

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告

臺灣草蜥複合種群種間雜交現象的探討：微衛星基因座的

開發與應用

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC-94-2621-B-034-002

計畫主持人：林思民

共同主持人：

計畫參與人員：王昭均，陳盈蓉，翁彩芸，趙芯妘，鍾坤燕

成果報告類型（依經費核定清單規定繳交）： 精簡報告 完整報告

本成果報告闕以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國文化大學生命科學系

中華民國九十五年十二月二十六日

臺灣草蜥複合種群種間雜交現象的探討：微衛星基因座的開發與應用

目錄：

中文部份	1
中文摘要	1
前言	2
材料與方法	6
結果與討論	7
致謝	9
參考文獻	9
計畫成果自評	11
英文部份	12
Abstract	12
Introduction	12
Materials and Methods	13
Results and Discussion	14
Acknowledgements	15
References	16
Table 1	18
Figure 1	19

臺灣草蜥複合種群種間雜交現象的探討：微衛星基因座的開發與應用

中文摘要

為了進行小尺度族群遺傳分化的研究需求，我們利用放射性同位素標定的 DNA 探針，篩選適用於台灣草蜥複合種群 (*Takydromus formosanus* species complex) 的微衛星基因座。我們以分布於台灣北部的翠斑草蜥 (*Takydromus* sp. nov. 1) 作為篩選對象，並將應用層面擴及至鹿野草蜥 (*Takydromus* sp. nov. 2) 與台灣草蜥 (*Takydromus formosanus*)。實驗過程中，我們挑出 196 枚在雜合反應中呈現強烈訊號的菌落進行定序，其中僅有 12 組基因座不含微衛星序列。扣除定序失敗與重複的部份，我們總共判別出 145 個獨立的微衛星基因座，其中含有 GATA 重複序列的基因座佔 44 個，而含有 GAAA 重複序列的基因座佔 101 個。有 42 個基因座含有超過 30 個 4-bp 的重複，23 組超過 40 個重複，9 組超過 50 個重複，而最長的重複片段則長達 62 次。許多個基因座同時存在著不同的微衛星序列，在最多樣的一組基因座中，總共可以在一段 800bp 的序列內看到 5 種不同的微衛星序列。最後我們挑出其中 16 個基因座設計引子，進行遺傳多樣性與族群分化的初步評估。在這批基因座中，對偶基因 (alleles) 的數目由 12 個到 25 個，而觀測到的異結合子 (heterozygous) 比例則由 0.686 到 0.941。數組基因座在統計上違反哈溫平衡，應該是肇因於測試族群存在著地理區域之間的遺傳分化，所導致 Wahlund effect 的結果。所有的基因座均在兩個性別中出現異結合子，顯示並沒有任何一組基因組為性連遺傳 (sex-linked)。與本實驗室以同樣流程篩選的其他脊椎動物相較，草蜥的微衛星基因座呈現以下的特性：(1) 基因座數目多；(2) 反覆片段次數長；(3) 微衛星序列種類多樣；與 (4) 對偶基因數多。

關鍵字：雜交，微衛星基因座，種化，草蜥

一、前言

生殖隔離 (reproductive isolation) 常常是種化的「原因」, 但也常常是種化的「結果」。Dobzhansky 和 Mayr 所提出的生物物種觀 (biological species concept; Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942) 以生殖隔離作為評斷分類的依據; 當時在動物學家的眼中, 種間的雜交 (hybridization) 現象是罕見的, 而雜交的後代 (hybrids) 則被視為演化過程中偶然出現的「雜訊」(Mayr, 1963)。然而, 透過野外或圈養下動物的觀察所累積的資訊, 動物學家們卻逐漸發現: 雜交的頻度與廣度, 可能遠過從前的預期; 而這些現象, 亦成為演化生物學家深感困惑且極具爭議性的問題 (Arnold, 1997; Harrison and Richard, 1993; Mallet, 2005)。因此, 近緣物種分布交會處所形成的雜交帶 (hybrid zone), 不但成為演化學中最好的天然實驗室 (Hewitt, 1988), 也成為人類一窺演化現象的窗口 (Harrison, 1990)。經過過去數年針對草蜥所進行的研究, 我們在立霧溪的沿岸發現一個這樣的交界區域。兩個同源的姊妹種草蜥以河為界, 分布在河岸的南北兩岸, 形成一個看似壁壘分明的界限。但是, 其中所蘊含演化上或生態上的現象, 卻引發我們高度的好奇。本研究計畫擬透過分子遺傳工具, 針對這兩個姊妹種進行包含雜交現象、雜交帶等等演化生物學方面的研究。

1. 研究物種與背景簡介

分布在東亞地區的草蜥屬 (*Takydromus*) 在分類上屬於爬蟲類中的有鱗目 (Squamata) 正蜥科 (Lacertidae)。全世界大多數正蜥科的屬種均分布在地中海周邊的南歐、北非與西亞地區, 只有草蜥屬全屬, 以及麻蜥屬 (*Eremias* spp.) 中極為少數的物種分布在東亞地區。因此這個東亞特有的屬無論在分布上與外型上, 都在正蜥科之中獨樹一幟 (Arnold, 1989; 1997)。大部分的草蜥喜歡棲息在以禾本科為主的草生地環境, 而且並不擅於進行長距離的播遷。根據我們過去針對數種草蜥所進行的族群遺傳研究, 顯示牠們很容易受到地形的阻隔, 而產生遺傳上或外型上的分化 (Lin, 2003)。

