

貳、材料及方法

一、標本採集：

(1) 採集地點：

採集的流域由北到南依次為：

大溪川(DS)、梗枋溪(KF)、新城溪(SH)、東澳北溪(DA)、南澳南溪(NA)、立霧溪(LW)、三棧溪(SJ)、海岸山脈(HA)、秀姑巒溪(SG)、三富溪(SF)、長濱齒草溪(CT)、羊橋溪(YC)、知本溪(JB)、金崙溪(JL)、大竹溪(DJ)、大武溪(DW)、港口溪(GK)、四重溪(SZ)、楓港溪(FG)、枋山溪(FS)。

物種以台灣絨螯蟹為主，於這幾條流域的中游及下游選定採集地點進行採集(圖一；表一)。

(2) 採集時間：

2005 年 12 月至 2007 年 5 月。

(3) 採集方法：

採集的方法主要使用蟹籠誘捕法，於各流域中各選定的樣站，每次採集放置 10 個蟹籠，每個蟹籠大小均相同(口徑:16 cm，長: 37cm)。使用鯉魚為餌料，將放有餌料的蟹籠放置於選定的點，開口朝下游並以石頭壓牢，從當天傍晚放置後，隔夜至隔天回收，所以蟹籠的放置時間約是 18~24 個小時。

二、標本處理方式：

在野外所採集到的標本個體先以冰塊冰凍，直到每隻蟹的活動力下降後，加上標籤並，以 75%的酒精固定保存(若直接以酒精固定，螃蟹將因為過度掙扎而使腳部發生斷裂，導致標本不完整)。之後帶回實驗室，並再次更換 75%酒精以保持樣本的新鮮度，以備之後的分析研究。

三、分子生物實驗：

1.DNA 萃取：

利用 Biokit 公司的組織及細胞 DNA 純化(Tissue and Genomic DNA Extraction Kit)套件萃取 DNA，其步驟如下：

(1)用消毒過後的剪刀剪取蟹足的肌肉約 100~300mg，置入 1.5ml 的離心管中。

(2)加入 200 μ l 萃取液(Lysis Buffer)，之後利用剪刀將蟹肉剪碎。

(3)加入 20 μ l 的蛋白質分解酶 K(Proteinase K)，接著溫和的搖動。

(4)將離心管放入 56°C 的恆溫水槽 2~3hr，如果蟹仍未溶解，可將時間延長直到完全分解。

(5)加入 700 μ l 的 DNA Binding solution，並放於 70°C 下 15 分鐘。

(加入 Binding solution 可能會產生白色沉澱，將於 70°C 下再次溶解)

(6)加入 99% Ethanol 200 μ l 於離心管中。(加入 Ethanol 後可能會有沉澱產生)

(7)將液體吸至 spin column 內，連同 collection tube 以 12500g 離心 1 分鐘後，並倒掉濾液。

(8)加入 600 μ l 的 Washing Buffer 清洗，以 12500g 離心 1 分鐘後，並倒掉濾液，此步驟重複 2 次。

(9)於 collection tube 中沒有廢液的情況下，再次以 12500g 離心 5 分鐘後，倒掉濾液。

(10)將 collection tube 丟棄，並將 spin column 放於一新的 1.5ml 離心管中。

(11)將 spin column 和新的 1.5ml 離心管一起放於 56°C 加熱器上，並將 spin column 蓋子打開，放置 5 分鐘。

(12)加入事先加溫的 elution solution(60~70°C)50~100 μ l，放於 56°C 加熱器上 2 分鐘，以高速離心機 13000g 離心 5 分鐘。

(13)將所得 DNA 置於-20°C 冰箱中備用。

2. DNA 增幅反應:

粗取的 DNA 以 PCR 來進行增幅，以提供定序。其反應條件如下:

