

農業部林業及自然保育署

113 年度林業發展計畫 執行成果報告

計畫名稱：臺灣寬尾鳳蝶保育遺傳及親緣地理學

(第 2 年/全程 2 年)

英文名稱：Conservation Genetics and Phylogeography of

Broad-tailed Swallowtail, *Papilio maraho*

計畫編號：113 林發-09.3-保-32

全程計畫期間：自 112 年 6 月 1 日至 113 年 12 月 31 日

本年計畫期間：自 113 年 1 月 1 日至 113 年 12 月 31 日

計畫聯絡人：吳立偉

執行機關：東海大學

摘要

臺灣寬尾鳳蝶 (*Papilio maraho*) 為野生動物保育法列為第 I 級保育類動物。由於數量稀少，野外不易進行生態調查方式估算其族群數量，對於野外族群大小、遺傳多樣性訊息所知有限。為了瞭解臺灣寬尾鳳蝶的族群是否健康，我們利用雙切限制酶片段 DNA 定序法獲得大量單核苷酸多型性資訊，以評估臺灣寬尾與中華寬尾鳳蝶分化時間、歷史族群變動、以及有效族群數量。研究結果顯示，兩種寬尾鳳蝶各為獨立分群，並且約於 4 萬多年前分化為前兩種。中華寬尾鳳蝶族群內，仍保有部分與臺灣寬尾鳳蝶相同的單核苷酸多型性，反之則無，顯示中華寬尾鳳蝶族群內保有較多的共祖的遺傳特徵。在歷史族群動態分析結果顯示臺灣寬尾鳳蝶曾經歷顯著的族群降低，並且隨後增長。近代的效族群量推估臺灣寬尾鳳蝶約為 1,523 隻。依據目前有效族群數量應無立即生存危險，然後續應持續了解不同年份樣本是否影響此有效族群的推斷，以及改善臺灣寬尾鳳蝶可利用棲地的品質，以達成永續臺灣寬尾鳳蝶在臺灣之目的。

關鍵詞：保育遺傳學、全基因組分析、近緣種、族群結構、親緣地理學

Abstract

The Broad-tailed Swallowtail, *Papilio maraho*, is classified as a Class I protected species under the Wildlife Conservation Act of Taiwan. Due to the scarcity of individuals in the wild, it is challenging to conduct ecological approaches to estimate population size in the wild. There is limited information regarding its population size and genetic diversity. To assess the genetic background of this Swallowtail, we used double-digest restriction site-associated DNA sequencing to obtain extensive single nucleotide polymorphism (SNP) data. We used these SNPs to evaluate the divergence between these two related Broad-tailed Swallowtails, historical population dynamics and effective population size. Our findings indicated that these two species represent independent lineages, having diverged approximately 40,000 years ago. Within the population of *Papilio elwesi*, we observed some shared SNPs with *Papilio maraho*, whereas the reverse was not occurred. This suggests that *Papilio elwesi* retains more ancestral genetic characteristics. Historical demographic analyses revealed that *Papilio maraho* has experienced a significant population decline followed by subsequent growth. Current estimates suggest that its effective population size is approximately 1,523 individuals, appearing to be no immediate risk to survival. However, ongoing monitoring of samples in different periods is needed to assess whether these estimates are affected by temporal variation. Additionally, improving the quality of living habitats for *Papilio maraho* will be crucial in achieving sustainable conservation efforts for this species in Taiwan.

Keywords: conservation genetics, genome-wide analysis, phylogeography, population structure

一、前言

臺灣寬尾鳳蝶 (*Papilio maraho*) 為大型、亮麗的臺灣特有蝶種，同時也為保育類野生動物 I 級瀕臨絕種保護物種，素有「國蝶」之稱。此蝶種野外數量不豐，加上幼蟲僅利用珍貴稀有植物—臺灣檫樹 (*Sassafras randaiense*) 為食，稀有蝶種利用稀有植物為幼蟲寄主，受限於幼蟲可利用植物資源，更顯得臺灣寬尾鳳蝶族群大小受到限制。由於此蝶種不易發現其蹤影，未能透過野外監測或者捉放法估計其族群數量，當前透過族群遺傳方式推估其有效族群數量，將是最有效的務實方式。此外，臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶 (*Papilio elwesi*) 十分近緣，過去徐 (2012) 曾利用粒線體 *cox1* 與 *cox2* 基因序列進行臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶的分群研究，顯示約為 1.8 萬年前開始分化 (Wu et al., 2015)。雖然分子基因型分析仍將這兩種蝴蝶分為 2 群，但是節點的支持度弱而且交尾器形態卻無法將此兩種區別 (Lu et al., 2009)。

近年來次世代定序技術及生物資訊分析方法的推陳更新，能夠提供大量的變異點位訊息提供種內或近緣種之間的親緣關係。例如基因淺層定序方法 (genome skimming) (Straub et al., 2012) 以及雙限制酶切位點標定法 (ddRAD, double-digest Restriction Associated DNA sequencing) (Peterson et al., 2012)，可供有效族群結構解析及有效族群量之估算。解析此兩種寬尾鳳蝶之間的關係及提供有效族群數量，則有利後續保育工作之推展，以達成臺灣寬尾鳳蝶永續生存於臺灣之願景。因此本計畫目的於第一年透過粒線體基因體確認臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶之間是否有穩定分群關係，結果是否與 Lu et al. (2009) 的結果吻合？第二年則是透過 ddRAD 的分生技術進行寬尾鳳蝶基因體層級的變異資訊比較，以釐清臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶之間的有效族群數量及歷史族群變動情形，並且計算臺灣寬尾鳳蝶自交系數 (Inbreeding index) 以健檢此保育類物種的族群遺傳資訊，提供目前保育行動計畫的實施基礎資訊。

二、計畫目的

本計畫為執行「瀕危物種－臺灣寬尾鳳蝶保育行動計畫」之保育策略：加強臺灣寬尾鳳蝶族群遺傳的評估、蝴蝶與寄主植物之間的基因調控與生物地理學研究。本年度計畫的主要目的，為透過 ddRAD 基因體層級的族群資訊，以推估臺灣寬尾鳳蝶的有效族群數量及探查寬尾鳳蝶族群過去的歷史變動，以制定合適的保育行動策略以永續臺灣寬尾鳳蝶的生存。

三、實施方法與步驟

(一) 取樣

蒐集國內、國外各大博物館可取得的寬尾鳳蝶標本，共取得 82 隻寬尾鳳蝶，包含中華寬尾鳳蝶共 60 隻，臺灣寬尾鳳蝶共 22 隻（表一）。每隻樣本取其標本之胸部的部分組織，並且進行 DNA 粗萃取（genomic DNA），以便進行後續分析。

