

---

開發台灣櫻花鉤吻鮭分子標記及  
原始生殖細胞移植之技術

內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告

中華民國九十四年十二月

094-301020500G-009

# 開發台灣櫻花鉤吻鮭分子標記及 原始生殖細胞移植之技術

受委託者：財團法人台北市七星生態保育基金會

研究主持人：郭金泉

內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告

中華民國九十四年十二月

# 目次

表次	II
圖次	II
摘要	III
	第一章、緒
論	1
	第二章、前人研
究	2
2.1 開發分子生物標記	2
2.2 原始生殖細胞移殖	6
第三章、材料與方法	10
3.1 材料來源	10
3.2 粹取標本基因組DNA	10
3.3 AFLP指紋圖譜的建構	10
3.3.1 酶切反應	11
3.3.2 聚合酶連鎖反應	11
3.3.3 預擴增反應	11
3.3.4 選擇性擴增反應	12
3.3.5 變性聚丙烯醯胺凝膠電泳與銀染	12
3.4 數據處理	13
第四章、結果	14
4.1 不同選擇性引子對台灣陸封型鮭魚DNA擴增和多樣性檢出效果	14
4.2 歸類分析	16

第五章、討論	18
5.1 台灣陸封型櫻花鉤吻鮭的遺傳多樣性現狀及原因	
探討	18
5.2 台灣陸封型櫻花鉤吻鮭遺傳多樣性保護對分析	
	19
5.3 核苷酸指紋(DNA fingerprinting)之應用	23
謝言	26
參考書目	27
附錄	30

### 表次

表 1	AFLP 接合子及引子序列	11
表 2	不同選擇性擴增引子從台灣陸封型鮭魚基因組 DNA 中檢出的片段數	5

### 圖次

圖 1	用 E-AGC/M-CAT 引子擴增獲得的台灣陸封型鮭魚指紋圖。左邊 M 為 10bp DNA 分子量標記物 (marker)	15
圖 2	根據 28 尾台灣陸封型鮭魚個體的遺傳距離用 UPGMA 法建構的歸類樹	16

---

圖 3 擴增位點數在不同顯性基因頻率區間內的分佈 . . . . . 17

圖 4 根據微衛星DNA分子標記分析推測Nekogigi (ネコギギ) 物種於長良川流域中呈現關連族群的構造 . . . . . 23

### 附錄次

附錄1 電泳儀、AFLP指紋電泳膠圖 . . . . . 30

附錄2 AFLP實驗步驟(銀染色法) . . . . . 31

附 錄 3 數 據 分 析 . . . . . 37

## 摘要

關鍵詞：櫻花鉤吻鮭、AFLP、遺傳多樣性

### 一、研究緣起

根據 2000 年 4 月 10-13 日，於行政院農委會特有生物研究保育中心舉辦的櫻花鉤吻鮭保育研討會之結論，茲摘錄部分決議之行動策略重點：

「本研討會研議的「保育行動策略」，是結合國外鮭鱒魚類專家及國內真正關心櫻花鉤吻鮭、真正希望解決櫻花鉤吻鮭困境的專家學者集思廣益產生的結晶。研討會的結束絕不是一場學術大拜拜的休止符，而是櫻花鉤吻鮭魚保育工作全新的開始，台灣保育史的另一個新里程碑。政策委員會及技術委員會在櫻花鉤吻鮭的保育工作上將扮演相當吃重的角色，我們亟待主管機關儘速成立，未來能透過前揭二委員會發揮跨部會整合有限資源的功能，逐步落實與充實保育工作，徹底解決櫻花鉤吻鮭的生存困境，為國寶魚打造永續生存的美麗未來。

為了達成上述總目標及工作目標，櫻花鉤吻鮭的復育策略(Restoration strategy)和工作項目(Tasks)如下：

#### 一、復育策略 (Restoration strategy)

為了櫻花鉤吻鮭族群的復原並預防其絕種，復育策略有三，包括：保育養殖場之建立、棲地之復原、衛星族群之建立，其工作項目如下：

---

4、冷凍精液保存(Semen cryopreservation)：為保存遺傳特性並預防族群滅絕，現階段應建立冷凍精液保存設備，未來更應發展魚卵或胚體的凍結保存技術。

5、養殖方法(Culture methods)：於保育養殖場內維持能完成生活史的櫻花鉤吻鮭人工族群，在台灣仍在試驗階段。養殖技術與試驗研究需要密切結合，若欲吸取鮭鱒魚類人工繁養殖經驗與技術，可向美、日等國參觀與學習，或請國內、外專家學者協助。

6、放流與監測(Release and monitoring)：七家灣溪櫻花鉤吻鮭放流已有10年之久，但卻無監測放流後仔魚之存活率及評估對野生族群之貢獻。在此建議保育養殖場開始運作前五年繁殖之仔魚不予放流，先作為建立人工養殖族群之用(第一優先)。人工養殖族群建立後能產生大量仔魚時才開始進行人工放流。放流於類須進行標誌，俾利監測放流後在自然溪流中之生存率及死亡率，以判定對野生族群之貢獻，避免盲目放流。另亦同時研究放流仔魚最適大小、時間及位置，以提高放流生存率。」

## 二、研究方式與過程

本實驗所用的台灣陸封型鮭魚樣品採集自雪霸國家公園台中縣大甲溪上游的支流七家灣溪。立即剪取其脂鰭(幾毫克到十幾毫克)，儲放於95%乙醇中，保存於-80°C冷凍櫃。粹取標本基因組DNA、以酶切反應、聚合酶連鎖反應、預擴增反應、選擇性擴增反應、變性聚丙烯醯胺凝膠電泳與銀染技術建構 AFLP 指紋圖譜、再經數據處理，最後用 UPGMA 方法進行歸類分析，繪出歸類圖。

### 三、重要發現

本實驗應用 AFLP (擴增片段長度多形性; Amplified fragment length polymorphism) 技術, 對採自台灣大甲溪上游七家灣溪的 30 尾台灣陸封型鮭魚 (台灣櫻花鉤吻鮭) 個體, 進行遺傳多樣性分析。以 6 對引子共檢出 626 條條帶 (擴增片段), 其中 212 條具有多樣性 (35.3%)。研究族群個體發現遺傳多樣性極低, 其 Shannon 指數為 0.1328, 預期雜合度 (異型合子;  $H_e$ ) 為 0.0800, 平均遺傳距離為 0.06854, 平均遺傳相似系數為 0.9342。用 UPGMA 法對 28 個個體進行歸類分析建立歸類樹, 發現此 28 個個體可歸類分為兩大分支 (族群), 可能分別來自兩個奠基族群。研究結果顯示台灣陸封型櫻花鉤吻鮭的遺傳多樣性程度很低, 族群遺傳架構相對簡單, 這說明該族群進化潛力有限, 瀕危程度很高。這可能是近半個世紀以來未採取正確而且有效的保育措施, 所造成族群數量急劇減少的嚴重後果。因此必須在現有工作的基礎上, 選擇異型合子較高的台灣陸封型櫻花鉤吻鮭當作種魚, 進行繁殖和放流, 以期改善族群遺傳架構, 保持和提升族群的遺傳多樣性。

### 四、主要建議事項

加強與日本、美國、加拿大、中國等國家的國際合作。舉辦國際研討會, 交換研究人員互訪交流、研習、研究樣本的交換, 他山之石可以攻錯。

近年來隨著分子生物學研究的發展, 多種 DNA 分析方法, 如 RFLP、RAPD 等相繼被應用到水產生物族群遺傳之結構和遺傳多樣性的研究中。這些方法各有其優缺點, 例如: RFLP 法結果穩定, 但操



---

作繁雜，不適合於處理大量標本；RAPD 法操作簡便，但結果再現性較差，易受 PCR 反應條件影響等。嘗試更多的分析方法，比較結合各方法之優劣，例如微衛星 DNA (microsatellite DNA) 必須有多形性很高的位點才行，不然無法區別後代的來源。AFLP 雖然可以做親子鑑定，但要更準確，仍需要結合微衛星 DNA 以及粒線體 DNA (mtDNA) 控制區 (control region) 的分析，以更精準的評估放流的效果。最好做更多對 AFLP 引子，另外還應該做 10 對以上的微衛星 DNA，以便對雜合度(異型合子)(heterozygosity) 作出較可靠之評價。如果可能，結合粒線體 DNA 控制區的序列分析 (測序)，和 PCR-RFLP，綜合三方面的分析結果會更好。

由於樣本僅有 30 尾嚴重不足，增加樣本數量才能更精準的把握台灣陸封鮭魚的遺傳結構。目前以手拋網採集樣本的方法既耗人力物力又沒有效率，實在有迫切引進先進的電魚儀器的必要性。如此才能加快研究的速度提高研究的品質，同時也可更確實估算現存台灣陸封鮭魚的數目，據此計算有效族群的數字，下有科學根據的決策。

我們對台灣陸封鮭魚遺傳基因多樣性之原始結構的知識一片空白，在未受人為影響之前，各地域族群 (local population) 內之基因多樣性的大小一概不知。明白此基本資訊才可以根據生物地理學推測物種的遷徙移動、分散狀況、物種在何時分化，確認其分布區域，甚至可以據此把分析結果提供作保育之決策。桃山瀑布是七家灣溪中天然分隔台灣陸封鮭魚族群的天塹，其上游應該還有原始台灣鮭魚族群，調查此族群之基因結構實刻不容緩。維持多個台灣陸封型鮭魚局部族群 (關連族群；metapopulation)，保持局部族群間多重通路 (network) 的暢通，應是分散危險，降低物種滅絕機率，保護台灣陸封型鮭魚物種永存的圭臬。

## ABSTRACT

### The Genetic Diversity of *Oncorhynchus masou formosanus* using AFLP

The genetic diversity of the 30 *Oncorhynchus masou formosanus* was explored applying AFLP technique in this study. Totally, 626 loci were detected using 6 primer pairs. Of which, 221 were polymorphic with a proportion of 35.3%. The stock has a low genetic diversity with Shannon index=0.1328, He=0.0800, average genetic distance=0.06854, and average BSI value=0.9342. UPGMA dendrogram indicated that the individuals were divided into two groups, which might stem from two different founder stocks. According to the present data, we suggest that the genetic diversity of the *Oncorhynchus masou formosanus* is very low, the genetic structure of the stocks was relatively simple which demonstrated that the evolution potential of the population was limited and the stocks were in sever danger. In order to improve the genetic structure, keep and enhance the genetic diversity level, we should choose the higher heterozygosity of *Oncorhynchus masou formosanus* individuals as stocks for breeding and releasing program.

**Key words:** *Oncorhynchus masou formosanus* 、 AFLP 、 genetic diversity

## 第一章、緒論

台灣陸封型鮭魚（台灣櫻花鉤吻鮭；*Oncorhynchus masou formosanus*；Formosan landlocked salmon）為台灣所特有的珍稀魚類。據推測，它是冰河時期為躲避嚴寒或迷途而到台灣。後來，由於冰河消退、氣溫上升、河川變遷襲奪、棲地改變、陸封或迷失歸途等因素，台灣鮭魚無法再洄游至大海，逐漸演化為陸封魚，是分佈于地球北半球最南端的鮭科魚類。因其地理位置的獨特性，該魚種在日本治台時期就被列為天然紀念物加以保護。但自20世紀40年代以來，因為棲息地破壞、水質污染和過度捕撈等，使得台灣陸封型鮭魚的分佈範圍和數量銳減。目前生存區域僅限于大甲溪上游支流七家灣溪最上游五公里的範圍內，族群數量急劇變動，數量最少時甚至僅存三百餘尾。鑒于台灣陸封型鮭魚在生物多樣性保護和生物學研究中的重要意義，政府保育單位將其奉為“國寶”魚優先進行保育。近年來隨著棲息地環境的逐步改善和人工繁殖放流工作的開展，台灣陸封型鮭魚的族群數量似乎有某程度的恢復，但仍需要詳細研究以證實。但同時也由於族群數量的急劇變動和數量極少，這些後代極易發生遺傳瓶頸效應、導致遺傳飄變和近交衰退，使得群體中某些對偶基因，尤其是稀有基因的喪失，造成遺傳變異水準下降，從而使族群的演化潛力和適應環境變化的能力降低。因此很有必要深入研究其遺傳多樣性，以更好地保護此瀕危族群的遺傳資源。