草蜥屬在亞洲地區的分布情形相當特殊, 是一個島嶼生物地理學上有趣的研究課

題。在全世界 16 或 17 種草蜥之中，有 9 種出現在島嶼地區，並有 8 種為島嶼特有種 (Arnold, 1997; Chou *et al.*, 2001)。這種分布現象引發兩棲爬行動物學者與生物地理學家的好奇，包括英國、日本、抑或是臺灣的研究人員，均曾先後針對本屬蜥蜴在島嶼之間的演化現象提出探討 (Arnold, 1997; Lin *et al.*, 2002; Ota *et al.*, 2002)。其中，臺灣因為同時擁有 5 種草蜥(包含 4 個特有種)，而成為全世界本屬多樣性最豐富的地區。本人在博士班就學期間，曾針對東亞島嶼地區草蜥的生物地理與親緣關係進行研究，發現其在島嶼地區多樣性的形成，與地質事件和冰河反覆的入侵有密切的關係 (Lin *et al.*, 2002)。根據這些研究結果，我們現在已經可以充分掌握本島每一個特有種蜥蜴的基礎演化生物學知識，包括牠們的分布區域，牠們與姊妹種之間各自的分歧年代，每一種在島內的族群遺傳結構與親緣地理學，而且其中多筆遺傳上的分歧年代均可與特定的地質事件相結合。這些前期的研究工作，成為我們在從事更深入的探討時重要的背景知識 (Lin, 2003)。

在臺灣的四個特有種之中，臺灣草蜥(*Takydromus formosanus*)是其中分布最廣、數量最多的一種，全島低海拔地區，從平地到森林邊緣，均可發現它的蹤跡 (呂等，1999)。最近，藉由研究全臺灣各地臺灣草蜥的粒線體 DNA 序列，發現本島草蜥屬的生物多樣性較先前的預期更高 (Lin, 2003)。外觀上相近的同一個物種，其實包含了三個在分布上、遺傳上各不相同的演化顯著單元 (evolutionarily significant units)。這三個區域性的單系群 (monophyly) 各自得到高度的統計支持，而且群與群之間的遺傳距離高達 8%至 10%之間，甚至已經大過某些其他草蜥「種間」的遺傳差異 (例如：蓬萊草蜥，宮古草蜥，與北草蜥之間的同一段基因差異)。真正臺灣草蜥的模式標本產地在臺灣西部，無論在外觀上或體型上，均可與北部群或東部群明顯區別；而在遺傳上，亦與後兩者呈現並系群 (paraphyly) 的關係。由於各自得到高度的單系支持，又具有可區辨 (diagnostic) 的特徵，若依照親緣物種觀 (phylogenetic species concept) 來界定這幾個分類單位，北部群與東部群在未來有提升為新種的必要。這兩個新種 (學名暫定為： *Takydromus chrysopunctatus* sp. nov.與 *Takydromus luyeiensis* sp. nov.) 目前

的分布大致以中央山脈的北段為界線，兩者性成熟的雄蜥在體色與第二性徵上有所差異，但是幼蜥與雌蜥不易區分。此三個演化單元在加入高海拔特有的雪山草蜥 (*T. hsuehshanensis*) 與中國東北的白條草蜥 (*T. wolteri*) 之後，共同形成一個統計上高度支持的單系群。我們暫時將其界定為一個「複合種群 (species complex)」。研究顯示這群蜥的種化過程大部分均發生在臺灣島內，而且與第三紀末期的造山運動有密切的關連性。由於脊椎動物在陸地上的移動能力並不算差，因此臺灣特有的脊椎動物通常來自於海洋隔離造成的種化。這類在「島內」發生種化的過程，在臺灣的陸域脊椎動物之中，屬於極為罕見的案例 (Lin, 2003)。

2. 問題發掘與實驗構想

在研究進行之初，我們一度認為北部與東部兩群蜥的交界帶大致位於中央山脈北段的清水斷崖附近。由於兩種蜥在演化上互為姊妹群，而粒線體基因組序列差異約為 8%，因此經過詳細地計算分子時鐘，並比對近緣物種的演化速率，我們推論這兩種蜥的遺傳分化介於 3.4 到 5.0 百萬年之間，正好與中央山脈隆起的年代相吻合。由此推論，這兩種蜥的種化過程極可能與中央山脈隆升造成的地形阻隔有密切的關連。但是透過近期更仔細的調查，進一步發現立霧溪的北岸為北部種 (*T. chrysopunctatus*) 分布的南限，而立霧溪的南岸則為東部種 (*T. luyeiensis*) 的北限。兩群蜥的交界地區，大約就位在此溪兩岸南北橫幅五公里、東西五公里之內的區域。河灘地本身即為草蜥喜歡居住的棲地環境，草蜥雖然並不直接在水域中活動，但是卻具有天生的泅水能力。同時，立霧溪與許多東部的河川一樣，水源、水道會隨著季節產生劇烈的變動，亦提供了蜥跨河播遷的機會。然而，根據粒線體 DNA 定序所呈現的研究結果，卻顯示這條河有效地阻隔了兩個物種之間的遺傳交流。這樣的分布現象，使我們對此兩種草蜥之間的演化與生態現象產生高度的興趣。

