

行政院農業委員會林務局111年度林業發展計畫 執行成果報告

計畫名稱： 大紫蛺蝶遺傳多樣性與不同亞種間之關係
(第1年/全程2年)

(英文名稱) **Genetic variation and phylogenetic relationships
among the subspecies of *Sasakia charonda*
(Nymphalidae: Apaturinae)**

計畫編號： 111林發-09.3-保-21

全程計畫期間： 自 111年3月1日 至 112年12月31日

本年計畫期間： 自 111年3月1日 至 111年12月31日

計畫聯絡人： 吳立偉

執行機關： 東海大學

摘要

大紫蛺蝶 (*Sasakia charonda*) 為廣泛分布於中南半島北部、中國華南、華東至東北、朝鮮半島、日本與臺灣的大型蛺蝶。依據最近的分類系統，此物種共分為四個亞種，但在外型上則缺乏明顯的鑑別特徵，無法有效判斷商業販賣的大紫蛺蝶標本內是否有來自臺灣的個體。目前大紫蛺蝶各亞種，除日本族群之外，所有族群都受到昆蟲標本貿易與棲地破壞的威脅。其中臺灣亞種 *ssp. formosana* 過去因棲地破壞嚴重，再加上商業採集壓力極大，分布範圍已大幅縮減，因此早期即被野生動物保育法視為瀕臨絕滅保育類野生動物。然而，臺灣的大紫蛺蝶雖然已被視為保育類多年，但其基礎研究仍然十分缺乏，因此不利於其保育行動之推展。為了釐清大紫蛺蝶的亞種關係與遺傳多樣性，本研究從國內各典藏機構取得 32 隻樣本，利用次世代基因淺層定序方法，進行譜系關係及基礎遺傳資料之建立。結果發現臺灣的大紫蛺蝶應為獨立的特有亞種，約略在 100 萬年前與其它三亞種分離，而這三亞種雖在體型與體色上略有差別，但其基因型則混合為一群。臺灣的族群則於 12 萬年前開始分化，比較採自 1981-2000 年 (8 基因型；N=10) 與 2001-2020 年 (3 基因型；N=5) 年間的臺灣大紫蛺蝶樣本時，其遺傳多樣性呈現近期基因型多樣性較低，意謂著有族群衰退之趨勢。然而近年的大紫蛺蝶樣本不易取得，因此可能影響遺傳多樣性之評估，未來我們將嘗試取得更多近代的大紫蛺蝶樣本，以釐清是否真有遺傳多樣性衰退之現象。

關鍵字：高通量定序、粒線體總基因體組定序法、特有性、臺灣物種起源

Abstract

The Great Purple Emperor (*Sasakia charonda*) is a large butterfly widely distributed in northern Indochina, South, East to Northeast China, the Korean Peninsula, Japan, and Taiwan. According to the current classification, this butterfly is divided into four subspecies. However, no obvious identification characters are found on the morphologies, and it is hard to trace the origin of the commercial specimens if they might be illegally collected from Taiwan. At present, all the subspecies populations are threatened by the insect trade and habitat destruction, except for the Japanese population. The Taiwan subspecies, ssp. *formosana*, has experienced a significant reduction due to habitat loss and intensely commercial collecting. Now this butterfly has been a protected species under Category I (endangered species) for over 30 years, but the protect actions for this butterfly are still poor. In order to obtain more information for making conservation strategies on this species, our goals in this project are 1) to clarify the subspecies relationships among four subspecies, and 2) to provide general genetic information on Taiwan population. In this study, total 32 specimens were obtained from museum collections and NGS genome skimming was used to obtain mitogenomic sequences for further analysis. The results showed that the Great Purple Emperor in Taiwan is a unique subspecies, distinctly separated from the other three ones around one million years ago. Moreover, the other three subspecies are mixed into one clade and could not be further divided. Our results also show that Taiwan population began to differentiate about 120,000 years ago, and compared to historical collection from 1981-2000 (8 genotypes; N=10) and 2001-2020 (3 genotypes; N=5), the genetic diversity seems to be lower recently. We make a caution with the current result because more samples are needed to clarify this genetic reduction.

