

大屯姬深山鍬形蟲之分子分類
鑑定及保育遺傳研究

內政部營建署陽明山國家公園

委託研究報告

中華民國九十六年十二月

大屯姬深山鍬形蟲之分子分類 鑑定及保育遺傳研究

受委託者：私立東海大學生命科學系

研究主持人：林仲平

內政部營建署陽明山國家公園

委託研究報告

中華民國九十六年十二月

一、研究緣起與背景

陽明山國家公園屬季風型亞熱帶氣候區，多樣的地形及繁茂的植被提供了北臺灣各種動物絕佳的覓食、活動和棲息場所，孕育及保存了豐富的棲地及生物多樣性。大屯姬深山鍬形蟲 *Lucanus datunesis* Hashimoto 1984 (Coleoptera: Lucanidae) 是臺灣特有種鍬形蟲，族群分布範圍狹窄，僅出現於陽明山國家公園內大屯火山區，屬於晝行性物種，每年五到六月雄蟲大量出現在大屯山區芒草叢、箭竹叢或地面，雌蟲較為少見。近年來由於棲地破壞和人類大量採集的壓力下，使得臺灣鍬形蟲的族群數量逐年下降，因此進行此一國家公園內特有昆蟲的生態研究，有助於大屯姬深山鍬形蟲的保育工作。目前學界對其生活史及族群動態尚無任何相關研究，因此本研究計畫將針對大屯山區大屯姬深山鍬形蟲，首先鑑定其分子分類地位，其次探討其族群遺傳結構，估算有效族群量大小，及探討其族群內遺傳多樣性。研究成果除了為本土昆蟲建立基本遺傳學資訊，並可提供陽明山

國家公園對此種特有鍬形蟲保育工作的參考。

二、研究方法

1. 樣本採集

本實驗室於九十六年五、六月間至大屯山區芒草叢、箭竹叢或地面進行大屯姬深山鍬形蟲樣本採集，在清晨以徒手目視尋找成蟲，在夜間以全光域水銀燈誘集。三次兩天一夜的採集總共採獲 58 隻雄蟲個體，然而雌蟲尚未捕獲。蟲體標本帶回實驗室後，部份暫時飼養於昆蟲箱中等待進行微衛星 DNA 引子開發，其餘蟲體保存於 -80°C 的冰箱中。本研究所獲得的蟲體樣本於計畫結束之後將永久保存於國立自然科學博物館，以利後續國內外學者專家研究使用。

2. 分子系統分類分析

於大屯山區採集大屯姬深山鍬形蟲成蟲或幼蟲，帶回實驗室後，將蟲體保存於 -80°C 的冰箱中。並在臺灣其它地區採集相近種，

姬深山鍬形蟲 *Lucanus swinhoei* Parry, 1874、黃腳深山鍬形蟲 *Lucanus miwai* Y. Kurosawa, 1996、及臺灣，大陸，東南亞其它深山屬鍬形蟲個體作為外群比較。利用所得蟲體胸部肌肉進行 DNA 萃取，粒線體基因序列以 universal insect mtDNA primers 增幅，核基因序列以相近物種 primers 增幅，PCR 產物用 kits 或電泳膠純化後送交明昕生物科技公司定序，DNA 序列以 EditSeq 和 MegAlign program 編輯及排序後，以 PAUP* 及 MrBayes program 進行親源關係及演化樹可信度的分析。我們使用 *Neolucanus doro* 為外群，分子演化的模式以 Modeltest 程式和 Likelihood Ratio Test 來選用。

3. 分子遺傳多樣性分析

將所得的大屯姬深山鍬形蟲族群內個體的粒線體基因 haplotypes，以 DnaSP program 分析遺傳多樣性的參數，包括 π (核酸多樣性)、 s (number of segregation sites)、 h (number of haplotypes)、 Hd (haplotype diversity)。大屯姬深山鍬形蟲的族群大

小參數 θ , μ , N_e 將利用 coalescent method 以 BEAST program 估算。

4. 微衛星 DNA 引子開發

由於其解析度及遺傳變異較一般常用的粒線體及核基因大，微衛星 DNA 引子的開發有助於未來分子鑑定和婚配生殖系統的研究。野外採集的樣本經 DNA 萃取後，以 *RsaI* 和 *AluI* enzyme 分解後，挑選大於 500 bps 的 DNA 片段，接上 SNX linker，然後以 PCR 反應將其這些片段放大，然後再以帶有螢光的 GATA 和 GAAA 重覆的 oligo-nucleotides 接上，用 TA cloning kit 轉殖到 vector 裡，以同位素 γ ^{32}P 標定，所得產物長度為 400-850 bps 的片段再以 PCR 和 DNA 定序確認。