- (1)在總體積 50.2 μ l 的反應溶液中加入以下組成物: 40 μ l ddH₂O、0.2 μ l 1U Super Taq (HT Biotechnology Ltd, Cambridge, UK)、5 μ l 10 \times Super Taq buffer、1 μ l dNTPs、1 μ l (5pmol/ μ l)的引子 LCO 和引子 HCO (Lee *et al.*, 2004)、最後加入 2 μ l DNA 萃取液。
- (2)在 TP600 PCR 儀(TaKR, Japan)中反應，步驟如下：
- 先在 94°C 下 10 分鐘使雙股 DNA 完全分開(denature)。
 - 接下來進行 35 次增幅循環，每個循環為：94°C/30 秒確保 DNA 雙股完全分開(denature)、51°C/45 秒使 DNA 與引子黏合(annealing)、72°C/45 秒進行 DNA 複製延伸(extension)反應。
 - 最後以 72°C 延伸反應作用 10 分鐘(final extension)，使延伸反應完全，得到最終 PCR 產物。

引子序列: LCO: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' 25mer

HCO:5'-TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCAA-3' 27mer

(圖二、圖三)

3.電泳染色:

取 1/10 的 PCR 產物與 1 μ l 的 DNA 染劑 (Loading Dye) 混合，並以 DNA marker (Gen 100 DNA ladder, GeneMark Biotechnology)做為分子量標記，在 2%瓊脂膠以 110V 電壓電泳 30 分鐘，之後以 Ethidium bromide (EtBr) 染色 20 分鐘、再以蒸餾水退染 10 分鐘，之後在紫外線下觀察照相。

4.PCR 產物純化(clean-up):

利用 Biokit 公司的產物純化(Clean/Gel Extraction Kit)套件萃取 DNA，萃取步驟如下：

(1)將 PCR 所得的溶液(150 μ l)轉移到一乾淨的離心管中。

(2)加入和 PCR 溶液等量的 Binding Buffer。

(ex:150 μ l PCR 溶液加入 150 μ l Binding Buffer)

(3)將液體吸至 spin column 內，連同 collection tube 以 12500g 離心 2 分鐘後，並倒掉濾液。

(4)加入 600 μ l 的 Washing Buffer 清洗，以 12500g 離心 1 分鐘後，並倒掉濾液，此步驟重複 2 次。

(5)於 collection tube 中沒有廢液的情況下，再次以 12500g 離心 5 分鐘後，倒掉濾液。

(6)將 collection tube 丟棄，並將 spin column 放於一新的 1.5ml 離心管中。

(7)將 spin column 和新的 1.5ml 離心管一起放於 56 $^{\circ}$ C 加熱器上，並將 spin column 蓋子打開，放置 5 分鐘。

(8)加入事先加溫的 elution solution(60~70 $^{\circ}$ C) 50~100 μ l，放於 56 $^{\circ}$ C 加熱器上 2 分鐘，以高速離心機 13000g 離心 5 分鐘。

(9)將所得 DNA 置於-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存備用。

5.DNA 定序：

定序前反應以 PCR 機器進行。以定序套裝藥品(Big Dye terminator sequencing kit, Applied Biosystems)在總體積 10 μ l 加入純化過的 PCR 產物約 200ng；3pmol 的引子 1 μ l；Big Dye 2 μ l;之後以水補足到 10 μ l。

接下來 PCR 機器的反應條件為，Denture 96 $^{\circ}$ C 4 分鐘；(Denture 96 $^{\circ}$ C 15 秒、annealing 50 $^{\circ}$ C 15 秒、extension 60 $^{\circ}$ C 4 分鐘)重複 28 次。之後保存-20 $^{\circ}$ C 中。於定序前還要先經過酒精沉澱的過程，步驟如下：