一、前言

前人研究

大紫蛺蝶 (*Sasakia charonda*) 為大型、美麗的蝶種，經行政院農業委員會公告屬於瀕臨絕種野生物種等級 I 之物種。此種種內共分四個亞種 (Masui et al., 2011)，主要分布於日本 (spp. *charonda*)；朝鮮半島、大陸東部及東北部 (spp. *coreana*)；臺灣 (spp. *formosana*) 及越南、雲南、緬甸 (spp. *yunnanensis*) 等地。本種過去受到收藏家的喜愛，因此過去承受極大的採集壓力。此外，在臺灣的大紫蛺蝶族群，其分布於中、低海拔山區，現今低海拔區域已受到人為開發破壞，已大幅縮減，諸如過去曾經分布台北市及新北市郊區族群(山中，1975)，今日已不覆見，僅局限於臺灣中北部山區 (徐堉峰，2018)，近年仍有大紫蛺蝶的蹤影，但出現地點大多位於北部橫貫公路一帶。對於該物種保護及族群資訊評估，應立即著手並加強相關調查研究。

國內臺灣大紫蛺蝶的研究十分缺乏，過去僅有日人山中 (1975) 將過去蝴蝶分布進行整理外。距今最近較全面的研究為李惠永 (1999) 針對此種的出沒時間、分布地點、幼成蟲形態以及所面臨之保育問題進行基礎資料收集與分析。第一期 107-110 年國土生態保育綠色網絡建置計畫，針對等級 I 級的瀕危動物進行保育行動之研擬，透過文獻、現地調查、專家學者以及利害關係人之專家會議而擬定大紫蛺蝶的行動方案，係目前有關臺灣的大紫蛺蝶保育課題最完整的資料之一，確實地為大紫蛺蝶務實的保育行動翻開暫新的一頁(徐堉峰，2018; 程歆仔，2019; 趙榮台，2020)。即便如此，基礎資訊仍十分缺乏，相關評估瀕危物種現今族群分布、數量概算以及保育策略之研擬仍窒礙難行，有待各方專家協助大紫蛺蝶相關資訊之收集。

目前大紫蛺蝶於野外數量不豐，不易行使捉放法以估計野外數量；更無法有效取得足夠且有代表性樣本進行遺傳訊息分析，以推估現今的有效族群數量。然而典藏於各大博物館之大紫蛺蝶樣本，是當前能獲得最多臺灣大紫蛺蝶樣本的來源。這些樣本不僅取自當前主要分布的地點(北部橫貫公路)，亦包括過去有分布但已滅絕的族群，例如台北市圓山(丹山)、新北市萬華 (艋舺) (表 1)。這些樣本大多為距今 20-90 年前的乾製標本，一般定序方法，無法有效獲得其遺傳訊息，若能取得這些樣本的遺傳訊息，將有助於探查臺灣大紫蛺蝶的歷史族群變動。基因淺層定序 (Genome skimming) 係指利用高通量定序平台進行大量的序列定序，但所獲得的定序量還未達到組裝完整的基因體序列的方法。此方法通常容易獲得序列片段重覆數量多 (high-copy number) 的基因序列，諸如葉綠體或粒線體胞器 DNA 或者核 DNA 的 rDNA (例如 18S-28S)。此方法係針對短片段序列進行定序，適用於博物館內已碎裂的樣本。本計畫以此方法建立大紫蛺蝶的遺傳資訊，在有限的經費及野外調查人手之下，推估大紫蛺蝶現今與過去的族群變動。

二、計畫目的：

進行不同亞種關係之比較，以釐清臺灣大紫蛺蝶之特有性；透過博物館歷史蒐藏的大紫蛺蝶樣本，與現今的大紫蛺蝶族群進行比對，以了解族群遺傳變異是否與棲息縮小與族群數量銳減的現象相符。

三、擬解決問題

根據大紫蛺蝶保育行動保育行動計畫，羅列當前威脅之一，即大紫蛺蝶的族群遺傳現況仍不清楚 (趙榮台, 2020)。缺乏此一基礎遺傳資料主因，與現今大紫蛺蝶野外族群數量少且飛行快，不易捕捉足夠數量以評估其族群遺傳現況相關。本計畫利用國內大紫蛺蝶典藏樣本進行遺傳訊息萃取，即以提供台灣大紫蛺蝶遺傳訊息為主要目的，符合大紫蛺蝶行動計畫中所列舉策略 C 的行動 C-2：「進行臺灣全島及鄰近地區之大紫蛺蝶族群遺傳及親緣關係研究，以瞭解臺灣大紫蛺蝶族群的遺傳多樣性現況為何，作為後續族群經營管理及復育工作之基礎」。另外，臺灣的族群雖然為特有亞種，但其形態特徵與其它地區亞種差異不大，將初步分析不同亞種之間差異。以此作為大紫蛺蝶基礎族群資訊，提供後續保育行動之參考，達成此蝶種永續生存於台灣之願景。

