

材料與方法

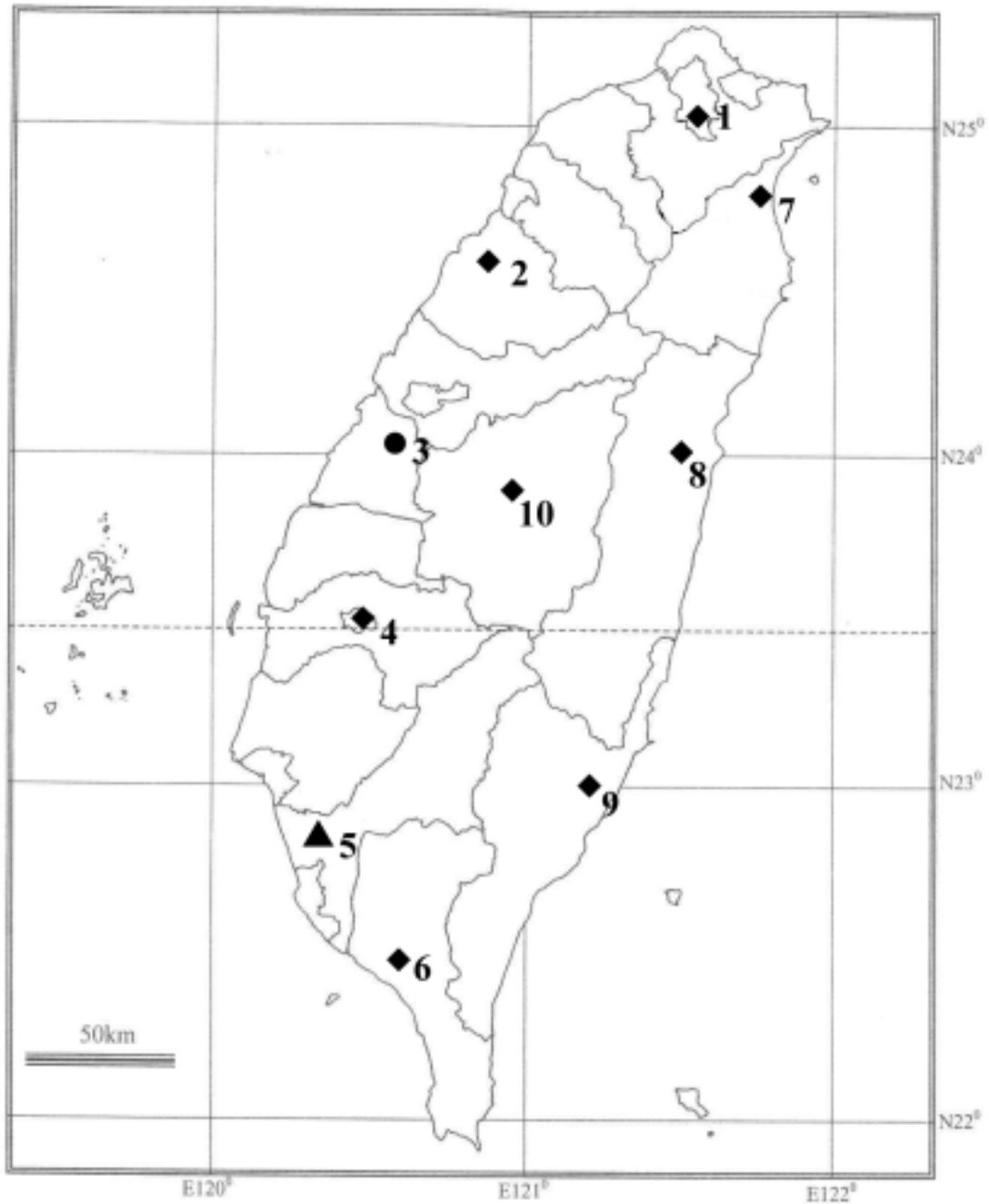
為證實上述提出之問題與假設，乃設計了實驗方法如下：

一、 樣本取樣

2002 年於臺灣各地區進行緣點白粉蝶 (*Pieris canidia*) 與白粉蝶 (*P. rapae crucivora*) 成體之採集，各取九個樣點，包括台北、苗栗、嘉義、彰化、南投、高雄、屏東、台東、花蓮、宜蘭 (圖一)。大陸地區緣點白粉蝶的樣點為四川省四面山、安徽省黃山市、香港；白粉蝶的採樣點為四川省永川、廣東省廣州市、浙江省麗水、河北省天津市、湖北省赤壁市、香港，另尚有日本福岡、奈良、鳴門與東京等四個採樣點 (圖二)。此外，有來自歐洲地區法國 Le Buga、芬蘭 Tiuten、瑞典 Stockholm 之樣本，此為白粉蝶的原名亞種 *P. r. rapae* (圖三)。各地區取樣數目與代號如表一與表二。