(二) DNA 萃取與雙切限制酶片段 DNA 定序

萃取 DNA 使用 Qiagen Puregene DNA Isolation kit (Genra Systems, Minnesota, USA) 進行。萃取後之 DNA 暫時保存於-20°C 冰箱，待所有樣本皆萃取後，再以雙切限制酶片段 DNA 定序法（Double Digest Restriction-site associated DNA sequencing；ddRAD-seq）進行酶切及上機前建庫。建庫的方式參考 Peterson et al. (2012) 與 De Vivo et al. (2023) 之方式進行，將臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶的 DNA 片段以 *EcoRI* 與 *MseI* 兩種限制酶進行樣本的 DNA 酶切。接著，將帶有 Barcode 的轉接子（adapter）以 T4 ligase 與酶切後的 DNA 片段連接，並以磁珠純化以去除小於 300 bp 的短片段。每個個體純化後的 DNA 片段獨立進行聚合酶連鎖反應（PCR）。根據每個個體 DNA 濃度，計算相同的 DNA 量進行混合，每個樣本取 200 ng 的 DNA，待所有樣本混和後再次進行磁

珠純化，並將樣本送至定序公司以 Illumina NovaSeq 6000 平台進行單股定序。

(三) 基因體組裝與資料處理

NGS 定序後的原始讀數 (raw reads) 以 STACKS v 2.65 軟體 (Rochette et al., 2019) 中的 *process_radtags* 功能，根據每個樣本特定的 Barcode 將讀數進行拆分 (demultiplex)。拆分後每個樣本的保留讀數 (retained reads) 平均約為 1.01M 條。為使樣本資料分析最大化，將保留讀數低於 0.4M 條的 5 個樣本不列入後續資料分析 (圖一)。

基因體組裝以中華寬尾鳳蝶基因體 (GCA_029641285.1; Pan et al., 2023) 做為參考基因體進行組裝。首先以 BWA v. 0.7.17-r1188 (Li and Durbin, 2009) 軟體中 *index -a bwts*、*aln* 及 *samse* 功能，將每個樣本的讀數與參考基因體進行比對，並將比對後的讀數輸出為 SAM 格式。隨後以 SAMtools v. 1.15.1 (Li et al., 2009) 軟體中 *view -bt* 與 *sort* 功能，進行 BAM 格式轉換及染色體位置排序。

接下來使用 STACKS v 2.65 軟體中 *ref_map.pl* 功能來進行單核苷酸多型性 (Single-Nucleotide Polymorphism; SNPs) 鑑定和基因型判定。最後使用 *populations* 功能對所有基因座 (loci) 和 SNPs 進行篩選，保留最小等位基因頻度大於 3% 以及 SNPs 缺失少於 20% 的樣本 (參數設定: `--min-populations 1 --min-mac 3 --min-samples-per-pop 0.8`)。將 SNPs 篩選後之資料進行族群遺傳之分析。組裝完成的基因體數據隨後使用 R 軟體中的 rMVP (Yin et al., 2021)，對 ddRAD-seq 所覆蓋的基因組中的變異情形進行分析。

(四) 寬尾鳳蝶的親緣關係與族群結構分析

將 STACKS 組裝及 SNPs 篩選後的資料輸出為 VCF 格式。為了避免 SNPs 之間的高連鎖不平衡 (Linkage Disequilibrium, LD) 導致分析中的統計偏差，使用 PLINK v.1.9 軟體 (Chang et al., 2015) 進行基因組掃描，設定窗口大小為 100 bp，每次移動 10 bp，並剔除具有較高 LD 值 ($r^2 > 0.2$) 的 SNPs，以進行重建親

緣關係與族群結構分析。

使用 IQ-TREE v2.0 (Nguyen et al., 2015) 基於最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 重建寬尾鳳蝶親緣關係，替換模型選擇 GTR+I+G 模型，並重複進行 1000 次 ultrafast bootstrap 以評估系統發育樹的節點支持度。

寬尾鳳蝶的族群結構分析，首先，將 SNPs 資料通過 vcfR 套件 (Knaus and Grünwald, 2017) 轉換為二進位基因型數據 (binary genotype data)。對於缺失數據 (missing data)，使用平均值插補法 (mean imputation) 以確保數據的完整性。接著，使用 R 軟體中的 adegenet 套件 (Jombart, 2008) 進行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)，以比較樣本之間的遺傳變異。

為評估最佳的遺傳群體數量 (K genetic clusters)，首先，以 PLINK v1.9 將 VCF 格式轉換為 ADMIXTURE 所需的二進位 bed 格式。隨後，我們使用 ADMIXTURE v1.3.0 (Alexander et al., 2009) 來評估寬尾鳳蝶的最佳分群，設定 K 值範圍為 1 到 10，並透過交叉驗證誤差 (Cross-validation error, CV error) 來評估寬尾鳳蝶的最佳分群及每個個體在不同群體中的混合比例。最後，使用 fineRADstructure v. 0.3.2 (Malinsky et al., 2018) 透過單倍型連鎖訊息 (haplotype linkage information) 和最近共同祖先 (co-ancestry matrix) 的推斷，量化個體及群體之間的關係和祖先來源。

(五) 臺灣寬尾鳳蝶的歷史有效族群變動及近代有效族群量

歷史有效族群量 (historically effective population size) 的計算有助於評估該物種過去族群是否有經歷過瓶頸效應或者創始者效應，我們利用 Stairway plot 2 (version 2.1.1; Liu and Fu 2020) 軟體進行估算。先以 easySFS (<https://github.com/isaacovercast/easySFS>) 使用所有基因座中的位點 (包含變異與無變異的位點) 分別計算臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶的點位頻率圖譜 (site frequency spectrum; SFS)。在 Stairway plot 2 中基因體的長度使用所有基因

座的總長度，突變率為每個位點每世代 2.9×10^{-9} (Keightley et al. 2015)。生活史世代以中華寬尾鳳蝶每年 2 個世代作為基準進行歷史有效族群量變化估算。

臺灣寬尾鳳蝶近代有效族群量 (recently effective population size) 的估算使用 R 軟體中 dartRverse 套件 (Gruber et al., 2018; Mijangos et al., 2022) 中的 *gl.LDNe* 函數基於 NeEstimator v2 (Do et al. 2014) 演算，並考量染色體資訊進行有效族群量的估算。為了提升估算的準確性，對臺灣寬尾鳳蝶的 SNPs 重新篩選，並通過連鎖不平衡 (LD) 篩選進一步清理數據。由於 NeEstimator 的演算對於缺失資料使用加權調和平均數 (variance-weighted harmonic mean; Peel et al. 2013)，因此，以篩選後的資料基於缺失率 (missing rate) 為 0% 的條件進行有效族群量估算。

五、結果與討論

(一) 生物資訊分析與資料處理

在雙切限制酶片段 DNA 定序後，去除定序品質不佳的個體後，保留了 77 隻個體，包括 20 隻臺灣寬尾鳳蝶與 57 隻中華寬尾鳳蝶。總共獲取了 82,179,648 條原始讀數，平均讀長為 140.08 bp，其中有 53,062,298 條讀數成功比對到參考基因組。基因組的平均覆蓋度為 $1.81\% \pm 0.20\%$ ，平均定序深度為 $16.65 \times \pm 5.47 \times$ ，平均鹼基品質為 39.54 ± 0.11 (Phred 分數)，平均比對品質為 32.22 ± 0.47 (Phred 分數) (表二)。