隨著分子生物學技術的快速發展，在保育遺傳學的研究領域中日益廣泛的使用各種分子標記；例如隨機擴增片段多形性DNA(RAPD)、限制性片段長度多形性(RFLP)、擴增片段長度多形性(AFLP)、微衛星DNA標記(microsatellite DNA)和變異性重複序列DNA(variable number of tandem repeat, VNTR)、粒腺體DNA(mtDNA)序列分析等技巧。其中AFLP標記結合了RFLP的準確性和PCR的高效性，具有所需使用的樣

本量少、實驗結果穩定可靠、多樣性檢出率高等優點，不必事先知道所欲分析物種的遺傳資訊，非常適合作遺傳多樣性的分析。目前台灣陸封型鮭魚遺傳多樣性方面研究的相關報導極有限。本研究首次利用 AFLP 分子標記研究台灣陸封型鮭魚族群群體的遺傳架構，並估算其遺傳多樣性，以期為保護台灣鮭魚遺傳多樣性提供理論的根據。

## 第二章、前人研究

### 2.1 開發分子生物標記

早期生物分類學家以形態學、解剖學、行為學、生態學等資料作為分類形質，到1960年代，由於遺傳學、生物化學、細胞學、分子生物學等發展，闡明了遺傳學的分子基礎，於是蛋白質，去氧核糖核酸、核糖核酸等逐漸成為研究生物演化上重要的對象，提供了研究族群遺傳結構及分類單元間親緣關係可運用的分子遺傳標記。分子標記之狹義概念是指DNA標記，它能直接反應生物個體或種群間基因組中DNA片段間的差異。但理想的分子標記必須具備下列條件：(1)直接以DNA表現，在生物體各組織、各發育階段都可檢測，不受季節、環境等限制，也不存在表達與否的問題；(2)標記數量極多，除特殊位點之標記外，均勻分佈於整個基因組；(3)符合孟德爾遺傳定律；(4)DNA的多形性高，自然存在許多等位變異；(5)標記表現為共顯性，可區分異型或同型配子（接合體）；(6)能明確辨別等位基因；(7)標記具再現性；(8)檢測方法簡單、快速、自動化；(9)開發與使用成本儘量低廉。可惜目前尚無任何一種分子標記技術可滿足以上所有的要求，雖是如此，並不影響分子標記應用於生物分子遺傳圖譜之建立、生物遺傳多樣性分析與物種之分類鑑定、轉

殖動植物種鑑定、物種性狀基因定位與分離及選殖、族群遺傳結構分析與輔助育種選種等方面。

DNA的多形性是生物多樣性的本質，DNA指紋分子標記即指以DNA多形性為基礎的遺傳標記。DNA多形性現象可分為兩大類：一為序列多形性，其基因差異發生在鹼基被其他鹼基替代或缺失所造成；二為長度多形性，是由重複DNA序列之重複次數不同，而形成DNA片段長度不同，此多形性DNA又稱為變異性重複序列DNA(VNTR)。學者以特定的探針做南方氏點墨法，來雜合人的染色體中具高度縱向排列且重複的核苷酸序列時，發現來自不同個體的DNA，所呈現的模式皆不相同，始稱此為DNA指紋或核苷酸指紋。目前常用的DNA指紋分子標記技術有：

(一)限制片段長度多形性DNA(Restriction fragment length polymorphism DNA, RFLP)

RFLP 技術的原理是物種基因在限制核酸內切酶作用下，產生長短不一的DNA片段。用含放射性同位素之標記作為DNA探針，進行雜合反應，使相關的DNA片段檢測出來，可得多形性圖譜。它表現出基因組DNA在限制核酸內切酶消化後，所產生的片段在長度上的差異。物種由於長期的演化，使物種間甚至品種間，在同源DNA序列上有所不同。RFLP之分析結果符合孟德爾遺傳定律，不受環境的影響；其標記為共顯性，可區分同型接合子與異型接合子；由於具有高度變異性、高分辨率、穩定可靠、再現性等特點，因此在生物系統分類、物種的起源和演化、種群遺傳結構考證，以及生物多樣性分析等研究上，被成功廣泛地應用。

但是在分析時，需要足夠的DNA，且DNA的質要求較高，始可進行；檢測過程費時、費力，使用放射性同位素，且現行可做為探針用之寡核苷酸序列為數不多，故應用上受到極大的阻力與限制；同時只能檢測內切酶識別位點上之變異，導致提供資訊有限等之缺

失。

(二)隨機擴增片段多形性 DNA(Random amplified polymorphism DNA, RAPD)

RAPD 技術是在 1990 年創立的。它是建立在 PCR 技術基礎上的 DNA 分析法，為 DNA 指紋開闢新的領域。其原理為在無需取得相關的檢測 DNA 序列情況下，利用不同的隨機排列的 10 個鹼基寡核苷酸單鏈為隨機引子，以研究生物的基因組 DNA 作模板進行 PCR 擴增反應，然後依 PCR 產物(DNA 片段)的多形性來進行遺傳分析。RAPD 分析之關鍵在於所用的引子序列不同，但對於每一特定的引子，它在目標基因的序列中有其特定的結位點，擴增特定的 DNA 區域片段，如基因的這區域發生序列嵌入、缺失、突變或重組等情形，就導致引子結合位點、擴增片段發生相應的變化，使 RAP 擴增產物在電泳圖譜中發生變化，從而檢測出目標基因在這區域的多形性。

RAPD 分析方法的最大優點為操作相當簡便、分析量大、樣品量需求少、不需使用放射性同位素；且 PCR 產物的多形性豐富，在動植物遺傳多樣性及其物種間鑑定等方面發揮作用。所以 RAPD 技術自 1990 年建構以來，短短 10 年已廣泛應用於細菌及動植物群體遺傳學、遺傳育種及生物系統分類與演化研究等方面。然此技術深受 PCR 技術的影響，而出現下述之缺失：(1)引子大小影響到與模板 DNA 煉合的專一性。引子長度較短，擴增產物的數量愈多；引子長度愈長，擴增產物的專一性越高，產生之染色帶越少，但太長也會產生非專一性的染色帶，故引子大小以 10~12 個鹼基最具效果；同時引子的 GC 含量以高於 50% 較佳；(2)PCR 反應條件對 RAPD 標記表現影響甚鉅。不同的 PCR 反應條件，會產生不同的擴增產物表現。在煉合溫度低、模板 DNA 濃度高的情形下，擴增片段出現模糊不清的模式之機率愈高。模板 DNA 濃度減少或鎂離子濃度高於 4.0mM 以上時，RAPD 擴增產物會減少，尤其在高濃度鎂離子條件下，大分子產

物減少且專一性模式會遺落。當煉合溫度高於 40°C 時，將阻礙 PCR 擴增片段之進行，而使產物數量減少。相對的亦減少隨機擴增片段的多形性，因此相關文獻中之煉合溫度大都設定在 36~40°C，這就產生了 RAPD 產物之再現性較低的另一缺失問題，也是 RAPD 技術發展最為研究人員存疑的關鍵點；(3)等位移動的現象。RAPD 擴增產物是在該產物為唯一的基本假設下來做判定，但事實上，有可能出現分子大小相同，但序列不同的 DNA 片段；(4)RAPD 反應敏感度極高。不同的 PCR 儀器或機型會產生不同的擴增產物濃度。此外，使用不同廠牌的聚合酶，也會產生不同的 RAPD 擴增產物。因此，固定試驗儀器及藥品，以減少試驗誤差，並配合各引子的專一性條件，將集體誤差減至最少，以增加 RAPD 標記的可信度。

(三)擴增片段長度多形性 DNA(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)

AFLP 為 Vos et al.(1995)提出結合 RFLP 與 RAPD 分析原理之最新的 DNA 指紋分析技術，其原理係將基因組 DNA (genomic DNA) 經過二種特定限制核酸內切酶處理，再與特定之接合子接合，作為擴增 DNA 片段的模板，再選擇含接合子之核苷酸序列末端上分別增加 2~3 個選擇性核苷酸的特定引子，進行 PCR 反應，來擴增引子能選擇性識別具有特異配對順序的特定 DNA 片段，然後把擴增片段 DNA 在高解析度的序列分析膠體上電泳，以其隨機表現之 DNA 片段多形性作為 DNA 指紋，其涵義為每一物種的染色體 DNA，在特定的限制核酸內切酶切點間特定片段的數量與大小均不相同。AFLP 技術所需 DNA 量少、不需經南方氏雜合操作，結果分辨率高、穩定可靠。每一分析可檢測到多個基因座，且多形性高，非常適合遺傳多樣性分析、種原鑑定、基因定位及快速建構遺傳圖譜等研究。有學者利用 AFLP 技術研究 54 份水稻之遺傳變異，與同功異構酶結果比較，二者結論相同，認為 AFLP 對水稻之遺傳變異與建構基因圖譜十分理想。

## 2.2 原始生殖細胞移植

現今基因轉殖技術已廣泛應用於商業上有經濟價值的物種，且被期望為育種魚類有效的方法。在水產養殖的領域，飼養的品種很少具有令人滿意的育種形質，因為以科學原理飼養水產物種的歷史，不如陸棲家畜動物悠久，且傳統的選拔育種技術需要很久的時空才能獲得人類所欲的品種。但是，自從 1980 年代後半以來，應用分子和細胞生物技術可快速、有效地改變飼養魚類的遺傳特性。在此介紹鮭科基因轉殖技術最近的發展，包括嶄新的基因轉殖方法—稱之為「細胞媒介基因轉殖」，及其未來在水產養殖上的應用。

技術—外源（外來）基因可藉「顯微注射，即用極細（5~10 $\mu$ m 直徑）之玻璃吸管（微量吸管；micropipette）將少量之外源基因以溶液方式注入授精卵之胚盤，導入寄主的鮭魚卵（6mm 直徑）。針對這個問題日本學者吉崎發現以還原之穀胱甘月太（glutathione）溶液處理虹鱒卵，可有效地延緩虹鱒卵硬化的時間，如此一來可使顯微注射更方便、容易、可行。再將「大約  $10^7$  外源基因之複製物混合於 2nl 的 Tris-EDTA 緩衝液」注射到授精卵中。用此顯微注射方法，大部分顯微注射的卵可正常發育，且大約 50% 胚胎的染色體可穩定地帶有外源基因。這些與寄主染色體結合的外源基因，可用調節元素，像是「啟動子」或「強化子」表現出其功能。為了達到魚體組織或某個階段表現出預期的外源基因，這些控制的調節元素最好必須要來自於魚（All-fish），特別是種源關係越近的物種越好。

在水產養殖上的應用—法國 Chourrout 等人於 1986 年首先發表「帶有外來成長激素基因之基因轉殖魚」的論文。此後，有許多研究者也陸續發表他們在虹鱒、大西洋鮭、Chinook 鮭和 coho 鮭（銀鮭）的試驗成果。大部分此類鮭科的研究報告皆試圖去生產製造「帶有外來加速成長速度的成長基因」之基因轉殖魚，以加快鮭魚的成長，節省飼料提早上市。加拿大 Devlin 團隊發現使用所有來自



鮭魚的成長激素基因，且以‘鮭金屬硫啟動子’啟動的魚隻，可以有效的刺激多種鮭科魚類之成長。成長最快的鮭魚，其成長速度甚至比沒有基因轉殖的魚隻快 10 倍。加拿大 Fletcher 和 Hew 團隊已著手以 AFP 基因去製造基因轉殖之抗寒鮭魚，這 AFP 基因是分離自棲息繁殖於寒冬之魚平鰈 (flounder) 魚類，再顯微注射入大西洋鮭之授精卵中，抗凍蛋白可成功地與鮭魚寄主的基因組結合，且傳遞至鮭魚後代並表現之。

嶄新的方法—細胞媒介的基因轉殖 (cell-mediated gene transfer) 建立一個穩定的基因轉殖品系，特別是同型結合的基因轉殖鱒的產生及維護外來基因，是需要很多勞力、空間、時間與成本。這意思是說——為了要建立一個生產基因轉殖魚品系的新技術，必須要有很大的空間去飼養這些魚種，而且要有足夠的時間讓牠成熟。有鑒於此，日本學者吉崎悟朗已試著去發展虹鱒幹細胞融合之基因轉殖 (stem cell-mediated gene transfer) 方法，這方法有以下三個主要的步驟：建立一個具有分化成生殖細胞 (germ cells) 能力的幹細胞品系 (stem cell lines)。將外源基因導入培養的幹細胞，且要以像是藥物抵抗 (耐性) 基因 (drug resistance gene) 具選擇性的標記去篩選 (screening) 基因轉殖的細胞。藉著生產‘生殖品系嵌合體魚 (germ-line chimera fish)’的技術，把基因轉殖的幹細胞發育成魚成體。此魚的產生，是因為將基因轉殖的幹細胞移植到發育中的胚胎，將來從這個胚胎孵化出的魚隻會含有兩種細胞型：一種來自寄主細胞，一種來自移植的培養細胞。如果培養細胞和寄主的生殖幹細胞不同，則‘嵌合體魚 (chimera fish)’的生殖腺會含有來自移植培養細胞之配子，這意思是說——若來自培養細胞之精與卵受精，則會產生完全來自於基因轉殖幹細胞的魚。此方法諸多優點的其中一個是，外源基因是在生物體外 (*in vitro*) 導入幹細胞，且帶有外源基因的細胞很容易在體積狹小的培養皿中被篩選出來。若以傳統

