

農業部林業及自然保育署

114 年度林業發展計畫 執行成果報告

計畫名稱：三種臺灣瀕危蝴蝶－寬尾鳳蝶、大紫蛺蝶與珠
光鳳蝶之保育基因體學

(第 1 年/全程 2 年)

英文名稱：Conservation genomics of three endangered
butterflies (*Papilio maraho*, *Sasakia charonda*,
and *Troides magellanus sonani*) in Taiwan

計畫編號：114 林發-09.3-保-32

全程計畫期間：自 114 年 1 月 1 日至 115 年 6 月 30 日

本年計畫期間：自 114 年 1 月 1 日至 114 年 12 月 31 日

計畫聯絡人：吳立偉

執行機關：東海大學

摘要

近年來隨著定序技術的發展，透過基因體的資訊可以解決瀕危物種樣本不易取得的問題，更可以了解基因體層級遺傳多樣性與適應生存的情形。並且在基於大數據的資料下，更可以協助訂定清楚的保育行動。本計畫主要針對三種瀕危蝶種－寬尾鳳蝶、大紫蛺蝶以及珠光鳳蝶進行保育基因體學的分析。透過基因體的組裝，以及每個樣本的重定序、回貼的方法獲得 SNPs 以解析其族群遺傳資訊，了解這些瀕危蝶種生存上是否有近親雜交係數較高或有不好的基因的累積。在寬尾鳳蝶的保育基因體分析結果，顯示臺灣寬尾鳳蝶在過去 200-400 年低有歷經瓶頸效應，現在的族群是已回穩與成長的族群。雖然族群呈現高度的近親雜交關係，但在檢測有害突變累積時明顯較中華寬尾鳳蝶低，因此認為目前寬尾鳳蝶族群生存狀況相對健康，後續應致力於增加其棲地與族群數量等相關保育行動。另外這此計畫，我們亦完成大紫蛺蝶與黃裳鳳蝶的基因體組裝，初步進行 5-6 個樣本的回貼方法確認組裝情形良好，將能提供後續大紫蛺蝶與珠光鳳蝶的保育基因體學研究。

關鍵字：寬尾鳳蝶屬、博物館基因體學、保育行動、保育類昆蟲、次世代定序

Abstract

Recent advances in NGS technologies have greatly expanded the application of genomic approaches in conservation biology, particularly for endangered species for which sampling is often limited. Genome-scale data not only enable robust assessments of genetic diversity and adaptive potential, but also provide a powerful foundation for evidence-based conservation planning under large-scale datasets. In this project, we conducted conservation genomic analyses on three endangered butterfly species in Taiwan: the Broad-tailed Swallowtail (*Papilio maraho*), the Great Purple Emperor (*Sasakia charonda*), and the Magellan Birdwing (*Troides magellanus*). We generated high-quality genome assemblies and performed whole-genome resequencing followed by read mapping to identify genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs). These data were used to infer population genetic structure and to evaluate whether contemporary populations exhibit elevated levels of inbreeding or an accumulation of deleterious mutations that could threaten long-term persistence. Our analyses of *P. maraho* indicate that the Taiwanese population experienced a historical bottleneck approximately 200–400 years ago, followed by demographic recovery and recent population growth. Although the population currently shows a high degree of inbreeding, the level of deleterious mutation accumulation is markedly lower than that observed in the closely related *P. elwesi*. These results suggest that the present population of *P. maraho* remains in relatively good condition. Accordingly, future conservation efforts should prioritize habitat expansion and population enhancement to further improve long-term viability. In addition, we also successfully completed genome assemblies for *S. charonda* and *T. aeacus*. Preliminary resequencing and read-mapping analyses based on five to six individuals per species confirmed the high quality of these assemblies. These genomic resources will provide a critical foundation for subsequent conservation genomic studies of the Great Purple Emperor and the Magellan Birdwing.

Keywords: Genus *Agehana*, museomics, conservation actions, protected insects, next-generation sequencing

一、前言

基因體保育遺傳研究的重要性

保育遺傳學 (conservation genetics) 的持續發展已為我們提供了許多方法來評估族群規模、遺傳多樣性以及建構族群的演化歷史。不僅提升辨識演化顯著單元 (evolutionary significant unit, ESU)，亦提供評估棲地破碎化帶來的效應等等議題。傳統的保育遺傳研究針對中性的分子標記進行 PCR 及定序，檢測該片段在族群中的變異位點以進行各項分析。然而傳統方式所選用的分子標記圈限於少數幾個基因的變異資訊，經常無法提供足夠的解析力，因而低估族群的遺傳多樣性，進而無法反映族群結構與歷史。隨著定序技術的進步，進行基因體定序的費用大大降低，且分析基因體的方法日趨成熟。使用基因體資料的好處，除了可以獲得覆蓋全基因組的變異範圍，能更精準地評估族群內及族群間的遺傳多樣性。此外，獲取染色體層級的變異資訊，透過比對分析，得以獲得染色體重組與連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) 等訊息，進而推估族群歷史動態、近代有效族群數量 (effective population size, N_e) 以及近親繁殖係數 (inbreeding index)。此外，透過遺傳資訊與環境之間的關聯性，協助我們辨識出受特定篩選的區域，而進一步評估族群適存度。例如，Li et al. (2022) 重新定序了 11 隻黑面琵鷺的全基因體並回推其有效族群數量變動及近親繁殖程度，顯示黑面琵鷺在 1940 年代經歷的嚴峻的瓶頸效應，可能與殺蟲劑 DDT 的污染有關。同時該研究也顯示黑面琵鷺經歷瓶頸效應後呈現了高度近親繁殖，進而產生更多非同義突變的積累，可能潛在累積更多有害突變。另外，Dussex et al. (2021) 重新定序 49 隻紐西蘭鴉鵂的全基因體，比較紐西蘭南島與南端的斯特維特島 (Stewart island) 的鴉鵂族群在族群數量以及有害突變積累的差異。結果顯示儘管特維特島上的族群規模較小、有更高的近親繁殖程度，但高度近親繁殖反而進一步透過純化選擇 (negative selection) 的作用將有害的變異排除，相比其南島的族群可能具有更高的適存度。整體而言，全基因體資料可為保育遺傳學提供更完整