使用 STACKS 進行 SNPs 鑑定，包含中華寬尾鳳蝶與臺灣寬尾鳳蝶的組裝序列總長度為 3,697,753 bp，共獲得 213,814 個 SNPs，在去除了具有高度連鎖不平衡的變異位點後，保留 19,335 SNPs。這些 SNPs 分布於中華寬尾鳳蝶的 30 條染色體上 (圖一)。然而，在第 28 和第 30 條染色體上未檢測到任何讀數。中華寬尾鳳蝶 ddRAD 組裝序列總長度為 3,907,891 bp，共獲得 73,260 個 SNPs，在去除了具有高度連鎖不平衡的變異位點後，保留 26,164 SNPs。臺灣寬尾鳳蝶

ddRAD 組裝序列總長度為 3,951,768 bp，共獲得 3,644 個 SNPs，在去除了具有高度連鎖不平衡的變異位點後，保留 489 SNPs。

(二) 寬尾鳳蝶親緣關係族群結構

重建寬尾鳳蝶 ML 親緣關係使用 19,335 SNPs 進行分析，結果顯示臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶之間已顯著分化：臺灣寬尾鳳蝶為一個獨立的單系群而且種內未觀察到明顯的族群分化，而中華寬尾鳳蝶種內依不同地點則有明顯的族群結構。浙江的族群是較早分化的分支，並與福建地區形成並系群，隨後分出江西、廣東、重慶及四川等地區的族群。這種分化模式顯示地理距離對中華寬尾鳳蝶的族群結構具有高相關性（圖二）。

主成分分析結果顯示第一主成分（PC1）及第二主成分（PC2）解釋變異量分別為 13.54%與 4.46%。PC1 顯示臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶之間存在顯著的遺傳分化。而 PC2 進一步顯示中華寬尾鳳蝶內部隨著地理距離而產生的遺傳分化（圖三）。

ADMIXTURE 族群結構分析，顯示 2 種寬尾鳳蝶各自歸為一群（K=2），每個個體的 SNPs 混和比例顯示，兩者之間有顯著的遺傳分化，臺灣寬尾鳳蝶族群內並無中華寬尾鳳蝶的基因型，但中華寬尾鳳蝶內有檢測到一定比例與臺灣寬尾鳳蝶共有的基因，可能與中華寬尾鳳蝶仍維持較多態的祖先型特徵在族群內，而臺灣寬尾鳳蝶則歷經創始者效應顯示較單一的遺傳組成。

finRADstructure 的共祖矩陣結果顯示，臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶群體之間的遺傳分化顯著。臺灣寬尾鳳蝶在群體內顯示出高度相似度（藍紫色），而在臺灣與中華寬尾鳳蝶群體之間的相似度較低（黃色）。中華寬尾鳳蝶進一步分為多個次族群，這些次族群內顯示出高度的相似度（深紅色到藍紫色），且不同

的次族群可以對應到不同的地理位置。這些結果與族群結構分析一致。此外，中華寬尾鳳蝶次族群間的高相似度顯示可能透過流暢的基因交流來維持（圖五）。

無論是親緣關係還是族群結構分析，都顯示臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶在遺傳結構上存在顯著分化。此外，中華寬尾鳳蝶親緣關係也展現出更高的地理族群結構與遺傳多樣性，暗示廣泛分布的中華寬尾鳳蝶在不同地理區域間可能受到地理距離、地理障礙或是氣候環境所導致的遺傳分化。

綜合上述分析結果，臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶為兩個獨立的單元，但中華寬尾鳳蝶族群內仍保留部分臺灣寬尾鳳蝶的 SNPs 訊息，顯示中華寬尾鳳蝶仍保留兩近緣種更多的祖先型特徵。這種不對稱的遺傳組成反應了過去共同祖先的基因多樣性，但因為兩者分離後逐漸產生差異。然而，中華寬尾鳳蝶族群內有明顯的族群結構，這些基因得以保留並在其族群中繼續發展，可能與中華寬尾鳳蝶擁有更廣泛的分佈範圍和多樣的寄主植物、棲息環境，這使其能夠維持更高的遺傳多樣性。相較之下，臺灣寬尾鳳蝶處於相對孤立的島嶼環境中，可能經歷了更強的選汰壓力，導致基因多樣性的減少，並且使其族群內無遺傳結構。

（三）臺灣寬尾鳳蝶的歷史有效族群變動及近代有效族群量

近代有效族群量的估算基於缺失率（missing rate）為 0% 的條件進行，臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶分別保留 1222 與 11,833 SNPs。臺灣寬尾鳳蝶近代有效族群量為 1522.9 隻（95%信賴區間: 852.2 隻 – 6975.2），中華寬尾鳳蝶近代有效族群量為 62.2 隻（95%信賴區間: 62.2 隻 – 62.3 隻）。臺灣寬尾鳳蝶近代有效族群量約為中華寬尾鳳蝶近代有效族群量的 24 倍。

Stairway plot 顯示臺灣寬尾鳳蝶歷史有效族群大小（ N_e ）隨時間變化，約在 20,000 年前， N_e 值開始快速上升，達到約 230,000 有效族群量的高峰。隨後，在 2,100 年前，下降至約 50,000 隻，並且於 600 年前再次發生顯著下降。當時

族群規模降至最低點，僅約 1,363 隻。然而，約 500 年前，族群開始回升，並在 200 年前維持穩定， N_e 值增長至 90,000 隻（圖六）；中華寬尾鳳蝶在約 30 萬年前有效族群量快速增長，達到巔峰約 110 萬隻。隨後，在約 2,000 到 3,000 年前，族群規模顯著下降，並在 600 年前經歷了第二次快速下滑，下降到約 10,000 有效族群量。之後族群數量持續下降（圖六）。

在歷史族群波動分析中，臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶有截然不同的族群變動歷史。臺灣寬尾鳳蝶顯示出明顯的瓶頸效應，而中華寬尾鳳蝶族群量則持續減少。值得注意的是，臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶經歷了兩次一致的有效族群快速下降事件，分別發生在 2,000 至 3,000 年前和 500 至 600 年前，可能當時的生存環境同時影響兩種的有效族群量。雖然尚未從歷史資料檢測相對應的具體事件，推測可能是氣候變遷或棲息地變化不宜寬尾鳳蝶的生存，然而具體事件仍需進一步確認。

利用 NeEstimator 估計臺灣寬尾鳳蝶的近代的有效族群量約 1522.9 隻。在 Frankham et al. (2014) 所建議的有效族群量為 100/1000 的準則下，顯示臺灣寬尾鳳蝶的當前族群數量尚未受到生存威脅，但未來仍應持續監測臺灣寬尾鳳蝶有效族群量變動趨勢。此外，臺灣寬尾鳳蝶過去曾歷經瓶頸效應的影響，未來應結合近交係數與遺傳負荷等指標，更全面地評估其遺傳健康狀況。