四、實施方法與步驟

取樣 (Sampling)

本研究分析用樣本(N=32)係透過蝴蝶標本收藏機構，諸如國立自然科學博物館、行政院農業委員會特有生物研究保育中心、行政院農業委員會農業試驗所、國立中山大學生物學系及國立臺灣師範大學生命科學系之昆蟲標本收藏取得，另外從 GenBank 可取得日本地區 2 個粒線體基因體，分析樣本如表一所示。台灣產大紫蛺蝶共獲得 20 隻樣本，從 1928 至 2019 年皆有，大部分樣本集中於 1986-1997 年間 (N=9)。本次取得的大紫蛺蝶樣本，採集地點主要集中在北部橫貫公路，少部分於新竹地區。另外，大紫蛺蝶另外三個亞種皆有進行採集，包括日本亞種 *spp. charonda* (22LW06038; 21LW09018; AP011824; AP011825)；大陸東北亞種 *spp. coreana* (21LW0916; 22LW06027)及大陸西南亞種 *spp. yunnanensis* (21LW0915; 21LW0917; 21LW12051; 22LW06026; 22LW06036; N7168)，用於比對不同亞種之間關係。

DNA 萃取流程及定序 (DNA processing and sequencing)

每個樣本取 1-2 隻腳部組織進行 DNA 萃取並測定 DNA 的量與品質，包括跑膠確認 DNA 長度以及以 Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)進行濃度測定。大部分 2000 年前的樣本 DNA 皆已降解，則直接進行次世代定序建庫及定序，而少部分 DNA 片段較長的樣本則進行超音波碎裂，取得 100-300 片段為主的區域進行定序。上機前的序列資料庫以 Celero DNA-Seq library preparation kit 建置，定序平台則以 Illumina Novaseq 6000 平台進行測序。

所得原始資料，進行 adaptor sequence 去除，並且去除序列品質小於 Q20 的區域。整理好的序列進行兩部分步驟：一、利用已發表的粒線體基因體做為參考序列庫 (Tseng et al., 2022)，將與參考序列庫相似的序列進行篩選 (70%相似度)，選出的序列再進行 97%序列組裝；二、先進行 97%相似度的序列組裝，之後再透過序列庫篩選類似粒線體基因體序列。序列組裝、篩選，以 CLC Genomics Workbench 軟體 (CLC bio, Aarhus, Denmark) 進行。另外，亦以 megahit 2.1 軟體 (Li et al., 2015) 進行基因體序列組裝，亦設定 97%相似度進行合併。

粒線體序列整理 (annotation of mitogenomic sequences)

上述步驗將兩個不同軟體進行粒線體基因體組裝後的序列，以 fasta 檔輸出後，以 Sequencher 4.10 (GeneCode, Boston, USA) 進行比對、及整理。大部分可從此步驟見到大片段的粒線體基因體序列產出。少部分因為樣本較舊或者組裝過程仍無法獲得完整的粒線體，則經補測序列量，嘗試獲得可分析序列，以便進行不同樣本之間的比較。粒線體基因體所具有 37 個基因位置，以 MITOS2 (Bernt et al., 2013) 進行預測。並以 MEGA7 (Kumar et al., 2016) 將每個基因分別排序 (alignment)，再將排序列的每段基因合併成一個序列陣 (sequence matrix)，以此轉換成 fasta、nexus 或 phylip 檔案格式，提供後續大紫蛺蝶族群遺傳資料分析。

資料分析 (data analysis)