的基因轉殖方法（例如：電破法；electroporation），我們必須飼養大批魚隻，並分析大量這些基因轉殖魚的 DNA，以確認轉殖的成績。然而，這種在生物體外的篩選法（screening）勞師動眾所費不貲，幾近乎可將此基因轉殖方法終結；再者，細胞媒介的基因轉殖技術不但是導入外源基因，而且也是修改內生基因（endogenous）核苷酸序列有效的工具。蛋白質工程最近的進展已顯示—若修改一些胺基酸的序列，可增加（up-regulate）某些蛋白質的活性，所以，修改內生基因可改變個體魚的表型，而且可當作育種魚類的新方法。當一幹細胞（stem cell）要採用在此方法時，必須先找出生殖幹細胞之前質（前驅）細胞（precursor cell），稱之原始生殖細胞（primordial germ cell；PGC）。在魚類，要確認並分離活的 PGC 技術仍嫌不足。由於 F<sub>1</sub> 不孕的果蠅（無法育成 F<sub>2</sub>）可以分離出造成果蠅不孕原因的 vasa 突變基因，據研究 vasa 基因其功能是在生殖細胞與 RNA 合作。日本學者吉崎已證實虹鱒的原始生殖細胞也有 vasa 基因的存在，而且具特異性，只存在於精巢和卵巢，因此 vasa 基因是標記虹鱒的原始生殖細胞非常有用的分子標記（marker）基因。為了要容易辨識，將虹鱒的原始生殖細胞可視化，我們必須純化 vasa 基因的轉錄調節區域（regulatory regions）並接上螢光蛋白，再將此基因注入虹鱒卵（寄主），使之和寄主的基因組結合。GFP 是一種分離自水母的蛋白質，GFP 不需要任何輔助因子便可呈現很強的綠色螢光，所以它被廣泛應用為細胞標記的工具，而且是證明外來基因有表現的標誌。含有 GFP 標記的 PGC 鱒胚，可被胰蛋白酶每解體，分散游離成個別獨立的 PGC 細胞，靠著流速細胞儀的強大分辨能力，帶有 GFP 螢光陽性之生殖細胞，可以被快速的分離出來。日本學者吉崎正在發展這種 PGC 在細胞外的培養與基因轉殖進入 PGC 的方法。即移植分離的 PGC 注入早期的胚，去產生生殖品系嵌合體鱒—是用細胞顯微注射法去獲得源自培養 PGC 的魚。如此，假設可以分離生

殖品系幹細胞，那麼用此技術的‘細胞媒介基因轉殖’方法，在最近的未來就是可行的。如此一來，台灣鮭魚不但可以借虹鱒之腹保育，而且凍結保存瀕危魚類，例如台灣鮭魚的原始生殖細胞(PGCs)，即可保護台灣鮭魚及其基因之多樣性的夢想，也為期不遠。

未來的方向—在此我們只選擇性的介紹基因轉殖在鮭魚方面的研究。然而，基因轉殖技術在水產養殖上其他物種的應用是極大的，例如：增強水產生物的抗病力、抗壓、抗緊迫和水產生物肉質的改進，都是有研究可能的重要議題。亦可延伸研究的範圍，像是導入例如：抗癌活性、抗高血壓活性等、防止癌症或高血壓的‘非魚’的外來基因密碼蛋白當作‘食用藥物。此法可讓口服疫苗更便宜平價，且更具供給普及的潛力，魚類可以生食（生魚片）不用一定要加熱煮沸，因此不會破壞外源基因所產生的蛋白質。我們需要更多關於分子和細胞生物學的資訊，特別是‘基因表現的機制’，如何精確地控制外源基因的表現。增加更多控制基因表型特徵的知識，以期有效地產生高品質之魚。基因轉殖魚若不幸地和自然族群交配繁衍，將會衝擊天然環境生態。為預防這潛在的危險，基因轉殖魚要有不孕（使其不能繁衍）的處理，及考慮將基因轉殖魚飼養在密閉的循環系統當中，以防止逃逸。

## 第三章、材料與方法

### 3.1 材料來源

本研究所用的陸封型台灣鮭魚樣品採集自雪霸國家公園台中縣大甲溪上游的支流七家灣溪。以手拋網盡量不傷害魚隻的方式採集30尾體長大小不等（15公分到26公分）之活魚，立即剪取其脂鰭（幾毫克到十幾毫克），儲放於95%乙醇中，帶回實驗室保存於-80°C冷凍櫃。

### 3.2 粹取標本基因組DNA

用苯酚/氯仿/異戊醇粹取法粹取基因組DNA，透過1%瓊脂糖凝膠電泳檢測DNA的完整性，選取質量好（片段大）的DNA樣品用於AFLP分析。DNA的濃度用HITACHI U-2001或UVB-1(Apices Scientific Co., Model EZC-2002)紫外分光光度計測定，試驗前用純水把所有個體的DNA樣品濃度調至50ng/μl。

### 3.3 AFLP指紋圖譜的建構

根據 Vos 等（1995）提供的 AFLP 方法和步驟，購買並合成試劑，建構 AFLP 指紋圖譜。AFLP 接合子及引子序列見表 1。

表 1 AFLP 接合子及引子序列

EcoR I 接合子(adapter)	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-3'	
Mse I 接合子(adapter)	5'-GACGTGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-3'	
預擴增引子對 (pre-amplification primers)		
EcoR I 引子	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	
Mse I 引子	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'	
選擇性引子對 (selective primers) 6 對		
E-AGC/M-CTA	E-AGC/M-CTT	E-AGC/M-CAT
E-ACG/M-CTA	E-AGG/M-CAT	E-ACA/M-CTG

### 3.3.1 酶切反應

取基因組 DNA 樣品各 100ng，Trull(10u/μl) 0.1μl，10×Y+/Tango buffer(反應緩衝液)4.0μl，再加純水至反應總體積 20μl。於 PCR 儀中 65°C 酶切 2h。再加入 EcoR I(10u/μl) 0.1μl，ddH<sub>2</sub>O 1.9μl 於 PCR 儀中 37°C 酶切 2h。於 70°C 中放置 15min，使酶失活，4°C 下保存備用。

### 3.3.2 聚合酶連鎖反應

每份連鎖反應混合液包括：酶切反應產物 5μl，10mM ATP 0.5μl，EcoR 1 adapter(5uM) 0.5μl，MseI adapter(50uM) 0.5μl，T4 DNA ligase (10u/μl) 0.1μl，再加純水至反應總體積 20μl。於 37°C 下反應 4h。4°C 下保存備用。

### 3.3.3 預擴增反應

反應混合液包括：連接產物 1μl，10×PCR buffer plus Mg<sub>2</sub><sup>+</sup> 2μl，

dNTP(10mM) 0.4 $\mu$ l, EcoR 1 preamp primer(10 uM) 0.4 $\mu$ l, Mse 1 preamp primer(10 uM) 0.4 $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 (5u/ $\mu$ l) 0.1 $\mu$ l。用 eppendoff 公司生產的 PCR 自動反應循環儀進行擴增。

PCR 反應條件：首先 94 $^{\circ}$ C 2min；接著 94 $^{\circ}$ C 30s，56 $^{\circ}$ C 60s，72 $^{\circ}$ C 60s，共 20 個循環；4 $^{\circ}$ C 下保存備用。根據 1.5% 瓊脂糖凝膠電泳檢測預擴增產物的質量。該產物用純水稀釋 10 倍，置 4 $^{\circ}$ C 下保存備用。

### 3.3.4 選擇性擴增反應

取 5 $\mu$ l 預擴增稀釋混合液，10 $\times$ PCR buffer plus Mg<sub>2</sub>+ 2 $\mu$ l，EcoRI 引子(27.8ng/ $\mu$ l) 0.4 $\mu$ l，MseI 引子(27.8ng/ $\mu$ l) 0.4 $\mu$ l，Taq DNA 聚合酶 0.2 $\mu$ l，加純水至總體積為 20 $\mu$ l。PCR 反應條件：先 94 $^{\circ}$ C 2min，再 94 $^{\circ}$ C 30s，65 $^{\circ}$ C 30s，(每循環溫度降低 1 $^{\circ}$ C)，72 $^{\circ}$ C 60s，10 個重複循環後變為：94 $^{\circ}$ C 30s，56 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 60s，26 個重複循環。反應結束後用 1.5% 瓊脂糖電泳檢測預擴增產物的質量。擴增反應產物保存於 4 $^{\circ}$ C 備用。

### 3.3.5 變性聚丙烯醯胺凝膠電泳與銀染

在中國集美大學採用 Amersham Pharmacia Biotect 公司的 Supple-EPS 3501XL 的電泳儀和 Hoefer TM SQ3 Sequencer 電泳槽測序系統，在台灣海洋大學採用 ATTO 公司的 AE-6145 型的電泳儀。以 6% 的變性聚丙烯醯胺凝膠 (繆 1999)、1 $\times$ TBE 緩衝液進行電泳。

電泳完畢後，固定、銀染、顯色步驟參照盧 (1993) 的方法進行。固定液配方為：20ml 乙酸+1980 ml 蒸溜水，固定時間：40min 以上(最好固定過夜)；銀染液配方：3ml 甲醛+10 克 AgNO<sub>3</sub>+400 $\mu$ l 1%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>，染色 30min 以上。

### 3.4 數據處理

分別以 1 和 0 代表每個個體在某一遷移率處有或無擴增片段(譜帶)出現，將上述獲得的 AFLP 指紋圖譜轉換成 1 和 0 構成的數字矩陣，在 Microsoft Excel 中以 Visual Basic 語言編製的程式(王等 2000)，計算各個群體出現的所有遷移率不同的擴增片段數目、多樣性片段(譜帶)數目及其比例、群體內擴增片段的相似系數、群體內的遺傳距離等各項參數，並對每個個體的擴增圖譜一一進行比較，計算出基因型(即一個個體擴增譜帶的組合型式)數。

$$\text{多樣片段比例} = (\text{多樣片段數量} / \text{檢出片段總數}) \times 100\%$$

顯性基因型頻率:  $P_d = n_i / n$ ，其中:  $n_i$  為位點  $i$  上有帶的個體數,  $n$  為總個體數。

$$\text{遺傳距離 (Genetic distance ; D)} = -\ln S$$

相似系數(相關性; Relatedness): 按 Lynch (1990) 的公式計算，即:  $S_{ij} = 2 N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。式中  $S_{ij}$  為相似系數， $N_{ij}$  為個體  $i$  與  $j$  共有的片段的數量， $N_i$ ， $N_j$  分別為個體  $i$  與  $j$  各具有片段的數量。

歸類分析(Assignment): 由 AFLP data analyzer 計算出遺傳距離，輸入 MEGA2.0 軟體中，用 UPGMA 方法進行歸類分析，構建歸類圖(相關性樹狀圖; relatedness tree)。

Shannon 多樣性指數: 群體內遺傳多樣性指數  $I = -\sum X_i \ln X_i / N$ ,  $X_i$  表示位元點  $i$  在該群體的出現頻率(也即顯性基因型頻率)， $N$  表示該群體的出現位點總數。

