

東海大學生命科學系

第五十二屆專題論文集

**Class-2010 Senior Research Theses,
Department of Life Science, Tunghai
University**

2010 年 7 月

目錄

【生醫領域】

- 張荷清、郭展延、鄭葳 03
探討咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌增生及移行的影響
- 王淳宇、邱偉欣 21
病毒 IRES 的序列分析
- 曾詠鈿、邱偉欣 51
以 MySQL 建置生物序列資料庫

【生態領域】

- 賴柔潔、喬奕凱、許智皓、關永才 59
馴養與發育對食蟹蛙(*Fejervarya cancrivora*)蝌蚪耐鹽度的影響
- 曹嘉真、汪碧涵 67
杜鵑餅病病原菌 *Exobasidium japonicum* Shirai 的存活策略
- 林泰申、譚博仁、卓逸民 80
雄性溪狡蛛(*Dolomedes raptor*)體色在求偶過程所扮演之角色探討
- 李毓文、汪碧涵 92
以斑蝶共生酵母菌 *Candida* sp. nov. 的核酸指紋追蹤
- 唐瑋勵、卓逸民 105
溪狡蜘蛛時間活動模式及體色功能之探討
- 曾廣瑜、蔡家麟、王嘉瑋、林惠真 119
不同棲地螃蟹觸角腺的差異

探討咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌增生及移行的影響

Effects of caffeic acid phenethyl ester on the proliferation and migration of human coronary smooth muscle cells

張荷清、郭展延、鄭葳

東海大學生命科學系 細胞生物學實驗室

摘要

目前介入性血管修復氣球支架 (infiltrator angioplasty balloon catheter) 是治療動脈粥瘤的常見方法，但支架會傷害動脈內皮細胞而引起發炎反應，過程中產生的生長因子造成內皮下層平滑肌細胞再度增生，從血管中層移行至內膜層，造成血管再狹窄的情形。研究發現，眾多生長因子中，最能促使平滑肌細胞增生及移行的分子是 platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)。接收到 PDGF-BB 刺激的平滑肌細胞會啟動一連串的訊號傳遞 (signal transduction pathway) 而使細胞增生並移行。因此，如果氣球支架能再配合抑制細胞增生及移行的藥物，便能提高支架帶來的臨床效益。熱門健康食品中的蜂膠 (propolis)，其主要活性成分—咖啡酸苯乙酯 (caffeic acid phenethyl ester, CAPE) 已知具有抗發炎、抗增生的特性，故本研究欲瞭解 CAPE 是否能抑制 PDGF-BB 引起的平滑肌細胞增生與移行及其機制。實驗結果顯示，CAPE 能阻礙 MAPK 及 PI3K-AKT 途徑使細胞週期停滯而抑制增生及細胞移行，並改變 Bcl-2 家族蛋白的比例促使粒線體釋出 cytochrome c，進而啟動 caspase-9 去活化 caspase-3 造成 DNA 片段化，最終導致細胞凋亡。實驗結果顯示，CAPE 可提供經由氣球支架手術所引起的再狹窄顯著的療效。

前言

動脈粥樣硬化 (atherosclerosis) 是一種血管慢性發炎的病症。在遺傳、抽菸、高血壓及高血脂等因素下，會使內皮層慢性損傷造成通透性增加，膽固醇因此能進入血管內皮下層並與鈣離子沉澱於血管壁，加上平滑肌細胞的增生及移行，形成脂質斑塊阻礙血流 [1]。當粥瘤形成在腦血管可能導致中風，若在冠狀動脈則造成心絞痛甚至心肌梗塞。自 1995 年起，經皮介入性治療 (percutaneous

coronary intervention, PCI) 是治療冠狀動脈疾病的主要方式，相較冠狀動脈繞道手術，有傷口小恢復期短等優點，但再狹窄發生的機率有 17%至 61%，其中需考慮病人本身的狀況，像是本身患有糖尿病或尿毒症就會提升再狹窄機會。所以再配合金屬支架支撐管壁維持血管結構，但仍有 20%~30%的病人在手術後六個月會有血管再狹窄 (restenosis) 的現象，發生原因主要是氣球擴張術或支架傷害到血管壁而引起發炎反應，使平滑肌細胞大量增生並移行至血管內膜 [2]。在正常

情況下，位於血管中層的平滑肌細胞會受內皮細胞及細胞外基質 (extracellular matrix) 的影響維持在停止生長的收縮型 (contractile phenotype)，因此賦予血管足夠的彈性，但周圍環境改變時，如發炎分子或生長因子的刺激，將使細胞型態轉為合成型 (synthetic phenotype)，此時收縮型結構蛋白 (如 alpha-actin、smoothlin 等) 表現量降低，並啟動細胞週期而增生並移行 [3]。發炎反應產生的眾多生長因子中，PDGF-BB 是刺激平滑肌細胞增生及移行的主要分子 [4]，雖然其他生長因子也具有相同效果，如 PDGF-AA、IGF-1 等，但過去研究顯示，在相同濃度的情形下，PDGF-BB 刺激平滑肌細胞的 DNA 合成量分別比 PDGF-AA 及 IGF-1 高 2 倍及 10 倍；誘導平滑肌細胞移行的數量比 IGF-1 多出 2 倍，而經過 PDGF-BB 刺激的平滑肌細胞也具有較旺盛的 MAPK 活性，造成這些現象的主要原因在於，平滑肌細胞擁有 PDGF-BB 受器 (PDGFR- β 及 α) 比 PDGF-AA 及 IGF-1 的受器分別多出 12 及 15 倍 [5]。

當 PDGF-BB 結合到平滑肌細胞膜上 receptor tyrosine kinase (RTK) 後，啟動血管平滑肌細胞的訊號傳遞 (signal transduction pathway)，經由 MAPK pathway

：RTK+PDGF-BB \rightarrow RAS \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK \rightarrow transcription factor 來活化細胞週期需要的基因，如轉譯出 cyclin D₁ 蛋白 [6]，使原本停止生長的血管平滑肌細胞再度進入細胞週期中的 G₁ 時期。在動物實驗中，比較大鼠受氣球擴張術刺激而移行到血管內膜的平滑肌細胞 (intimal smooth muscle cell) 及位在血管壁中層的正常平滑肌細胞 (medial smooth muscle cell)，在初代培養下，發現內膜平滑肌細

胞較中層平滑肌細胞易有增生的現象。若在相同培養環境下，內膜平滑肌細胞增生速度較中層平滑肌細胞快，甚至內膜平滑肌細胞在低血清情況下仍可增生，且內膜平滑肌細胞較中層平滑肌細胞有較活躍的類生長因子活動 (PDGF-like activity) [7]。此外，在高濃度 PDGF-BB 的環境下，平滑肌細胞凋亡的比例也會下降 [8]。

最近以飲食來預防或減輕動脈粥瘤發生及惡化的趨勢相當普遍。熱門健康食品「蜂膠」其主要活性成分咖啡酸苯乙酯 (caffeic acid phynethyl ester, CAPE) 具有抗發炎、抗癌，抗氧化及免疫調控等特性 [9]。CAPE 屬於多酚類 (polyphenolic) 化合物，有文獻指出低濃度的多酚化合物可活化抗氧化基因來抑制細胞癌化，而高濃度會使細胞進入凋亡 [10]。經實驗證明，CAPE 可藉由使粒線體失去功能、耗盡 GSH 及選擇性得除去過氧化氫使 HL-60 cell 凋亡。另外，咖啡酸及苯乙醇是 CAPE 的主要代謝物，但實驗顯示咖啡酸及苯乙醇並不如 CAPE 具有抑制生長的效果，可能原因是 CAPE 相較於其代謝物更具親脂性，以致於更易於進入細胞中，當 CAPE 進入細胞後，將被脂酶水解成具活性的化合物，以展現其生物功能 [11]。

除了促進凋亡，CAPE 能抑制環氧化酶 (cyclooxygenase) 及轉錄因子 nuclear transcription factor kappa-B (NF- κ B) 的活性，而這兩種分子是產生發炎的關鍵因素 [12]。CAPE 並可使 C6 glioma cell 的細胞週期停留在 G₀/G₁ 達到抑制腫瘤細胞的增生 [9]，也能阻礙血小板造成的血液凝集 [13]。動物實驗方面，已有實驗證明因氣球擴張術而生成新生內膜的高血壓大鼠在餵食咖啡酸苯乙

酯後，動脈粥樣硬化的形成有減緩的趨勢 [14]。

然而，在臨床醫療中對於支架本身要配合何種藥物，才能為降低再狹窄機率提供有效的局部性治療仍未發現。故本實驗想先了解 CAPE 在細胞培養環境下對人類冠狀動脈平滑肌細胞增生及移行的抑制情形並探討其機制，未來可做為動物實驗及臨床實驗的參考。

材料方法

細胞培養

將 1×10^5 個人類冠狀動脈平滑肌細胞 (PromoCell, 德國) 種在裝有 Medium199 (GIBCO, 美國) T25 培養盒，培養液內含 10% 胎牛血清、0.25% 牛腦下垂體萃取液及每毫升一單位的抗生素 (Sigma, 美國) 培養於 37°C ，二氧化碳濃度 5% 的培養箱中，培養液每兩天換一次。當長至培養盒八、九成時，抽掉舊培養液後加入 3 ml 胰蛋白酶 (trypsin) 置於室溫 1 至 2 分鐘分離細胞，接著加入 3 ml 培養液來終止胰蛋白酶作用。以懸吊式離心機 1200 rpm 離心 5 分鐘後除去上清液，加入 6 ml 培養液將細胞分成兩盒做繼代培養。

PDGF-BB 對平滑肌細胞增生的影響

將 1×10^5 個細胞分別種在含 M199 培養液的六孔培養盤中。48 小時後，換成含不同濃度 PDGF-BB (0、12.5、25、50、100 ng/ml) (Sigma, 美國) 的 M199 培養液，在不同時間點 (0、6、12、24、48 小時) 以血球計數器算出細胞數，建立細胞生長曲線以找出使細胞增生最適合的 PDGF-BB 劑量，以做為後續實驗的參考。

CAPE 對 PDGF-BB 刺激平滑肌細胞增生的影響

決定刺激平滑肌細胞增生的 PDGF-BB 濃度後，將 1×10^5 個細胞分別種在含 M199 培養液的六孔培養盤中，48 小時後，換成含最適濃度的 PDGF-BB 及不同濃度 CAPE 的 M199 培養液培養，CAPE 濃度分別為 0、10、30、90 μM 。在培養 0、6、12、24、48 小時後用血球計數器算出細胞數並以 trypan blue 區分出死亡細胞，建立生長曲線觀察在 PDGF-BB 刺激細胞生長的情況下，不同濃度的 CAPE 對細胞抑制增生的能力及存活率的影響。

PDGF-BB 對平滑肌細胞移行的影響

將 1×10^5 個細胞分別種在含 M199 培養液的六孔培養盤，待細胞長滿後 (即為 100% confluence)，以無菌吸管尖端刮出一寬 0.4 mm 的空間，並加入 4 μM cytosine •-D-arabinofuranoside (ara-c) (sigma, 美國) 培養於 37°C 、二氧化碳濃度 5% 的培養箱中，4 小時後一組加入指定濃度的 PDGF-BB，另一組不加。計算 0、6、12、24、48 小時後以相差顯微鏡拍下移行到刮痕內的細胞，並數出跨越的細胞數，以此判斷 PDGF-BB 對細胞移行的影響。Ara-c 能抑制 DNA 複製，因此能確認移向刮痕區的細胞是移行而非增生。

CAPE 對 PDGF-BB 刺激平滑肌細胞移行的影響

將 1×10^5 個細胞分別種在含 M199 培養液的六孔培養盤，待細胞長滿後 (即為 100% confluence)，以無菌吸管尖端刮出一寬 0.4 mm 的空間，並加入 4 μM cytosine •-D-arabinofuranoside (ara-c)

(sigma, 美國), 培養於 37°C, 二氧化碳濃度 5% 的培養箱中 4 小時後, 分別加入 PDGF-BB 與不同濃度 CAPE (0、10、30、90 μ M) 的混合液。計算 0、6、12、24、48 小時後以相差顯微鏡拍下移行到刮痕內的細胞, 並數出跨越的細胞數, 以此判斷 CAPE 對 PDGF-BB 刺激平滑肌細胞移行的影響。

DNA 片段化分析

此部分以 Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit (Gene Mark) 進行。將待測細胞連同培養液收至離心管中, 以 2500 rpm 離心 5 分鐘後棄上清液。接著加入 1 倍 PBS 清洗細胞, 離心 1 分鐘後棄上清液 (以下離心皆以 14000 g 進行)。加入 200 PBS 與沉澱物混勻後加入 4 μ l RNase A 於室溫下反應 5 分鐘, 再加入 20 μ l proteinase K solution 及 200 μ l binding buffer, 所有溶液混合均勻後並在 56°C 水浴中作用 30 分鐘至 1 小時, 直至細胞溶解完全後, 離心 5 分鐘去除細胞碎片。在萃取液中加入 200 μ l 100% EtOH 並混勻, 將所有液體移至套於收集管的 column, 離心 1 分鐘棄濾液。在 column 中加入 300 μ l binding buffer, 離心 1 分鐘後棄濾液。隨後加入 700 μ l washing solution 並離心 1 分鐘棄濾液, 此步驟做 2 次後再空離 5 分鐘使 EtOH 完全去除。最後將 column 放入新的收集管, 並在 column 內加入 37.5 μ l 的 70°C Elution buffer 反應 2 分鐘後離心 5 分鐘, 使 DNA 被沖洗下來。將定量的 DNA 在 1.8% 內含 EtBr 的洋菜膠中以 100 伏特進行電泳。40 分鐘後將洋菜膠照紫外光以觀察 DNA 的狀況。

細胞質及粒線體的 cytochrome c 分離

法

細胞收集好後, 與冰的 1 倍細胞質萃取液 (含蛋白酶萃取液) (Biovision, Mountain view, CA, 美國) 作用 10 分鐘, 接著於 4°C 下以 700 g 離心 10 分鐘, 再將上清液以 10000 g 離心 30 分鐘, 使細胞質 (上清液) 與粒線體 (沉澱物) 分離。最後, 將沉澱物與粒線體萃取液 (含蛋白酶萃取液) (Biovision, Mountain view, CA, 美國) 混勻並震盪 10 秒鐘以獲得純化的粒線體蛋白。萃取出細胞質及粒線體蛋白以西方點墨法做進一步分析。此外, 因 prohibitin 是粒線體特有蛋白, 故以此作為粒線體蛋白標記。

蛋白質濃度測定

待測細胞於 4 °C 預冷 15 分鐘後收集培養液, 加入 1 ml/well PBS 並以細胞刮板收集細胞, 再以 1 ml PBS 沖洗培養盤並回收, 最後將細胞混合液在懸吊式離心機以 2500 rpm 離心 5 分鐘, 棄置上清液後以 1 ml PBS 清洗細胞, 以懸吊式離心機以 2500 rpm 離心 5 分鐘, 棄置上清液。接著加入 lysis buffer (protease inhibitor: RIPA=1:100) 以超音波震盪器震 (sonicator) 震 30 分鐘, 接著在冷凍離心機以 4°C、10000 g 離心 15 分鐘來分離出蛋白質。以 THERMO BCA Protein Assay Kit 測定蛋白質濃度, 取 A 液 B 液混合液 (50:1) 1 ml, 各標準濃度 (0、250、500、1000、1500、2000 mM) 的蛋白質液 10 μ l, 蛋白質樣本液 2 μ l, 以 50 °C 烘箱烘 30 分鐘後, 冰 5 分鐘, 最後用熱機的分光光度計波長 562 nm 偵測濃度。

電泳、轉漬及西方點墨法

在測定蛋白質濃度後, 取 30 μ g 蛋白質在 12% 聚丙醯胺電泳膠及 running buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine,

0.1% SDS) 中分離不同分子量的蛋白質。焦集膠體施加 50 伏特，到分離膠體時施加 90 伏特電壓。以 transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, 20% MeOH) 半乾式轉漬器 (Bio-Rad, 美國) 施加 20 伏特 400 毫安培 35 分鐘，將聚丙醯胺膠上的蛋白質轉漬到以用甲醇處理的 PVDF 膜上，隨後將膜放進含 5% 脫脂牛奶的 PBST 緩衝液 (0.05% PBS, Tween20) 填補孔洞以 PBST 浸洗 3 次，使用的一級抗體有小鼠抗人類 cyclin D₁、小鼠抗人類 cyclin A、兔子抗人類 cyclin B₁、兔子抗人類 cyclin E、小鼠抗人類 CDK4、小鼠抗人類 CDK2、小鼠抗人類 CDK1、小鼠抗人類 bcl-2、兔子抗人類 bad、兔子抗人類 caspase 9、兔子抗人類 caspase 3、小鼠抗人類 caspase 8、小鼠抗人類 cytochrome c、兔子抗人類 MEK、兔子抗人類 MEK (phosphor S222)、小鼠抗人類 ERK1/2、小鼠抗人類 ERK1/2 (phospho T185 + Y187)、兔子抗人類 AKT、兔子抗人類 AKT (phospho S473)、皆以 PBST 稀釋成 1:1000。在加入一級抗體後置於 4 °C。隔天回溫 30 分鐘後以 PBST 洗三次，每次 5 分鐘，接著加入山羊抗小鼠 HRP 接合抗體 (peroxidase conjugated secondary antibody 1:3000，以 PBST 稀釋) 或山羊抗兔子 HRP 接合抗體反應一小時，以 PBST 洗三次，每次 5 分鐘，以呈色劑 (Millipore, 美國) 顯色並以冷光影像感應系統 (Fuji, 日本) 拍攝觀察。

結果

PDGF 能促進平滑肌細胞增生及移行

以血球計數器的計數結果顯示，

PDGF 促進增生的效果隨計量增加而提升，且處理 12.5 ng/ml PDGF-BB 6 小時後即達到顯著差異 (Fig. 1A)。移行測定結果則在處理 12.5 ng/ml PDGF-BB 12 小時後出現顯著差異，但在 25 ng/ml PDGF-BB 刺激下的細胞，具有更明顯的移行能力，而 50 及 100 ng/ml 處理下的移行趨勢與 25 ng/ml 類似 (Fig. 1B)。此外，因參考其他相關研究的實驗方法 [15]，故選擇 25 ng/ml PDGF-BB 進行後續實驗。

CAPE 抑制 PDGF-BB 引起的平滑肌細胞增生及移行

計數結果顯示，CAPE 抑制 PDGF-BB 引起的增生效果隨計量增加而提升，尤其處理 10 μ M 及大於 10 μ M 濃度的 CAPE 24 小時後達到顯著差異 (Fig. 2A)。為了解其中是否有細胞死亡，故以 trypan blue 測定細胞存活率，參考其他相關論文的判定方法，當存活率降到 90% 以下時才定義該劑量具細胞毒性 [16]，所以施加 10 μ M CAPE 6 小時後，存活率下降至 89%，判斷為出現細胞毒殺現象 (Fig. 2B)。移行測定結果可知處理 10 μ M CAPE 12 小時後即出現顯著差異。所以 CAPE 具有抗移行的特性 (Fig. 3B)。

CAPE 使細胞週期的蛋白量下降

為了瞭解 CAPE 抑制細胞增生的過程中，細胞週期是否已受影響，所以我們以西方點墨法顯示屬於 G1 時期的 cyclin D₁、CDK4，S 時期的 cyclin E、CDK2、cyclin A 及 G2 時期的 cyclin B₁、CDK1。結果顯示所有分子的表現都隨著 CAPE 劑量增加而有下降的趨勢，並非只影響特定時期的分子表現 (Fig. 4)。

CAPE 減少 MEK、ERK、AKT 及其活化態的表現量

此部分的實驗中 MEK 及 ERK 屬於 MAPK 途徑，AKT 則屬於 PI3K-AKT 途徑，這兩種途徑除了使 cyclin D1 表達造成細胞增生外，也維持細胞的存活。西方點墨法顯示這三種蛋白的表現量隨 CAPE 劑量上升而下降 (Fig. 5A)，另外，由 Fig. 5A 也可看出活化態的磷酸化蛋白下降趨勢較總量明顯。將活化態的 phospho-MEK 及 phospho-ERK1/2 量化的結果顯示，兩者皆在 10 μ M CAPE 處理 24 小時後 (Fig. 5B, 5C)，下降量達顯著差異。

CAPE 可經由內因性途徑使細胞凋亡

在前部分的存活曲線顯示 10 μ M CAPE 對平滑肌細胞具毒殺性，為釐清是何種死亡情形，我們以 DNA 電泳觀察 DNA 的狀態。若為壞死現象 DNA 會呈現散狀 (smear)；若是凋亡，會造成 DNA 片段化 (fragmentation)，故出現梯狀 (ladder)，結果顯示處理不同濃度的 CAPE 72 小時後，30 μ M 就會造成 DNA 片段化 (Fig. 6)。為了瞭解是經由內因性或外源性途徑造成細胞凋亡，故以西方點墨法分析 Bcl-2 家族蛋白、caspase cascade 的表現及粒線體釋出 cytochrome c 的情形。由 Fig. 7A 可知屬於內因性途徑的 Bcl-2 家族中，抗凋亡蛋白 Bcl-2 在施加 CAPE 後 48 小時後出現隨劑量增加少的情形，而促凋亡蛋白 Bax 則相反，這兩種蛋白的變化量分別在施加 10 μ M 及 30 μ M CAPE 48 小時後達顯著差異，而兩者均在較高劑量的 CAPE 處理後亦達顯著差異 (Fig. 7B, 7C)。細胞質中的 cytochrome c 隨 CAPE 劑量增

加，從粒線體釋出的量由 25 % 提升至 95% (Fig. 7D, 7E)，其下游的 caspase-9，也在施加 CAPE 48 小時後活化態的表現量增加，下游的 caspase-3 也有增加的情形 (Fig. 8A)，量化結果顯示，這兩種活化的 caspase 皆在施加 10 μ M CAPE 48 小時後達顯著差異 (Fig. 8B, 8C)。然而，屬於外源途徑的 caspase-8 則未隨 CAPE 濃度增加而增加 (Fig. 8A)。據此推測 CAPE 主要經由內因性途徑使平滑肌細胞凋亡。

討論

目前在動物實驗中已證明 CAPE 可減少因氣球擴張術引起的再狹窄 [17]，但詳細機制尚未探討。本實驗結果顯示，在 10 μ M CAPE 處理下能夠有效抑制 PDGF-BB 引起的細胞增生。為了瞭解 CAPE 是否影響細胞週期的進行，我們以西方點墨法觀察相關分子的表現量，由結果可知由 G1 到 G2 時期的相關分子皆有下降的趨勢，並非使特定時期的分子減少表現。過去的研究顯示，處理 CAPE 24 小時後，能使 C6 glioma cell 的細胞週期停止在 G1 時期，並使參與 G1 時期的 cyclin D₁ 表現量下降 [10]。本實驗結果顯示，PDGF-BB 刺激過的細胞在施加 CAPE 24 小時後 cyclin D1 即有表現減少的趨勢，據此推測 24 小時之內，細胞週期可能停滯於 G1 時期，使其下游的相關分子 (如 cyclin E、cyclin A 及 CDK1 等) 的基因表達也減少 [18]，但細胞週期的分佈狀況仍須以流式細胞儀作更進一步分析。

為了瞭解 CAPE 是影響何種訊息途徑抑制細胞週期的進行，我們也觀察 MAPK 途徑相關分子的表現情形。由結

果可見 CAPE 在 24 小時使磷酸化 MEK 及 ERK 的表現量下降，也使在細胞存活中扮演要角的磷酸化 AKT 隨 CAPE 劑量增加而減少。雖然在 Fig.5A 可見 MEK、ERK 及 AKT 的總量都隨 CAPE 劑量增加而減少，但因磷酸化蛋白下降情形比總量明顯，所以我們推測 CAPE 使活化態訊息分子減少，不完全是因為總量的降低，至於 CAPE 是否抑制激酶或是活化去磷酸酶則可再深入探討。

由 Fig. 2B 的存活曲線可知，CAPE 會降低細胞的存活率，再者，已有文獻指出高劑量的多酚類化合物會造成正常細胞凋亡 [10]，所以我們推測可能有細胞凋亡發生。將平滑肌細胞處理不同劑量的 CAPE 72 小時後，以洋菜膠分析 genomic DNA 的狀態，Fig. 5 顯示出 30 μ M CAPE 處理下出現細胞凋亡的指標現象—DNA 片段化，雖然在施加 10 μ M CAPE 即出現細胞毒性，但可能死亡的細胞數不夠所以此方法無法觀察到 DNA 片段化。對於氣球擴張術之後內皮損傷的傷口復原，細胞增生與凋亡數量的恆定是不可或缺的。理論上細胞增生活性越高，凋亡也應增加 [19]，若彼此失衡將導致的內膜增厚而形成再狹窄。其中，很重要的原因是細胞凋亡的比例下降 [19、20]。已有研究指出，將抗凋亡蛋白 Bcl-x 的反向寡聚核苷酸輸送到內膜形成部位，可引起凋亡甚至減緩心血管疾病 [21]，此結果說明 Bcl-2 家族蛋白參與內膜的形成或使內膜穩定存在。本實驗可知，CAPE 能藉由調控 Bcl-2 家族蛋白使平滑肌細胞經由內因性途徑使細胞凋亡。除此之外，細胞週期停止常伴隨移行的細胞數減少甚至造成細胞凋亡 [8、10]，所以在本實驗中 CAPE 可能透過停滯的細胞週期啟動細胞凋亡機制，但兩者之間是否有直

接關係仍待確認。而移行測定結果中，雖然 CAPE 使移向刮痕的細胞數減少，但在非刮痕區的細胞有大量懸浮的細胞，我們推測 CAPE 對於平滑肌細胞的毒殺性大於抗移行的能力。

CAPE 具多種生物活性，其中重要的能力即為促進凋亡。前文提及的 ERK 及 AKT 除了促進細胞增生也能抑制細胞進入凋亡。過去研究發現 MEK 及 AKT 分別能磷酸化 Bad 的 serine112 及 136，抑制其活性以維持細胞存活，ERK 也能磷酸化 CERB (cAMP response element binding protein) 於 serine 133 [22]，或是抑制 Bcl-2 功能的促凋亡蛋白 Bim [23]，抑制凋亡發生。但 CAPE 是否也經由這幾種途徑促使細胞凋亡仍有待證明。CAPE 透過凋亡機制維持細胞數目的恆定對於支架所產生的傷口是好的現象，因相較於壞死所產生的發炎反應，若使增生的細胞走向凋亡後周圍組織代謝掉，更能維持傷口的穩定性。

自從得知平滑肌細胞是再狹窄主要致病因子後，已有許多天然化合物已被發現也能抑制平滑肌細胞的增生及移行，如黃蓮及燕麥萃取物 [24、25]，甚至在已上市的塗藥性支架上的藥物 sirolimus 也是主要作用於平滑肌細胞 [26]，雖然相較於一般金屬支架，使用塗藥性支架僅剩下 5%至 10%的再狹窄率 [27]，但仍有發生的危險，除了患者本身因素之外，sirolimus 會抑制血管的再內皮化 (reendothelialization) [28] 且其高氧化壓力會干擾內皮細胞連結分子 VE-cadherin 的表現 [29]，使支架造成的傷口短時間內難以復原。已有實驗證實，CAPE 在適當濃度下能維持人類血管的內皮細胞的存活 [30]，且其抗氧化的特性有助於表皮傷口的復原 [31]，但是否

與助於恢復血管內皮的傷口仍須證實。

總之，CAPE 在本實驗中展現其抗增生，抗移行及促進細胞凋亡的特性。它阻礙 MAPK 途徑使細胞週期停止，以抑制平滑肌細胞的增生及移行。而細胞週期的停滯可能啟動凋亡途徑，造成 Bcl-2 家族蛋白的比例改變，使粒線體釋出 cytochrome c 而啟動內因性途徑分子 caspase-9，進而促使 caspase-3 活化 DNA 內切酶使 DNA 片段化導致細胞凋亡。未來若能更進一步證實 CAPE 有利於再內皮化，則能提升它對抗血管再狹窄的潛力。

參考文獻

1. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001;104:503-516.
2. Chang CC, Ong ET. Coronary restenosis. *Acta Cardiol Sin* 2005;21:177-189.
3. Rensen SSM, Doevendans PAFM, Eys GJJM. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart J* 2007;15:100-108.
4. Zimmermann O, Zwaka TP, Marx N, Torzewski M, Bucher A, Guillard P, Hannekum A, Hombach V, Torzewski J. Serum starvation and growth factor receptor expression in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 2006;43:157-165.
5. Bornfeldt KE, Raines EW, Graves LM, Skinner MP, Krebs EG, Ross R. Platelet-derived Growth Factor: Distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation. *Annals New York Acad Sci* 1995;12:416-430.
6. Karp GC. *Cell and molecular biology*. 5th edition:638-641.
7. Walker LN, Bowen DF, Ross R, Reidy MA. Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:7311-7315.
8. Gibbons GH, Dzau VJ. *Molecular Therapies for Vascular Diseases*. *Sci* 1996;272:689-693.
9. Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, Lin WL, Chou FP, Tseng TH. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2006;234:199-208.
10. Owuor ED, Kong AN. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 2002;64:765-770.
11. Chen JH, Shao Y, Huang MT, Chin CK, Hoa CT. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett* 1996;108:211-214.
12. Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of

- activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:9090-9095.
13. Chen TG, Lee JJ, Lin KH, Shen CH, Chou DS, Sheu JR. Antiplatelet activity of caffeic acid phenethyl ester is mediated through a cyclic GMP-dependent pathway in human platelets. *Chi J Physiol* 2007;50(3):121-126,
 14. Maffia P, Ianaro A, Pisano B, Borrelli F, Capasso F, Pinto A, Ialenti A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester in a rat model of vascular injury. *Br J Pharmacol* 2002;136:353-360.
 15. Chen CN, Li JYS, Yeh YT, Lee PL, Usami S, Chien S, Chiu JJ. Synergistic roles of platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1 in phenotypic modulation of human aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:2665-2670.
 16. Wang X, Stavchansky S, Bowman PD, Kerwin SM. Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells. *Bioorg Med Chem* 2006;14:4879-4887.
 17. Ho HC, Hsu SL, Ting CT, Kuo CY, Yang VC. Caffeic acid phenethyl ester inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using a local delivery system. *Cell Mol Biol* 2009;55:1161-1167.
 18. S'anchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Seminars Cell Develop Biol* 2005;16:311-321.
 19. Mayr M, Xu Q. Smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *Exp Gerontol* 2001;36:969-987.
 20. Mallat Z, Alain T. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Bri J Pharmacol* 2000;130:947-962.
 21. Biro S, Fu YM, Yu ZX, Epstein SE. Inhibitory effects of antisense oligodeoxynucleotides targeting c-myc mRNA on smooth muscle cell proliferation and migration. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:654-658.
 22. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Sci* 1999;286:1358-1362.
 23. Harada H, Quearry B, Ruiz-Vela A, Korsmeyer SJ. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates Bim, inhibiting its association with Bax and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:15313-15317.
 24. Liang KW, Yin SC, Ting CT, Lin SJ, Hsueh CM, Chen CY, Hsu SL. Berberine inhibits platelet-derived growth factor-induced growth and

- migration partly through an AMPK-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Europ J Pharmacol* 2008;590:343–354.
25. Nie L, Wise ML, Peterson DM, Meydani M. Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. *Atheroscler* 2006;186:260–266.
26. Inoue T, Node K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents. *Circ J* 2009;73: 615-621.
27. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003;349:1315–1323.
28. Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont E, Gold HK, Virmani R. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1500-1510.
29. Oroszlán M, Bieri M, Ligeti N, Farkas A, Koestner SC, Meier B, Mohacsi PJ. Proliferation signal inhibitor-induced decrease of vascular endothelial cadherin expression and increase of endothelial permeability in vitro are prevented by an anti-oxidant. *J Heart Lung Trans.* 2008;27:1311-1318.
30. Wang XY, Stavchansky S, Zhao BT, Bynum JA, Kerwin SM, Bowman PD. Cytoprotection of human endothelial cells from menadione cytotoxicity by caffeic acid phenethyl ester: the role of heme oxygenase-1. *Europ J Pharmacol.* 2008;591:28–35.
31. Serarslan G, Altug E, Kontas T, Atik E, Avci G. Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol* 2007;32: 709–715.

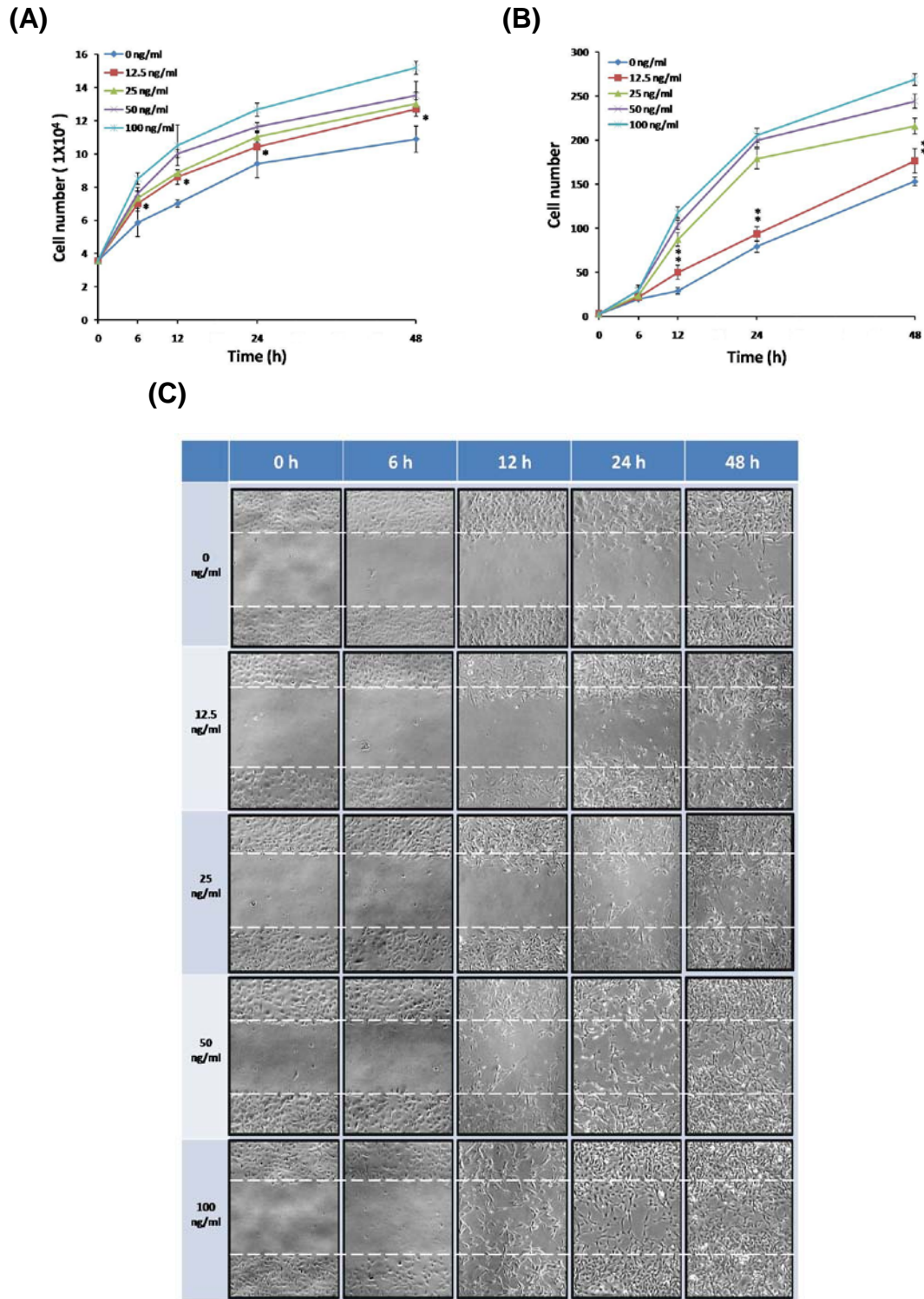
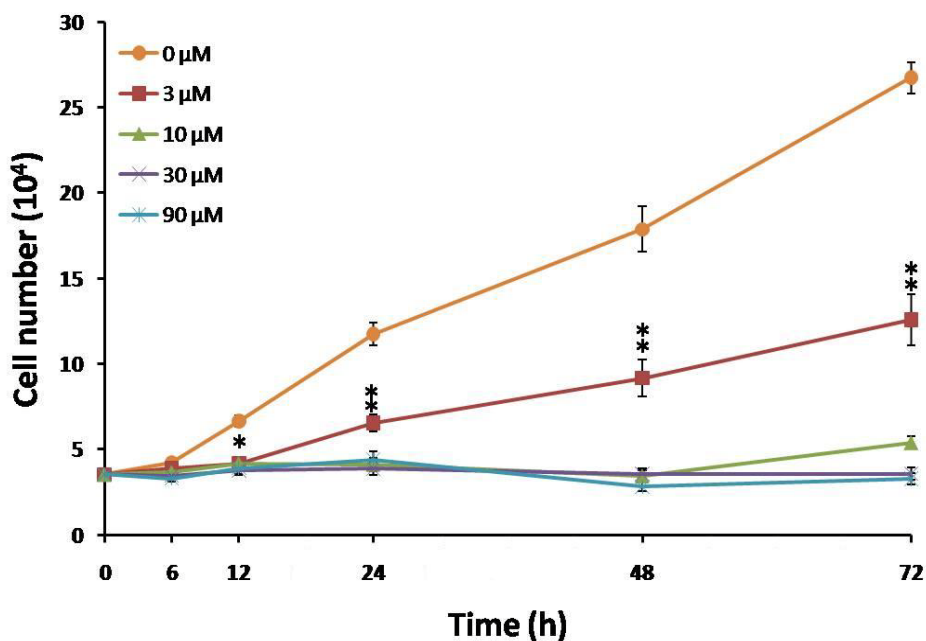


Fig. 1 PDGF-BB 能促進平滑肌細胞增生及移行。(A) 處理 PDGF-BB (0、12.5、25、50、100 ng/ml) 於指定時間 (0、6、12、24、48 小時) 後，以血球計數器計算細胞數 (A)。在移行測定中，計算刮痕中的細胞數(B)，並以像差顯微鏡拍攝細胞移行的狀況 (40 X) (C)。(n=3, *p<0.05, **p<0.01, 與控制組比較。)

(A)



(B)

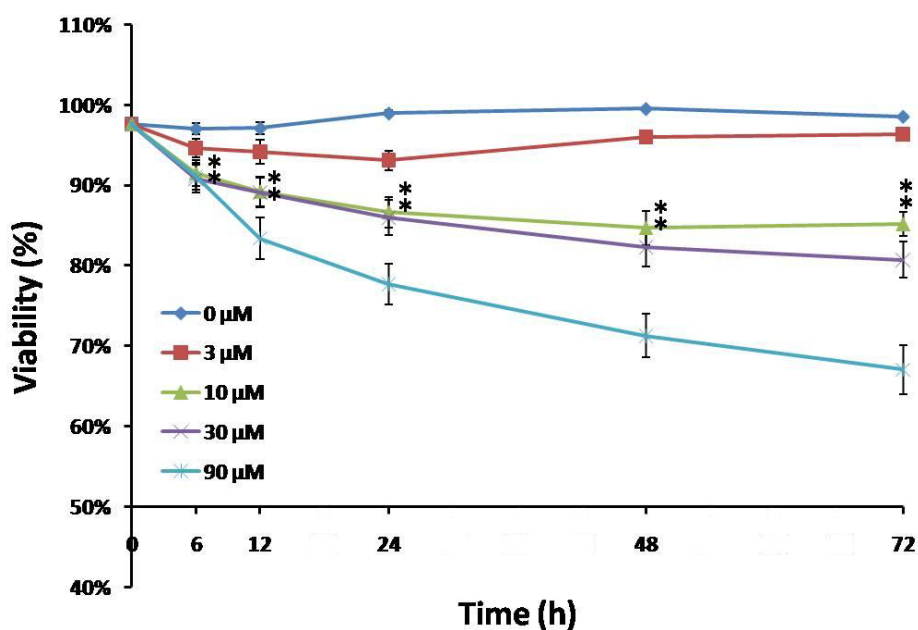
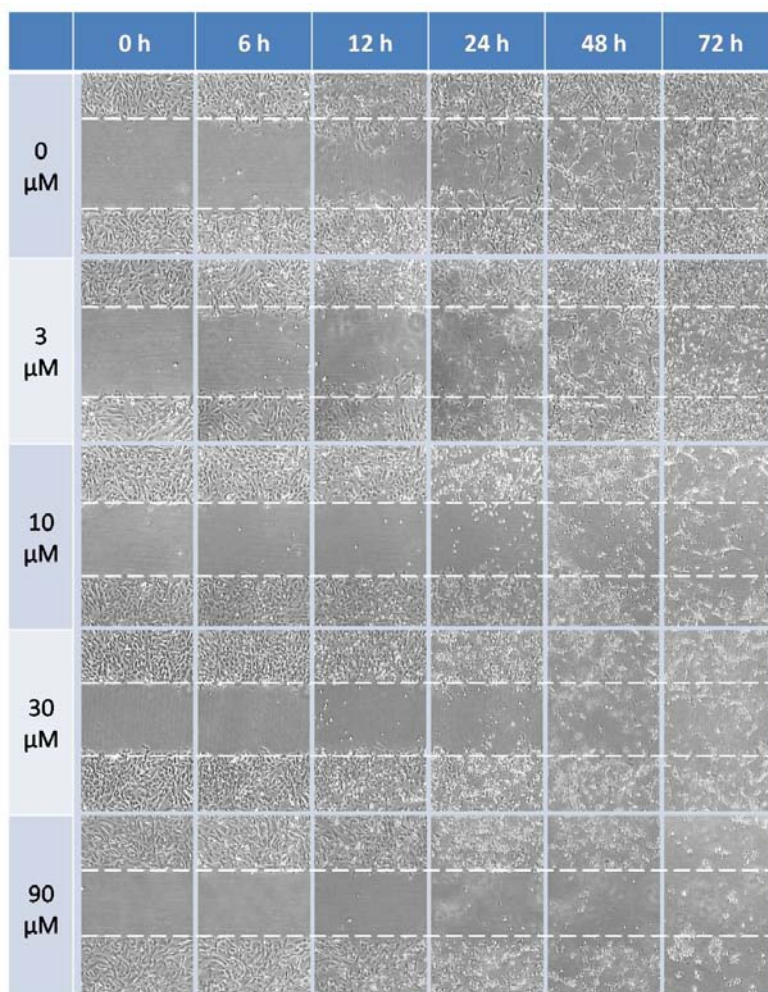


Fig. 2 CAPE 能抑制 PDGF-BB 引起的平滑肌細胞增生並降低細胞存活率。處理 CAPE (0、3、10、30、90 μM) 於指定時間 (0、6、12、24、48、72 小時) 後，以血球計數器計算細胞數 (A)，並以 Trypan blue 判定死亡細胞後計算存活率 (B)。(n=6, *p<0.05, **p<0.01, 與控制組(0.3% DMSO)比較。)

(A)



(B)

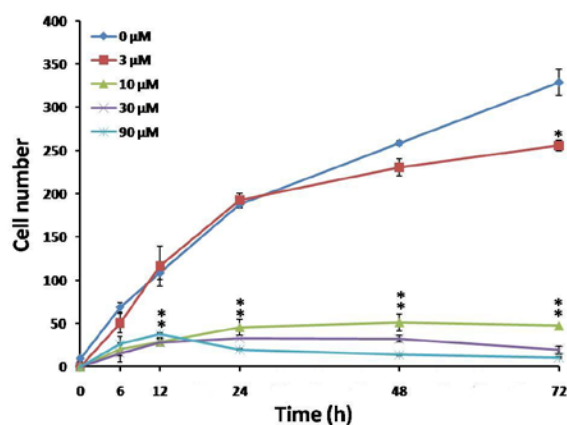


Fig. 3 CAPE 能抑制 PDGF-BB 引起的平滑肌細胞移行。處理 CAPE (0、3、10、30、90 μM) 於指定時間 (0、6、12、24、48、72 小時) 後，以像差顯微鏡拍攝細胞移行的狀況 (40 X) (A)，並計算刮痕中的細胞數(B)。(n=3, *p<0.05, **p<0.01，與控制組(0.3% DMSO)比較。)

