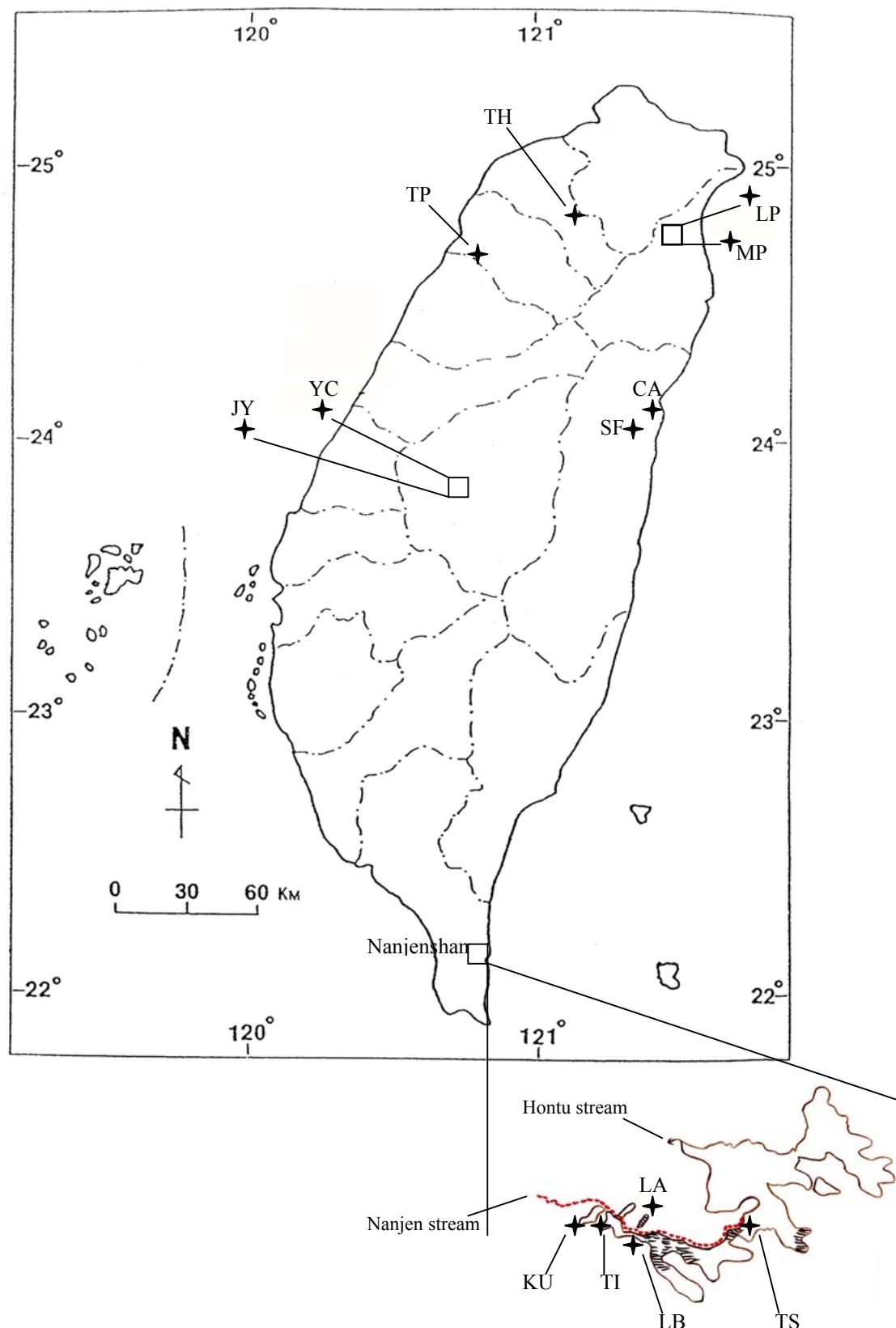


Fig. 2 *Cloeon marginale* Hagen sample locations and distribution. Abbreviations of populations are given in Table 1.

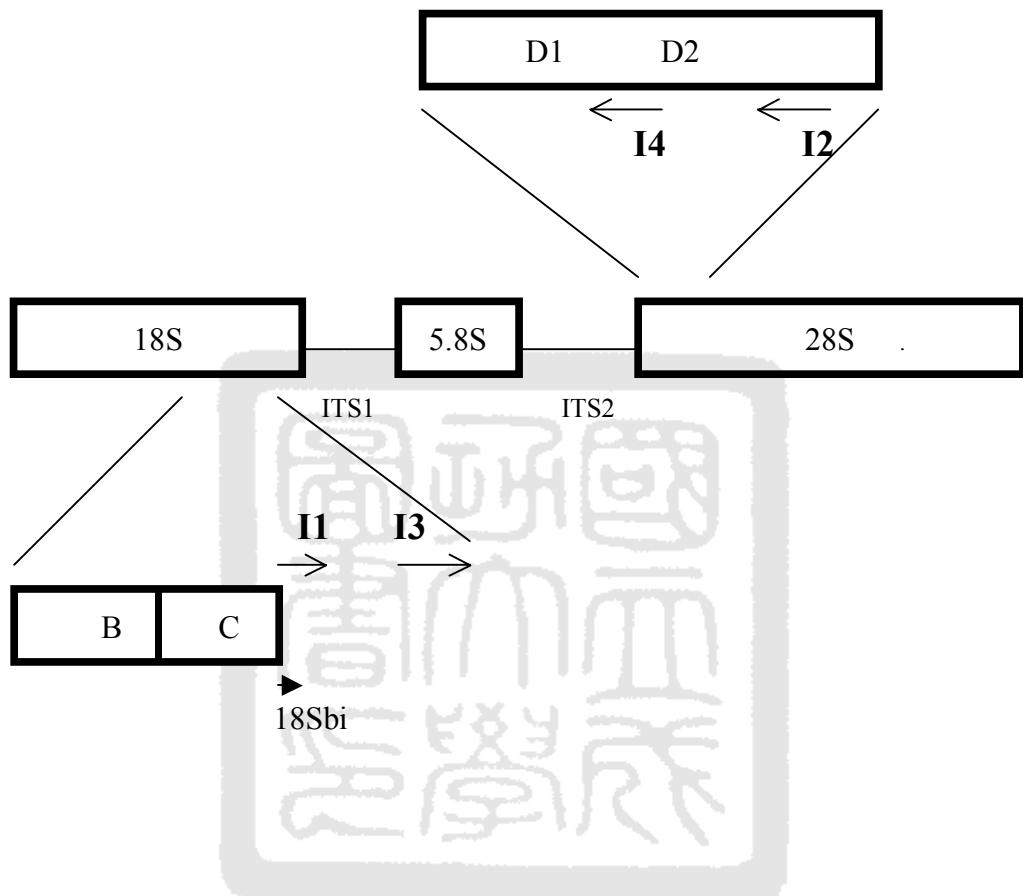


Fig. 3 The region of rDNA used in the study and location of primers, arrow indicating the direction of PCR amplification. (Modify Whiting *et al.*, 1997)