本計畫共取得 20 個台灣地區的大紫蛺蝶樣本，我們以 37 個粒線體基因進行台灣族群多樣性分析，以 Popart 1.7 軟體 (Leigh & Bryant, 2015) 進行核苷酸歧異度 (nucleotide diversity; π) 及基因型歧異度 (haplotype diversity; h) 分析。另外，以 Popart 1.7 軟體進行臺灣各地的樣本的基因型網狀親緣關係之建構，以了解基因型分布與各地點的關係。不同亞種之間的大紫蛺蝶，將會利用 IQ-TREE 2.1 (Nguyen et al., 2015) 及 BEAST 1.10 (Suchard et al., 2018) 分別進行 Maximum likelihood 及 Bayesian inference 樹形建構，以檢視臺灣大紫蛺蝶與其它亞種的關係。定年分析，選擇 *Sasakia funebris* (NC_022134) 及 *Hestina assimilis* (22LW06102) 為外群，以進行定年的設定。時間參考點則參考先前研究分析結果 (Wu et al., 未發表)，設定 *Sasakia* 屬起源於 20.7Ma (95% HPD 14-27 Ma)，兩種大紫蛺蝶物種分化時間為 11.73 Ma (95% HPD range 7.5-16 Ma)。以定年的結果以推測不同亞種之間的分化時間。

五、結果與討論

本研究共進行 30 隻大紫蛺蝶及外群紅斑脈蛺蝶 (*Hestina assimilis*) 基因淺層定序。每隻樣本原始序列皆超過三千萬條，組裝完後的序列皆獲得 37 個粒線體基因序列及核 DNA 的 18S rDNA、5.8S rDNA 及 28S rDNA。序列資料分析過程中，僅有一隻取自農試所的樣本 (應為日據時代樣本，但無年份資料)，標示為圓山 (丹山)，

定序的序列顯示大部分屬於真菌，暫時排除在後續的資料分析裡。另一隻大紫蛺蝶樣本(22LW02005)在 3'端部分序列未能獲得(133 bp)，其餘樣本皆有完整的 37 個粒線體基因序列。

本計畫的分析資料取自 30 隻今年度計畫自行組裝的序列資料以及 4 隻相關的樣本如表一所示。分析的資料包括 34 隻樣本的 13 個粒線體蛋白基因序列，進行排序並且將序列接合後長度為 14,738 bp。台灣亞種包括 20 個樣本、大陸西南亞種包括 6 個樣本、東亞至大陸東北包括 2 個樣本、日本 2 個樣本，及從 GenBank 下載為日本亞種的序列(AP011824, AP011825)。序列基因型數量、多樣性位點 (polymorphic sites)、基因型歧異度(haplotype diversity)、核苷酸歧異度 (nucleotide diversity)分析結果如表二。資料顯示序列變異度約為每 100 個基因長度約有 4-7 個變異點，族群內變異度尚可，而基因型多樣性顯示具有多個基因型，因此合適作為基因型之間差異分析。