預期雜合度: 將每個 AFLP 擴增條帶看作一個基因位點，並假設群體處於 Hardy-Weinberg 平衡狀態。不出現擴增條帶的個體為隱性純合體，據此可算出各個位點的顯性基因與隱性基因頻率，進而可計算出群體的預期雜合度:

$$H_e = 1 - \sum P_i^2, P_i \text{ 為單個位點上的等位元基因的頻率。}$$

預期雜合度和 Shannon 多樣性指數採用軟體 POPGEN1.32 計算。

## 第四章、結果

### 4.1 不同選擇性引子對台灣陸封型鮭魚DNA擴增和多樣性檢出效果

由於有2個個體在部分引物中擴增條帶不清晰，僅對28個個體擴增條帶進行了統計。用6對不同選擇性引子，在28尾台灣陸封型鮭魚的DNA樣品中，檢出了626個不同的擴增片段，其中405個片段（64.7%）為群體的全部個體共有，其餘221個片段（35.3%）僅見於部分少數個體，表現多樣性現象。各對引子擴增出的基因型（一個個體擴增譜帶的組合型式）數目式與標本數目不一致（表2）。AFLP標記的遺傳符合孟德爾定律，因此在數據分析中可將1個擴增片段視為一個基因，1個個體的擴增片段組合即為該個體的基因型。每對引子檢出的多樣位點數從23到69不等，平均36.83個，多樣位點比例在33.5%~58.5%之間，以E-ACA/M-CTG檢出的位點數（185）最多，E-AGG/M-CAT多樣性（79.4%）最高（表2）。圖1顯示了引子E-AGC/M-CAT擴增出的AFLP指紋圖譜。



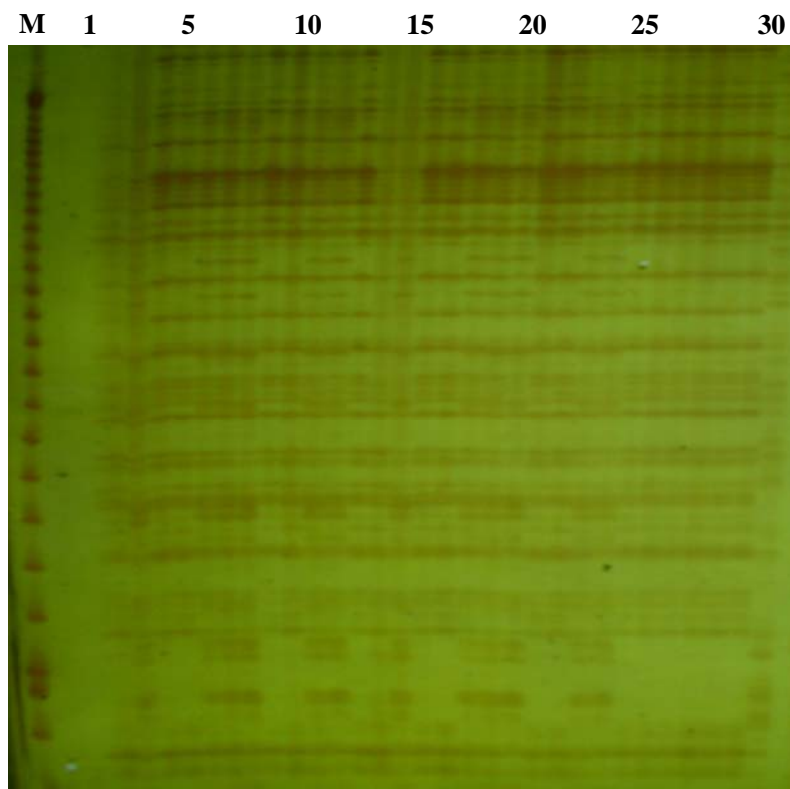


圖 1：用 E-AGC/M-CAT 引子擴增獲得的台灣陸封型鮭魚 AFLP 指紋圖。  
左邊 M 為 10bp DNA 分子量標記物 (marker)

表 2 不同選擇性擴增引子從台灣陸封型鮭魚基因組 DNA 中檢出的片段數

引子	樣本數	檢出位點	多樣位點 N
E-AGC/M-CTA	28	41	24(58.5%)
E-AGC/M-CTT	30	64	23(35.9%)
E-AGC/M-CAT	30	48	24(50.0%)
E-ACG/M-CAT	30	152	83(54.6%)
E-AGG/M-CAT	30	136	108(79.4%)
E-ACA/M-CTG	28	185	123(66.5%)

綜合 6 對選擇性引子擴增的結果，按照 Lynch 的公式計算出個體間的遺傳相似系數為 0.8608-0.9933，平均 0.9342。個體間的遺傳距離範圍為：0.0082-0.1909,平均遺傳距離為 0.06854。所檢測 28 個個體的 Shannon 多樣性指數為 0.1328，預期雜合度 ( $H_e$ ) 為 0.0800。

#### 4.2 歸類分析

根據個體間的遺傳距離用 UPGMA 法對 28 個個體進行歸類分析，建構了歸類樹 (圖 2)，28 個個體聚合為兩大分支 (clade)，大致可歸類成兩大族群。

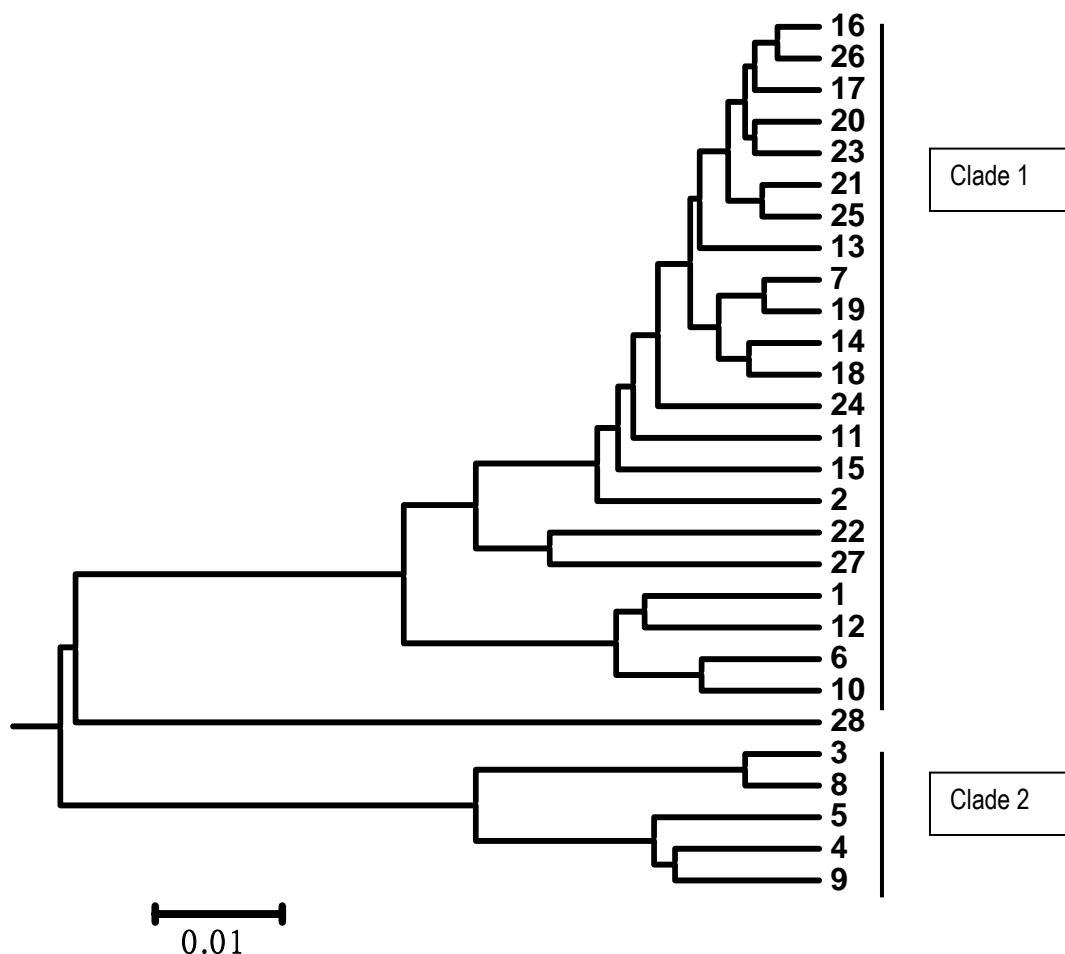


圖 2 根據 28 尾台灣陸封型鮭魚個體的遺傳距離用 UPGMA 法建構的歸類樹

圖3顯示所檢測28個個體AFLP擴增條帶頻率分佈圖，由於AFLP是顯性標記，故圖3也即是顯性基因型頻率分佈圖。從圖中可以看出在群體中出現頻率為100%的單態位點數量最多，形成一個最高的峰，多樣位元點（多樣性）數量較少，曲線上各頻率區間多樣位元點數量多數貼近座標軸，僅在20%~29%的頻率區間上出現一個低矮的峰。

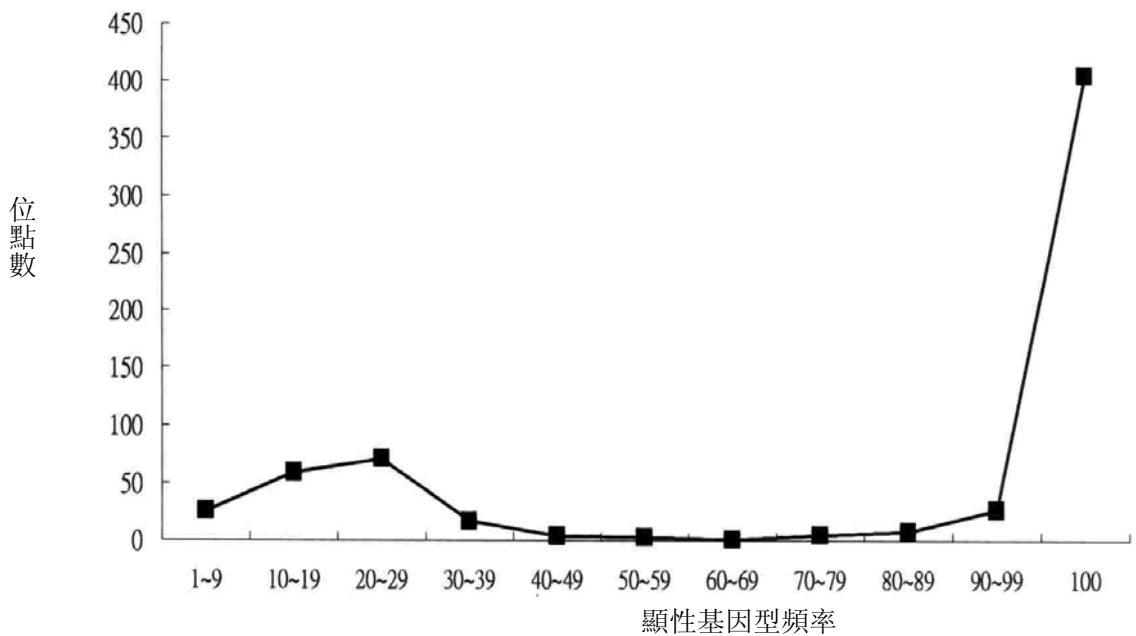


圖3 擴增位點數在不同顯性基因頻率區間內的分佈

## 第五章、討論

### 5.1 台灣陸封型鮭魚的遺傳多樣性現狀及原因探討

台灣陸封型鮭魚屬冰河時期孑遺的活化石，是台灣家喻戶曉的保育明星物種。但由於族群數量起起落落、急劇減少和族群年齡架構老化（曾1997，2000），其遺傳多樣性很可能遭到破壞嚴重萎縮。本試驗測得的台灣陸封型鮭魚個體間的遺傳相似係數平均為0.9342，個體間的遺傳距離平均為0.0680。個體間的相似係數高於所有其他目前用AFLP技術研究過的魚類（真鯛、牙鮭）野生族群，甚至高於一些魚類（大黃魚、牙鮭）的人工繁育群體，而與經過連續兩代雌核發育的鯉魚品系相近（0.9290）。族群群體平均多樣位點比例為36.83%，低於海水魚類中大黃魚（69.2—76.6%）和真鯛（58.4—64%）、牙鮭（40.07—46.18%），而與來源於同一尾雌魚並經過連續兩代雌核發育的一個鯉魚品系相近。台灣陸封型鮭魚的期望雜合度（異型合子； $H_e$ ）才0.0800，Shannon多樣性指數為0.1328，雖然使用AFLP技術進行研究並計算Shannon多樣性指數的魚類例子尚不多，難以比較說明台灣陸封型鮭魚此二指標是稍高或者偏低，但是本試驗測得的期望雜合度遠低於一般淡水魚類的平均期望雜合度（0.54左右；DeWoody and Avise 2000）。以上這些指標都表明臺灣鮭魚的遺傳多樣性貧乏，個體之間的遺傳相似性很高，遺傳距離即遺傳差異比較小。這與王（1997）用同工酶技術發現臺灣櫻鮭的遺傳同質性很高的結論一致。也即臺灣陸封型鮭魚個體間存在嚴重的近親繁殖，導致基因純合度過高，等位基因分佈極不平衡。