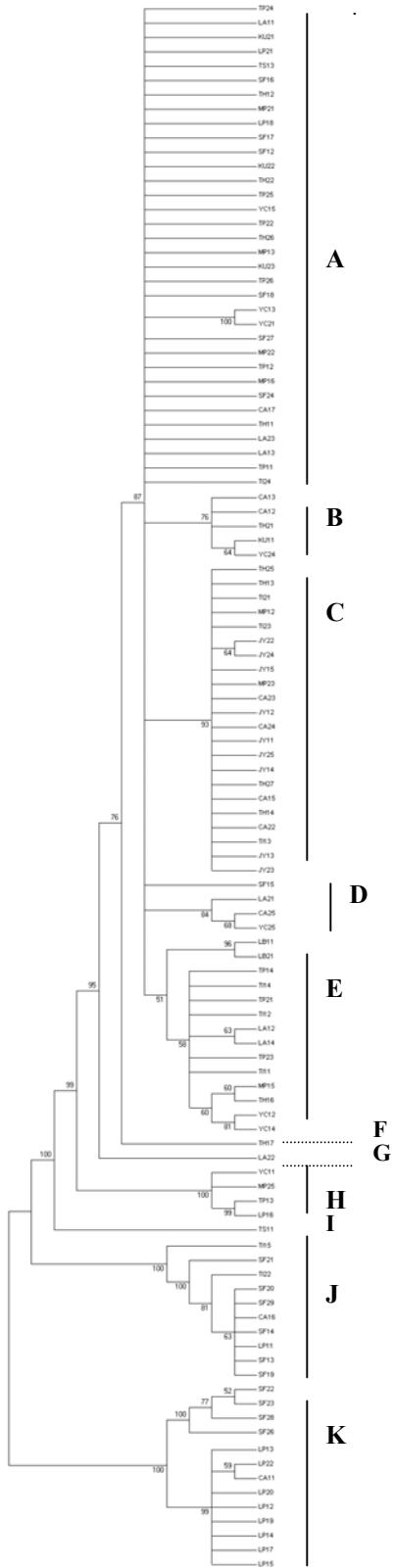


Fig. 4 Neighbor-joining tree representative sequences (haplotypes) of nuclear rDNA in *Cloeon marginale* Hagen. Numbers at notes indicate bootstrap values. rDNA types (A-K) are labeled on clades.

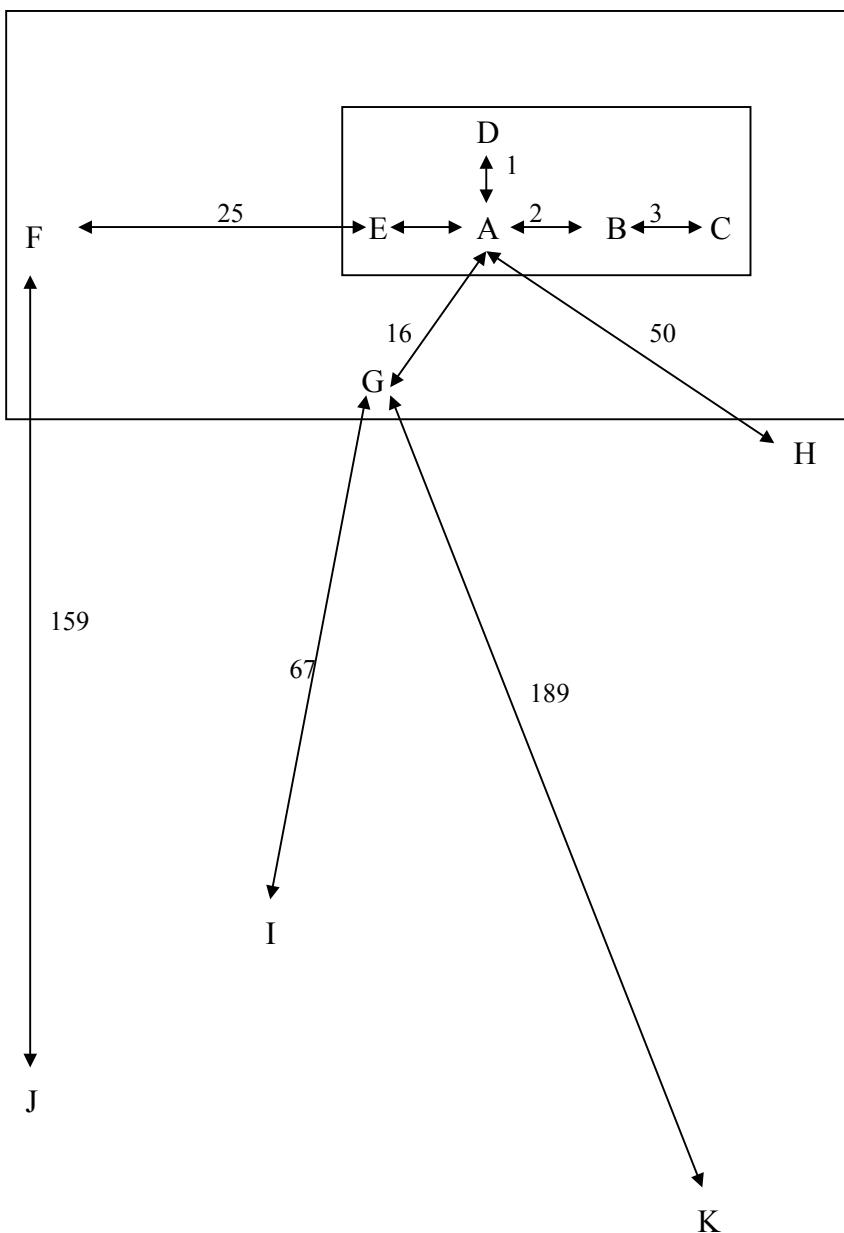


Fig. 5 Minimum spanning network generated using method of Excoffier and Smouse (1994) for types of nuclear rDNA of populations of *Cloeon marginale* Hagen. Mutational changes are indicated at nodes.