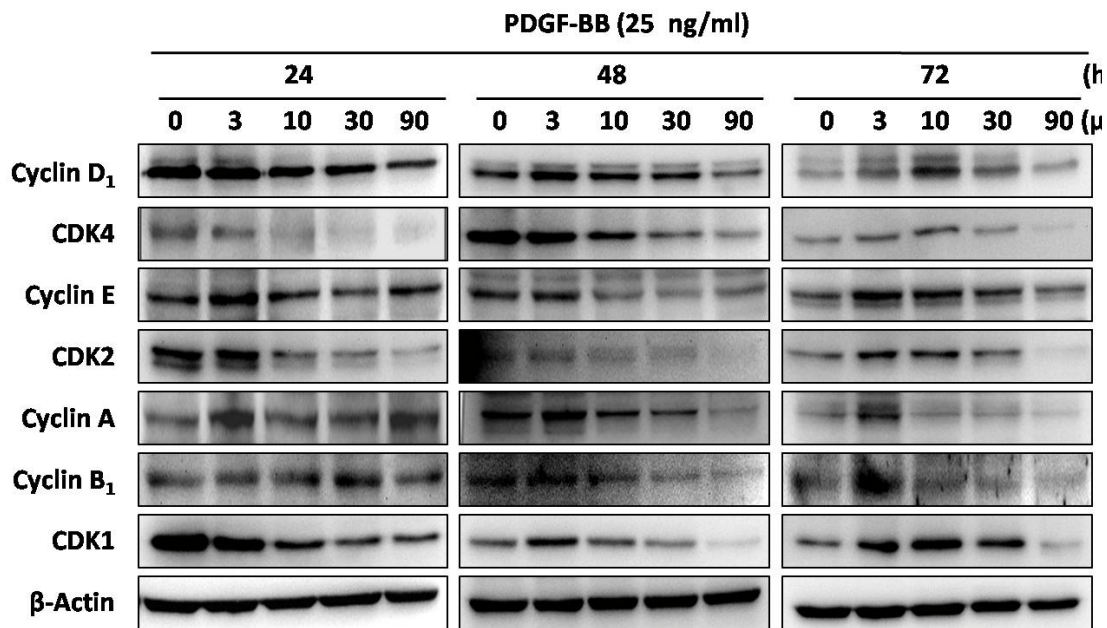
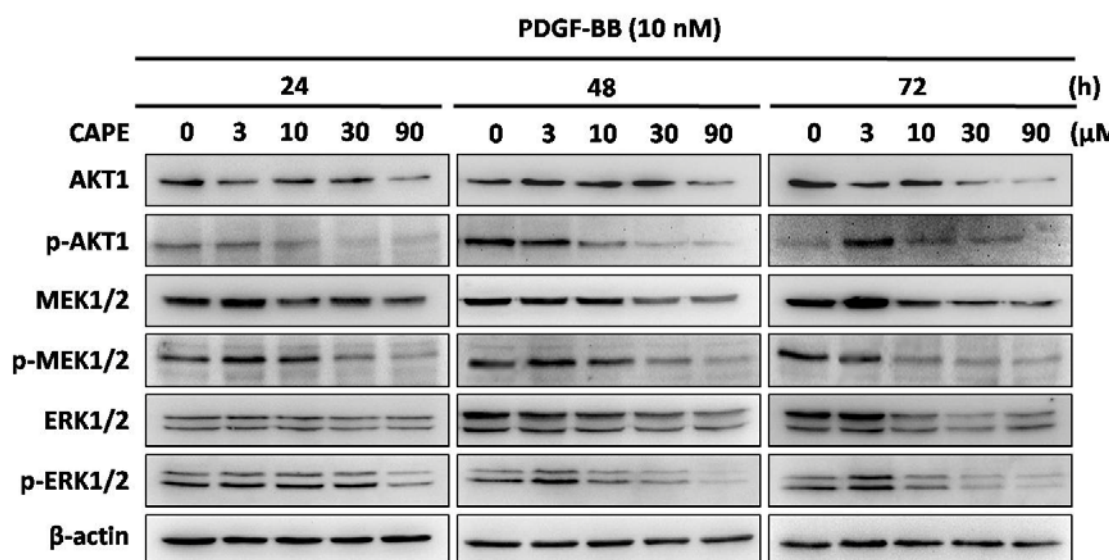


Fig. 4 CAPE 能抑制細胞週期分子的表現。處理 CAPE (0、3、10、30、90 μ M) 於指定時間 (24、48、72 小時) 後，以西方點墨法顯示結果。

(A)



(B)

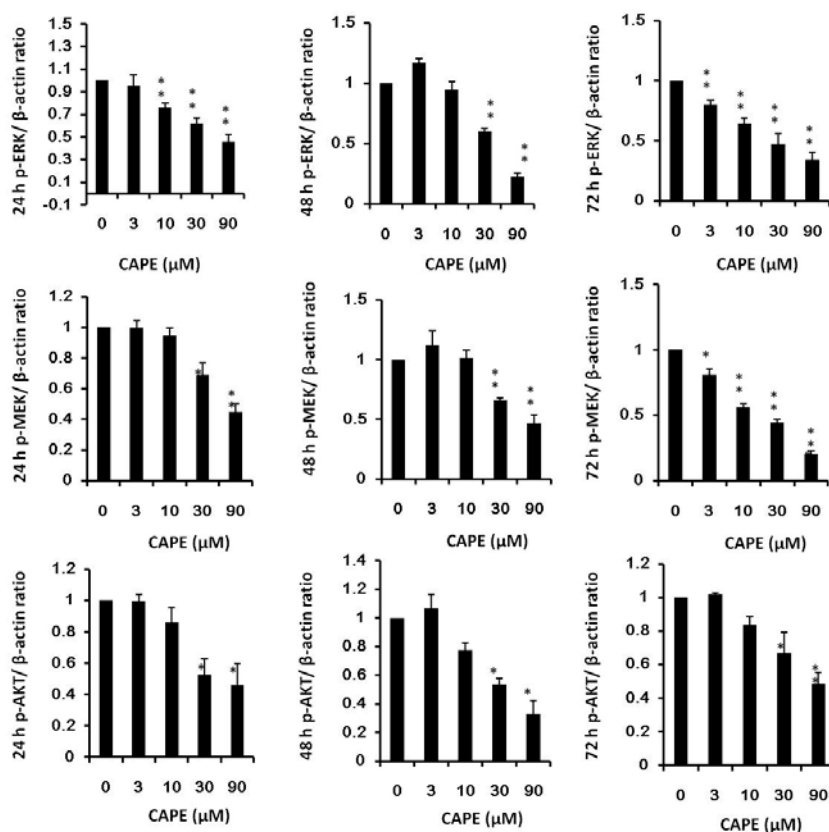


Fig. 5 CAPE 能抑制 MEK、ERK、AKT 及其活化態分子的表現。處理 CAPE (0、3、10、30、90 μM) 於指定時間 (24、48、72 小時) 後，以西方點墨法顯示結果(A)，並以 Multi Gaude V2.2 量化活化態 AKT、MEK、ERK 分子的表現(B)。(n=3, *p<0.05, **p<0.01，與控制組(0.3% DMSO)比較。)

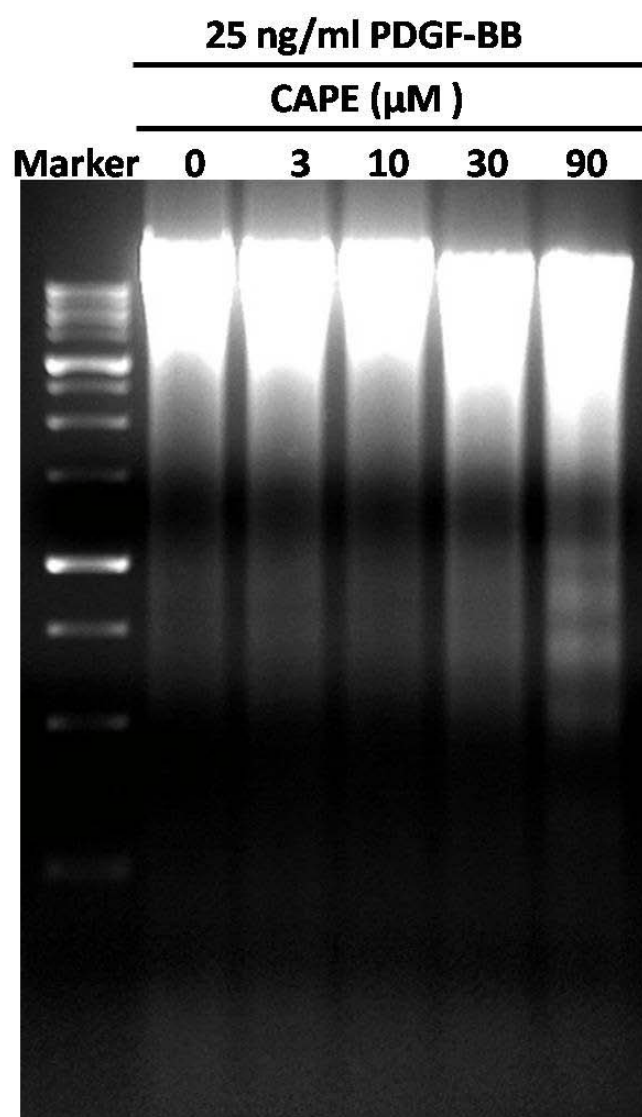


Fig. 6 CAPE 使 DNA 片段化。處理 CAPE (0、3、10、30、90 μM) 於 72 小時後，以洋菜膠電泳分析 DNA 的狀態。

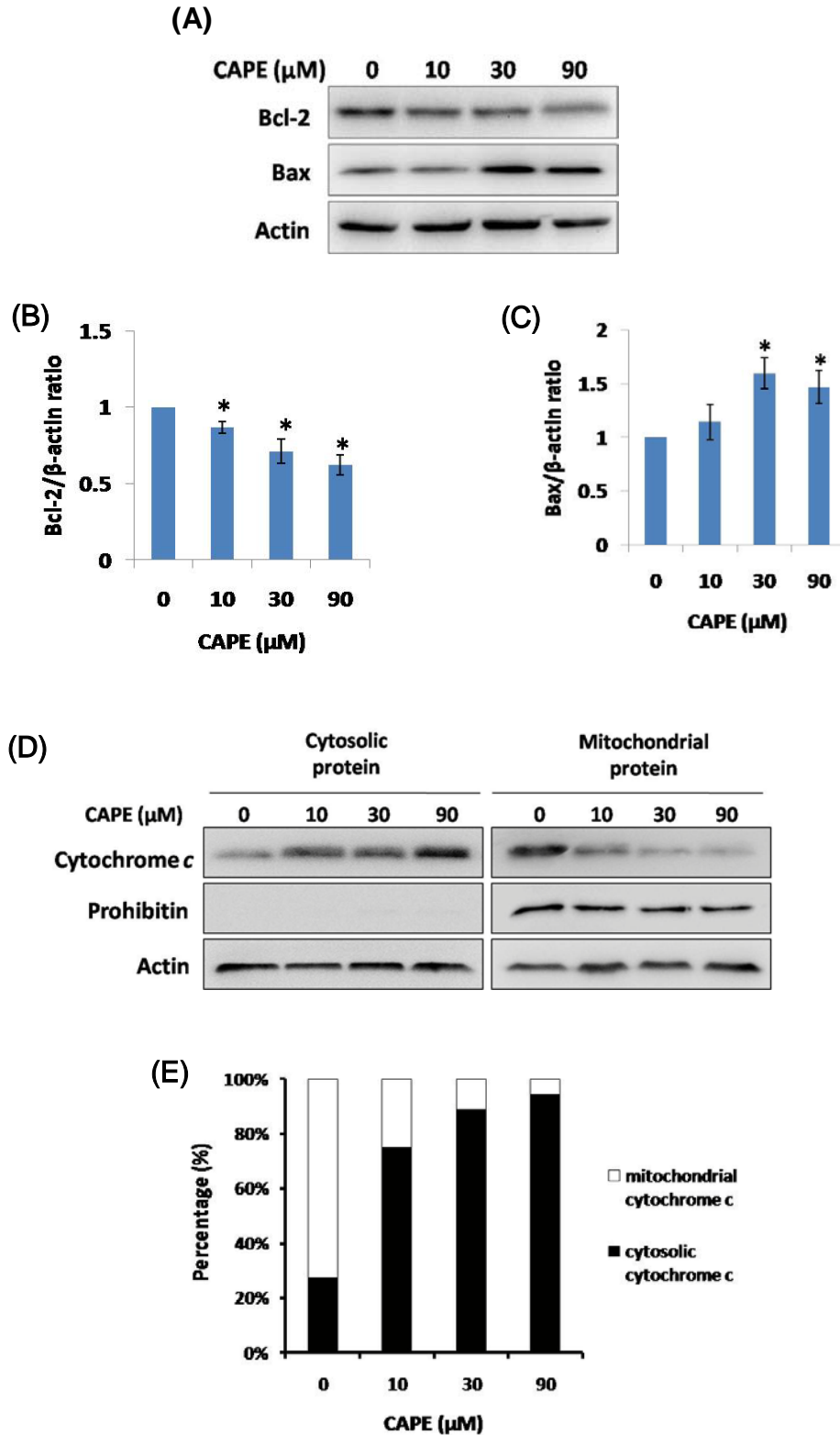
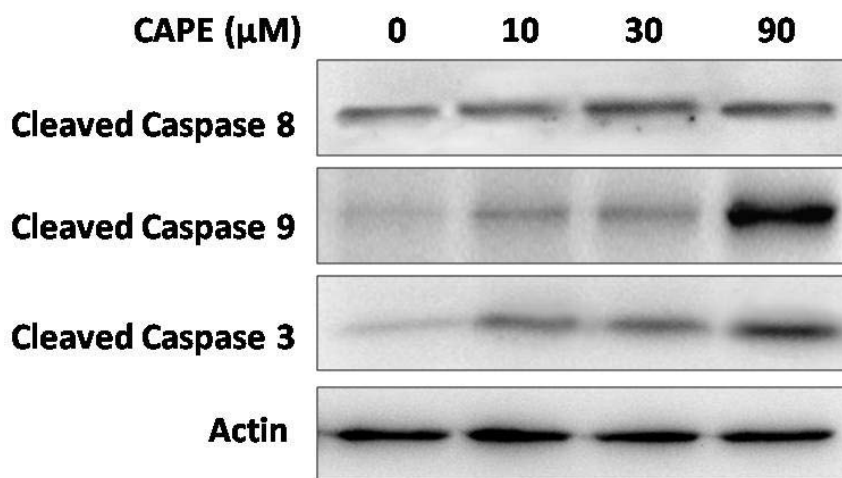
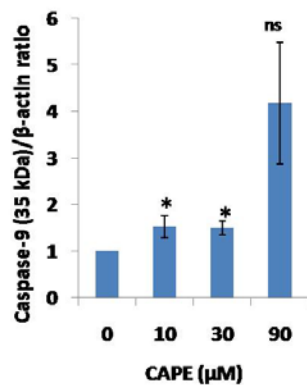


Fig. 7 CAPE 能改變 Bcl-2 及 Bax 的表現使粒線體釋出 cytochrome c。處理 CAPE (0、10、30、90 μM) 於 48 小時後，以西方點墨法顯示結果 (A)，並以 Multi Gauge V2.2 量化分子的表現 (B,C)。分離細胞質及粒線體蛋白後，以西方點墨法顯示 cytochrome c 的分布情形 (D) 並以 Multi Gauge V2.2 量化 (E)。(n=3, *p<0.05, **p<0.01, 與控制組(0.3% DMSO)比較。)

(A)



(B)



(C)

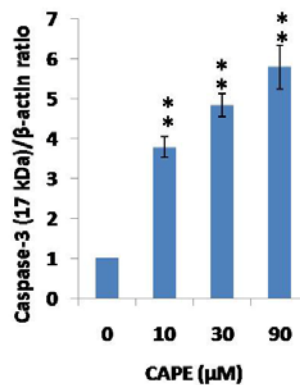


Fig. 8 CAPE 能使內因性凋亡途徑的 caspase 活化態表現增加。處理 CAPE (0、10、30、90 μM) 於指定時間 48 小時後，以西方點墨法顯示結果(A)，並以 Multi Gaude V2.2 量化分子的表現(B,C)。(n=3, *p<0.05, **p<0.01，與控制組(0.3% DMSO)比較。)

病毒 IRES 的序列分析

Analysis of viral IRES sequences

王淳宇*、邱偉欣

東海大學生命科學系 生物資訊實驗室

摘要

病毒的 IRES 是個 mRNA 的二級結構，該結構不需五端帽幫助可直接與核糖體結合，並且，病毒的 IRES 具有結構上的特徵但卻沒有序列上的明顯特徵。因此，我們從現有資料庫中取得數量有限，並具有 IRES 活性的病毒 mRNA 序列，針對這些序列進行全面的分析，希望找出更多病毒 IRES 可資辨別的特徵；包含 IRES 本身以及其周邊區域序列上或結構上的各種可能特徵。我們利用 Perl 語言以及多序列排比軟體 Muscle 對 IRESite 裡的 44 種病毒基因體 (genome) 序列進行分析。分析項目包含：IRES 在病毒基因體的分佈位置、IRES 序列區域是否具有重複序列、受 IRES 調控的基因是否均為同源基因。目前結果顯示，病毒 IRES 在基因體出現的位置不具特定性，鹼基比例也不具規則性；但在同一個分類群中，不同種的病毒受 IRES 調控且產物相似的基因，其產物的氨基酸序列有很高的相似性，我們推論這些基因可能為同源基因。結果顯示出，受到 IRES 調控的基因並不一定為同源基因。由目前結果可以推論：具有 IRES 的基因並非都是同源基因。未來我們也會檢查非同源基因的 IRES 的序列相似性。

前言

真核生物的轉譯起始是一個複雜的過程，需要多種輔助的蛋白質幫助，這些蛋白質稱作轉譯起始因子。在轉譯起始初期 eIF4F 複合體(包含 cap-binding 蛋白 eIF4E、DEAD-box RNA 解旋酶 eIF4G 與 eIF4A) 會結合到 mRNA 5'-m⁷ cap 結構上，另外，eIF4B、eIF4H 可以增進 eIF4A 的活性。40S 核糖體次單體與 eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}、eIF3、eIF5 結合後形成 43S 複合次單體，43S

複合次單體透過 eIF3 與 eIF4F 複合物結合，同時與 mRNA 結合，從五到三端辨認 5' UTR 上的起始密碼 AUG，通常為遇到的第一個 AUG。到達 AUG 起始密碼後，eIF2 上的 GTP 便被水解，40S 核糖體次單體中的 P 位置釋出，60S 核糖體次單體便與 40S 核糖體次單體結合形成 80S 核糖體，此時轉譯起始因子脫離，轉譯起始過程至此為止，然後開始進行轉譯(Richard, et al., 2010)。

真核生物的轉譯起始過程大都需要五端帽 (5'cap)，但某些病毒在感

染真核細胞後的轉譯起始過程，則不須五端帽的幫助。在不需五端帽的情況下，病毒的 mRNA 與宿主核糖體的結合需要特殊的機制。IRES (internal ribosome entry site) 提供了一個這樣的機制。IRES 為一段 mRNA 上特殊的區域，位於 mRNA 5' 端非轉譯區域 (5' untranslation region) 中，可調控轉譯起始而影響蛋白質的表現。病毒 IRES 可透過 eIF3 直接與 40S 核糖體次單體做結合，因此 40S 核糖體次單體結合到 mRNA 上不需透過起始因子 eIF4F 與 mRNA 5'-m⁷cap 的結合，便可以進行轉譯起始(Kieft, 2001; Komar et al., 2005)。

IRES 最早於 1988 年在 Poliovirus (小兒麻痺病毒) 與 Encephalomyocarditis (腦心肌炎病毒) 中發現 (Komar, 2005)。在已完成的研究指出，有些真核生物的基因也具有 IRES，例如在果蠅與酵母菌的 mRNA 中也都有發現 IRES 的存在。IRES 被認為具有二級或是三級結構，而根據 MFE (minimum folding energy) 的測試，計算組成 IRES 結構需要的最小能量，因為最小能量的 IRES 結構擁有最高的穩定度。研究顯示出 IRES 的活性與其結構有相當大的關係(Xuhua, 2009)。雖然真核生物的 IRES 有結構上的特性，但是卻沒有辦法判定出它們之間共有的特徵。因此在本實驗中，我們希望藉由分析病毒的 IRES，尋找出更多 IRES 的特徵，希望未來可應用於真核生物 IRES 的辨識，與更了解如何使用 IRES 作為轉譯起始的機制。

材料與方法

【資料整理與歸納】

本實驗的主要目的為探討病毒 IRES 的特性，首要工作為蒐集病毒 IRES 序列。選用的資料庫為 IRESite (Martin, et al., 2009)。此資料庫中存放不同類型的序列：病毒完整的基因體序列、病毒 mRNA 序列、病毒 CDS (coding sequence) 序列與病毒 IRES 序列。IRESite 資料庫中所存放的 IRES 序列都經過實驗證明其具有生物的活性。本次蒐集到 44 種基因上帶有 IRES 的病毒，而每一種病毒擁有的 IRES 數量從 1 到多個不等。這大量的資料與序列需要經過妥善的整理與歸納，才能做接下來要進行的分析。根據收集到的資料製成(表一)，表一中的資料包含：病毒名稱、IRES 名稱、基因體大小、IRES 在基因體中出現的位置等重要資訊。此外，我們使用 NCBI 的 Taxonomy 資料庫(Sayers, et al., 2009) (Benson, et al., 2009)。檢索每一種病毒的生物分類表，並依照其生物分類將 44 種病毒分成 11 個類群(表二)。更進一步的整理，我們將每一個分類群中的病毒具有 IRES 活性的 CDS 篩選出來，並以 CDS 產物的功能分類(表三)。

【工作站】

實驗室使用 Arch-Linux 作業系統架設工作站，這個 Linux 發行套件的優點就是系統執行速度快，以及其附加套件非常精簡，故是作為工作站的最佳選擇。且不同於其他的發行套件每半年才進行一次升級，

Arch-Linux 採用無縫升級的方式，使系統永遠保持在最新狀況。相較於其他的版本，不只新軟體進套件庫的時間非常緩慢，有時必須升級才能使用新版的軟體；Arch-Linux 沒有這樣的問題，往往都是在軟體的新版本發佈後一天內，就可以快速獲得更新。

【使用軟體】

分析的過程中主要使用到三種工具；Perl 程式語言(Elie, 2007)。Perl 程式語言的優點是可以一次處理大量的文字檔案。鹼基序列或是氨基酸序列，這些序列都是純文字檔，而對純文字檔案作擷取，分割或是格式整理正是 Perl 擅長的項目。我們利用 Perl 寫成許多有用的小程式對權酸序列、胺基酸序列進行諸如片段擷取、樣式辨認、轉換 FASTA 格式或大小寫字母轉換的整理，這些小工具讓我更方便做下一步的分析。

Muscle (Edgar, 2004) 是一個精準度高且功能多樣的多序列排比軟體。面對大量的序列也可以進行快速的多序列排比，實驗中的同源基因檢測便是使用 Muscle 來分析。經 Muscle 分析後可以匯出多種不同類型的檔案，方便應用在不同的場合；例如以純文字表示的 msf 多序列排比格式或圖形式 html 格式，而後者在辨識上比較直接，容易比較，於是在此實驗中採用 html 格式。

波士頓大學和 NSF(National Science Foundation) 所共同研發的 Tandem Repeats Finder (Benson, 1999)，用於尋找序列中重覆出現的片段。軟體會分析出：重覆片段的核

甘酸組成、有幾個重覆發生與重覆位置在哪裡。

結果

對於尋找 IRES 的特性我們問了多個問題：IRES 在整個基因體的絕對位置、IRES 本身的長度、5 端非轉譯區域中 AT/CG 鹼基對的比值、IRES 中是否有重複序列出現，最後我們想要知道，受到 IRES 調控的基因是否為同源基因。

【IRES 的相對位置分析】

我們想要知道，IRES 序列片段位於整段基因體的哪一個位置。使用最初整理完成的表一，在表一中可以看出每一個 IRES 位於位於基因體的位置。根據表一中 IRES 的絕對位置與基因體長度的資料，製作(表四)，列出基因體大小與 IRES 所在位置。根據分析的結果，發現 IRES 在基因體中出現的位置並不一定。基於每一個病毒的基因體大小並不相同，只用絕對位置來判別有失其準確度，因此將數值轉化成百分比，形成百分比位置後可以做更客觀的比較。結果顯示出 IRES 出現的位置有些從整個基因體長度的 66.8% - 68.8% 出現但也有從 0% - 7% 或是 3.2% - 10.6% 這些位置出現。這樣的結果表示，IRES 在整段基因體出現的位置並無固定，表示 IRES 在基因體中出現的位置並不是它明顯的特徵。

【IRES 長度分析】

接著分析了 IRES 的長度，是否落在一個共同的長度範圍內。根據(表

一) 可以整理出一個結果，IRES 的長度並無一個較相近的範圍，範圍差異極大，如 Acute bee paralysis virus, (ABPV) 的 IRES 長度為 199 bp，而 Encephalomyocarditis virus 的 IRES 長度卻有 576 bp (表四)。如此顯示出，長度並不是 IRES 所共有的特徵。

【AT/CG 比例分析】

每個物種都有特定的 AT/CG 比例。已完成的實驗指出，在多種不同物種間，發現轉譯區域的序列裡序列的組成有共通的特徵 (GC-content)，這些區域包含：5' UTR，coding sequence(CDS) 和 3' UTR，尤其在 5' UTR 與 3' UTR 的位置中 (GC-content) 有特別高的現象 (Lingang, et al., 2004)。而 IRES 序列位於 5'UTR 序列中，因此我們想要知道，在病毒 5'UTR 序列中，AT/CG 鹼基對的比例，是否具有相近的比值。分析後，製成如 (表五)，取出其中幾種病毒做 AT/CG 比值的分析 (表六)，可以看出 GBA-A 的 AT/CG 比值為 0.59，而 crTMV 的 AT/CG 比值為 3.25。結果顯示，每個 5'UTR 的 AT/CG 比值差異太大。說明不同種病毒間 5'UTR 的 AT/CG 比值差異極大，並沒有相似的比值。未來工作應將範圍縮小至 IRES 序列，分析 IRES 序列中 AT/CG 的比值，並比較整段 5'UTR 與 IRES 序列的 AT/CG 的比值，分析兩者是否有相關性。

【重複序列分析】

將每一個 IRES 分析之後，所得到的結果如 (表七)，在所有病毒的 IRES 中，我們一共發現了三個 IRES 具有重複序列。分別為 *idefix* 病毒的 *idefix* IRES 與 *Gypsy* 病毒的 *Gypsy-D2*、*Gypsy-D5* IRES (表八)，兩種病毒都為感染果蠅的病毒，三個 IRES 都有個別的重複序列出現，但是三個 IRES 之間並沒有共同的重複序列出現。全部的 IRES 中只有 3 個具有重複序列，比例極小，而且彼此之間的重複序列並不相同。不具有特殊的意義，可以判斷，重複序列並不是 IRES 的重要特徵。

【受 IRES 調控的基因是否為同源基因】

我們想要知道，受 IRES 調控的基因，是否都為同源的基因。我們做了以下的分析：在之前的整理中，已將病毒分成多個分類群，也已將每一個分類群中受到 IRES 調控的 CDS 篩選出。於是我們以分類群為單位將這些 CDS 做多序列排比分析，分析它們是否為同源基因。分析使用 *Muscle* 多序列排比軟體，輸出參數設定為 *html* 格式。全部的分類群完成分析後，可以明顯看出兩個不同的結果，序列極為相似與不相似。生物資訊學以序列的相似程度來決定兩基因是否為同源基因，分析的結果可以判斷出兩群；一群為同源基因 (圖一至圖七)，區域與全域都有極高相似性，其分別為：C、D、E、F、G、J、H 群病毒。另一群為非同源基因 (圖八至圖十二)，只有有限的局部序列顯示出相似性而全域相似度在這些基因序列之間則極為低，其分別為

A、B、I 群病毒。這些 CDS 都有受到 IRES 調控，但不全為同源基因。例如；判定為同源基因的如 C 群病毒（圖一）有：Bovine viral diarrhea virus1、Classical swine fever virus。H 群病毒有：Hepatitis GB virus A、Hepatitis GB virus B、Hepatitis GB virus C。以上兩群病毒經分析後可以看出序列的相似度非常高，應為同源基因。而判定為不同源基因的 A 群病毒（圖八）有：Homalodisca coagulata virus-1、Plautia stali intestine virus、Homalodisca coagulata virus-1、Drosophila C virus strain EB、Aphid lethal paralysis virus、Himetobi P virus。I 群病毒（圖十二）有：Hepatitis A virus (wild-type)、Hepatitis C virus subtype 1a。如 H 群病毒被認為是同源基因，而 I 群病毒為非同源基因。H、I 群病毒雖同為肝炎病毒但其序列差異極大，從這樣的結果可以得知，受到 IRES 調控的 CDS 不全為同源基因。因此 IRES 在演化上起源可能並非單一的。

討論

在經過以上對病毒 IRES 的分析之後，我們發現病毒 IRES 在基因體上的百分位置沒有特定出現的地方，5' UTR 鹼基的比值在每種病毒間差異極大，沒有相似的比值。未來會分析 IRES 序列中 AT/CG 的比值，並比較整段 5'UTR 與 IRES 序列的 AT/CG 的比值，分析兩者是否有相關性。雖然有 3 個 IRES 有重複序列的出現，但數量太少，應不是 IRES

主要特徵。是否為同源基因的分析結果指出，受到 IRES 調控的基因，不一定是同源基因，這項結果指出 IRES 在演化上的起源可能並非單一的。未來我們會進一步將具有 IRES 的病毒基因其 5'UTR 做更進一步的分析，以期能找出更多序列或結構上的特殊樣式，這對於判斷 IRES 片段，基因體註解(genome annotation)，以及瞭解轉譯調控，都將有所貢獻。

參考文獻

- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J and Sayers EW. (2009) Nucleic Acids Research, vol. 37: pp. 26-31.
- Benson, G. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Research, Vol. 27: pp. 573-580
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, Vol. 32: pp. 1792-1797
- Ellie Q. (2007) Perl by example, 4th edition, Prentice Hall Ptr
- Komar AA. and Hatzoglou M. (2005) Internal ribosome entry site in cellular mRNAs: mystery of their existence. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 280: pp. 23425-23428

- Kieft JS, Grech A, Adams P and Doudna JA. (2001) Mechanisms of Internal Ribosome Entry in Translation Initiation. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. LXVI: pp277-283
- Lingang Z, Simon K, Charles RC and Natalia EB. (2004) GC/AT-content spikes as genomic punctuation marks. Proceedings of the National Academy of Sciences vol. 101: pp.16855–16860
- Martin M, Tomás M, Václav V, Petr H, Philippe D and Martin P. (2009) IRESite—a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. Oxford Journals, Vol. 38: pp.131-136
- Richard JJ, Christopher UTH and Tatyana VP (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nature, Vol.10 : pp.113-127
- Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Feolo M, Geer LY, Helmberg W, Kapustin Y, Landsman D, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Miller V, Mizrachi I, Ostell J, Pruitt KD, Schuler GD, Sequeira E, Sherry ST, Shumway M, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E and Ye J. (2009) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research, vol. 37: pp. 5-15.
- Xuhua X, Martin H. (2009) Strong eukaryotic IRESs have weak secondary structure. *PLoS ONE* vol. 4 e4136.

IRES site id	virus name	Genome sequence	IRES name	IRES absolute position	How IRES determined	The abbreviated name of this ORF/gene	The description of the protein encoded in this ORF	The ORF absolute position	IRES before witch CDS
618	Acute bee paralysis virus, complete genome(ABPV)	9491bp RNA	ABPV IGRpre d	6340-6538	guessed	CDS1:replicase polyprotein		605-6325	CDS2
						CDS2:capsid protein		6509-9253	CDS1
416	Avian encephalomyelitis virus, complete genome(AEV)	7055 bp ss-RNA	AEV	1-494	experimentally_determined	CDS1:polyprotein		495-6899	
619	Aphid lethal paralysis virus, complete genome(ALPV)	9812 bp RNA	ALPV IGRpre d	6639-6822	guessed	CDS1:non-structural polyprotein		540-6647	CDS2
						CDS2:capsid protein		6509-9253	
620	Black queen cell virus nonstructural polyprotein	8550 bp ss-RNA	BQCQ IGRpre d	5647-5836	guessed	CDS1:non-structural polyprotein		658-5625	

						CDS2: capsid protein		5834-8395	CDS2
37	Bovine viral diarrhea virus 1, complete genome(BVDV1)	12573 bp ss-RNA	BVDV1_1-385	1-385	experimentally determined	CDS1: Bovine viral	diarrhea virus 1 polyprotein	386-12352	
			BVDV1_29-392	29-391	experimentally determined				
40	Cricket paralysis virus, complete genome	9185 bp RNA	CrPV 5NCR	1-708	unknown	CDS1: CrPV gp1	nonstructural polyprotein	709-6024	both CDS1/CDS2 have IRES
			CrPV IGR	6025-6216	experimentally determined	CDS2: CrPV gp2	structural polyprotein	6214-8904	
603	Tobacco mosaic virus	6312 bp RNA	crTMV IRES _{cp}	26-173	experimentally determined	CDS1: CP	coat protein	174-647	CDS1
602	Tobacco mosaic virus	6312 bp RNA	crTMV IRES _{cp}	655-802	experimentally determined	CDS1: MP	movement protein	76-879	CDS1
39	Tobacco mosaic virus	6304 bp RNA	crTMV IRES _{cp1}	5456-560	experimentally determined	CDS1: CtVg p1	RNA replicase read-through protein, 178 kDa	69-4874	neither CDS1/CDS2 have IRES
			crTMV IRES _m p75	4802-4876	experimentally determined	CDS2: CtVg p2	RNA replicase protein, 122kDa	69-3392	

			crTMV_4649-487 IRESm 6 p228		experim entally_ determin ed				
148	Hog cholera virus	12311 bp RNA	CSFV	1-373	experim entally_ determin ed	CDS1:polyp rotein	polyprotein	374-12070	CDS1
225	Human coxsackiev irus B3 strain 20	7399 bp ss-RNA	CVB3	1-750	experim entally_ determin ed	CDS1: polyprotein	polyprotein	743-7300	CDS1
621	Drosophila C virus strain EB	9264 bp RNA	DCV_I GR	6078-626 6	guessed	CDS1:NS	non-structural polyprotein	799-6078	CDS2
						CDS2CP	capsip ed protein	6267-8972	CDS1
140	Encephalo myocarditis virus	7835 bp ss-RNA	EMCV- R	257-832	experim entally_ determin ed	CDS1: polyprotein	genomic polyprotein	834-7712	
627	Ectropis obliqua picorna-like virus	9394 bp ss-RNA	EoPV_ 5NTR	1-390	experim entally_ determin ed	CDS1:polyp rotein	polyprotein	391-9354	CDS1
286	Equine rhinovirus 1 polyprotein gene	7636 bp ss-RNA	ERAV_ 245-96 1	245-956	experim entally_ determin ed	CDS1:Lab	Lab polyprotein	850-7596	CDS3/CDS4 have IRES
						CDS2:Lab	Lab polyprotein	853-7596	
						CDS3:Lab	Lab polyprotein	913-7596	
						CDS4:Lab	Lab polyprotein	916-7596	
26	Equine Rhinovirus type 2	8828 bp RNA	ERBV_ 162-92 0	162-920	experim entally_ determin ed	CDS1:polyp rotein	Equine Rhinovirus type 2 polyprotein	904-8664	

637	Human enterovirus 71 strain pinf7-54A from Taiwan	7464 bp RNA	EV71_1-748	1-748	experimentally determined	CDS1:polypeptide	viral polyprotein	746-7327	CDS1
577	Feline leukemia virus Notch2 gene, clone FeLV/Notch2-B, partial cds	1641 bp DNA	FeLV-Notch2	582-819	experimentally determined	CDS1:FeLV-Notch2	Intracellular domain of Notch2 protein fused with C-terminus from part of FeLV env gene	817-2313	CDS1
321	Foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain C, isolate c-s8c1	8115 bp RNA	FMDV_type_C	578-1038	experimentally determined	CDS1:polyprotein	viral polyprotein	1039-8022	CDS1
38	Hepatitis GB virus A polyprotein A	9653 bp RNA	GBV-A	15-707	experimentally determined	CDS1:GBV-A	Hepatitis GB virus A polyprotein.	594-9458	CDS1
54	Hepatitis GB virus B genomic RNA	9397 bp RNA	GBV-B	30-445	experimentally determined	CDS1:GBV-B	Hepatitis GB virus B polyprotein.	446-9040	CDS1
41	Hepatitis GB virus C structural and non structural proteins gene, partial cds	9377 bp RNA	GBV-C	13-642	experimentally determined	CDS1:GBV-C	Hepatitis GB virus C polyprotein.	535-9066	CDS1

69	Drosophila melanogaster gypsy transposable element	7469 bp DNA	gypsy_env	1-330	experimentally determined	CDS1:gag		842-2197	
			gypsyD5	530-790	experimentally determined	CDS2:gag-pol protein		842-5232	
			gypsyD2	330-846	experimentally determined				
42	Hepatitis A virus (wild-type) RNA	7478 bp ss-RNA	HAV_HM175	151-734	experimentally determined	CDS1:polyprotein	Human hepatitis A virus, polyprotein b	741-7418	CDS1
222	Hepatitis C virus subtype 1a	9416 bp ss-RNA	HCV_type_1a	1-383	experimentally determined	CDS1:Polyprotein	HCV polyprotein	342-9377	CDS1
616	Himetobi P virus genomic RNA	9275 bp RNA	HiPV_IGRpred3	6286-647	experimentally determined	CDS1:NS	non-structural protein precursor	964-6297	
						CDS2:CP	capsid protein precursor (36.5 kDa)	6473-9097	CDS2
73	Human immunodeficiency virus 1	9181 bp ss-RNA	HIV-1	104-336	experimentally determined	CDS1:gag	Pr55 is further cleaved by a protease into final mature peptides	336-1838	
						CDS2:gag-pol	Gag-Pol is further cleaved by a protease into final mature peptides	336-4642	

622	Homalodiscus coagulata virus-1	9345 bp RNA A	HoCV1 _IGRpred	5802-5989	guessed	S1:NS	non-structural polyprotein	420-5807	
						CDS2:CP	capsid protein	5990-8740	CDS2
139	Human rhinovirus 2	7102 bp RNA	HRV-2	11-614	experimentally_ determined	CDS1:polyprotein	Genome polyprotein	611-7063	CDS1
623	Israel acute paralysis virus of bees	9499 bp mRNA	IAPV_ GRpred7	6419-6617	guessed	CDS1:NS	non-structural polyprotein	696-6398	CDS2
						CDS2:CP	capsid protein	6582-9308	
68	Drosophila melanogaster retroelement: gag, pol and env genes, partial	7411 bp DNA A	idifix	33-553	experimentally_ determined	CDS1:Gag	Gag protein	538-1476	CDS1
						CDS2:gag-pol	gag-pol protein	538-4929	
624	Kashmir bee virus	9524 bp RNA A	KBV_ GRpred9	6428-6629	guessed	CDS1:NS	non-structural polyprotein	609-6410	
						CDS2:CP	capsid protein	6630-9296	CDS2

322	Mus musculus glycine receptor beta-subunit gene, partial cds; and retrotransposon L1spase/endonuclease/reverse transcriptase gene	9278 bp DN A	LINE-1 _ORF16 -101_to -1	1686-1786	experimentally determined	CDS1:ORF16 Mouse L1 ORF1p, 43kDa,	homotrimer, nucleic acid chaperone with RNA and ssDNA binding capability, essential for retrotransposition	1787-2902	both CDS1/CDS2 have IRES
			LINE-1 _ORF15 -302_to -202	1485-1585	experimentally determined	CDS2:ORF2 Mouse L1 ORF2p, 150kDa,	reverse transcriptase and endonuclease, essential for retrotransposition. This protein product was always anticipated/studied only indirectly.	2943-6788	
			LINE-1 _ORF27 -138_to -86	2805-2857	experimentally determined				
			LINE-1 _ORF16 -44_to -1	1740-1786	experimentally determined				

59	Plautia stali intestine virus	8797 bp RN A	PSIV_I GR	6002-614 6	experim entally_ determin ed	CDS1:PSIV gp1	Nonstructural protein precursor. Computer analysis revealed that the aminoacid sequence of ORF1 contains core motifs of picornaviral 2C RNA helicase, 3C cysteine protease and 3D RNA dependent RNA polymerase.	571-6006	CDS2
						CDS2:PSIV gp2	The capsid protein precursor contains coding regions of four capsid proteins: 33, 30, 26, 4.5 kDa. Coding regions of these proteins were mapped by determination of their N-terminal sequences.	6193-8628	
242	Human poliovirus 1 Mahoney	7440 bp RN A	PV_typ e1_Ma honey	320-631	experim entally_ determin ed	S1:polyprote in	polyprotein	743-7372	CDS1

598	Poliovirus P3/Leon/37 (type 3)	7431 bp ss-RNA	PV_type3_Leon	1-742	experimentally_determined	CDS1:polyprotein	viral polyprotein	743-7363	CDS1
435	Reticuloendotheliosis virus strain APC-566	8286 bp DN A	REV-A	363-939	experimentally_determined	CDS1:gag-poly	Gag-pol polyprotein	935-6016	
437	Rhopalosiphum padi virus	10011 bp RN A	RhPV_5NCR	1-579	experimentally_determined	CDS1:polyprotein	non-structural polyprotein	580-6576	both CDS1/CDS2 have IRES
625	Solenopsis invicta virus 1	8026 bp RN A	RhPV_1GR	6875-7106	experimentally_determined	CDS2:polyprotein	structural polyprotein	7107-9560	both CDS1/CDS2 have IRES
			SINV1_1GRpre 2d	4223-442	guessed	CDS1:NS	non-structural polyprotein	28-4218	
						CDS2:CP	capsid protein	4390-7803	
596	Simian virus 40	5243 bp DN A	SV40_661-830	153-322	experimentally_determined	CDS1:agnoprotein-truncated	N-terminal half of agnoprotein fused out-of-frame to VP2 ORF. The resulting protein was not yet directly shown to exist, unlike the non-truncated agnoprotein.	11-103	CD3
						CDS2:VP2	SV40 late structural protein VP2	54-1112	

						CDS3:VP3	SV40 late structural protein VP3 (27kDa)	408-1112	
						CDS4:VP4	SV40 late structural protein VP4 (14kDa)	735-1112	
597	Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) RNA polyprotein	8098 bp ss-RNA	TMEV	1-1040	experimentally_determined	CDS1:polyprotein	viral polyprotein	1065-7976	CDS1
615	Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) RNA polyprotein	8098 bp ss-RNA	TMV_UL_IRES mp228	4670-4900	experimentally_determined	CDS1:RdRp	RNA polymerase (read-through protein)	69-4919	CDS3
						CDS2:RdRp	RNA polymerase (read-through protein)	69-3419	
						CDS3:MP	movement protein	4903-5709	
						CDS4:CP	coat protein	5712-6191	

626	Triatoma virus(TrV)	9010 bp RN	TRV_5 NTR	1-694	experimentally_determined	CDS1:NS	non-structural polyprotein	549-5936	both CDS1/CDS2 have IRES
			TrV_IGR	5929-6149	experimentally_determined	CDS2:CP	capsid protein	6109-8715	
77	Taura syndrome virus(TSV)	10205 bp ss-RNA	TSV_1 GR	6741-6990	experimentally_determined	CDS1:ORF1	non-structural polyprotein	417-6740	
						CDS2:ORF2	capsid protein precursor	6953-9982	CDS2