一般海水魚的基因多型性最高，洄游性魚類居中，淡水魚最低，主要的影響因子為有效族群數目的差異（DeWoody and Avise 2000）。淡水魚通常棲息生活於特定的湖泊或溪流中，族群數量較少和外界

交流極罕，且生存環境經常發生劇烈環境變動（乾旱、洪水），因此有效族群數目遠低於海水魚。因此陸封後的台灣陸封型鮭魚族群數量一旦銳減後，其遺傳架構會明顯改變，近親交配繁殖和遺傳漂變加速，導致遺傳異質性和基因多樣性不斷喪失。本研究結果發現期望雜合度低（ $He=0.0800$ ）而大多數多樣性位點僅見於少數個體，這表示台灣陸封型鮭魚個體間對偶基因（allele）分佈極不平衡，如不採取有效措施，這些對偶基因將很快遺失或固定。雖然28個個體大致上聚合為兩大分支（clade），但是這是否可以說明這些個體分別來源於不同的親本群體，則還需要更進一步的研究。

另外，研究中測得的Shannon多樣性指數（0.1328）和平均遺傳距離（0.0680）均高於王（1997）進行12尾台灣陸封型鮭魚的mtDNA序列分析所報告的數據（分別為0.0435和0.001）。本研究中估算的期望雜合度（ $He=0.0800$ ）也比其分析台灣陸封型鮭魚的23種同功異構酶所報告的數據（0.0115）高。這種差異可能是由分析方法的差異引起的。但都同樣反映了台灣陸封型鮭魚族群間分化程度極低，族群間的變異極小，基因嚴重均質化。

## 5.2 台灣陸封型鮭魚遺傳多樣性保護對策分析

從本研究結果可以看出，雖然條帶的多樣性較高（35.3%），但大部分多樣性條帶僅為少數個體所擁有，這意味著這些對偶基因在族群中的分佈頻率很低。如果在保育過程中不特別注意，保護帶有這種對偶基因的個體，就會很快導致某些低頻對偶基因的丟失，進而使族群的遺傳多樣性進一步降低。當一個對偶基因在台灣陸封型鮭魚族群群體中的分佈頻率過低時，在隨機抽取的樣品中仍可能會丟失該基因，因此在放流實施過程中，除了要考慮生態學原理和管理成本外，還必須同時考慮保持族群多樣性的遺傳學原理。

目前台灣陸封型鮭魚的生存區域僅限於七家灣溪五公里的範圍

內，由歷年調查的族群數量的紀錄發現族群數量最多時也不會超過四千尾。因此該地區的生物生產力有限，因為有承載量（carrying capacity）的極限，也同時限制了可以人工放流的魚群數量。異地保育（*ex situ*）是保護和恢復珍稀和瀕危物種的有效措施。事實上，隨著保育工作的進展，對台灣陸封型鮭魚進行異地遷移是大勢所趨。而有效族群（ $N_e$ ）的大小與一個族群的遺傳多樣性之程度有密切的關係。因此確定族群在特定條件下其有效族群的大小，對防止近親繁殖和保持族群的遺傳多樣性有一定意義。在掌握台灣鮭魚遺傳架構特徵後，應該嘗試放流一部分人工繁殖的台灣陸封型鮭魚仔稚魚到與七家灣溪生態環境條件相似，而且在歷史紀錄中曾經有台灣陸封型鮭魚出現的溪流，並追蹤調查其遺傳組成的經時變化，確定該區域的最適放流量；同時也讓大自然決定台灣陸封型鮭魚的演化，而非人為決定它未來的演化走向。

在人為飼養台灣陸封型鮭魚族群的遺傳管理上，透過建立譜系，可以達到減緩和避免近交衰退的速度。但較低的對偶基因頻度即使在沒有發生近交的情況下仍可能出現遺傳漂變；因此必須把注意力放在稀有對偶基因遺傳型個體的發現和妥善保存上。在選擇親魚時為低頻對偶基因攜帶者提供更多的繁殖機會，使這些對偶基因在群體中的分佈頻率提升，從而降低這些基因的丟失機率，最大限度地保持台灣陸封型鮭魚的遺傳多樣性。

淡水魚依其生活史可分為周緣性淡水魚（原本是海水魚只是短暫進入淡水水域）、淡海兩側洄游型（生活史來回於淡水和海水之間）和純淡水型（終生棲息於淡水）。隨著淡水之滿水或乾涸，地理造成之侵食及堆積作用，因此河川與湖沼組成的淡水水域，其空間極富多樣性。棲息於此種環境之淡水魚也因而演化出各式各樣的生活史及族群構造。尤其純淡水魚極易受地理隔離，同一物種經常在不同的環境下求生存。更由於淡水（河川、湖沼）是人類最鄰近的環境，

自古極易受人類活動，如治水、利水之目的變更河川水路，岸邊水泥化，掩埋造新生地的影響。因此物種內不同族群間明顯有分化現象，例如純淡水的鯉科魚類其族群內之多樣性極小，但淡海兩側洄游之香魚其族群內的多樣性即較高。比起海水，淡水的環境變動更遠大於海水水域。根據最近日本環境省新版的紅皮書（Red list）之記載，日本總共有76個物種和亞種需要保護。這個數目是日本列島原生淡水魚總數（318）的約1/4弱。歸納日本淡水魚物種急劇減少的主要原因有，建築開發、在河川設置橫斷物、農業活動、工業廢水、下水道污水之排入、農藥及肥料之使用及引進來物種等等，總之都是人為因素。

要適當的保護稀少物種之際，明瞭稀有物種的族群遺傳結構是不可或缺的。聯合國生物多樣性（biodiversity）之定義，包括基因（gene）、物種（species）、生態系（ecosystem）及地景（landscape）的多樣性。為了維持生態系的構造和機能之正常運作，保護生態系其構成要素的基因和物種是具體的對策。因此必須重視產生物種多樣性的演化背景。一般淡水魚無法在空氣中和陸上生存，僅能棲息於淡水水域（河川、湖沼、水田、水路等）的某些棲地，其棲地分布呈補丁區塊（patch）狀，因此很容易因為地理原因，同一物種被隔離而獨自演化形成每個獨立不同遺傳結構的族群（遺傳基因的固有性；局部地域的族群；Local population）。藉著不同遺傳結構的族群間的種間雜交，而恢復其物種遺傳基因之多樣性。每個獨立不同遺傳結構的族群間彼此都有相關，而非獨立，任一層次多樣性之減少或消失都會影響另一層次之多樣性。一般系統分類學僅以單系統群為研究對象，但保育生物學的基因的固有性是指演化歷史過程的產物，包括單系統群，側系統群及多系統群。因此學者建議從族群遺傳的眼光保護物種的對象應以實質的管理單位（Management Unit；EU）著手。

稀有物種一般具有在有限的棲地僅餘極少的數目的特徵。由數個生息於局部地域的族群組成關連族群 (metapopulation)，籍著各族群間或多或少的遺傳交流，維持此物種的基因多樣性。若是彼此間完全斷絕交流則稱為地域族群 (regional population)。遺傳交流越少的物種，其滅絕的機率就越大。因此持續監測每個族群之遺傳結構是豐富此物種之基本方針。維持關連族群族群棲地間良好自由交流通路的暢通，避免棲地零碎化也都是維持族群基因多樣性的重點。因為即使某個局部族群滅絕，移入別處的局部族群，仍有機會恢復物種的基因多樣性。曾 (2000) 調查發現颱風頻繁的年代，台灣陸封型鮭魚數量即銳減，暗示颱風可能是最近幾年造成陸封型鮭魚數量減少的主要原因。因為台灣陸封型鮭魚對環境條件的要求很高，只能生活在水溫 $16^{\circ}\text{C}$ 以下清淨無污染的水體，而颱風會使水體的環境條件發生急劇的變化，從而威脅台灣陸封型鮭魚的生存。但是颱風永遠存在，每年必定侵襲台灣，維持多個台灣陸封型鮭魚局部族群，保持局部族群間多重通路 (network) 的暢通，應是分散危險，降低物種滅絕機率，保護台灣陸封型鮭魚物種永存的圭臬。

日本ネコギギ (*Pseudobagrus ichikawai*) 是一種鮡科魚類多棲息於日本長良川河川中緩流區的瀨和瀾間的大巨石頭縫隙間。流域中巨石堆的分隔由數公尺到數十公尺不等。計算其一支流之棲息所約有102個，其中的10個 (佔全面積之15%) 聚集著70%的個體，族群分佈呈區塊狀。選擇其中7個主要棲地，採集分析其每個個體之微衛星DNA的結構。發現僅數十公尺分離的族群之間即有明顯的基因結構差異，全流域呈不同的族群構造 (圖4)。台灣鮭魚是否也呈現類似的分佈現象是值得今後探討的課題。由於我們對台灣鮭魚之遺傳基因多樣性之原始結構知識一片空白，在受人為影響之前，各地域族群內之基因多樣性的大小一概不知。明白此基本資訊才可以根據生物地理學推測物種的遷徙移動、分散狀況、物種在何時分化，確認



其分布區域，甚至可以據此把分析結果提供作保育之決策。桃山瀑布是七家灣溪中天然分隔台灣鮭魚族群的天塹，其上游應該還殘留有原始台灣鮭魚族群，調查此族群之基因結構實刻不容緩。

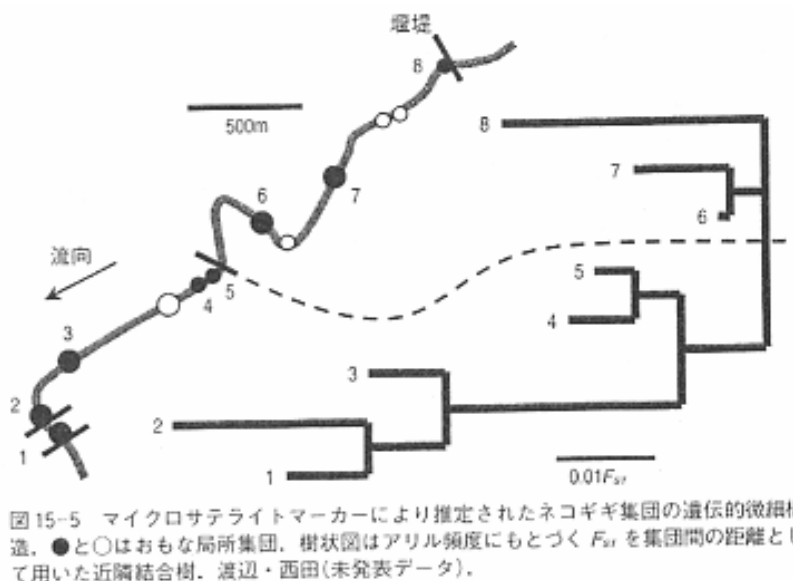


圖4、根據微衛星DNA分子標記分析推測Nekogigi (ネコギギ) 物種於長良川流域中呈現關連族群的構造

### 5.3 核苷酸指紋(DNA fingerprinting)之應用

核苷酸指紋應用技術之層次主要有粒線體 DNA 序列分析、RAPD、微衛星 DNA 及 AFLP 四大類，其所代表的意義都不相同。AFLP 結合 RFLP 與 RAPD 分析原理之最新的核苷酸指紋分析技術，其原理係將基因組 DNA 經二種特定限制性核酸內切酶處理，再與特定接合子(Adapter)接合，再以含接合子之核苷酸序列的特定引子來擴增特定 DNA 片段，以其表現之 DNA 片段多形性來作為核苷酸指紋。其代表涵義為每一物種的染色體 DNA 在特定的限制性核酸內切酶切點間特定片段的數量與大小，每一物種均不相同，而且具有遺傳性，故可作為親緣關係(genetic relationship)與譜系親子關係(pedigree)之研究。