族群現況評估，有助於進一步執行、規劃或修正當前的保育行動。

島嶼物種的遺傳特徵及保育關注

從文獻中可知 (Frankham, 1997, 1998; Van Noordwijk & Scharloo, 1981; Wilfert et al., 2007)，島嶼與大陸的同種或近緣種族群遺傳相比較時，通常具有以幾個下特徵：(1) 島嶼面積與資源相對較缺乏，所能承載的有效族群數量較小；(2) 島嶼族群通常起源於較少個體數量的創始者，受到瓶頸效應 (bottleneck effect) 或創始者效應 (founder effect) 的影響，具有較低的遺傳多樣性；(3) 島嶼的有效族群量小，族群間個體的近親繁殖程度通常較高；(4) 較高的近親繁殖程度也通常導致族群適存度降低 (inbreeding depression)。基於上述特徵，島嶼物種更容易因人為活動、自然災害、氣候變遷的影響，造成物種生存受到威脅。

基因體分析原理及優勢

保育基因體學除了提供大量的遺傳訊息以供族群適存度的各種資訊分析與評估。加上近年來定序技術的發展，使得全基因體的定序的費用降至可應用實行程度。對於目前正在執行瀕危物種的族群遺傳分析訊息，提供重要且全面的管道。尤其瀕危物種的樣本一般較少且取得不易，而次世代定序平台則不受限於樣本老舊的影響，可從博物館樣本收提取 DNA 進行遺傳資訊分析。一般而言，基因體分析原理為建構一個參考基因體，再將個體樣本進行重定序 (resequencing) 的方式將序列資訊對應 (mapping) 至基因體位置。透過不同物種之間的序列變異分析，了解物種的遺傳多樣性、族群結構、歷史族群變動以及雜交情形。

三種保育類蝴蝶執行情形與面對挑戰

臺灣寬尾鳳蝶 (*Papilio maraho*) 從過去的研究成果，了解為獨立種並且與中華寬尾鳳蝶互為姊妹 (Lu et al., 2009)。雖然僅利用 *cox1* 基因所提供分群證據並不高 (Lu et al., 2009)，但後續翅紋形質分析與粒線體基因體網狀親緣關係支持為 2 種的結果 (Yeh et al., 2025)。臺灣寬尾鳳蝶目前在太平山調查有穩定的族群棲息，每年 5-7 月在鳩之澤溫泉旁溪邊經常有成蝶停棲吸水訪花。除此之外，北橫、觀霧、尖石、花蓮、台中和平鄉有零星的發現紀錄。但目前資料顯示這些地點的族群關連性為何，仍有待釐清。另外，島內的寬尾鳳蝶族群遺傳多樣性及近親雜交情形仍有待建立。

臺灣的大紫蛺蝶 (*Sasakia charonda*) 受到人為活動等棲息開發，其族群生存範圍已退縮至臺灣北部山區，以新竹至北橫一帶為主。目前的研究資料顯示，臺灣族群與其它諸如日本、韓國、浙江、廣東、越南等地的族群明顯不同。利用粒線體基因體序列可以明確檢測樣本是否來自臺灣或其它地方 (Yeh et al., 2025)。目前粒線體資料顯示臺灣的大紫蛺蝶族群族群變異度高，但是囿限於母系遺傳的粒線體資訊，對於臺灣的族群是否有明確的族群結構、近親雜交指數、有效族群量估算以及是否有不好的基因累積，尚待加入核 DNA 的資訊以便釐清。然而目前野外數量少不易發現，而過去博物館收藏的樣本卻有足夠個體以進行基因體的重定序分析，將有利於評估臺灣大紫蛺蝶的族群遺傳情形。

蘭嶼島上的珠光鳳蝶 (*Troides magellanus sonani*) 在我國境內僅分布於蘭嶼。過去的保育行動大多於島上復植港口馬兜鈴以維持島上珠光鳳蝶幼生期所需的寄主植物資源量。2022 至 2023 年時有發現人為引入至臺灣北部的個體，經粒線體分析其來源為蘭嶼的族群 (Chu et al., 2025)。島上的族群目前有效族群量僅七百多隻，並且近親雜交係數為 0.5 左右，顯示大部分的個體有高比例的近親繁殖的後代 (徐珮慈，2023)。2023 年底歷經小犬颱風的影響，2024 年野外觀測數量僅有個位數。對於蘭嶼珠光鳳蝶的族群是否長期為高比例的近親雜交結果，還

是今年的小犬颱風造成族群大幅縮小，應提供族群避難所以及更清楚的基因體變異度資訊以釐清當前珠光鳳蝶族群生存的風險。

二、計畫目的

本計畫為執行三種瀕危物種－臺灣寬尾鳳蝶、大紫蛺蝶及珠光鳳蝶的基因體層級的遺傳資訊收集及分析，目的為透過基因體的資訊分析族群有效族群量、過去族群變動情形以及是否有累積不好的遺傳變異。藉由這些族群遺傳訊息，提供保育行動計畫的科學證據。

針對此三種瀕危物種的研究工作，將分 2 年進行：

- (1) 114 年擬利用重定序資料，進行臺灣寬尾鳳蝶的保育遺傳研究，以分析族群結構、族群變異度、近親雜交情形以及是否有不良變異累積。
- (2) 114 年擬利用分子定序技術，初步組裝兩種保育類蝴蝶的基因體，以供後續重定序使用的參考資料，以利保育遺傳分析。
- (3) 114 年擬初步利用重定序資料，進行大紫蛺蝶、珠光鳳蝶的保育基因體初步分析，了解基因體與重定序資料之間是否吻合。
- (4) 115 年擬利用重定序資料，進行大紫蛺蝶、珠光鳳蝶的保育遺傳研究，以分析族群結構、族群變異度、近親雜交情形以及是否有不良變異累積。
- (5) 115 年擬針對三種保育類基因體遺傳分析後，對於現況保育行動的具體建議。

三、實施方法與步驟

(一) 寬尾鳳蝶基因體重定序與保育遺傳研究

1. 樣本採集與定序

臺灣寬尾鳳蝶野外數量稀少，不易取得大量樣本進行實驗。本計畫所使用的 20 隻臺灣寬尾鳳蝶個體中，12 隻樣本來自先前研究的組織 (Lu et al.,

2009)；另外 8 隻個體則為 2022-2023 年起執行太平山寬尾鳳蝶調查計畫時所採集到幼生期。此外，本計畫所使用的 24 隻中華寬尾鳳蝶，有 22 隻來自先前的研究樣本 (Lu et al., 2009)，另 2 隻採自福建省則為合作研究單位所提供。所有個體取其足或胸部肌肉組織，以 Genra Puregene Tissue Kit (Genra Systems, Minneapolis, MN, USA) 萃取其 DNA。萃取後則使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 檢測 DNA 總量，若達到 200 ng 以上，則使用 Covaris S220 超聲波碎裂儀 (Covaris, Inc., Woburn, MA) 將 DNA 分子碎裂至 200-500 bp，使用 NuGEN Ovation Ultralow Library System (NuGEN Technologies, San Carlos, CA) 進行次世代定序 (NGS) 建庫，並在 Illumina Novaseq 平台完成 2×150 bp paired-end 定序。