在演化學家的眼中，姊妹種所形成的交界帶，是一個珍貴的天然演化實驗室 (Butlin, 1998; Grant and Grant, 1998; Hewitt, 1988)。在過去的實驗之中，我們遭遇的主要問題是：粒線體基因組為母系遺傳，因此並沒有能力偵測鑑別父系方面的遺傳交流狀況。

從粒線體上看不到遺傳交流，並不表示遺傳交流真的不存在。如前所述，這兩種蜥蜴的雌蜥外觀極為相似，但是雄蜥卻會呈現不同顏色的婚姻色斑點。由於我們在立霧溪的南北兩岸持續觀察到顏色介於中間型的雄蜥，因此我們懷疑這兩群蜥蜴極可能有潛在的、或是雄性攜帶的遺傳交流。我們的疑問包括：兩種蜥蜴在交界帶是否能形成雜交後代？而不管答案是肯定或是否定，均會引發出更多的後續問題：如果有雜交，此雜交的歷史已經持續多久？是來自天然因素，或者是否可能來自於人為因素（例如蘇花公路開通）導致的結果？雜交的比例有多少？而遺傳物質向對方滲入（introgression）的距離有多遠？這個滲入是雙向的還是單向的？雜交的後代在演化上具有優勢或是劣勢？交界帶的範圍是否逐漸拉大，或侷限在河岸的某一側？

相反地，如果天然雜交的後代在交界帶不存在，那麼未來的研究方向，勢必將導至行為、性擇與生殖隔離等方面。兩種蜥蜴是用什麼樣的機制確保其擇偶過程的正確性？是配子前的生殖隔離（prezygotic isolation），或是配子後的生殖隔離（postzygotic isolation）？是否有更多我們未知的性擇（sexual selection）因素，或是再加強（reinforcement）因素介入，協助維持這兩個物種在遺傳上的獨立性？

國際上以此類天然雜交帶為研究題材最經典的案例，發生在法國與西班牙的交界處。庇里牛斯山不但成為人文與政治上的地理屏障，亦成為生物在遺傳上與遷移上的天然屏壁。山脈南北兩側的兩群蚱蜢在冰河時期因為氣候造成隔絕，但在冰河時期結束之後，再度在山脈的頂端相交，形成一條帶狀的交界區域。以 Hewitt 為首的英國研究團隊多年來致力於庇里牛斯山兩側的蚱蜢，成果斐然（Butlin, 1998; Butlin and Hewitt, 1985; Cooper *et al.*, 1995; Hewitt, 1996）。另一個關於雜交研究的經典案例則發生在加拉巴戈群島，當地芬雀會在某些年份進行頻繁的雜交動作，而且雜交後代的存活率會與氣候條件或選汰壓力形成密切的相關（Grant and Grant, 1998）。但是整體而言，雖然非特定性的雜交現象在自然界受到越來越多的記錄，但是像立霧溪這種「固定區域」的天然雜交帶，在自然界其實並不常見。也因此，國內鮮少有相關的研究進行；而即使在國際上，相關的案例亦並不多見。與國外知名的研究樣區相對照，由於臺灣東部地區的棲地幅員

更小，造成此一交界帶的變化梯度可能更加銳利，而選汰的作用亦將更加單純而鮮明。這兩種蜥蜴在交界帶的生殖生態與行為生態，均有機會成為本土一個相當經典的演化生物學研究題材。

因此，本計畫擬利用以微衛星基因座（microsatellite loci）為主的分子遺傳工具，探討這兩個物種在交界帶的分布、歷史、族群遺傳，以及種間雜交等演化生物學現象。首先將針對兩個新種草蜥，開發並測試具有種鑑別力（species specific）的微衛星基因座。其次，則將利用交界帶採集的標本，探討自然環境下種間雜交程度與歷史。這些研究將有助於了解爬行動物的種間界限（species boundary）與種化過程（speciation），並可作為後續關於天擇、性擇、與保育遺傳學等實驗設計的基礎，以供更加深入探討這兩個姊妹物種在交界地區的演化機制。

二、材料與方法

由於微衛星基因座大多具有物種專一性，但是蜥蜴科本身曾經進行的微衛星研究卻極為有限，因此本研究首先必須自行篩選適用於草蜥的微衛星基因座。實驗以 Li *et al.* (1997) 與 Hamilton *et al.* (1999) 所發展的技术作為分離微衛星體基因座的基礎。首先自翠斑草蜥（暫時定名為 *Takydromus viridipunctatus* sp. nov.）的尾部採取肌肉組織，利用標準的 phenol / chloroform 進行 DNA 的萃取。挑選品質良好的 DNA 樣本，以限制酶將粗抽的 DNA 切割成細小的片段。在溶液中加入接合酶（ligase）與連接子（linker），使 DNA 片段與連接子進行接合反應。其後以接合子作為引子進行 PCR 反應，以增加溶液中的 DNA 的濃度。為了從擴增的基因庫中分離出含微衛星體的 DNA 片段，先在擴增的溶液中添加帶有 biotin 標記的兩組微衛星體核酸探針（GAAA₁₀ 與 GATA₁₀），利用互補 DNA 序列之間的黏合特性，使 biotin 標記的探針黏合上基因庫內的微衛星體基因座。並藉由 biotin-streptavidin 的抗體辨識能力，以標記有 streptavidin 的磁珠（Dynabeads M-280 Streptavidin）吸附含有 biotin 標記的微衛星體 DNA，並溶解在緩