為判斷緣點白粉蝶與白粉蝶族群間之親緣關係，選擇分類上同屬的 *P. brassicae* 與 *P. napi* 共三個個體作為外群，採樣點分別為英國 Berkshire 與法國 Le Buga (表四)。

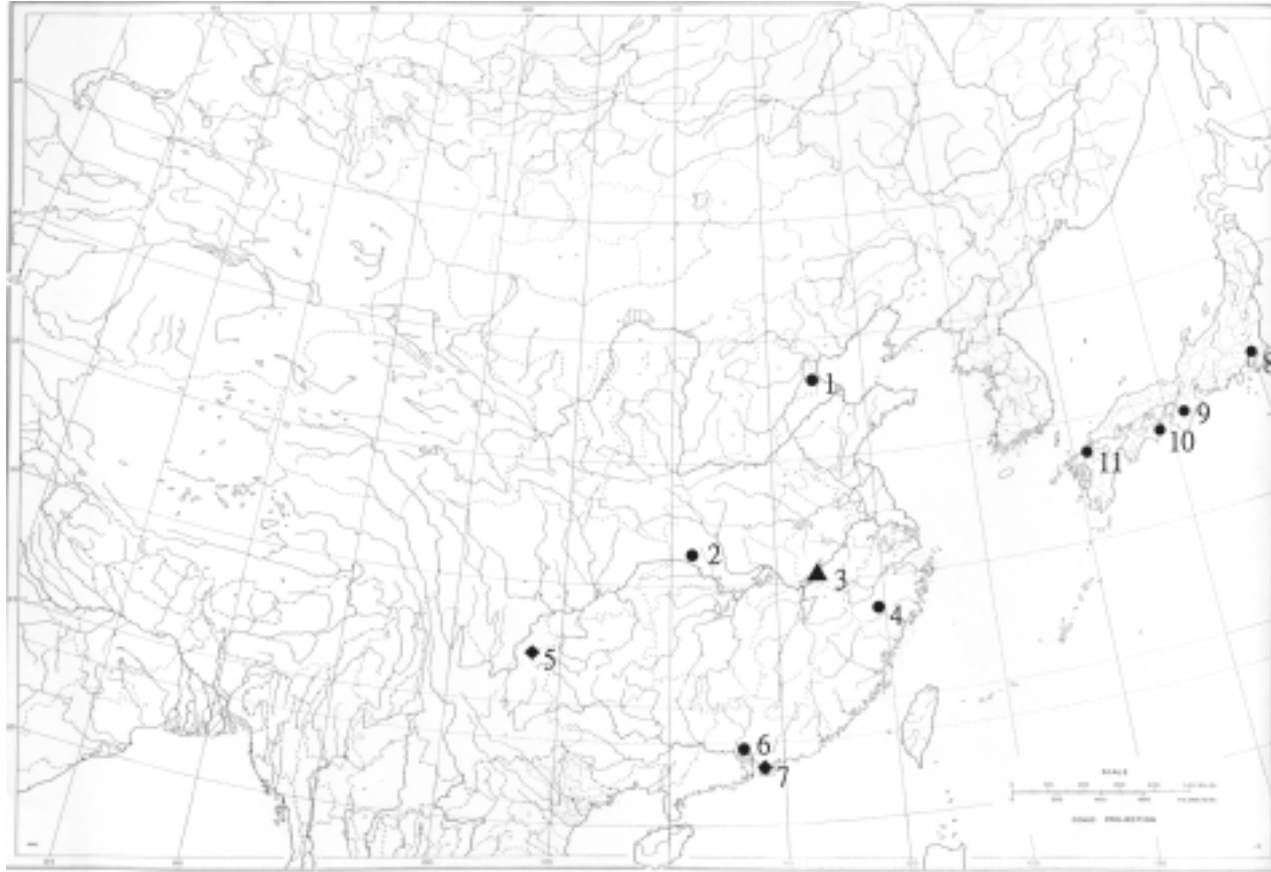
所有的樣本以 99.5% 酒精或 -80°C 低溫冰箱保存。