2. 序列處理與變異點偵測

所有樣本之 NGS 序列使用 Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014) 去除轉接子 (adaptor) 與品質篩選。篩選後的序列使用 BWA MEM 對應 (mapping) 至已公開發表的中華寬尾鳳蝶參考基因體序列 ASM2984927v1 (Pan et al., 2023)。使用 SAMtools (Li et al., 2009) 將對應品質小於 30 者去除並進行排序 (sorting) 與格式轉換。序列若為 PCR duplicates 者使用 Picard MarkDuplicates 辨識並標記，在後續分析中將其視為單一序列處理。基因型偵測 (genotyping) 使用 GATK (McKenna et al., 2010) 軟體所提供之工作流完成。單一個體之基因型使用 HaplotypeCaller 進行辨識，使用 CombineGVCFs 合併所有個體之基因型，並使用 GenotypeGVCFs 擷取整個資料集中的變異位點 (variants)。為去除低品質與潛在的誤判基因型，我們首先使用 RepeatModeler 與 RepeatMasker 辨識參考基因體中的轉座子序列 (transposable elements; TE) 並去除位於該序列中的 SNPs。低品質的 SNPs (DP < 220; QD < 2.0) 使用 GATK VariantFiltration 去除，有缺失基因型

(missing genotype) 的位點使用 bcftools view 去除，最終只保留位於體染色體 (autosome) 的 SNPs 進行族群遺傳分析。

3. 遺傳結構分析

針對族群遺傳結構分析，包含主成分分析 (principle component analysis; PCA) 與 Admixture (Alexander et al., 2009)，上述模型要求任一等位基因 (allele) 之間須獨立且隨機重組。因此執行分析前我們使用 Plink v1.9 (Purcell et al., 2007) 去除高度連鎖不平衡的 SNPs，參數設定為“--indep-pairwise 100 10 0.2”，及以 100 kb 的滑動窗格 (sliding window) 以 10 kb 遞進計算窗格內 SNP pair 間等位基因頻度的 r^2 ，去除高度連鎖的 SNP pair ($r^2 > 0.2$)。PCA 使用 Plink 中的“--pca 10”參數計算前 10 個主成分 (PC)。我們使用 Admixture v1.3 分別檢測兩個物種內的遺傳結構，由 1 到 10 檢測樣本之間的祖先族群數量 (K)，最佳的 K 值由 cross-validation (CV) error 評估，最低 CV error 者及選為最佳的族群數。另外，為了檢驗臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶的種內的遺傳分化與地理分布之間的關聯性，我們使用 R v4.4.0 (R Core Team, 2024) 中的 vegan 套件 (Dixon, 2003) 計算樣本間的歐幾里德遺傳距離 (Euclidean genetic distance) 與 Haversine 地理距離，並進行 Mantel test 檢測兩組資料的相關性與 9999 次的 permutation 評估統計顯著性。

4. 有效族群大小與波動

族群波動歷史 (demographic history) 使用 PSMC 與 SMC++ (Curtis et al., 2015) 與 GONE (Santiago et al., 2020) 完成，由於這些分析皆仰賴檢視全基因體範圍之 SNPs 並評估染色體的重組來計算不同時間節點的 N_e 值，其中 PSMC 與 SMC++ 透過突變率來推估時間，但自然狀況下每個世代之間突

變發生的頻率較低，因此 PSMC 與 SMC++ 被用於數萬至數千個世代之間的分析；而 GONE 則透過 recombination rate 計算 N_e 並推估時間，因此可用於近百個代內的族群波動。此二分析使用所有的 SNPs 進行分析，並將不同物種分別計算。PSMC 與 SMC++ 所使用的突變率參考紅帶袖蝶 *Heliconius melpomene* 設定為 2.9×10^{-9} site per generation (Keightley et al., 2015)，其餘參數皆使用預設數值進行分析。在 GONE 分析中，基因體重組率使用先前研究中所計算之鱗翅目昆蟲的平均重組率 4.74 cM/Mb (Wilfert et al., 2007)，其餘設定皆按照預設參數進行。由於樣本取樣年代的偏差與樣本內部的遺傳結構會對 GONE 分析結果造成影響 (Novo et al., 2023)，考量到中華寬尾鳳蝶內部的顯著的 isolation-by-distance 現象，我們只針對臺灣寬尾鳳蝶進行 GONE 分析，且將樣本分為 2000 年代與 2020 年代分別進行。

5. 近親繁殖評估

我們使用每一個體之 runs of homozygosity (ROH) 進行近親繁殖評估，ROH 為基因體中長片段的同型合子序列，通常由該族群經歷的有效族群大小下降與個體間的近親繁殖有關 (Brüniche-Olsen et al., 2018; Ceballos et al., 2018; Curik et al., 2014)。本研究使用 RzooROH (Bertrand et al., 2019) 辨識個體基因體中的 ROH 區域，RzooROH 可透過模型選擇方式將 ROHs 進行依據 R_k 值進行分類， R_k 可轉換為 ROH 片段共祖的時間並回推近親繁殖在不同時間點的強度。為減低運算負荷，我們定義了 9 個 R_k 值並進行 ROH 辨識與歸類，分別為 64, 256, 1024, 4096, 16384, 32768, 65536, 262144 與 524288，其對應之共祖時間為 32, 128, 256, 2048, 8192, 16384, 32768, 131072, 與 262144 個世代。基因型辨識錯誤率 (genotyping error rate) 設定參考先前研究設為 0.025% (Ferenčaković et al., 2013)。每個個體的近親繁殖

係數 (F_{ROH}) 計算方式為：總 ROH 長度/體染色體總長度，並使用 Wilcoxon signed-rank test 比較物種之間以及臺灣寬尾鳳蝶在不同年代樣本間的 F_{ROH} 是否具有顯著差異。