雖然臺灣寬尾鳳蝶遺傳檢測上並無生存的風險，但此蝶種目前在國內仍屬於不易發現的蝶種，因此可以採取生態習性偏好與棲地管理的策略，進一步提升族群的長期永續經營。目前野外調查發現臺灣檫樹幼齡木有受到臺灣寬尾鳳蝶母蝶的偏好 (吳立偉、陳子英, 2023)，可以透過栽植臺灣檫樹 (*Sasafra randaiense*)，以擴大幼蟲可透用寄主資源，以增加族群數量。但在此之前，應進行系統性調查，以確認臺灣寬尾鳳蝶的主要棲息地及與臺灣檫樹之間的關係。之後可以擴大此蝶種的棲息環境，有助於基因流動和族群穩定以減少族群孤立的風險。另外亦可透過生態模型預測評估潛在分布，並且利用生態模型預測未

來環境變化對族群的潛在影響。結合科學證據以及公民參與及環境教育，辦理保育活動如棲地維護、食草栽植及賞蝶活動，邀請當地居民、社區和遊客推廣寬尾鳳蝶的保護知識，透過保育活動讓民眾參與保育工作，有助於提高保護的可持續性。

七、參考文獻

- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19 (9), 1655-1664.
- Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C., Vattikuti, S., Purcell, S. M., & Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*, 4 (1), s13742-015.
- De Vivo, M., Chou, M. H., Wu, S. P., Kuan, Y. H., Chen, W. Y., Wang, L. J., L.-J., Morgan, B., Phang, G.-J., & Huang, J. P. (2023). Genomic tools for comparative conservation genetics among three recently diverged stag beetles (*Lucanus*, Lucanidae). *Insect Conservation and Diversity*, 16 (6), 853-869.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular ecology resources*, 14(1), 209-214.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J., & Brook, B. W. (2014). Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170, 56-63.
- Gruber, B., Unmack, P. J., Berry, O. F., & Georges, A. (2018). dartr: An r package to facilitate analysis of SNP data generated from reduced representation genome sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 18, 691-699.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12745>

- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24 (11), 1403-1405.
- Keightley, P. D., Pinharanda, A., Ness, R. W., Simpson, F., Dasmahapatra, K. K., Mallet, J., Davey, J. W., & Jiggins, C. D. (2015). Estimation of the spontaneous mutation rate in *Heliconius melpomene*. *Molecular Biology and Evolution*, 32 (1), 239-243.
- Knaus, B. J., & Grünwald, N. J. (2017). vcfr: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Molecular Ecology Resources*, 17 (1), 44-53.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25 (14), 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25 (16), 2078-2079.
- Liu, X., & Fu, Y. X. (2020). Stairway Plot 2: demographic history inference with folded SNP frequency spectra. *Genome Biology*, 21 (1), 280.
- Lu, C. C., Wu, L. W., Jiang, G. F., Deng, H. L., Wang, L. H., Yang, P. S., & Hsu., Y. F. (2009). Systematic status of *Agehana elwesi* f. *cavaleriei* based on 33 morphological and molecular evidence. *Zoological Studies*. 48(2): 270–279.
- Malinsky, M., Trucchi, E., Lawson, D. J., & Falush, D. (2018). RADpainter and fineRADstructure: population inference from RADseq data. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (5), 1284-1290.
- Mijangos, J. L., Gruber, B., Berry, O., Pacioni, C., & Georges, A. (2022). dartR v2: An accessible genetic analysis platform for conservation, ecology and agriculture. *Methods in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13918>
- 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. *Molecular Biology and Evolution*, 32 (1), 268-274.
- Pan, Z., Ding, Y., Zhang, S., Li, L., & Ma, F. (2023). Chromosome-Level Genome Assembly of *Papilio elwesi* Leech, 1889 (Lepidoptera: Papilionidae). *Insects*, 14 (3), 304.
- Peel, D., Waples, R. S., Macbeth, G. M., Do, C., & Ovenden, J. R. (2013). Accounting for missing data in the estimation of contemporary genetic effective population size (N_e). *Molecular Ecology Resources*, 13 (2), 243-253.
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLOS One*, 7 (5), e37135.
- Rochette, N. C., Rivera-Colón, A. G., & Catchen, J. M. (2019). Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, 28 (21), 4737-4754.
- Straub, S. C., Parks, M., Weitemier, K., Fishbein, M., Cronn, R. C., & Liston, A. (2012). Navigating the tip of the genomic iceberg: Next-generation sequencing for plant systematics. *American journal of botany*, 99(2), 349-364.
- Wu, L. W., Yen, S. H., Lees, D. C., Lu, C. C., Yang, P. S., & Hsu, Y. F. (2015). Phylogeny and historical biogeography of Asian *Pterourus* butterflies (Lepidoptera: Papilionidae): a case of intercontinental dispersal from North America to East Asia. *PLoS One*, 10(10), e0140933.
- Yin, L., Zhang, H., Tang, Z., Xu, J., Yin, D., Zhang, Z., Yuan, X., Zhu, M., Zhao, S., Li, X., & Liu, X. (2021). rMVP: a memory-efficient, visualization-enhanced, and parallel-accelerated tool for genome-wide association study. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 19(4), 619-628.
- 吳立偉、陳子英 (2023) 和平事業區 61、62 林班臺灣檫樹生長情形對臺灣寬尾