(1)先將 sequencing PCR 產物轉移到 0.6ml 的 tube 中。

(2)分別加入 sample 2.5 倍量的 95%酒精和 0.1 倍量的 NaOAc。

(3)於 vortex 後放於陰暗處 15 分鐘。

(4)以離心機 13000g 離心 20 分鐘，之後移去上清液。

(5)加入 75%的酒精。

(6)於 vortex 後以離心機 13000g 離心 5 分鐘，再次移去上清液。

(7)接下來移到真空乾燥機中 10 分鐘。

(8)乾燥後保存於-20℃ 中已備定序。

接下來以定序儀(ABI PRISM 3100 genetic analyzer)進行定序，定序結果命名並存放於電腦中以待接下來的分析。

四：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:

將定序所得的兩股 DNA，利用 SeqMant (DNASTar lasergene 7.10) 程式將定序出來的原始序列做進一步的校對，接下來將所有整理過後的序列切成等長另外儲存。(當進行雙股校對時將 GenBank 上收尋到的台灣絨螯蟹的 COI 序列(AF105249)放入當作參考(表二)，可提高校對的可信度)。

將所有序列排列成 CLUSTAL X 1.81 軟體可接受的模式。接下來將結果輸入 CLUSTAL X 1.81 軟體轉換排序，再次經過人為整理成 MEGA3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 3.1)軟體可讀取的模式。

2.親緣樹的建構

將整理結果輸入 MEGA3.1 軟體。以內建程式 Neighbor-joining(NJ)分析法(Saitou *et al.*, 1987)繪出所有台灣絨螯蟹標本(N=88)種內的親緣關係樹。另外再以台灣絨螯蟹分析所得基因型，加上 GenBank 中收尋到的絨螯蟹屬序列再建立另外一屬間的親緣關係樹。NJ 法的理論為透過距離最近或

相鄰的成對分類單元使系統樹的總距離達到最小。其中"相鄰"指的是兩個分類單元在某一無根分叉樹中僅透過一個節點(node)相連。循序地將相鄰點合併成新的一點，就可以建立一個相應的親緣樹。NJ tree 中每一個 group 的可信度值利用不加權、重複二千次 bootstrapping 分析檢測(Felsenstein, 1985)。Bootstrap 數值若大於 70 相當於統計上 95%的信心支持度(Hillis and Bull, 1993)

將 Tang and Zhou (2003)發表於 GenBank 上日本的日本絨螯蟹 *E. japonica* (N=2)、大陸的中華絨螯蟹 *E. sinensis* (N=2)、大陸的合浦絨螯蟹 *E. hepuensis* (N=2)、大陸的直額絨螯蟹 *E. rectus* (N=1)、狹額絨螯蟹 *E. leptognathus* (N=1)與紅螯相手蟹 *Sesarma haehatocheir* (N=1)的 578bp 粒線體 COI 序列放入一起比較，進一步了解之間的親緣關係。其中直額絨螯蟹是彼等於廣東珠江發現的新模，希望藉比較可確定台灣絨螯蟹和直額絨螯蟹間的關係，而紅螯相手蟹在親緣關係樹中視為外群(表二)。

另外將分布於台灣西部日本絨螯蟹 *E. japonica* (N=2)的 COI 序列同樣放入一起比較(本實驗室未發表之資料)。

3.台灣絨螯蟹 Network 之建構

除了以 Neighbor-joining 法繪出親緣關係樹外，尚以 MEGA 軟體計算兩兩基因型 (genotypes) 間比較 (pairwise comparison) DNA 的突變數。將 MEGA 軟體所得到的數值進一步整理並輸入 MINSPNET (Excoffier *et al.*, 1994) 軟體中，建立得到 Network 的關係數值，可將其繪成 Network 圖表。