(表一) 本次蒐集到 44 種基因上帶有 IRES 的病毒，而每一種病毒擁有的 IRES 數量從 1 到多個不等。表一中的資料包含：病毒名稱、IRES 名稱、基因體大小、IRES 在基因體中出現的位置等重要資訊。

A	B	C
group A		
019 Aphid lethal paralysis virus, complete genome(ALPV)	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
020 Black queen cell virus nonstructural polyprotein	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
40 Cricket paralysis virus, complete genome	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
051 Drosophila C virus strain EB	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
016 Himechob P virus genomic RNA	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
022 Homaldisca coagulata virus-1	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
59 Plautia stali intestine virus	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
437 Rhopalosiphum padi virus	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
026 Triatoma virus(TTV) nonstructural protein precursor and capsid protein precursor	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; Crispavirus	
group B		
018 Acute bee paralysis virus, complete genome(ABPV)	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; unassigned Dicistroviridae	
023 Israeli acute paralysis virus of bees	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; unassigned Dicistroviridae	
024 Khazret bee virus	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; unassigned Dicistroviridae	
035 Soleopsis invicta virus 1	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; unassigned Dicistroviridae	
01 Taura syndrome virus(TSV)	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Dicistroviridae; unassigned Dicistroviridae	
group C		
01 Bovine viral diarrhoea virus 1, complete genome(BVDV1)	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Flaviviridae; Pestivirus	
143 Hog cholera virus	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Flaviviridae; Pestivirus	
group D		
025 Human coxsackievirus B3 strain 20	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Enterovirus; Human enterovirus B	
027 Human enterovirus 21 strain p07-544 from Taiwan	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Enterovirus; Human enterovirus B	
group E		
030 Equine rhinovirus 1 polyprotein gene	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Aphthovirus	
021 Foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain C, isolate o-601	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Aphthovirus	
group F		
155 Human rhinovirus 2	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Enterovirus; Human rhinovirus A	
042 Human poliovirus 1 Mahoney	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Enterovirus; Human enterovirus C	
056 Poliovirus P3/Leech/37 (type 3) (Human enterovirus C)	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Enterovirus	
group G		
045 Tobacco mosaic virus	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Virgaviridae; Tobamovirus; unclassified Tobamovirus	
015 Tobacco mosaic virus	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Virgaviridae; Tobamovirus	
group H		
04 Hepatitis GE virus A polyprotein	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Flaviviridae; unclassified Flaviviridae	
04 Hepatitis GE virus B genomic RNA	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Flaviviridae; unclassified Flaviviridae	
01 Hepatitis GE virus C structural and non structural proteins gene	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Flaviviridae; unclassified Flaviviridae; GBV-C/HGV group	
group I		
04 Hepatitis A virus (wild-type) RNA	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae; Hepatovirus	
022 Hepatitis C virus subtype 1a	Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses; no DNA stage; Flaviviridae; Hepatovirus; Hepatitis C virus; Hepatitis C virus group 1	

(表二)經過生物分類法分類後的病毒群組根據 Taxonomy 中的病毒分類資訊，依照病毒的生物分類法，將病毒分類成 A 至 K 群。

	A	B	C	D	E	F
1	a					
2	437			CDS2 (7103..7105,7107..9560)	structural polyprotein	
3	620	5647-5836	2	CDS2 5834-8395	structural polyprotein	
4	40			CDS2 6217-8904	structural polyprotein	
5	626	1-694	2	CDS1 549..5936	nonstructural protein precursor	
6	40	1-708	2	CDS1 709-6024	nonstructural polyprotein	
7	437	1-579	2	CDS1 580..6576	nonstructural polyprotein	
8	626	5929-6149		CDS2 6109..8715	capsid protein precursor	
9	59	1485-1585	2	CDS2 1950..5402	capsid protein precursor	
10	622	5802-5989	2	CDS1 5990..8740	capsid protein precursor	
11	621	6078-6266	2	CDS2 6267..8972	capsid polyprotein	
12	619	6639-6822	2	CDS2 6820-9243	Capsid protein	
13						
14						
15	b					
16	618	6340-6538	2	CDS2 6509-9253	Capsid protein	
17	623	6419-6617	2	CDS2 6582..9308	structural polyprotein	
18	624	6428-6629	2	CDS2 6630..9296	structural polyprotein	
19	625	6675-7106	2	CDS2 4390..7803	contains capsid proteins	
20		153-322	7	CDS1 join(5188..5243,1..16)	hypothetical protein	
21	77	6741-6990	2	CDS2 6947..9982	capsid protein precursor	
22						
23	c					
24	37	1-385	1	CDS1 386 12352	polyprotein	
25	148	1-373	1	CDS1 374..12070	polyprotein	
26	d					
27	225	1-750	1	CDS1 743..7300	polyprotein	
28	637	1-748	1	CDS1 746..7327	polyprotein	
29						
30	e					
31	286	245-956	1	CDS1 794..7537	polyprotein	
32	321	578-1038	1	CDS1 1039..8022	polyprotein	
33	f					
34	139	11-614	1	CDS1 611..7063	genome polyprotein	
35	242	320-631	1	CDS1 743..7372	polyprotein	
36	595	1-742	1	CDS1 743..7363	viral protein precursor	

(表三)每一群組中，根據蛋白質的功能做更進一步的分類將病毒分群後，在每一個群組中，將有受到 IRES 調控的 CDS 篩選出來，再依其蛋白質的種類做細分。如紅框中的 A 群病毒再分成三群，分別是：結構蛋白、非結構蛋白、capsid 蛋白。

Virus name	Genome sequence	IRES absolute position	Percentage of the position	Length
Acute bee paralysis virus, complete genome(ABPV)	9491bp	6340-6538	66.8% - 68.8%	199
Avian encephalomyelitis virus, complete genome (AEV)	7055bp	1-494	0% - 7%	494
Aphid lethal paralysis virus, complete genome (ALPV)	9812bp	6639-6822	67.6% - 69.5%	184
Encephalomyocarditis virus	7835bp	257-832	3.2% - 10.6%	576
Bovine viral diarrhea virus 1, complete genome (BVDV1)	12573bp	1-385	0% - 3%	185

(表四)IRES 位置與整段基因體的比較列出數種病毒說明 IRES 在整段基因體中的位置。如 Acute bee paralysis virus 位於其整段基因體的 66.8%- 68.8%，而

Bovine viral diarrhea virus 1 的 IRES 位置位於 0% - 3%，IRES 在整段基因體出現的位置並無固定，表示 IRES 在基因體中出現的位置並不是它明顯的特徵。

5UTR 的長度與其中 ATCG 的比例								
病毒編號	病毒名稱	5UTR 總長	A	T	C	G	AT	CG
26	ERVB	5UTR1 894	182	246	243	223	428	466
37	BVD1	5UTR1 384	112	84	90	108	196	198
38	GBA-A	5UTR1 593	117	104	170	201	221	371
39	crTMV	5UTR1 68	38	14	14	2	52	16
		5UTR2 1495	443	420	257	375	863	632
		5UTR3 2216	654	624	367	571	1278	938
40	crPV	5UTR1 708	203	195	147	163	398	310
		5UTR2 192	59	63	33	37	122	70
41	GBV-C	5UTR1 532	106	89	162	175	195	337
42	HAV_HM17 5	5UTR1 734	150	239	166	179	389	345
		5UTR2 740	153	240	167	180	393	347
54	GBV_B	5UTR1445	88	93	126	138	181	264
59	PSIV	5UTR1 570	151	172	113	134	323	247
		5UTR2 186	56	63	33	34	119	67
68	Idefix	5UTR1 987	412	256	189	130	668	319
69	GYPSY	5UTR1 243	87	58	61	37	145	98
73	HIV-1	5UTR1 233	60	42	53	78	102	131
77	TSV	5UTR1 416	111	125	105	75	236	180
		5UTR2 206	55	50	50	51	105	101
139	HRV2	5UTR1 611	151	169	154	137	320	291
140	EMCV-R	5UTR1 833	167	166	309	191	333	500
148	CSFV	5UTR1 374	100	77	92	105	177	197
222	HCV_type_1 a	5UTR1 341	65	69	102	105	134	207
225	CVB3	5UTR1 743	184	188	191	180	372	371
242	PV	5UTR1 742	174	198	189	181	372	370
286	ERAV	5UTR1 793	177	177	222	217	354	439
321	FMDV	5UTR1 1038	225	231	310	272	456	582
322	LINE-1	5UTR1 1786	424	254	509	599	678	1108
416	AEV	5UTR1 458	93	128	105	132	221	237
435	REV-A	5UTR1 934	192	261	220	261	453	481
		5UTR2 2434	612	553	588	681	1165	1269

		5UTR3 3320	851	698	899	872	1549	1771
437	RhPV	5UTR1 579	163	221	110	85	384	195
		5UTR2 526	164	148	120	94	312	214
		5UTR3 529	315	149	120	94	464	214
577							0	0
596	SV40	5UTR1 561	134	153	120	154	287	274
		5UTR2 914	208	263	194	249	471	443
597	TMEV	5UTR1 1064	236	270	314	244	506	558
598	PV	5UTR1 742	162	186	202	192	348	394
602	crTMV	5UTR1 68	37	14	14	3	51	17
		5UTR2 1484	453	414	270	347	867	617
603	crTMV	5UTR1 68	37	14	14	3	51	17
		5UTR2 1484	452	414	270	348	866	618
		5UTR3 2213	667	621	375	550	1288	925
615	TMV_type1	5UTR1 68	34	18	15	1	52	16
616	HiPV	5UTR1 965	301	294	188	182	595	370
		5UTR2 177	49	60	32	36	109	68
618	ABPV_IGRp red	5UTR1 603	196	168	118	121	364	239
		5UTR2 182	50	53	33	46	103	79
619	ALPV	5UTR1 539	166	176	115	82	342	197
		5UTR2 171	51	62	25	33	113	58
620	BQCV_IGRp red	5UTR1 656	173	190	124	169	363	293
		5UTR2 207	62	66	38	41	128	79
621	DCV	5UTR1 799	212	316	102	109	528	211
		5UTR2 188	57	68	30	33	125	63
622	HoCV-1	5UTR1 419	161	88	92	78	249	170
		5UTR2 182	48	45	45	44	93	89
623	IAPV	5UTR1694	223	212	126	133	435	259
		5UTR2 183	45	50	37	51	95	88
624	KBV	5UTR1 608	199	187	108	114	386	222
		5UTR2 219	63	63	43	50	126	93
625	SINV-1	5UTR1 27	7	8	9	3	15	12
		5UTR2 171	47	45	35	44	92	79
626	Trv	5UTR1 548	155	194	80	119	349	199
		5UTR2 172	46	55	32	39	101	71
627	EoPV	5UTR1 390	115	143	64	68	258	132

637	EV71	5UTR1 745	177	193	196	179	370	375

(表五) IRES 所在的 5'UTR 序列中，ATCG 鹼基對的數量。計算出 5'UTR 的總長， ATCG 鹼基對的數量。準備做下一步 AT/CG 鹼基對的比值的計算。

Virus name	AT /CG	Ratio
ERVB	428/466	0.91
BVD1	196/198	0.98
GBA-A	221/371	0.59
crTMV	52/16	3.25

(表六)其中幾個病毒 5'UTR 序列中 AT/CG 鹼基對的比值。列出數種病毒 5'UTR 序列中 AT/CG 鹼基對的比值，如 GBA-A 的 AT/CG 鹼基對比值為 0.59，而 crTMV 的 AT/CG 鹼基對比值為 3.25。5'UTR 的 AT/CG 比值在不同的病毒間差異極大。

	病毒名稱	IRES 名稱	IRES 序列長度	有無重複
39	crTMV	crTMV_IREScp	146	NO Repeat Found
		crTMV_IRESmp75	75	NO Repeat Found
		crTMV_IRESmp288	288	NO Repeat Found
40	crPV	crPV_5NCR	708	NO Repeat Found
		crPV_IGR	192	NO Repeat Found
41	GBV-C	gbv_c	630	NO Repeat Found
42	HAV_HM175		584	NO Repeat Found
54	GBV_B	gbv_b	416	NO Repeat Found
59	PSIV	psiv_igr	415	NO Repeat Found
68	Idefix	idefix		Repeat Found
69	GYPSY	Gypsy-env	330	NO Repeat Found
		Gypsy-D2	517	Repeat Found
		Gypsy-D5	261	Repeat Found
73	HIV-1	HIV	233	NO Repeat Found
77	TSV	TSV_igr	250	NO Repeat Found
139	HRV2	Hrv-2	604	NO Repeat Found

140	EMCV-R	Emcv-r	576	NO Repet Found
148	CSFV	csfv	373	NO Repet Found
222	HCV_type_1a		383	NO Repet Found
225	CVB3	cvb3	750	NO Repet Found
242	PV	PV_type1_Mahoney	312	NO Repet Found
286	ERAV	ERAV 242-961	712	NO Repet Found
321		FMDV type-c	461	NO Repet Found
322	LINE-1	ORF1 -44 to -1	47	NO Repet Found
		ORF1 101 to -1	101	NO Repet Found
		ORF1 302 to -202	101	NO Repet Found
		ORF1 138 to -86	53	NO Repet Found
416	AEV	AEV	494	NO Repet Found
435	REV-A	Rev-a	577	NO Repet Found
437	RhPV	RhPV_5NCR	579	NO Repet Found
		RhPV_IGR	232	NO Repet Found
577	FeLV-Nothc2		238	NO Repet Found
596	SV40	SV40_661-830	170	NO Repet Found
597	TMEV	tmev	1040	NO Repet Found
598	PV	PV_type3_Leon	742	NO Repet Found
602	crTMV	crTMV_IRES _{Scp}	148	NO Repet Found
603	crTMV	crTMV_IRES _{Scp}	148	NO Repet Found
615	TMV_type1	TMV_U1_IRES _{mp} 288	231	NO Repet Found
616	HiPV	HiPV-IGR pred	188	NO Repet Found
618	ABPV_IGRpred	ABPV_IGRpred	199	NO Repet Found
619	ALPV	ALPV	184	NO Repet Found

620	BQCV	BQCV_IGRpred	190	NO Repet Found
621	DCV	Dcv-igr	189	NO Repet Found
622	HoCV-1	HoCV-1_IGRpred	188	NO Repet Found
623	IAPV	IAPV_IGRpred	199	NO Repet Found
624	KBV	KBV_IGRpred	202	NO Repet Found
625	SINV-1	SINV-1	200	NO Repet Found
626	Trv	trv_5ntr	694	NO Repet Found
		trv_IGR	221	NO Repet Found
627	EoPV	EoPV_5NTR	390	NO Repet Found
637	EV71	EV71_1-748	748	NO Repet Found

(表七)重複序列的分析結果。將每一個 IRES 分析之後，所得到的結果如(表七)，在所有病毒的 IRES 中，我們一共發現了三個 IRES 具有重複序列。

Virus name	IRES name	
Idefix	Idefix	Repeat Found
GYPSY	Gypsy-D2	Repeat Found
GYPSY	Gypsy-D5	Repeat Found
Idefix	Drosophila melanogaster Idefix retroelement: gag, pol and env genes, partial	
GYPSY	Drosophila melanogaster gypsy transposable element, complete sequence	

(表八)其中三個 IRES 具有重複序列。在全部的 IRES 中只有 3 個具有重複序列，比例占極小一部份，而且彼此之間的重複序列並不相同。不具有特殊的意義，可以判斷，重複序列並不是 IRES 的重要特徵。

```

37 MELItNELLyKtYKQKPVGVEEPVYDqa6dPLF6ErgaVHPQSTLKLPHkRgerDvPtnL
148 MELnhfELLyKtNKQKPMGVEEPVYDat6rPLF6DpseVHPQSTLKLPHdRGrkNkTtL

37 aSLPKRGDCRSgnrSPVSGIYLKPGPLFYQDYkGPVYHRAPLELFEEgsmCetTKRIGR
148 kNLPRKGDRCRSgnhLPGVSGIYVKGPGVYQDYmGPVYHRAPLEFFDeVqfCevTKRIGR

37 VTGSdGKLYHiYVICDGIILKsAtRsyqRvfRWVhNrLDCLPWLVTCSdtkEgATkkK
148 VTGSdGKLYHtYVICDGIILKlAkRgepRtLkWIrNftDCPLWVTCSd---DgASgsK

37 tQKPRLeRgKMKIvPKEsEKDSKTKPPDATIVVEGVYQVRRKkGktKsKNTQDGLYHNK
148 eKKPDRInKGLKIvPKEhEKDSRTPPDATIVVEGVYQVRRKkGkvKgKNTQDGLYHNK

37 NKPqESRKKLEKALLAWAIAIIVLFQvmtgENITQWNLqDNGTe6IQrAMFqRGNVNSLH
148 NKPpESRKKLEKALLAWAIAIIMLYQpveaENITQWNLsDNGTnGIqHAmYLRGNVNSLH

37 GIWPeKICtGVPSHLATDIELKtIh6MMDASEkTNYTCRQRHEWNKHWGNWYIEPW
148 GIWpGKICtGVPTHLATDVELKeIq6MMDASEgTNYTCRQRHEWNKHWGNWYIIPW

37 ILVMNRTQANLteGqPpRECAVTCRYDRaSDLVNVVQARDsPTpLTGCKKGNFSFAGiL
148 ILVMNRTQADLaEgPpVKECAVTCRYDKdADINNVVQARNrPTtLTGCKKGNFSFAGVt

37 MrgPCNFeIAasDvLFkEHEriSMfQDttLYLVDGLTNSLEgARQGTAKLTTWLKQLgi
148 IesPCNFvSveDtLYgDHEcGSLQDaaLYLVDGMTNIEEnARQGaARVTSWLRQLrt

37 lGKkLeNKSktWFGAYaSPYCDVdrKIGYIWyTnCTPAclPKntKIVGPKFgTNAED
148 aGKRLeGRSKtWFGAYaLSPYCNVtsKIGYIWyTnCTPAclPKntKIIGPKFgTNAED

37 GKILHEMGGHSEvLLLSLVLSDFAPETAsvMYLILHFsiPQsHvDvmdCDktQLNLTv
148 GKILHEMGGHSEfLLLSLVLSDFAPETAsaLYLILHYvIPQpHdEpegCDtnQLNLTv

37 ELtJaEVIpGsvMNLGKYVCIRPNWNPYETvVLaFEEVsQVVKLALRALRDLTRVWNSA
148 ELrTeDVIpGsvMNVGKYVCVRPNWNPYETeVLaLFEeVgQVVKLaLRALRDLTRVWNSA

37 TtAFLVCLVKIVRGQMVQGIWLLLLIT6vQhLdCKpEFsYAIkdeRIGqLGAeGLTT
148 STIAFLICLIVLKGIVQGVWLLLVtGaQGrLaCKeDyYAISttDeIGLGAeGLTT

37 TWKEYSpGhKLeDtmVIAwCedGkLmyLqrctretRYLALHtRALPSTSVfKkLFDGRk
148 TWKEYNhdLQLnDgtVkaSvAgsfkvtalnvsrRYLAsLhKALPSTSVfEELFDG-t
    
```

(圖一) C 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 區域與全域都有極高相似性，判定為同源基因。C 群病毒有：Bovine viral diarrhea virus1、Classical swine fever virus。

```

225 MGAQVSTQKTGAHEtrLNASgnSiIHYTnINyYKDa5n5AnRQdftQDPgKFtePVKDI
637 MGSQVSTQRSgSHensnSAtegsTiNYTtINyYKSYaA7AgKQkslkQDPdKFanPVKDI

225 miKsLpaLnSPtVeeCGYSDRVsITLGNSTIITQEcANVVVGYGvWPdYlkDSEATAeD
637 ftEmaapLkSPSaEaCGYSDRVaaqLTIIGNSTIITQEaANIIVGYGvWPsYcsDSDATAvD

225 QPTQPOVAtcRFYTLDSvqWQKTSpGWNWKLpDaLsNlGLFGQNmQYHYLgRTGYtVHVQ
637 KPTRPDVsvnRFYTLDTkLWEKSSkGWYWKfPDvLTeTgVfGQNaQFHLYrRSgFcIHVQ

225 CNASKFHQGC LLVvcVPEaeMgcatLdntpsaellGGdsakEfad--Kpvas6SNkLvq
637 CNASKFHQGaLLVavLPEyVIGtva-----6GtgtEDshppyKqtqp6ADgfeL

225 RvvYnagm6VgVgnLTI fPHQWInLRtNnsAtIVMPYtNSVPMdMnfrHnNvtLMVIPfv
637 QhpYvLda6IpIsqLTVcPHQWInLRtNncAtIIVPYtINALPfdSaLnHcnfgLLVVPis

225 PLDYcp6STtyVPIITVIAPMCAEYn6LRlAghQ6LPTmntPGScQFLTSDdfqSpsaMP
637 PLDYdqGATpvIPITIIAPMCFEfaGfrRqAvtQGfPTelkP6TnQFLITDDgvSapiLP

225 qYdvTPeMrIPGEVKNLMEIaEVDSVvPvqNVgekvnS-MeayQiPvrSneGs6tqvfgF
637 nFhpTPcInIPGEVRNLELcQVETILeVnVpntnatSLMERLRFpVsAqa6k6elcavF

225 pLqPgySsvFsrTLLGEIlnYYtWSGSIXLTFMFcGsaMATGKfLLAYSPPGagaPtkR
637 radPgrSgpMqsTLLGQLcgYYTqWSGSLEVTFMFtGsfMATGKMLIAYTPPGpLPkdR

225 vdAMLGthVWWDvGLQSScvLcIPWISqTHYRfvAsD---EYtagGfITcWYQTNiVVPa
637 atAMLGtdIWDvGLQSSvtLvIPWISnTHYRAhArDgvfDYyttGLVSiWYQTNyVVPi

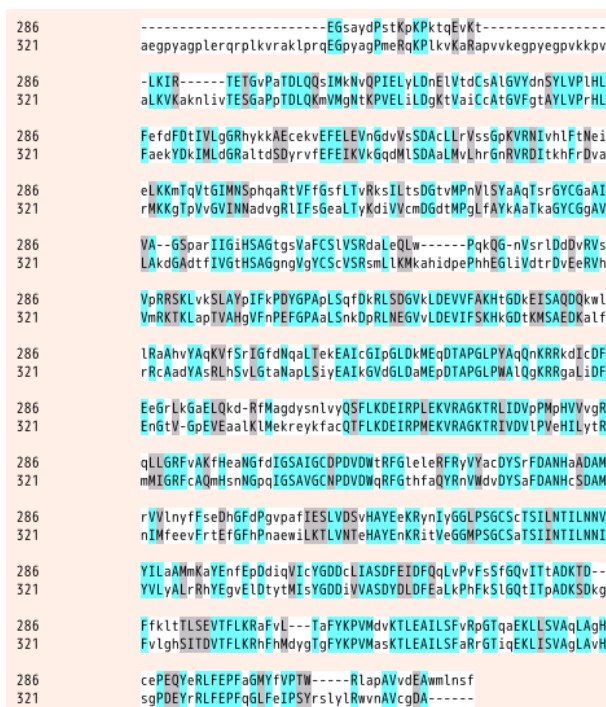
225 dAqSScYIMcfvSACnDFSVRLKdtpfIsQqnffQ6p-----VEdAItaAIgrvadvtvg
637 gApNTaYIIaLaAAqkNFTMKLcKDasdILQtgtiQ6drvadvIEsSIgdSVsRaltraL

225 tgPTnsEai-----PALtAAEt6hTSqvvpdgtNQTRhWkNyHSrSESTIENfL
637 paPTgqdtqvsshrLdtgkPALqAAEi6aSSnasdesmIETRcVlnSHStAETILDSff

225 cRSacVlyftEyknsGakr---YAEwvLtprrqaAQLRRKLEfFTYVRFDELFLFVItStqq
637 sRAglVgeiDlpLeGttnpngYAnWdIditgyAQMRKVELFTYMRfNaEITFVAcTp--

225 pstTqnqdaQILthQiMYVPPGgPvPdkvDSyWQTSNPSVfWtegNaPpRMSIPFLSi
637 ---IgevvqQLL--QyMEVPPGgaPkPdSrESlaWQATNPSVfVklSDoPaQVSVPFMSp
    
```

(圖二) D 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 區域與全域都有極高相似性，判定為同源基因。D 群病毒有：Human Coxsackievirus B3 strain、Human enterovirus 71 strain。



(圖三) E 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 區域與全域都有極高相似性，判定為同源基因。E 群病毒有：Equine rhinovirus 1、Foot and mouth disease virus strain C。

139 PV (human) PV	MGAQVSrQnVGtHstqNsvsn6SsLNyfnINyfkDaASnqASKLeFtQDPSKFTdPVKDV MGAQVSSQKVGAEHNSNRAYGGSTINYYTINYYrDSASNAASKQDFSQDPSKFTPEIKDV MGAQVSSQKVGAEHNSNRAYGGSTINYYTINYYKDSASNAASKQDySQDPSKFTPEIKDV
139 PV (human) PV	LeKgiPtLqSPtVEACGYSDRiiQiTrGdSTITsQdvANaiVAYGwPhYLsskdAsaiD LiKTAPmLNSPNIeACGYSDRVLQLTLGNSTITITQEAANSVVAYGrWPEYLRDsEANPVD LiKTAPaLNSPNEACGYSDRVLQLTLGNSTITITQEAANSVVAYGrWPEfIRdEANPVD
139 PV (human) PV	kPsqPDtsSnRFYTLrsVtWssSSKGGWWWLDPALkDMGiFGE NMfYHYLGRSGYTiHVQ QPTEPDVAACRFYTLDTVstKESrGWWWLDPALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQ QPTEPDVAtCRFYTLDTVmGKESKGGWWWLDPALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQ
139 PV (human) PV	CNASKFHQGLiValIPEhqiAsalhg-nvNvgYnythPGEtGrevkAe-TrLnpdLqPt CNASKFHQGLgVFAvPEmCLAGDsNttmHTSYqNANPGEkGgtFtgtFITpdNnqTSPA CNASKFHQGLgVFAIPEyCLAGDsDk-qrYTSYaNANPGErGgkFySqFndNavTSPk
139 PV (human) PV	eEy----wLnfD6TLGNitiFPHQfINLrNSNSATIiaPYVNAvpmDSMrSHNNwslvI RrFCPVDYLgnGTLGNAFVPHQIINLRTNNcATLVLPPVNSLsIDSMvKHNWGIAl REFCPVDYLgCvLLGNAFVPHQIINLRTNSATIIVPYVNAIaIDSMvKHNWGIAl
139 PV (human) PV	iPicPLE-tSsaintIPITIsIsPMCaeFSGaR---aKrQGLPVfiTPGSgQfLTdDf LPLaPLNFASESspEIPITLIAPMCcEFNGLRNITLPrIQGLPVmnTPGSNQLTADNF LPLsPLDFAqDSsvEIPITVIAPMCcEFNGLRNVTaPKfQGLPVlnTPGSNQLTSDNh
139 PV (human) PV	QSPCALPwyhpTkeIsIPGEVKNlvEicqvDslVpIwntdTyiNsenMYsVvLqsSiNap QSPCALPeFdvTPPIDIPGEVKNMELAEIDTMIPFdLsaTKkNTMEMYRvRLSDkphd QSPCALPeFdvTPPIDIPGEVKNMELAEIDTMIPLnLesTKrNTMDMYRvtLSDSaDls
139 PV (human) PV	DkIfsirtvdASqP-LatTLiGEIssYfTHWtGSLrFsFmFCGtantTvKLLIAYtPPGi DPLCLLSPASDPRLSHTMLGEIINYYTHWAGSLKFTFLFCGfMMAtgKLLVYAPPGA qPILCLLSPASDPRLSHTMLGEvLNYYTHWAGSLKFTFLFCGfMMAtgKiLVAYAPPGA
139 PV (human) PV	aePttRKdAMLGHVWVGLQStisMVPVWISashYRnTspgrsT-sGYItcwYQTRLV dPPkkRKEAMLGHVWVIGLQSSCTMVPVWISatTYRQIdDSFTEGGYISvFYQTRIV qPPTsRKEAMLGHVWVIGLQSSCTMVPVWISvTYRQTqDSFTEGGYISmFYQTRIV
139 PV (human) PV	iPpqTPptarLLcFVSGCkDFcLRmaRDTnHlQsqAiAQnp---VENyIDEVLINEvL-- VPLSTPreMdlLgFVSACNDFSVRLRDTT-HIEQKALAGIgmLemDntvrEtv-- VPLSTPksMsmLgFVSACNDFSVRLRDTT-HIeQsALpQG----IEDLIsEVAqgaLtl

(圖四) F 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 區域與全域都有極高相似性，判定為同源基因。F 群病毒有：Human rhinovirus 2 Human poliovirus 1 Mahoney、Poliovirus P3 Human enterovirus C。

603 615	MAqfQqtidmqTLqaaaGpNSLVNDLAsRRVYDnAVEELNARsRRPKVHFSKaVStEQTL MAytQtattsaLdtvrgnNSLVNDLAKRRLYD+AVEEFNARdRRPKVNFsKvISeEQL
603 615	IATnAYPEFEISFtHTQSAVHSLAGGfRSLELEYLMMQVPF6SLTYDIG6NFS AHLFKGR IATrAYPEFQITfYNTQNAVHSLAGGfRSLELEYLMMQIPYGSLTYDIG6NFS AHLFKGR
603 615	dYVHCCMPNLVDROIaRHEGhKEAIHsYVNRlKRqqRpVPeYQRAfNnYAE nPhfvhCd aYVHCCMPNLVDROIaRHEGqKDSIElyLSRLERggkTvpFnQKaAFDrYAEiPedavCh
603 615	kpFQqc-elttangtdtYAVAlLSIYDIPvEEFGSALLRKNvkTCFAAFHFhENMLLDcd ntFQtmrhqpmqsgrvYAlALhSIYDIPaDEFGAALLRKNvhTCYAAFHFENMLLEds
603 615	tVtLDEIgaAtFqRa6DnLsfFhNEStLNYtHSFNSIIKYVCKTFFPASqRfVyhKEFLV yVnLDEInAcFsRd6DKLTFsFaSEStLNYtHSYSNIIKYVCKTYFPASnReVyhKEFLV
603 615	TRVNTWYCKFTRVDTFtLFRGvYHnVDcEEFYkAMDDAWHYKKTlAMNAERTIfKDNA TRVNTWCKFSRIDTFLYKGVaHkSVDsEQFYtAMEDAWHYKKTlAMcNSerILLEDSS
603 615	ALNFWFPKVRDMVIVPLFDaStTgMmSRREVMNKFVYTVLNHIKTYQAKALTYANVL SVNYWFPKMRDMVIVPLFD:SLeTskrTRKEVLVSXDFVTVLNHIRTYQAKALTYANVL
603 615	SFVESIRSRIINGVTARSEWDtDKAILgplAMTFFLiTKLghVQDEIILkKFqkfdRTt SFVESIRSRIINGVTARSEWDvDKSLLqsLSMTFYLhTKLavlKDDLLIsKFsLgsKtV
603 615	nEliWtsLcdAlmqvIpsVKEtLVrggfVKVAeqALEIKIPELYcTFaDRLVLQYKkAeE cQhVWdeIslaFgnafPSVKErLnrkLIRVAgdALEIRVPDlyVTFhDRLvtEYKaSvD
603 615	fQScDLsKpLEESEkyYNALSELSVLenLdsFDLEaFktLCQqksVDPdmaAKVVAIM- mpALDIrKkMEETEmYNALSELSVLenLdsFDVDFvsqMCQsleVDPmtAAKVIVAVMs
603 615	-KceLTLpFKKPTeeISeSLKtgEgtSaehkVLSLQnDaPfcvknLveGsVpayGMc nEsgLTLtFERPTEanVALALQdqEkaSegalvtSrEvEeP-smkgSMarGeLqla6La
603 615	---PKgggfdkLDVD-IadFHlkSvDAVKRgtMmSaVYTGsIEVRQMKNYIDyLsASLSA gdhPEssyskneIEsLeqFHMAtaDLSLIRkqMsS:VYTGpIKVQMKNFIDSLASLSA
603 615	tVSNLcKVLrdvhgVDPeSQEKsGVmDvrrgRWLLKpNAKSHAWGvAEdanhKlvIvLLn aVSNLvKILKDtaaIDLETROKfGVLDVasrKWLIXPtAKSHAWGvVEtharKyhVaLLe

(圖五) G 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 區域與全域都有極高相似性，判定為同源基因。G 群病毒有：Tobacco mosaic virus。

```

EMCV-R      mattmeqetCaHsLtfEeCPkCSALqyrnGF-YLLkyDeEWYpELLt-DgEDDVf----
597         -----maCkHgyp-DvCPiCTAVdatpGfEYLLmaDgEWYptDLLcvDLODDVfwpd

EMCV-R      -----DpeLdmEVVfELQGNSTSSDKNMSsEgNEGVIINNFYSNQYNSIDLS
597         tsnqsqtmDwtDvpLirDIVmEpQGNSSSSKNSqSs6NEGVIINNFYSNQYNSIDLS

EMCV-R      ANaaG5-DpPRTyGQfSNLfsGAvNAFSnM1PLLADQTEEMENLSDRVsQDtAGNTvTN
597         ASggnAgDaPQInGQLSNIlgGaANAFAtMaPLLlDQTEEMENLSDRVAsDkAGNSaTN

EMCV-R      TQSTVGRlvGYGtvHdGEHPASCADTAASEKILAEVRYTfKvndWTSTQKpFeYIRIPLP
597         TQSTVGRlcGYGksHnGEHPASCADTADKVLAAERYTidLasWTSQEAfHIRIPLP

EMCV-R      HVLSGEDGGVFGAaLRRHYLkTGWRVQVQCNASQFHAGsLLVFMapeYpT-----
597         HVLAGEDGGVFGAtLRRHYLkTGWRVQVQCNASQFHAGsLLVFMapeYpTgkgtktgtn

EMCV-R      --LdaFaMdnrW-SkdnLpNgtrTqTnKkGpFAMDHQnfWQWTLYPHQfLNLRTNTTVDL
597         epsDpFtMDteWrSpqgaPtGyRyds-RtGfFAtNHQnQWQWTVYPHQLNLRTNTTVDL

EMCV-R      EYPYVNIAPTSSWTQHASWTLVIAVAPLTYSTGAStsLdITASIQPvrPVFNGLRHETL
597         EYPYVNVAPSSWTQHANNWTLVAVLSPQLqYATGSspDvqITASLQPVnPVFNGLRHETV

EMCV-R      srQSPIPVITIREHAgTtWYSTLPDSTVPIYGKtpvaPSMYvGEYkDfLEIaQIPTFIGNk
597         iaQSPIPVITREHkGcFYSTnPDITVPIYGKtistPSDYMCGEFsDLLELcKLPtFLGNp

EMCV-R      ipNa--vPYieASNTaVktqpLatYQVtLSCSCLANTfLAALSrNFaQYRGSLvYtFVFT
597         ntNnkryPYfsATNS-VpatsMvdYQVaLSCSCMANsMLAAVARNFnQYRGSLnFlFVFT

EMCV-R      GtAMMKGKFLIAYTPPGAGKPTSRDQAMQATYAIWDLGLNSSFYtVPFISPTHFRmvgty
597         GaAMVKGKFLIAYTPPGAGKPTRDQAMQSTYAIWDLGLNSSFNFtAPFISPTHYRqtsy

EMCV-R      dqvnITNaDGWVTVWQLTPLYpGcPTSAkILTMVSAGkDFSCLKMISPapWsPQGVEN
597         tsptITSvDGWVTVWKLTPLYpGtPTNSdLTLVSAgDfLrMPSIPkTwvPQGVDM

EMCV-R      AEKGvteNtNATaDFVAQPVyLPENQTKVAFFYNRSsPIGafTVKsG-SLESGFapfsNg
597         AEKGkvsNdDASvDFVAEPVklPENQTRVAFFYDRAvPIG--mLRpGqNMETtFnyqeNd

EMCV-R      tcpNsVILTPpGfPdPaydqLrpQrlteI---WngneetskvFPLkSKQDYSfclFSPF
597         yrLcLLLTPLpScFcdsssgpqktkapVqwrWvrsggvnganFPLmTKQDYAfclFSPF
    
```

(圖六)J 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 區域與全域都有極高相似性，判定為同源基因。 J 群病毒有：Encephalomyocarditis virus、Theiler's murine encephalomyelitic virus。

```

54      laTsyMGfvcdnVLYTahHGSKgRrLAhPtGsIhPitvdAanDqdiYqpCgAGSLtrCS
38      sTTRsMgcCvNGVvYTTYHGtnArpmAgPfgpVnArWWSASDDvTVYPLpN6ascLqaCk
41      aTsrMsGtCLNGLLfTTFHGAsSRtIATpVgaLNPvWWSASDDvTVYPLpGgaNSLvpCS

54      CgeTkgylvtr1G6sLvevknkdDpywcVcgalPMAVA--kGSSGaPILCS6Hvi6Mfta
38      CQpIgvWIRndGALChg-tlGk---vDlDMPaElsDFRGSSGSPILCDEGHAVGNLIS
41      CQaescWVIRsdGALChglskGD---kVeldvaMEVADFRGSSGSPvLCEGHAVGNLVS

54      arnS6GsVSqIR-vRPLvcagyhpqyTahaTldtkPtVPne--YsvqilIaPTGs6KStk
38      VLHrGsRVSSvRYTkP-----WetlPreiearsEaPPVpGttgYREAPLFLPTGAGKSTR
41      VLHSGGRVtaARFTRP-----WtqvPTdakTtEpPPVPkagvfKEAPLfmPTGAGKSTR

54      lPlsYmQekyeVLVLPNSVATtasMpkYMHatyGvnPnCYfngkcTn---TgaSLTYST
38      VPnEyKaGhKVLVLPNSIATVRAMGPyMEkltGKHPsvYCGHDTaYSRTIDSSLTYcT
41      VPLEYgnmGhKVLiLNPNSVATVRAMGPyMERLaGKHPsifCGHDTaFTRItdSpLTYST

54      YGmyLtgacs--RnyDViICDECHaTDaTtVLGIGkVlteApsknVRLVlATATPPgvi
38      YGRFMANPrKylRGndVVICDEIHvTdpTsILGmGRaRLLaReCGVRLlLFATATPPvsP
41      YGRFLANPrQmLRGvsVVICDECHshDsTvLLGIGRVrdvARgCGVQLVLYATATPPgsP

54      pTpHanItEiqltDEGTIPFhgkIkeEnlkGRHLIFeatKkhCdeLAneLArk6itAV
38      MakHeSiHemLgsEGEvPFYcflPrlsRyaTGRHLIFCHSKvECtRLssaLsf6VntV
41      MTqHpsIietkL-DvGEIPFYghgIPLERmrTGRHLVfCHSKaECeRLAGqsar6VNAi

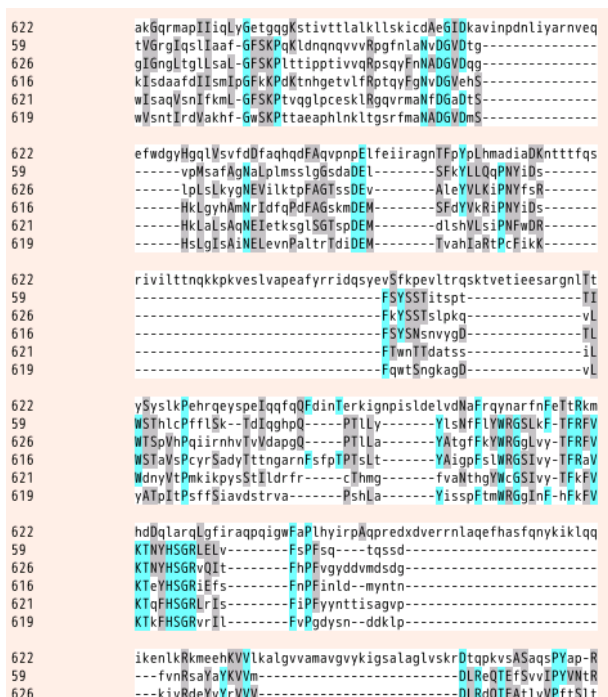
54      sYYRGcDiSkIPeGdcVvVATDALcTGYTgdFDSVYDCsLMVEgtchVdLDPTfTmGVRv
38      vYfRgketd-IPtGdvCVDALSTGYTGNFDtVTDCLMVEEVEVEVLDPTITIGvkT
41      aYYRGkDsIikdGdLVVcATDALSTGYTGNFSDVTDCLvVEEVEVEVLDPTITIsLRT

54      cgvSAivKqQRRGRtGRGRAGiYYVvdgSctPs6mVpecnIveAfdAakAWYGLssteaq
38      VPApAeLRaQRRGRcGRGkAgTYqAlmsSAPAGtVRSgaLwaAVEAgvSWYGLEPDAig
41      VPASAElsmQRRGRtGRGRsGrYYAagvkaPAGvVRSgPVWsaAVEAgvtWY6mEPDlta

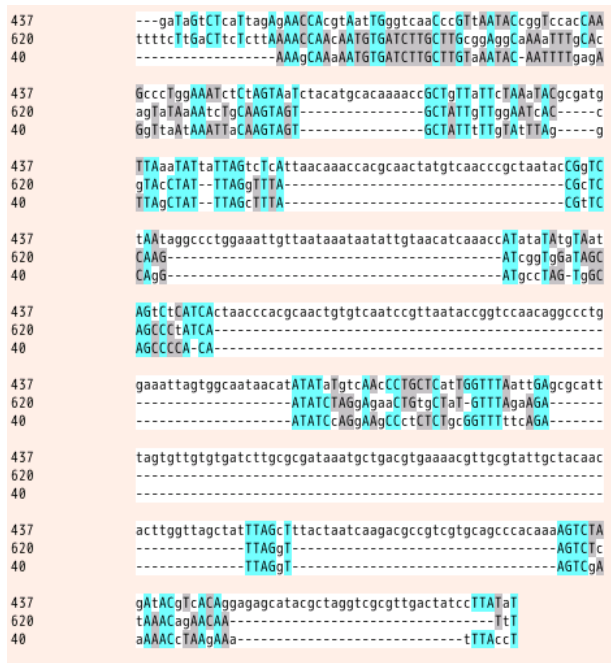
54      tiLdtYrtqPglAIgANldEwAdlFsmvnpPepsFvnt--AKrtadNvvLLtaaQlqlCh
38      dLLRaYDsCPYTAASISsIGEaiaFftgLvPmRnYpQvWAKqkGhNWPLLVGVQRhMcE
41      nLLRlYDdCPYTAaAADIGEaAvFFAgLaPlRmhPDVsWAKvr6vNWPLLVGVQRtMcR
    
```

(圖七)HH 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 區域與全域都有極高相似性，判定為同源基因。 H 群病毒有：Hepatitis GB virus A、

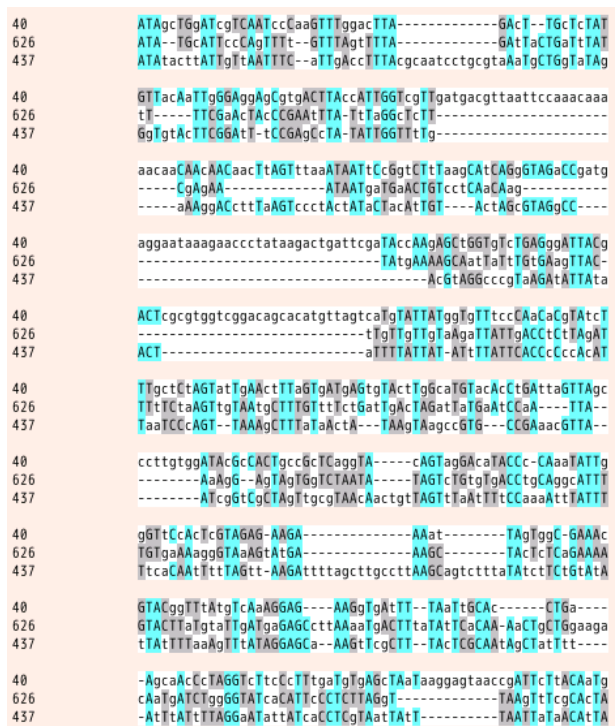
Hepatitis GB virus B、Hepatitis GB virus C。