AFLP 是在 RAPD 技術基礎上引入限制性核酸內切酶處理故又稱選擇性限制片段擴增 (selective restriction fragment amplification, SRFA) 技術。其基本原理和程序可概括為三個主要步驟：第一步是將純化的基因組 DNA 用特定限制性核酸內切酶進行完全酶解，第二步是用 T<sub>4</sub>DNA 連接酶將特定設計的人工接合子 (如 adapter or linker) 連接到酶切的 DNA 片段兩端，第三步是用含有人工接合子核心序列、特定酶切位點序列和 2~3 鹼基的隨機選擇序列的人工合成引子，對連接好的 DNA 片段進行 PCR 擴增。此技術由於將酶切和 PCR 擴增結合在一起，從而克服了 RFLP 分析技術和 RAPD 技術中的許多不足，如 RFLP 雜交步驟的繁瑣和 RAPD 技術的重複性較差等問題，因而能被廣泛用於遺傳圖譜的構建、基因定位和種系遺傳標記的尋找等研究。與 RFLP 和 RAPD 技術相比，AFLP 的主要特點是其 PCR 擴增引子由核心序列、特定限制內切酶的切點序列和選擇鹼基序列三部分組成，人工接合子序列中存在與核心序列和酶切點序列互補的鹼基，而選擇序列則由數個隨機鹼基組成。其數目與擴增產物的片段數成反比。在研究中，一般是透過控制選擇鹼基的數目來調整所需擴增產物的片段數，以適應不同研究目的的需要。如果減少一個選擇鹼基，則擴增的 DNA 帶紋數往往可增加 4 倍。此外，由於本技術採用了較高 T<sub>m</sub> 值的擴增引子，煉合溫度一般為 56°C，故其特异性比 RAPD 更強，重複性更好；再加上人工接合子可以進行系列設計，而每一人工接合子又可合成一系列的擴增引物，因此可為基因組分析提供大量的 DNA 指紋數據，大大提升對偶基因判別的準確性和對多樣性檢出的靈敏度。本研究的 6 對選擇性引子從 28 尾台灣陸封鮭魚檢測到 626 條的 AFLP 條帶，221 個片段 (35.3%) 於部分個體表現出多樣現象，這表示 AFLP 對檢測台灣陸封鮭魚個體間 DNA 多樣性與其他生物一樣有效，是研究台灣陸封鮭魚群體族群遺傳多樣性中值得重視的技巧。

Wang 等(2004)研究 6 種對蝦，發現各個對蝦物種具有其特有的片段，這些特殊的基因標記片段，可克服利用型態特徵不易分辨對蝦幼苗的困難，並將各物種特有的共享條帶 DNA 測序後設計 PCR 引子，發展成為 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) 標記。且已經確定了一批可以用以進行 6 種受試對蝦物種鑑定(別)的 AFLP 標記，這些工作對於對蝦物種之鑑別及其生物學的研究將有莫大助益。若是台灣陸封鮭魚也能開發出此 SCAR 標記對未來探討台灣陸封鮭魚的洄游等族群動態工作將如虎添翼。他們同時根據 6 對選擇性引子的 AFLP 指紋圖譜計算各受試個體及物種間的遺傳距離進行聚類分析。發現同一物種的不同個體首先聚合成 6 群，不同物種而形態學上相似的物種也聚合在一起，這與用 mtDNA 標記所作研究的結果一致，亦即說明以 AFLP 技術得到的遺傳距離，用於對蝦物種間、至少在亞屬水準上的親緣關係研究是適宜和可信的。

由於使用 AFLP 技術時不必事先知道所欲分析物種的遺傳資訊，因此此技術在分析各種生物物種的親緣關係上很有潛力。但需要特別指出，以 AFLP 分析由個體間檢出的片段一般假設來自是同一基因座的對偶基因 (allele of the same locus) 而且同源 (homologous)。但是由於以 AFLP 檢出之片段的序列較短 (2 種限制酶識別順序加上 PCR 引子末端添加的選擇性鹼基，合計約 16bp)，當受檢對象之間差異較大時 (如不同物種) 可能會出現較多的非對偶片段 (nonallelic fragmentation)。因為同樣大小的片段可能來自不同的基因座，但卻被當成不同物種間的相同基因座，而導致低估物種間遺傳距離等錯誤的結論。因此用 AFLP 技術進行親緣關係分析研究時有必要採用多對選擇性引子、也即需增加觀測位點，並對結果進行綜合分析，才可以保證所獲結果的正確性 (Wang et al., 2004)。

## 謝言

感謝中國福建省廈門市集美大學王志勇教授研究室研究生的技術指導，王志勇和香港中文大學朱嘉濠教授的數據分析和討論。更感謝雪霸國家公園管理處林處長、楊課長、廖技士等人的大力幫忙本研究才得以完成。

## 參考書目

中文：

- 盧聖棟 1993. 現代分子生物學技術，北京：高等教育出版社，95-149。
- 曾晴賢 1997 櫻花鉤吻鮭族群生態調查和育種場位址評估。內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告。
- 王昱人 1997 台灣鉤吻鮭與日本鉤吻鮭遺傳多樣性之研究。清華大學生命科學所碩士論文。65 頁。
- 繆穎 1999. AFLP分子標記及其應用。亞熱帶植物通訊。28(2)：55-60。
- 曾晴賢 2000。櫻花鉤吻鮭族群監測與生態調查（四）內政部營建署雪霸國家公園管理處委託研究報告。
- 王志勇、王藝磊、林利民、洪惠馨、張雅芝、邱淑貞、岡本信明 2000. 利用 AFLP 指紋技術研究中國沿海真鯛群體的遺傳變異和趨異。水產學報，25(4)：288-293。
- 王志勇,王藝磊,林利民 2002 福建官井洋大黃魚 AFLP 指紋多態性的研究。中國水產科學，9（3）：198-202。
- 夏軍紅、鄭勁松、魏卓、趙慶中、王丁 2004. 天鵝洲保護區長江江豚 AFLP 遺傳多樣性分析。高技術通訊。7：25-28。
- 張全啟，徐曉斐，齊潔 2004 牙鮡野生群體與養殖群體的遺傳多樣性分析。中國海洋大學學報，34（5）：816-820。

日文：

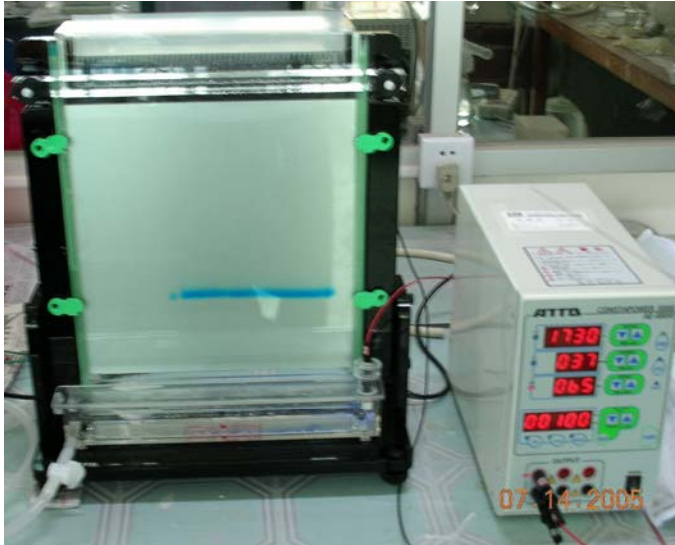
- 細谷和海：生物多樣性を考慮した淡水魚保護，日本の希少淡水魚の現状と系統保存—よみがえれ日本産淡水魚，長田芳一・細谷和海，綠書房，pp.315-329（1997）。
- 井田 齊、奥山文弥 2002 サケ、マス魚類のわかる本。山と溪谷社。247 頁。
- 前川光司 編 2004 サケ、マスの生態と進化。文一総合出版。335 頁。
- 片野 修、森 誠一 監修、編 2005 希少淡水魚の現在と未来。信山社 416 頁。
- 西田 睦、武内和彦、鷺谷いづみ 2005 生態系へのまなざし。東京大學出版社 312 頁。

英文：

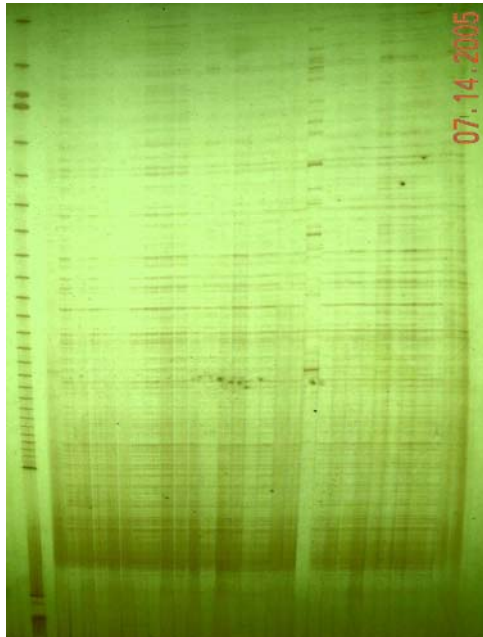
- Avise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York.
- Brooker, A.L., Cook, D., Bentzen, P., Wright, J.M. and Doyle, R.W. (1994). Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51 1959-1966.
- Carter, R.E., Mair, G.C., Skibinski, D.O.F., Parkin, D.T. and Beardmore, J.A. (1991). The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture*, 95 41-52.
- Carvalho, G.R. and Pitcher, T.J. (1995). *Molecular genetics in fisheries*. Chapman & Hall, London, UK.
- Curtis J M R and Taylor E B. 2003. *Bioconservation* 115(1):45.
- DeWoody JA and Avise JC, 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater, and anadromous fishes compared with other animals. *J Fish Biol*56:461-473
- Healy, M., Kline, P. and Tsai, C.F. (2001). Saving the endangered Formosa landlocked salmon. *Fisheries*. 26 6-14.
- Huang, L. and Wang, Y.Q. 2004. SSR polymorphism of Alligator sinesis and Conservation. *Strategy of Genetic Diversity* 31(2):143— 150
- Lynch, M. 1990. Similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 1990,7:478-484.
- Martinez, J.L., Gephard S., Juanes F. and Garcia-Vazquez.E. (2000). The use of microsatellite DNA loci for Genetic monitoring of atlantic salmon populations. *North American Journal of Aquaculture* 62 285-289
- Mayama, H. (1990). Ecological notes on masu salmon. *Technical reports of Hokkaido salmon hatchery (Fish and egg)* 159 7-21. ( in Japanese )
- Morris, D.B., Richard, K.R. and Wright, J.M. (1996). Microsatellites from rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53 120-126.
- Numachi, K.I., Kobayashi, T., Chang, K.H. and Lin, Y.S. (1990). Genetic identification and differentiation of Formosan salmon, *Oncorhynchus masou formosanus*, by restriction analysis of mitochondrial DNA, *Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica* 29(3) 61-72
- O'Connell, M. and Wright, J.M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7 331-363.
- Perez-Enriquez, R. and Taniguchi, N. (1999). Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population off Japan and the Southwest Pacific, using microsatellite DNA markers. *Fisheries Science* 65(1) 23-30.
- Perez-Enriquez, R. and Taniguchi, N. (1999). Use of microsatellite DNA as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of red sea bream. *Fisheries Science* 65(3) 374-379.

- Pittman-Cooley, L. and Tiersch, T.R. (2000). Isolation of DNA from cryopreserved fish sperm. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiana, pp. 310-13.
- Sanford, C.P. (1990). The phylogenetic relationships of salmonid fishes. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist(Zool)* 56(2) 145-153.
- Takagi, M., G. Sogabe and N. Taniguchi. 1998. Genetic variability and divergence of ayu *Plecoglossus altivelis* using AFLP fingerprinting. *Suisan Ikushu* 26:55-61.
- Taniguchi, N. (1999). Genetic diversity and its evaluation in fish and shellfish. *Aquabiology* 21 280-289. ( in Japanese )
- Takagi, M. (2001). Genetic and breeding studies on the hypervariable DNA markers in fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 67 610-13. ( in Japanese )
- Tseng, M.C., Chen, C.A., Kao, H.W., Tzeng, W.N. and Lee, S.C. (2001). Polymorphisms of GA/GT microsatellite loci from *Anguilla japonica*. *Marine Biotechnology*, 3 275-280.
- Vos, P., R. Hogers, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23 : 4407-4414.
- Wang, Z.Y., Kwok, H.T and Chu, K.H. (2004). Applications of AFLP technology in the genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32 ( 4 ) 399-407.
- Wang Z, Jayasanka P, Khoo SK. (2000). AFLP Fingerprinting reveals genetic variability in common carp stocks from Indonesia. *Asian Fisheries Science* 13:139-147.
- Wright, J.M. (1993). DNA fingerprinting in fishes, in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (eds P.W. Hochachka and T. Mommsen), Elsevier, Amsterdam, pp. 57-91.