4. 絨螯蟹種間的分子時鐘(molecular dating)建構

本研究中的物種台灣絨螯蟹會降海產卵，並且抱卵的雌蟹與幼蟹會生存於河口一段時間。所以將其視為是海域性生物，研究中以 Schubart *et al.*

(1998)估計牙買加海域相手蟹類 (*Sesarma*)，COI 序列每百萬年變異度為 1.66%來當作絨螯蟹 COI 序列變異度的數值。

另外繁(2001)於研究中認為雖然絨螯蟹有降海產卵的特性，但由於其產卵場只限於近海區域，且其大眼幼體期即開始往淡水河流上溯，並不會在海水中停留很長的時間，故將其歸類為淡水物種。所以此研究也以陸域相手蟹類，COI 序列每百萬年變異度為 2.33%(Schubart *et al.*, 1998)來做換算。並以此兩種換算數據，來表示分化年代的上下限。

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

1. 族群內遺傳組成多型性之估算

利用 DnaSP4.10.4 (DNA Sequence Polymorphism, Version 4.10.4.) (Rozas and Rozas, 1999)估算族群內的遺傳組成多樣性，分別使用了二種指數：單倍體基因多樣性指數(haplotype diversity, h)，以及核苷酸多樣性指數(nucleotide diversity, π) (Nei and Li, 1979 ; Nei, 1987)，來量化顯示族群的遺傳歧異度。

單倍體多樣性指數(h)用以估計由族群內任取兩相異個體，其單倍體基因型 (haplotype) 不同的機率，即族群內的遺傳變異度 (genetic variability) 指標，其計算公式依照 Nei(1987)如下：

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k x_i^2 \right)$$

n ：為族群之總樣本數

x_i ：基因型 i 在該族群 x 中所佔的比例

單倍體基因型多樣性指數的計算僅參考了族群內各基因型所佔的頻度，而核苷酸多樣性指數則除了基因型的頻度外進一步加入了不同基因型間序列的差異程度。核苷酸多樣性指數(π)則代表了從族群內隨機選取的兩

條序列做比較，每個位點核苷酸不同的平均數。其計算公式依照 Nei(1987) 如下：

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

n ：為族群之總樣本數

x_i 和 y_j ：第 i 型和第 j 型基因型在族群中出現的頻度

π_{ij} ：第 i 型和第 j 型基因型間平均核苷酸差異的數目

$\frac{n}{n-1}$ ：校正因子，用以修正樣品太小時的誤差

2. 中性檢定(Tajima's D test)

$$\text{Tajima's test}(D) = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$$

Tajima's D test (Tajima, 1989) 主要是以 D 檢定的方式來檢測 π 與 θ 值是否有顯著差異。 π 值就是先前提到的核苷酸多樣性指數(nucleotide diversity, π)。 θ 值則是在中性演化的前提下，序列中每一個位置裡核苷酸變異的期望數值，可藉由每個位置的分離數(segregating sites)估算出來，僅考慮核苷酸變異位置的數目，不考慮出現的頻率(Kimura, 1968)，因此 θ 值會因為族群的數量大小受到影響。所以若將 π 值與 θ 值拿來做比較，可以研判族群過去曾經經歷的的族群事件。

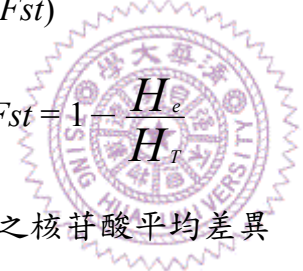
$D = 0$ 表示族群內個體彼此逢機交配。 $D > 0$ 表示族群面臨 possible balancing selection 或是族群正在分化(population subdivision)。 $D < 0$ 表示族群最近遭受 directional selection，例如 population bottleneck。

3. 族群間之遺傳分化(F_{st})與遺傳歧異度(Nm)

基因流傳(gene flow)就是指基因在族群間的移動現象(Schaal, 1980)，也可簡單的說成是遺傳因子在族群間的交換現象，而這種交換是藉由個體的遷移和交配生殖所形成的。基因流傳和天擇(nature selection)兩者在演