鳳蝶數量之影響。行政院農業委員會林務局羅東林區管理處。

徐堉峰（2012）以寬尾鳳蝶屬的親緣關係及親緣地理學探討洲際間的隔離/散佈
形況。行政院國家科學委員會專題研究計畫。

表一、本計畫使用國內、國外各大博物館可取得的寬尾鳳蝶樣本。

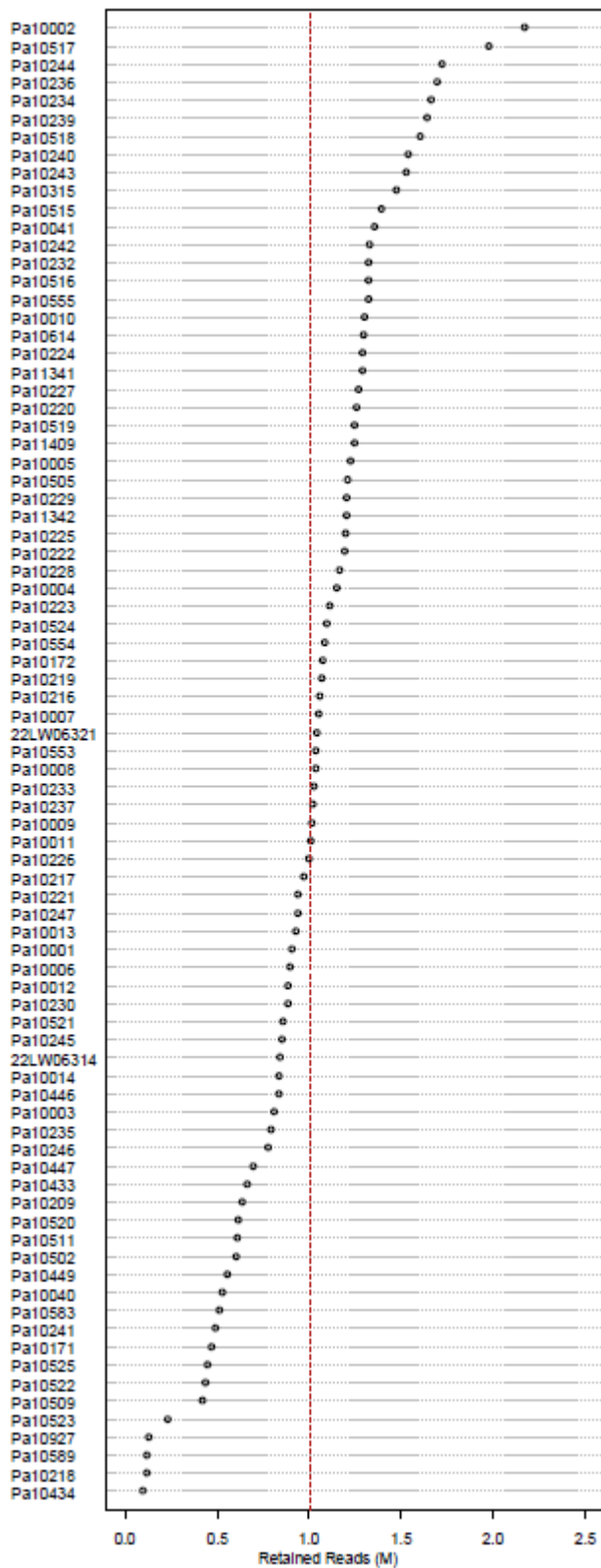
| 編號 | ID | 物種名 | 採集地點 |
|----|----------|-----------------------|-----------|
| 1 | Pa1-0003 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉明池 |
| 2 | Pa1-0004 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉明池 |
| 3 | Pa1-0005 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉明池 |
| 4 | Pa1-0014 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 5 | Pa1-0040 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 6 | Pa1-0209 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 7 | Pa1-0235 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 8 | Pa1-0239 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 9 | Pa1-0241 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉明池 |
| 10 | Pa1-0446 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 11 | Pa1-0447 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 12 | Pa1-0502 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭鄉大同鄉明池 |
| 13 | Pa1-0505 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭鄉大同鄉太平山 |
| 14 | Pa1-0509 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭鄉大同鄉太平山 |
| 15 | Pa1-0524 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 16 | Pa1-0583 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 17 | Pa1-0589 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉太平山 |
| 18 | Pa1-0927 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉明池 |
| 19 | Pa1-1341 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉突稜 |
| 20 | Pa1-1342 | <i>Papilio maraho</i> | 宜蘭縣大同鄉突稜 |
| 21 | Pa1-1409 | <i>Papilio maraho</i> | 新竹縣尖石鄉鎮西堡 |
| 22 | Pa1-0171 | <i>Papilio moraho</i> | 宜蘭縣大同鄉英士村 |
| 23 | Pa1-0433 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶市四面山 |
| 24 | Pa1-0434 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶市四面山 |
| 25 | Pa1-0449 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶市四面山 |
| 26 | Pa1-0553 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶市四面山 |
| 27 | Pa1-0554 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶市四面山 |
| 28 | Pa1-0555 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶市四面山 |
| 29 | Pa1-0614 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶市四面山 |
| 30 | Pa1-0229 | <i>Papilio elwesi</i> | 江西蘆山 |
| 31 | Pa1-0511 | <i>Papilio elwesi</i> | 江西蘆山 |
| 32 | Pa1-0521 | <i>Papilio elwesi</i> | 江西蘆山 |
| 33 | Pa1-0522 | <i>Papilio elwesi</i> | 江西蘆山 |
| 34 | Pa1-0523 | <i>Papilio elwesi</i> | 江西蘆山 |
| 35 | Pa1-0001 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |
| 36 | Pa1-0002 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |
| 37 | Pa1-0007 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |
| 38 | Pa1-0010 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |
| 39 | Pa1-0011 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |
| 40 | Pa1-0013 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |

| | | | |
|----|-----------|-----------------------|--------------|
| 41 | Pa1-0518 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |
| 42 | Pa1-0519 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |
| 43 | Pa1-0520 | <i>Papilio elwesi</i> | 重慶江津四面山 |
| 44 | Pa1-0006 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 45 | Pa1-0009 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 46 | Pa1-0220 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 47 | Pa1-0222 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 48 | Pa1-0223 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 49 | Pa1-0224 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 50 | Pa1-0225 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 51 | Pa1-0226 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 52 | Pa1-0227 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江麗水地區景寧縣赤木山 |
| 53 | Pa1-0228 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江麗水地區景寧縣赤木山 |
| 54 | Pa1-0230 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江麗水地區景寧縣赤木山 |
| 55 | Pa1-0232 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江麗水地區景寧縣赤木山 |
| 56 | Pa1-0233 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 57 | Pa1-0234 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江麗水地區景寧縣赤木山 |
| 58 | Pa1-0236 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 59 | Pa1-0244 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 60 | Pa1-0245 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 61 | Pa1-0246 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江麗水地區景寧縣赤木山 |
| 62 | Pa1-0315 | <i>Papilio elwesi</i> | 浙江安吉縣龍王山 |
| 63 | Pa1-0515 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣西花坪 |
| 64 | Pa1-0516 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣西花坪 |
| 65 | Pa1-0517 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣西花坪 |
| 66 | Pa1-0525 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣西花坪 |
| 67 | Pa1-0008 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 68 | Pa1-0012 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 69 | Pa1-0041 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 70 | Pa1-0172 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 71 | Pa1-0216 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 72 | Pa1-0217 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 73 | Pa1-0218 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 74 | Pa1-0219 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 75 | Pa1-0221 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 76 | Pa1-0237 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 77 | Pa1-0240 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 78 | Pa1-0242 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 79 | Pa1-0243 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 80 | Pa1-0247 | <i>Papilio elwesi</i> | 廣東韶關乳源南嶺 |
| 81 | 22LW06314 | <i>Papilio elwesi</i> | 福建龍岩市上杭縣貴和 |
| 82 | 22LW06321 | <i>Papilio elwesi</i> | 福建龍岩市上杭縣貴和 |