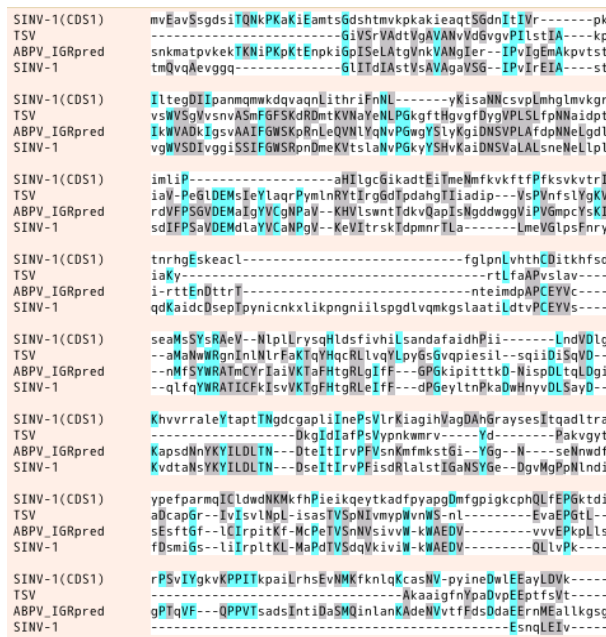
(圖八)A 群病毒，受 IRES 調控的 CDS(capsid protein) 多序列排比分析結果。(截圖)只有有限的局部序列顯示出相似性而全域相似度在這些基因序列之間則極為低。A 群病毒有：Homalodisca coagulata virus-1、Plautia stali intestine virus、Homalodisca coagulata virus-1、Drosophila C virus strain EB、Aphid lethal paralysis virus、Himetobi P virus、Cricket paralysis virus、Rhopalosiphum padi virus、Black queen cell virus。



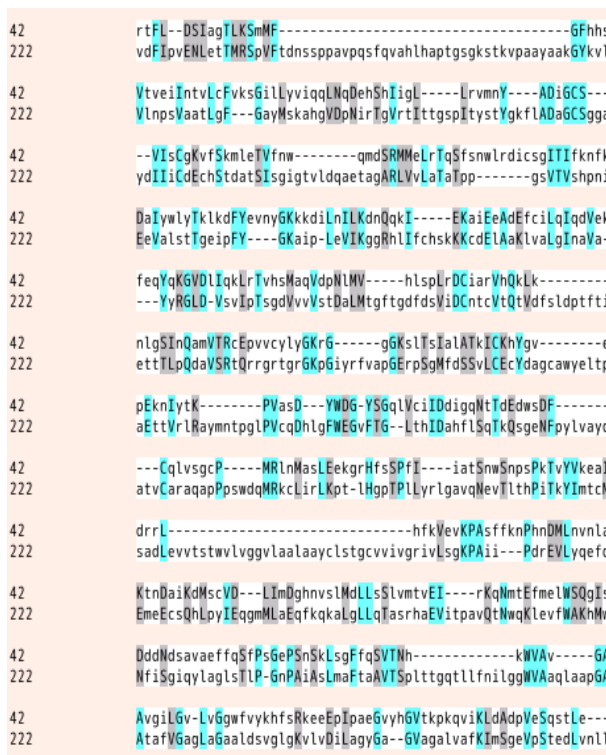
(圖九) A 群病毒，受 IRES 調控的 CDS (非結構蛋白) 多序列排比分析結果。
 (截圖) 只有有限的局部序列顯示出相似性而全域相似度在這些基因序列之間則極為低。A 群病毒有：Homalodisca coagulata virus-1、Plautia stali intestine virus、Homalodisca coagulata virus-1、Drosophila C virus strain EB、Aphid lethal paralysis virus、Himetobi P virus、Cricket paralysis virus、Rhopalosiphum padi virus、Black queen cell virus。



(圖十) A 群病毒，受 IRES 調控的 CDS (結構蛋白) 多序列排比分析結果。
 (截圖) 只有有限的局部序列顯示出相似性而全域相似度在這些基因序列之間則極為低。A 群病毒有：Homalodisca coagulata virus-1、Plautia stali intestine virus、Homalodisca coagulata virus-1、Drosophila C virus strain EB、Aphid lethal paralysis virus、Himetobi P virus、Cricket paralysis virus、Rhopalosiphum padi virus、Black queen cell virus。



(圖十一) B 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 只有有限的局部序列顯示出相似性而全域相似度在這些基因序列之間則極為低。B 群病毒有：Taura syndrome virus、Acute bee paralysis virus、Solenopsis invicta virus 1、Israel acute paralysis virus、Kashmir bee virus。



(圖十二) I 群病毒，受 IRES 調控的 CDS 多序列排比分析結果。(截圖) 只有有限的局部序列顯示出相似性而全域相似度在這些基因序列之間則極為低。I 群病毒有：Hepatitis A virus (wild-type)、Hepatitis C virus subtype 1a。

以 MySQL 建置生物序列資料庫

Using MySQL to build a sequence database

曾詠鈿*、邱偉欣

東海大學生命科學系 生物資訊實驗室

摘要

英國劍橋大學的 Sanger 教授在西元 1977 年完成了 ϕ x174 噬菌體的定序，至此開始，許多不同物種的基因體計畫皆陸續的展開。美國國家衛生研究院 (NIH) 在 1989 年成立了人類基因體研究中心，揭開人類基因體解碼計畫 (Human Genome Project, 又稱為基因組定序計畫) 的序幕。以美國為首以及英、德、法、日等十幾個國家，超過六十個各別的大學和研究機構參與，為人類基因體中 30 億個鹼基進行定序工作。1997 年，美國政府開放了原本只允許官方和學術機構參與的政策；賽勒拉 (Celera Genomics) 生物科技公司和鉑金埃爾默 (Perkin Elmer) 生技公司即合作並投入人類基因體解碼計畫。人類基因體的草稿最終在 2000 年出爐，然而龐大的資料也因此衍生出了關於資料儲存的新問題。

繁多的資料，若沒有經過邏輯化、結構化的儲存，將會造成日後管理的困難，資料庫便應運而生。資料庫，是指擁有一定格式、組織，且能夠有系統的整理儲存大量資料，方便搜尋以及修改的資料集。近年來，由於資料庫管理系統 (DBMS, Database Management System) 的電子化，使人們可以更有效的進行資料管理。

生物序列的儲存，管理和使用是本實驗室非常重要的工作，生物序列包含了 DNA 序列、RNA 序列和氨基酸序列等。這些生物序列均是龐大的資料，若不給予有效且妥善的管理，勢必造成使用上的困難。為了達到對資料的有效管理，我們使用了自由軟體 MySQL 建構資料庫，並且使用 PHP 語言，HTML 語言以及 CSS 編寫 Web 介面，建構友善的資料庫操作界面。

前言

西元 1977 年， ϕ x174 噬菌體的基因體被完整定序開始[1]；西元 2000 年，人類基因體序列的草稿公布完成[2]；至今不斷地有新的生物基因體被定序出來[3]。而這僅是生物序列的一部分，所謂生物序列包括了 DNA 序列、RNA 序列以及氨基酸序列。這些

序列的紀錄方式由於科技的蓬勃發展，漸漸從紙本變成可在網路快速傳播的電子檔。網路上的電子資料大量出現，勢必要有一個能有效管理這些電子資料的方法，電子資料庫便應運而生。

實驗室中，各研究人員使用網路上收集而來的生物序列進行各自的研究，但難免會有重複下載，卻互相不

知道的情形。如前所提，生物序列為一筆當龐大的資料，若重複下載儲存的情況發生越多次，則儲存資源的浪費也會越嚴重。故實驗室需要一個能有效管理這些生物序列的方法，而電子資料庫的架設便成的最理想的選擇。資料庫能有效的將資料統整，使資料能有邏輯的被儲存，在日後新增或搜尋資料也都可以依循此邏輯下去執行。

資料庫需要管理，而資料庫管理系統就是為管理資料庫而設計的電腦軟體系統，用以管理資料庫的分類及數據的存取[4]。具有代表性的資料管理系統有：Oracle[註一]、Microsoft SQL Server[註二]、MySQL[註三]及 PostgreSQL[註四]等。通常資料庫管理員會使用資料庫管理系統來建立資料庫系統。建立資料庫需要一個模型語言對應該資料庫管理系統的數據模型，定義其資料庫的架構。最常用的三大類分別為階層式、網路式及關聯式的模型，可以視乎不同的需求選擇最適合的模型。目前最常使用的是關聯式模型，並需以 SQL 語言[註五]操作之。而儲存至資料庫的數據則須經最佳化（欄位、紀錄及檔案），這樣可以在永久儲存裝置（permanent data storage device）上儲存極大量的數據。而當一般使用者要搜尋或儲存資料時，資料的查詢語言及撰寫資料表的程式，讓使用者可以互動方式查問資料庫，進行資料分析及依使用者的權限來更新資料，並同時在多使用者同時存取之下仍維持數據完整。

實驗室的電子資料庫是由 MySQL 所建立，這套軟體是個功能強大、穩定的自由軟體，麻雀雖小五

臟俱全，雖為自由軟體，但卻幾乎具備了架設資料庫所有需要的功能，故它也是中小型企業、個人架設資料庫的最佳選擇。而資料庫類型是目前網路上最流行的關聯式資料庫，其特徵是由許多的二維式資料表組成。資料表是由欄與列組成：每一列表示著一筆資料，每一筆資料有著許多的值，又以欄位分隔值的不同類型。而不同的資料表間，彼此會有某些欄位存有一些關聯性，這些關聯性可使資料表中的資料經由電腦計算而產生新的暫存資料表，不只讓資料需重複儲存的情形大大降低，減少儲存資源的浪費，也因如此，用關聯取代個別搜尋，資料庫搜索引擎的速度可以大幅提升。不同的資料表的資料也可以有多元化的組合，讓資料的表示可以更靈活，這也是關聯式資料庫受歡迎的原因。

在製作一個電子資料庫時，為了方便一般使用者使用，會配合上一個網頁程式語言與 Web 介面結合，讓使用者在遠端透過 Web 介面與伺服器進行互動。網路上最常見組合便是 MySQL+PHP，而實驗室也是使用此組合。PHP（Hypertext Preprocessor）是一種在電腦上執行的程式語言，主要用途是在於處理動態網頁，產生圖形使用者介面（GUI）[註六]，另外也包含了命令列執行介面（GLI）[註七]。PHP 大多在伺服器端執行，透過執行 PHP 的程式碼來產生網頁提供瀏覽器讀取，在 Web 介面與資料庫間的連結間，扮演非常重要的腳色。PHP 的優點在於它是設計 GUI 的好工具，易學易用，且由於它普遍被應用，故在網路上相關的資

源亦非常豐富。

Web 的介面與使用者是否能有效操作資料庫有著密切的關係。HTML (HyperText Markup Language) 就是網路最普遍用來編寫 Web 介面的一種「超文字標籤語言」，它跟一般的文書處理器不同的地方在於，它具有超文字 (HyperText)、超連結 (HyperLink)、超媒體 (HyperMedia) 的特性，透過網路能夠在世界各地用甚至用不同系統的主機作交流。所謂「超文字」和一般傳統文件最大的不同就是，傳統文件只能讓你循序地閱讀，而「超文字」是藉由一些特殊標籤 (例如連結) 的協助，以樹狀甚至網狀 (故稱為 Web) 來組織文件。標示 (Markup) 是透過在文章中插入標籤 (Tags) 來賦予文字一些特性，如標題，段落，連結等等。Web 介面是使用者在使用資料庫時最直接接觸的層面，介面上資訊的呈現方法不同，使用者能吸收到的資訊強度也會有所不同，故在網頁上的排版也是相當重要的。

實驗室將會以關聯式資料庫模型為基礎，利用 MySQL 建置一生物序列資料庫，配合上 PHP、HTML 以及 CSS 做出來的網頁介面，可以方便實驗室研究人員使用此資料庫。研究人員可以上傳所搜集到的資料，資料庫管理系統會將這些資料有邏輯的歸類整理存入資料庫中；研究人員亦可利用此資料庫搜尋生物序列，或者有比對出有相似序列的生物。

材料與方法

伺服器的建置

電子資料庫的架設需要一台主機作為伺服器之用。LAMP，是指一組常被一起使用來執行動態網站或者伺服器的自由軟體，分別是指 Linux、Apache、MySQL、PHP。Linux 為作業系統，Apache 為網頁伺服器軟體，MySQL 為資料庫管理系統，PHP 為網頁程式語言。實驗室的電子資料庫便是使用此組合。

Linux 作業系統擁有數一數二的穩定性和運行效率，且由於 Linux 是建於 GPL[註八]基礎下的產物，因此任何人皆可以自由取得。Linux 支援者眾多，有相當多的熱心團體、個人參與其中的開發，因此可以隨時獲得最新的安全資訊，並給予隨時的更新，亦即是具有相對的較安全！相較於 Windows 系統，安裝 Linux 系統主機上可以同時允許多人上線來工作，且資源的分配公平而穩定。多人多工是 Linux 一個相當好的功能，可以在一 Linux 主機上面規劃出不同等級的使用者，而且每個使用者登入系統時的工作環境都可以不相同，此外，還可以允許不同的使用者在同一個時間登入主機，同時使用主機資源。Linux 幾乎不受電腦病毒的感染，一來是因為病毒在 Linux 下幾乎不會發作，原因除了大部分的病毒都是為 Windows 寫的之外，二來是因為 Linux 有非常好的權限管制，系統只有管理者才可以進入，所以即使遭受電腦病毒感染，也無法破壞系統。Linux 當初規定旗下的軟體，都一定要開放原始碼，懂得程式碼的人可依不同的需求，在之後個別加入所需軟體，也因此有許多不同版本的 Linux

可以選擇，像著名的 Ubuntu、SUSE、Red Hat 等版本。實驗室是使用 Arch-Linux，其優點就是系統執行速度快，以及其附加套件非常精簡的特性，是作為伺服器的最佳選擇。且不同於其他版本半年的才一次升級，Arch-Linux 採用無縫升級的方式，使系統永遠保持在最新狀況。相較於其他的版本，不只新軟體進套件庫的時間非常緩慢，有時必須升級才能使用新版的軟體；Arch-Linux 沒有這樣的問題，往往都是在軟體的新版本發佈後一天內，就可以快速獲得更新！

除了主機，作業系統與使用者所製作的網頁外，還需要一套能將網頁放置網路上讓他人存取的軟體，也就是所謂的網頁伺服器軟體。實驗室是使用 Apache 作為網頁伺服器軟體，其提供完整的原始碼，並且允許自由使用及修改。同時也支援多種平台的使用，目前可供執行 Apache 伺服器軟體的作業系統包括：Unix、Linux、BeOS、OS/2、Windows 以及 Netware 等，最重要的是它穩定度以及執行效率，受到大家的喜好。

MySQL 與關聯式資料庫

而實驗室是使用 MySQL 這套軟體來架設實驗室的關聯式資料庫，但 MySQL 這套軟體需要使用繁雜的 SQL 語言來進行操作，故會使用 phpMyAdmin 來輔助資料庫的架設。phpMyAdmin 是一套由 PHP 網頁程式語言編寫成的 MySQL 資料庫系統管理程式，讓管理者可以使用 Web 介面管理 MySQL 資料庫[圖一]。藉由此 Web 介面，可以運用一個簡易方

式輸入繁雜 SQL 語法，尤其要處理大量資料的匯入及匯出更為方便。使用 phpMyAdmin 就可以方便的建立、修改、刪除資料庫及資料表。

資料表的建立需透過不斷的思考、嘗試與討論，小心翼翼將其建立起來，若稍有思考不構縝密的地方，建立起的表格可能會在日後造成資料庫的運行會有問題產生。例如，資料表在建立時，每個欄位都要給予名稱，且不得重複；慎選欄位的種類，不然將來資料可能出現無法儲存的問題等。

HTML 與 CSS

HTML 是架設 Web 網頁所以必須的一種網頁標籤語言，標籤語言是一種將文本 (Text) 以及文本相關的其他信息結合起來，展現出關於文檔結構和數據處理細節的計算機文字編碼。與文本相關的其他信息 (包括例如文本的結構和表示信息等) 與原來的文本結合在一起。但是為了加強文字的可讀性，多半會使用 CSS 串聯式樣式表作為輔助，來強調 HTML 結構化的訊息。CSS (Cascading StyleSheets)，顧名思義稱之為「串聯式樣式表」。其功能廣泛，凡是網頁上看得到的文字、圖片、表格、表單皆可以使用。文字方面，您可以利用 CSS 來隨意設定字體大小、設定行距、間距、去除連結底線等，可以加強訊息可以被讀取的效率。亦可以利用 CSS 將圖片或文字精準的定位在網頁上的某一個地方，更可以更改表單、表格的框線、顏色等，甚至可以更改滑鼠形狀或是做出類似簡報的轉場效果。

HTML 與 CSS 的組合可以讓電子資料庫所需的 Web 介面，不只有美觀效果，在操作方面也更加人性化、直覺化。

結果

在關聯式資料庫所需的資料表部分已經完成。資料的類型分為物種名稱、染色體編號、染色體的序列、基因名稱，和各基因有的 cds、est、Genome Sequence、Open Reading Frame、cDNA 等 DNA 的序列，以及基因轉錄出來的 RNA 序列、及胺基酸序列。將其分成 9 個資料表，建立彼此的關聯[圖二]。編號一資料表有三個欄位，欄位名稱分別是「物種名稱」、「染色體編號」、「序列」，其輸入的資料為某物種某染色體的編號及其 DNA 序列。編號二資料表亦有三個欄位，「物種名稱」、「染色體編號」、「基因名稱」，其輸入資料為某生物某染色體帶的某基因。兩資料表的「物種名稱」、「染色體編號」欄位名稱相同，將其做上關聯。編號二的資料表「基因名稱」關聯到其他編號三至編號九等七個資料表的「基因名稱」欄位。其餘七個資料表都為兩個欄位，除了「基因名稱」欄位分別是「RNA 序列」、「胺基酸序列」以及「cds」、「est」、「Genome Sequence」、「Open Reading Frame」、「cDNA」等五個不同範圍基因的 DNA 序列。編號三與四資料表，各別為其基因轉錄、轉譯出來的 RNA 及胺基酸序列。

而在 Web 介面部分，也已完成一個符合實驗室需求的網頁，具有個別搜尋物種的名稱、基因名稱的相關

序列，亦可以輸入序列，來尋找相關的基因或者物種。同時擁有上傳的功能，可讓研究室人員搜尋到的新資料依照資料庫當初設定的邏輯，輕鬆上傳新增資料[圖三]。網頁中的搜尋欄位可輸入物種的名稱，搜尋出其生物的生物序列，亦或輸入一段不知名的序列藉以搜尋有這段序列的物種或者是基因。

討論

目前資料庫所需的資料表已經架設完成，符合實驗室研究人員使用的 Web 網路介面也已完成，接下來的目標就是建立起 PHP 網路程式語言對於兩者的連結。PHP 網路程式語言的使用與資料庫的建立及 Web 網頁的建立是使用截然不同的平台，在使用上須從頭學習起其語法及如何應用。同時，也須在建立連結後，測試其 PHP 語法是否有錯誤造成連結出問題，使 Web 網頁以及資料庫間的資訊轉換及呈現能夠順利進行。

附註

[註 一]
<http://www.oracle.com/global/tw/index.html>

[註 二]
<http://www.microsoft.com/sqlserver/2008/en/us/>

[註 三]
http://www.mysql.com/?bydis_dis_index=1

[註四]<http://www.postgresql.org/>

[註五] SQL 全名是結構化查詢語言 (Structured Query Language) 是用於資料庫中的標準數據查詢語言。

但在各種資料庫系統都有對 SQL 規範作了某些編改和擴充。所以不同資料庫系統之間的 SQL 語言並不能完全相互通用。

[註六]Graphical User Interface，簡稱 GUI，是指採用圖形方式顯示的電腦操作用戶介面。與早期電腦使用的命令列介面相比，圖形介面對於使用者來說在視覺上更易於接受。

[註七]Command Line Interface，簡稱 CLI，是指在圖形使用者介面得到普及之前使用最為廣泛的使用者介面，它通常不支援滑鼠，使用者透過鍵盤輸入指令，電腦接收到指令後，予以執行。

[註八] GPL 是一種授權聲明。如果有一個軟體宣稱它是以 GPL 釋出的，就表示它是完全自由的，並同時還會提供原始碼讓人任意得下載、使用、複製，或是販賣、修改這份軟體。

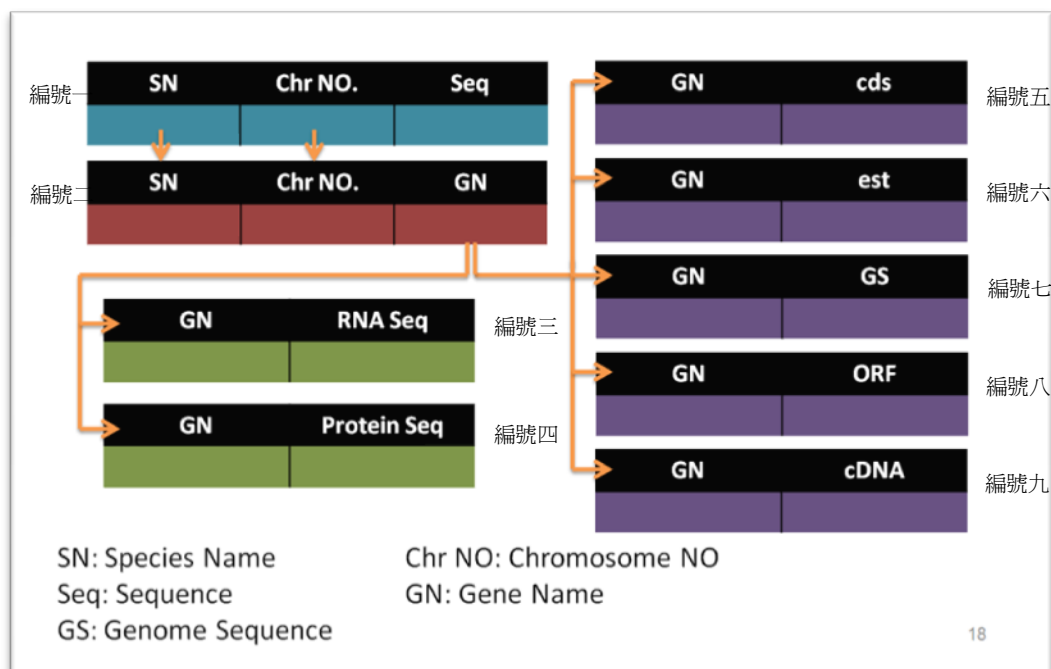
參考文獻

1. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M., 1977, Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.*, 265(687-695).
2. David R. Bentley, The Sanger Centre, The Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK, Correspondence to David R. Bentley, The Sanger Centre, The Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK., 2000, The Human Genome Project - An Overview. *Medicinal Research Reviews*, 20(189-196).
3. Liolios K, Chen IM, Mavromatis K, Tavernarakis N, Hugenholtz P, Markowitz VM, Kyrpides NC., 2010, The Genomes On Line Database (GOLD) in 2009: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res*, 13(346-354).
4. <http://www.techterms.com/definition/dbms>

圖表



圖一：phpMyAdmin 為一套 PHP 語言編寫而成的軟體，可以使用 Web 介面的按鍵取代繁雜的 SQL 語言來操作 MySQL，使資料庫的管理可以更便利、更有效率。



圖二：編號一資料表三個欄位分別是「物種名稱」、「染色體編號」、「序列」，而輸入的資料為某物種的名稱、某染色體的編號及其 DNA 序列。編號二資料表三個欄位分別是「物種名稱」、「染色體編號」、「基因名稱」，而輸入資

料為某生物的名稱、某染色體的編號及其含有的基因名稱。兩資料表的「物種名稱」、「染色體編號」欄位名稱相同，將其做上關聯。編號二的資料表「基因名稱」關聯到編號三至編號九資料表的「基因名稱」欄位。其餘七個資料表都為兩個欄位，除了「基因名稱」欄位分別是「RNA 序列」、「胺基酸序列」以及「cds」、「est」、「Genome Sequence」、「Open Reading Frame」、「cDNA」等五個不同範圍的基因 DNA 序列。編號三與四資料表，各別為其基因轉錄出來的 RNA 序列及轉譯出來的胺基酸序列。



圖三：首頁的右方有搜尋的空格，可輸入物種的名稱，搜尋出其生物的生物序列，亦或輸入一段不知名的序列藉以搜尋有這段序列的物種名稱或者是基因名稱。而右上方的「upload」標籤，可讓非資料庫管理員的研究室人員將蒐集到的序列上傳，引導使用者將生物序列有系統的存入資料庫中。

馴養與發育對食蟹蛙(*Fejervarya cancrivora*)蝌蚪耐鹽度的影響

The effects of acclimation and development on salinity tolerance of *Fejervarya cancrivora* tadpoles

賴柔潔* 喬奕凱 許智皓 關永才

東海大學生命科學系兩棲爬蟲實驗室

生物對環境因子的耐受限度可能發生改變，「馴化」為其中一影響生物調整環境因子耐受度的策略。馴化涉及生理上、非遺傳上對環境因子的耐受程度改變，藉由馴化的過程生物可以調整牠們對環境因子的耐受範圍。鹽度是一種可影響兩棲類生態與存活的环境因子，因為對皮膚具高通透性的兩棲類來說，鹽度的改變很容易造成體內離子濃度與水分平衡失調。兩棲類主要生活在淡水環境，但某些廣鹽性蛙類會棲息於半淡鹽水的環境中，其中食蟹蛙(*Fejervarya cancrivora*)是目前已知最耐鹽的蛙類。過去研究顯示，在直接移置處理下食蟹蛙蝌蚪的最高鹽耐受為 15ppt SW(part per thousand sea water)，但野外觀察到蝌蚪能存活於 24ppt SW 濃度下的半鹽水棲地，同時觀察也發現發育期數較高的蝌蚪，耐鹽度相對較高，推論可能與馴化及發育程度有關。然而，迄今沒有具體的實驗數據可證實馴化與發育對耐鹽度的關係。因此，本實驗透過鹽度轉換來馴養蝌蚪，以了解兩棲類對鹽環境耐受度的調控。實驗結果顯示，發育期數對蝌蚪的耐鹽度有顯著的影響，而經過馴養後，蝌蚪的耐鹽度會顯著的提高。在鹽度轉換速率不同的處理下，鹽度轉換速率不影響蝌蚪的耐鹽度，其中發現食蟹蛙蝌蚪最高能在 19ppt SW 環境下變態成為小蛙。綜合以上結果顯示，食蟹蛙蝌蚪是已知耐鹽度高的蛙類。經馴養後的蝌蚪能增加其存活率以及變態成功率，推測有利於食蟹蛙蝌蚪在多變且不可預測的自然環境下生存。

前言

生物對環境因子的耐受限度都可能發生改變，「馴化」為其中一影響生物調整環境因子耐受度的策略。馴化(acclimatization)涉及生理上、後天性對環境因子耐受程度的改變，藉由馴化的緩慢過程逐漸調整對環境因子的耐受範圍。鹽度是影響生物棲地利用的因子之一，對皮膚具高通透性的兩棲類來說，鹽度是一項會限制兩棲類分布的重要環境因子，鹽度上升很容

易造成體內離子濃度與水分平衡失調，因此幾乎所有兩棲類都是生活在淡水環境中。大多數兩棲類成體無法在鹽度 9ppt 以上環境存活(Gordon et al., 1961; Uchiyama et al., 1990; Christy and Dickman, 2002)，但廣鹽性的食蟹蛙(*Fejervarya cancrivora*)，卻可棲息於海岸地區的半淡鹽水環境，例如紅樹林及沿岸沼澤，表示他們在生理上可能會面臨到不同程度的鹽度變化。

Uchiyama and Yoshizawa

(1992) 發現食蟹蛙蝌蚪 (Witschi stage 21-25) 能存活於鹽度 13.2 ppt (40% 海水) 中，但在鹽度超過 16.5 ppt (50% 海水) 的環境中便無法存活，若將蝌蚪由淡水直接置入鹽度 33 ppt (100% 海水) 的鹽水之中，蝌蚪在幾小時內便會脫水及死亡。Uchiyama and Yoshizawa (1992) 將成長至 W stages 24-25 的食蟹蛙蝌蚪放置在鹽度 13.2 ppt (40% 海水) 的環境下馴養三天，再將蝌蚪置入鹽度 19.8 ppt (60% 海水) 中，發現有少數個體便能適應 60% 海水環境。這種現象可能可經由馴養的過程，增加食蟹蛙蝌蚪的耐鹽度。但由於 Uchiyama and Yoshizawa (1992) 馴養方法交代不明，加上年幼蝌蚪 (W stage 21-25) 因為很快的發育並改變牠們的期數，使得 Uchiyama and Yoshizawa (1992) 逐步馴養的實驗無法完成。以上各項都讓我們無法清楚得知馴養對食蟹蛙蝌蚪的實際效應。

Gordon and Tucker (1965) 一同發現存活於野外高鹽環境中的蝌蚪為期數較高較年長的個體。而 Uchiyama and Yoshizawa (1992) 亦指出幼年時期的食蟹蛙蝌蚪較其餘無尾目幼體有較高的耐鹽度，並且認為此能力會隨蝌蚪期數增加而上升。然而，迄今仍然沒有具體的實驗數據可證實發育程度與耐鹽度具相關性的假說。為了驗證前人推測，我們設計了三組實驗。實驗一，比較早期、中期以及晚期蝌蚪的耐鹽度，藉以了解發育程度與耐鹽度的相關性。實驗二，為了了解馴養對蝌蚪的影響，因此選用相同期數的食蟹蛙蝌蚪，觀察有經過馴養與未經馴養食蟹蛙蝌蚪耐鹽度

的差異。實驗三，我們希望探討在馴養與發育共同影響下，鹽度轉換速率的不同對蝌蚪造成的影響。

材料與方法

食蟹蛙 (*Fejervarya cancrivora*) 為中大型蛙類，目前在台灣只分布於屏東縣東港鎮、林邊鎮、佳冬鄉等地，繁殖期約為每年五到十月，每次產卵數為數千顆不等。我們將從屏東採集來的食蟹蛙餵以蟋蟀和麵包蟲飼養於塑膠箱內，待其產卵便將卵團拾起，置於鹽度 3 ppt 鹽水的塑膠盒 (長 x 寬 x 高 = 29 x 18.5 x 11 cm) 中，待其孵化長成蝌蚪，並且成長至實驗所需期數，再將其分別單獨飼養於盛有 100 毫升 3 ppt 鹽水的小塑膠盒 (長 x 寬 x 高 = 10.5 x 7.5 x 4.5 cm) 內，並以穿洞的半透明塑膠蓋蓋上，每日以足量的煮熟蔬菜餵食。所有蝌蚪皆飼養於 30 °C 的恆溫箱內，光週期控制在日夜比為 12:12。

本實驗在開始之前，逢機選取 10 隻蝌蚪，將其直接由鹽度 3 ppt 鹽水中置入 30 ppt 鹽水內，觀察其死亡前失去平衡的行為，並在往後實驗中，以蝌蚪是否失去平衡行為做為蝌蚪無法忍受的臨界鹽度界定。並在蝌蚪失去平衡後，將牠放回鹽度 3 ppt 的鹽水之中讓牠恢復。

實驗一、不同發育期對蝌蚪耐鹽度測定

依據食蟹蛙蝌蚪發育程度不同分為早期 (Gosner stage 27~30)、中期 (Gosner stage 31~33) 及晚期 (Gosner stage 34~37) 三小組 (表

一)。每小組皆使用兩批不同父母產下的卵，第一批卵每小組取發育至所需期數的食蟹蛙蝌蚪 15 隻，三組共需 45 隻。第二批卵每小組取發育至所需期數的食蟹蛙蝌蚪 20 隻，三組共需 60 隻。此部份實驗共需 105 隻蝌蚪。本實驗中三組的蝌蚪於實驗開始時都置於 3 ppt 的鹽度中，然後將牠們每 2 個小時換一次水，每次換水提高 2 ppt 的鹽度，持續向上置換至蝌蚪失去平衡的鹽度為止。實驗分析方面，我們利用 ANOVA 的區集設計(RCBD)分析兩批蝌蚪以及各發育期間有無差異，若各發育期間有顯著差異再使用 Duncan 測試法，對早期、中期與晚期的數據進行多重比較。

實驗二、不同馴養處理對蝌蚪耐鹽度測定

此實驗共分為三小組，每組皆使用兩批不同成蛙配對所產下的卵，每批皆取 10 隻 Gosner stage 33~35 的蝌蚪，一組數量共 20 隻。本實驗中三組的蝌蚪於實驗開始時都置於 3 ppt 的鹽度中，第一組為控制組，此組蝌蚪不經過馴養過程。第二組蝌蚪置換到 100 毫升 10 ppt 鹽水中馴養一天。第三組蝌蚪則置換到 100 毫升 10 ppt 鹽水中馴養三天。待每組到達其馴養天數後，將所有個體分別置入 100 毫升 18 ppt 的鹽水中，每 2、4、6、8、10、12、24、48 個小時觀察一次，記錄蝌蚪失去平衡的時間。此部份實驗利用 ANOVA 的區集設計(RCBD)分析兩批蝌蚪以及各發育期間有無差異，若各發育期間有顯著差異再使用 Duncan 測試法，對早期、中期與晚期的數據進行多重比較。

實驗三、鹽度增加速率對蝌蚪耐鹽度的影響

此實驗共分為三小組，每組皆使用兩批不同成蛙配對所產下的卵，每批卵取 15 隻 Gosner stage 27-30 的蝌蚪，一組數量共 30 隻。本實驗中三組的蝌蚪於實驗開始時都置於 3 ppt 的鹽度中，第一組蝌蚪每天向上提高鹽度 2 ppt，第二組蝌蚪每兩天向上提高鹽度 2 ppt，第三組蝌蚪每三天向上提高鹽度 2 ppt。每次向上提高鹽度時記錄蝌蚪的存活率以及發育期數。每組鹽度持續向上置換至蝌蚪死亡或變態(達 Gosner stage 42)為止。

結果

不同發育期對蝌蚪耐鹽度測定

早期蝌蚪在置換到鹽度 23 ppt 的鹽水時，所有個體都失去平衡。中期蝌蚪在置換到鹽度 21 ppt 的鹽水時，46%的個體失去平衡；當置換到鹽度 23 ppt 的鹽水時，所有個體失去平衡。晚期蝌蚪在置換到鹽度 21 ppt 的鹽水時，12.5%的個體失去平衡；當置換到鹽度 23 ppt 的鹽水時，所有個體失去平衡。不同發育期的蝌蚪，對於失去平衡的鹽度沒有顯著差異 ($F_{2,101}=1.75, p=0.1786$)(圖一)。

不同馴養處理對蝌蚪耐鹽度測定

在鹽度為 18 ppt 的鹽水之下，控制組在第 8 個小時有 65%的個體失去平衡，在第 12 個小時有 97.5%的個體失去平衡。經過一天馴養的組別，在第 12 個小時有 42.5%的個體失去平衡，不到 24 小時，所有個體皆失去平衡。馴養三天的組別，在第 12

個小時有 36.1% 的個體失去平衡，在 24 小時內有 94.4% 的個體失去平衡，48 小時之內，所有個體皆失去平衡。有無經過馴養對於蝌蚪耐鹽度有顯著影響($F_{2,113}=28.46$, $p<0.0001$)，但馴養一天與馴養三天的處理間沒有差異(圖二)。

鹽度增加速率對蝌蚪耐鹽度的影響

不同鹽度轉換速率對於蝌蚪最後的致死鹽度沒有影響(圖三)。而三個處理間的半致死濃度約在 21 ppt 到 23 ppt，另外發現在三天置換的處理蝌蚪在 15 ppt 到 19 ppt 有變態的個體出現，為目前所知食蟹蛙蝌蚪最高的變態鹽度。

討論

不同發育期對蝌蚪耐鹽度測定

前人研究認為期數愈高的蝌蚪耐鹽度愈高(Uchiyama and Yoshizawa, 1992)，但是我們的結果顯示發育期數跟耐鹽度之間是沒有關係的。前人研究推測蝌蚪排鹽機制可能類似廣鹽性硬骨魚，利用鰓進行離子調節(Gordon and Tucker, 1965)。在廣鹽性硬骨魚類的鰓上分布許多 Mitochondria-rich 細胞(簡稱 MR 細胞)，MR 細胞膜上有 Na^+ , K^+ ATPase(簡稱 NKA)負責細胞內離子調節運輸系統(Hwang and Lee, 2007)。Uchiyama and Yoshizawa(1992)發現食蟹蛙蝌蚪在外鰓時期(Gosner stage 20-25)的鰓上僅有少量 MR 細胞，而進入內鰓時期(Gosner stage 26)之後鰓上 MR 細胞的數量便會明顯增加。本實驗所使

用的蝌蚪都已進入內鰓時期(Gosner stage 26)之後，因此我們推測早期(進入內鰓時期)蝌蚪的鰓已經發育得夠完整並能夠應付高鹽環境，所以早期、中期以及晚期蝌蚪的耐鹽度沒有差異。另外，經由巫(2009)的研究發現，未經過馴養的澤蛙蝌蚪由 3 ppt 環境直接轉至 11 ppt 環境後，直到第 6 個小時 NKA 的表現量才有上升的趨勢。本實驗中鹽度置換速率為每 2 個小時向上置換 2 ppt，可能因為鹽度上升速率太快，導致蝌蚪的生理機制來不及反應，因而無法辨別早期、中期及晚期蝌蚪耐鹽度的差異。

不同馴養處理對蝌蚪耐鹽度測定

前人研究指出沒有經過馴養的食蟹蛙蝌蚪，在 16.5 ppt、18 ppt 以及 21 ppt 環境下存活皆不超過 24 小時(Gordon, 1961; Uchiyama and Yoshizawa, 1992; 徐, 2010)。但是 Gordon(1961)將野外採自鹽度 23 ppt 水池中的食蟹蛙蝌蚪，置入濃度 33 ppt 的鹽水中，發現蝌蚪可以存活五天，即使飼養三天後，鹽度已經因為水蒸發而上升到 39 ppt，仍然可以存活超過三天。其他研究也顯示食蟹蛙蝌蚪經逐步提升鹽度馴養後，有能力存活於超過 16 ppt 的環境中(Uchiyama and Yoshizawa, 1992)。本研究結果也顯示經過馴養的個體耐鹽度較未經過馴養個體高，經過馴養的個體，可以在高達 27 ppt 下存活超過 24 個小時。

澤蛙蝌蚪經過馴養後能存活在較高鹽度之下，NKA 相對蛋白表現量也顯著提昇，推測澤蛙蝌蚪存活率提高與鰓上 NKA 表現量增加有關(巫,

2009)。我們認為食蟹蛙蝌蚪也可能因為馴養的過程，活化鰓上面的 MR 細胞，導致耐鹽度顯著提昇。此外我們研究結果發現食蟹蛙蝌蚪經過一天馴養與三天馴養耐鹽度沒有顯著差異，結果暗示食蟹蛙蝌蚪可能經過一天的馴養就能活化鰓上的 MR 細胞，表示食蟹蛙蝌蚪可以迅速反應環境的鹽度變化。以上顯示，食蟹蛙蝌蚪經過逐步馴養，可以增加耐鹽度，最後甚至能夠忍受至海水鹽度(Uchiyama and Yoshizawa, 1992)。

鹽度增加速率對蝌蚪耐鹽度的影響

我們研究結果顯示三組處理的半致死鹽度都在 21 至 23 ppt 之間，顯示鹽度轉換的速率對蝌蚪的耐鹽度不會有影響。本實驗雖然控制了馴養天數，但在實驗過程中無法控制蝌蚪的發育期數，於是實驗過程同時受到發育以及馴養天數兩個因子影響。由實驗一及實驗二我們得知蝌蚪的發育期數與馴養天數不會影響蝌蚪的耐鹽度，所以鹽度轉換速率對蝌蚪的耐鹽度不會造成影響。本實驗中一天和兩天向上置換的處理所有個體最後皆死亡，因為一天及兩天向上置換的處理尚未達到可變態的天數，環境鹽度就已到達致死濃度，以致於沒有個體可以變態。曾有研究指出，高鹽水池中的食蟹蛙蝌蚪必須在大雨來臨使水池鹽度降低時才能完成變態(Gordon and Tucker, 1965)。但在實驗中我們發現，三天向上置換的處理中有蝌蚪變態，而變態時的鹽水濃度介於 15 至 19 ppt 之間，為目前所知食蟹蛙蝌蚪最高的變態鹽度。若蝌蚪能在較高濃度下變態，不用等到下雨使環境鹽

度下降才能變態，如此將能夠提升蝌蚪的適存度。

現今因為人類的活動，例如：大量使用防止路面結冰的道路去冰鹽(road de-icing salt)以及土地開發(Sanzo and Hecnar, 2006; Christy and Dickman, 2002)等等，都加速了環境鹽化的程度。而人類無窮盡的擷取自然資源，造成全球暖化趨勢日漸嚴重，因此帶來的海平面上升或降雨不均等問題，也都讓淡水以及土地飽受鹽化的威脅(Rios-Lopez, 2008)。藉由本研究讓我們能夠了解，兩棲類遇到半淡鹽水環境時的反應，以及鹽度對兩棲類的數量以及分布上的限制，可作為未來保育兩棲類的參考資料。

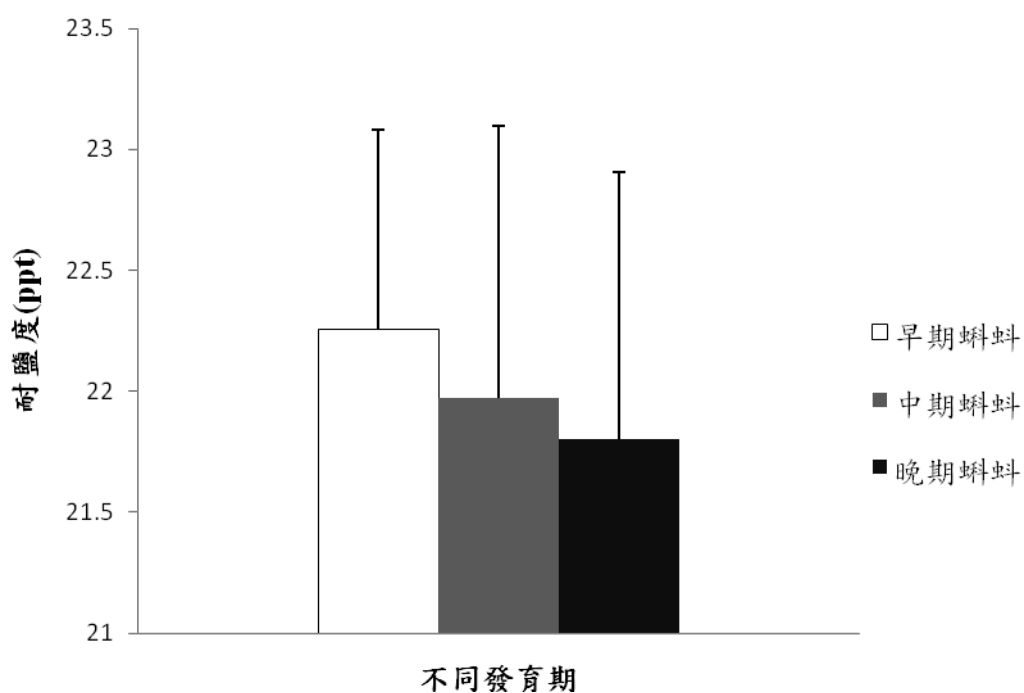
參考文獻

- Beebee, T. J. C. 1985. Salt tolerances of natterjack toad (*Bufo calamita*) eggs and larvae from coastal and inland populations in Britain. *Herpetological Journal* 1: 14-16.
- Chinathamby, K., Reina, R. D., Bailey, P. C. E., Lees, B. K. 2006. Effects of salinity on the survival, growth and development of tadpoles of the brown tree frog, *Litoria ewingii*. *Australian Journal of Zoology* 54: 97-105.
- Christy, M. T., Dickman, C. R. 2002. Effects of salinity on tadpoles of the green and golden bell frog (*Litoria aurea*). *Amphibia Reptilia*