6. 遺傳負荷評估

本研究使用 SnpEff (Cingolani et al., 2012) 偵測個體層級的有害突變，並將變異效果分為四種類型：「High」(無義突變；nonsense mutation)；「Moderate」(錯義突變；missense mutation)；「Low」(同義突變；synonymous mutation)；以及「Modifier」(位於非編碼區域的突變)。其中，無義突變視為功能缺失 (loss of function, LoF) 突變，並視為「高度有害」；錯義突變因會改變胺基酸序列且可能影響基因功能，被視為「中度有害」。

本研究使用中華寬尾鳳蝶的參考基因體與基因註釋建立 SnpEff 的資料庫，用於預測突變程度。為降低由於臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶的種化產生的導致突變程度的預測偏誤，我們選擇外群 *Pterourus pilumnus* 作為祖先等位基因的代表。簡而言之，*P. pilumnus* 個體以相同的方法進行定序，並使用 BCFtools 搭配 mpileup 與 call (使用“-c”參數) 進行全基因體等位基因辨識，以同時獲得變異與非變異位點。使用 BCFtools 將 QUAL < 30 或 DP < 5 的位點被移除。*P. pilumnus* 的同型合子位點被視為祖先狀態，並僅保留其參考基因體中與 *P. pilumnus* 一致的 SNP 進行 SnpEff 註釋。此外，在某一物種中完全固定、但在另一物種中不存在的 allele 因其可能代表物種特有的適應，而非後天衍生的有害突變，所以將其排除分析。為避免單一 SNP 被多重註釋，我們僅保留雙等位 (biallelic) SNP 用於後續分析。為量化有害突變的累積，本研究統計每個個體的衍生 LoF (dLoF) 與錯義突變 (dN) 數量，並以衍生同義突變 (dS) 數量進行標準化，得到 dLoF/dS 與 dN/dS 兩項指標。分別使用 Wilcoxon test 比較臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳

蝶，以及比較 2000 年代與 2020 年代的臺灣寬尾鳳蝶。

接著，與先前的研究相似 (Dussex et al., 2021; Xue et al., 2015)，我們估計兩物種之間在三種突變的相對等位基因頻率。對於每一類型的 SNP，我們將每個位點 (i) 的衍生等位基因頻率 (f) 計算為衍生等位基因數除以總偵測到的等位基因數。接著，對於只存在於物種 X 而在物種 Y 缺乏的突變類別 C 中之等位基因，我們估計其期望頻率 L 如下：

$$L_X(C) = \sum_{i \in C} f_i^X (1 - f_i^Y)$$

同樣針對物種 Y 計算 $L_Y(C)$ 後。兩者的相對比值 R_{XY} 定義為：

$$R_{XY}(C) = \frac{L_X(C)}{L_Y(C)}$$

若 $R_{XY} > 1$ ，表示物種 X 的該類突變相對物種 Y 有較高的頻率；若 < 1 ，則相反。為評估 R_{XY} 的統計顯著性，我們使用 Jackknife 重複抽樣方法估計 R_{XY} 的在整體資料集當中的變異並獲得 95% 信賴區間。若 95% 信賴區間不包含 1，則兩物種間等位基因頻率差異具有統計顯著性。

為進一步評估兩物種在不同突變類別中的純化選擇 (purifying selection) 的差異，我們使用 easySFS (Gutenkunst et al., 2009) 推算兩物種三類突變的等位基因頻譜 (site frequency spectrum; SFS)。由於 SFS 的結果直接受到樣本數的影響，我們從中華寬尾鳳蝶中隨機選取 20 個體以匹配臺灣寬尾鳳蝶的樣本量，並重複抽樣 3 次以檢查抽樣變異。我們使用 R 進行 Pearson's Chi square test，以比較不同類別的頻率分布差異。為符合卡方檢定的離散假設，我們將等位基因頻率乘以 100 並四捨五入為整數，並設定

simulate.p.value = TRUE 進行 2000 次 permutation 以評估顯著性。最後，因為有害突變的純化通常會產生如較高比例的異型合子 (Dussex et al., 2021; Xue et al., 2015)，我們使用 Wilcoxon test 比較臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶在三類突變中的異型合子與同型合子變異數量差異。

(二) 大紫蛺蝶與珠光鳳蝶基因體組裝與重定序

1. 參考基因體定序與組裝

大紫蛺蝶雌蝶取自新竹白蘭部落，在白蘭部落目前有穩定的大紫蛺蝶族群生長。但對於珠光鳳蝶基因體的分析，由於歷經小犬颱風的影響，於6月前尚未取得雌性幼蟲以利分析，因此我們選用同屬的黃裳鳳蝶 *Troides aeacus* 作為替代進行基因體定序。我們將野外採集到的各一隻大紫蛺蝶與黃裳鳳蝶雌性個體 (為從幼蟲飼育至成蝶) 置入 -80°C 冷凍保存。針對長片段 DNA 定序，該個體之肌肉組織使用 Genomic-tip 20/G kit and Qiagen Buffer Set (Qiagen, Germany) 萃取其高分子量 DNA，使用 KAPA HyperPrep Kit 與 Oxford Nanopore Technologies (ONT) Ligation Sequencing Kit V14 完成 DNA 建庫，並在牛津奈米孔定序儀 ONT R10.4.1 flow cells 搭配 ONT MinKNOW 軟體完成定序，並使用 Dorado v0.9.6 進行核酸位點辨識 (basecalling)。除此之外，我們另外使用 Genra Puregene Tissue Kit 萃取較小分子量之 DNA 並在 Illumina Novaseq X 平台上完成高準確率的短片段定序作為序列校正使用。除此之外，為了確保基因體組裝結果符合細胞中的染色體結構與數量，我們將同一個體的腦組織使用 high-resolution chromosome conformation capture (Hi-C) 技術捕捉染色體結構。並在中研院 NGS 定序中心使用 Illumina NextSeq 2000 平台完成定序。

Illumina 序列皆使用 fastp (Chen, 2025) 去除轉接子與篩選低品質序列，序列品質小於 Q30 者皆去除。基因體草圖 (draft genome) 使用 ONT 序列與