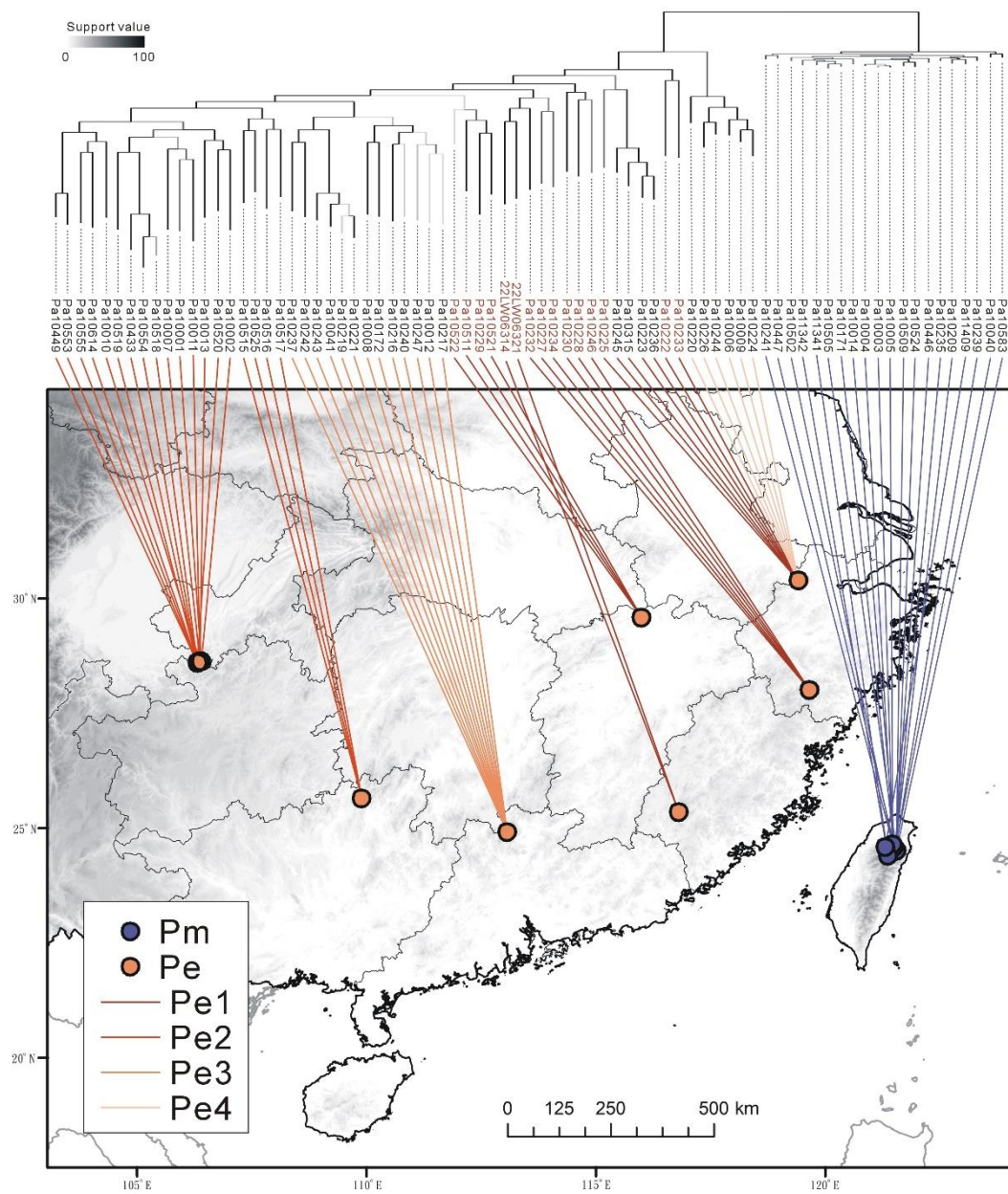
表二、寬尾鳳蝶 ddRAD 定序與組裝結果。

| 編號 | ID | 原始讀數 | 基因組比對讀數 | 平均基因覆蓋度 | 平均定序深度 | 平均鹼基品質 | 平均比對品質 |
|----|----------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
| 1 | Pa-10003 | 807120 | 509033 | 1.56 | 14.51 | 39.65 | 31.86 |
| 2 | Pa-10004 | 1150111 | 857830 | 1.68 | 22.65 | 39.58 | 31.83 |
| 3 | Pa-10005 | 1228082 | 968597 | 1.73 | 24.92 | 39.56 | 32.01 |
| 4 | Pa-10014 | 838357 | 561345 | 1.58 | 15.82 | 39.68 | 32.11 |
| 5 | Pa-10040 | 528081 | 267731 | 1.42 | 8.38 | 39.70 | 32.35 |
| 6 | Pa-10209 | 634770 | 386618 | 1.53 | 11.23 | 39.68 | 31.95 |
| 7 | Pa-10235 | 795441 | 240648 | 1.40 | 7.64 | 39.70 | 32.53 |
| 8 | Pa-10239 | 1640798 | 694287 | 1.63 | 19.00 | 39.50 | 32.06 |
| 9 | Pa-10241 | 489735 | 300331 | 1.45 | 9.23 | 39.58 | 32.20 |
| 10 | Pa-10446 | 835443 | 601399 | 1.64 | 16.30 | 39.69 | 32.23 |
| 11 | Pa-10447 | 696554 | 474030 | 1.69 | 12.54 | 39.65 | 32.43 |
| 12 | Pa-10502 | 605261 | 450083 | 1.73 | 11.58 | 39.60 | 32.34 |
| 13 | Pa-10505 | 1208063 | 833826 | 1.73 | 21.48 | 39.42 | 32.33 |
| 14 | Pa-10509 | 419787 | 271465 | 1.73 | 7.02 | 39.69 | 32.81 |
| 15 | Pa-10524 | 1096441 | 705628 | 1.81 | 17.38 | 39.50 | 32.38 |
| 16 | Pa-10583 | 509759 | 328402 | 1.44 | 10.14 | 39.52 | 32.21 |
| 19 | Pa-11341 | 1289878 | 963611 | 1.75 | 24.46 | 39.44 | 31.20 |
| 20 | Pa-11342 | 1204093 | 885628 | 1.70 | 23.23 | 39.46 | 31.62 |
| 21 | Pa-11409 | 1245739 | 880487 | 1.73 | 22.66 | 39.50 | 31.35 |
| 22 | Pa-10171 | 466244 | 293547 | 1.35 | 9.72 | 39.54 | 30.34 |
| 23 | Pa-10433 | 662995 | 479055 | 1.81 | 11.80 | 39.63 | 32.06 |
| 25 | Pa-10449 | 557366 | 383779 | 2.01 | 8.52 | 39.65 | 33.00 |
| 26 | Pa-10553 | 1035240 | 748037 | 2.25 | 14.80 | 39.60 | 32.38 |
| 27 | Pa-10554 | 1084350 | 849566 | 2.02 | 18.70 | 39.60 | 32.71 |
| 28 | Pa-10555 | 1322196 | 1004283 | 2.08 | 21.49 | 39.23 | 32.02 |
| 29 | Pa-10614 | 1298588 | 897495 | 1.86 | 21.50 | 39.52 | 31.80 |
| 30 | Pa-10229 | 1205719 | 620462 | 1.95 | 14.18 | 39.61 | 32.51 |
| 31 | Pa-10511 | 610277 | 401511 | 1.64 | 10.92 | 39.66 | 31.72 |
| 32 | Pa-10521 | 857098 | 345142 | 1.89 | 8.15 | 39.68 | 32.98 |
| 33 | Pa-10522 | 436605 | 63465 | 1.11 | 2.57 | 39.68 | 33.22 |
| 35 | Pa-10001 | 905985 | 543236 | 1.69 | 14.27 | 39.61 | 31.95 |
| 36 | Pa-10002 | 2170071 | 1608754 | 1.99 | 35.98 | 39.31 | 31.54 |
| 37 | Pa-10007 | 1051054 | 631673 | 1.75 | 16.10 | 39.53 | 32.32 |
| 38 | Pa-10010 | 1304034 | 980656 | 1.83 | 23.93 | 39.42 | 31.80 |
| 39 | Pa-10011 | 1008342 | 717456 | 1.73 | 18.50 | 39.42 | 31.63 |
| 40 | Pa-10013 | 926349 | 687810 | 1.73 | 17.74 | 39.29 | 32.74 |
| 41 | Pa-10518 | 1602683 | 1252005 | 1.98 | 28.15 | 39.31 | 31.93 |
| 42 | Pa-10519 | 1246256 | 959319 | 2.09 | 20.43 | 39.48 | 32.76 |
| 43 | Pa-10520 | 613019 | 395613 | 1.81 | 9.77 | 39.42 | 32.21 |
| 44 | Pa-10006 | 895988 | 527984 | 1.84 | 12.80 | 39.59 | 32.57 |