圖一、緣點白粉蝶 (*Pieris canidia*) 與白粉蝶 (*P. rapae crucivora*) 於台灣島內的採樣點

◆代表緣點白粉蝶與白粉蝶共同的採樣點；▲代表緣點白粉蝶採樣點；●代表白粉蝶採樣點。

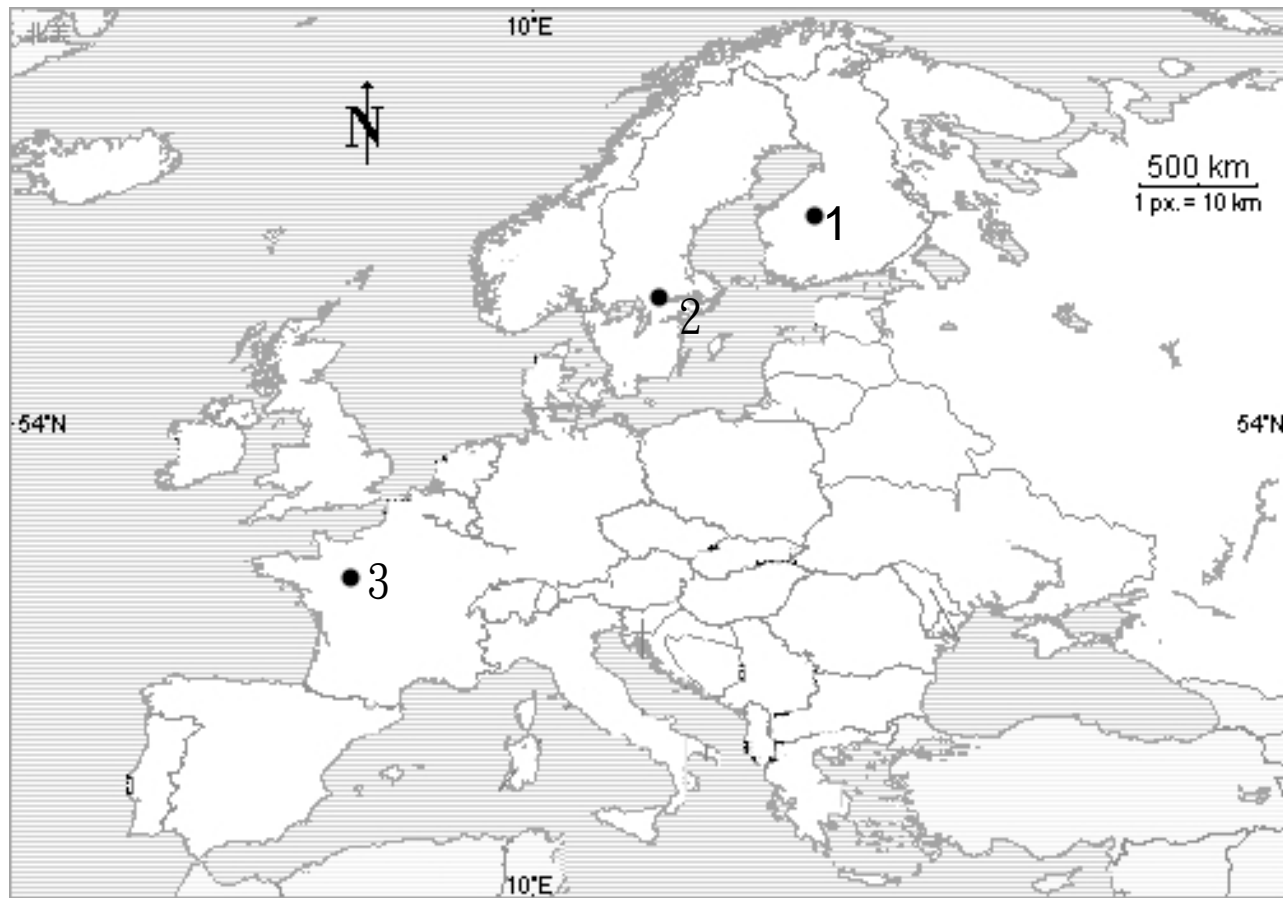
1: 台北 2: 新豐 3: 彰化 4: 嘉義 5: 高雄 6: 屏東 7: 宜蘭 8: 花蓮 9: 台東
10: 南投。