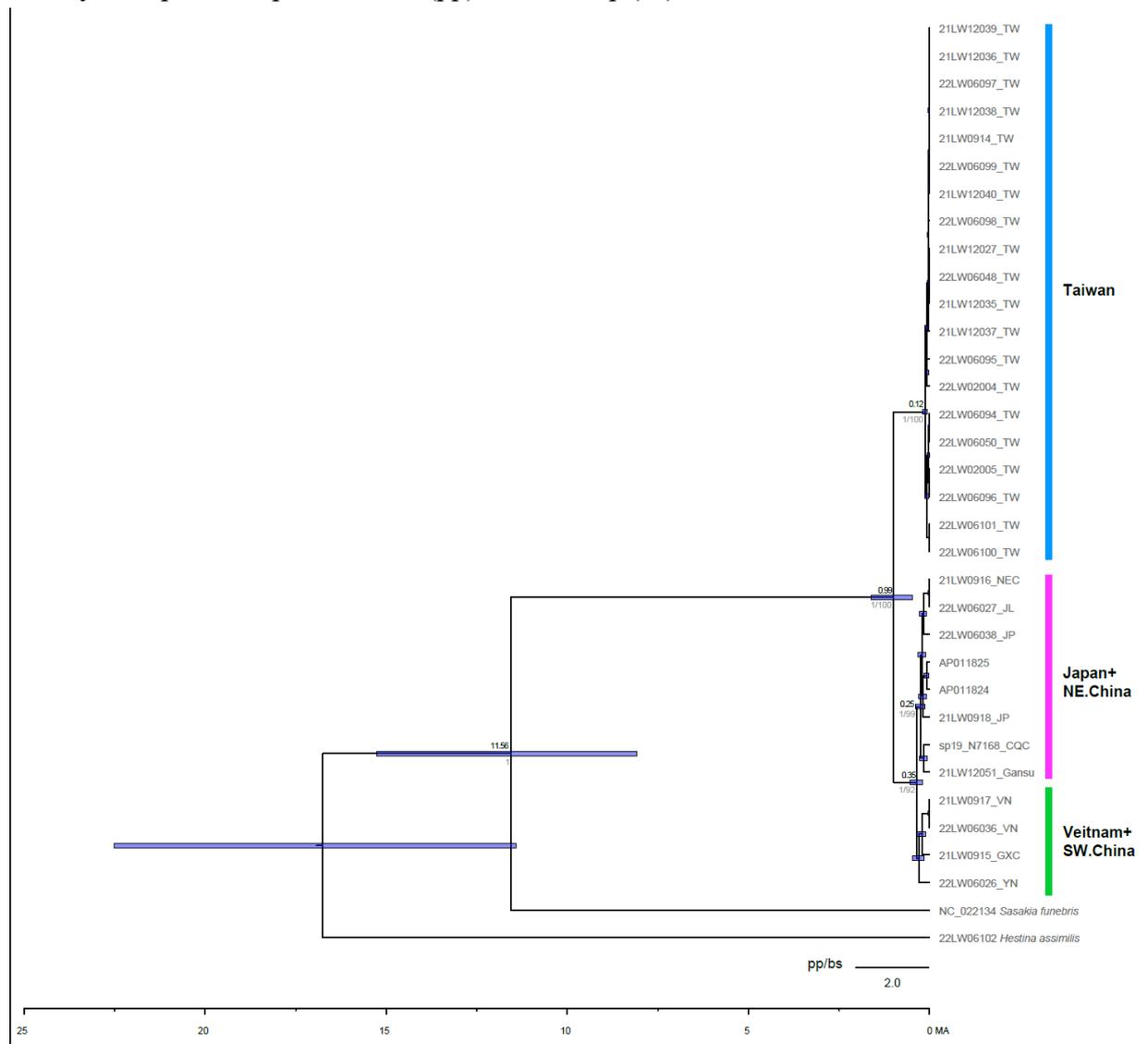
大紫蛺蝶亞種之間、基因型之間的譜系關係如圖一、二所示。臺灣的大紫蛺蝶與其它三種大紫蛺蝶亞種分別歸於不同群內(圖一)。日本亞種與東北亞種歸成一群，越南與大陸西南亞種自成一類，但此三種不同亞種之間的分群並未獲得節點支持度。從基因型譜系關係來看，臺灣的亞種具有特有性，與其它亞種明顯分隔。臺灣的特有亞種族群應於 99 萬年前即已與其它族群分開，與其它亞種之間並無基因型的交換。臺灣島內的族群約於 12 萬年前開始分化，新竹與桃園的族群具有相同的基因型，臺灣島內不同地點的族群仍有基因交流。整體而言，目前的遺傳分析推測臺灣的族群係為大紫蛺蝶的祖先早期即從大陸進到台灣島後，即停止與大陸其它族群再進行基因交流。進入臺灣島內似乎為單一祖先，並且在晚期才開始進行島內族群分化。

相對於臺灣島內的亞種，島外的三個亞種譜系關係尚未能獲得良好的解析，但此群分化時間大約於 34 萬年前開始，早於臺灣島內的族群分化。然而此分化時間明顯低估，因為所取用的樣本僅有 12 隻，仍有許多地點的族群仍未取得，諸如 *spp. coreana* 亞種於浙江、韓國的分布族群。而日本的網狀基因型關係呈現分成兩群 (圖二)，是否與型態多樣化的日本亞種，其實是來自不同支系進入日本，有待增加取樣以釐清此一關係。