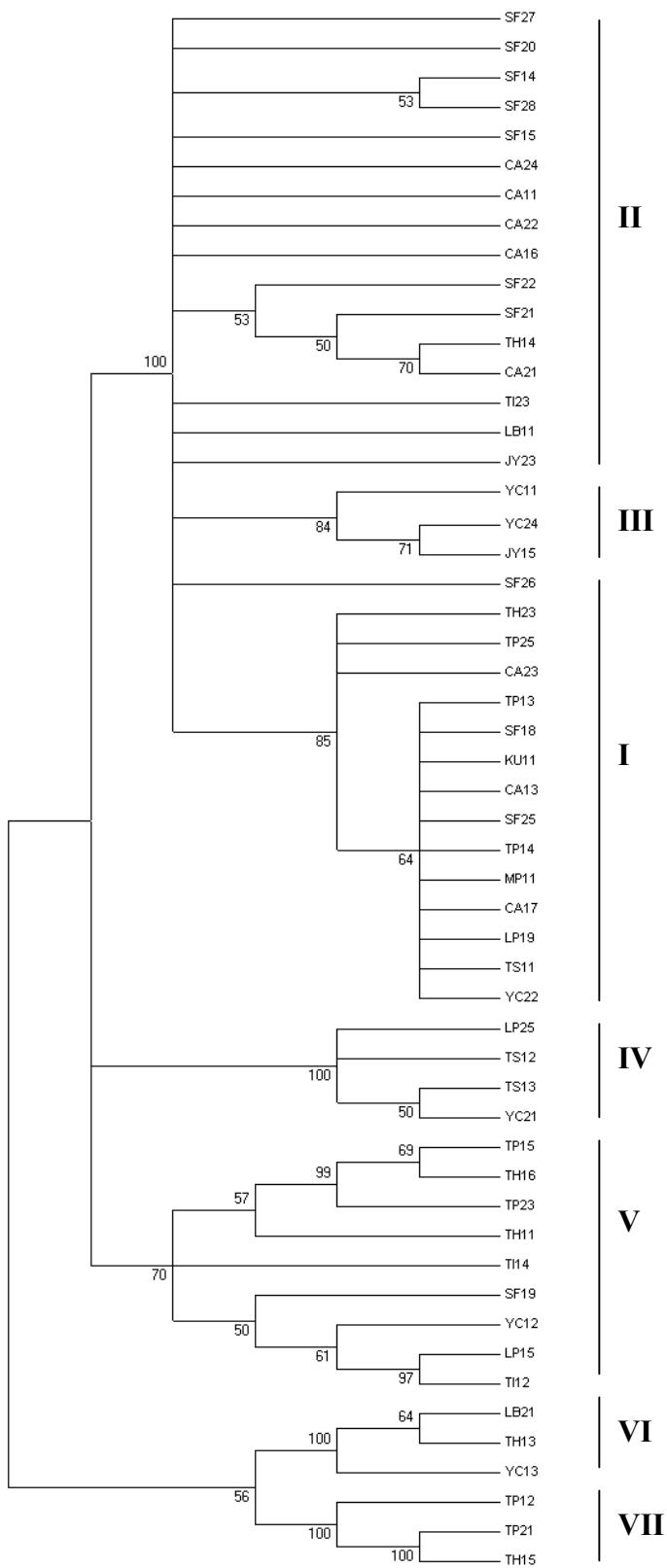


Fig. 6 Neighbor-joining tree representative sequences (haplotypes) of nuclear EF-1 α in *Cloeon marginale* Hagen. Numbers at notes indicate bootstrap values. EF-1 α types (I-VII) are labeled on clades.

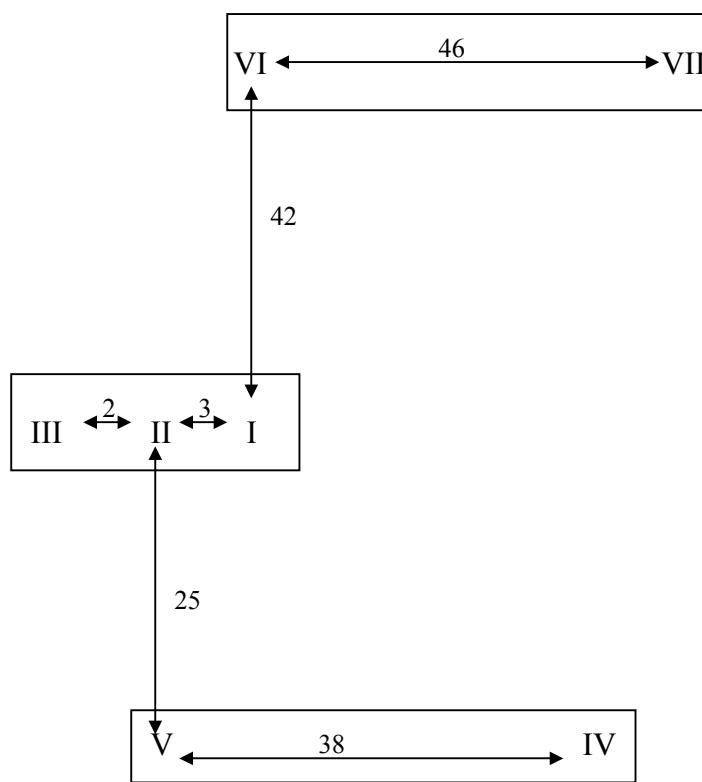


Fig. 7 Minimum spanning network generated using method of Excoffier and Smouse (1994) for types of nuclear EF-1 α of populations of *Cloeon marginale* Hagen. Mutational changes are indicated at nodes.