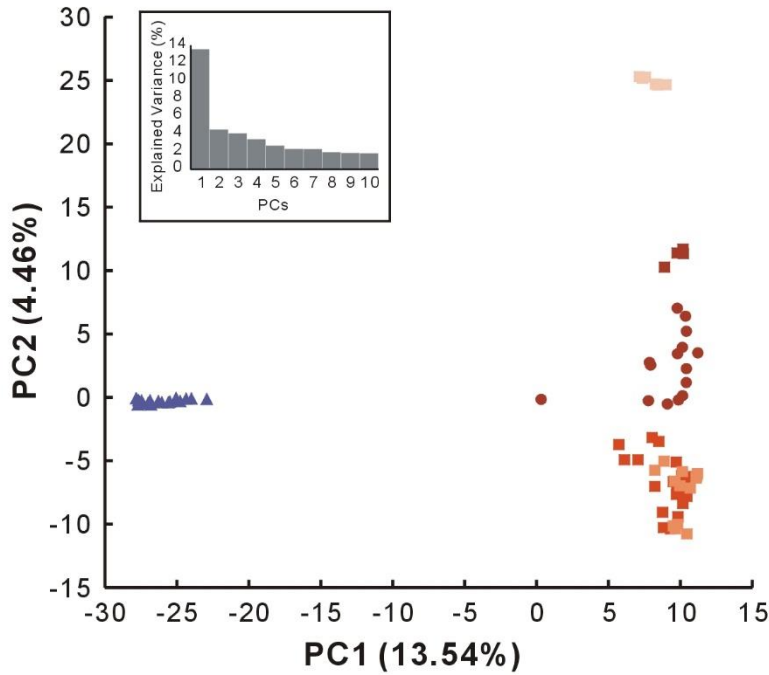
| | | | | | | | |
|----|-----------|---------|---------|------|-------|-------|-------|
| 45 | Pa-10009 | 1016321 | 770975 | 2.00 | 17.23 | 39.64 | 32.39 |
| 46 | Pa-10220 | 1260808 | 944129 | 2.04 | 20.64 | 39.60 | 32.68 |
| 47 | Pa-10222 | 1195332 | 924754 | 2.16 | 19.10 | 39.53 | 32.52 |
| 48 | Pa-10223 | 1111929 | 863713 | 2.04 | 18.87 | 39.51 | 32.58 |
| 49 | Pa-10224 | 1291871 | 949844 | 2.10 | 20.14 | 39.55 | 32.56 |
| 50 | Pa-10225 | 1199583 | 906692 | 1.95 | 20.80 | 39.53 | 32.08 |
| 51 | Pa-10226 | 999795 | 737115 | 1.99 | 16.47 | 39.60 | 32.57 |
| 52 | Pa-10227 | 1268197 | 950306 | 2.00 | 21.13 | 39.58 | 32.53 |
| 53 | Pa-10228 | 1163774 | 862062 | 1.98 | 19.35 | 39.59 | 32.35 |
| 54 | Pa-10230 | 883330 | 693869 | 1.84 | 16.81 | 39.55 | 32.97 |
| 55 | Pa-10232 | 1324111 | 485148 | 1.78 | 12.12 | 39.65 | 32.50 |
| 56 | Pa-10233 | 1026031 | 458133 | 1.69 | 12.08 | 39.67 | 32.50 |
| 57 | Pa-10234 | 1665381 | 665120 | 1.82 | 16.36 | 39.69 | 32.27 |
| 58 | Pa-10236 | 1695916 | 953320 | 1.93 | 22.01 | 39.44 | 31.81 |
| 59 | Pa-10244 | 1724661 | 832093 | 1.87 | 19.86 | 39.43 | 31.86 |
| 60 | Pa-10245 | 853466 | 579423 | 1.81 | 14.24 | 39.58 | 32.08 |
| 61 | Pa-10246 | 777777 | 542366 | 1.85 | 13.05 | 39.48 | 31.97 |
| 62 | Pa-10315 | 1473419 | 898034 | 1.91 | 20.97 | 39.40 | 31.78 |
| 63 | Pa-10515 | 1395363 | 631958 | 1.95 | 14.48 | 39.47 | 32.44 |
| 64 | Pa-10516 | 1322681 | 847347 | 1.95 | 19.34 | 39.41 | 32.15 |
| 65 | Pa-10517 | 1978925 | 745624 | 1.89 | 17.58 | 39.38 | 32.09 |
| 66 | Pa-10525 | 448455 | 253358 | 1.89 | 6.01 | 39.48 | 31.90 |
| 67 | Pa-10008 | 1034465 | 768303 | 1.75 | 19.56 | 39.39 | 31.66 |
| 68 | Pa-10012 | 887642 | 616771 | 1.72 | 15.99 | 39.39 | 31.90 |
| 69 | Pa-10041 | 1356569 | 1032091 | 1.99 | 23.20 | 39.31 | 32.07 |
| 70 | Pa-10172 | 1072737 | 757183 | 1.75 | 19.30 | 39.60 | 31.76 |
| 71 | Pa-10216 | 1056182 | 759887 | 2.00 | 16.91 | 39.41 | 32.92 |
| 72 | Pa-10217 | 969779 | 750606 | 1.86 | 17.95 | 39.57 | 32.82 |
| 74 | Pa-10219 | 1070531 | 784194 | 1.90 | 18.43 | 39.60 | 32.91 |
| 75 | Pa-10221 | 939275 | 675163 | 1.80 | 16.72 | 39.60 | 32.60 |
| 76 | Pa-10237 | 1019619 | 565881 | 1.76 | 14.36 | 39.58 | 32.13 |
| 77 | Pa-10240 | 1537292 | 695084 | 1.82 | 17.00 | 39.59 | 32.45 |
| 78 | Pa-10242 | 1326394 | 868645 | 1.88 | 20.64 | 39.61 | 32.31 |
| 79 | Pa-10243 | 1530536 | 792177 | 1.89 | 18.71 | 39.54 | 32.66 |
| 80 | Pa-10247 | 936612 | 680138 | 2.03 | 14.94 | 39.51 | 31.93 |
| 81 | 22LW06314 | 840243 | 551567 | 1.95 | 12.62 | 39.59 | 32.21 |
| 82 | 22LW06321 | 1040674 | 697398 | 1.82 | 17.08 | 39.58 | 31.78 |