衝溶液中。此為實驗流程中的第一次篩選。

以步驟二的反應條件以及連接子為引子，對吸附下來的 DNA 片段再進行一次 PCR 反應，以增加基因庫中含微衛星體片段的 DNA 濃度。將上述 PCR 產物以 TA cloning 的方法載入質體，並轉殖入大腸菌中（Promega pGEM-T Vector System），經藍白呈色（color selection）後，挑選內含質體的菌落。將內含質體的菌落轉漬至雜和反應的尼龍膜（Nylon membrane）上，以 ^{32}P 標記的微衛星體探針篩檢含有微衛星體的菌落。此為實驗流程中的第二次篩選。挑選質體內載有微衛星體片段的大腸菌，以 DNA 自動定序儀判讀載入的微衛星體基因座序列。在微衛星體基因座的上下游的已知序列設計引子，用以增幅特定的微衛星片段。

三、結果與討論

藍白成色之後，我們挑出大約 800 個內含質體的白色菌落，進行放射性同位素的雜合。呈現明顯訊號的菌落大約有 300 個，其中 196 個菌落被挑出並定序。在這 196 個定序的菌落中，只有 12 組基因座不含微衛星序列。扣除定序失敗與重複的基因座之後，我們判別出 145 個獨立的微衛星基因座。其中含有 GATA 重複序列的基因座佔 44 個，而含有 GAAA 重複序列的基因座佔 101 個。

與本實驗室以同樣流程篩選的其他脊椎動物相較，草蜥的微衛星基因座呈現以下幾項特性：(1) 基因座數目眾多；(2) 反覆片段次數長；(3) 微衛星基因序列多樣；(4) allele 數目多。首先，在相同條件篩選的流程之下，草蜥的 145 個微衛星基因座高居所有物種之冠，而且是其他物種的數倍之多。在這些微衛星基因座中，有 42 個基因座超過 30 個重複，23 組超過 40 個重複，9 組超過 50 個重複次數，而最長的片段長達 62 個 4-bp 的重複，光重複區域的總長度就長達 248 個鹼基對。許多個微衛星基因座可以同時找到數個並存的微衛星序列，最豐富的一組基因座中，總共可以找到 5 種不同的微衛星反覆序列，集中在一段 700bp 以內的序列中。

我們在 145 組基因座中挑出 20 個基因座，利用周圍序列設計 PCR 引子，進行同物種（翠斑草蜥）與跨物種（鹿野草蜥，學名暫定為 *T. luyeanus* sp. nov.）的 PCR 增幅測試。其後再挑出 12 組合成螢光引子，進行種內遺傳多樣性的評估。此 12 組引子的試驗結果如表一（Table 1）。

在這批完成測試的 12 組基因座中，每一組均呈現相當高度的多樣性。從 51 隻完成所有基因座測試的翠斑草蜥個體來看，allele 的數目由最少的 12 個到最多的 25 個，而觀測到的異結合子（heterozygous）比例則由 0.686 到 0.941。其中二組基因座在統計上違反哈溫平衡，應該是肇因於測試族群存在著地理區域之間的遺傳分化，所導致 Wahlund effect 的結果。所有的基因座均在兩個性別中出現異結合子，因此並沒有任何一組基因組為性連遺傳（sex-linked）。

為了瞭解這批微衛星基因座在物種與雜交問題上的鑑定能力，我們在本年度的先期測試中總共使用了 163 隻翠斑草蜥與 95 隻鹿野草蜥。目前已完成微衛星基因型定型（genotyping）的總共有六組基因座，圖一（Fig. 1）使用 Structure 程式，展現其中這些基因座針對兩物種的鑑別能力。本結果顯示在僅使用半數基因座的情形下，兩物種之間已經具備尚稱穩定的鑑別趨勢。所有純系的鹿野草蜥在圖中呈現綠色的區塊，而純系的翠斑草蜥則應該呈現紅色。鹿野草蜥並未出現鑑別錯誤的問題，但是大約 8% 的翠斑草蜥出現了類似鹿野草蜥的遺傳特質。由於粒線體 DNA 序列顯示這兩群蜥蜴已經歷經相當長期的遺傳分化，因此這個現象似乎既非導因於基因交流，亦非來自祖先多型性，而只是單純導因於基因座數目不夠所導致。因此，在明年度的計畫中，我們擬針對現存問題繼續進行遺傳標記的定型與改進，預期在 12 組基因座全部納入分析之後，將可提供更可靠的鑑別能力。