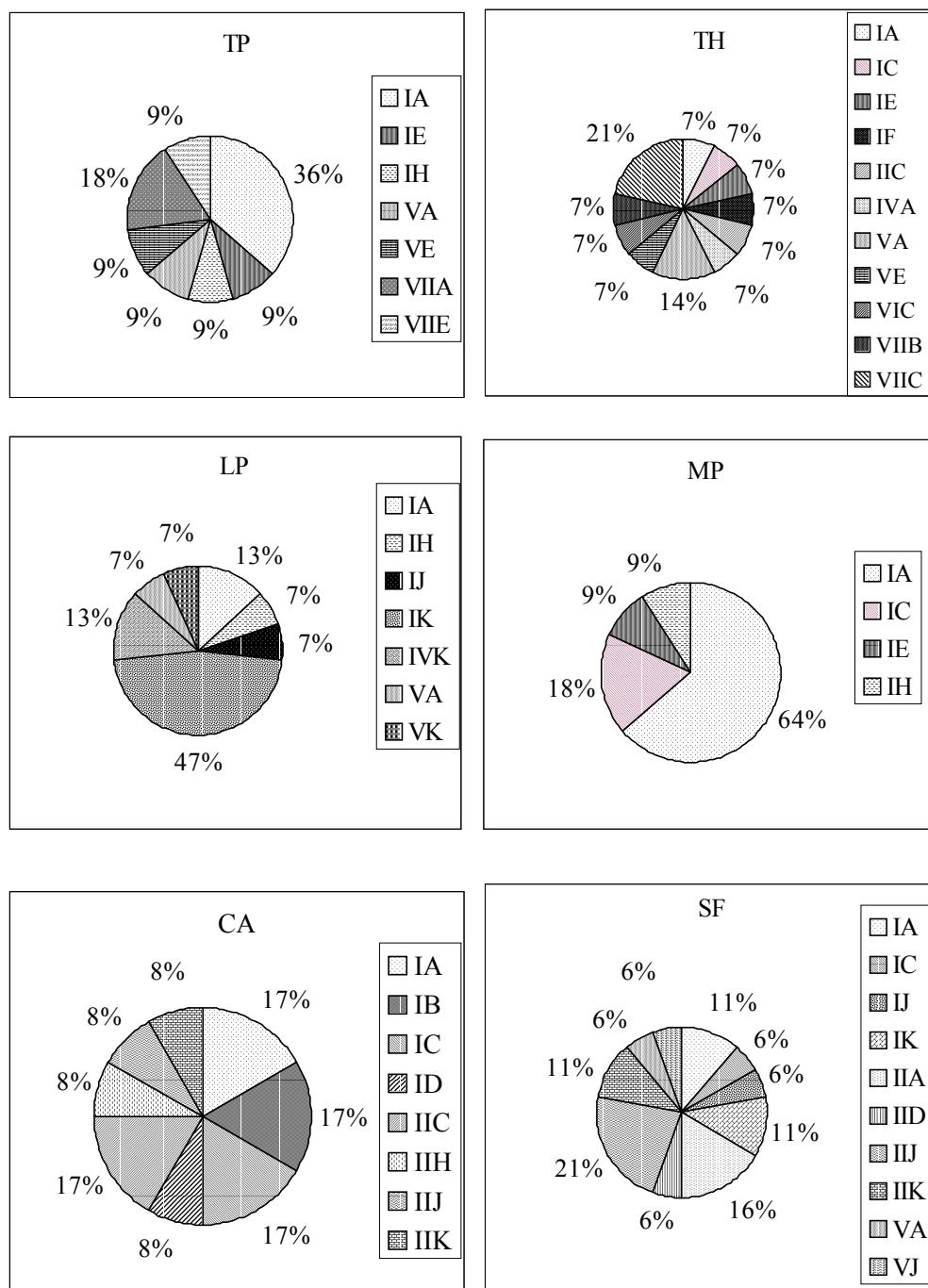


Fig. 8 Frequency of nuclear types (rDNA-EF-1 α associations) in each population is indicated in pie diagrams. Abbreviations of populations are given in Table 1.

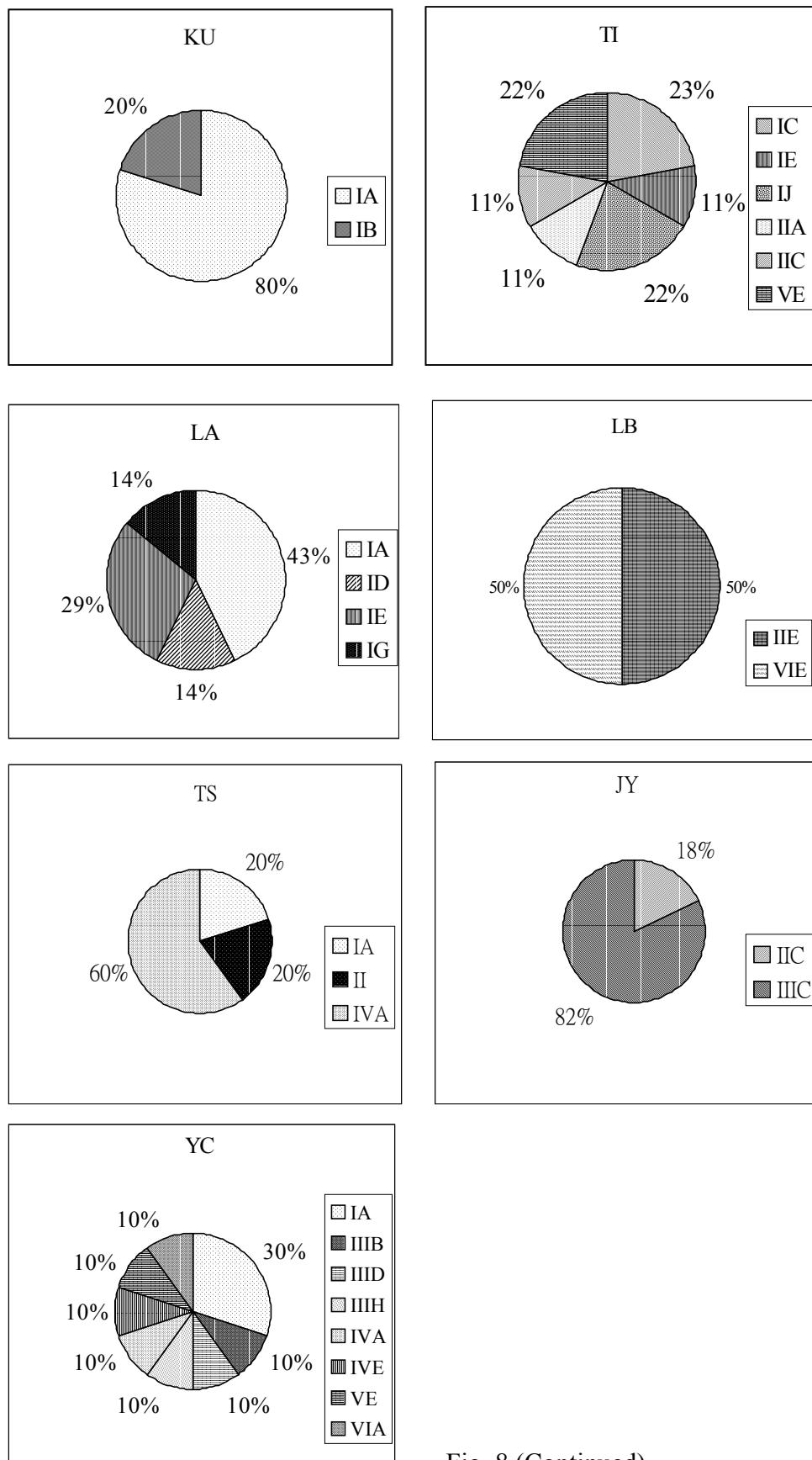


Fig. 8 (Continued)