Flye (Kolmogorov et al., 2019) 程式以預設參數完成，並使用 pypolca 搭配 Illumina 短片段序列進行校正。校正後的基因體草圖使用 BWA MEN 將 Hi-C 定序片段進行 mapping，使用 YaHs (Zhou et al., 2023) 與 Juicer (Durand et al., 2016a) 進行基於 Hi-C 關聯訊號重建染色體架構 (scaffolding)，組裝成完整基因體。Hi-C 關聯分析圖使用 JuiceBox (Durand et al., 2016b) 進行視覺化。最終基因體組裝結果使用 Quast 5.3.0 (Gurevich et al., 2013) 與 BUSCO v6.0.0 (Seppey et al., 2019) 評估組裝完整度。

2. 族群樣本重定序分析

我們分別選取過去計畫中進行粒線體組裝的大紫蛺蝶與珠光鳳蝶各 6 隻樣本 (Chu et al., 2025; 吳立偉, 2023)，進行重定序實驗與分析 (表一)。其中珠光鳳蝶則以本計畫所組裝的黃裳鳳蝶基因體作為參考與分析。DNA 萃取與 NGS 定序方式參照上述寬尾鳳蝶重定序研究之方法。NGS 序列使用 fastp 將轉接子與品質低於 Q30 的序列去除。序列對應使用方法與檔案格式轉換參考寬尾鳳蝶重定序所使用的方法，每一個體的重定序結果使用 SAMtools stats 功能進行計算。個體之間的 SNPs 使用 BCFtools mpileup 與 call 功能進行偵測，並使用 VCFtools (Danecek et al., 2011) 將品質 QUAL < 30、深度 DP < 5 與具有 missing genotype 的 SNPs 去除。SNPs 密度分布使用 rMVP (Yin et al., 2021) 以 10^5 bp 為區間進行計算並繪製。

四、結果

(一) 寬尾鳳蝶基因體重定序與保育遺傳研究

1. 序列資料與遺傳結構

在寬尾鳳蝶重定序分析中，共取得 3,460,238,913 條高品質的 NGS 序列，並比對至中華寬尾鳳蝶參考基因體。每個樣本的基因體覆蓋率介於 83.40%

至 86.53% 之間，重定序深度則介於 5.31 至 192.16 倍 (表一)。經 SNP 偵測與過濾，最終共保留 4,783,956 個高品質的 SNPs 供後續分析使用。在 PCA 結果中，PC1 與 PC2 分別解釋了總體遺傳變異的 51.76% 與 6.57% (圖一)。Admixture 分析的 CV error 顯示臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶的最佳 K 值皆為 1 (圖二)，表示兩個物種各自的族群內皆不存在明顯的遺傳結構。Mantel test 結果顯示 (圖二)，臺灣寬尾鳳蝶的遺傳距離與地理距離間無顯著相關性 ($r = -0.21, p = 0.88$)，相反地，中華寬尾鳳蝶則呈現顯著的 isolation-by-distance (IBD) 模式 ($r = 0.4545, p < 0.05$)。

2. 歷史族群變動與近期有效族群大小

PSMC 與 SMC++ 的結果顯示 (圖三)，自 Last Interglacial (LIG) 之後，中華寬尾鳳蝶與臺灣寬尾鳳蝶的 N_e 均持續下降。整體而言，相較於中華寬尾鳳蝶，臺灣寬尾鳳蝶的族群規模較小且變動較為劇烈。GONE 的結果顯示臺灣寬尾鳳蝶其在過去 500 年內經歷了嚴重的瓶頸效應 (圖三)。瓶頸效應開始的時間因取樣年代而有所異：而在 2000 年代的樣本中，瓶頸效應則發生於 250 個世代前 (圖四)；而在 2020 年代的樣本中，約發生於 450 個世代之前。在兩個組別在經歷瓶頸後的 N_e 都下降至約 200 並維持穩定的低族群量，在最近 100 個世代前 N_e 顯著的提升至約 2000 至 5000。此外，兩個資料集都顯示在最近 10 個世代內再次出現 N_e 的急遽下降：2000 年組別下降至 713，而 2020 年代組別下降至 144。

3. ROH 與近親繁殖

根據 R_{zoo}ROH 的分析結果，臺灣寬尾鳳蝶個體的 F_{ROH} 介於 0.8643 至 0.9063，而中華寬尾鳳蝶則介於 0.1858 至 0.4219 (表 2)。Wilcoxon test 顯示臺灣寬尾鳳蝶的 F_{ROH} 值顯著高於中華寬尾鳳蝶，但臺灣寬尾鳳蝶於 2000

年代與 2020 年代兩個時期之間的差異則不具統計顯著性。其中，臺灣寬尾鳳蝶在 R_k 值為 1024、4096 與 16384 的 ROH 片段中呈現最高比例(圖五)。

4. 遺傳負荷程度

以同義突變數量將 LoF 與錯義突變數量標準化後 ($dLoF/dS$ 與 dN/dS)，臺灣寬尾鳳蝶個體在 LoF ($W = 366, p < 0.05$) 與錯義突變 ($W = 478, p < 0.05$ ；圖六) 皆呈現顯著較低的比例。對於 2000 年代與 2020 年代所採集的臺灣寬尾鳳蝶樣本，LoF ($W = 54, p = 0.6784$) 與錯義突變 ($W = 48, p = 1$ ；圖六) 的數量皆未檢測到顯著差異(圖六)。同樣地，在 R_{XY} 比值 (*P. maraho* / *P. elwesi*) 顯示臺灣寬尾鳳蝶的 LoF 等位基因頻率降低 ($R_{XY} = 0.3319$ ；CI: 0.0639–0.6002)，但錯義突變無顯著差異 ($R_{XY} = 1.025$ ；CI: 0.9472–1.1021)，而同義突變顯示較高的等位基因頻率 ($R_{XY} = 1.1719$ ；CI: 1.1208–1.223；圖七)。SFS 的卡方檢定結果顯示，兩個物種在 LoF 與同義突變之間的頻率分布皆具有顯著差異；然而錯義突變與同義突變之間則無顯著差異(圖七；表三)。在每個物種內，各突變類別的同型與異型基因型之間的變異數皆呈現顯著不同(圖八)。值得注意的是，臺灣寬尾鳳蝶僅在 LoF 類別中具有較多的同型合子突變，而中華寬尾鳳蝶在所有突變類別中皆觀察到較多的異型合子突變(圖八)。

(二) 大紫蛺蝶與珠光鳳蝶基因體組裝與重定序

1. 大紫蛺蝶參考基因體組裝與重定序分析

我們總共獲得約 11 Gb 的 ONT 定序資料，包含 140 萬條序列，其 N50 為 31 kb。此外，我們也取得了約 30 Gb 的 Illumina 短序列 NGS 資料用於，以及約 35 Gb 的 Hi-C 序列資料。以 ONT 資料進行初步的 *de novo* 組裝、Illumina 的短片段序列校正與 Hi-C 資料進行 scaffolding 並移除長度低於 1 kb