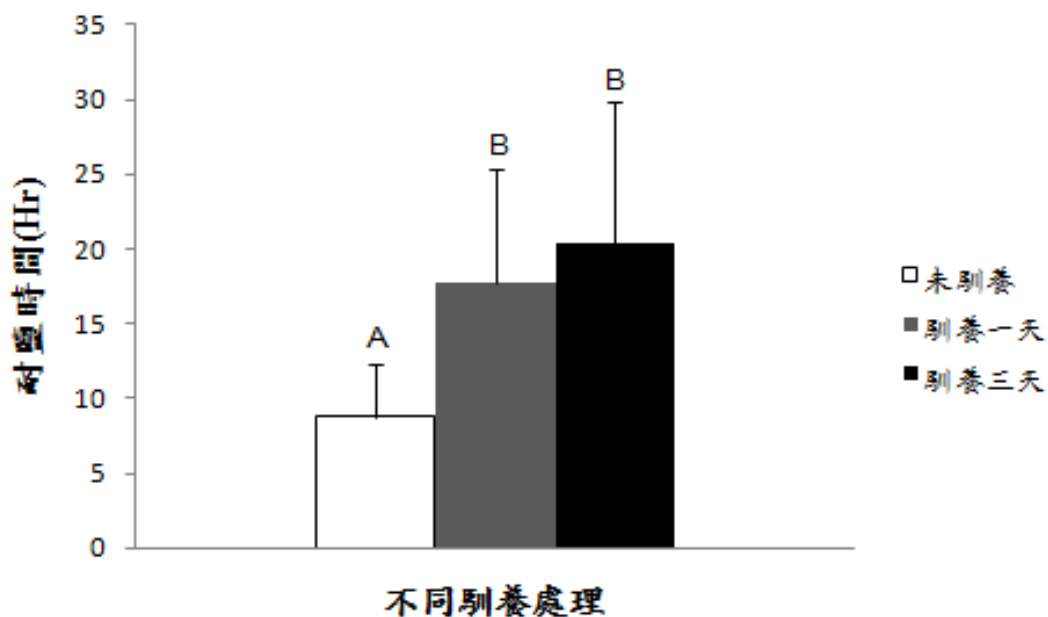
- 23:** 1-11.
- Gordon, M. S., Schmidt-Nielsen, K., Kelly, H. M. 1961. Osmotic regulation in the crab-eating frog (*Rana cancrivora*). *Journal of Experimental Biology* **38**: 659-678.
- Gordon, M. S., Tucker, V. A. 1965. Osmotic regulation in the tadpoles of the crab-eating frog (*Rana cancrivora*). *Journal of Experimental Biology* **42**: 437-445.
- Hwang, P. P. 1987. Tolerance and ultrastructural responses of branchial chloride cells to salinity changes in the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*. *Marine Biology* **94**: 643-649.
- Hwang, P. P., Lee, T. H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* **148**: 479-497.
- Rios-López, N. 2008. Effects of increased salinity on tadpoles of two anurans from a Caribbean coastal wetland in relation to their natural abundance. *Amphibia-Reptilia* **29**: 7-18
- Sanzo, D., Hecnar, S. J. 2006. Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environment Pollution* **140**: 247-256.
- Uchiyama, M., Konno, N. 2006. Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. *General and Comparative Endocrinology* **147**: 54-61.
- Uchiyama, M., Murakami, T., Yoshizawa, H. 1990. Notes on the development of crab-eating frog, *Rana cancrivora*. *Zoological Science* **7**: 73-78.
- Uchiyama, M., Yoshizawa, H. 1992. Salinity tolerance and structure of external and internal gills in tadpoles of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. *Cell Tissue Research* **267**: 35-44.
- Wu, C. S., Kam, Y. C. 2009. Effects of salinity on the survival, growth, development, and metamorphosis of *Fejervarya limnocharis* tadpoles living in brackish water. *Zoological Science* **26**: 476-482.
- 徐菟佐。(2010)。鹽度對食蟹蛙蝌蚪成長發育及變態特徵的影響。東海大學生命科學系碩士論文。
- 巫奇勳。(2009)。半淡鹹水環境澤蛙蝌蚪的滲透調節、成長與變態之研究。東海大學生命科學系博士論文。

表一、Gosner 蝌蚪期數判定表，Gosner 27~30，後肢腳芽清晰可見，判定為早期蝌蚪；Gosner 31~33，後之腳芽末端形成三角形狀，判定為中期蝌蚪；Gosner 34~37，可清楚見到腳掌及腳趾，判定為晚期蝌蚪。

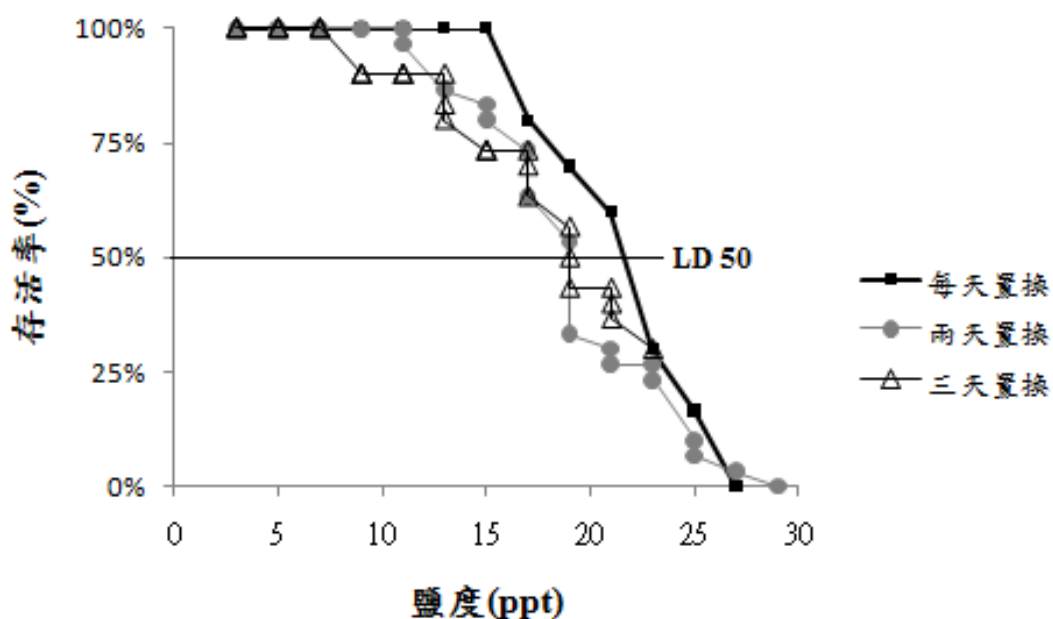
期數	判定依據	圖說
Gosner 27-30	後肢腳芽清晰可見	
Gosner 31-33	後肢腳芽末端開始有三角形的形狀	
Gosner 34-37	可見到腳掌及清楚腳趾	



圖一、不同期數食蟹蛙蝌蚪的耐鹽度。各處理間雖有遞減趨勢，但並無顯著差異($F_{2,101}=1.75$; $P=0.1786$)



圖二、食蟹蛙蝌蚪不同馴養處理後之耐鹽時間。控制組與馴養一天及三天之處理間有顯著差異($F_{2,113}=28.46$; $P<0.0001$)，而馴養一天與馴養三天之處理間沒有顯著差異。



圖三、不同鹽度置換速率之蝌蚪存活率。各處理間的半致死率(LD 50)無明顯差異，都落在 21 ppt 到 23 ppt，但處理中只有三天置換沒有 100%致死率，三天置換的處理中有蝌蚪變態成功。

杜鵑餅病病原菌 *Exobasidium japonicum* Shirai 的存活策略

Survival strategy of *Exobasidium japonicum* Shirai, the pathogen of gall of azalea

曹嘉真* 汪碧涵

東海大學生命科學系 真菌實驗室

摘要

本研究探討引起杜鵑餅病 (gall of azalea) 的日本外擔子菌 *Exobasidium japonicum* Shirai 的存活與生態。最近三年，東海大學校園中的杜鵑餅病蔓延，此病害造成開花減少與樹勢衰弱，嚴重者死亡。該菌好低溫，秋季到春季發病，只有新生組織發病，新葉及嫩莖上長出不規則肉質腫瘤，成熟腫瘤表面形成一層白色粉末狀的子實層，釋出擔孢子，產孢期每個腫瘤每天可釋出上萬個孢子；夏季高溫，腫瘤萎縮死亡，脫落或宿存。孢子如何在夏季高溫存活？越夏後如何感染幼嫩組織？文獻記載，*E. japonicum* 的孢子可以在寄主芽鱗的保護下休眠半年，但沒有數據。我以 PCR 方法偵測非發病季節時，罹病區杜鵑組織帶菌情形，探討外擔子菌在夏季高溫期的存活策略。無論上一季曾罹病或鄰近無病徵的寄主枝條或葉片，夏季都偵測到病原菌；春季發病後，夏季偵測杜鵑各部位的帶菌率：葉痕為 78%(14/18)，莖 62% (13/21)，葉最低，僅 10% (1/10)，其中，由罹病植株長出的新芽帶菌率 100% (12/12)。本研究以 PCR 方法證實 *E. japonicum* 在非發病季節存活於寄主杜鵑的莖與葉的組織內；葉痕帶菌率高，顯示孢子侵入葉片後即由葉柄延伸至莖上節的組織棲息，當葉片脫落，病原菌潛存於葉痕下存活，待葉痕長出新芽，病原菌隨之入侵新芽，在發病季節刺激寄主幼嫩組織細胞膨大與分裂，形成腫瘤，完成其生活史。

前言

杜鵑餅病是由日本外擔子菌 *Exobasidium japonicum* Shirai 引起的，此病害會使杜鵑在幼嫩組織上形成腫瘤，例如在有葉片上、莖上、花朵或在頂芽形成腫瘤，除了產生腫瘤外，也會造成開花、結實減少、樹勢衰弱，嚴重時導致死亡。東海校園內，從 2006 年開始發現杜鵑罹患杜鵑餅

病，其中包括校門口、第二校區、圖書館與相思林四大杜鵑栽植區。而在陽明山國家公園境內，也發現杜鵑罹患此病害，分布廣，包括花鐘廣場附近、陽明書院、竹仔湖、馬槽白岑寺等地區都有罹病。

腫瘤是杜鵑餅病最明顯的病徵，初期為淡綠色，成熟後轉成深綠，有些腫瘤表面形成子實層，產擔孢子，產孢後開始萎凋，皺縮成黑色，宿存

在枝條上或脫落。東海校園內主要在 3 月中開始形成，從發病到乾枯只有一個月，一直到 11 月中才又形成腫瘤(白, 2009)，所以日本外擔子菌的發病季節是從秋季到隔年的春季，夏季屬於非發病季節，杜鵑不形成腫瘤，沒有擔孢子感染杜鵑，杜鵑在秋季仍然發病。

關於外擔子菌 *Exobasidium* 的相關研究，大多著重於顯微型態觀察 (Mims and Richardson, 2007)、分類 (施欣慧, 2006; Nagao et al., 2003; Nagao et al., 2004; Nagao et al., 2006; Nannfeldt JA, 1981)、系統發育 (Begerow et al., 2002) 和抗病機制等 (Nimal Punyasiri, 2005)，且大多是新種的發現 (Nagao et al., 2003; Nagao et al., 2004; Nagao et al., 2006) 以及茶餅病的相關研究 (Nimal Punyasiri, 2005)，關於日本外擔子菌的生態研究相當稀少。僅 Nannfeldt 在 1981 年曾經報導，日本外擔子菌 *E. japonicum* 可以在杜鵑的芽裡休眠存活半年，當芽生長時，菌才開始生長，但是沒有任何數據。

我的研究目的就是探討杜鵑餅病原菌的感染途徑和其越夏的存活策略。我調查腫瘤全日產孢量，以了解最佳產孢時段和病原菌接種環境條件。並分離將腫瘤上的擔孢子，培養純化後加以保存，以供未來相關研究。在發病季節，偵測杜鵑個部位組織是否帶菌，了解日本外擔子菌在發病季節的存活位置。在非發病季節，偵測杜鵑各部位帶菌率，探討日本外擔子菌的越夏存活策略。最後以接種試驗，確認其感染途徑，以推測日本外擔子菌完整的生活史。

材料及方法

腫瘤全日產孢量調查

在陽明山國家公園內，以封口袋將水瓊脂培養基(water agar)懸掛在產孢腫瘤下方，分別收集三個正在產孢的腫瘤落下的擔孢子，每三小時更換一皿，將培養皿帶回實驗室在顯微鏡下計數孢子數目。

採集樣本

在東海大學校園內杜鵑種植區，包括校門口和文學院附近，隨機剪取已產孢的杜鵑腫瘤。

病原菌的分離、純化與保存

分離菌株

腫瘤切成小塊，黏附於培養皿蓋內 1cm×1 cm 的瓊脂塊上，室溫靜置，待腫瘤表面長出外擔子菌的擔孢子，彈射到水瓊脂培養基(water agar)表面，培養至發芽，在顯微鏡下將擔孢子連同培養基切下，放置馬鈴薯瓊脂平板培養基 (Potato Dextrose agar, PDA) 下培養。

在解剖顯微鏡下切取日本外擔子菌單一菌落置於馬鈴薯瓊脂培養基 (Potato Dextrose agar, PDA) 上，以四區劃線法塗開，增加菌落面積並確保菌株無污染，放置 20°C 下培養，以便後續實驗。

菌株保存

使用兩種方法保存：

1. 將日本外擔子菌菌株以馬鈴薯瓊脂平板培養基 (Potato Dextrose agar, PDA) 在 20°C 下培養 20 至 30 天後，切取菌落塗佈在菌種保

存管中的馬鈴薯瓊脂斜面培養基上，待菌落長滿後，加入滅菌礦物油，蓋過斜面，放置 5°C 下保存。

- 將菌株以馬鈴薯瓊脂培養基 (Potato Dextrose agar, PDA) 在 20°C 下培養 20 至 30 天，刮取菌落至含有 15% 甘油的馬鈴薯培養液 (Potato Dextrose Broth, PDB)，震盪均勻後，放置 -80°C 下保存。

田間枝條帶菌率監測

樣本來源

分別於 2009 年夏季與 2010 年春季，在東海校園內主要杜鵑種植區，包括校門口和文學院附近，隨機剪取杜鵑腫瘤，以及曾罹病或無病徵枝條。

腫瘤與植物組織 DNA 萃取

DNA 萃取使用修改 Doyle & Doyle (1990) 所得的方法，將樣本以 1% 次氯酸鈉表面消毒後，切成小塊置於微量離心管 (Eppendorf) 中，加入適量無菌金剛砂，以研磨棒 (pestle) 研磨後。加入 65°C 預熱的 500 µl CTAB 萃取緩衝液 (1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 2% PVP-40 [w/v], 20 mM Methyl trimethyl ammonium bromide [CTAB])，加入 5 µl 2-Mercaptoethanol，震盪數秒後，以 65°C 加熱 30 分鐘，再加入等體積的 dichloromethane/isoamyl alcohol (24:1) 使蛋白質與 DNA 分離，輕緩混合後，以 14,000 rpm 離心二分鐘。取出上層液，加入 0.6 倍體積的異丙醇 (isopropanol) 沈澱 DNA，輕緩混合後，14,000 rpm 離

心二分鐘，去除上清液。沈澱物加入 500 µl wash buffer (76% ethanol, 10 mM ammonium acetate) 清洗，靜置二分鐘後，再以 14,000 rpm 離心二分鐘，倒掉上清液以去除鹽類。將微量離心管倒置於在無菌操作台內風乾後，加入 20-50 µl 無菌水溶解，將 DNA 保存於 -20°C 冰箱。

聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

專一性引子對 Exo-F 和 Exo-R 由 *E. japonicum* 核醣體 DNA 中的內部間隔轉錄區序列設計出，利用 Booster PCR 步驟進行擴增反應。

PCR 反應液中含有引子對 Exo-F/Exo-R 各 1.0 µM、1 U *Taq* polymerase (Fermentas, USA)、100 µM dNTPs 2.5 µl、1 X PCR buffer、及 2.5 µl DNA，以溫度循環控制器 (Miometra[®], T3000 Thermocycler, Biomata, Germany) 進行反應。第一階段反應條件如下：94°C 作用 5 分鐘使 DNA 變性；變性溫度 94 °C，1 分鐘，黏合溫度 58 °C，30 秒，聚合溫度 72 °C，1 分鐘，進行 35 個循環；最後以 72 °C 延長 10 分鐘。將第一階段獲得的 PCR 產物取 2.5 µl 作為第二階段 PCR 的 DNA 模版，其餘條件與第一階段相同，進行 35 個循環。

取 5 µl 的 PCR 產物，加入 1 µl loading dye 充分混合後，注入 1.2% agarose 膠體內，在 0.5 倍的 TAE 緩衝溶液 (50X TAE/1L: Tris base 242 g, glacial acetic acid 57.1 g, 0.5 M EDTA 100 ml pH 8.0) 中，以 100 V 進行電泳反應 20 分鐘，並以 ethidium

bromide (Sigma, USA) 染色。以 100 bp DNA 標誌 (MBI Fermentas, Lithuania) 比對 PCR 產物，電泳膠體以 UVP ImageStore 7500 (UVP, California, USA) 照相記錄。

接種試驗

分別使用了三種自然接種方法：

1. 腫瘤切成小塊，黏附於培養皿蓋內 1cm×1 cm 的瓊脂塊上，室溫下靜置，待腫瘤表面的擔孢子成熟，收集彈射到水瓊脂培養基 (water agar) 表面的擔孢子，以無菌水洗下培養基表面上的孢子，塗抹在葉片表面上，套袋保濕 24 小時，待葉腋位置萌發新芽，以 PCR 偵測新芽、嫩葉、嫩莖、葉柄、葉痕和老葉是否帶菌。
2. 使用水瓊脂培養基 (water agar) 收集腫瘤落下的擔孢子，將水瓊脂培養基切成條狀，連同擔孢子置於在葉片上，套袋 24 小時，2 週後，以 PCR 偵測自然掉落葉片與未掉落葉片的葉肉、葉脈、葉柄和葉痕是否帶菌。
3. 使用水瓊脂培養基 (water agar) 收集腫瘤落下的擔孢子，將水瓊脂培養基切成條狀，連同擔孢子置於葉片中間，套袋 24 小時，1 週後，以 PCR 偵測葉肉中間、葉肉下部、葉脈、葉柄和葉痕的帶菌率。

病害防治試驗

修剪防治

在校園裡選取罹病嚴重的植株，使用兩種修剪方式：

1. 將罹病杜鵑枝條莖的上端修剪後，經二個月後，新芽長出，以 PCR 偵測新芽、葉片和莖的帶菌率。
2. 將罹病杜鵑所有帶葉片的枝條強勢修剪後，經六個月後，長出葉片，以 PCR 偵測葉片、葉柄、葉痕和莖的帶菌率。

結果

腫瘤全日產孢量調查

總共調查三個腫瘤，平均每日產 8,000 多個孢子，三小時的最高量超過 3,000 個，產孢時間主要由晚上六點到隔天早上六點，佔整日產孢量的 86% (圖一)。

日本外擔子菌的分離

總共分離到 6 株日本外擔子菌，其中 1 株分離自東海校園，5 株分離自雲林縣林內鄉。其中 6 株皆已知分離杜鵑種類，分別為艷紫杜鵑(R0)、西洋杜鵑(R31,R32,R33)和平戶杜鵑(R29,R30)(表一)。

田間枝條帶菌率監測

發病季節杜鵑各部位帶菌率(表二)

於 2009 年 10 月偵測帶有葉腫瘤的枝條，杜鵑各部位的帶菌率：葉痕最高 100%(11/11)，其次為葉柄 73%(8/11)，莖 27% (3/11)，腫瘤最低 17%(2/12)，而未發病植株長出的新芽帶菌率 45% (5/11)。

於 2010 年 1 月偵測帶有葉腫瘤的枝條，杜鵑各部位的帶菌率：腫瘤 100%(8/8)，葉脈 100%(3/3)，葉肉 63%(5/8)。

於 2010 年 4 月偵測帶有葉種瘤的枝條，杜鵑各部位的帶菌率：腫瘤 82%(9/11)，葉柄 45%(5/11)，莖 25%(2/8)，葉痕為 18%(2/11)。

總計，在發病季節，杜鵑各部位的帶菌率由高到低為：腫瘤 61%(19/31)，葉痕 59%(13/22)，葉柄 59%(13/22)，新芽 45%(5/11)，莖 26%(5/19)。

非發病季節杜鵑各部位帶菌率(表二)

於 2009 年 9 月偵測帶有莖種瘤的枝條，杜鵑各部位的帶菌率：葉痕為 50%(2/4)，莖 71%(5/7)，腫瘤 43%(3/7)。帶有葉種瘤的枝條，杜鵑各部位的帶菌率：葉痕為 86%(6/7)，腫瘤 83%(5/6)，葉柄 40%(2/5)，莖 33%(2/6)。沒有病徵的枝條，杜鵑各部位的帶菌率：新芽 100%(12/12)，葉痕為 86%(6/7)，莖 75%(6/8)，葉片 10%(1/10)。總計，在非發病季節帶菌率由高到低為，新芽 100%(12/12)，葉痕為 78%(14/18)，莖 62%(13/21)，腫瘤 62%(8/13)，葉柄 40%(2/5)，葉片 10%(1/10)。

接種試驗

於 2009 年 12 月，在葉片表面塗抹日本外擔子菌孢子懸浮液接種，經三個月後，新芽從葉腋位置長出，偵測新芽、嫩葉、嫩莖、葉痕、葉柄和老葉是否帶菌，PCR 結果顯示，葉痕及嫩莖位置帶菌(表三、圖二)。

於 2010 年 1 月，將擔孢子連同培養基切條平貼在葉片上接種，經兩週後，偵測一片紅毛杜鵑掉落的葉片，一片平戶杜鵑尚未掉落的葉片，以及一片未接種的葉片，PCR 結果顯

示，紅毛杜鵑的葉肉帶菌，平戶杜鵑的葉痕帶菌(表四)。

於 2010 年 3 月，將擔孢子連同培養基切條平貼在葉片上接種，分別接種嫩葉與老葉，一週後，取嫩葉 4 片、老葉 6 片及控制組 4 片，分別偵測葉肉中間、葉肉下方、葉脈、葉柄與葉痕。結果，嫩葉在葉肉中間與葉柄各測得 1 個正反應；老葉在葉肉下方與葉痕各測得 2 個正反應(表五)。

修剪防治試驗(表六)

罹病植株經高位修剪後，以 Booster PCR 偵測杜鵑各部位帶菌率：新芽 93%(13/14)，莖 67%(2/3)，葉片 0%(0/4)。

罹病植株經強勢修剪後，以 Booster PCR 偵測杜鵑各部位帶菌率：莖 0%(0/6)，葉片 0%(0/6)，葉柄 0%(0/6)，葉痕 0%(0/6)，共 24 個樣本，均不帶菌。且於隔年發病季節並未產生腫瘤。

討論

腫瘤全日產孢量調查結果顯示，日本外擔子菌大多在夜間產孢。在觀察中也發現，在較濕冷的天氣下，腫瘤較多形成白色子實層，顯示日本外擔子菌喜好中溫。菌落在平板培養基上也在 20°C 的培養箱中生長較佳。

在發病季節結果顯示，在當季形成的幼嫩組織中，杜鵑植物組織各部位都有偵測到帶菌。其中在葉柄基部和葉柄的偵測率最高。這表示，病原菌不只是感染葉片後，不只存活在葉片，也會在杜鵑其他幼嫩組織中存活。其有兩種可能：一是病原菌感染葉片後，在當季形成腫瘤，同時也經

過葉柄、葉柄基部到植物體內存活；另一就是，病原菌感染葉片後，經過葉柄、葉柄基部到植物體內存活，等到下一個發病季節時，再經由葉柄基部、葉柄到葉片形成腫瘤，或是兩種途徑同時發生。我認為兩種途徑同時發生的機率較高，因為在 2010 年春季有發現到，約農路上的杜鵑在形成腫瘤萎凋後，附近杜鵑隨即形成新腫瘤的現象，可能是當季擔孢子多次感染所造成。

在夏季，非發病季節的 PCR 偵測結果顯示，杜鵑各部位組織都測得帶菌。根據 Nannfeldt 在(1981)報導，日本外擔子菌可以在芽裡面休眠存活。根據本研究結果可以知道，日本外擔子菌，不只是在芽裡面休眠存活，它也可以在植物組織內存活。其中，新芽偵測率最高。乾枯的腫瘤仍然可以測到帶菌，但是它已經不會產生擔孢子，沒有傳播的功能。所以新芽不是受到外在的擔孢子感染的，而是從杜鵑內部感染的。因為杜鵑在每個生長季的時候會落葉更換成新的葉子，所以在冬季和春季受到感染葉片已經在秋季前掉落，造成發病前葉片帶菌偵測率低。而杜鵑葉子掉落後，葉柄基部形成葉痕，然後新芽從葉痕的位置長出來，而葉柄基部帶菌偵測率高達 78%，所以推測是棲息在葉痕位置也就是葉柄基部的病原菌感染新芽。

莖在非發病季節(26% ,5/19)與發病季節(62% ,13/21)都有測得帶菌。但就單一樣本來看，在同一條莖上帶菌情形是不連續的，有的有位置偵測到帶菌，有的沒有。這顯示病原菌不是系統性的感染，它沒辦法在莖

裡面快速的拓殖。所以病原菌感染葉片後，經過葉柄，大部分會留在葉柄基部，葉痕的位置上。所以我們推測帶有腫瘤的枝條形成時，病原菌就從葉痕的位置感染新芽，使得枝條帶菌，接著病原菌隨著罹病組織拓殖到葉片上，然後形成腫瘤。但是如果罹病的組織沒有跟著長上去，它就不會形成病徵。如果從沒帶菌的葉痕長出來的枝條，就會是不帶菌的。但也有可能葉痕位置帶菌，病原菌沒隨著新芽生長，但是病原菌還是會繼續棲息在葉痕那裏。

接種試驗方面，塗抹孢子懸浮液的處理結果，在葉柄基部與嫩莖上測得帶菌。顯示，病原菌感染葉片後會拓殖到葉柄基部，葉痕的位置，使得從葉痕長出新芽形成的嫩莖受感染。但樣本數不足以及未偵測控制組樣本。以培養基切條平貼接種的處理有三次。第一次結果，掉落的紅毛杜鵑的葉肉帶菌，未掉落平戶杜鵑的葉痕帶菌，掉落的葉片可能是啟動防禦機制阻斷病原菌侵入至葉柄基部，而未掉落的葉片，病原菌便侵入至葉痕位置。但仍有樣本數不足，以及無法排除杜鵑物種間抗病差異的問題。第三次結果，嫩葉及老葉各部位帶菌率皆不高，單就葉片來看，四片嫩葉中兩個帶菌，六片老葉中三個帶菌，老葉及嫩葉的比例看不出差異，可能是偵測時間距離接種只有一個禮拜，病原菌尚未侵入完全，或是此種接種方法效果不佳。

在行政院農委會的植物保護手冊中提到，同樣受外擔子菌屬 *Exobasidium vexans* Mass. 感染的茶餅病，可以用以下六種藥劑防治：

護汰芬水懸劑(Flutriafol)、三泰芬可濕性粉劑(Triadimefon)、百克敏乳劑(Pyraclostrobin)、易胺座可濕性粉劑(Imibenconazole)、賽福座可濕性粉劑(Triflumizole)、三得芬乳劑(Tridemorph)。所以我認為它們對杜鵑餅病同樣有效。但是藥劑防治有毒，在校園內施行不容易。因此我們去做了修剪防治。結果將枝端高位修剪後，偵測葉痕萌發的新芽，帶菌率 93%。因為那時候沒有外在的感染源，所以應該是病原菌棲息存活在下位的枝條，等葉痕位置發芽時，病原菌從葉痕感染新芽。所以我們在校園裡另外選取罹病嚴重的植株，強勢修剪後，把它有葉片的小枝條都修剪掉，讓病原菌沒有可以感染的部位。經六個月之後，它長出葉片以 PCR 偵測莖、葉片、葉柄與葉痕，共 24 個樣本均不帶菌。可能是強勢修剪把近年來受拓殖有菌棲息的枝條都去除了。而在低位枝條上重新長出來的不定芽，就不帶菌了。

日本外擔子菌以擔孢子傳播，根據我的實驗結果推論，擔孢子感染葉後拓殖到葉柄基部潛伏，而葉片掉落後，病原菌棲息在葉痕的位置。等到頂芽、葉腋側芽或葉痕發芽時，棲息的病原菌就會隨著新生組織生長。在發病季節的時候，讓寄主形成腫瘤，如果病原菌拓殖到嫩莖，就形成莖腫瘤，拓殖到葉片，就形成葉腫瘤，如果受感染的是花芽，就形成花腫瘤，腫瘤形成子實層，產生擔孢子傳播，來完成生活史。

參考文獻

施欣慧，2006。台灣地區外擔子菌科之研究。國立台灣大學植物病理與微生物研究所碩士論文，台北。

Begerow D, Bauer R, Oberwinkler F (2002) The Exobasidiales: an evolutionary hypothesis. *Mycol Progress* 1:187-199

Doyle JJ, Doyle JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.

Mims CW, Richardson EA (2007) Light and electron microscopic observations of the infection of *Camellia sasanqua* by the fungus *Exobasidium camelliae* var. *gracilis*. *Can. J. Bot.* 85:175-183

Nagao H, Akimoto M, Kishi K, Ezuka A, Kakishima M (2003) *Exobasidium dubium* and *E. miyabei* sp. Nov. causing *Exobasidium* leaf blisters on *Rhododendron* spp. In Japan. *Mycoscience* 44:1-9

Nagao H, Ezuka A, Harada Y, Sato T, Kakishima M (2006) Two new species of *Exobasidium* causing *Exobasidium* diseases on *Vaccinium* spp. In Japan. *Mycoscience* 47:277-283

Nagao H, Kurogi S, Sato T, Kakishima M (2004) Taxonomy of

Exobasidium otanianum causing
Exobasidium leaf blight on
Rhododendron species in Japan.
Mycoscience 45:245-250

Nagao H, Ogawa S, Sato T,
Kakishima M (2003) *Exobasidium*
symploci-japonicae var.
carpogenum var. nov. causing
Exobasidium fruit deformation on
Symplocos lucida in Japan.
Mycoscience 44:369-375

Nagao H, Sato T, Kakishima M
(2004) Three species of
Exobasidium causing
Exobasidium leaf blight on
subgenus *Hymenanthes*,

Rhododendron spp., in Japan.
Mycoscience 45:85-95

Nannfeldt JA (1981). *Exobasidium*,
a taxonomic reassessment applied
to the
European species. *Symbolae*
Botanicae Upsaliensis, 23, 1-71.

Nimal Punyasiri PA, Abeysinghe
ISB, Kumar V (2005) Preformed and
induced chemical Resistance of tea
leaf against *Exobasidium vexans*
infection. *J Chem Ecol*
31:1315-1324

表一、實驗用菌株表

菌株編號	採樣日期	宿主	來源
R0	2009.12.20	艷紫杜鵑	東海大學
R29	2010.04	平戶杜鵑	雲林縣林內鄉
R30	2010.04	平戶杜鵑	雲林縣林內鄉
R31	2010.04	西洋杜鵑	雲林縣林內鄉
R32	2010.04	西洋杜鵑	雲林縣林內鄉
R33	2010.04	西洋杜鵑	雲林縣林內鄉

表二、發病季節與非發病季節，杜鵑發病及無病徵枝條各部位帶菌偵測率。

季節	枝條	腫瘤類型	採樣時間	腫瘤		莖		葉痕		葉柄		芽		葉片		葉脈	
非發病 季節	有腫瘤殘存枝條	莖腫瘤	Sep 2009	3/7	43%	5/7	71%	2/4	50%								
		葉腫瘤	Sep 2009	5/6	83%	2/6	33%	6/7	86%	2/5	40%						
	鄰近無病徵枝條		Sep 2009			6/8	75%	6/7	86%			12/12	100%	1/10	10%		
	總計			8/13	62%	13/21	62%	14/18	78%	2/5	40%	12/12	100%	1/10	10%		
發病季節	有腫瘤殘存枝條	葉腫瘤	Oct 2009	2/12	17%	3/11	27%	11/11	100%	8/11	73%						
			Jan 2010	8/8	100%									5/8	63%	3/3	100%
	Apr 2010	9/11	82%	2/8	25%	2/11	18%	5/11	45%					3/11	27%	3/11	27%
	鄰近無病徵枝條		Oct 2009									5/11	45%				
總計				19/31	61%	5/19	26%	13/22	59%	13/22	59%	5/11	45%	8/19	42%	6/14	43%

表三、以孢子懸浮液接種葉片，三個月後，以 PCR 偵測葉片及不定芽各部位帶菌情形。

偵測部位					
芽	嫩葉	嫩莖	葉柄	葉痕	老葉
0/1	0/2	1/1	0/1	1/1	0/1

表四、將培養基上的擔孢子覆蓋平貼在葉片上接種，二週後，以 PCR 偵測葉片各部位帶菌情形。

	偵測部位				
	葉肉	葉脈	葉柄	葉痕	控制組
紅毛杜鵑	1/1	0/1	0/1	0/1	
平戶杜鵑	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1

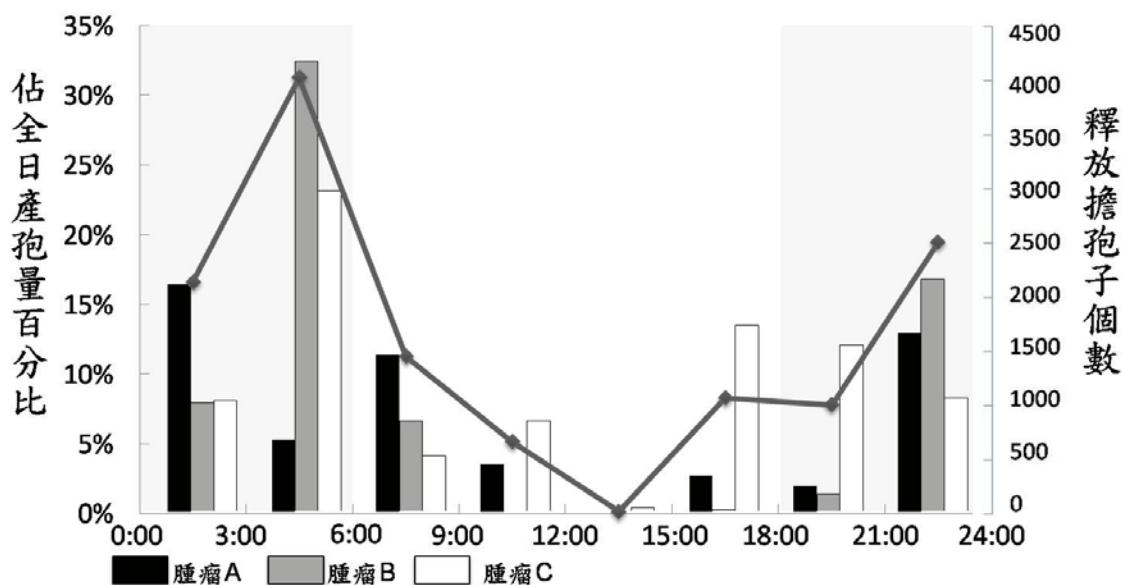
表五、將擔孢子連同培養基切條平貼接種在老葉與嫩葉上，一週後，以 PCR 偵測葉片各部位帶菌情形。

	偵測部位				
	葉片中段	葉片基部	葉脈	葉柄	葉痕
嫩葉	1/4	0/4	0/4	1/4	0/4
老葉	0/6	2/6	0/6	0/6	2/6
控制組	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

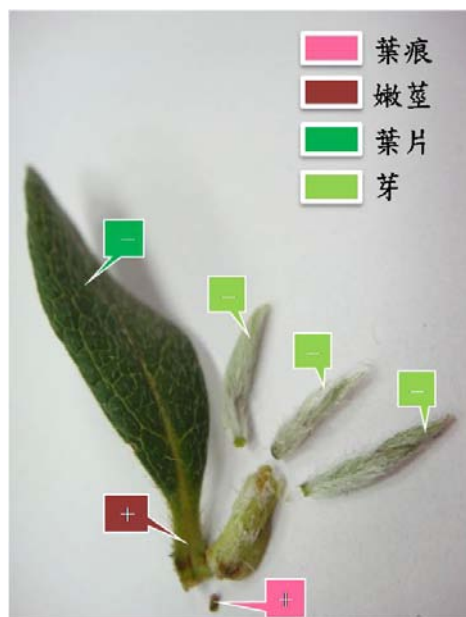
表六、高位修剪及強勢修剪後，以 Booster PCR 偵測植株各部位帶菌率。

偵測部位	高位修剪		強勢修剪	
	正反應數/總數	偵測率	正反應數/總數	偵測率
莖	2/3	67%	0/6	0%
葉片	0/4	0%	0/6	0%
葉柄			0/6	0%
葉痕			0/6	0%
芽	13/14	93%		

圖一、杜鵑腫瘤產孢日週期。



圖二、以孢子懸浮液接種葉片，三個月後，以 PCR 偵測葉片及不定芽各部位帶菌情形。



雄性溪狡蛛(*Dolomedes raptor*)體色在求偶過程所扮演之角色探

討

Evaluating how body coloration of male fishing spider (*Dolomedes raptor*) is involved in courtship

林泰申 譚博仁 卓逸民

東海大學生命科學系 行為生態學實驗室

摘要

前人針對蜘蛛身上鮮艷色彩功能的研究顯示結網型蜘蛛其鮮豔色彩對於其獵物捕食扮演著重要的角色，然而針對徘徊型蜘蛛體色功能所進行之探討則非常少。跑蛛為大型的徘徊型蜘蛛，前人主要針對其捕食的食性及躲避天敵策略進行研究，但很少有人對跑蛛其醒目的色斑的功能進行深入的探討。溪狡蛛(*Dolomedes raptor*)其雌性與雄性成熟個體有明顯的雌雄二型性(sexual dimorphism)，成熟雌性個體在第一、二對步足的前端具有白色色斑；成熟的雄性個體則是在頭胸部上的背甲形成白色的環狀色斑。我們進行每兩週一次之野外的觀察了解溪狡蛛生殖活動之時間及空間分佈模式，也利用視覺生理方法量化其體表光訊號及彩色視覺能力；最後我們在野外進行色斑操控行為實驗，利用與溪狡蛛體色相仿之色紙做成模型，有白環的蜘蛛模型(n = 25)、無白環的蜘蛛模型(n = 32)兩種處理並利用夜視攝影機進行五天從晚上八點到早上四點的監控來探討溪狡蛛的體色在求偶過程中所扮演之角色。目前由全年度野外調查結果可以知道溪狡蛛的生殖季節主要是在春、夏兩季，而初步的結果顯示模型無法有效的吸引雌蛛的靠近，表示雄蛛體色可能不被當做長距離溝通訊號，所以我們預期當雌蛛在擇配時，雄蛛的體色可能作為顯示其身體品質狀況之用而影響其在求偶時被接受的成功率。

前言

很多人針對結網型蜘蛛的體色進行過很多實驗證明其體色對於蜘蛛的捕食具有很大的重要性：例如日間人面蜘蛛鮮黃的色斑能夠增進其雙翅目以及膜翅目昆蟲的攔截量 (Tso et

al., 2002)，且利用色差值的計算可以知道有些種類的昆蟲能夠分辨人面蜘蛛黃色色斑與背景植被的差異，而黑色部分則無法被分辨 (Tso et al., 2004)。而在夜間大銀腹蛛藉由顏料改變其體色也能造成不同的捕食的結果 (Tso et al., 2007)，或是利用顏

料改變茶色姬鬼蛛腹部的黃色斑塊，也會造成其捕食的差異 (Chuang et al., 2007)，由研究當中我們可以了解顏色在蜘蛛身上並不只是裝飾的作用，而是能夠幫助其增加能夠更多的捕食機會。因為結網型蜘蛛的視力通常是很差的，所以大部分的研究著重於其體色對於獵物的視覺剝削；而相對於結網型蜘蛛而言，徘徊性蜘蛛的視力就非常好，其體色的研究大部分就著重在性擇方面的研究。在性擇的選汰壓力下，在蜘蛛不論是雌性的選擇或是雄性的競爭壓力，都會利用很多不同種的溝通訊號當做選擇依據，例如視覺訊號、聽覺訊號、化學訊號、振動訊號跟觸覺訊號 (Huber, 2005)。前人針對生活在沙漠的一種高腳蛛的移動進行研究，可以知道蜘蛛的夜間視覺是必要且重要的 (Nørgaard et al., 2008)。有些跑蛛科的雄蛛甚至會製做類似於卵囊的結婚禮物，當作感覺上的剝削訊號以避免被雌蛛在交配時發生同種相食行為 (Stålhandske, 2001；2003)。

我們都知道視覺在白天是一種很重要的溝通訊號，但在夜間的光強度如此低落，背景雜訊那麼高的狀況下，是否動物也會利用視覺做為交配間的溝通訊號呢？我們利用在夜間活動的溪狡蛛 (*Dolomedes raptor*) 進行實驗，牠們具有雌、雄體色二型性，雄蛛在成熟後背甲上具有明顯的白環，而雌蛛則是在腳上具有色斑。我們想要藉由野外觀察及色斑操控實驗來了解是否是因為性擇的壓力而造成溪狡蛛的性別二型性；並且由實驗室的實驗操作來探討是否雄蛛的光訊號會在夜間被雌蛛當做判定身體品質的

依據來選擇要不要與雄蛛進行生殖行為。如果本假說獲得證實，本研究將會是首先報導夜行性動物也會利用視覺顏色訊號當做交配依據。

材料方法

溪狡蛛是一種棲息在溪邊的夜行性徘徊型蜘蛛，主要捕食半水棲性昆蟲、蝌蚪、魚類為食。當遇到捕食者的攻擊時會往後跳、甚至潛入水中躲避攻擊可以長達半個小時之久。當蜘蛛成熟之後，雄性與雌性的體色有非常大的不同，雌性蜘蛛在前第一、二對步足有一節白斑 (圖一 a)；而雄蛛在背甲上有明顯的一圈亮白色白環 (圖一 b)。

(1) 確認溪狡蛛的交配季節：

我們在 2009 年 3 月至 2010 年 4 月，在台中縣東勢鎮東勢林場外的四角林溪中 (N24°17'06.78"，E120°52'03.96") 進行為期一年的溪狡蛛族群量的動態調查，記錄不同時期與性別蜘蛛出沒的時間。我們每個月進行一到兩次的夜間觀察，於十點進入河床進行樣線的搜尋與記錄，我們會調查當天在溪邊所出現的個體數以及其是否為成熟的雄性或雌性或是未成熟個體。調查為期一年，記錄成蛛數量之巔峰時刻以瞭解那幾個月份為溪狡蛛的交配季節。

(2) 雄性溪狡蛛模型之製作：

由於我們想要了解雄性溪狡蛛身上之視覺訊號會有什麼功能，所以我們利用與雄蛛體色光訊號相似的色紙進行顏色的操控實驗。為了能夠使模型蜘蛛與真實蜘蛛在視覺訊號上是沒有差別的，我們在書局買了大量不同的

棕色與白色色紙，利用光譜儀(S4000, Ocean Optics, Inc., Dunedin, Florida) 來測量其反射光譜及反射強度以進行挑選。而為了去除在製作模型蜘蛛白色色斑因為膠水的氣味因子所影響，所以我們在另一種沒有白色色斑的處理組上也會黏上和體色一樣的色紙(圖二)。