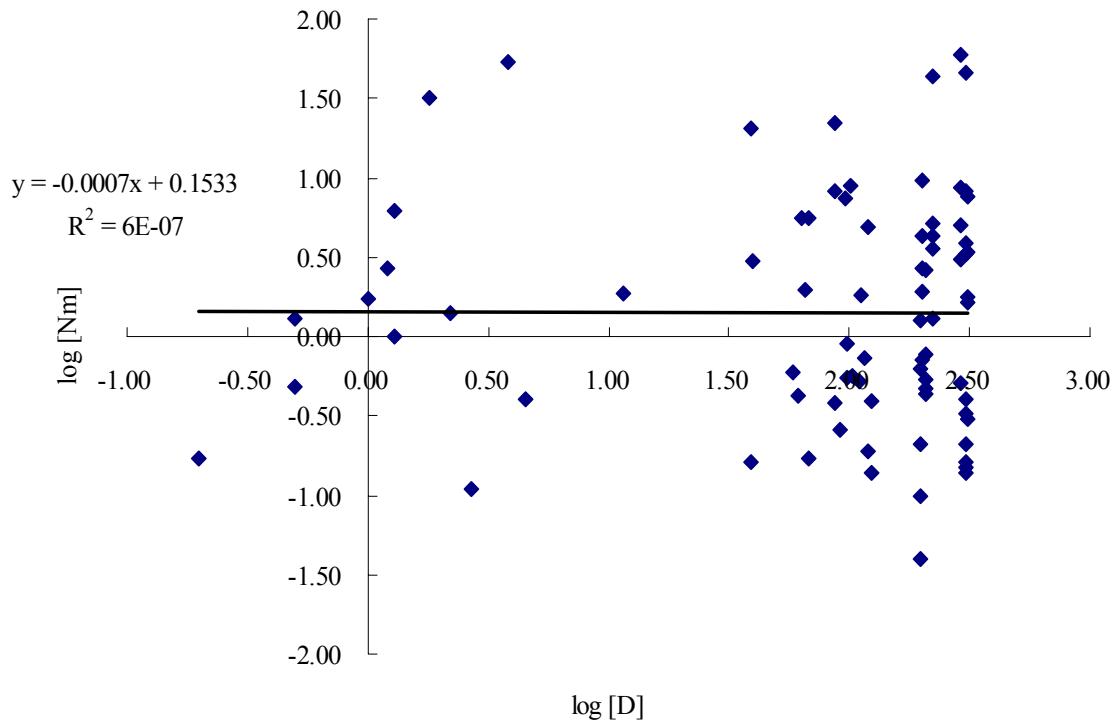


Fig. 9 Scatter plot of logarithmic scales of Nm and geographical distance between 13 populations of *Cloeon marginale* Hagen.

Table 1. Materials of *Cloeon marginale* Hagen collected from different populations in Taiwan used for nuclear ribosomal DNA and elongation factor 1 α (EF-1 α) sequencing. Locality, area, sample size, nuclear types (rDNA type and EF-1 α type associations), and aquatic profile of each population are indicated.

Localities	Area	Symbol	Coordinate	Sampling size (n)	Nuclear types	Aquatic profile
Northern Region		N		51	IA (14), IC (3), IE (3), IF (1), IH (3), IJ (1), IK (7), IIC (1), IVA (1), IVK (2), VA (4), VE (2), VK (1), VIC (1), VIIA (2), VIIB (1), VIIC (3), VIIIE (1)	Permanent/ Temporal
Hsinchu	Ta-pu-shuiku	TP	24° 40' N, 120° 59' E	11	IA (4), IE (1), IH (1), VA (1), VE (1), VIIA (2), VIIIE (1)	Permanent
Taoyuan	Tahsi	TH	24° 51' N, 121° 17' E	14	IA (1), IC (1), IE (1), IF (1), IIC (1), IVA (1), VA (2), VE (1), VIC (1), VIIB (1), VIIC (3)	Temporal
Ilan	Shuang-line-pi, large pool	LP	24° 45' N, 121° 39' E	15	IA (2), IH (1), IJ (1), IK (7), IVK (2), VA (1), VK (1)	Permanent
	Shuang-line-pi, small pool	MP	24° 45' N, 121° 39' E	11	IA (7), IC (2), IE (1), IH (1)	Permanent
Eastern Region		E		30	IA (4), IB (2), IC (3), ID (1), IJ (1), IK (2), IIA (3), IIC (2), IID (1), IIH (1), IIJ (5), IIK (3), VA (1), VJ (1)	Temporal
Hualine	Chi-an	CA	23° 58' N, 121° 33' E	12	IA (2), IB (2), IC (2), ID (1), IIC (2), IIH (1), IIJ (1), IIK (1)	Temporal
	Shou-feng	SF	23° 52' N, 121° 30' E	18	IA (2), IC (1), IJ (1), IK (2), IIA (3), IID (1), IIJ (4), IIK (2), VA (1), VJ (1)	Temporal

Table 1 (Continued)

Localities	Area	Symbol	Coordinate	Sampling size (n)	Nuclear types	Aquatic profile
Southern Region		S		28	IA (8), IB (1), IC (2), ID (1), IE (3), IG (1), II (2), IJ (1), IIA (1), IIC (1), IIE (1), IVA (3), VE (2), VIE (1)	Permanent
Pengtung,	Kuhu	KU	22° 04' N, 120° 52' E	5	IA (4), IB (1)	Permanent
Nanjenshan	Ta-ilan-tan	TI	22° 04' N, 120° 52' E	9	IC (2), IE (1), IJ (2), IIA (1), IIC (1), VE (2)	Permanent
	3.7 km lake area	LA	22° 04' N, 120° 52' E	7	IA (3), ID (1), IE (2), IG(1)	Permanent
	4.0 km lake area	LB	22° 04' N, 120° 52' E	2	IIE (1), VIE (1)	Permanent
	Ta-shui-yu	TS	22° 04' N, 120° 52' E	5	IA (1), II (1), IVA (3)	Permanent
Central Region		C		21	IA (3), IIC (2), IIIB (1), IIIC (9), IIID (1), IIIH (1), IVA (1), IVE (1), VE (1), VIA (1)	Permanent
Nantou	Jih-yueh-tan	JY	23° 51' N, 120° 55' E	11	IIC (2), IIIC (9)	Permanent
	Yu-chih	YC	23° 53' N, 120° 56' E	10	IA (3), IIIB (1), IIID (1), IIIH (1), IVA (1), IVE (1), VE (1), VIA (1)	Permanent

Table 2. Sequences and position of primers used for the PCR amplification of rDNA and EF-1 α .