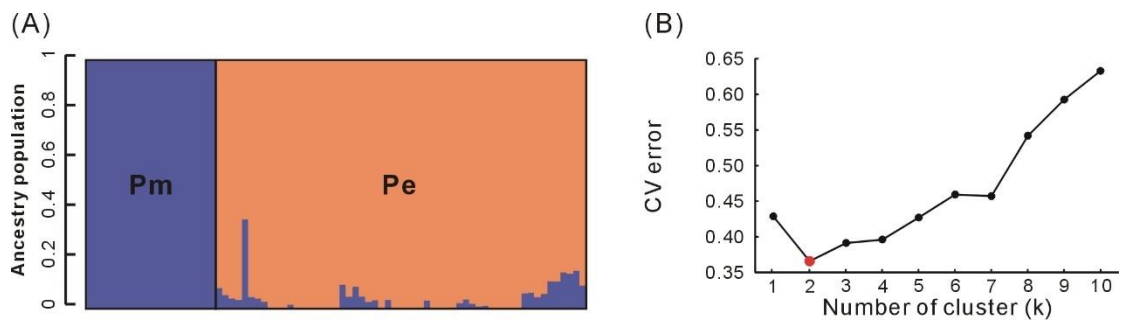
圖一、在寬尾鳳蝶樣本中，根據每個樣本特定的 Barcode 將讀數進行拆分 (demultiplex) 後，每個樣本保留的讀數分布。



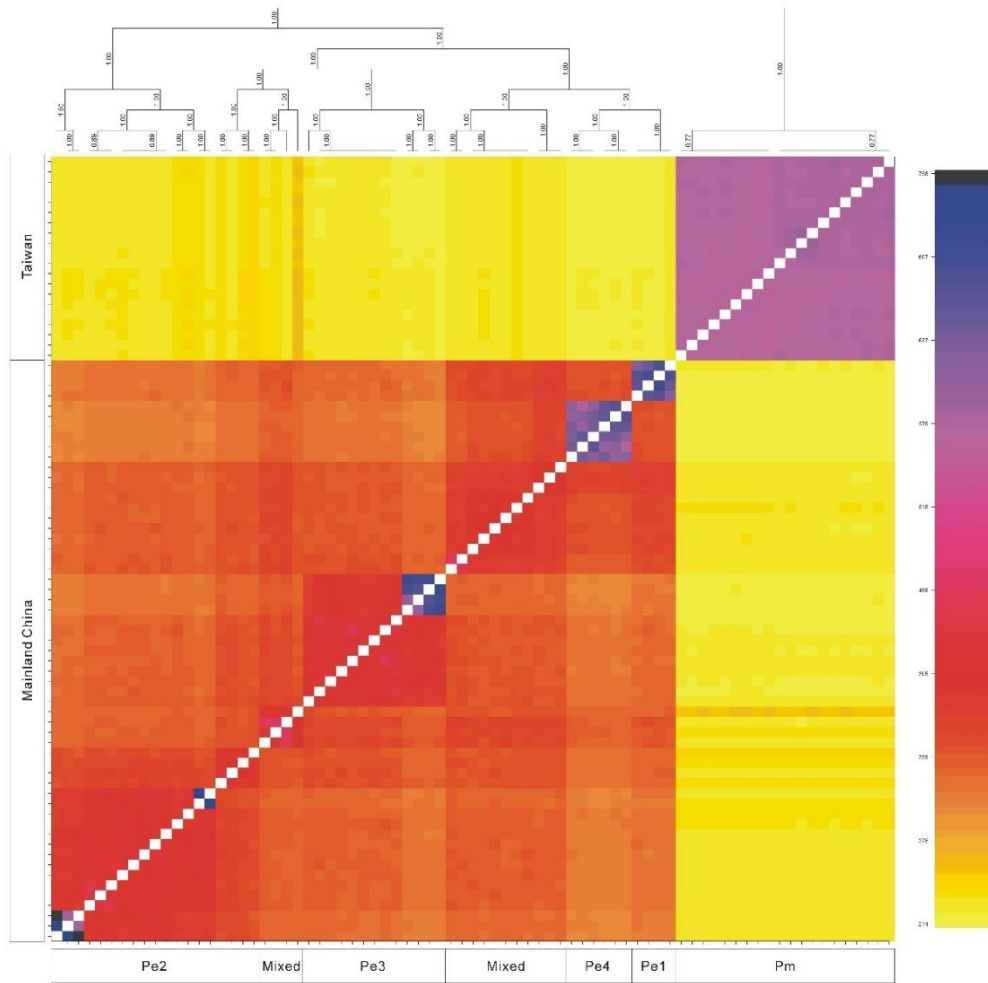
圖二、以 ddRAD 獲得的 SNP 重建臺灣寬尾鳳蝶 (Pm) 與中華寬尾鳳蝶 (Pe) 親緣關係。



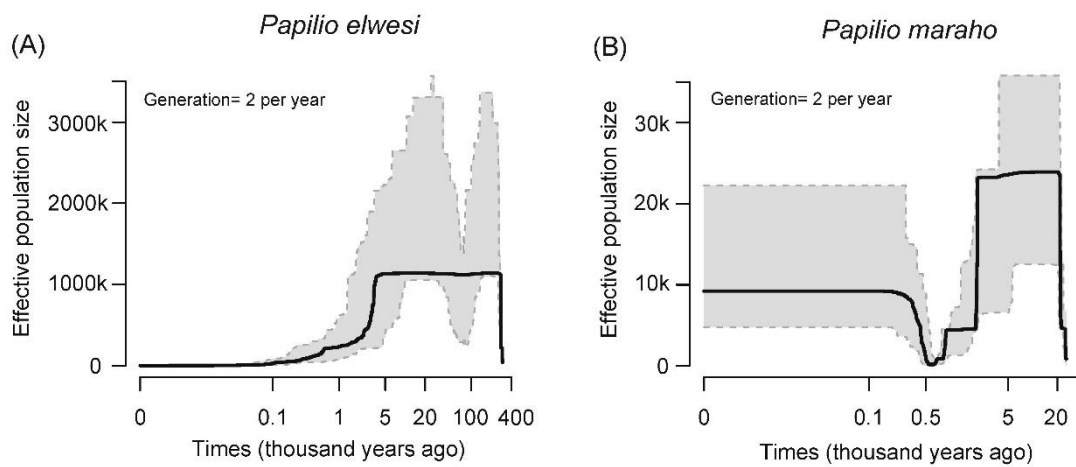
圖三、主成分分析 (PCA) 圖顯示了臺灣寬尾鳳蝶 (藍色) 和中華寬尾鳳蝶 (棕色) 之間明顯的遺傳分群。



圖四、(A) ADMIXTURE 分析顯示臺灣寬尾鳳蝶 (Pm; 藍色) 和中華寬尾鳳蝶 (Pe; 棕色) 的族群結構。(B) 交叉驗證 (CV) 錯誤準則評估最佳的遺傳群體數量。



圖五、RADpainter 和 fineRADstructure 的共同祖先矩陣顯示了臺灣寬尾鳳蝶和中華寬尾鳳蝶之間共同祖先關係。



圖六、基於點位頻率圖譜 (SFS) 所繪之 (A) 中華寬尾鳳蝶和 (B) 臺灣寬尾鳳蝶有效族群量波動。