(3) 野外利用蜘蛛模型之操控實驗：

我們於 2009 年的 8 月 28 日至 9 月 1 日，於東勢林場外的四角林溪溪邊利用色紙分別製作有無色斑的雄性溪狡蛛，利用紅外線攝影機由晚上八點拍攝至翌日早上四點，共計八個小時。主要想了解雄性溪狡蛛背甲上的白環是否具有吸引雌蛛的功能並進而成功交配或是有其他重要的功能。

野外的拍攝實驗結束之後，我們將所有影帶拿回實驗室進行分析，總共拍攝時數為 460 個小時(有白斑的處理為 194 個小時，無白斑的處理為 266 個小時)。在影帶觀看時會同時記錄是否有獵物的吸引、雌蛛的靠近及被捕食者攻擊等事件。而我們把在影帶中所觀測到的獵物、捕食者及異性，因為模型蜘蛛的關係改變了原本的移動路徑，或是直接去接觸模型蜘蛛的情況，認定為一次的吸引事件。

(4) 後續的實驗室體色控制實驗：

我們也會在東勢林場採集未成熟的溪狡蛛回來實驗室進行馴養至成熟，避免其在野外有交配過的經驗，並在馴養時利用隔板分開每一個飼育箱，避免視覺的互動所影響。當溪狡蛛成熟之後，我們會區分為兩種處理，其一會利用與雄性棕色體表光訊號雷同的棕色顏料塗抹在白環上去除白環

的光訊號；而另一種處理則把棕色顏料塗抹於棕色背甲上。我們選擇之玻璃缸其長寬高分別為 60,30,30 公分，再利用碎石頭模擬河床佈置成展示場，再分別放入成熟的雄蜘蛛與成熟後三至四周的雌蜘蛛進行實驗。先以隔板隔開靜置一個小時，讓蜘蛛能夠熟悉環境並使雌蛛有足夠的時間佈置曳絲。再抽開隔板並利用紅外線夜視攝影機進行八個小時的拍攝，每隻雄性與雌性蜘蛛個體在實驗中都只會使用一次。

結果

由野外的長期觀察結果我們可以發現溪狡蛛是一種夜間活動的遊獵型蜘蛛，並主要棲息於水邊捕食無脊椎昆蟲或是小型魚蝦，遇到危險會潛入水中進行逃避。我們為了瞭解何時為溪狡蛛的交配季節，所以進行為期一年的野外族群調查，根據調查結果顯示雌性溪狡蛛與幼蛛在全年四季都會出現，而雄性溪狡蛛則只出現在每年的春、夏兩季(圖三)，因此我們認為在春、夏兩季是溪狡蛛主要交配季節。

而在野外進行有無色斑的紙模型蜘蛛拍攝實驗中，經過五天的野外拍攝總共分析了 266 個小時的影帶，我們在影帶中記錄並分析比較有白斑的模型蜘蛛($n = 26$) 和無白斑的模型蜘蛛($n = 32$)之獵物的吸引率、蜘蛛的吸引次數以及被攻擊的次數。我們可以看到在單位時間之內有白斑處理與無白斑處理之間對於獵物的吸引率有顯著的差異(圖六)，我們利用普瓦松分佈進行統計分析可以知道在單位時間中有無色斑的處理對於獵物的吸引

率具有顯著的差異(表一 a)。由此結果可以知道雄性溪狡蛛色斑能夠有效的吸引獵物的靠近。

而我們主要想要知道雄性溪狡蛛的在成熟之後色斑的改變這麼大，是否在雌性的吸引上會有實質上的功能，所以利用色紙模型在排除其他如嗅覺刺激之情況下單純的操作視覺因子。在五天的實驗當中，在有白環的色斑處理組中記錄到了四次的蜘蛛吸引事件，而在無色斑的模型蜘蛛則沒有記錄到任何一次的吸引事件(圖七)，這證明了我們色紙處理的模型蜘蛛是有能力能夠吸引到蜘蛛的靠近。而在這次野外的實驗當中，我們也記錄到了三次的攻擊事件(圖八)。沒有色斑的模型蜘蛛吸引了三次掠食者的靠近，而三次的被攻擊事件都是由螃蟹所造成。在其中一次被攻擊事件裡，我們的紙模型甚至被螃蟹整個由石頭上拆解下來帶走；但是在有色斑的處理當中則沒有記錄到任何一次的被攻擊事件發生，這有可能意味著在某種程度上，有白斑的存在能夠有效的產生避敵的效果。

討論

我們由整年度的野外族群量調查可以發現雌蛛及幼蛛在每個月分均有一定數量出現，而雄蜘蛛只會出現在春、夏兩季，所以我們推測溪狡蛛的交配季節主要是在春、夏兩個季節發生。因為雄性成蛛只短暫出現在幾個月分，相較於雌蛛的生命周期顯著較短，所以我們認為其主要的功能應該是與繁殖有關。這樣的結果有助於我們往後的擇配實驗的設計及進行，也

可以根據其有可能出現的季節去野外捕捉雄蛛，並在正確的季節讓牠們有交配的動機。

而在 2009 年暑假所進行的色紙模型實驗中，我們主要想了解在單純只有視覺訊號之情況下雄蛛是否能吸引到雌蛛的靠近，並探討雌性溪狡蛛是否會利用視覺訊號來決定是否要跟雄蛛進行交配。而根據我們所分析的影帶記錄，我們可以發現在有白斑處理的模型蜘蛛有記錄到四次的雌蛛靠近。雖然所觀測到的次數不足夠在統計上達成顯著上的差異，但是我們還是有四次的吸引記錄，也意味著我們所製作的模型蜘蛛是有能力可以吸引到蜘蛛靠近的。造成吸引蜘蛛的次數那麼低的原因有可能是因為我們在進行拍攝得時候已經是在溪狡蛛交配季節的末期，有可能在野外自然的環境中雄蛛的數量本來就已經很少，且雌蛛大部分都已經交配過並已經懷孕等待產卵，所以對於雄蛛的吸引訊號反應會降低。也有可能色斑的視覺訊號並不是被當做長距離的溝通訊號所使用，而是讓雌蛛在近距離時能夠藉由色斑來反應雄蛛本身的品質，來決定要不要跟牠進行交配。

在影片的分析當中我們也順道記錄了在有無白斑處理當中的模型，牠們所吸引到的獵物以及被捕食者所攻擊的次數。在體色對獵物吸引的功能探討上，我們在兩處理間可以發現到有無色斑會影響到雄性蜘蛛對於獵物的吸引效果。有白斑的模型在單位時間內所吸引的獵物顯著的高於沒有白斑的模型，這證明了色斑有一部分的功能是能夠幫助蜘蛛吸引到更多的獵物靠近。而我們也在所有的影帶中發

現到三次的被捕食者的攻擊事件，這三次的攻擊事件都是由螃蟹所造成，而三次被攻擊的事件都發生在沒有白斑的模型蜘蛛，甚至其中有一隻螃蟹直接就把模型蜘蛛從石頭上給拆了下來。而在有白斑的模型則是沒有任何的捕食者攻擊記錄。雖然在統計上因為發生的事件太少所以無法造成顯著的差異，但是由目前的現象看來，有白斑的蜘蛛似乎在某種程度上也會有避敵的效果。為了要能夠更清楚這些現象，我們需要在往後的實驗上選擇在溪狻蛛的交配季節裡以較高的樣本數進行拍攝。

我們接下來也會在實驗室繼續進行活蜘蛛的色斑操作實驗，以深入探討造成雄蜘蛛體色色斑與雌蜘蛛體色二型性的成因。我們認為有可能在野外雌蜘蛛在夜晚準備要進行交配時，因為在光訊號強度較低且背景雜訊高的狀態下，主要還是會利用費洛蒙吸引雄性靠近，因為氣味的訊號溝通能夠傳遞較遠，且不容易受到障礙物的阻礙，而吸引雄蜘蛛靠近之後，有可能會利用雄蜘蛛身體上的白斑進行視覺上的審視，當做對雄蜘蛛身體品質的一種判斷依據，而因為這種視覺訊號的溝通而導致溪狻蛛的雌雄體色二型性的差別。若本假說能夠得到證實，則本研究將會是首先報導夜行性動物也會利用顏色訊號當做擇偶之依據。

參考文獻

- Bruce, J. A. and Carico, J. E. 1988. Silk use during mating in *Pisaurina mira* (Walckenaer) (Araneae, Pisauridae). *Journal of Arachnology*, 16, 1-4.
- Chuang, C.-Y., Yang, E.-C. and Tso, I.-M. 2007. Diurnal and nocturnal prey luring of a colorful predator. *Journal of Experimental Biology*, 210, 3830-3837.
- Framenau, V. W. and Hebets, E. A. 2007. A review of leg ornamentation in male wolf spiders, with the description of a new species from Australia, *Artoria schizocoides* (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*, 35, 89-101.
- Huber, B. A. 2005. Sexual selection research on spiders: progress and biases. *Biological Reviews*, 80, 363-385.
- Itakura, Y. 1998. Discovery of nuptial feeding in the spider, *Perenethis fascigera* (Araneae: Pisauridae). *Acta arachnologica*, 47, 173-175.
- Johnson, J. C. 2005. The role of body size in mating interactions of the sexually cannibalistic fishing spider *Dolomedes triton*. *Ethology*, 111, 51-61.
- Johnson, J. C. and Sih, A. 2005. Precopulatory sexual cannibalism in fishing spiders (*Dolomedes triton*): a role for behavioral syndromes. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58, 390-396.
- Nørgaard, T., Nilsson, D.-E., Henschel, J. R., Garm, A. and Wehner, R. 2008. Vision in the

- nocturnal wandering spider *Leucorchestris arenicola* (Araneae: Sparassidae). *Journal of Experimental Biology*, 221, 826-823.
- Shamble, P. S., Wilgers, D. J., Swoboda, K. A. and Hebets, E. A. 2009. Courtship effort is a better predictor of mating success than ornamentation for male wolf spiders. *Behavioral Ecology*, 20, 1242-1251.
- Stålhandske, P. 2001. Nuptial gift in spider *Pisaura mirabilis* maintained by sexual selection. *Behavioral Ecology*, 6, 691-697.
- Stålhandske, P. 2003. Nuptial gifts of male spiders function as sensory traps. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269, 905-908.
- Tso, I.-M., Tai, P.-L., Ku, T.-H., Kuo, C.-H. and Yang, E.-C. 2002. Colour-associated foraging success and population genetic structure in a sit-and-wait predator *Nephila maculata* (Araneae: Tetragnathidae). *Animal Behaviour*, 63, 175-182.
- Tso, I.-M., Lin, C.-W. and Yang, E.-C. 2004. Colourful orb-weaving spiders through a bee's eyes. *Journal of Experimental Biology*, 207, 2631-2637.
- Tso, I.-M., Huang, J.-P. and Liao, C.-P. 2007. Nocturnal hunting of a brightly coloured sit-and-wait predator. *Animal Behaviour*, 74, 787-793.

表一 不同處理間的普瓦松迴歸分析結果。(a)不同處理在單位時間內的獵物吸引；(b)不同處理在單位時間內的蜘蛛吸引；(c)不同處理在單位時間內被攻擊次數之比較。我們在分析中把無白斑的處理組之事件發生機率 β 設定為 0 以利與其他處理進行比較。

(a)

Parameter	Group	Estimate of β	SE	z	p
Intercept		-3.7917	0.4082	-9.288	<0.0001
處理	有白斑	1.1629	0.4879	2.383	0.0172
處理	無白斑	0.0000	0.0000		

(b)

Parameter	Group	Estimate of β	SE	z	p
Intercept		-22.86	3426.64	-0.007	0.995
處理	有白斑	18.69	3426.64	0.005	0.996
處理	無白斑	0.0000	0.0000		

(c)

Parameter	Group	Estimate of β	SE	z	p
Intercept		-4.197	0.500	-8.394	<0.0001
處理	有白斑	-18.381	3480.944	-0.005	0.996
處理	無白斑	0.0000	0.0000		

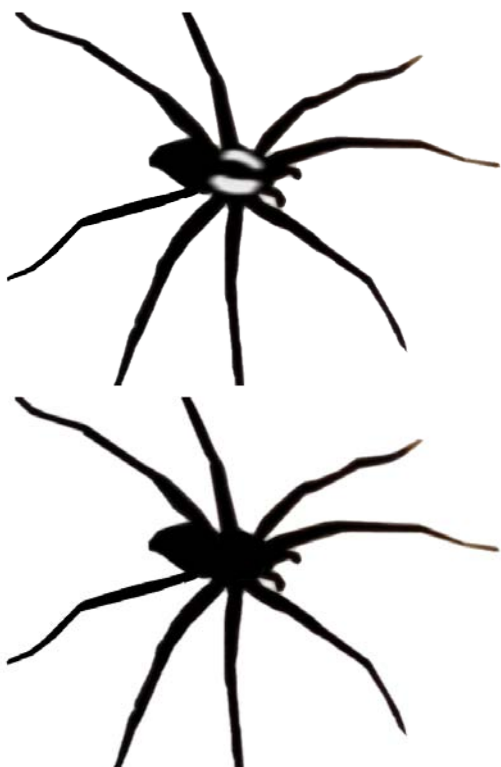
(a)



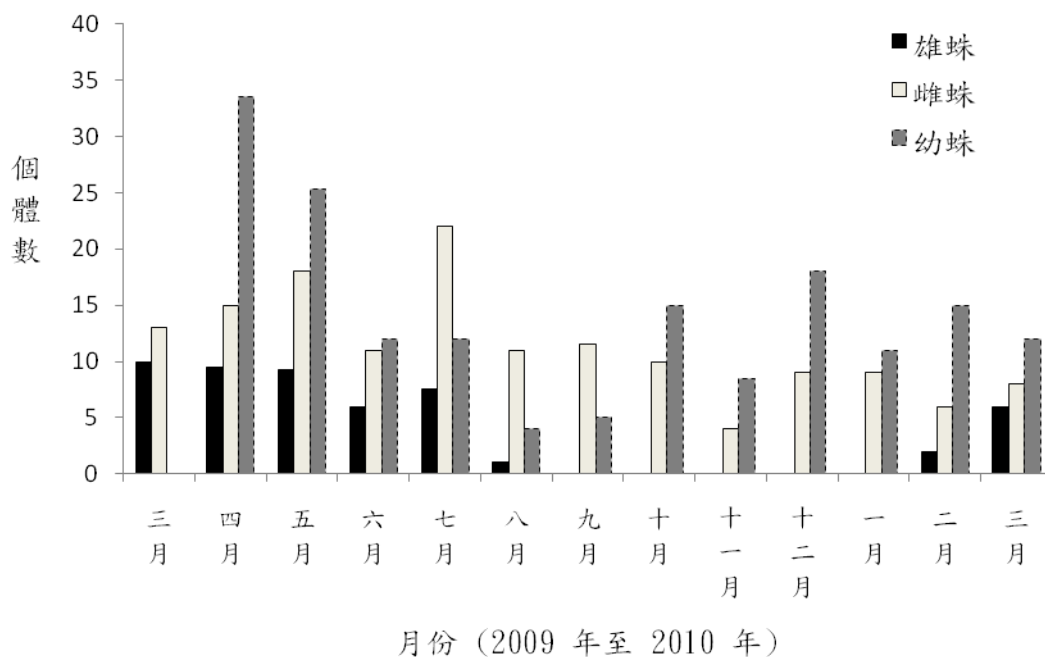
(b)



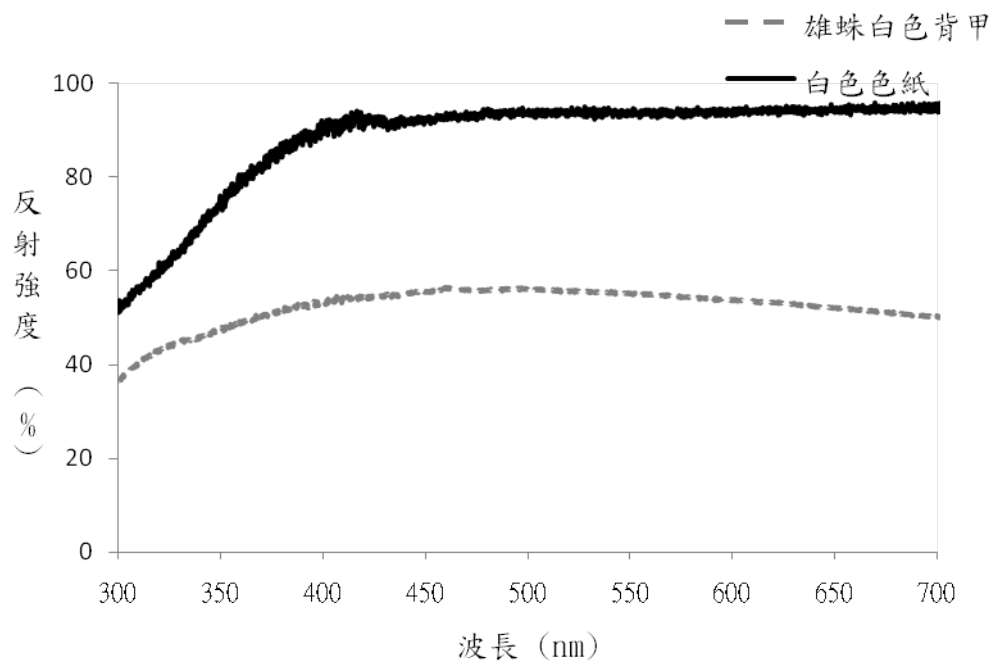
圖一 溪狡蛛雄性(a)與雌性(b)有明顯的體色二型性。



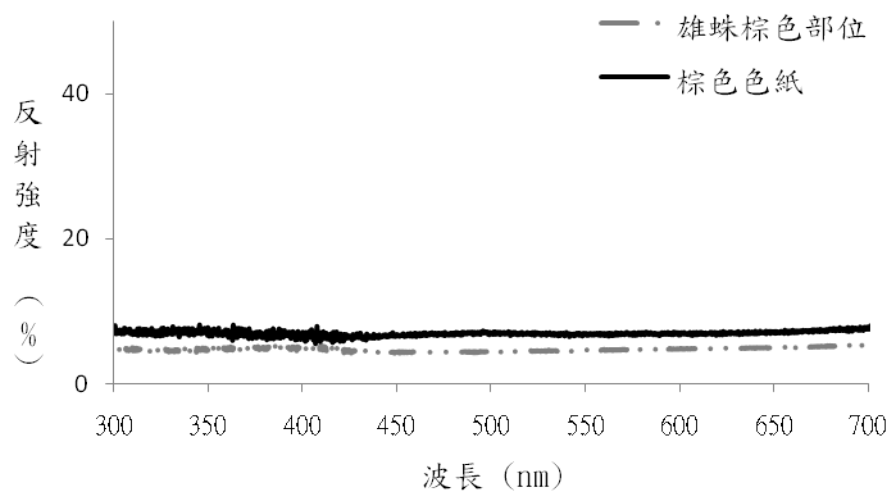
圖二 野外操作實驗使用之有無色斑的模型蜘蛛示意圖。



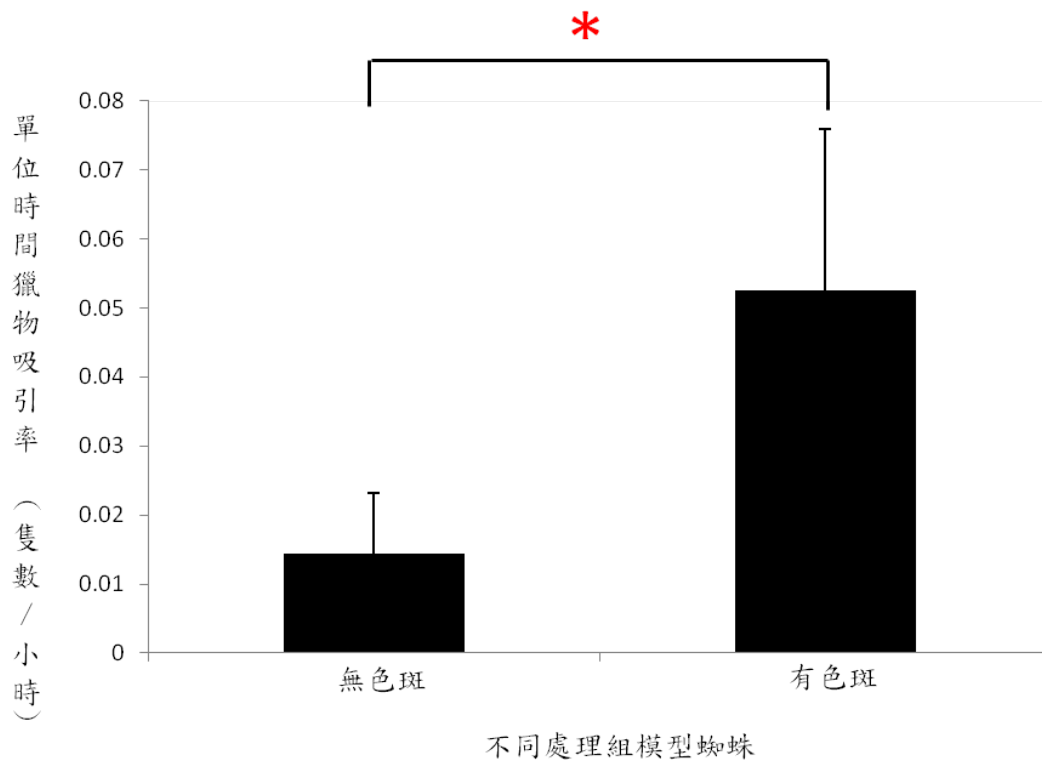
圖三 雄性、雌性與幼體溪狡蛛在四角林溪樣區全年份的族群動態變化量。



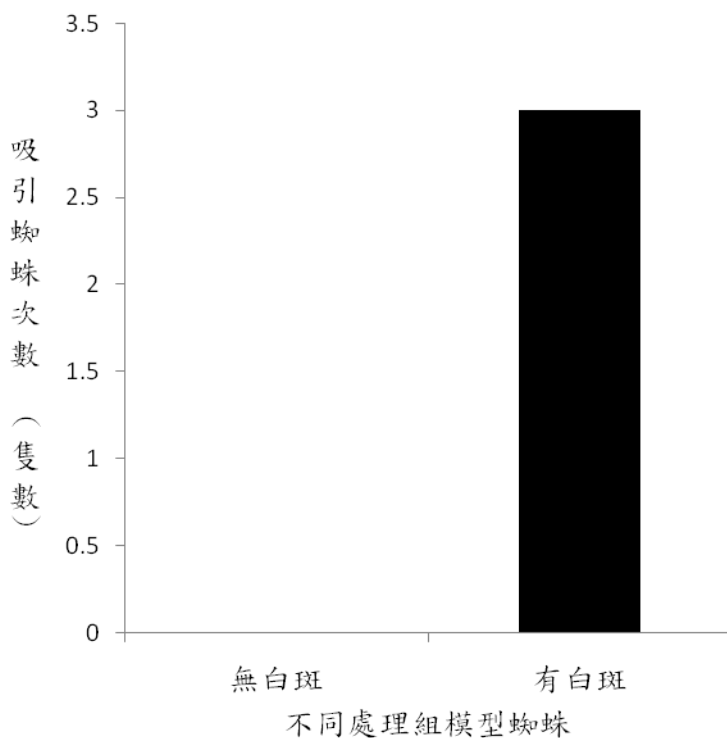
圖四 白色色紙與雄性溪狡蛛背甲白環的反射光譜比較圖。



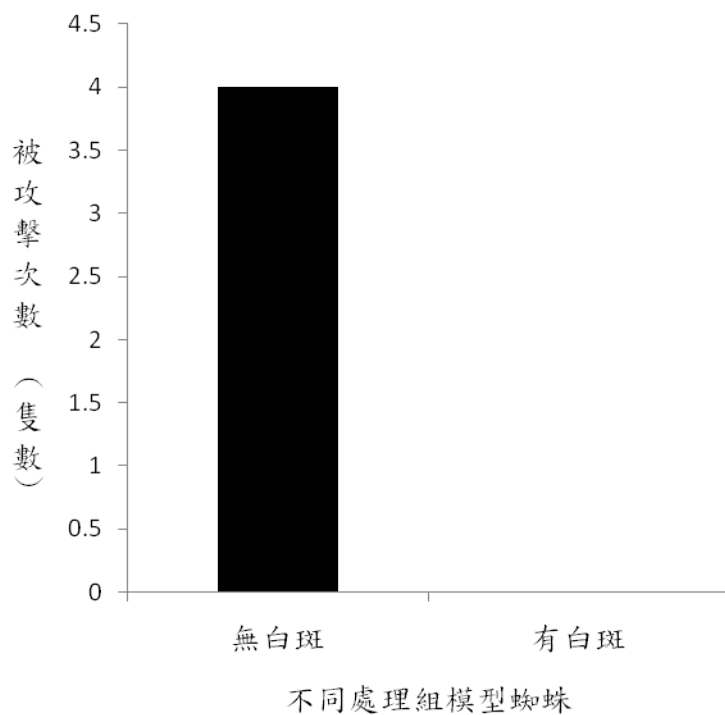
圖五 棕色色紙與雄性溪狡蛛棕色部分體色的反射光譜



圖六 有色斑 (n = 25)與無色斑的模型蜘蛛(n = 32)的單位時間獵物吸引率。利用普瓦松分佈進行統計分析之結果顯示兩處理間具有統計上的顯著差異 (* : $P < 0.05$)。



圖七 有色斑 (n = 25)與無色斑的模型蜘蛛(n = 32)對於野外溪狡蛛的吸引次數。



圖八 有色斑 (n = 25)與無色斑的模型蜘蛛(n = 32)的被攻擊次數。

以斑蝶共生酵母菌 *Candida sp. nov.* 的核酸指紋追蹤

台灣越冬斑蝶生育地與遷徙行為

Using DNA fingerprinting of a symbiotic yeast, *Candida sp. nov.*, to trace breeding habitat and migration behavior of wintering butterflies in Taiwan

李毓文*、汪碧涵

東海大學生命科學系 真菌實驗室

摘要

台灣的「紫蝶幽谷」與墨西哥的帝王斑蝶蝶谷，為目前全球兩個重要的越冬蝶谷。台灣特有的紫斑蝶(*Euploea. sp.*)為少數以成蝶型態渡冬的蝶類，其每年秋季返回「越冬蝶谷」的行為亦為世上少有。本研究於2009年的4、5、8、10與12月，分別在台灣西半部地區各斑蝶棲息地，及東部地區的斑蝶越冬蝶谷採集樣本，由20個植物樣本與69個斑蝶樣本分離純化酵母菌，獲得共51個形態型，其中一種*Candida sp.* 普遍分佈於供試植物與斑蝶，為新種酵母菌*Candida sp. nov.*。經PCR-RFLP分群與部分菌株定序確認共得92株*C. sp. nov.*，繼以RAPD圖譜分析其族群遺傳多樣性。結果顯示在田野中所獲得的斑蝶共生酵母菌*C. sp. nov.*菌株之族群遺傳多樣性很高，而源自同一棲地的斑蝶，牠們所攜的酵母菌菌株遺傳相似度亦高。推測這些斑蝶可能在當地生長羽化，所攜帶的酵母菌為在地菌株，所以具有當地菌株的遺傳特徵。因此，藉由斑蝶所攜帶之*C. sp. nov.*菌株的RAPD圖譜指紋可追蹤斑蝶的生育地與遷徙路線。

研究發現，於2009年4月基隆與8月雲林地區所捕獲的斑蝶身上菌株遺傳多樣性高，顯示當時有不同來源的斑蝶遷入活動。台東金崙為越冬蝶谷，12月份所獲得的斑蝶可能為各地南遷而至，共生酵母菌菌株間之歧異度高於其他地區。本研究發現紫斑蝶共生酵母菌，其核酸指紋可作為宿主生育地標幟，為田野酵母菌族群遺傳及用以追蹤其宿主遷徙的重要研究起步。

前言

全球具兩大知名越冬蝶谷，一為位於南美洲墨西哥的帝王斑蝶谷，另一為台灣高雄縣茂林鄉的「紫蝶幽谷」。每年秋季，羽化的成蝶會大量的南遷至南部溫暖的地方越冬，待隔

年春天再北返至各棲息地進行生育繁殖(詹家龍, 2008)。目前研究已知斑蝶的遷徙路線，其主要採用標放方式，但再捕獲率很低，如台灣約只有萬分之一，因此斑蝶遷徙調查雖已累積多年的資料與努力，卻仍不易回答生育地的斑蝶是從哪裡來的，或回到越冬

蝶谷的斑蝶來自哪些生育地等問題。

酵母菌的群聚分佈常和媒介昆蟲、植物微棲地條件及環境條件有關(Lacnance *et al.*, 2003; Brysch - Herzberg, 2004)，許多昆蟲攜有酵母菌並且是酵母菌的傳播者(Lachance and Starmer, 2000)，果蠅帶有多種酵母菌(Lacnance *et al.*, 1995；Phaff and Knapp, 1956)，高比例的蜜蜂攜有 *Saccharomyces cerevisiae*，為冬季蜂巢內的優勢種(Stevic, 1962)。昆蟲的共生植物也與酵母菌有密切的關係。在夏威夷島的昆蟲與牽牛花生態系中，幾種甲蟲在牽牛花間傳播酵母菌，牠們所出現樣點與有酵母菌 *Metschnikowia hawaiiensis* 或 *Candida kipukae* 的牽牛花的分佈一致；甲蟲對某些酵母菌似乎有專一性的傳播功能(Lacnance *et al.*, 2003)。目前仍無蝴蝶攜帶酵母菌的相關研究，且酵母菌自然族群的族群遺傳研究有限。

本研究的目的是有三，首先調查台灣紫斑蝶身上的酵母菌多樣性；二、尋找可做為指標的酵母菌種，並建立核酸指紋分析方法；三、調查各地紫斑蝶的核酸指紋，探討核酸指紋圖譜做為生育繁殖地與遷徙行為追蹤探討工具的可行性。

材料與方法

樣區與樣本採集

春至秋季為紫斑蝶在全台各棲息地繁殖的季節，此時採樣以台灣西岸中、北部地區為主。北部地區採樣點

有基隆縣槓子寮、台北縣石碇二格山、桃園縣蝙蝠洞、香光山寺及大溪地區；中部地區為雲林縣林內。台東金崙採集越冬紫斑蝶樣本。主要採集分析紫斑蝶足跡，方法如下所敘；為調查體內與體外菌相比較，僅部分蝴蝶樣本攜回實驗室。

樣本包括小紫斑蝶 (*Euploea tulliolus koxinga* Fruhstorfer, 1908)、斯氏紫斑蝶 (*Euploea sylvester swinhoei* Wallace and Moore, 1866)、圓翅紫斑蝶 (*Euploea eunice hobosoni* Butler, 1877)、端紫斑蝶 (*Euploea mulciber* Barsine Fruhstorfer, 1904) 四種台灣特有亞種的紫斑蝶，以及亦有遷徙行為且在蝶谷越冬的小紋青斑蝶 (*Tirumala septentrionis* Butler, 1874)。

同時收集紫斑蝶棲息植物江某 (*Schefflera octophylla* (Lour.) Harms) 的葉片，在台東縣大武的蝶谷內與蝶谷外各取10株植物的葉片樣本，每兩棵樹的樣本混合為一個樣本，攜帶回實驗室分離母菌。採樣時，以新的夾鍊袋直接套裝，避免樣本受到汙染。

酵母菌的分離

為獲得斑蝶體表攜帶的酵母菌菌株，將斑蝶樣本放入置有酵母菌選擇性培養基—添加抗生素 Chloramphenicol 的酵母麥芽瓊脂培養基平板 (Yeast-Malt Agar, YMA, Difco, pH=4.5, 40 mg/L Chloramphenicol) (Yarrow, 2000) 的夾鍊袋中密封，讓斑蝶在袋內的培養基上踩踏15分鐘後釋放斑蝶，取出培養皿；將培養皿置於25°C培養箱中1至2天，待菌落長出。

分離斑蝶頭部及口器之酵母菌，將其頭部取下置入 1.5 ml 心管中，加入適量無菌海砂及 500 μ l 菌水後將樣本磨碎後震盪均勻，取 100 μ l 在 YMA 酵母菌選擇性培養基平板上，以曲玻棒均勻塗開培養。

植物樣本之酵母菌分離，取 10 平方公分植物葉片樣本置入乾淨含有 40 ml 無菌水的培養皿中，以矽膜密封，置於 25°C 培養箱，85 rpm 盪 15 分鐘後取 100 μ l 樣本洗液至選擇性 YMA 培養基上，以曲玻棒均勻塗開，置於 25°C 培養箱培養 1 至 2 天，待菌落長出。

當以上分離培養基上長出菌落後，於解剖顯微鏡下辨識不同菌株，將培養基上菌落形態不同的酵母菌單一菌落挑出，以四區劃法純化菌株，培養於 YMA 平板培養基。純化菌株依其菌落外觀形態特徵及細胞形態，初步區分形態種，挑選出來的菌落須再純化培養一次，獲取純菌。

所有菌株於室溫下以 YMA 培養液培養 2 天後，取 700 μ l 菌液，加入已滅菌 20% 甘油 700 μ l，混合均勻，置於 -80°C 冷凍保存。(Kirsop et al., 1988)。

核酸萃取

修改 Doyle 與 Doyle (1990) 的方法萃取酵母菌 DNA。取單一菌落在 YMA 培養基上四區劃開，於 25°C 培養兩天以活化細胞。以牙籤刮取適量新鮮細胞，懸浮於含有 500 μ l CTAB 萃取緩衝液 (Hexadecyl trimethylammonium bromide, CTAB; 2%, NaCl 1.4 M EDTA 20 mM, Tris (pH=8) 100 mM) 1.5 ml 離心管中混合均勻，置於 94°C 30 分鐘和 65°C

10 分鐘以打破細胞壁。加入 500 μ l Dichloromethane : isoamyl alcohol (24:1, v/v)，上下反轉混合均勻，以桌上型超高速微量離心機 (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Germany) 室溫下離心 15,000 rpm 2 分鐘；將上清液吸取至新-3') 及 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 1.5 ml 離心管中並加入 300 μ l Isopropanol，上下反轉混合均勻，室溫離心 15,000 rpm 2 分鐘；倒掉上清液，加入 500 μ l 洗滌緩衝液 (Wash buffer, ethanol; 76 %, ammonium 10 mM)，靜置 2 分鐘後室溫離心 15,000 rpm 2 分鐘；去除上清液留下膠狀的 DNA，在無菌操作台中風乾。風乾後的 DNA 加入 20-50 μ l 無菌純水，37°C 下回溶 DNA 30 分鐘，置於 -80°C 下保存。萃取的酵母菌 DNA 以核酸計算儀 (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) 計算濃度，並調整至 50 ng / μ l 做為後續 PCR 反應之模板 DNA。

核糖體 DNA ITS 區域的 PCR-RFLP 分群

萃取酵母菌菌株 DNA 後，以廣效性引子對 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3') 及 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')。(White et al., 1990)。

rDNA 中的 ITS 區域，參考 Chang 與 Wang (2002) 及 汪等人 (2003) 的條件進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 擴增。PCR 混合液組成為 40.1 μ l 無菌水、5 μ l 10X Taq buffer、0.5 μ l dNTP (10 mM)、ITS 引子各 0.5 μ l，0.4 μ l Taq polymerase (2U/ μ l, GeneMark, Taiwan)，及 3 μ l

模板DNA (50 ng / μ l)，反應總體積為50 μ l。

PCR反應，DNA變性起始溫度為95°C、3分鐘，其後39個循環，核酸變性95°C、30秒，黏合溫度58°C、30秒，擴增溫度72°C、45秒，電泳膠體分析以100 ml 的0.5X TAE buffer配製1.2% Agarose (w/v)膠體，以Ethidium bromide 染色；110 V 下電泳30分鐘，使用100 bp 分子量大小標誌。

PCR產物以HhaI、HaeIII、HinfI、MspI四種限制酵素進行限制酶片段長度多型性RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)分析。每種內切酶識別的特定序列，作用後產生許多不同長度的片段；以電泳將它們分開。各核酸片段電泳後的條帶位置不同，組成不同指紋圖譜，不同菌種四種RFLP圖譜不同，據以判別各菌株是否為同種酵母菌，篩選出各種酵母菌，定序分析鑑定；同種酵母菌的菌株，再以RAPD分析種內的族群遺傳多樣性。

RAPD分析

分析新種酵母菌*Candida sp. nov.*的族群遺傳多樣性，試驗32個隨機引子後，篩選出OPA-01 (5'-CAGGCCCTTC-3')、OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3')以及OPE-18 (5'-GGACTGCAGA-3') (Valério1, H. M., et al., 2006; Verquezl, L. B., 2007)具有區辨族群遺傳變異能力，可獲得各菌株的三個隨機核酸增幅多型性(Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD)圖譜，作為族群遺傳分析的指紋。

分析樣本的DNA 指紋圖譜相似

度，以1、0代表有、無DNA條帶，利用Primer 5.0 軟體(Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK)進行One-Way ANOSIM (Analysis of Similarity)分析，並以Cluster群叢分析繪製親緣關係樹狀圖。

結果與討論

各棲地樣本數量

於台灣西岸中北部各斑蝶棲息地，及東部地區蝶谷採集斑蝶樣本，得小紫斑蝶12隻、斯氏紫斑蝶11隻、圓翅紫斑蝶1隻、端紫斑蝶17隻，以及小紋青斑蝶28隻，共69隻斑蝶樣本。(表一)。

各地斑蝶與植物上的酵母菌多樣性

由台灣西岸各斑蝶棲息地，與東部台東蝶谷內外獲得69個斑蝶樣本與20個江某樣本，共獲得198株酵母菌，以外觀形態區分出51個形態種(圖一)。蝶谷的斑蝶棲居植物江某上有19型37個菌株；斑蝶體表及頭部分離得37型酵母菌形態種，共計有161個菌株。形態編號1、2、3、6、9、13的酵母菌同時在斑蝶與棲居植物葉表均有發現，可能為葉表真菌由斑蝶攜帶傳播，或是棲息於斑蝶的真菌。

斑蝶上的酵母菌形態種，桃園地區與雲林的斑蝶樣本上所獲得的酵母菌介於為5到19種形態，種類較豐富。桃園地區共三個棲息地，共分離得29型酵母菌，有17種形態種只在桃園發現，其中具五型在雲林捕獲的斑蝶上亦出現，第6型則在雲林及台北均有發現。雲林林內的斑蝶酵母菌形態有14種類型，其中編號1、3、6、27的形態

種在其他地區也有發現，可能為普遍分布種。

在基隆槓子寮、台北縣石碇二格山各獲得2種，和其他地區比較多樣性較低。以所捕獲的斑蝶樣本之鱗粉量判斷，該二批斑蝶為新蝶，所攜菌相較單純。

比較各棲地斑蝶的體表和頭部的酵母菌形態種，體表的多樣性高於頭部，有些種類僅在頭部發現；編號1、3、6及41的形態種在體表及頭部都有發現。斑蝶上發現的37個形態種酵母菌中，以第一形態種的分離率最高，在各地樣區的植物及斑蝶樣本上普遍分布，因此選擇該酵母菌形態種為研究對象。

限制酶片段長度多型性 RFLP 分群確認菌種

第一形態種的菌株數量和前測實驗的菌株樣本總合共計有226株，選取代表菌株153株進行PCR，其中102株菌的rDNA ITS片段長度相同，為550 bp左右，將此102株進一步以經PCR-RFLP分析，確認其RFLP圖譜形態；相同菌種應有相同的RFLP菌株圖譜。四種限制酵素中，*HaeIII*與*MspI*沒有切點，*HhaI*與*HinfI*分別有1個切點2個條帶，和2個切點三個條帶，以此條帶形態篩選出相同分群的菌種共計92株，從中選取10株分別來自於基隆、台北、雲林的斑蝶酵母菌菌株及台東江某葉表酵母菌菌株，觀察記敘形態，並比對rDNA ITS序列，鑑定為新種*Candida*屬酵母菌- *Candida* sp. nov.。(圖二、圖三)

Candida sp. nov.之RAPD圖譜指紋相似度比較

以OPA-01、OPA-02與OPE-18逢機引子所獲得的RAPD圖譜，分析92株*Candida* sp. nov.的種內族群遺傳變異，以Cluster分析繪製樹狀圖，每個編號代表一隻斑蝶上一株菌的RAPD圖譜，*Candida* sp. nov. rDNA ITS已定序菌株以紅色星號表示，分布在不同的分支。(圖四)

樹狀圖可略分為8個分支，另有10株菌自成一分支，可見田野中的菌株族群遺傳多樣性。

從分支編號1(台北)及8(桃園)的兩個分群可以發現，相同棲息地之*C.* sp. nov.的DNA指紋圖譜差異和其他地區相比較小，或甚至相同，可能因這些斑蝶在當地出生、羽化，攜帶的酵母菌為在地菌株，具有當地遺傳特徵。

在第一分支均具相同指紋的菌株中，以台北捕獲7隻斑蝶所攜10株菌為最大宗，這些斑蝶均為新蝶，應為當地生育羽化，但其中在雲林及桃園亦捕獲攜帶和台北菌株DNA指紋圖譜相同的*C.* sp. nov.的斑蝶，推測這兩株菌源於台北，斑蝶自台北羽化後，攜該指紋菌株遷徙，分別在桃園與雲林被捕獲。

相同情形也出現在第5分支，基隆與桃園捕獲斑蝶之酵母菌核酸指紋與三隻雲林斑蝶所帶酵母菌指紋完全相同，可能由雲林生育，遷徙至基隆與桃園被捕獲；第8分支的一個次分支也有3隻桃園斑蝶與2隻基隆斑蝶帶有相同指紋菌株，這些部分由於樣本數不

足，尚須更多數據以探討其生育地與遷徙。

第三分支的菌株源自越冬蝶谷台東金崙的紫斑蝶，菌株指紋的歧異度遠高於其他分支；十二月所捕獲的斑蝶可能是各地南遷而至，因此所攜菌株指紋多樣性高，而且指紋與西岸生育地的斑蝶所攜該菌指紋大不相同。根據目前有限數據，並未發現西岸調查區域的斑蝶遷徙到台東金崙越冬，若有東岸生育地的菌株指紋，則可看出哪些地方生育的紫斑蝶會回到這個蝶谷越冬。一個棲息地所捕獲攜不同指紋菌株的斑蝶，代表這些斑蝶由不同生育地遷徙匯聚。

第一、第四與五分支的菌株源於基隆、台北、桃園及雲林捕獲的斑蝶，可看出斑蝶可長距離的遷徙，且遷徙範圍廣泛。我們可利用 *Candida sp. nov.* 的核酸指紋，追蹤斑蝶的生育地與遷徙路徑。

各地區 *Candida eupoleicola* 指紋相似度分析

以ANOSIM分析各棲息地斑蝶所攜帶的 *Candida sp. nov.* 之DNA指紋圖譜。初步將各樣區劃分為北、中及東三大地理區，結果顯示台灣東岸和西岸地區各斑蝶棲息地的斑蝶上所獲得的 *C. sp. nov.* 指紋圖譜，兩兩比較均有極顯著差異，推測因台灣東岸地區和西岸中、北部因地理環境上受到山脈阻隔，斑蝶在東西兩岸遷徙不易，因而造成差異；台灣西岸地區的中、北部因斑蝶的南遷北返遷徙行為交流，*C. sp. nov.* 的指紋圖譜無顯著差異。(表二)

將三大地理區各棲息地樣點分開來看，西岸台北石碇二格山的 *C. sp.*

nov.