## 附錄1



ATTO公司生產的AE-6145 型電泳儀



用引子擴增獲得的台灣陸封型鮭魚AFLP指紋電泳膠圖。橫座標是30個個體，縱座標表示30個個體的條帶。縱座標最左的一條條帶是DNA分子量標記物 (marker)。



## 附錄 2、AFLP 實驗步驟 (銀染色法)

### AFLP protocol (Silver Staining Method)

Modified by Wang Zhi Yong

#### ■ *Preparation of genomic DNA* (1<sup>st</sup>~2<sup>nd</sup> day)

1. Extraction of (genomic) DNA : best use fresh samples.
2. Run agarose gel (0.8~1.0%) to check quality of DNA
3. Determine DNA concentration by UV photospectral meter. Best all adjust to 50ng/  $\mu$  l  
(1 OD<sub>260</sub>=50  $\mu$ g/ml)

#### ■ *Restriction digestion and ligation:* (3<sup>rd</sup> day)

##### Using LifeTechnologies AFLP Core Reagent Kit:

1. Mix 100 ng of DNA (<18  $\mu$ l), 5  $\mu$ l of 5X Reaction Buffer, 2  $\mu$ l of EcoRI/MseI
2. Add ddH<sub>2</sub>O or MQ water TO 25  $\mu$ l
3. Incubate 2 h at 37°C
4. Incubate 15 min at 70°C, and put on ice (● stop sample I)
5. Take 5.0  $\mu$ l of the double digested products into a new PCR tube, add 4.8  $\mu$ l of Adapters/Ligation Solution and 0.2  $\mu$ l of T4 DNA ligase (1u/ $\mu$ l)
6. Mix at RT and incubate at 20°C for 2 h
7. add 10  $\mu$ l of TE buffer (NOT water)
8. Store the reaction at -20°C (● stop sample II)

##### Using BioLabs Reagent:

1. (for one sample) Mix the following components in an appropriate tube:

ddH <sub>2</sub> O		add TO 20 $\mu$ l
NE Buffer2 (10x)	2.0 $\mu$ l	
EcoRI (20u/ $\mu$ l)	0.125 $\mu$ l	
MseI (10u/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l	

2. Add 50~100 ng sample DNA (all individuals should be in equal amount) into each reaction tube and vortex slightly (spin down if necessary)
3. Incubate 2~3 h at 37°C (● stop sample I)

Note: The digestion should NOT be done for significantly longer than 3 h.

4. Add 5 $\mu$ l of the following mix to per reaction tube:
 

NE Buffer2 (10x)	0.5 $\mu$ l	
BSA (10mg/ml)	0.025 $\mu$ l	
ATP (100mM)	0.05 $\mu$ l	
EcoRI adapter (5.0pM)	0.5 $\mu$ l	
MseI adapter (50pM)	0.5 $\mu$ l	
ddH <sub>2</sub> O		3.35 $\mu$ l
T4 DNA ligase (0.4u/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l	
5. Incubate 3~6 h at 37 °C
6. Store the reaction at -20 °C (● stop sample II)

● stop means can be stopped at that step.

■ **Pre-amplification:** (4<sup>th</sup> day)

	Pre amp Reaction ( $\mu$ l)
MQ water	13.4
10X PCR buffer	2.0
2 mM dNTPs	2.0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.2
EcoRI preamp primer (37 $\mu$ M)	0.17
MseI preamp primer (33 $\mu$ M)	0.17
Taq (5u/ $\mu$ l)	0.1
DNA (adapter ligased)	1.0
<b>Total</b>	<b>20.0</b>

**Pre-amp program:**

94 °C 2 min

20 cycles of:     94 °C 30 sec

53 °C 30 sec

72 °C 1 min

Hold at:         15 °C                     (● stop sample III)

After the PCR, take 6  $\mu$ l to do electrophoresis (run on 1.5% agarose gel), then make 1:3~15 dilution of the reaction with TE buffer pH 8.0, or with MQ.

(● stop sample III-2)

■ *Selective amplification:*

	Per reaction
MQ	8.7
10X PCR buffer	2.0
2mM dNTPs	2.0
25mM MgCl <sub>2</sub>	1.2
EcoRI primer (10 μM)	0.5
MseI primer (10 μM)	0.5
<i>Taq</i>	0.1
DNA (from pre-amp rx)	5.0
Total	20.0

PCR program:

94 °C 2'  
 65 °C 30"  
 72 °C 1'  
 then 10 cycles –1 °C  
 94 °C 30"  
 65-56 °C 30"  
 72 °C 1'  
 then 28~30 cycles (for 68 well comb), or 25~26 cycles (for 45 well and 49 well comb)  
 94 °C 30"  
 56 °C 30"  
 72 °C 1'  
 then  
 72 °C 5'  
 hold  
 4 °C (● stop sample IV)

Prior to running the samples need to have 6-10 ul formamide stop solution added and then to be concentrated by evaporating at 90 °C for ~25 min.

*Electrophoresis and analysis of AFLP products: (5<sup>th</sup> day)*

2X formamide buffer:

99% deionised formamide  
 10 mM EDTA  
 0.05% w/v xylene cyanol  
 0.05% w/v bromophenol blue  
10X TBE buffer (in 1 L):

Tris-base: 108 g  
 Boric acid: 55 g  
 0.5 M EDTA (pH 8.0): 40 ml  
 dH<sub>2</sub>O: add to 1000 ml

**8.11M Urea-TBE solution (in 1 L):**

Urea: 486.5 g  
 10X TBE: 100 ml  
 dH<sub>2</sub>O : add to 1000 ml

**Prepare a 5% acrylamide gel (with 7.0 M Urea):** In the hood!!!!!!

For BioRad large gel tank, 0.4 mm comb : need about 86 ml  
 For BioRad large gel tank, 0.75 mm comb : need about 165 ml  
 For 北京特力工贸电泳槽, 0.45 mm comb: need about 70 ml

	For BioRad large gel tank, 0.4mm comb	For 70 ml
8.11M Urea-TBE	76 ml	60.5 ml
40% acrylamide/bis acrylamide	11 ml	8.75 ml
TEMED	60 ul	45 ul
10% AMPS	540 ul	430 ul

***Glass preparation:***

1. Wipe glass with kimwipe and ethanol
2. Fixed glass should be treated with Sigmacote or Repel Silane, and the edge of free glass should be treat with Bind Silane.
3. Set the free galss into gel rig
4. Inject gel solution
5. Insert comb into the gel
6. Let it polymerize for at least 2 h (**Important:** above side should be slightly lower than the bottom side.)
7. Remove the comb slowly and carefully. (☹ The well might be destroyed when remove the comb too fast)

***Gel loading and running:***

1. Fill the lower and upper chambers with 0.5~1X TBE (lower: 400~500 ml; upper: 1cm higher than the short glass, about 1000 ml).
2. Flush wells with dropper and pipet
3. Pre-run: temperature 55 °C; constant power 135~145 W, 0.5~ 1 hr.
4. Denature samples and AFLP ladder when pre-running
5. Check the temp
6. Stop the power
7. Flush wells with pipet
8. Load 2.5-3.0  $\mu$ l (for 68 well comb) or 5.0~6.0  $\mu$ l (for 49 well comb) of sample; 3  $\mu$ l of ladder
9. Set the power at: temperature 50 °C; constant power 110 W, 3 hr
10. Stop the running after 2.0-3.0 h (bromophenol blue has run off and xylene cyanol (the green dye) be about 13 cm above the bottom)
11. Drain the TBE buffer back to bottle (it can be reuse for 1~2 times), remove the clinchers, then carry gel plates to the sink. Run cold water over the outside until plates cool.
12. Place plates on desk with front (glass) plate underneath. Prise plates apart very carefully and remove the gel rig and spacers.
13. Dip the gel (on glass plate) in fixing solution (see bellows).

***Silver staining:***

Fixing and stopping solution: 1~2% Acetic acid

for 1800 ml, add 18~30 ml 99% Acetic acid to 1800 ml ddH<sub>2</sub>O

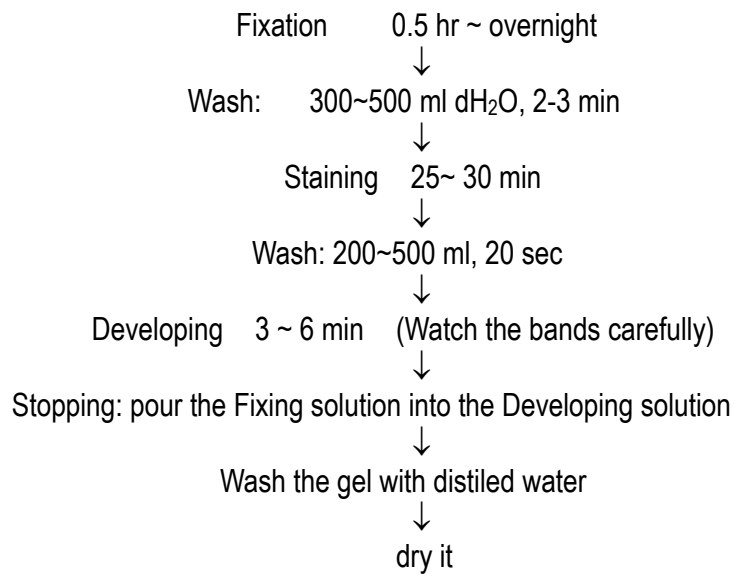
Staining solution: AgNO<sub>3</sub> 0.2%, Benzeen sulphonic acid 0.07%

for 1600 ml, AgNO<sub>3</sub> 3.2g, Benzeen sulphonic acid 1.02g

Notes: Staining solution can be reused for 3~4 times. Just need to add ~1.0g AgNO<sub>3</sub> to the old solution when reuse.

Developing solution: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5%\*, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.002%, HCHO 0.037~0.056%. for 1800 ml, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 45g, 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 360 $\mu$ l, 37% Formalin 1.8~2.7 ml Notes: 2.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> can be replaced by 0.5% NaOH.

Staining procedure:



### 附錄 3、數據分析

#### 1、AFLP 矩陣數據

橫座標：台灣陸封型鮭魚個體數目 縱座標：檢出條帶數

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
13	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



















496	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
497	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
498	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
501	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
502	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
503	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
504	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
505	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
506	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
507	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
508	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
509	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
510	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
511	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
513	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
514	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
515	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1
516	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1
517	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
518	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
519	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
521	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
522	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
523	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
524	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
525	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
526	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
527	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
528	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
529	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
530	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
531	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
532	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
533	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
534	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
535	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
536	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
537	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
538	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
539	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
541	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
542	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
543	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
544	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
545	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
546	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
547	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
548	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
549	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
551	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1





608	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
609	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
610	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
611	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
612	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
613	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
614	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
615	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
616	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
617	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
618	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
619	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
620	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
621	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
622	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
623	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
624	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
625	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
626	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## 2、相似係數