Primers	5' position	Sequences	3' position	References
I1 ^a	1402	5'-TCC GAT AAC GAA CGA GAC T-3'	1421	Whiting <i>et al.</i> , 1997
I2 ^a	4046	TCC TTG STT CAA GAC GGG TC	4065	Whiting <i>et al.</i> , 1997
I3	1	CAC CGC CCG TCG CTA TTA CC	20	Present study
I4	861	TAG CCT TGG ATG GAG TTT ACC	881	Present study
EF 1 ^b	305	GAC AAC GTC GGG TTC AAC GTG AAG AAC G	314	Palumbi, 1996
EF 2 ^b	360	ATG TGA GAG GTG TGG CAA TCC AAG	368	Palumbi, 1996

Note: ^a Positions are based on the sequence for *Drosophila melanogaster* (Tautz *et al.*, 1987).

^bThe map starts at about amino acid position 150.

Y= C/G

Table 3. Descriptive statistics for separate and combined rDNA partitions.

	rDNA						
	18S	ITS1	5.8S	ITS2	28S	ITS region	Total
Consensus length (bp)	154	121	174	205	325	500	979
Data partition length (bp)	145 (141~151)	110 (82~115)	155 (153~165)	172 (161~177)	299 (297~313)	436 (401~445)	881 (852~897)
No. variable sites/% data partition	61/39.6	95/78.5	106/60.9	170/82.9	165/50.8	371/74.2	597/61.0
Polymorphism sites (tv+ts)	52	34	88	76	130	198	380
<i>indel</i>	9	61	18	94	35	173	217
No. parsimony informative sites/							
% data partition	51/33.1	83/68.6	85/48.9	147/71.7	148/45.5	315/63.0	514/52.5
%A	30.5	36.0	27.6	34.9	31.3	32.7	31.9
%T	24.7	35.0	26.6	25.1	22.8	28.2	25.8
%C	20.8	14.6	19.8	18.1	18.0	17.9	18.4
%G	24.0	14.3	26.0	21.9	27.9	21.2	24.0
transitions (ts)	0.0439	0.1315	0.0799	0.1156	0.0561	0.1018	0.0729
transversions (tv)	0.0373	0.1259	0.0517	0.1294	0.0745	0.0936	0.0760
R (ts/tv)	1.1769	1.0445	1.5455	0.8934	0.7530	1.0876	0.9592
# of haplotypes	23	16	40	48	36	67	87
Haplotype diversity (<i>h</i>)	0.726	0.469	0.865	0.899	0.864	0.941	0.980
Nucleotide diversity (θ)	0.0754	0.2383	0.1310	0.2317	0.1273	0.1737	0.1334

Table 4. Estimates of haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (θ) with populations of *Cloeon marginale* Hagen based on rDNA sequences. Possible minimum recombination events are inferred using software DnaSP. Testing statistics for neutrality at rDNA. These symbols for populations see Table 1.

Populations	Sample sizes	# of haplotypes	Polymorphic sites (S)	Haplotype diversity ($h \pm SD$)	Nucleotide diversity ($\theta \pm SD$)	Minimum recombination (Rm)	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*	Tajima's D
N	51	35	342	0.961 ± 0.018	0.14833 ± 0.01940	37	-1.27833	-1.12467	-0.39247
TP	11	10	91	0.982 ± 0.046	0.02419 ± 0.01247	0	-2.24701*	-2.44208*	-1.87066*
TH	14	10	71	0.923 ± 0.060	0.02104 ± 0.00527	3	-1.37714	-1.47051	-1.02266
LP	15	11	322	0.933 ± 0.054	0.20460 ± 0.04520	25	-0.34248	-0.30372	-0.06087
MP	11	8	94	0.891 ± 0.092	0.02267 ± 0.01120	0	-2.30400**	-2.53869**	-2.03663***
E	30	25	332	0.982 ± 0.016	0.21588 ± 0.02213	32	0.72086	0.74860	0.45751
CA	12	10	321	0.970 ± 0.044	0.13126 ± 0.05496	23	-1.85068	-2.10919	-1.84035*
SF	18	16	336	0.980 ± 0.028	0.26133 ± 0.02900	14	1.35579	1.55251	1.28503

* P < 0.05, **P < 0.02, ***P < 0.01

Table 4. (Continued)

Populations	Sample sizes	# of haplotypes	Polymorphic sites (S)	Haplotype diversity	Nucleotide diversity	Minimum recombination				
				($h \pm SD$)	($\theta \pm SD$)	(Rm)	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*	Tajima's D	
S	28	24	280	0.974 ± 0.024	0.06506 ± 0.02122	22	-1.20054	-1.75375	-2.05550*	
	KU	5	4	0.900 ± 0.161	0.00437 ± 0.00140	0	-1.19955	-1.26846	-1.19955	
	TI	9	9	251	1.000 ± 0.052	0.14221 ± 0.05360	8	0.07941	-0.08932	-0.57412
	LA	7	7	42	1.000 ± 0.076	0.02104 ± 0.00436	1	-0.00727	-0.06914	-0.25302
	LB	2	2	3	1.000 ± 0.500	0.00346 ± 0.00173	0	—	—	—
	TS	5	3	120	0.700 ± 0.218	0.06314 ± 0.03679	0	-1.26812**	-1.37965**	-1.26812
C	21	17	151	0.981 ± 0.020	0.03357 ± 0.00757	5	-1.92464	-2.11923	-1.55669	
	JY	11	9	14	0.964 ± 0.051	0.00353 ± 0.00065	0	-1.70955	-1.89066	-1.55309
	YC	10	9	134	0.978 ± 0.054	0.04897 ± 0.01215	5	-1.04806	-1.16000	-0.96070
Overall	130	87	380	0.980 ± 0.006	0.13342 ± 0.01316	52	-0.18921	-0.62411	-0.90636	

? Four or more sequences are need to compute Tajima's and Fu and Li's statistics.

* P < 0.05, **P < 0.02, ***P < 0.01

Table 5. Estimates of haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (θ) with populations of *Cloeon marginale* Hagen based on EF-1 α sequences. Possible minimum recombination events are inferred using software DnaSP. Testing statistics for neutrality at EF-1 α . These symbols for populations see Table 1.