指紋圖譜和基隆、桃園及雲林地區有顯著到極顯著的差異。其他地區如基隆、桃園和雲林的 *C. sp. nov.* 之RAPD指紋圖譜差異不大，僅有基隆槓子寮及雲林林內分別和桃園2(香光山寺)、桃園3(蝙蝠洞)之間有顯著差異，如有更多數據，或可用以分析兩兩地點間的斑蝶移動率。

另比較桃園地區的桃園1(蝙蝠洞)、桃園2(香光山寺)、桃園3(大溪)三個不同棲息地採樣點間的 *C. sp. nov.* DNA指紋圖譜沒有顯著差異，可能由於紫斑蝶在這三個有地緣關係的斑蝶棲地間移動頻繁，以致各樣點捕獲的紫斑蝶間的 *C. sp. nov.* 菌株DNA指紋圖譜沒有顯著差異。(表三)

不同種類斑蝶之 *Candida sp. nov.* RAPD指紋相似度比較

不同種類斑蝶上之 *Candida sp. nov.* 菌株之遺傳多樣性沒有顯著差異。推測其遺傳多樣性的分布受地理限制，和斑蝶的種類不相關。四種紫斑蝶在幼蟲時期的食草各不相同，但蜜源植物沒有顯著差異，該菌如何拓殖於各種斑蝶有待進一步探究。(表四)

結論

- 一、斑蝶身上常見2到10種種酵母菌棲居；初步以形態區分，在七個樣區捕獲的69隻斑蝶樣本上，共獲得37個酵母菌形態種。
- 二、小紫斑蝶、斯氏紫斑蝶、圓翅紫斑蝶、端紫斑蝶四種紫斑蝶及小紋青斑蝶身上常攜有新種酵母菌 *C. sp. nov.*。

- 三、 比較 *C. sp. nov.* RAPD 指紋圖譜，發現由全省捕獲斑蝶身上分得的菌株，族群遺傳多樣性很高，相似度介於 0 - 100% 之間
- 四、 同一棲地中，新的紫斑蝶攜帶相同核酸指紋的 *C. sp. nov.*，這些斑蝶可能在當地生育，因此攜有具生育地核酸指紋的 *C. sp. nov.*。台北縣石碇二格山的三種 7 隻斑蝶上，10 株 *C. sp. nov.* 的三組 RAPD 指紋完全相同。
- 五、 同一棲地發現攜帶完全不同核酸指紋菌株的紫斑蝶，可能是由其他生育地遷徙而至。例如桃園與雲林各捕獲一隻攜有相同指紋菌株的紫斑蝶，與其他桃園及雲林的紫斑蝶菌株指紋完全不同，這兩隻紫斑蝶可能在台北生育，遷徙到桃園以及雲林被捕捉。
- 六、 四月基隆與八月雲林地區的紫斑蝶 *C. sp. nov.* 指紋分析發現菌株遺傳多樣性高，顯示當時有許多不同來源的斑蝶遷入活動。
- 七、 動物遷徙追蹤不易，大型動物可用衛星追蹤，但成本高昂；鳥類常用腳環，但再捕獲率低；蝴蝶常用標放，但在捕獲率在千分之一到萬分之一間，數據有效獲取率偏低；或以同位素檢測，但只能做廣尺度推估。本研究發現紫斑蝶攜有普遍分布的優勢酵母菌，其各地族群具有不同的核酸指紋特徵，或許可以做為追蹤紫斑蝶生育地以及遷徙路線的指標，

應進一步確認，可能是微生物生態、田野與昆蟲遷徙行為研究的重大發現。

參考文獻

- 汪碧涵、張靜文、王嫻婷。2003。五種紅酵母屬酵母菌的分子類緣關係分析。台灣農業化學與食品科學 41: 101-112。
- 詹家龍。2008。紫斑蝶。晨星出版社，台北。
- Chang, C. W., and Wang, P. H. 2002. Six *Rhodotorula* species from Taiwan. Fungal Science. 1, 2: 23-26.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.
- Herzberg, M. B., 2004. Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. FEMS Microbiology Ecology. 50: 87-100.
- Kirsop, B. E. and Kurtzman, C. P. 1988. Living resources for biotechnology. In Kirsop, B. E., Kurtzman, C.P. (Eds.). Yeasts, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 234.
- Lachance, M. A., Bowles, J. M., and Starmer, W. T. 2003. Geography and niche occupancy as determinants

- of yeast biodiversity: the yeast-insect-morning glory ecosystem of Kipuka Puau, Hawaii. *FEMS Yeast Research*. 4: 105-111.
- Lachance, M. A., Gilbert, D. G., and Starmer, W. T. 1995. Yeast communities associated with *Drosophila* species and related flies in an eastern oak-pine forest: a comparison with western communities. *Indian Journal of Microbiology*. 14: 484-494.
- Lachance, M.-A. and Starmer W. T., 2000. Ecology and yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed., Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, pp. 21-30.
- Phaff, H. J. and Knapp E. P. 1956. The taxonomy of yeasts found in exudates of certain trees and other natural breeding sites of some species of *Drosophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 22: 117-130.
- Stevic, S. 1962. The significance bees (*Apis* sp.) and wasps (*Vespa* sp.) as carrier of the yeast for the microflora of grapes and the quality of wine. *Arkhiv. Poljoprivredne Nauke*. 50: 80-92.
- Valério¹, H. M., and Cássia Botelho Weikert-Oliveiral, R., Resendel, M. A. 2006. Differentiation of *Candida* species obtained from nonsocomial candidemia using RAPD-PCR technique. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39: 174-178
- Verquezl, L. B., García, A. C., and Tanaka, L. V., 2007. Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and ATB ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24: 148-151
- Yarrow, D., 2000. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed., Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, pp. 77-100.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322

表一、不同棲地中所獲得斑蝶之種類與數量

	基隆	台北縣	桃園1	桃園2	桃園3	雲林	台東	總數
小紫斑蝶	0	0	1	0	1	5	5	12
端紫斑蝶	1	2	6	3	4	1	0	17
斯氏紫斑蝶	2	2	0	0	3	4	0	11
圓翅紫斑蝶	0	0	0	0	0	1	0	1
小紋青斑蝶	2	6	4	3	4	0	9	28
總數	5	10	11	6	12	11	14	69

基隆：槓子寮，台北縣：石碇二格山，桃園1：蝙蝠洞，桃園2：香光山寺，桃園3：大溪

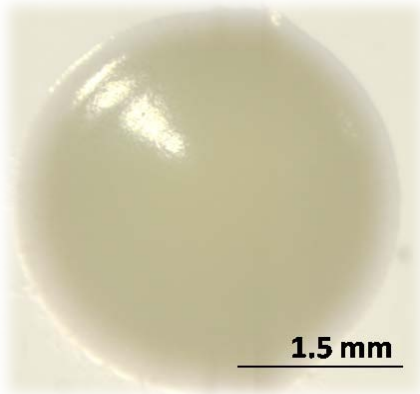
表二、台灣三大地理區斑蝶所攜之 *Candida eupoleicola* RAPD 指紋圖譜相似度

Pairwise test	R statistic	P-value
東部-北部	0.384	0.001 **
東部-中部	0.514	0.002 **
北部-中部	0.037	0.323
Global R	0.268	0.002 **

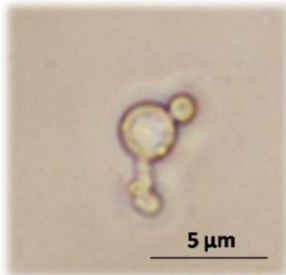
表三、台灣各棲息地樣點間斑蝶所攜之 *Candida eupoleacola* RAPD 指紋圖譜相似度

Pairwise test	R statistic	P-value	
台東-台北	0.355	0.001	**
台東-基隆	0.476	0.001	**
台東-林內	0.514	0.002	**
台東-桃園 1	0.494	0.001	**
台東-桃園 2	0.525	0.002	**
台東-桃園 3	0.552	0.001	**
台北-基隆	0.249	0.044	*
台北-林內	0.234	0.011	*
台北-桃園 1	0.261	0.004	**
台北-桃園 2	0.275	0.014	*
台北-桃園 3	0.29	0.001	**
基隆-林內	0.155	0.11	
基隆-桃園 1	0.213	0.078	
基隆-桃園 2	0.379	0.009	**
基隆-桃園 3	0.105	0.21	
雲林-桃園 1	0.045	0.259	
雲林-桃園 2	0.052	0.228	
雲林-桃園 3	0.266	0.007	**
桃園 1-桃園 2	-0.07	0.73	
桃園 1-桃園 3	0.071	0.123	
桃園 2-桃園 3	-0.03	0.542	
Global R	0.262	0.001	**

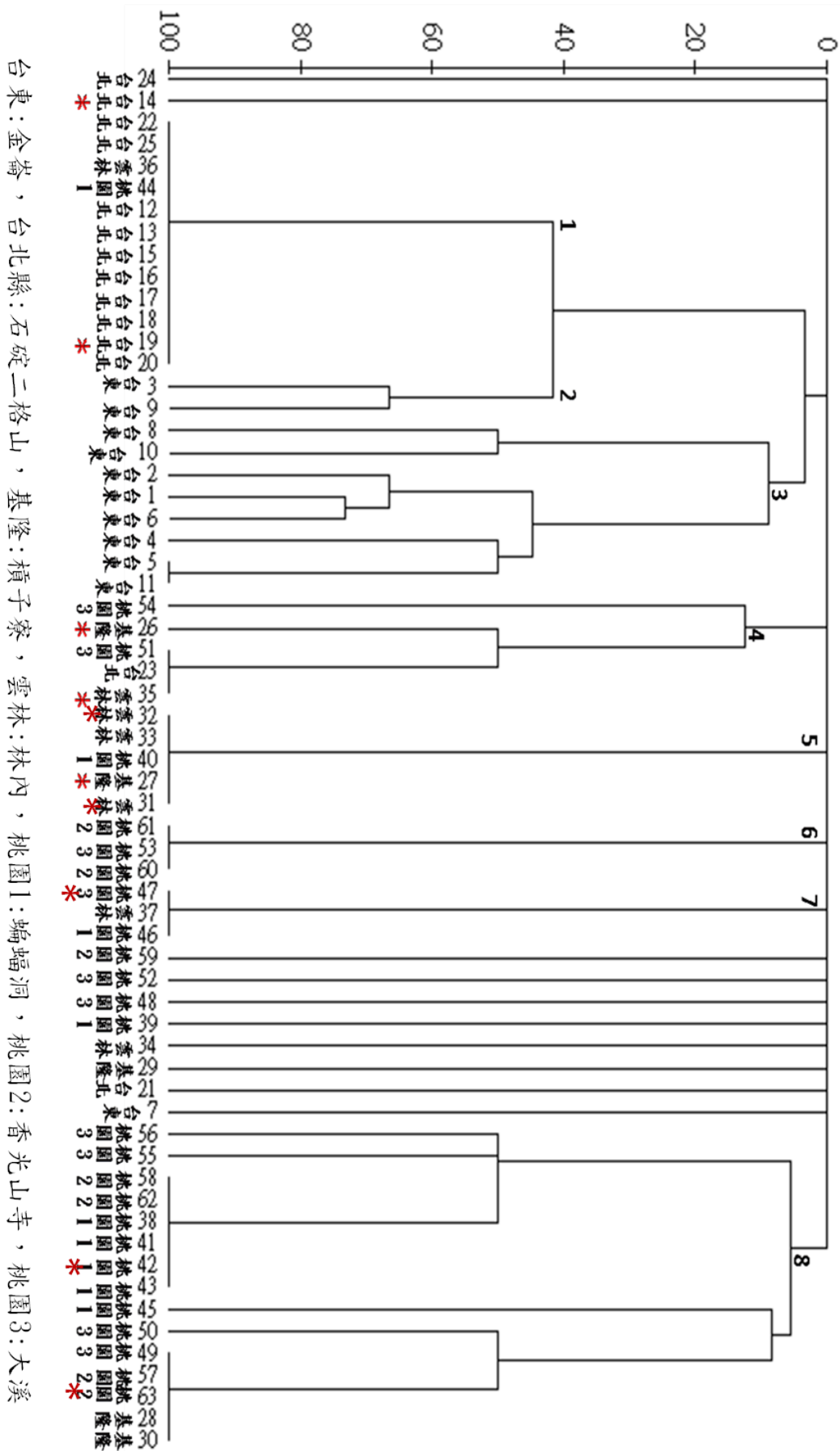
圖二、*Candida* sp. nov. 的單一菌落形態



圖三、*Candida* sp. nov. 的出芽生殖



圖四、*Candida sp. nov.* 之RAPD 圖譜指紋相似度比較



溪狡蜘蛛時間活動模式及體色功能之探討

Temporal activity pattern and function of body coloration of fishing spider *Dolomedes raptor*.

唐瑋勵*¹、卓逸民¹

¹東海大學生命科學系

摘要

自然界中，動物信號可能藉由觸覺、視覺、聽覺、嗅覺等多種方式在同種與不同種生物間被傳遞。許多動物的體色具上述特性並具欺騙、求偶、減少被捕食機率和增加捕食效率等功能。前人研究顯示結網型蜘蛛其鮮豔體色在獵物捕食上扮演重要角色，然而目前沒有任何研究針對在夜間光暗環境下活動的徘徊性蜘蛛其醒目白斑之功能進行深入的探討。跑蜘蛛為大型之夜行性徘徊性蜘蛛，在頭胸部及足部末端有明顯的白色斑紋。本研究經由研究溪狡蜘蛛 (*Dolomedes raptor*) 不同年齡階段體色的變化模式，日夜間活動週期，所捕食之獵物種類以及個體跟微棲地環境的關係來探討跑蜘蛛科蜘蛛身體白斑之功能。結果顯示雄雌成蜘蛛以及幼體蜘蛛其白斑分佈模式並不相同，成熟雌蜘蛛白天跟夜晚出現數量有極顯著差異，主要在夜間出現覓食。我們利用模型蜘蛛於四角林溪進行野外操作性實驗，觀察白斑的有無是否會影響獵物吸引力；並在室內操作實驗中將雌性溪狡蜘蛛腿上白斑刮除，將其置於展示場中比較刮除前後其獵物吸引力是否有所差異。結果顯示，身上具有白色色斑的雌性溪狡蜘蛛較不具白斑者有較高的獵物吸引力。因此，雌蜘蛛腿上白斑可有效增加夜間捕食效率，顯示夜行性之徘徊性蜘蛛也會如同圓網蜘蛛般利用體表光訊號來色誘獵物。

前言

自然界中，動物信號藉由觸覺、視覺、聽覺、嗅覺，甚至融合多樣的方式在同種與不同種間被傳遞。由釋放者 (Releasers) 所釋放之信號刺激接收者產生天生的固定行為模式 (fixed action patterns, FAPs)。例如知更鳥 (European robin) 的前胸具有橙紅色的羽毛，雄性知更鳥一旦看到前胸是橙紅色的鳥，即會引發一連串

的固定行為模式：啄、抓、拍翅等將入侵者趕走 (Tobias, 1997)。而信號刺激與固定行為模式之間的作用，對於動物在環境中的生存是很重要的。例如海鷗雛鳥看到親代其鳥喙上的紅點，會引起雛鳥去啄其紅點向親代乞食 (Tinbergen, 1951)，並藉此乞食行為獲得親代的照顧。除此之外，某些動物會釋放出欺騙的視覺信號刺激獵物做出其天生的固定行為模式，以增加自己的利益。例如歐洲杜鵑會將雛鳥寄生到他種鳥類的巢中；而他種鳥

類會偏好將食物給脖子升高、頭搖動及嘴張開的雛鳥，因杜鵑的雛鳥可成長得比宿主本身的後代還快且體型較大，故可以放出比較強烈的訊號，而獲得比較多的食物(Lichtenstein et al., 1998)。或生存在深海黑暗環境下的鮫鱈魚其前背鰭上具有發光器，可發出生物螢光以誘引獵物前來(Munk, 1999)。除了視覺信號之外，捕食者也利用了不同層面的欺騙信號誘引獵物做出對其有利的固定行為模式。例如在嗅覺層面上，流星錘蜘蛛會擺盪具有雌蛾費洛蒙的絲團以吸引獵物前來(Haynes et al., 2002)。捕食者藉由以上這些欺騙的信號可激發其獵物天生的固定行為模式，來增加其獲得的利益。

前人研究指出，結圓網的蜘蛛身上鮮豔的體色也是極佳的欺騙信號，可誘導其獵物表現固定行為模式以增加捕食的效率。在日間，人面蜘蛛的族群中，色斑較鮮豔的典型個體可比色斑不鮮豔的黑色型個體攔截到較多的獵物(Tso et al., 2002)，這代表鮮豔的體色對於捕食活動是有幫助的。且量化人面蜘蛛身體各部份在膜翅目昆蟲的眼中其色差之後，可發現黃色的點及條帶可從植背背景分辨出來，但黑色的部份則不行(Tso et al., 2004)。而在之後的操控實驗中，以黑漆覆蓋黃色的點及條帶，可顯著降低其獵物攔截率，這樣的結果指出色斑的顯眼部位對於獵物是有吸引力的(Chuang et al., 2007)；同樣地，在夜間茶色姬鬼蜘蛛的操控實驗結果也指出其腹面鮮豔色斑之功能為吸引獵物靠近，對於獵物具有視覺吸引力的(Chuang et al., 2007)；而前人在日間

以模型蜘蛛的所進行的操控實驗顯示，如將色斑的顯眼部份其面積放大，也就是將欺騙訊號的強度提高，可顯著提高獵物吸引率，但相對地也較易被捕食者發現而被攻擊；而改變顯眼部位的顏色則會顯著降低獵物吸引率，但改變顯眼部份的排列方式，也就是將原先分散之顯眼部份使之聚集到模型蜘蛛的頭胸部，獵物吸引率並無顯著地改變(Fang et al., 2008；郭等人, 2009)。

過去的研究已證實，結網性蜘蛛身上鮮豔的體色具有吸引獵物的功能，而徘徊性蜘蛛由結網性蜘蛛演化而來，身上也同樣具有明顯的色斑，這讓人聯想到徘徊性蜘蛛身上的色斑是否像結網性蜘蛛的體色一般會為其帶來好處。而關於徘徊性蜘蛛體色的研究目前大多與性擇相關，例如狼蜘蛛(Kotiaho et al., 1998)。在本研究中，我想測試是否此類蜘蛛之鮮豔體色在夜間也扮演吸引獵物之角色。

至目前為止，針對跑蜘蛛所進行之相關研究並不多。少數學者的研究發現跑蜘蛛在遭遇攻擊時會藉由向後跳(Figiel et al., 1994；Suter, 2003)，或是潛入水中來躲避天敵(Roble, 1985)。半水棲性的溪狡蜘蛛可偵測水面上的震動得知獵物的方位(Bleckmann et al., 1994)。也有學者研究其如何藉由跳躍或滑行在水面上移動(Gorb and Barth, 1994)。至目前為止，沒有任何研究針對跑蜘蛛體色在生態上的意義進行進一步的探討。

因此，我藉由研究溪狡蜘蛛不同年齡階段體色的差異模式，24 小時活動時間的觀察以及其獵物的種類，來探討跑蜘蛛科的體色在生態上的意義；並

利用蜘蛛與蜘蛛模型之白斑來探討白斑是否對於蜘蛛之捕食具有影響力。使用真實或者模型蜘蛛這兩種實驗方式各自有其不同的好處；使用模型蜘蛛可在技術層面上輕易地操控色斑的有無，同時也可以排除掉其他外在因素影響實驗，例如氣味；而直接利用蜘蛛操縱白斑的有無則可模擬真實情況的吸引事件。

材料方法

田野操作實驗

(一) 實驗物種• 溪狡蜘蛛

溪狡蜘蛛，學名為 *Dolomedes raptor*，為跑蛛科，屬於地表坐等伏擊型的徘徊性蜘蛛，具半水棲性，在夜間經常以等候的姿態出現於河岸礫石上捕捉陸地或水中的獵物。其雌性成蛛在腳步前端具有明顯的白斑，是一個作為體色研究很好的題材。另外，溪狡蜘蛛具有雌雄二型性，雄蜘蛛體型較雌蜘蛛小，且在頭胸部具有一圈白環。幼蛛的色斑則是呈碎花狀分布於全身(如圖一)。

(二) 調查溪狡蜘蛛出沒的時間及獵物種類：

在進行野外操作實驗之前，我在 2008 年 7 月 7~9 日調查溪狡蜘蛛其日夜出沒時間與其捕食獵物的種類。觀察樣區為蓮華池蛟龍溪上游(23°55'30.15"N, 120°53'24.51"O)，其河道上方受原始闊葉林所遮蔽，河岸多以礫石灘為主。我們尋找適當河段後拉出 32 公尺的穿越線，每兩小時巡迴一次觀察實驗樣區內的溪狡蜘蛛出現隻數以及其捕食獵物的種類，藉此了解其體色發揮作用之時間及作用

對象為何。

(三) 製作模型蜘蛛：

由於我們使用色紙做成的模型蜘蛛來進行操控實驗，因此必須挑選出與真正蜘蛛體色有相似光波型的色紙。雌性溪狡蜘蛛的體色主要由黑色及腳部前端的白色色斑所組成，為了模擬其色斑訊號，我們從各個書局搜集了黑色與白色的不同材質紙張，並以光譜儀(S4000, Ocean Optics Inc., USA)來測量其反射光譜。利用所測得的光波形來挑選出與雌蜘蛛體色波形最相近的黑色色紙與雌蜘蛛腳前端的白斑波形最相近的白色色紙。為了避免色紙的特質在實驗過程中受到環境因子的影響而改變，每個模型蜘蛛只使用一次。

(四) 野外操控實驗樣區：

研究樣區位於台中縣東勢鎮四角林溪(24°17'5.31"N, 120°52'19.43"O)，海拔高度約為 500 公尺，年均溫在攝氏 20-25 度之間，當地保留了相當豐富的林相資源以及生物多樣性。進行田野操作實驗的樣區為四角林溪下游河段之兩旁河岸，其地形多以礫石灘為主，主要樹種包括：樟樹、楓香、杉木、油桐、肖楠、櫻花、梅花等，此處除了具有密集的溪狡蜘蛛族群之外，尚有拉式清溪蟹、褐樹蛙、蓬萊脊菱蝗與平背脊菱蝗等生物共存。

(五) 野外實驗操作處理：

本實驗使用 SONY Hi-8、D8 攝影機以及數位攝影機(SONY SR100 與 SR62 系列)進行拍攝觀察，於 2009 年 8 月 28 日至 9 月 1 日間進行野外操縱實驗，為期五天。每天晚上 8 開始拍攝到凌晨 4 點，共計八個小時。

藉由操縱色斑的有無設計出兩種模型蜘蛛。控制組所用的蜘蛛模型是模擬正常成熟雌性溪蜘蛛，其八隻腳部前端皆具有白色色斑。而實驗組所用的蜘蛛模型則腳前端不具有白色色斑，而改以與體色相同的黑色色斑做為替代(如圖二)。在攝影機拍攝之前，我們利用矽利康防水膠將蜘蛛隨機固定於河段兩旁的石頭、竹竿等乾燥物上。

(六) 分析不同處理之模型蜘蛛其吸引力：

野外的操作實驗結束之後，我們將拍攝完畢的錄影帶及影片帶回實驗室分析，拍攝樣本數約為 80 隻(控制組約為 40 隻，實驗組約為 40 隻)，總共時數約為 640 個小時(控制組約為 320 小時，實驗組約為 320 小時)。觀看影帶時，如發現畫面中的無脊椎動物其活動的路線，會因為模型蜘蛛的關係而產生改變，並且徘徊於模型蜘蛛的身旁，我們即認定為一吸引事件。每個模型蜘蛛其吸引事件發生的次數最後會加總在一起，並除以拍攝的小時數，來計算出獵物吸引率。

室內操作實驗

(一) 室內實驗操作處理：

本實驗使用 SONY Hi-8、D8 攝影機以及數位攝影機(SONY SR100 與 SR62 系列)進行拍攝觀察，於 2009 年 9 月 5 日至 9 月 19 日間進行室內操作實驗。每天晚上 8 點開始拍攝到半夜 12 點，共計 4 個小時。我們採集了四角林溪上游河段的成熟雌性溪蜘蛛以及當地兩種菱蝗：平背脊菱蝗(*Eucrotettix oculatus transpinosus* Zheng) 與 蓬萊脊菱蝗(*Platygalialidium formosanum*)，於台中縣烏石坑低海拔試驗站溫室中進

行拍攝實驗，試驗站位於台中縣和平鄉自由村烏石坑地區(24°17'46.64"N, 120°55'41.46"O)，海拔高度為 670 至 1,834 公尺，平均氣溫約為攝氏 18 度，年雨量 2,684mm，相對溼度平均百分之八十五，整年有霧天氣約一百天，並有明顯之乾溼季，以植生及氣候而言，環境頗適合野生動物棲息。

操作實驗前，蜘蛛統一禁食兩天以上以固定饑餓程度。在攝影機拍攝之前，於兩尺的透明魚缸中鋪入等面積(長為 30 公分，高為 4 公分)的碎石、一顆大石，以及 2000 毫升的水，以模擬蜘蛛棲地環境。拍攝前 30 分鐘將蜘蛛與兩隻菱蝗個別關入不透明的塑膠杯中，並將三個杯子倒置在魚缸中，使蜘蛛與菱蝗適應缸內的環境(如圖三)。五分鐘後釋放蜘蛛，使其自由地在缸內活動。25 分鐘後釋放菱蝗並開始以紅外線夜視模式進行拍攝。拍攝結束後紀錄菱蝗的隻數，用以計算蜘蛛的捕食率。每隻蜘蛛在拍攝後，將其白斑刮除做為實驗組，進行下一次的拍攝實驗。

(二) 分析不同處理之蜘蛛其吸引力：

室內拍攝結束之後，我們將錄影帶與影片帶回實驗室分析，總共觀察記錄了 25 隻成熟雌蛛，總共時數約為 240 小時。觀看影帶時，如發現菱蝗直線朝向蜘蛛前進超過其兩倍體長，即認定為一吸引事件；倘若菱蝗有碰觸蜘蛛或被蜘蛛捕食都會被記錄。最後，我將吸引事件個別加總起來，並除以拍攝小時數，來計算吸引率。

初步結果

(一) 調查溪狡蜘蛛出沒的時間及獵物種類：

(1) 成熟雌性溪狡蜘蛛

在蓮華池地區為期三天之田野調查，共觀察記錄了 69 隻成熟雌性溪狡蜘蛛。我發現雌蜘蛛在夜晚出現的數量明顯地比白天高 (如圖四)(t -test, $P = 0.003$)。且根據雌蜘蛛的時間活動模式調查可知雌蜘蛛約於傍晚時間(大約六點左右)出現在溪邊捕食，於清晨(大約早上六點)時離開(如圖五)。白天蜘蛛大多躲藏於石縫或石頭下。

(2) 幼蜘蛛

於調查期間共觀察記錄了 84 隻幼蜘蛛，而幼蜘蛛的出現模式與雌蜘蛛非常不同。幼蜘蛛白天與夜晚的出現數量未達顯著差異(t -test, $P = 0.816$)。根據幼蜘蛛的時間活動模式來看，幼蜘蛛全天候活動於溪邊捕食(如圖六)。

(3) 成熟雄性溪狡蜘蛛

於調查期間共觀察記錄了三隻成熟雄性溪狡蜘蛛，但由於成熟雄蜘蛛所觀察到的數量太少，故不列入分析。

(4) 溪狡蜘蛛夜間獵物的組成

溪狡蜘蛛之夜間獵物多樣性高，其中包含無脊椎及脊椎動物。在數量上以菱蝗為最多(如圖七)。而這些獵物都有可能是蜘蛛腿上白斑的作用對象。

綜合以上的結果：成熟雌性溪狡蜘蛛位於其步足前端具有明顯之白斑，是一種適合作為體色研究之題材，而雌性個體於夜間出現在溪邊捕食，並主要以捕食與其棲地重疊的菱蝗為主，顯示蜘蛛腿上的白斑主要作用時間為夜晚，且其主要作用對象可能為諸如菱蝗之夜行性昆蟲。因此，我選擇利用成熟雌蜘蛛於夜晚進行實驗，並

利用菱蝗作為室內操作實驗之獵物。

(二) 野外模型蜘蛛操縱實驗之初步結果

根據我目前的初步結果，白斑存在組樣本數為 11 隻，而白斑移除組的樣本數為 10 隻，我發現兩組處理間的吸引率沒有顯著差異(如圖八)，但在兩組間的獵物組成有顯著差異(如圖九)。但此部份僅為初步結果，尚有 2/3 的部份還有待完成，須將實驗完成後才能知道確切的結果。

(三) 室內操作實驗：

白斑存在組蜘蛛其獵物吸引率顯著高於白斑移除組(Wilcoxon test, $P = 0.034$)(如圖十)，此結果顯示白斑在夜間可有效吸引獵物前來。然而，兩組處理間菱蝗有無接觸蜘蛛之次數組成雖看似有差異，但未達統計顯著性(如圖十一)。而比較蜘蛛捕食情況在兩組間的組成，其結果非常接近統計上的顯著性(如圖十二)(Wilcoxon test, $P = 0.051$)，雖然未達顯著差異，但也非常接近顯著，因此根據這個結果我還是推論具有白斑的蜘蛛捕食成功率較高。

討論

以往對於蜘蛛體色的研究大多都針對結網性蜘蛛，但徘徊性蜘蛛也同樣具有鮮豔的體色。在我們的實驗之中，我們利用操縱白斑的有無來探討體色是否具有吸引獵物的功能。從我們一開始的實驗得知，成熟雌蜘蛛與幼蜘蛛的活動時間不同，造成這樣的差異可能跟不同生長階段的生存策略有

關。在幼蛛時期迅速長大可能是提高其適存度的重要因子，所以幼蛛會在被捕食風險高的白天也進行捕食。而且幼蛛斑駁之體色可能有助於增加隱蔽性，降低其可見度，以減少被捕食的機率。而雄溪狡蜘蛛數量過少，推測可能原因為此季節已過了交配期，進入產卵期，所以雄蜘蛛可能在交配前異性相食中，或於完成交配後死亡，因此在產卵期見不到它們。

在觀察其活動模式的同時，我們也針對夜間獵物的組成進行觀察。由結果可知溪狡蜘蛛之夜間獵物多樣性高，其中包含無脊椎及脊椎動物。在數量上以菱蝗為最多。脊椎獵物之數量雖不高，但其體型較大、生物量高為高價值獵物。而我們推測這些獵物也可能是雌蜘蛛步足上白色色斑之作用對象之一，值得在未來進行深入之探討。

我的第一個實驗是單純探討蜘蛛身上的色斑在夜間是否可有獵物前來，在本實驗中，選用色紙製作模型蜘蛛的好處是，能夠輕易的對於色斑進行操作實驗，且能避免真蜘蛛所提供的其他訊號(例如氣味)而將欺騙訊號單獨限制於視覺訊號。從我的初步結果可知白斑雖然不能增加獵物吸引率，但卻可使蜘蛛吸引不同型態的獵物前來。但由於資料尚未完全，還有待之後補齊才能夠知道完整的結果。

我利用真正的蜘蛛直接操縱其身上的色斑，如此可以觀察在真實情況下色斑對於菱蝗的吸引情況。而根據室內操作實驗結果得知，雌蜘蛛腿上白斑可有效增加夜間捕食效率，顯示夜行性之徘徊性蜘蛛也會如同圓網蜘蛛般利用體表光訊號來色誘獵物。在調

查的過程中，我發現菱蝗經常在朝向蜘蛛前進一段距離後即轉向或停止不動，而根據我的結果：未接觸的組成數量上明顯高於有接觸，但在兩組之間組成未達顯著性，因此根據此結果推論白斑對於菱蝗並非具有警示功能之信號。另外，由於我放入了兩隻菱蝗，因此其捕食情況有三種，第一種就是兩隻被捕食、或是只捕食一隻、甚至兩隻都沒捕食，比較三種情況在兩組處理間的組成， P 值為 0.051，接近顯著差異。雖然未達差異顯著性，但也非常接近，因此根據此結果我還是推論具有白斑的蜘蛛捕食成功率較高。

過去研究指出，雄性菱蝗可藉由重複震動展示其前胸背板之求偶行為以增加交配成功機率，而雄性菱蝗身上也具有明顯的白斑。(Hochkirch et al., 2006)。因此，溪狡蜘蛛也許模擬了菱蝗的求偶信號，吸引菱蝗前來，進而增加其捕食率。但由於所使用兩種菱蝗活動力不同，也有可能影響被捕食的機率，因此在未來我將調查菱蝗活動力以納入分析以實驗更加完整，並針對野外操作實驗所獲之影片資料持續進行觀察與分析。

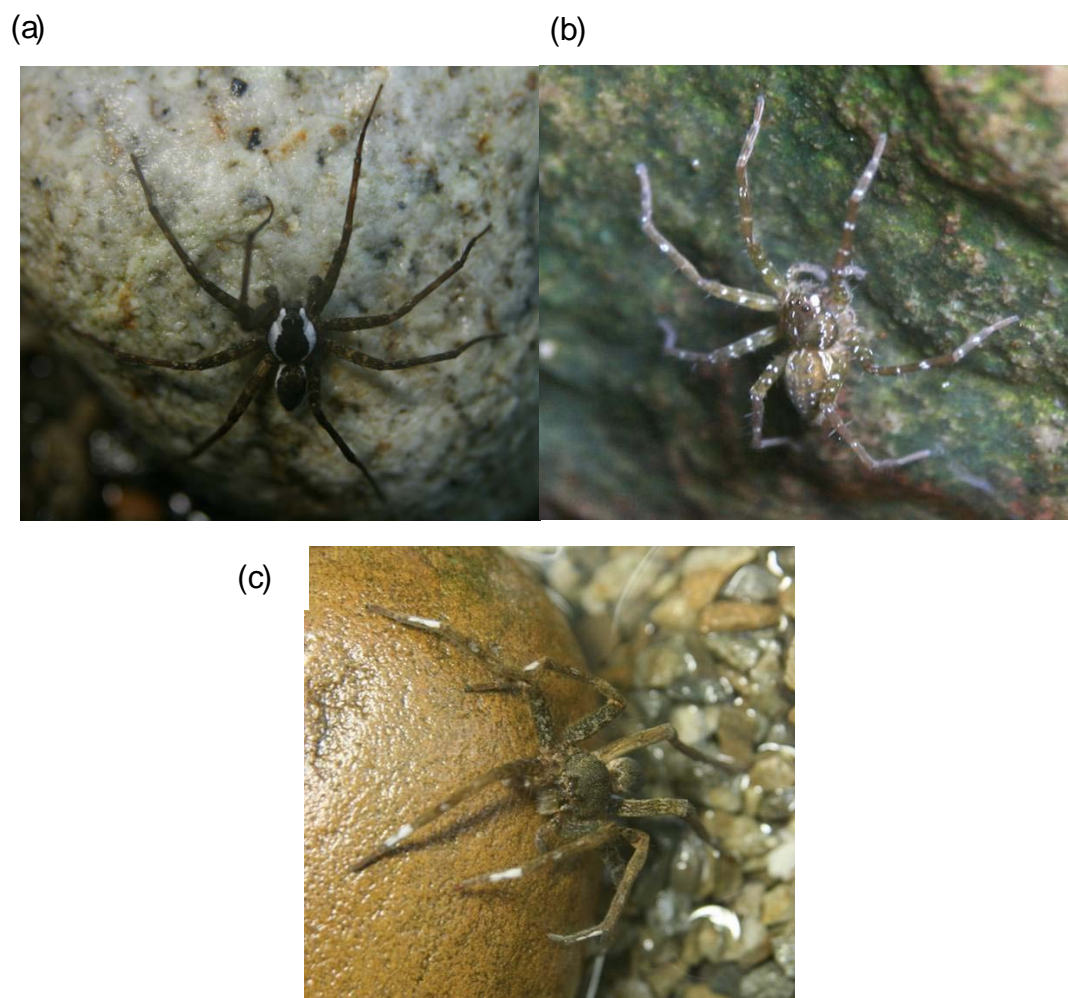
參考文獻

郭懿儀, 彭博, 陳思瑋。 2009。蜘蛛為什麼色成這個樣子。東海大學生命科學系學士論文。

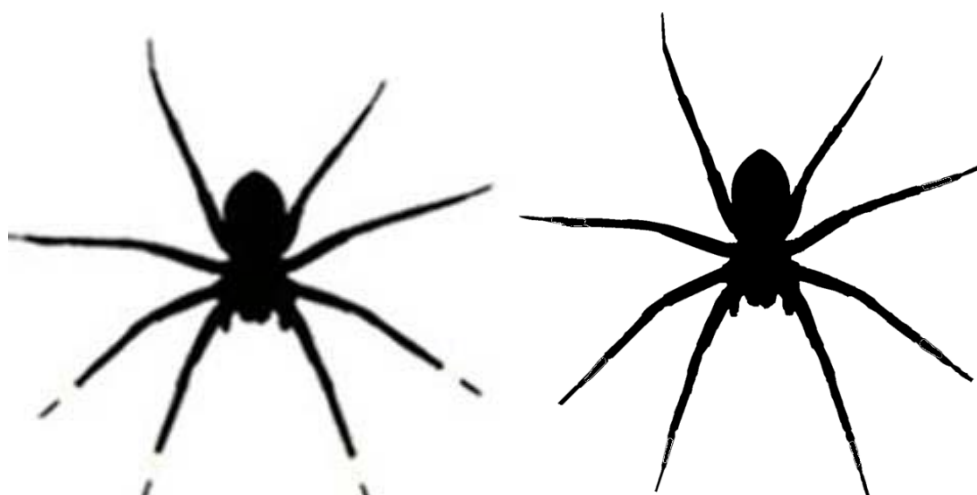
Hochkirch, Axel, Deppermann, Jana, and Groning, Julia. 2006. Visual communication behaviour as a mechanism behind reproductive

- interference in three pygmy grasshoppers (Genus *Tetrix*, Tetrigidae, Orthoptera). *Journal of Insect Behavior*, 19, 559-571.
- Bleckmann, H., Borchardt, M. Horn, P. and Gerner, P. 1994. Stimulus discrimination and wave source localization in fishing spiders (*Dolomedes triton* and *D. okefinokensis*). *Journal of Comparative Physiology A-sensory Neural and Behavioral Physiology*, 174, 305-316.
- Chuang, C. Y., Yang, E. C. and Tso, I. M. 2007. Diurnal and nocturnal prey luring of a colorful predator. *Journal of Experimental Biology*, 210, 3830-3837.
- Fan, Chun-Min; Yang, En-Cheng, Tso, I-Min, 2009. Hunting efficiency and predation risk shapes the color-associated foraging traits of a predator. *Behavioral Ecology*, 20, 808–816.
- Figiel, C. R., Miller, JR. and Miller, G. L. 1994. Effects of fish on the growth and survival of two fishing spider populations (*Dolomedes triton*; Araneae, Pisauridae). *Journal of Arachnology*, 22, 185-189.
- Gorb, S. N. and Barth, F. G. 1994. Locomotor behavior during prey-capture of a fishing spider, *Dolomedes plantarius* (Araneae: Araneidae): galloping and stopping. *Journal of Arachnology*, 22, 89-93.
- Haynes, K. F., C. Gemeno, K. V., Yeargan, J. G. Millar, and Johnson, K. M. 2002. Aggressive chemical mimicry of moth pheromones by bolas spider: how does this specialist predator attract more than one species of prey? *Chemoecology*, 12, 99-105.
- Kotiaho, J. S., Alatalo, R. V., Mappes, J., Nielsen, M. G., Parri, S., and Rivero, A. 1998. Energetic costs of size and sexual signaling in a wolf spider. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 22, 2203-2209.
- Tobias, J., 1997. Asymmetric territorial contests in the European robin: the role of settlement costs. *Animal behaviour*, 54, 9-21.
- Kreiter, N. and Wise, D. H. 1996. Age-related changes in movement patterns in the fishing spider, *Dolomedes triton* (Araneae, Pisauridae). *Journal of Arachnology*, 24, 24-33.
- Lichtenstein, G., and S. G. Sealy. 1998. Nesting competition, rather than supernormal stimulus, explains the success of parasitic brown-headed cowbird chicks in

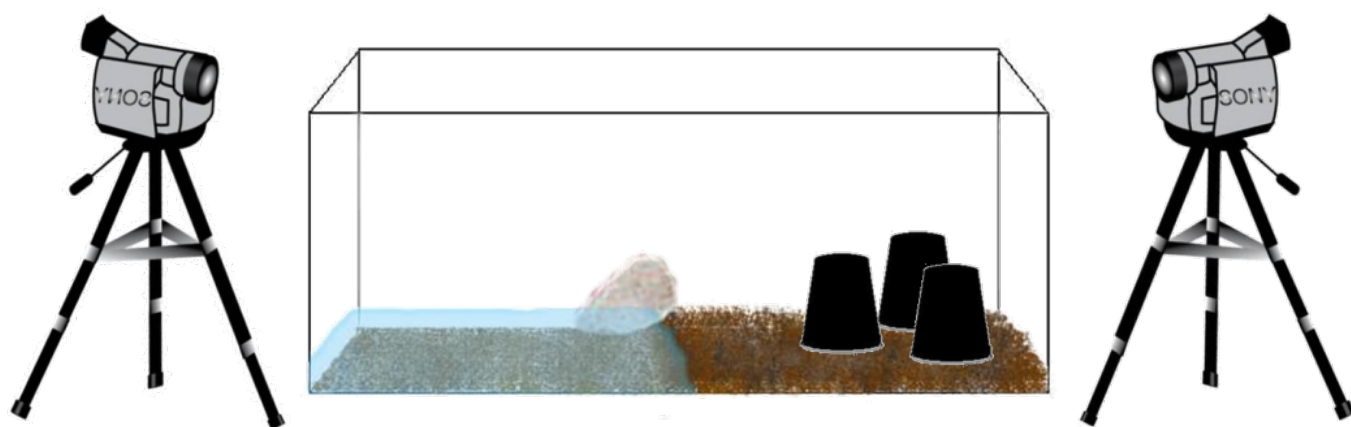
- yellow warbler nests. *Proceedings of the Royal Society of London*, B265, 249-254.
- Munk, O. 1999. The escal photophore of ceratioids (Pisces; Ceratioidei) – a review of structure and function. *Acta Zoologica*, 80, 284.
- Roble, S. M. 1985. Submergent capture of *Dolomedes triton* (Araneae, Pisauridae) by *Anoplius depressipes* (Hymenoptera, Pompilidae). *Journal of Arachnology*, 13, 391-392.
- Suter, R. B. 1999. Cheap transport for fishing spiders (Araneae, Pisauridae): The physics of sailing on the water surface. *The Journal of Arachnology*, 27, 489-496.
- Suter, R. B. 2003. Trichobothrial mediation of an aquatic escape response: Directional jumps by the fishing spider, *Dolomedes triton*, foil frog attacks. *Journal of Insect Science*, 3, 19-25.
- Tinbergen, N. 1951. *The Study of Instinct*. New York: Oxford University Press.
- Tso, I. M., Tai, P. L., Ku, T. H., Kuo, C. H. and Yang, E. C. 2002. Colour-associated foraging success and population genetic structure in a sit-and-wait predator *Nephila maculata* (Araneae: Tetragnathidae). *Animal Behaviour*, 63, 175-182.
- Tso, I. M., Lin, C. W. and Yang, E. C. 2004. Colourful orb-weaving spiders through a bee's eyes. *Journal of Experimental Biology*, 207, 2631-2637.