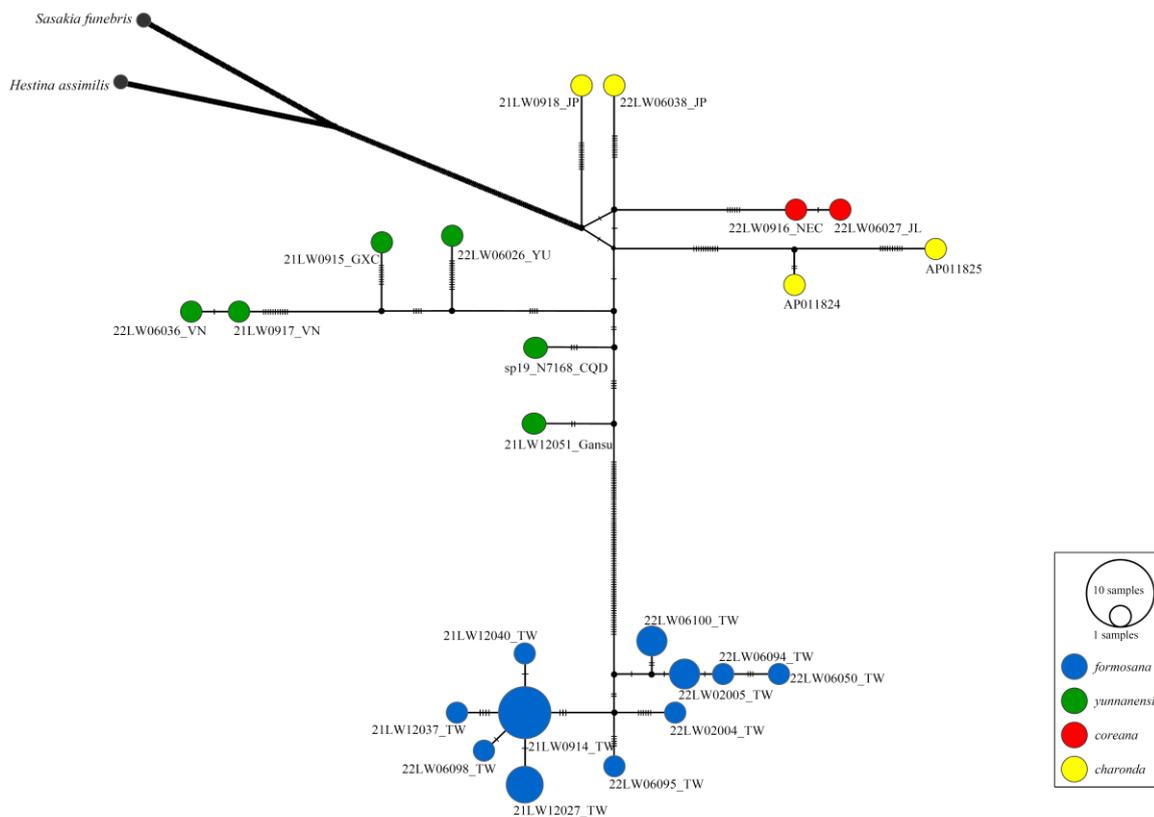
本計畫執行主要取自博物館內的收藏樣本，對於保育類昆蟲而言，無需再進行野外族群取樣，減少人為的干擾。目前最大量的大紫蛺蝶的樣本收藏於國立自然科學博物館內，但是大部分的樣本並無採集資訊，因此較難以在本計畫的族群遺傳分析時使用。而中央研究院、台大昆蟲標本館尚無此台灣亞種樣本收藏。後續的樣本收集則應與海外的博物館合作，以取得這些珍貴的歷史樣本。

利用粒線體總基因體組定序方法，證實可成功獲得目標基因。即便有些樣本老舊(1928年)、部分序列亦混合真菌的序列，但仍可以從中獲得大紫蛺蝶的目標序列。因此，粒線體總基因體定序方法，可作為其它保育類昆蟲進行遺傳資訊評估時初步使用之方法，粒線體基因序列呈現中度變異的序列資料，可供大尺度族群進行分析。