三、研究成果

1. 分子親緣地位

利用所得大屯姬深山鍬形蟲及臺灣相近種類進行蟲體胸部肌肉 DNA 萃取，粒線體基因 *COI* (Cytochrome Oxidase I)、控制區基因 (AT-rich) 及 核基因 *Wg* (*Wingless*) 序列分別以 universal insect primers 增幅，長度各為 1300 bps (*COI*)、600 bps (AT-rich) 和 500 bps (*Wg*)。各鍬型蟲物種 DNA 序列以 EditSeq 和 MegAlign program 編輯及排序後，以 PAUP* 電腦程式進行最簡約法 (maximum parsimony), 最大可能法 (maximum likelihood), 和貝式法 (Bayesian phylogenetic analysis) 進行分析，親源關係及演化樹可信度以非母數拔靴法 (nonparametric bootstrapping) 和驗後或然率 (posterior probability) 來分析。Likelihood Ratio Test 選擇 GTR+G+I 為最合適的 *COI* 分子演化的模式，最大可能法和貝式法皆用此分子演化的模式進行分析。

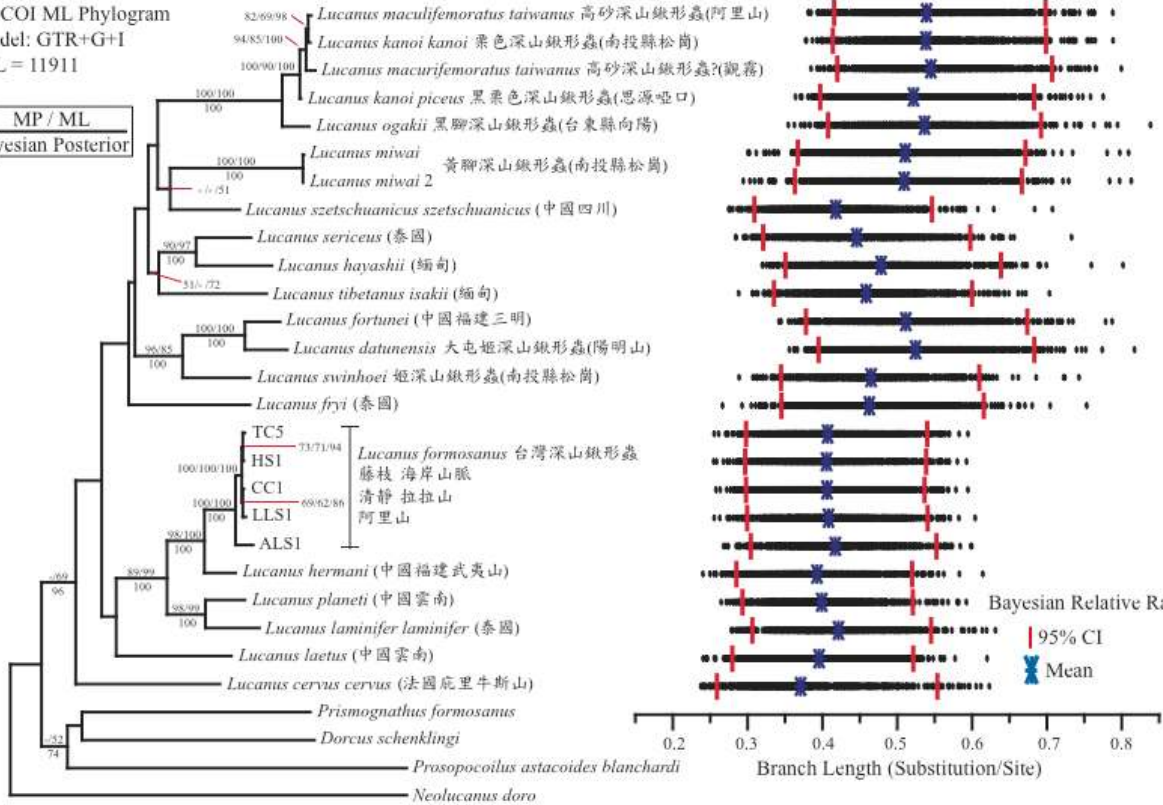
COI 分子親緣樹結果如圖一，這個結果顯示：1) *COI* 基因提供足夠的遺傳變異訊息，可以辨識相近的 *Lucanus* 屬鍬型蟲，演化樹中親緣關係支持度高 2) 相對於外群而言，深山屬鍬形蟲 *Lucanus*