四、致謝

感謝林美珠小姐在實驗期間給予技術上的協助與支援，並感王昭均、謝陳盈蓉同學在研究上的多方協助。本計畫由國科會支柱，計畫編號為：NSC-94-2621-B-034-002。

五、參考文獻

- Arnold, E. N. 1989. Towards a phylogeny and biogeography of the Lacertidae: relationships within an Old-World family of lizards derived from morphology. *Bull. Br. Mus. nat Hist (Zool.)* 55: 209-257.
- Arnold, E. N. 1997. Interrelationships and evolution of the east Asian grass lizards, *Takydromus* (Squamata: Lacertidae). *Zool. J. Linnean Soc.* 119: 267-296.
- Arnold, M. L. 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Inc., New York.
- Butlin, R. K. 1998. What do hybrid zones in general, and the *Chorthippus parallelus* zone in particular, tell us about speciation? Pages 367-378 in D. J. Howard and S. H. Berlocher (editors). *Endless forms - species and speciation*. Oxford University Press, Inc. New York.
- Butlin, R. K., and G. M. Hewitt. 1985. A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): behavioural characters. *Biol. J. Linnean Soc.* 26: 287-299.
- Chou, W.-H., N. Q. Truong, and O. Pauwels. 2001. A new species of *Takydromus* (Reptilia: Lacertidae) from Vietnam. *Herpetologica* 57: 497-508.
- Cooper, S. J. B., K. M. Ibrahim, and G. M. Hewitt. 1995. Post-glacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus brunneus*. *Mol. Ecol.* 4: 49-60.
- Dobzhansky, T. 1937. *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Grant, B. R., and P. R. Grant. 1998. Hybridization and speciation in Darwin's finches: the role of sexual imprinting on a culturally transmitted trait. Pages 404-424 in D. J. Harrison, R. G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys Evol. Biol.* 7: 69-128.
- Harrison, R. G., and G. Richard. 1993. Hybrids and hybrid zones: historical perspective. In "Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, Oxford, pp 3-12.
- Hamilton, M. B., E. L. Pincus, A. Di-Fiore, and R. C. Fleischer. 1999. Universal linker

- and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* 27: 500-507.
- Hewitt, G. M. 1988. Hybrid zones - natural laboratories for evolutionary studies. *Trends Ecol. Evol.* 3: 158-167.
- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linnean Soc.* 58: 247-276.
- Li, S.-H., Y.-J. Huang, and J. L. Brown. 1997. Isolation of tetranucleotide microsatellites from the Mexican jay *Aphelocoma ultramarina*. *Mol. Ecol.* 6: 499-501.
- Lin, S.-M., C. A. Chen, and K.-Y. Lue. 2002. Molecular phylogeny and biogeography of the grass lizards genus *Takydromus* (Reptilia: Lacertidae) of East Asia. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22: 276-288.
- Lin, S.-M. 2003. Phylogeny and phylogenetic studies of *Takydromus* in Taiwan and adjacent regions (Squamata: Lacertidae). Ph. D. dissertation, National Taiwan Normal University, Taipei.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trend. Ecol. Evol.* 20(5): 229-237.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press.
- Ota, H., M. Honda, S.-L. Chen, T. Hikida, S. Panha, H.-S. Oh, and M. Matsui. 2002. Phylogenetic relationships, taxonomy, character evolution and biogeography of the lacertid lizards of the genus *Takydromus* (Reptilia: Squamata): a molecular perspective. *Biol. J. Linnean Soc.* 76: 493-509.
- 呂光洋，杜銘章，向高世。過渡的世界：臺灣兩棲爬行動物圖鑑。大自然出版社，台北市。

六、計畫成果自評：

本計畫自 2005 年 10 月開始執行，並已於 2006 年 9 月執行完成。本年度預定工作目標主要為篩選共同適用於翠斑草蜥與鹿野草蜥的微衛星引子，並在樣本上進行測試。實驗部份進行極為順利，我們成功地從翠斑草蜥身上篩選出預計使用的微衛星引子，而且得到的數量遠超過原本預期。在物種的實際測試方面，證明這些引子在兩物種之間均可通用，並呈現高度的多樣性。至於物種之間的比較，初步結果亦顯示這批引子具有適度的鑑別效力，在未來一年的延續計畫當中，將實際應用於兩種草蜥雜交地帶的物種鑑別。在篩選引子的部份，本論文已經撰寫成英文稿件，並發表於 *Molecular Ecology Notes*。

Isolation and characterization of twelve tetra-repeated microsatellite loci from the Formosan grass lizard (*Takydromus formosanus*)

Abstract

Twelve tetra-repeated microsatellite loci were developed for the island-endemic grass lizard *Takydromus formosanus* (Squamata: Lacertidae). We characterized these loci by genotyping 51 individuals sampled from six localities. The number of alleles per locus ranged between 12 – 23, while the observed heterozygosity ranged between 0.686 – 0.941. None of these loci showed gametic disequilibrium or sex linkage. With such highly polymorphism, we believe that these loci should be suitable for fine-scaled analysis of population structure, hybridizations, or individual identification of grass lizards.