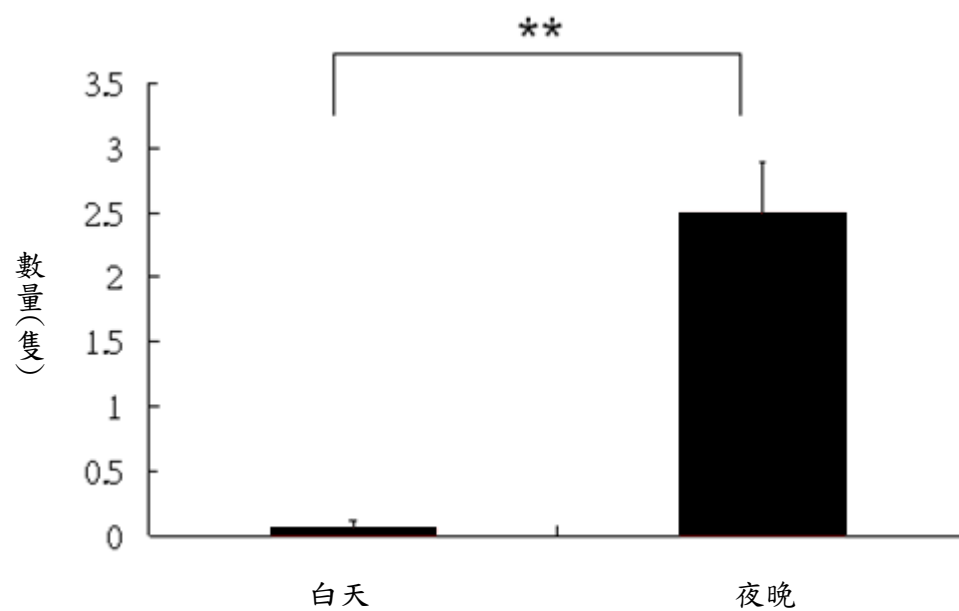
圖一、實驗物種—溪狡蛛。(a)雄蛛；(b)幼蛛；(c)雌蛛。



圖二、野外操控實驗所使用的模型蜘蛛。(a)白斑存在組；(b)白斑移除組。

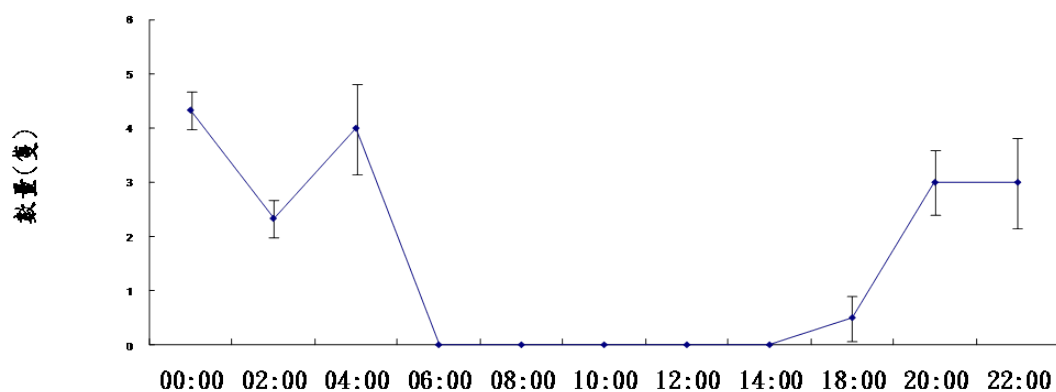


圖三、室內操控實驗所使用的拍攝場景。

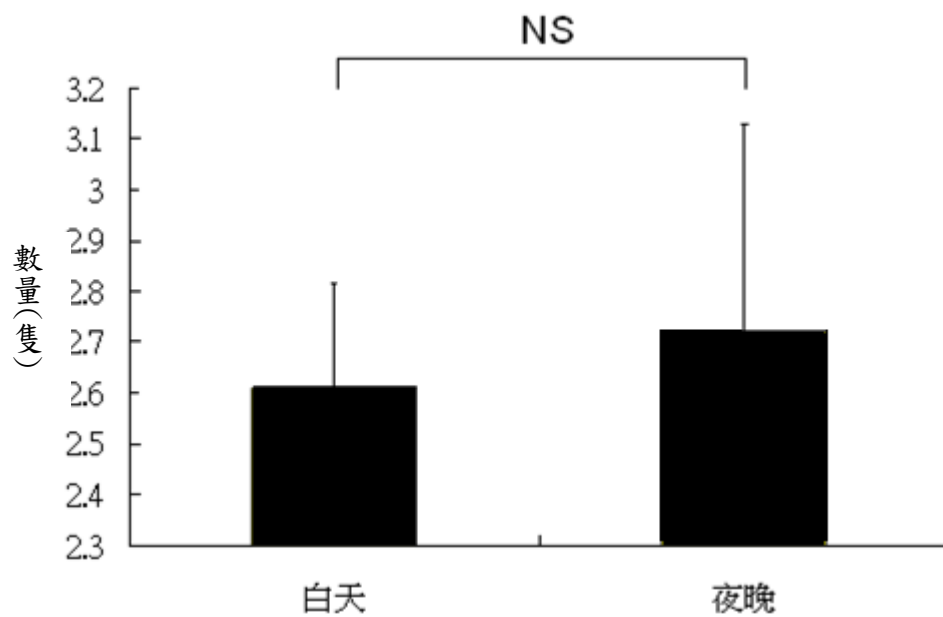


圖四、成熟雌性溪狻蛛的夜晚與白天出現數量之平均值與標準差。

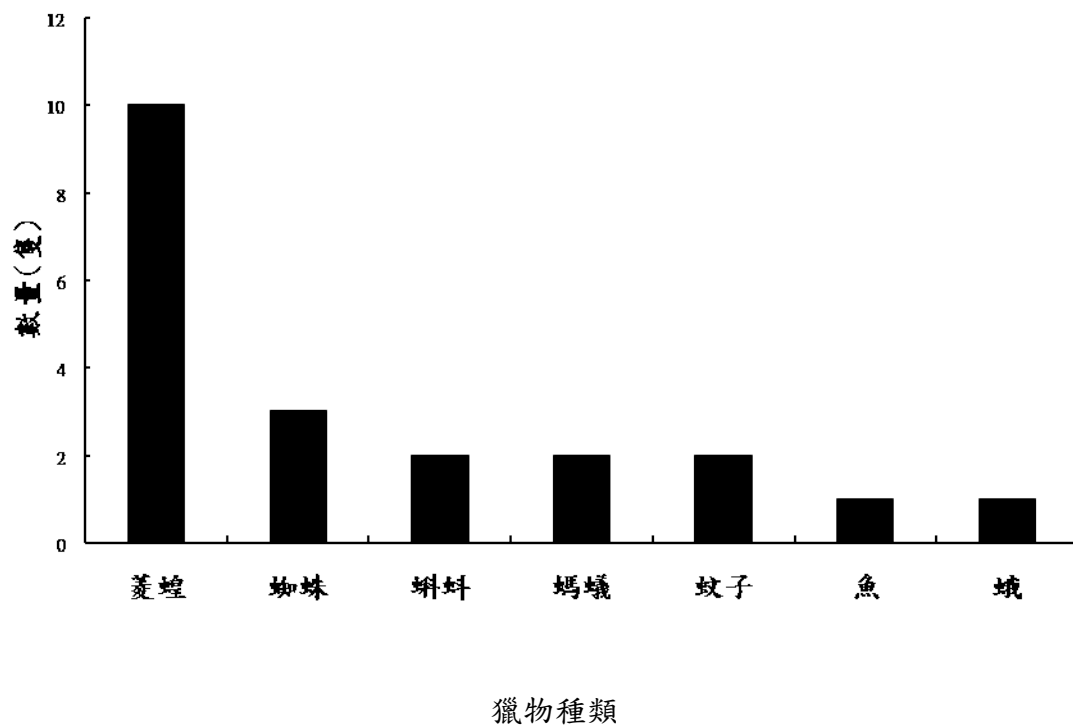
(** : $p < 0.01$)



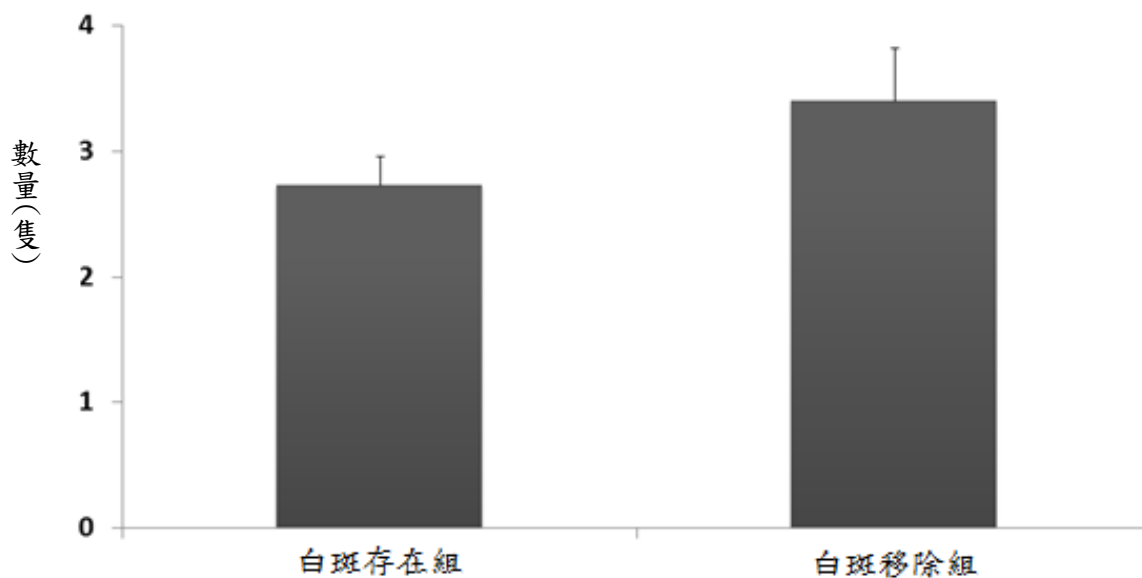
圖五、蛟龍溪樣區成熟雌性溪狡蚱在一天當中的數量變化。



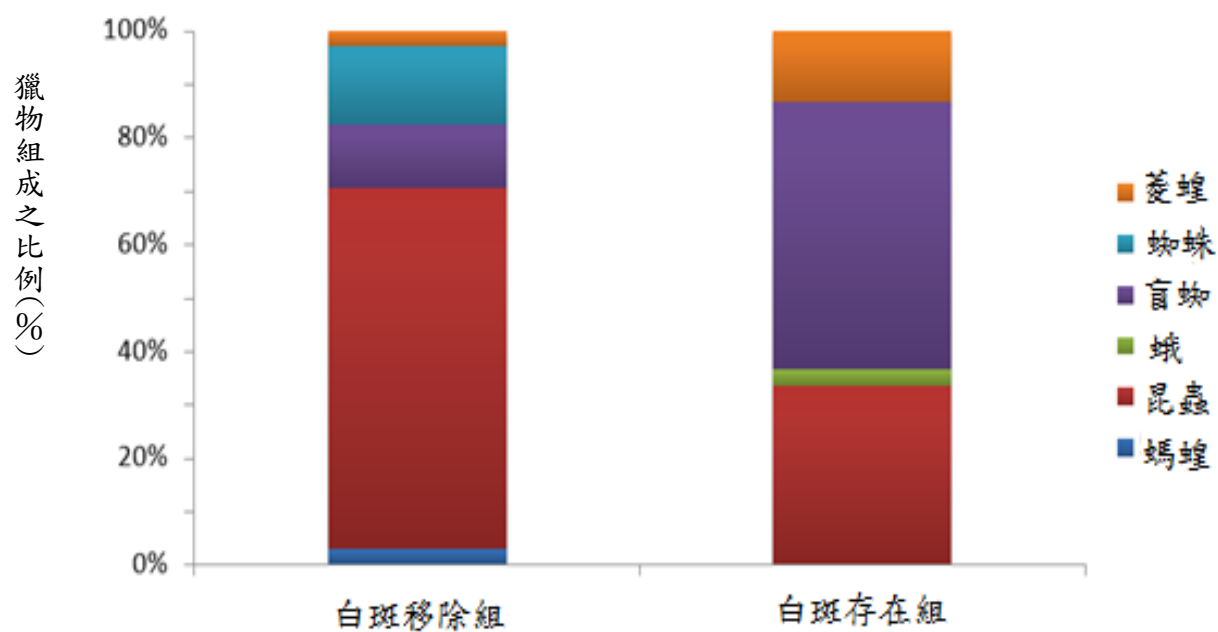
圖六、蛟龍溪樣區溪狡蚱幼蚱的夜晚與白天出現數量之平均值與標準差。
(NS：無顯著差異)



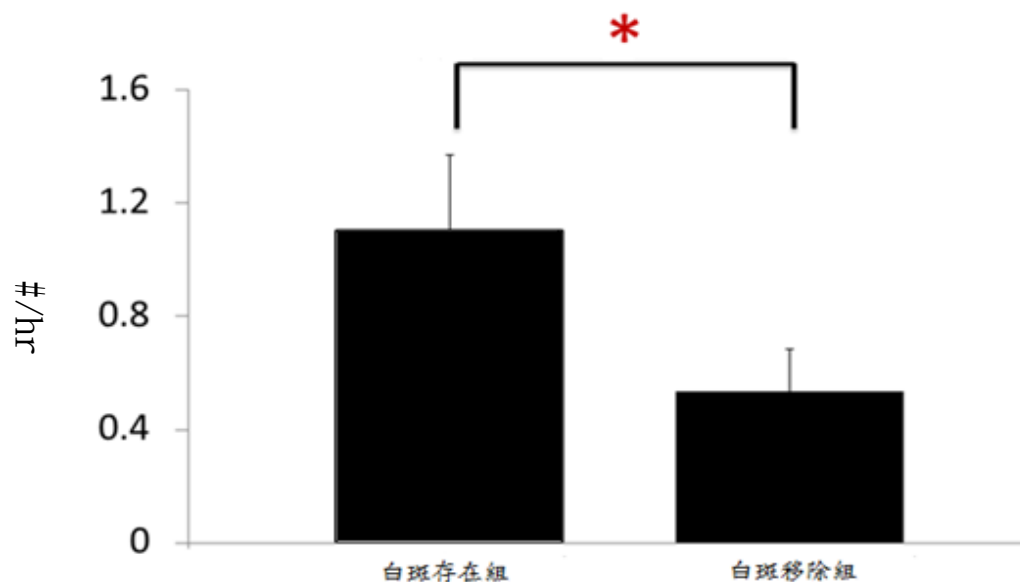
圖七、四角林樣區溪狡蜘蛛夜間獵物的組成及數量。



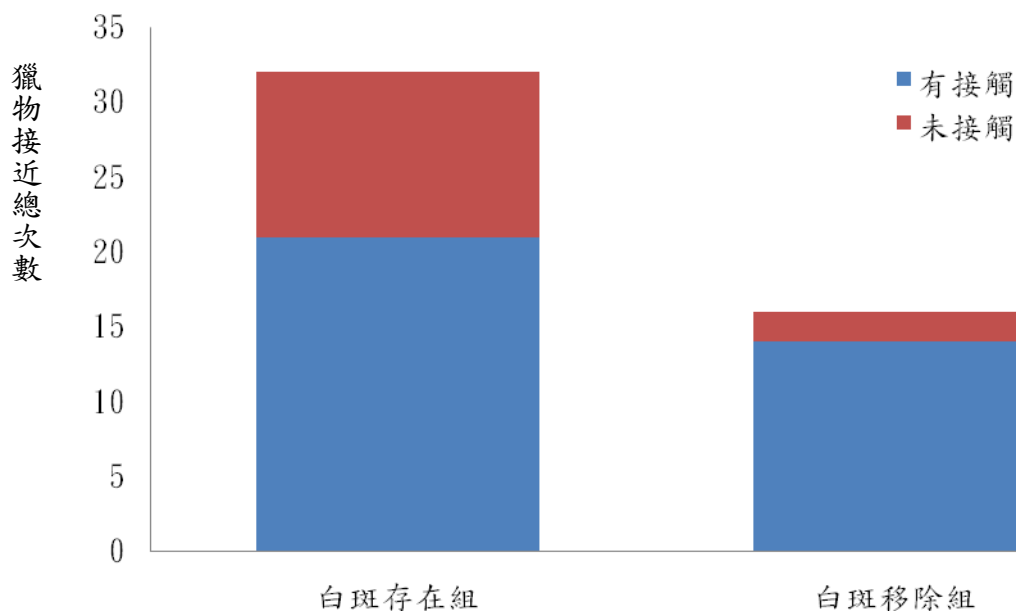
圖八、不同處理組溪狡蜘蛛模型獵物吸引率平均值與標準差。



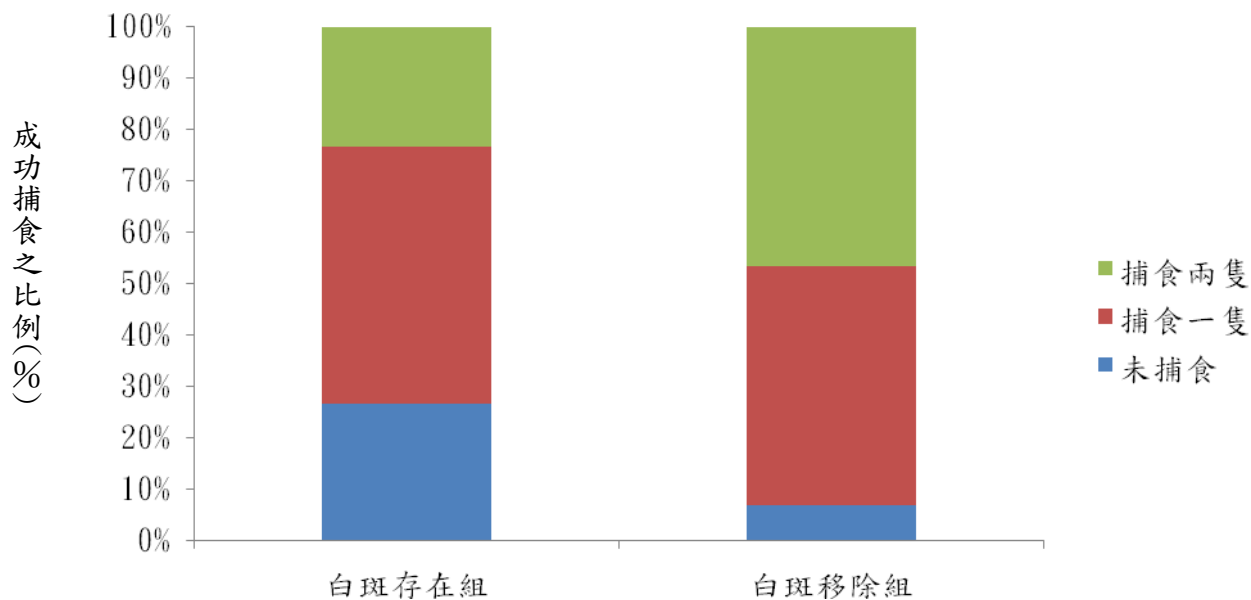
圖九、不同處理組溪狹蝸模型所吸引之獵物組成之百分比。



圖十、不同處理組溪狹蝸之獵物吸引率與標準差。(*: $p < 0.05$)



圖十一、不同處理組溪狡蜘蛛是否接觸蜘蛛之次數。



圖十二、不同溪狡蜘蛛三種處理組捕食情況的組成百分比。

不同棲地螃蟹觸角腺的差異

Comparisons of the antennal glands in different crabs

曾廣瑜、蔡家麟、王嘉瑋、林惠真

東海大學生命科學系 演化生理實驗室

摘要

螃蟹的排泄器官—觸角腺主要是由兩種結構：終末囊(coelomosac)以及迷路(labyrinth)所組成。終末囊在結構及功能上與哺乳類動物腎臟中腎小球的足細胞(podocytes)類似，能夠過濾體液及產生尿液，而迷路細胞則具有再吸收的功能。我們想探討螃蟹在不同棲地上，其觸角腺中終末囊及迷路在分佈及形態上是否會有不同或是其他特化組織的出現。本次實驗以石臘切片觀察並描述觸角腺的結構。偏陸生的螃蟹選擇方蟹科的臺灣厚蟹(*Helice formosensis*)以及沙蟹科的網紋招潮蟹(*Uca arcuata*)，海水蟹選擇饅頭蟹科的紅點黎明蟹(*Matuta lunaris*)

，淡水蟹選擇拉氏清溪蟹(*Candidiopotamon rathbunae*)。結果發現，偏陸生螃蟹的觸角腺，其迷路分佈較緊密，偏水生各物種則具有分佈較廣的血腔及終末囊。總結以上結果，螃蟹觸角腺在不同物種及棲地下，結構是有所差異的，但結構上的差異是否會影響到觸角腺功能的不同，還需要後續的實驗來探討。另外，環境水量相對於環境鹽度對觸角腺組織形態的影響可能較大，但亦需要更多物種的研究來證實。

前言

螃蟹可以生存在許多不同的棲地：從海生、潮間帶到淡水，甚至能在陸地上生存。在這些棲地中的環境因子，如溫度、環境水量、含氧量及滲透壓等，都不盡相同。而這些不同因子會對螃蟹的生理作用，如氣體交換、體液離子調節機制以及水份的利用等造成影響(Freire *et al.*, 2008; Charmentier *et al.*, 2009)。鰓是螃蟹主要維持體液離子組成恆定以及氣體交換的器官，而螃蟹的排泄器官—觸角腺，則與調節體液體積有關(Charmentier

et al., 2009)。觸角腺主要是由兩種結構：終末囊(coelomosac)以及迷路(labyrinth)所組成。甲殼綱螯蝦觸角腺終末囊在結構及功能上，與哺乳類動物腎臟中腎小球的足細胞(podocytes)類似，能夠過濾體液及產生尿液；而迷路則具有再吸收的功能(Peterson and Loizi, 1987)。螃蟹尿液產生途徑，是血腔中體液經終末囊過濾產生初級尿液後，並由迷路進行再吸收的功能，最後由腎孔將尿液排除(Schmidt-Nelson, *et al.*, 1968)。由實驗室前人對痕掌沙蟹觸角腺研究也指出相同的結果(Tsai, unpublished data

)。另外，不同棲地及物種的脊椎動物，其腎元結構有差異的存在，如近遠曲小管的長短、亨氏管的有無等(Willmer *et al.*, 2000)。那是否脊椎動物腎臟功能相似的螃蟹觸角腺，會因棲地的不同，而在組織中終末囊及迷路在分佈及形態上會有改變，或是有組織特化的現象？因此，本實驗以石蠟切片來進行生存於環境鹽度不同(海生及淡水生)以及離水程度不同(偏陸生及偏水生)的螃蟹之觸角腺結構觀察。

材料方法

物種

實驗動物採集自臺中縣清水鎮高美濕地及臺中縣四角林溪所取得。高美溼地具有相當多不同種類的棲地，如沙地、泥灘地、石礫堆、潮溪區、紅樹林及草澤區等。自高潮線的泥灘地中採集兩物種：方蟹科(Grapsidae)的臺灣厚蟹(*Helice formosensis*)及沙蟹科(Ocypodidae)的網紋招潮蟹(*Uca arcuata*)作為偏陸生物種，從潮溪區中採集饅頭蟹科(Calappidae)的紅點黎明蟹(*Matuta lunaris*)作為海生物種，而淡水物種則是四角林溪中溪蟹科(Potamidae)的拉氏清溪蟹(*Candidiopotamon rathbunae*)。

螃蟹體液滲透壓測定

物種取得後，利用針筒由螃蟹步足基部抽取體液，接著使用 5500 vapor pressure osmometer 進行體液滲透壓的測定，所測出的單位為 mOsm/ kg。

石蠟切片

在解剖時，沿背甲後方邊緣剪開，並翻開背甲，而觸角腺大略在眼柄的基部。

組織取出後，直接放入固定液(G₅，pH=7.4，利用蔗糖，依個體調整滲透壓)中，在 4°C 下固定 15~19 小時，並以震盪器增加組織固定的效果。

組織固定 15~19 小時後，每隔 10 分鐘以緩衝液(washing buffer: 0.1 M PB{0.1M NaH₂PO₄ · H₂O + 0.1M Na₂HPO₄ · 2H₂O, pH=7.2 } + 2.5x PBS{0.4M NaCl + 0.005M KCl + 0.02M Na₂HPO₄ · 2H₂O + 0.005M KH₂PO₄, pH=7.4 } + ddH₂O，利用蔗糖，依個體調整滲透壓)清洗組織，共 5 次。再以不同濃度的酒精進行組織脫水(70 %、80 %、90 %、95 %、100 % *2)，每隔 15 分鐘更換至下一個濃度。接著依序以 100%酒精:100%二甲苯兩者比例為 3:1、1:1、1:3 的溶液中進行置換，每個步驟為 25 分鐘。再利用 100 % 二甲苯置換兩次，每次 25 分鐘。最後以石蠟進行滲蠟，12 小時後將組織埋入蠟塊中。蠟塊以石蠟切片機(Leica RM 2125RT)進行組織縱切切片，厚度為 5µm，並以 HE(Hematoxylin-Eosin)染色法染色。蘇木紫(Hematoxylin)可以使細胞核呈現紫色，伊紅(Eosin)可使細胞質呈現粉紅色。最後以 100 % Permount 封片。

組織觀察

使用光學顯微鏡觀察終末囊及迷路在組織中的分佈，以及終末囊及血管在組織中走向。在組織走向的部份，利用 powerpoint 繪製組織中終末囊及血管的位置，作出示意圖，以進行組織終末囊及血管走向的分析。在終末囊及血管結構面積部份，我們利用 image-J 量化組織中終末囊及血管結構面積以及組織總面積，並以此計算出終末囊及血管結構在組

織中所佔的比例。每種物種觸角腺組織觀察約 3~4 隻，但進行量化的重複數都各為 1。

巨大終末囊及血腔結構

偏陸生物種在組織中央具偏水生物種沒有的巨大終末囊及血腔結構，我們特別量化此結構。由於在組織各切層中的巨大終末囊及血腔大小不同，我們將量化的結果分成前、中及後段。前段與後段不是組織的絕對位置，而是收切片時的先後順序。而中段為組織中央的位置。

結果

觸角腺內部組織分佈

臺灣厚蟹觸角腺的結構觀察

臺灣厚蟹觸角腺組織內部大略可分成兩區：第一區及第二區。第一區大約是從組織的中段一直到尾端，為主要血腔及血管所在的區域。此區具有一個或數個巨大終末囊(coelomosac)及血腔所組成的結構，約佔組織總面積的 4.00%~8.50%(表一)。且組織中大多數的終末囊也集中在中央終末囊與血腔結構的周圍。迷路(labyrinth)大多圍繞在終末囊外圍，沒有聚集的現象。而在第二區的部份，有許多非包覆在終末囊外圍的迷路密集分佈，且此區終末囊的形態較小，明顯與第一區的組織分佈不相同。另外，組織中終末囊所佔的比例約為 11.1%，小於偏水生物種拉氏清溪蟹(18.3%)及紅點黎明蟹(20.9%)(表二)。

網紋招潮蟹觸角腺的結構觀察

網紋招潮蟹觸角腺在組織右側上方一小部份組織較整體組織其他區域有較密集的情形。組織的中間部份，有一個或

數個較大的終末囊，依組織切片層的不同，約佔組織整體的 2.80%~8.40%，且也是往兩側有逐漸縮小的趨勢(表一)。主要終末囊較集中於組織中央。迷路除了在終末囊外圍，也有單獨存在的現象。另外，組織中終末囊所佔的比例約 10.8%，小於偏水生物種拉氏清溪蟹(18.3%)及紅點黎明蟹(20.9%)(表二)。

紅點黎明蟹觸角腺的結構觀察

紅點黎明蟹觸角腺中終末囊均勻分佈在組織內，在組織所佔的比例約 20.9%，大於偏陸生物種臺灣厚蟹(11.1%)及網紋招潮蟹(10.8%)(表二)。觸角腺中央，也有較大的終末囊出現。在觸角腺外圍，一部份是由較小的終末囊所填充；另一部份是由在組織內層中，較大的終末囊延伸到組織的外圍所組成。組織中迷路細胞彼此纏繞的現象不多，大多是一個終末囊與外圍的迷路存在。

拉氏清溪蟹觸角腺的結構觀察

拉氏清溪蟹觸角腺的結構與紅點黎明蟹觸角腺結構相當類似，終末囊均勻分佈在組織內，且在組織中所佔的比例約 18.3%。大於偏陸生物種臺灣厚蟹(11.1%)及網紋招潮蟹(10.8%)(表二)。迷路大多出現在終末囊外圍，少有獨立出現或是聚集的情形。

觸角腺內部終末囊及血腔走向

偏陸生物種的主要血管大略是從觸角腺的中間部份進入組織。而血管進入後所形成的較大終末囊與血腔的結構，往組織的左、右兩側有逐漸縮小且分散的情形。另外，終末囊也大多集中在組織中間的位置。

偏水生物種組織終末囊分佈均勻，且所佔的比例(拉氏清溪蟹，18.3%、紅點黎明蟹，20.9%)也高於偏陸生物種(臺灣厚蟹，11.1%、網紋招潮蟹 10.8%)。但我們沒有觀察到血管進入觸角腺的位置，以及如陸生物種組織中央的較大終末囊及血腔的結構。

討論

終末囊分佈現象

偏陸生物種終末囊大多集中在組織巨大終末囊及血腔結構的周圍。組織其他部份的終末囊形態較小，數量也較少。此巨大終末囊及血腔結構在器官中央時，近乎貫穿整個組織，且成樹枝狀往前後左右沿伸。偏水生物種的終末囊均勻的分佈在觸角腺中，雖然組織中間部份有較大的終末囊，但並沒有貫穿整個組織。而在紅點黎明蟹觸角腺中，組織內外圍的終末囊形態也有所差異，外圍終末囊形態較小，而內部的終末囊較大。在拉氏清溪蟹觸角腺中也有此現象出現。在偏陸生及偏水生物種之間終末囊的分佈是有所差異的。由於終末囊能夠進行體液過率的功能，所以偏水生物種分佈較廣的終末囊可能可以增加過率體液的速率。但由於主要影響到體液過濾速率的因素，是生物體本身的血壓，以及體液與足細胞之間的滲透壓差，所以終末囊的分佈是否會影響到體液過液速率，還需要測量功能性的實驗，如 PEG (polyethyleneglycol) 的排除 (Holliday and Miller, 1984) 等，以驗證終末囊形態的差異與體液過濾速率間的關係。

迷路分佈現象

偏陸生物種觸角腺中的迷路除了包

圍在終末囊外側，亦有單獨出現的情形。臺灣厚蟹觸角腺的第二區，迷路分佈緊密，且並非全部都環繞在終末囊外圍；而網紋招潮蟹除了中央終末囊及血腔結構外，也有許多單獨出現的迷路分佈在組織中。相反的，偏水生物種的迷路幾乎都環繞在終末囊外，只有小部份單獨出現的迷路，是兩終末囊中的連結。迷路具有再吸收的功能，所以迷路較密集的偏陸生物種觸角腺，我們猜測，也許具有較好的再吸收能力，或是能夠增加水份的回收。但這樣的想法還需更進一步進行功能上的探討來支持。

環境鹽度及含水量

兩偏水生物種都能長時間接觸到水，但環境水中的鹽度差異卻是相當的明顯。海水滲透壓約 1000 mOsm，淡水滲透壓約 10 - 20 mOsm。在組織內迷路及終末囊分佈及組織走向的觀察中，兩偏水生物種之間結構並沒有太大的差異，反而是水生物種及偏陸生物種間有明顯的差異。所以我們推測，環境水量相對於環境鹽度對觸角腺組織形態的影響可能較大，但亦需要更多物種的研究來證實。

人為誤差及量化

由於在取觸角腺或是固定等人為因素，而導致組織有部份破損情形。我們利用組織覆蓋度、終末囊所佔比例等進行組織量化，但無可避免有誤差的存在。因此，我們沒辦法將量化的結果進行統計分析，但組織中的分佈及走向等，並沒有因人為失誤而有所改變。

未來展望

我們將進行更多不同棲地及物種觸

角腺結構的比較，並且進行螃蟹觸角腺功能的測定，如體液過濾速率、離子調結蛋白質在鹽度轉換下的活性差異及水通道蛋白在觸角腺的位置及含量等，以支持在結構上所觀察的結果。

致謝

感謝林惠真老師以及實驗室學長姐的指導及帶領，讓我們無論是在學習或是實驗碰到障礙時，能夠找到方向及目標，並努力去克服進而完成。也感謝大家的督促，讓我們了解及體會到時間管理的重要性。另外，感謝夥伴及朋友們的指教，及幫助我們讓野外的採集更加順利。謝謝大家。

參考文獻

Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Towle, D., 2009. Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. In: Evans, D.H. (Ed.), Osmotic and ionic regulation: cells and animals. CRC Press, Boca Raton, pp. 165-230.

Freire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C., 2008. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 272-304.

Peterson, D.R., Loizzi, R.F., 1987. Regional cytology and cytochemistry of the crayfish kidney tubule. *J. Morph.* 141, 133-146.

Schmidt-Nielsen, B., Gertz, K. H., Davis, L. E., 1968. Excretion and ultrastructure of the antennal gland of the fiddler crab *Uca mordax*. *J. Morph.* 125, 473-496.

Willmer, P., Stone, G., Johnston, I., 2005. Environmental physiology of animals. Blackwell Publishing, Malden, pp. 97-98.

附表

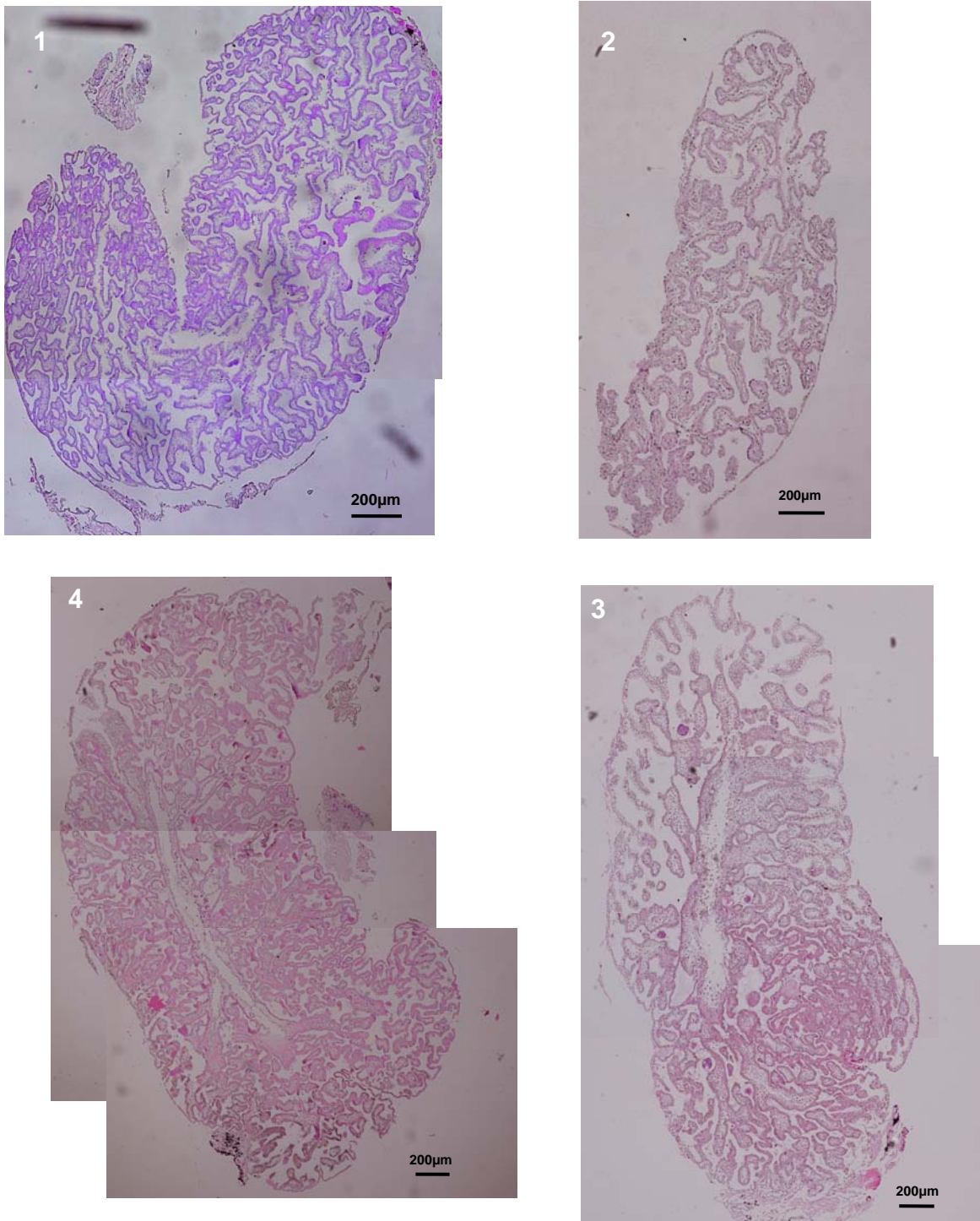
表一、螃蟹觸角腺中巨大終末囊及血腔結構在觸角腺中所佔的比例。

物種	組織中巨大終末囊及血腔結構所佔比例		
	前段	中段	後段
臺灣厚蟹(<i>Helice formosensis</i>)	4.00 %	8.50 %	4.80 %
網紋招潮蟹(<i>Uca arcuata</i>)	4.17 %	8.40 %	4.80 %

表二、螃蟹觸角腺終末囊及血腔在觸角腺中所佔的比例。

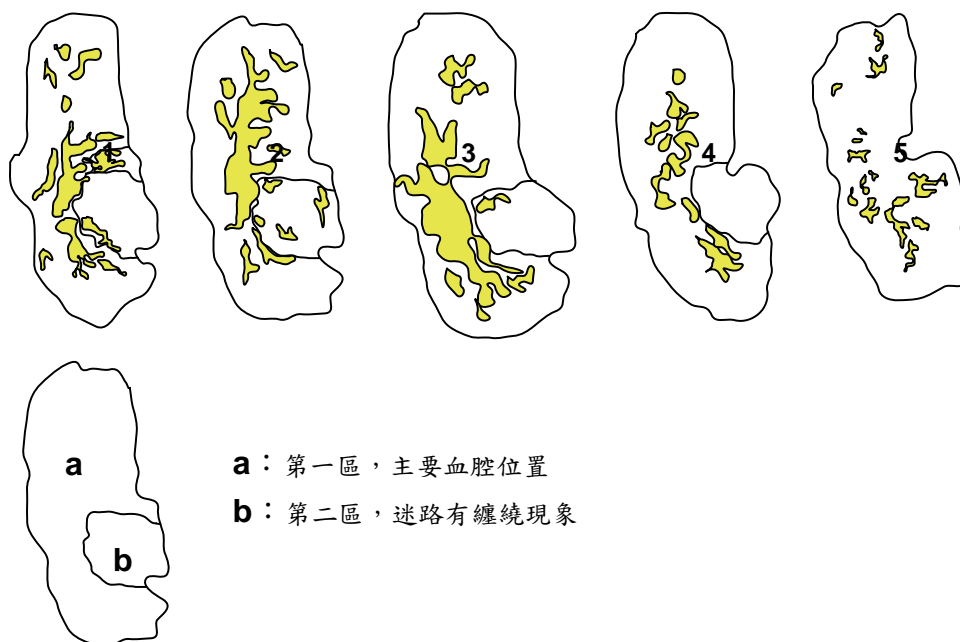
物種	組織中終末囊及血腔比例
拉氏清溪蟹(<i>Candidiopotamon rathbunae</i>)	18.3 %
紅點黎明蟹(<i>Matuta lunaris</i>)	20.9 %
網紋招潮蟹(<i>Uca arcuata</i>)	10.8 %
臺灣厚蟹(<i>Helice formosensis</i>)	11.1 %

附圖

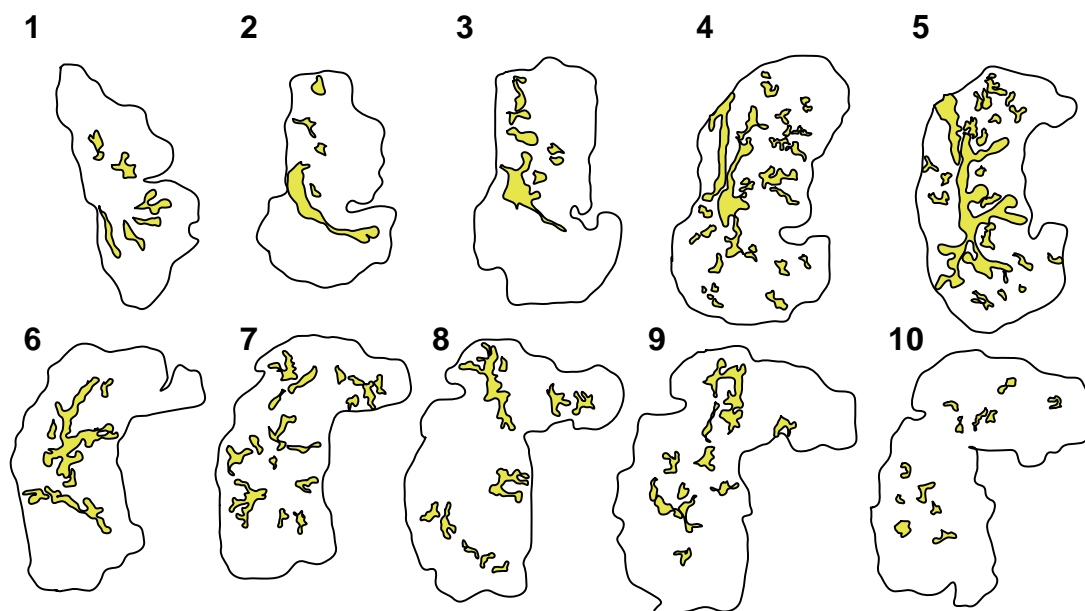


圖一、螃蟹觸角腺切片圖。

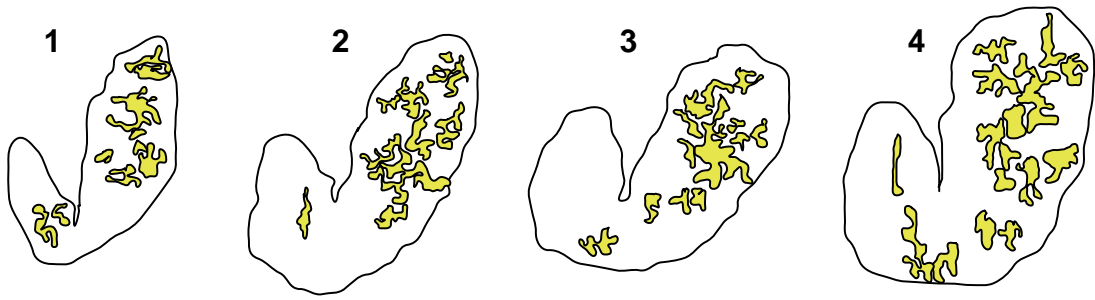
1：紅點黎明蟹觸角腺切片圖(海生物種)。2：拉氏清溪蟹觸角腺切片圖(淡水物種)。3：臺灣厚蟹觸角腺切片圖(偏陸生，海水物種)。4：網紋招潮蟹觸角腺切片圖(偏陸生，海水物種)。偏陸生物種終末囊大多集中在組織巨大終末囊及血管結構的周圍，偏水生物種的終末囊均勻的分佈在觸角腺中。而偏陸生物種迷路有明顯聚集的現象。



圖二、臺灣厚蟹(偏陸生，海水)觸角腺終末囊及血腔走向圖。我們將臺灣厚蟹觸角腺分成主要血腔位置，以及迷路有纏繞現象兩區。1-5 為同一觸角腺中不同切層終末囊及血腔的分佈情形。黃色部份為終末囊及血腔結構。組織中央具巨大終末囊及血腔結構。此結構往組織左右兩側有縮小的情形。



圖三、網紋招潮蟹(偏陸生，海水)觸角腺終末囊及血腔走向圖。1-10 為同一觸角腺中不同切層終末囊及血腔的分佈情形。黃色部份為終末囊及血腔結構。網紋招潮蟹觸角腺組織中央具有巨大終末囊及血腔結構。此結構往組織左右兩側有縮小的情形。



圖四、紅點黎明蟹(海生蟹)終末囊及血腔走向圖。1-4 為同一觸角腺中不同切層終末囊及血腔的分佈情形。黃色部份為終末囊及血腔結構。終末囊及血腔結構均勻的散佈在組織中。



圖五、拉氏清溪蟹(淡水蟹)觸角腺終末囊及血腔走向圖。1-6 為同一觸角腺中不同切層終末囊及血腔的分佈情形。黃色部份為終末囊及血腔結構。終末囊及血腔結構均勻的散佈在組織中。