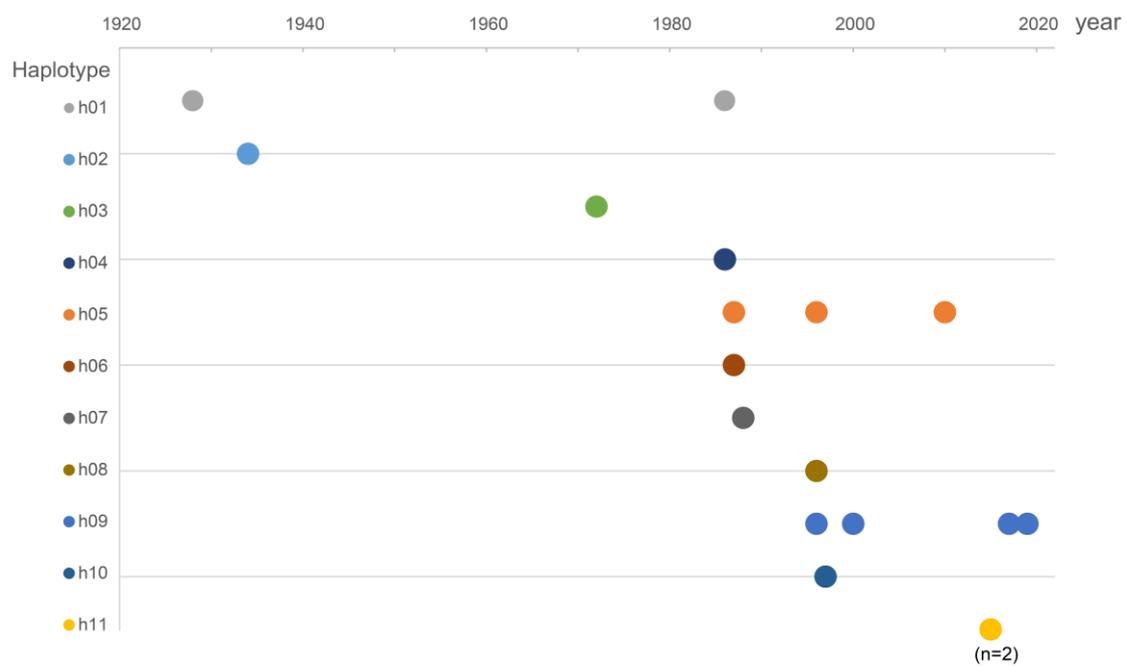
圖一、大紫蛺蝶不同亞種之間的譜系關係及定年結果。每個節點所示數值(pp/bs)為 Bayesian posterior probabilities (pp)及 bootstrap (bs) value of Maximum Likelihood。



圖二、為大紫蛺蝶不同基因型之間的網狀親緣關係。藍色為 *spp. formosana* 臺灣亞種；綠色為 *spp. yunnanensis* 大陸西南亞種；紅色為 *spp. coreana* 大陸東北亞種；黃色為 *spp. charonda* 日本亞種。



圖三、臺灣島內大紫蛺蝶粒線體基因型與時間關係圖(N=18)。另有 2 隻臺灣的大紫蛺蝶有地點資訊(桃園大曼，基因型 h09)但無表示日期，未放上此關係圖中。



表一、本研究所取得並分析的大紫蛺蝶及其近緣的外群資訊。22LW02003(円山)、22LW02006(艋舺)兩筆資料因序列品質不佳，故不列入分析。

	Genus	Species	ssp	DNA No.	Date	Country	Location	樣本來源	Haplotype
1.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW02005	1928	Taiwan	新竹，五峰茅園(Chikutö)	行政院農業委員會農業試驗所	h01
2.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW02004	1934	Taiwan	Shinchiku(新竹州)，Shiigao Chikuto	行政院農業委員會農業試驗所	h02
3.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06050	1972	Taiwan	桃園,復興萱源	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	h03
4.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06096	1986	Taiwan	桃園,復興巴陵-萱源	國立臺灣師範大學生命科學系 徐堉峰教授研究室	h01
5.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06098	1986	Taiwan	桃園,復興巴陵-萱源	國立臺灣師範大學生命科學系 徐堉峰教授研究室	h04
6.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	21LW12035	1987	Taiwan	桃園,復興巴陵	國立自然科學博物館	h05
7.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	21LW12037	1987	Taiwan	桃園,復興巴陵	國立自然科學博物館	h06
8.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06094	1988	Taiwan	桃園,復興萱源	國立臺灣師範大學生命科學系 徐堉峰教授研究室	h07
9.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06048	~1996	Taiwan	桃園,復興拉拉山	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	h05
10.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	21LW12036	1996	Taiwan	北橫巴陵- 明池	國立自然科學博物館	h09
11.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	21LW12040	1996	Taiwan	桃園,復興巴陵- 明池	國立自然科學博物館	h08

12.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06095	1997	Taiwan	桃園,復興萱源	國立臺灣師範大學生命科學系 徐堉峰教授研究室	h10
13.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06097	2000	Taiwan	桃園,復興大曼	國立臺灣師範大學生命科學系 徐堉峰教授研究室	h09
14.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	21LW12027	2010	Taiwan	北橫上巴陵	行政院農業委員會特有生物研 究保育中心	h05
15.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06100	2015	Taiwan	桃園,復興巴陵	國立臺灣師範大學生命科學系 徐堉峰教授研究室	h11
16.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06101	2015	Taiwan	桃園,復興巴陵	國立臺灣師範大學生命科學系 徐堉峰教授研究室	h11
17.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	21LW09014	2017	Taiwan	桃園,復興三光	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	h09
18.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW06099	2019	Taiwan	桃園,復興萱源	國立臺灣師範大學生命科學系 徐堉峰教授研究室	h09
19.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	21LW12038		Taiwan	桃園,復興巴陵	國立自然科學博物館	h09
20.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	21LW12039		Taiwan	桃園,復興巴陵	國立自然科學博物館	h09
21.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>coreana</i>	21LW09016		China	東北	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	
22.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>coreana</i>	22LW06027	2015	China	吉林	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	
23.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>yunnanensis</i>	N7168	2008	China	重慶	重慶自然史博物館	
24.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>yunnanensis</i>	21LW12051	2021	China	甘肅	中山大學生物學系	