Keywords: hybridization, microsatellites, speciation, *Takydromus*

Introduction

The East Asian grass lizards (Lacertidae: *Takydromus* spp.) are characterized by their slender body shapes and extraordinarily long tails. They are distributed in the Oriental and Palearctic regions with a total of 16 – 17 species (Arnold 1997). With 5 species including 4 endemics on a single island (Arnold 1997, Lue *et al.* 1999), Taiwan shows the highest diversity of *Takydromus* among the regions of their distribution. In recent times, two more cryptic species were identified from *T. formosanus* on this island through mitochondrial DNA sequences (Lin 2003) and morphological analysis (Lin, unpublished data). However, with parapatric distribution and occasionally intermediate morphotypes found at the contact zone, this species complex might serve as an ideal system to study the evolutionary consequence of

natural hybridization between sister species. To detect the existence of probable hybrids, a set of highly polymorphic markers are needed. In this study, we constructed a microsatellite-enriched partial genomic library for the Formosan grass lizard (*Takydromus formosanus*) following the protocol proposed by Hsu *et al.* (2003). Twelve tetra-repeated microsatellite loci were isolated and tested in this study.

Materials and Methods

Genomic DNA was extracted from muscle tissue of an adult male grass lizard using a modified LiCl method (Gemmell & Akiyama 1996). About 0.6 µg of genomic DNA was digested with three restriction enzymes, *HaeIII*, *RsaI* and *AluI* (BioLabs® Inc.), in a volume of 50 µl. Digested DNA fragments were ligated with SNX linkers (Hamilton *et al.* 1999) to provide priming sites for the subsequent polymerase chain reaction (PCR). The PCR was set up in a volume of 50 µl containing 1 µM SNX linker (forward), 0.5 mM dNTP, 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH9.0; 50 mM KCl, 0.01% (w/v) gelatin, and 0.1% Triton X-100), 3.5 mM MgCl₂, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences), and 7 µl linker-ligated fragments. The condition of PCR process was set at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 70 °C for 2 min, and followed by 70 °C for 5 min using iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad). Solid-phase hybridizations were conducted with 3'-biotin-labelled (GATA)₁₀ or (GAAA)₁₀ oligonucleotides to preferentially select amplified DNA fragments containing microsatellites. We captured these fragments by Dynabead M280 streptavidin (DynaL®) according to the manufacturer's instruction. These microsatellite-enriched DNA fragments were PCR-amplified again and then ligated into pGEM®-T Easy vectors (Promega) and transformed into JM109 competent cells. Transformed cells grew at 37 °C for 16 h on LB agar plate containing ampicillin, X-gal and IPTG for blue/white selection. A total of 1200 white colonies were lifted to Hybond-N+ membranes (Amersham Pharmacia Biotech) and hybridized with [³²P]

ATP 5' end-labelled oligonucleotides of motif (GATA)₁₀ or (GAAA)₁₀. We identified 190 positive clones and determined their sequences using a DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE on MegaBACE 1000 autosequencer (Amersham Bioscience). Sequences were determined in both directions and proofread by using SEQUENCHER software version 4.0.5 (Gene Codes Corporation). Among these clones, 164 contained microsatellite sequences. Excluding repetitive clones, we obtained 145 different microsatellite loci. Primers were designed from 20 of these clones with the aid of program FASTPCR 2.3.10 (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/oligos.htm).

PCR products were successfully obtained of expected sizes from all 20 loci. Twelve among them were chosen and the reverse primers of these loci were labeled with HEX, FAM or TAMRA fluorescent dyes. PCR were conducted in a 15 µl reaction volume containing about 50 ng genomic DNA, 0.2 µM each primer, 0.625 mM dNTP, 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH9.0; 50 mM KCl, 0.01% (w/V) gelatin, and 0.1% Triton X-100), 0.4 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences) and 1.5 mM MgCl₂ (Table 1). The PCR condition was set to denaturation at 94 °C for 3 min, then 30 cycles of 94 °C for 30 sec, 58 °C for 30 sec, and 72 °C for 30 sec, followed by a final extension at 72 °C for 3 min. All fragments of the 12 loci could be successfully obtained from the same protocol. The PCR products were electrophoresed in MegaBACE 1000 autosequencer (Amersham Biosciences) using ET-400 (Amersham Biosciences) as size standards. Sizing of alleles was analyzed with the software GENETIC PROFILER 2.0 (Amersham Biosciences). In this study, 51 individuals from 6 sample locations were included for characterization of these loci.

Results and Discussion

We calculated the observed and expected heterozygosities using the software CERVUS version 2.0 (Marshall *et al.* 1998) and represented the results in Table 1.

The conformance to Hardy-Weinberg expectations of each locus was calculated using GENEPOP version 3.4 (Raymond & Rousset 1995). The mean number of alleles per locus was 17.67 (from 12 to 23), while the mean observed heterozygosity was 0.871 (from 0.684 to 0.941). Two loci (TF148 and TF163) represented significant differences between observed and expected heterozygosity, which is probably due to the Wahlund effect (Wahlund 1928) because samples from several geographically isolated populations were put together in this analysis. We calculated gametic disequilibrium using GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995). When corrected for multiple comparisons using Bonferroni method, no pairwise comparison between loci showed significant gametic disequilibrium. Heterozygotes were discovered in both genders for all these 12 loci, showing that no locus is sex-linked.