圖二、緣點白粉蝶 (*Pieris canidia*) 與白粉蝶 (*P. rapae crucivora*) 於中國大陸與日本地區的採樣點

◆代表緣點白粉蝶與白粉蝶共同的採樣點；▲代表緣點白粉蝶採樣點；●代表白粉蝶採樣點。

1:河北 2:湖北 3:安徽 4:浙江 5:四川 6:廣東 7:香港 8:東京 9:奈良 10:鳴門 11:福岡。



圖三、白粉蝶原名亞種 (*Pieris rapae rapae*) 於歐洲地區的採樣點

1: Tiutuen, Finland 2: Stockholms Län, Sweden 3: Le Buga, France

表一、緣點白粉蝶 (*Pieris canidia*) 樣本之數量以及採集地點與代號之對照表

地點	代號	數量
台灣島內		
嘉義縣 嘉義市	CY	10
新竹縣 新豐鄉	HF	10
花蓮縣 吉安鄉	HU	9
宜蘭縣 鶯仔嶺	IL	6
高雄縣 阿蓮鄉	KA	8
台東縣 關山鄉	LC	10
台北市	TP	6
屏東縣 埔鹽鄉	PT	10
南投縣 魚池鄉	YT	10
大陸地區		
安徽省 黃山市	AH	5
四川省 四面山	CT	5
香港	HK	5

表二、白粉蝶 (*P. rapae crucivora*) 樣本之數量以及採集地點與代號之對照表

地點	代號	數量
台灣島內		
彰化縣 彰化市	CH	9
嘉義縣 嘉義市	CY	9
新竹縣 新豐鄉	HF	10
花蓮縣 吉安鄉	HU	10
宜蘭縣 礁溪鎮	IL	10
南投縣 水里鄉	NT	10
屏東縣 埔鹽鄉	PT	8
台北市	TP	10
台東縣 關山鄉	TT	10
大陸地區		
四川省 永川	CT	4
廣東省 廣州市	KT	4
浙江省 麗水	TC	5
河北省 天津市	HT	5
湖北省 赤壁市	HP	3
香港	HK	2
日本地區		
Akasaka, Chikugo, Fukuoka (福岡)	FK	5
Nara (奈良)	NR	3
Naruto (鳴門)	NU	5
Tokyo (東京)	TK	5

表三、白粉蝶原名亞種 (*P. r. rapae*) 樣本之數量以及採集地點與代號之對照表

地點	代號	數量
Le Buga, France	FR	2
Tiutuen, Finland	FL	4
Runsa, Upplands Väsby, Stockholms Län, Sweden	SW	2

表四、外群樣本之數量以及採集地點與代號之對照表

種名	代號	地點	數量
<i>Pieris napi</i>	LB	Le Buga, France	2
<i>P. brassicae</i>	UK	Silwood Park, Ascot, Berkshire, England	1

二、 方法

(一) DNA 之抽取

利用標準之 Phenol/chloroform 經過修正後的方法抽取 DNA，步驟如下：

1. 取適量成蝶胸部組織，置於 300 μ l 之 1% digestion buffer 中，將組織剪碎，另加入 10 μ l 之 protenase K (0.5mg/ml) 以及 10 μ l 之 DTT (10mg/m)。置於 56°C 水浴槽反應 14-18 小時。

表五、Digestion buffer 濃度比例配方

藥 劑	濃 度
Tris (pH 8.0)	10mM
EDTA (pH 8.0)	2mM
NaCl	10mM
SDS	1%
DTT	10mg/ml
Protienase K	0.5mg/ml

2. 加入等體積 5M 之 LiCl 與二倍體積之氯仿，搖動 45 分鐘，再以 15000 r.p.m. 離心 15 分鐘。

3. 取出上清液，加入等體積之氯仿，再搖動 30 分鐘，之後以 15000r.p.m.離心 15 分鐘。
4. 取出上清液，加入 25 倍體積 99.5%冰酒精。輕晃數次，再以 15000r.p.m.離心 15 分鐘。
5. 倒去上清液，加入 1000 μ l 之 70%酒精，將沈澱物彈起，以 15000r.p.m.離心 5 分鐘。
6. 倒去上清液，至入通風櫥風乾。
7. 將萃取出之 DNA 溶於 50 μ l 之二次蒸餾水中。
8. 於 1%瓊脂膠片上進行電泳，檢查 DNA 的完整性，最後保存於 -20°C 冰箱。