								昆蟲系統分類與演化研究室	
25.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>yunnanensis</i>	22LW06026	2021	China	雲南	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	
26.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>yunnanensis</i>	21LW09015		China	廣西	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	
27.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>yunnanensis</i>	21LW09017	2018	Vietnam	Đông Văn, Hà Giang	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	
28.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>yunnanensis</i>	22LW06036	2018	Vietnam	Đông Văn, Hà Giang	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	
29.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>charonda</i>	22LW06038	1968	Japan	長野	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	
30.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>charonda</i>	21LW09018	2021	Japan	大阪	中山大學生物學系 昆蟲系統分類與演化研究室	
31.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>charonda</i>	AP011824		Japan		GenBank	
32.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>charonda</i>	AP011825		Japan		GenBank	
33.	<i>Sasakia</i>	<i>funnebris</i>	<i>funnebris</i>	NC_022134				GenBank	
34.	<i>Hestina</i>	<i>assimilis</i>		22LW06102	2018	Taiwan	桃園,復興萱源	國立臺灣師範大學生命科學系 徐瑋峰教授研究室	
35.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW02003		Taiwan	丹山	行政院農業委員會農業試驗所	
36.	<i>Sasakia</i>	<i>charonda</i>	<i>formosana</i>	22LW02006		Taiwan	艋舺	行政院農業委員會農業試驗所	

表二、大紫蛺蝶各亞種種內的基因歧異度(haplotype diversity)及核苷酸歧異度(nucleotide diversity)。

	Number	haplotype number	nucleotide diversity	haplotype diversity
spp. <i>formaosana</i>	20	11	0.0004788	0.89
spp. <i>charonda</i>	4	4	0.0020893	1
spp. <i>coreana</i>	2	2	0.0000682	1
spp. <i>yunnanensis</i>	6	6	0.0020241	1

參考文獻

- 山中正夫。1975。台灣產蝶類の分布 (5)。蝶と蛾。26：100。
- 李惠永。1999。瀕危種蝴蝶—大紫蛺蝶之棲所、生活史及習性。國立臺灣大學昆蟲學研究所碩士論文。
- 徐堉峰。2018。107 年度「國土生態保育綠色網絡建置」之「瀕危野生動物保育優先性評估、行動計畫與推動」—「大紫蛺蝶保育策略研擬與研究案」。行政院農業委員會特有生物研究保育中心。
- 程歆仔。2019。108 年度「國土生態保育綠色網絡建置」之「瀕危野生動物保育優先性評估、行動計畫與推動」—「大紫蛺蝶與珠光鳳蝶之保育推廣與研究案」。行政院農業委員會特有生物研究保育中心。
- 趙榮台。2020。109 年度「國土生態保育綠色網絡建置」之「瀕危野生動物保育優先性評估、行動計畫與推動」—「大紫蛺蝶之保育策略及行動計畫研擬案」。行政院農業委員會特有生物研究保育中心。
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritsch, G., Pütz, J., Middendorf, M., Stadler, P.F., 2013. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 313-319.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
- Leigh, J.W., Bryant, D., 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.-W., 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31, 1674-1676.
- Masui, A., Bozano, G.C., Floriani, A., 2011. Guide to the butterflies of the Palearctic region, Nymphalidae part IV. Omnes Artes, Milano, Italy.
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., Von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268-274.
- Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J., Rambaut, A., 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 4, vey016.
- Tseng, H.-Y., Chiba, H., Lohman, D. J., Yen, S.-H., Aduse-Poku, K., Ohshima, Y., Wu, L.-W., 2022. Out of Asia: Intercontinental dispersals after the Eocene-Oligocene transition shaped the zoogeography of Limenitidinae butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 170, 107444.