Microsatellite loci have been reported in several lacertid lizards, including *Lacerta vivipara* (Boudjemadi *et al.* 1999), *L. viridis* (Böhme *et al.* 2005), *Podarcis muralis* (Boudjemadi *et al.* 1999, Nembrini & Oppliger 2003), *P. bocagei* (Pinho *et al.* 2004), and *Gallotia galloti* (Richard & Thorpe 2000). However, it is the first time to isolate these polymorphic markers from the East Asian endemic genus, *Takydromus*. Furthermore, none of the 12 loci developed in this paper showed sequence similarity to those reported in the other lacertid lizards. With such high level of polymorphism, these microsatellite loci should be suitable for fine-scaled studies of population structure, hybridizations, and individual identification for the *Takydromus* lizards.

Acknowledgements

We thank the assistance from Miss M.-C. Lin for her great helps in laboratory works. This study was based on the funding gave to Si-Min Lin from the National Science Council, Taiwan, ROC (NSC-94-2621-B-034-002).

References

- Arnold EN (1997) Interrelationships and evolution of the east Asian grass lizards, *Takydromus* (Squamata: Lacertidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **119**, 267-296.
- Boudjemadi K, Martin O, Simon JC, Estoup A (1999) Development and cross-species comparison of microsatellite markers in two lizard species, *Lacerta vivipara* and *Podarcis muralis*. *Molecular Ecology*, **8**, 518-520.
- Böhme MU, Berendonk TU, Schlegel M (2005) Isolation of new microsatellite loci from the Green Lizard (*Lacerta viridis viridis*). *Molecular Ecology Notes*, **5**, 45-47.
- Gemmell NJ, Akiyama S (1996) An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics*, **12**, 338-339.
- Hamilton MB, Pincus EL, DiFiore A, Fleischer RC (1999) Universal linker and ligation procedures for microsatellites. *BioTechniques*, **27**, 500-507.
- Hsu YC, Severinghaus LL, Lin YS, Li SH (2003) Isolation and characterization of microsatellite DNA markers from the Lanyu scops owl (*Otus elegans botelensis*). *Molecular Ecology Notes*, **3**, 595-597.
- Lin SM (2003) Phylogeny and phylogeographic studies of *Takydromus* in Taiwan and adjacent regions (Squamata: Lacertidae). Ph. D. Dissertation, Department of Biology, National Taiwan Normal University.
- Lue KY, Tu MC, Shang G (1999) A field guide to the amphibians and reptiles of Taiwan. SWAN Pub. Co., Taipei, Taiwan.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7**, 639-655.
- Nembrini M, Oppliger A (2003) Characterization of microsatellite loci in the wall lizard *Podarcis muralis* (Sauria: Lacertidae). *Molecular Ecology Notes*, **3**, 123-124.

- Pinho C, Sequeira F, Godinho R, Harris DJ, Ferrand N (2004) Isolation and characterization of nine microsatellite loci in *Podarcis bocagei* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 286-288.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Richard M, Thorpe RS (2000) Highly polymorphic microsatellites in the lacertid *Gallotia galloti* from the western Canary Islands. *Molecular Ecology*, 9, 1919-1920.
- Wahlund S (1928) Zusammensetzung von populaionen und korrelation-serscheinungen von standpunkt der verebungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, **11**, 65-106.

Table 1: Characterization of the 12 microsatellite loci of *Takydromus formosanus* with a sample size of 51.

Locus	Repeat Motif	Primer sequences(5'-3')	Range of allele sizes (bp)	$T_a(^{\circ}\text{C})$	No. of allele	H_o	H_E	P values (HWE)	GenBank Accession no.
TF013	(GATA) ₂₁	F: ATTCCGTGGCACTTGGCAGG R: TGGCTCATAGTATTGGCTTGC	178-230	58°C	13	0.902	0.878	0.380	DQ012386
TF046	(GATA) ₂₂	F: ACAGAAGAACTTGGGTCTCCAG R: GCTCTCCAGCCAGGTGTCAC	211-363	58°C	25	0.882	0.945	0.249	DQ012388
TF064	(GAAA) ₁₄ AAAA(GAAA) ₅	F: CGACTCATCTCCCGTGCCAG R: ATTTCTCAAGGTGACATTGG	230-290	58°C	16	0.902	0.911	0.392	DQ012390
TF092	(GAAA) ₁₁ GATA(GAAA) ₂	F: AAACAACATTCCGCTATCG R: TATTATGTCAAGTGCCATGC	183-259	58°C	20	0.863	0.929	0.348	DQ012392
TF098	(GAAA) ₁₈	F: ATCTAAATGGTCCACTGATC R: ACTGAAGGGATGGCAATGAG	209-261	58°C	12	0.941	0.887	0.929	DQ012394
TF100	(GAAA) ₂₃	F: GTTCCCTGGGGCTACCACAG R: AATGGATAACTGGCTTCCTG	202-298	58°C	18	0.863	0.916	0.171	DQ012395
TF121	(GAAA) ₂₁	F: TCCACAAATCAGGGCACTGC R: AACTCAAAATCCATCACAG	174-238	58°C	15	0.922	0.891	0.494	DQ012397
TF130	(GAAA) ₂₄	F: AAGAAGTGTcGGCTCTGTC R: TGTCTGAAATCAGTGGCAAC	166-262	58°C	19	0.922	0.907	0.902	DQ012398
TF148	(GAAA) ₁₉	F: GGTCTACCAGGACTCCTTCC R: TGCATGTGTGAACTGTGAGC	155-217	58°C	18	0.843	0.913	0.002*	DQ012401
TF159	(GAAA) ₂₇	F: CCTGTTAGATTCTGCCATTC R: TGCCATACAAATCCCACACC	224-324	58°C	23	0.922	0.931	0.292	DQ012403
TF163	(GAAA) ₁₄	F: TGGAACACTGGCAAAGGAG R: TTCTCTCATTCGGGGGTATC	222-282	58°C	16	0.686	0.917	0.000*	DQ012404
TF167	(GAAA) ₁₅	F: GTGACCTCGTCCATGTGTGCG R: CAAAGTCTATCGCAGCACTG	261-323	58°C	17	0.804	0.899	0.111	DQ012405