(二) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

以聚合酶連鎖反應來增幅細胞色素氧化酶 I, II (cytochrome oxidase I, II) 之基因片段。

細胞色素氧化酶 I, II 基因區間的 PCR 放大反應引子為：

1A. LCO : 5' - GGTCAAATCATAAAGATATTGG - 3' (Wahlberg and Zimmermann 2000)

1B. HCO : 5' - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA - 3' (Wahlberg and Zimmermann 2000)

2A. Efc_{ox2100} : 5'- CTGCTGGAGGAGGCGATCC -3' (吳立偉, 未發表)

2B. Cpp_{cox2770} : 5'- TGGATAATCAGAATATCGTCGAGG -3' (吳立偉, 未發表)

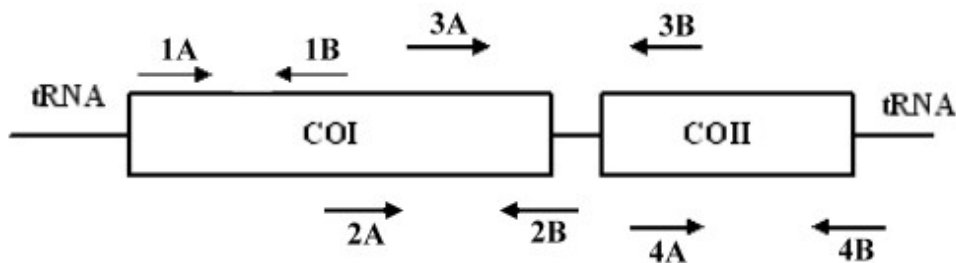
3A. pco-2440 : 5'- CTGTTGGAGGTTTAACCGGAG - 3'

3B. pco-3200 : 5'- TTCCGGGACGATTAATAAAG - 3'

4A. Pierre : 5'- AGAGCCTCTCCTTTAATAGAACA - 3' (Caterino and Sperling 1999)

4B. Eva : 5'- GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT - 3' (Caterino and Sperling 1999)

引子對於粒線體 DNA 的相對位置如圖四。引子 3A 與 3B 是參考所由分別由 2A 與 2B 及 4A 與 4B 所取得之片段序列自行設計之。



圖四、本研究所使用之引子在粒線體 DNA *COI* 與 *COII* 上的位置

基因區間片段之 PCR 反應是參考 Brunton (1998) 報導的方法，並經修飾後使用，利用 GeneAmp PCR System 9700 的熱循環儀進行反應。PCR 的反應程序如下：

1. 先以 94°C、1 分鐘，使 DNA 雙股完全變性 (denature) 解開後，進行 35 個循環，循環設計如下：94°C、15 秒，使 DNA 雙股變性解開；54°C、1 分鐘，使 DNA 與引子鍊合 (annealing)；72°C、40 秒，進行 DNA 延伸 (extension)。35 個循環結束後，再進行 72°C、10 分鐘，使 DNA 的延伸工作完全，反應後保存於 4°C。
2. 在 1%瓊脂膠片上，以電壓 100 伏特進行進行電泳 30 分鐘。經由溴化乙啶螢光染色劑 (0.5mg/ml EtBr) 的處理後，在紫外光燈下拍照，檢測增幅的 DNA 產物的品質與片段長度。

三、 統計分析

(一) 序列排序 (sequence alignment) 與分析

先將定序所得之序列以 BioEdit (version 3.5.0.9) (Hall 1999) 軟體進行比對與排序，再至 National Center of Biotechnology Information (NCBI) 網站上進行序列比對，確認為本研究所需之生物序列。

排序後的序列以 BioEdit 軟體將檔案轉存成 DnaSP (version 3.51) 軟體 (Rozas and Rozas 2000) 以及 MEGA (version 2.1) 軟體 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Kumar et al. 2001) 所需之格式，以進行相關資料之分析。