的 scaffolds 與 contigs 後獲得包含 2,425 個 contigs，總長度約 523.1 Mb 的參考基因體。其 N50 為 17.3 Mb，BUSCO 組裝完整度為 99.1%。在 Hi-C 關聯矩陣圖中顯示了 29 條染色體結構 (圖九)。六隻個體進行重定序結果如表一，每個樣本的基因體覆蓋率介於 89.46% 至 92.38% 之間，重定序深度約介於 12.42× 至 29.61× 之間。使用 BCFtools 所偵測並過濾後保留 9,083,347 個 SNPs (圖十)。

2. 黃裳鳳蝶基因體組裝與珠光鳳蝶重定序分析

我們總共獲得約 8 Gb 的 ONT 定序資料，其 N50 為 18 kb。我們也獲得了約 97 Gb 的 Illumina 短序列 NGS 資料用於，以及約 35 Gb 的 Hi-C 序列資料。以 ONT 資料進行初步的 de novo 組裝、Illumina 的短片段序列校正與 Hi-C 資料進行 scaffolding 並移除長度低於 1 kb 的 scaffolds 與 contigs 後獲得包含 262 個 contigs，總長度約 344.1 Mb 的參考基因體。其 N50 為 12.1 Mb，BUSCO 組裝完整度為 97.7%。在 Hi-C 關聯矩陣圖中顯示了 30 條染色體結構 (圖十一)。六隻個體進行重定序結果如表一，每個樣本的基因體覆蓋率介於 89.46% 至 92.38% 之間，重定序深度約介於 5.86× 至 8.76× 之間。使用 BCFtools 所偵測並過濾後保留 9,139,971 個 SNPs (圖十二)。

五、討論

(一) 台灣寬尾鳳蝶的保育遺傳

結果顯示，臺灣寬尾鳳蝶具有島嶼物種常見的多項遺傳特徵，包括高度近交與劇烈變動的族群歷史。與中華寬尾鳳蝶相比，臺灣寬尾鳳蝶在過去十萬年間經歷更嚴重的族群下降，且在最近 500 個世代仍持續有族群規模波動。然而，儘管歷史上經歷這些長期的族群變動，其遺傳特徵，包含近交程度與遺傳負荷，

在近二十年間仍維持相當穩定。特別的是，臺灣寬尾鳳蝶的個體遺傳負荷顯著低於中華寬尾鳳蝶，其適存度似乎較大陸分布的中華寬尾鳳蝶來得好。透過近緣種族群遺傳的比較，更能了解臺灣寬尾鳳蝶的遺傳負荷與遺傳背景訊息，未來需要再增加臺灣寬尾鳳蝶的取樣量，以確認族群變動的穩定度，以健全寬尾鳳蝶保育策略的方向與行動。

兩種寬尾鳳蝶的遺傳交流模式

遺傳結構與遺傳多樣性是保育生物學中辨別保育單元與檢測地區性適應的重要資訊 (Bradbury et al., 2023; De Vivo et al., 2023; Huang et al., 2024)。然而在目前的臺灣寬尾鳳蝶取樣中，族群呈現近乎完全混合 (panmixia)，顯示目前取樣地區可以視為單一族群。但本計畫的樣本以北臺灣為主，然而過去的文獻指出臺灣寬尾鳳蝶也分佈於台灣的中、南部山區 (Yamanaka, 1971)。因此未來若能加入來自其他地區的樣本，將更有助於釐清其完整遺傳結構。相較之下，中華寬尾鳳蝶在中國大陸表現出明顯的分群並且族群之間 IBD 模式，顯示其族群移動能力有限，不同地區的族群容易隔離基因交流較弱。反而對中華寬尾鳳蝶的保育則是維持棲地連續性以維持基因交流 (Funk et al., 2012)。

島嶼族群的變動較為劇烈

在臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶中，長時間尺度下的族群歷史皆顯示其有效族群大小自 LIG 後，皆呈現下降趨勢，其中臺灣寬尾鳳蝶的下降幅度更大且波動更顯著。在近 150 至 450 世代中 (圖三)，臺灣寬尾鳳蝶呈現嚴重的瓶頸效應，然而 2000 年代與 2020 年代的樣本呈現不同的族群變動模式，可能受到採樣年代與採樣區域並非完全一致的影響 (圖四)，亦有可能 GONE 的分析於 200 代之前的推估精準度較低 (Santiago et al., 2020)。但兩種寬尾鳳蝶所呈現的族群變動模式與許多溫帶或高海拔昆蟲常見的冰期擴張模式不同，即兩種在冰期中

皆沒有呈現族群擴張的情形 (Buckley et al., 2009; Fu & Wen, 2023; Huang et al., 2024; Huang & Lin, 2010; Kimmitt et al., 2023; Lei et al., 2014; Lin et al., 2008)。此不一致現象可能反映不同類群的生物在氣候波動下的特性差異 (Papadopoulou & Knowles, 2016)。

蝴蝶的族群大小高度依賴寄主植物的資源多寡 (Curtis et al., 2015)，而臺灣寬尾鳳蝶僅以臺灣檫樹為食，其族群大小與寄主植物的豐度度密切相關，尤其其偏好火燒或崩塌後形成的開放且明亮的環境 (Griggs & Burns, 1990; Gu, 1977)，因此是否有山崩所造成的陽性環境對於臺灣檫樹的生長存在重要的生長環境。而我們的資料顯示近百年內的族群呈現擴張，則可能與十九世紀森林伐木活動相關，當時臺灣森林面積減少約 7.35% (Chen et al., 2019; Yang & Sheu, 2010)，反而創造了台灣檫樹的偏好的棲地環境，進而促成臺灣寬尾鳳蝶的族群成長。雖然此推論與臺灣寬尾鳳蝶的採集資料 (Yamanaka, 1971) 及臺灣中高海拔山區開發的歷史一致，但仍需更多證據確認寄主植物與蝴蝶族群變動的關聯性。