Populations	Sample sizes	# of haplotypes	Polymorphic sites (S)	Haplotype diversity	Nucleotide diversity	Minimum recombination			
				($h \pm SD$)	($\theta \pm SD$)	(Rm)	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*	Tajima's D
N	51	21	84	0.823 ± 0.052	0.14766 ± 0.01680	16	0.80821	0.33970	-0.58359
TP	11	8	65	0.927 ± 0.066	0.18319 ± 0.03351	7	0.80527	0.71458	0.12087
TH	14	9	79	0.901 ± 0.062	0.22093 ± 0.01890	9	0.02661	-0.00997	-0.10159
LP	15	8	57	0.790 ± 0.105	0.10533 ± 0.02799	5	0.70820	0.34125	-0.76565
MP	11	3	2	0.473 ± 0.162	0.00270 ± 0.00104	0	-0.33034	-0.49428	-0.77815
E	30	20	59	0.949 ± 0.027	0.05629 ± 0.01377	4	-1.18431	-1.57843	-1.64135
CA	12	9	15	0.939 ± 0.058	0.02949 ± 0.00378	0	-0.44023	-0.25754	0.38206
SF	18	14	56	0.967 ± 0.030	0.07268 ± 0.02452	4	-1.07415	-1.35965	-1.40340

Table 5. (Continued)

Populations	Sample sizes	# of haplotypes	Polymorphic sites (S)	Haplotype diversity ($h \pm SD$)	Nucleotide diversity ($\theta \pm SD$)	(Rm)	Minimum recombination		
							Fu and Li's D*	Fu and Li's F*	Tajima's D
S	28	11	66	0.714 ± 0.093	0.09656 ± 0.02159	6	-0.62336	-0.99971	-1.30575
KU	5	2	1	0.400 ± 0.237	0.00212 ± 0.00126	0	-0.81650	-0.77152	-0.81650
TI	9	5	43	0.806 ± 0.120	0.09660 ± 0.03478	1	-0.18168	-0.32495	-0.62573
LA	7	2	1	0.286 ± 0.196	0.00152 ± 0.00104	0	-1.04881	-1.10146	-1.00623
LB	2	2	43	1.000 ± 0.500	0.27111 ± 0.13555	0	—	—	—
TS	5	4	40	0.900 ± 0.161	0.14567 ± 0.04173	0	1.72334*	1.86293*	1.72334
C	21	11	64	0.781 ± 0.094	0.08869 ± 0.02301	6	-0.70312	-1.12644	-1.55623
JY	11	3	3	0.473 ± 0.162	0.00446 ± 0.00169	0	0.12672	-0.06770	-0.62785
YC	10	9	63	0.978 ± 0.054	0.15952 ± 0.03298	6	-0.03042	-0.20787	-0.64367
Overall	130	53	94	0.878 ± 0.025	0.11361 ± 0.01027	19	0.9332	0.04539	-1.06133

?Four or more sequences are need to compute Tajima's and Fu and Li's statistics.

* P < 0.05.

Table 6. Distribution of rDNA types (A-K) among populations of *Cloeon marginale* Hagen. Regions are indicated: Northern region (N), Central region (C), Southern region (S), and Eastern region (E).

Regions:	N				C		S				E		Total	
	TP	TH	LP	MP	JY	YC	KU	LA	TS	TI	LB	SF	CA	
A	7	4	3	7		5	4	3	4	1		6	2	46 (35.4%)
B		1				1	1					2		5 (3.8%)
C	6		2	11					3			1	4	27 (20.8%)
D						1		1				1	1	4 (3.1%)
E	3	2		1		2		2		3	2			15 (11.5%)
F		1											1 (0.8%)	
G							1						1 (0.8%)	
H	1		1	1		1						1		5 (3.8%)
I								1					1 (0.8%)	
J			1						2			6	1	10 (7.7%)
K			10								4	1		15 (11.5%)

Table 7. Distribution of EF-1 α types (I-VII) among populations of *Cloeon marginale* Hagen. Regions are indicated: Northern region (N), Central region (C), Southern region (S), and Eastern region (E).

Regions:	N				C		S				E		Total	
	TP	TH	LP	MP	JY	YC	KU	LA	TS	TI	LB	SF	CA	
I	6	4	11	11		3	5	7	2	5		6	7	67 (51.5%)
II		1				2				2	1	10	5	21 (16.2%)
III						9	3							12 (9.2%)
IV		1	2			2			3					8 (6.2%)
V	2	3	2			1				2		2		12 (9.2%)
VI		1				1					1			3 (2.3%)
VII	3	4												7 (5.4%)

Table 8. Association Between rDNA types and EF-1 α types of *Cloeon marginale* Hagen. Distribution region of each type is indicated in square brackets. Percentage of each complex type is indicated in parentheses. W: widespread. Other symbols see Table 1.

	rDNA type: A [W]	B [W]	C [W]	D [C+S+E]	E [N+S+C]	F [TH]	G [LA]	H [N+E+C]	I [TS]	J [N+E+S]	K [N+E]	Total
EF-1 α type:												
I [W]	29 22.3%	3 2.3%	8 6.2%	2 1.5%	6 4.6%	1 0.8%	1 0.8%	3 2.3%	1 0.8%	4 3.1%	9 6.9%	67
II [C]	4 3.1%		6 4.6%	1 0.8%	1 0.8%			1 0.8%		5 3.8%	3 2.3%	21
III [W]		1 0.8%	9 6.9%	1 0.8%				1 0.8%				12
IV [N+S+C]	5 3.8%				1 0.8%					2 1.5%		8
V [W]	5 3.8%				5 3.8%					1 0.8%	1 0.8%	12
VI [N+S+C]	1 0.8%		1 0.8%		1 0.8%							3
VII [N]	2 1.5%	1 0.8%	3 2.3%		1 0.8%							7
Total	46	5	27	4	15	1	1	5	1	10	15	130

Table 9. Pairwise F_{ST}/Nm estimates between populations based on genetic variation of rDNA. These symbols for populations see Table 1.