Abbreviations: T_a : annealing temperature; H_o : observed heterozygosity; H_E : expected heterozygosity; and HWE: Hardy-Weinberg equilibrium.

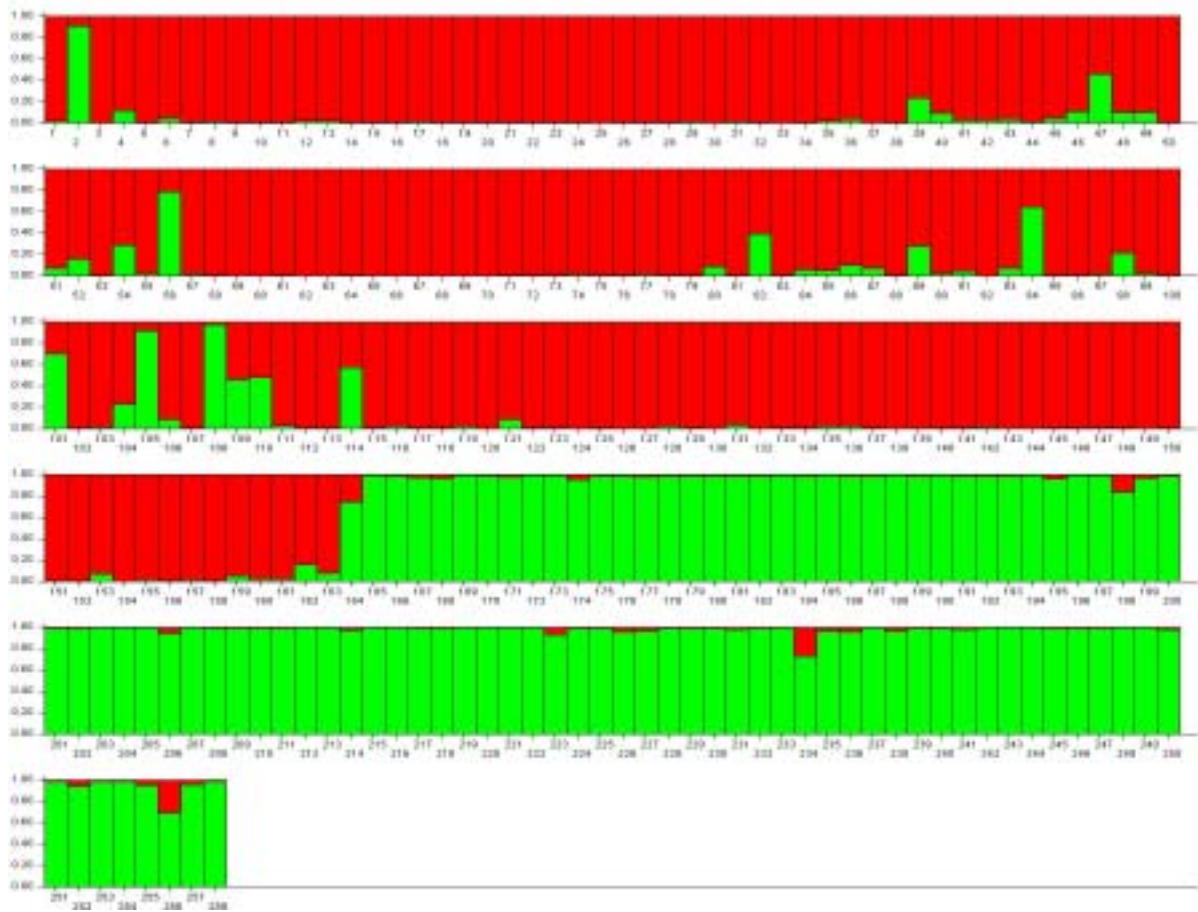


Figure 1: 利用 Structure 軟體，使用 6 組微衛星基因座進行翠斑草蜥 (*Takydromus viridipunctatus*) 與鹿野草蜥 (*T. luyeanus*) 的遺傳分群。其中紅色區塊代表翠斑草蜥，綠色區塊代表鹿野草蜥。