為一單系群、3) 大屯姬深山鍬形蟲和其它相近種在遺傳上有明顯分化、4) 就目前的取樣樣本而言，大屯姬深山鍬形蟲和中國大陸福建三明產的鍬形蟲種類 *Lucanus fortunei* 親緣上最為相近。5) 在台灣的鍬形蟲物種中，以姬深山鍬形蟲 *Lucanus swinhoei* 和大屯姬深山鍬形蟲親緣最為相近、並和前兩個物種形成一個單系群。6) 而在台灣生態習性和形態特徵和大屯姬深山鍬形蟲最相似的黃腳深山鍬形蟲 *Lucanus miwai* 卻和中國大陸四川產的 *Lucanus szetschuanicus* 親緣最相近。此外，親緣樹中也顯示台灣各地區台灣深山鍬型蟲 *Lucanus formosanus* 族群為一單系群，並和中國福建武夷山 *Lucanus hermani* 和雲南的 *Lucanus planeti* 為姐妹物種。貝式相對速率分析 (Bayesian relative rate) 也顯示 *Lucanus* 各物種間演化速率相當。



Mt COI ML Phylogram
 Model: GTR+G+I
 -lnL = 11911

MP / ML
 Bayesian Posterior



— 0.05 substitutions/site

2. 遺傳多樣性

我們分析了 10 個大屯姬深山鍬形蟲個體的 *COI* 基因, DNA 序列發現這 10 個個體的 *COI* 基因皆為同一個粒線體單型 (haplotype), 這個結果顯示陽明山國家公園內大屯山區的這個大屯姬深山鍬形蟲族群的遺傳多樣性非常低 (Hd , haplotype diversity = 0), 和同為 *Lucanus* 屬的台灣深山鍬型蟲 *Lucanus formosanus* 相較之下 ($Hd = 0.995$) 明顯偏低, 而分析 AT-rich 基因到目前為止發現至少有兩個不同的單型。然而粒線體 DNA 只能視為同一個基因座, 因此較為常用的多基因座微衛星 DNA 為往後用來估算異型合子頻率較為合適的分子標記。

3. 建立微衛星 DNA 引子

目前已建構完成大屯姬深山鍬形蟲 DNA enriched library, 正在進行“重覆 DNA 片段”的篩選, 已篩選到 40 組帶有重覆片段的基因座, 將進行序列定序確認。其中已有 8 組確認設計的引子能成功增

幅目標基因座 (表一), 並在不同個體並呈現對偶基因多型性。

表一

Loci	Microsatellite Core Repeat	Length
33	(TATC) ₁₀	168
34	(GATA) ₈	149
8	(AAAG) ₁₀	125
19	(TATC) ₉	332
22	(TATC) ₁₂	297
23	(TATC) ₁₀	175
27	(TATC) ₈	197
31	(TATC) ₁₀ AATCATGTCCCTC(TATC) ₈	156

四、結論與建議

本研究計畫確定大屯姬深山鍬形蟲為一遺傳及親緣上的特有物種，與台灣其他相近物種 (姬深山鍬形蟲 *Lucanus swinhoei* 和黃腳深山鍬形蟲 *Lucanus miwai*) 有顯著的分子遺傳差異。大屯姬深山鍬形蟲和中國大陸福建的鍬形蟲種類 *Lucanus fortunei* 在親緣上最為相近。粒線體基因分析發現其族群遺傳多樣性比群量大且全島分布

的相近物種，台灣深山鍬型蟲 *Lucanus formosanus* 為低，推測大屯
姬深山鍬形蟲目前的有效族群量非常低，建議有關單位對對此特有鍬
形蟲棲地及個體持續並加強保育工作，並因這個物種僅有單一族群，
有效族群量及遺傳多樣性低，應考慮將大屯姬深山鍬形蟲列為保育類
昆蟲。

五、參考文獻

- 張永仁。2006。鍬形蟲 54: 臺灣鍬形蟲全圖鑑&野外觀察等比例摺
頁。遠流出版社。160 頁。
- Avice, J.C., 2004. Molecular Markers, Natural History, and
Evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 684.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an
approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783– 791.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2002. Introduction
to Conservation Genetics. Cambridge University Press,
Cambridge, UK. 617 pp.

- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.R., 2001. MrBayes: bayesian inference of phylogeny. *Biometrics* 17, 754– 755.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817– 818.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651– 701.
- Swofford, D.L., 1998. PAUP*, version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.