高近親繁殖與低有害突變的臺灣寬尾鳳蝶

臺灣寬尾鳳蝶的 ROH 比例顯著高於中華寬尾鳳蝶，符合島嶼族群常見的高近親繁殖的現象 (Frankham, 1998)，尤其近期的人為棲地破碎化通常會加劇野外族群的近親繁殖程度。本研究顯示臺灣寬尾鳳蝶的近親繁殖事件主要發生於 512 至 8192 的世代之前，而非近期發生。儘管 F_{ROH} 極高，臺灣寬尾鳳蝶的 LoF 突變頻率卻遠低於中華寬尾鳳蝶，且有較高的異形合子比例，顯示 LoF 突變受到更強的純化選擇 (purifying selection) 的作用，而非僅由遺傳漂變 (genetic drift) 造成。這個現象在近年多個野外物種中被反覆觀察，包括哺乳類、鳥類、爬蟲類、昆蟲與植物 (Dussex et al., 2021; Feng et al., 2024; Grossen et al., 2020; Khan et al., 2021)，這些研究認為瓶頸效應可能有助於清除隱性有害突變，使族群的遺傳負荷下降。而本研究的結果顯示，臺灣寬尾鳳蝶的族群瓶頸可能與古氣候變

動相關，而時間序列樣本也顯示近二十年來遺傳特徵 (N_e 與 ROH) 穩定，並無明顯的下降趨勢。

後續的臺灣寬尾鳳蝶的保育行動

透過本計畫寬尾鳳蝶基因體分析的結果，臺灣寬尾鳳蝶的基因體資訊顯現近期的族群較過往相對穩定。儘管其近親繁殖的程度高，但近代的有效族群量較過往高，而且，族群的遺傳負荷相對近緣種來得低。這些結果顯示臺灣島內的臺灣寬尾鳳蝶皆為同一個族群，族群較過往瓶頸效應的族群量明顯成長。但對於這樣的訊息皆憑藉 20 隻樣本所建構的結果，未來將持續增加樣本分析，以了解確切的族群狀況全貌。但在現在的寬尾鳳蝶保育行動中，提供充足的寬尾鳳蝶的幼蟲寄主資源，將是改善臺灣寬尾鳳蝶生存的重要行動工作。然而，臺灣檫樹耐陰性較差 (Van Breugel et al., 2007)、種子具有強休眠性且發芽率低 (Yang & Sheu, 2010)，不易培養充足的造林木提供造林。加上如果沒有適當的人為擾動，臺灣檫樹容易在演替中後期，被其它樹種所演替。目前臺灣檫樹在臺灣即呈現小族群且零星分布，唯有擴大此樹種的種植面積與數量才能有效的增長臺灣寬尾鳳蝶的族群量，並達到永續台灣的使命。

(二) 大紫蛺蝶基因體組裝與重定序測試

結合 ONT 與 Hi-C 技術，我們獲得了高品質的大紫蛺蝶基因體 (圖九)。最終組裝結果所呈現的 scaffold 數量與過去核型分析 (karyotype analysis) 所獲得的染色體數量一致 (Saito et al., 1982)。基因體大小約為 523.1 Mb (BUSCO 為 99.1%)，在整個蛺蝶科當中位居中間值 (Liu et al., 2020)。使用 2000 至 2015 所採集的樣本進行重定序，即可偵測到約九百萬個變異位點可供未來的保育遺傳分析使用 (圖十)。

(三) 黃裳鳳蝶基因體組裝與珠光鳳蝶重定序

黃裳鳳蝶的基因體序列組裝相當完整，基因體總長度約 344.1 Mb (BUSCO 為 97.7%)，共獲得 30 個可能的染色體 (圖十一)。但與 Kodo and Shigeru (1968) 中的台灣黃裳鳳蝶染色體數量有異 (n=31)，但與中國大陸西南的樣本一致 (n=30)。這與鱗翅目昆蟲種內染色體數量有變異導致 (Lukhtanov et al., 2011)。使用 1996 年至 2003 年的珠光鳳蝶老舊樣本 (N=5) 仍可偵測到超過九百萬個變異點 (圖十二)，但因為所對應之參考基因體並非同一物種，重定序的基因體覆蓋率僅約 75% 左右，不如大紫蛺蝶可獲得超過 90% 的覆蓋率 (表一)，且不同物種的基因體結構可能有差異，使用諸如 PSMC 或是 GONE 等仰賴基因體重組回溯有效族群變化的分析可能會產生誤差，因此仍建議針對珠光鳳蝶組裝參考基因體，以便更準確地評估其保育遺傳現況。

後續計畫的建議：

1. 有關臺灣寬尾鳳蝶重定序結果顯示，現今的族群為過去歷經瓶頸效應增長後的族群，雖然有效族群量仍偏低、近親雜交系數偏高，但遺傳負荷較近緣種低，從遺傳角度顯示目前族群成長狀況屬於穩定成長。不過目前的評估受限於 20 隻樣本所呈現的結果，加上分為 2 個相差 10 年的樣本及不同地點，後續仍需增加樣本數量及分布地點以驗證此資訊。
2. 即便遺傳分析顯示族群尚未立即受到威脅，然而臺灣寬尾鳳蝶在野外數量仍然不易為國人所見。因此擴大其寄主植物種植，增加此蝶種的幼生期資源量，將有助於族群增長，實為保育臺灣寬尾鳳蝶的重要工作項目。
3. 保育行動計畫也需要讓民眾參與，以達到擴大全民參與的目的。可以透過舉辦保育講座、棲地了解、臺灣檫樹的造林與一般造林樹種之間的差異、寬尾鳳蝶的生態旅遊等項目，讓民眾更了解保育工作的重要性。

4. 大紫蛺蝶及黃裳鳳蝶的基因體在此計畫已獲得相當完整的基因體序列，後續可以比照寬尾鳳蝶重定序分析。目前透過前其的計畫已有收集充足的大紫蛺蝶與珠光鳳蝶的樣本，將透過下一年度的計畫將此兩種進行保育基因體分析。
5. 今天陸續有收集到珠光鳳蝶、臺灣寬尾鳳蝶以及曙鳳蝶雌蝶的樣本，目前也已送至中研究。鳳蝶的基因體大約為 500 Mb 上下，因此後續若能獲得基因體做為參考序列，將對於臺灣五種保育類蝴蝶做進一步的完整評估。