TP	TH	LP	MP	CA	SF	KU	TI	LA	LB	TS	JY	YC
TP	—											
TH	0.077/3.01	—										
LP	0.598/0.17	0.609/0.16	—									
MP	0.047/5.53	0.012/20.41	0.598/0.17	—								
CA	0.033/7.36	0.027/8.84	0.399/0.38	0.011/21.98	—							
SF	0.310/0.56	0.324/0.52	0.215/0.91	0.312/0.55	0.118/1.87	—						
KU	0.048/4.96	0.132/1.65	0.632/0.15	0.006/46.04	0.066/3.55	0.346/0.47	—					
TI	0.075/3.09	0.069/3.38	0.430/0.33	0.070/3.33	0.051/5.18	0.087/2.63	0.127/1.72	—				
LA	0.004/59.49	0.125/1.75	0.606/0.16	0.061/3.87	0.055/4.32	0.317/0.54	0.151/1.40	0.085/2.69	—			
LB	0.329/0.51	0.454/0.30	0.638/0.14	0.383/0.40	0.162/1.29	0.368/0.43	0.699/0.11	0.162/1.29	0.342/0.48	—		
TS	0.030/8.65	0.032/7.64	0.542/0.21	0.031/8.25	0.006/43.03	0.243/0.78	0.005/54.17	0.039/6.24	0.008/31.67	0.202/0.99	—	
JY	0.494/0.26	0.254/0.73	0.645/0.14	0.390/0.39	0.112/1.99	0.376/0.42	0.705/0.10	0.166/1.26	0.545/0.21	0.863/0.04	0.284/0.63	—
YC	0.030/8.21	0.120/1.83	0.573/0.19	0.048/4.92	0.044/5.50	0.294/0.60	0.116/1.91	0.086/2.67	0.055/4.32	0.257/0.72	0.026/9.53	0.384/0.40
												—

Table 10. Pairwise F_{ST}/Nm estimates between populations based on genetic variation of EF-1 α . These symbols for populations see Table 1.

TP	TH	LP	MP	CA	SF	KU	TI	LA	LB	TS	JY	YC
TP	–											
TH	0.013/19.36	–										
LP	0.063/3.73	0.131/1.66	–									
MP	0.238/0.80	0.353/0.46	0.115/1.93	–								
CA	0.202/0.99	0.280/0.64	0.082/2.79	0.286/0.62	–							
SF	0.157/1.34	0.204/0.98	0.096/2.36	0.347/0.47	0.032/7.45	–						
KU	0.242/0.78	0.358/0.45	0.120/1.84	0.038/6.25	0.322/0.53	0.366/0.43	–					
TI	0.079/2.90	0.145/1.47	0.039/6.68	0.143/1.50	0.025/9.57	0.021/11.57	0.148/1.43	–				
LA	0.240/0.79	0.356/0.45	0.117/1.89	0.093/2.94	0.299/0.59	0.354/0.46	0.000/ ∞	0.145/1.48	–			
LB	0.081/3.32	0.143/2.00	0.071/3.80	0.127/1.72	0.003/76.07	0.078/3.47	0.139/1.55	0.118/2.37	0.129/1.68	–		
TS	0.196/1.02	0.145/1.48	0.166/1.26	0.482/0.27	0.395/0.38	0.321/0.53	0.485/0.27	0.272/0.67	0.485/0.27	0.059/3.96	–	
JY	0.401/0.37	0.388/0.39	0.406/0.37	0.922/0.02	0.530/0.22	0.291/0.61	0.931/0.02	0.335/0.50	0.935/0.02	0.047/5.07	0.498/0.25	–
YC	0.068/3.41	0.054/4.36	0.004/63.23	0.263/0.70	0.132/1.64	0.069/3.35	0.272/0.67	0.021/11.67	0.267/0.69	0.224/1.37	0.040/6.02	0.207/0.96

Table 11. Pairwise F_{ST} / Nm estimates between geographical regions (N, E, S, C) based on genetic variation of nrDNA (below the diagonal) and EF-1 α (above the diagonal).

	EF-1 α : N	E	S	C
rDNA				
N	–	0.122/1.79	0.021/11.71	0.149/1.43
E	0.050/4.73	–	0.077/3.01	0.107/2.09
S	0.082/2.80	0.129/1.69	–	0.123/1.78
C	0.145/1.47	0.216/0.91	0.067/3.49	–

Table 12. Observed number (O) of genotype frequency is compared to expected value (E) based on chi-square analysis.

 $(X^2 = 73.586, P = 0.11176)$

		rDNA type: A B C D E F G H I J K										Total	
		EF 1 α type:											
I	O	29	3	8	2	6	1	1	3	1	4	9	67
	E	23.71	2.58	13.92	2.06	7.73	0.52	0.52	2.58	0.52	5.15	7.73	
II	O	4	0	6	1	1	0	0	1	0	5	3	21
	E	7.43	0.81	4.36	0.65	2.42	0.16	0.16	0.81	0.16	1.62	2.42	
III	O	0	1	9	1	0	0	0	1	0	0	0	12
	E	4.25	0.46	2.49	0.37	1.38	0.09	0.09	0.46	0.09	0.92	1.38	
IV	O	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	8
	E	2.83	0.31	1.66	0.25	0.92	0.06	0.06	0.31	0.06	0.62	0.92	
V	O	5	0	0	0	5	0	0	0	0	1	1	12
	E	4.25	0.46	2.49	0.37	1.38	0.09	0.09	0.46	0.09	0.92	1.38	
VI	O	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3
	E	1.06	0.12	0.62	0.09	0.35	0.02	0.02	0.12	0.02	0.23	0.35	
VII	O	2	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	7
	E	2.48	0.27	1.45	0.22	0.81	0.05	0.05	0.27	0.05	0.54	0.81	
Total		46	5	27	4	15	1	1	5	1	10	15	130

Appendix 1. The program of reaction for touchdown PCR.

Step	Temperature (°C)	Reaction time (Min: Sec)	Step	Temperature (°C)	Reaction time (Min: Sec)
1	92	02:00	22	92	00:35
2	57	01:30	23	50	01:30
3	72	01:30	24	72	01:30
4	92	00:35	25	92	00:35
5	56	01:30	26	49	01:30
6	72	01:30	27	72	01:30
7	92	00:35	28	92	00:35
8	55	01:30	29	48	01:30
9	72	01:30	30	72	01:30
10	92	00:35	31	92	00:35
11	54	01:30	32	47	01:30
12	72	01:30	33	72	01:30
13	92	00:35	34	15 times to 31 step	
14	53	01:30	35	92	00:35
15	72	01:30	36	46	01:30
16	92	00:35	37	72	01:30
17	52	01:30	38	9 times to 35 step	
18	72	01:30	39	72	10:00
19	92	00:35	40	4	00:00
20	51	01:30	41	End	
21	72	01:30			

作者簡歷

姓名：洪 龍 華

性別：男

生日：民國 65 年 09 月 13 日

籍貫：台北縣

地址：台北縣新莊市民安路 229 巷 7 弄 8 號 5 樓

電話：(022) 2058484

e-mail: hlh@single.url.com.tw

學歷：

1997 年 國立宜蘭農工專科學校畜產科畢業

1999 年 國立屏東科技大學野生動物保育學系學士

2002 年 國立成功大學生物學研究所碩士