Similarity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1																					
2	0.9368																				
3	0.8869	0.9144																			
4	0.9145	0.8870	0.9576																		
5	0.9253	0.8780	0.9423	0.9749																	
6	0.9721	0.9344	0.8693	0.9106	0.9251																
7	0.9382	0.9742	0.9093	0.8778	0.8845	0.9526															
8	0.8844	0.9161	0.9884	0.9500	0.9346	0.8648	0.9069														
9	0.9162	0.8765	0.9486	0.9775	0.9737	0.9065	0.8611	0.9521													
10	0.9617	0.9282	0.8614	0.9049	0.9136	0.9816	0.9378	0.8608	0.9026												
11	0.9333	0.9649	0.8947	0.8718	0.8784	0.9393	0.9752	0.8963	0.8631	0.9393											
12	0.9729	0.9308	0.8873	0.9187	0.9159	0.9743	0.9406	0.8869	0.9165	0.9660	0.9357										
13	0.9338	0.9634	0.9091	0.8815	0.8764	0.9356	0.9804	0.9108	0.8688	0.9377	0.9686	0.9468									
14	0.9437	0.9668	0.8984	0.8733	0.8858	0.9496	0.9794	0.8980	0.8724	0.9433	0.9828	0.9460	0.9707								
15	0.9270	0.9670	0.9170	0.8854	0.8765	0.9268	0.9687	0.9228	0.8847	0.9247	0.9572	0.9294	0.9708	0.9677							
16	0.9418	0.9631	0.9145	0.8786	0.8774	0.9350	0.9780	0.9162	0.8758	0.9286	0.9662	0.9528	0.9846	0.9770	0.9727						
17	0.9389	0.9666	0.9119	0.8802	0.8829	0.9407	0.9836	0.9136	0.8734	0.9343	0.9696	0.9498	0.9836	0.9782	0.9675	0.9923					
18	0.9437	0.9711	0.9045	0.8772	0.8898	0.9454	0.9816	0.9061	0.8744	0.9370	0.9763	0.9397	0.9707	0.9892	0.9656	0.9748	0.9804				
19	0.9421	0.9719	0.9046	0.8732	0.8838	0.9502	0.9912	0.9063	0.8683	0.9417	0.9772	0.9444	0.9803	0.9880	0.9750	0.9845	0.9901	0.9880			
20	0.9418	0.9653	0.9063	0.8786	0.8714	0.9393	0.9824	0.9080	0.8677	0.9372	0.9684	0.9442	0.9846	0.9748	0.9727	0.9867	0.9878	0.9770	0.9867		
21	0.9465	0.9612	0.9028	0.8832	0.8781	0.9439	0.9782	0.9024	0.8705	0.9397	0.9729	0.9467	0.9781	0.9793	0.9664	0.9801	0.9813	0.9793	0.9824	0.98	
22	0.9231	0.9372	0.8915	0.8730	0.8698	0.9188	0.9449	0.8911	0.8663	0.9229	0.9569	0.9255	0.9469	0.9609	0.9380	0.9529	0.9499	0.9504	0.9510	0.95	
23	0.9471	0.9642	0.9072	0.8735	0.8743	0.9403	0.9791	0.9089	0.8726	0.9360	0.9651	0.9495	0.9791	0.9759	0.9738	0.9878	0.9845	0.9759	0.9856	0.98	
24	0.9350	0.9561	0.9022	0.8770	0.8698	0.9326	0.9685	0.9018	0.8682	0.9347	0.9634	0.9396	0.9728	0.9740	0.9634	0.9769	0.9738	0.9654	0.9727	0.98	
25	0.9483	0.9631	0.9083	0.8806	0.8774	0.9436	0.9802	0.9080	0.8737	0.9372	0.9727	0.9506	0.9802	0.9814	0.9706	0.9867	0.9856	0.9792	0.9867	0.98	
26	0.9458	0.9672	0.9098	0.8739	0.8726	0.9389	0.9823	0.9116	0.8710	0.9325	0.9682	0.9482	0.9800	0.9791	0.9748	0.9933	0.9878	0.9791	0.9889	0.99	
27	0.9064	0.9351	0.8995	0.8711	0.8640	0.8983	0.9386	0.9011	0.8624	0.9044	0.9274	0.9048	0.9427	0.9335	0.9317	0.9443	0.9436	0.9356	0.9424	0.95	
28	0.8687	0.8780	0.8538	0.8540	0.8469	0.8691	0.8786	0.8552	0.8453	0.8791	0.8948	0.8793	0.8928	0.8944	0.8764	0.8919	0.8893	0.8862	0.8841	0.88	

### 3、遺傳距離

Distance	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1																					
2	0.0652																				
3	0.1200	0.0895																			
4	0.0894	0.1200	0.0434																		
5	0.0776	0.1301	0.0595	0.0254																	
6	0.0283	0.0678	0.1401	0.0936	0.0778																
7	0.0638	0.0261	0.0951	0.1303	0.1227	0.0486															
8	0.1228	0.0877	0.0116	0.0513	0.0677	0.1452	0.0978														
9	0.0875	0.1319	0.0528	0.0228	0.0267	0.0982	0.1495	0.0491													
10	0.0390	0.0745	0.1492	0.0999	0.0903	0.0186	0.0642	0.1499	0.1025												
11	0.0690	0.0358	0.1112	0.1371	0.1296	0.0626	0.0251	0.1094	0.1473	0.0626											
12	0.0275	0.0717	0.1195	0.0848	0.0878	0.0261	0.0613	0.1200	0.0872	0.0346	0.0664										
13	0.0685	0.0372	0.0953	0.1261	0.1320	0.0666	0.0198	0.0935	0.1407	0.0643	0.0319	0.0547									
14	0.0580	0.0337	0.1072	0.1355	0.1212	0.0517	0.0208	0.1076	0.1365	0.0584	0.0174	0.0555	0.0298								
15	0.0758	0.0336	0.0866	0.1217	0.1319	0.0760	0.0318	0.0804	0.1225	0.0783	0.0438	0.0732	0.0296	0.0328							
16	0.0600	0.0376	0.0894	0.1295	0.1308	0.0672	0.0222	0.0875	0.1327	0.0740	0.0344	0.0484	0.0155	0.0233	0.0276						
17	0.0630	0.0340	0.0922	0.1277	0.1245	0.0612	0.0165	0.0904	0.1354	0.0679	0.0308	0.0515	0.0166	0.0220	0.0331	0.0078					
18	0.0580	0.0293	0.1004	0.1310	0.1168	0.0562	0.0186	0.0986	0.1342	0.0651	0.0239	0.0622	0.0298	0.0109	0.0350	0.0255	0.0198				
19	0.0597	0.0285	0.1002	0.1356	0.1235	0.0511	0.0088	0.0984	0.1413	0.0601	0.0231	0.0572	0.0199	0.0121	0.0253	0.0156	0.0100	0.0121			
20	0.0600	0.0353	0.0984	0.1295	0.1377	0.0626	0.0177	0.0966	0.1419	0.0649	0.0321	0.0574	0.0155	0.0255	0.0276	0.0134	0.0122	0.0233	0.0134		
21	0.0550	0.0396	0.1023	0.1242	0.1300	0.0577	0.0221	0.1027	0.1387	0.0622	0.0275	0.0548	0.0221	0.0209	0.0342	0.0201	0.0188	0.0209	0.0177	0.011	
22	0.0800	0.0648	0.1148	0.1359	0.1395	0.0847	0.0567	0.1153	0.1435	0.0802	0.0441	0.0775	0.0545	0.0399	0.0640	0.0483	0.0513	0.0509	0.0503	0.043	
23	0.0543	0.0365	0.0974	0.1352	0.1344	0.0616	0.0211	0.0955	0.1363	0.0661	0.0356	0.0518	0.0212	0.0244	0.0266	0.0123	0.0156	0.0244	0.0145	0.010	
24	0.0672	0.0449	0.1029	0.1313	0.1395	0.0697	0.0320	0.1033	0.1413	0.0675	0.0373	0.0623	0.0276	0.0263	0.0373	0.0233	0.0266	0.0352	0.0277	0.018	
25	0.0531	0.0376	0.0961	0.1272	0.1308	0.0581	0.0200	0.0966	0.1350	0.0649	0.0276	0.0506	0.0200	0.0188	0.0299	0.0134	0.0145	0.0210	0.0134	0.011	
26	0.0558	0.0333	0.0945	0.1348	0.1363	0.0630	0.0179	0.0926	0.1382	0.0699	0.0324	0.0532	0.0202	0.0212	0.0256	0.0067	0.0123	0.0212	0.0112	0.009	
27	0.0982	0.0671	0.1059	0.1380	0.1461	0.1073	0.0634	0.1041	0.1480	0.1005	0.0753	0.1001	0.0590	0.0688	0.0708	0.0573	0.0581	0.0666	0.0593	0.048	
	0.1408	0.1301	0.1580	0.1579	0.1661	0.1403	0.1294	0.1564	0.1681	0.1288	0.1112	0.1287	0.1134	0.1116	0.1319	0.1144	0.1173	0.1209	0.1232	0.116	

#### 4、Clade 1 and 2 pairwise difference

Diff	Observed	Model Freq.	obs	model
0	0	0.1	0	0.000414079
1	0	0.1	0	0.000414079
2	0	0.1	0	0.000414079
3	0	0.1	0	0.000414079
4	0	0.2	0	0.000828157
5	0	0.4	0	0.001656315
6	1	0.7	0.003558719	0.002898551
7	2	1.2	0.007117438	0.004968944
8	4	1.8	0.014234875	0.007453416
9	2	2.5	0.007117438	0.010351967
10	4	3.2	0.014234875	0.013250518
11	6	3.8	0.021352313	0.01573499
12	5	4.3	0.017793594	0.017805383
13	2	4.7	0.007117438	0.019461698
14	5	4.9	0.017793594	0.020289855
15	3	5	0.010676157	0.020703934
16	4	5.1	0.014234875	0.021118012
17	5	5.1	0.017793594	0.021118012
18	8	5	0.028469751	0.020703934
19	9	4.9	0.03202847	0.020289855
20	5	4.8	0.017793594	0.019875776
21	5	4.8	0.017793594	0.019875776
22	3	4.7	0.010676157	0.019461698
23	5	4.6	0.017793594	0.019047619
24	4	4.5	0.014234875	0.01863354
25	8	4.4	0.028469751	0.018219462
26	2	4.3	0.007117438	0.017805383
27	7	4.2	0.024911032	0.017391304
28	2	4.1	0.007117438	0.016977226
29	6	4	0.021352313	0.016563147
30	3	3.9	0.010676157	0.016149068
31	5	3.8	0.017793594	0.01573499
32	4	3.8	0.014234875	0.01573499
33	3	3.7	0.010676157	0.015320911
34	6	3.6	0.021352313	0.014906832
35	0	3.5	0	0.014492754
36	1	3.5	0.003558719	0.014492754
37	2	3.4	0.007117438	0.014078675
38	1	3.3	0.003558719	0.013664596
39	0	3.2	0	0.013250518
40	3	3.2	0.010676157	0.013250518
41	2	3.1	0.007117438	0.012836439
42	1	3	0.003558719	0.01242236
43	2	3	0.007117438	0.01242236
44	3	2.9	0.010676157	0.012008282
45	1	2.8	0.003558719	0.011594203
46	3	2.8	0.010676157	0.011594203

47	5	2.7	0.017793594	0.011180124
48	4	2.7	0.014234875	0.011180124
49	2	2.6	0.007117438	0.010766046
50	6	2.6	0.021352313	0.010766046
51	2	2.5	0.007117438	0.010351967
52	6	2.5	0.021352313	0.010351967
53	5	2.4	0.017793594	0.009937888
54	7	2.3	0.024911032	0.00952381
55	2	2.3	0.007117438	0.00952381
56	3	2.2	0.010676157	0.009109731
57	6	2.2	0.021352313	0.009109731
58	4	2.2	0.014234875	0.009109731
59	5	2.1	0.017793594	0.008695652
60	4	2.1	0.014234875	0.008695652
61	5	2	0.017793594	0.008281573
62	5	2	0.017793594	0.008281573
63	4	1.9	0.014234875	0.007867495
64	1	1.9	0.003558719	0.007867495
65	1	1.9	0.003558719	0.007867495
66	1	1.8	0.003558719	0.007453416
67	2	1.8	0.007117438	0.007453416
68	1	1.7	0.003558719	0.007039337
69	3	1.7	0.010676157	0.007039337
70	3	1.7	0.010676157	0.007039337
71	0	1.6	0	0.006625259
72	2	1.6	0.007117438	0.006625259
73	0	1.6	0	0.006625259
74	1	1.5	0.003558719	0.00621118
75	1	1.5	0.003558719	0.00621118
76	1	1.5	0.003558719	0.00621118
77	1	1.4	0.003558719	0.005797101
78	1	1.4	0.003558719	0.005797101
79	1	1.4	0.003558719	0.005797101
80	0	1.3	0	0.005383023
81	1	1.3	0.003558719	0.005383023
82	1	1.3	0.003558719	0.005383023
83	2	1.3	0.007117438	0.005383023
84	1	1.2	0.003558719	0.004968944
85	3	1.2	0.010676157	0.004968944
86	3	1.2	0.010676157	0.004968944
87	3	1.2	0.010676157	0.004968944
88	1	1.1	0.003558719	0.004554865
89	6	1.1	0.021352313	0.004554865
90	3	1.1	0.010676157	0.004554865
91	3	1.1	0.010676157	0.004554865
92	2	1	0.007117438	0.004140787
93	3	1	0.010676157	0.004140787
94	2	1	0.007117438	0.004140787
95	2	1	0.007117438	0.004140787
96	2	1	0.007117438	0.004140787

97	1	0.9	0.003558719	0.003726708
98	0	0.9	0	0.003726708
99	0	0.9	0	0.003726708
zongji	281	241.5		

Clade 1 and Clade 2