化上通常是扮演抗衡的角色，因為天擇的力量會將自然族群塑造成適於某一環境的形態，相反的基因流傳卻會使得適存於各個不同環境的族群間有了溝通，漸漸的使其趨於相似。因此天擇是造成遺傳分化的主要力量，而基因流傳卻是促使族群遺傳均質化的動力（黃，1991；Slatkin, 1987）。當基因流傳的力量非常強大將完全抵消掉天擇所造成的作用，使所有的族群呈現出一均質化的結果。但是，反過來說若基因流傳受限於某些因素(區域因素、環境因素、競爭因素)阻礙了基因的交流，則天擇力量將突顯出來最後導致族群走向分化的命運。為了解族群間交流與分化的情況，必須創造一量化的數值使我們易於清楚的比較與討論族群間的關係。而在這裡我們用遺傳分化指數(F_{st})與基因流傳值(Nm)來做探討，分敘如下：

族群間遺傳分化指數(F_{st})


$$F_{st} = 1 - \frac{H_e}{H_T}$$

H_e 為族群內不同序列之核苷酸平均差異

H_T 為族群間不同序列之核苷酸平均差異

<

F_{st} 值小於 0.05，表示族群間沒有遺傳分化。 F_{st} 值介於 0.05 ~0.15 間，表示族群間分化程度低。 F_{st} 值介於 0.15~0.25 之間，表示群間呈現中等程度分化。若 F_{st} 高於 0.25，則表示族群間分化程度很高 (Wright, 1978)。族群間基因遺傳分化指數 (F_{st})，亦可用來代表族群間基因交流值。

基因流傳值(Nm)，用來表示每個世代族群間遷徙個體數，此值亦可用來間接評估基因流傳大小或是基流傳速率(Slatkin, 1985)。

(N : 代表有效族群大小 m : 每一代中個體發生遷移的頻率)

$$F_{st} = \frac{1}{1 + 2Nm}$$

若 $Nm = 1$ 表示在地區性族群間每一個世代，有一個個體交流，足以防止藉由個別族群基因漂變所產生的基因分化。當 $Nm > 1$ 表示族群間有較強的基因交流，因此基因漂變的力量並不足以造成基因分化 (Slatkin, 1985)。另外 $Nm > 4$ 時，此族群可能為一逢機交配的族群 (Hartl and Clark, 1989)。若 Nm 值越大，相對的 F_{st} 值會變小，族群間基因分化程度亦隨之降低。

同時檢測 F_{st} 、 Nm 值與區域距離間的關係，用以檢測 isolation by distance 的效應。

4 族群間的核苷酸差異(d_{xy})與淨差異(D_A)

D_A 用來表示兩族群間核苷酸淨差異，亦代表兩族群間的遺傳距離。要計算出 D_A 前必須先計算出族群內的核苷酸差異 (d_x, d_y) 與族群間的核苷酸差異 (d_{xy})，其計算公式依照 Nei(1987) 分敘如下：

$$d_x = \frac{n_x}{n_x - 1} \sum_{ij} x_i x_j d_{ij}$$

$$d_y = \frac{n_y}{n_y - 1} \sum_{ij} y_i y_j d_{ij}$$

n_x : 族群 x 的樣本數

x_i 和 x_j : 分別表示第 i 和第 j 型基因型在族群 x 內的頻率

d_{ij} : 第 i 和第 j 型基因型間相異核苷酸所佔的比例

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

x_i : 第 i 型基因型在族群 x 內的頻率

y_j : 第 j 型基因型在族群 y 內的頻率

將代表族群間核苷酸期異度的 d_{xy} 減去代表族群內核苷酸期異度的 d_x 和 d_y 平均值，便可以得到兩族群間的淨核苷酸差異(D_A)

$$D_A = d_{xy} - \frac{d_x + d_y}{2}$$

研究中除了以程式計算出每個區域族群間的遺傳距離外，為了更深入了解各溪流間細部的相互關係，亦針對每條河流間的遺傳距離做計算，以利比較與分析。以上研究均利用 DnaSP 4.10.4 進行分析。