以 DnaSP 軟體計算樣本序列排列後核苷酸置換 (substitution) 的位點數量，以計算變異點之比例。

(二) 遺傳變異分析

以 DnaSP 3.5 軟體進行 Tajima's test (Tajima 1989)、計算族群內核苷酸歧異度 (Nucleotide diversity, π) (Nei 1987 equation 10.5 or 10.6)、基因型歧異度 (haplotype diversity, h) (Nei 1987 equation 8.4 以 $2n$ 代替 n)、族群間的遺傳距離 (d_{xy}) (Nei 1987 equation 10.20, Jukes and Cantor correction)、族群間的遺傳分化指數 F_{ST} 以及基因流傳值 Nm (Hudson et al. 1992 equation 3.4)。

1. Tajima's test :

中性假說 (neutral theory) (Kimura 1983) 理論基礎為遺傳變異存在族群是否只受隨機的基因漂變影響，不受天擇決定，因此核苷酸的置換率只受突變率的影響，演化較快的基因在種內及種間將具有更多的遺傳變異。

利用 DnaSP 軟體進行 Tajima's test，計算核苷酸變異位置的數目 (θ) 與 π 有無顯著差異。假設核苷酸變異不受干擾、隨機交配前提下達到平衡，則 $\theta = \pi$ 。使用之統計 D 值，為 β 分布的假設下，平均為 0，變方為 1。當值為 0 表示符合中性假說的預測。

2. 核苷酸歧異度 π

核苷酸歧異度為兩個單套型的序列中核苷酸差異的平均數，可用於推估族群內的遺傳變異，公式如下：

$$\pi = n \sum x_i x_j \pi_{ij} / (n-1) \quad (\text{Nei 1987 equation 10.5 or 10.6})$$

n 為取樣的 DNA 序列數量， x_i 為族群內單套型 i 的個數， x_j 為族群內單套型 j 的個數， π_{ij} 是第 i 個與第 j 個單套型間序列的差異。

3. 基因型歧異度 h 又稱基因歧異度 (gene diversity)

代表不同對偶基因的數量及頻率，公式如下：

$$h = n(1 - \sum x_i^2) / (n-1) \quad (\text{Nei 1987 equation 8.4})$$

n 為取樣的個體數， x_i 為第 i 的個基因型的頻率。

核苷酸歧異度與基因型歧異度都可呈現出族群內的遺傳變異，核苷酸歧異度呈現的是族群中不同個體間序列差異的程度，與基因型數量無關；而基因型歧異度呈現的是不同對偶基因的數量與頻度，與序列之相似程度無關 (Avice 2000)。

4. 族群間的遺傳距離 d_{xy}

計算兩兩族群間核苷酸置換的平均數，計算公式為：

$$d_{xy} = \sum_{ij} x_i x_j d_{ij}$$

x_i 為 x 族群的第 i 個基因型之取樣頻度，

x_j 為 y 族群的第 j 個基因型之取樣頻度，

d_{ij} 為 x 族群第 i 個基因型與 y 族群的第 j 個基因型之核苷酸變異位

點。

5. 族群間遺傳分化指數 F_{ST} 與基因流傳值 Nm

遺傳分化指數可代表族群間分化的程度，公式為：

$$F_{ST} = 1 - H_w / H_b \quad (\text{Hudson et al. 1992 equation 3.4})$$

H_w 與 H_b 分別代表族群內及族群間兩兩序列的平均核苷酸差異。

$$Nm = ((1 / F_{ST}) - 1) / 2$$

N 代表族群大小， m 為每一代移入的對偶基因比例， Nm 即為每一代移入的基因數。當 Nm 大於 1 時，代表基因流傳順暢 (Maruyama and Nei 1981, Slatkin 1987)。

(三) 親緣關係之建構

1. 近鄰歸群法 Neighbor-joining method

以 MEGA (version 2.1) 軟體 (Kumar et al. 2001) 根據 Kimura-2-parameter method 計算兩兩序列間的距離矩陣，將樣本間序列置換程度換算成遺傳距離，代表分支長度 (branching length)，分別計算兩兩樣本與其他樣本之間產生的分支長度，找出分支最短的歸群

方式，再以同法依序將其他樣本歸群進去，找出其餘分支，建構成具有最短遺傳距離的親緣關係樹 (Saitou and Nei 1987)，並以 bootstrap 重複取樣 1000 次，鑑定親緣關係樹的可信度。

2. 網狀關係圖

以 TCS 軟體 (Templeton et al. 1992) 以最檢約方法估算基因之譜系，並建立網狀親緣關係圖。