六、參考文獻

- 吳立偉 (2023)。大紫蛺蝶遺傳多樣性與不同亞種間之關係。農業部林業及自然保育署。
- 徐珮慈 (2024)。蘭嶼珠光鳳蝶的保育遺傳學：從追湖北臺灣引入事件到對保育行動的啟發。東海大學生命科學系。
- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19(9), 1655–1664.
- Bertrand, A. R., Kadri, N. K., Flori, L., Gautier, M., & Druet, T. (2019). RZooRoH: an R package to characterize individual genomic autozygosity and identify homozygous-by-descent segments. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(6), 860–866.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Bradbury, D., Binks, R. M., Webb, A., & Byrne, M. (2023). Defining conservation units in a species complex with genomic-taxonomic discordance: A case study of *Conospermum caeruleum* (Proteaceae). *Biodiversity and Conservation*, 32(6), 1949–1975.
- Brüniche-Olsen, A., Kellner, K. F., Anderson, C. J., & DeWoody, J. A. (2018). Runs

- of homozygosity have utility in mammalian conservation and evolutionary studies. *Conservation Genetics*, 19(6), 1295–1307.
- Buckley, T. R., Marske, K. A., & Attanayake, D. (2009). Identifying glacial refugia in a geographic parthenogen using palaeoclimate modelling and phylogeography: The New Zealand stick insect *Argosarchus horridus* (White). *Molecular Ecology*, 18(22), 4650–4663.
- Ceballos, F. C., Joshi, P. K., Clark, D. W., Ramsay, M., & Wilson, J. F. (2018). Runs of homozygosity: Windows into population history and trait architecture. *Nature Reviews Genetics*, 19(4), 220–234.
- Chen, S. (2025). fastp 1.0: An ultra-fast all-round tool for FASTQ data quality control and preprocessing. *iMeta*, 4(5), e70078. <https://doi.org/10.1002/imt2.70078>
- Chen, Y.-Y., Huang, W., Wang, W.-H., Juang, J.-Y., Hong, J.-S., Kato, T., & Luysaert, S. (2019). Reconstructing Taiwan's land cover changes between 1904 and 2015 from historical maps and satellite images. *Scientific Report*, 9(1), 3643.
- Chu, W.-C., Yago, M., Hsu, P.-T., Yeh, L.-W., Lin, Y.-P., Chao, R.-F., Hsu, Y.-F., & Wu, L.-W. (2025). Historical Collections Help Trace the Origin of Introduced and Native Populations of the Endangered Butterfly, *Troides magellanus sonani* (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2025(1), 9132747. <https://doi.org/10.1155/jzs/9132747>
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X., & Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain *w*¹¹¹⁸; *iso-2*; *iso-3*. *Fly*, 6(2), 1–13.
- Curik, I., Ferenčaković, M., & Sölkner, J. (2014). Inbreeding and runs of homozygosity: A possible solution to an old problem. *Livestock Science*, 166, 26–34.

- Curtis, R. J., Brereton, T. M., Dennis, R. L., Carbone, C., & Isaac, N. J. (2015). Butterfly abundance is determined by food availability and is mediated by species traits. *Journal of Applied Ecology*, *52*(6), 1676–1684.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, *27*(15), 2156–2158.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- De Vivo, M., Chou, M.-H., Wu, S.-P., Kuan, Y.-H., Chen, W.-Y., Wang, L.-J., Morgan, B., Phang, G.-J., & Huang, J.-P. (2023). Genomic tools for comparative conservation genetics among three recently diverged stag beetles (Lucanus, Lucanidae). *Insect Conservation and Diversity*, *16*(6).
- Dixon, P. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, *14*(6), 927–930.
- Durand, N. C., Muhammad, S. S., Machol, I., Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2016a). Juicer Provides a One-Click System for Analyzing Loop-Resolution Hi-C Experiments. *Cell Systems*, *3*(1), 95–98.
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.07.002>
- Durand, N. C., Robinson, J. T., Shamim, M. S., Machol, I., Mesirov, J. P., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2016b). Juicebox Provides a Visualization System for Hi-C Contact Maps with Unlimited Zoom. *Cell Systems*, *3*(1), 99–101.
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.07.012>
- Dusseux, N., Van Der Valk, T., Morales, H. E., Wheat, C. W., Díez-del-Molino, D., Von Seth, J., Foster, Y., Kutschera, V. E., Guschanski, K., & Rhie, A. (2021). Population genomics of the critically endangered kākāpō. *Cell Genomics*, *1*(1), 100002.

- Feng, Y., Comes, H. P., Chen, J., Zhu, S.-S., Lu, R., Zhang, X.-Y., Li, P., Qiu, J., Olsen, K. M., & Qiu, Y.-X. (2024). Genome sequences and population genomics provide insights into the demographic history, inbreeding, and mutation load of two ‘living fossil’ tree species of *Dipteronia*. *The Plant Journal*, *117*(1), 177–192.
- Ferenčaković, M., Sölkner, J., & Curik, I. (2013). Estimating autozygosity from high-throughput information: Effects of SNP density and genotyping errors. *Genetics Selection Evolution*, *45*, 1–9.
- Frankham, R. (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, *78*(3), 311–327.
- Frankham, R. (1998). Inbreeding and extinction: Island populations. *Conservation Biology*, *12*(3), 665–675.
- Fu, J.-Z., & Wen, L.-Y. (2023). Impacts of Quaternary glaciation, geological history and geography on animal species history in continental East Asia: A phylogeographic review. *Molecular Ecology*, *32*(16), 4497–4514.
- Funk, W. C., McKay, J. K., Hohenlohe, P. A., & Allendorf, F. W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution*, *27*(9), 489–496.
- Griggs, M. M., & Burns, R. (1990). *Sassafras albidum* (Nutt.) Nees. In R. M. Burns & B. H. T. coordinators Honkala (Eds.), *Silvics of North America* (Vol. 2, pp. 773–777). Department of Agriculture, Forest Service.
- Grossen, C., Guillaume, F., Keller, L. F., & Croll, D. (2020). Purging of highly deleterious mutations through severe bottlenecks in Alpine ibex. *Nature Communications*, *11*(1), 1001.
- Gu, Y.-R. (1977). Fast-growing and highly valuable Taiwan sassafras (I). *Taiwang Forestry*, *3*(12), 12–15.

- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gutenkunst, R. N., Hernandez, R. D., Williamson, S. H., & Bustamante, C. D. (2009). Inferring the joint demographic history of multiple populations from multidimensional SNP frequency data. *PLoS Genetics*, *5*(10), e1000695.
- Huang, J.-P., & Lin, C.-P. (2010). Diversification in subtropical mountains: Phylogeography, Pleistocene demographic expansion, and evolution of polyphenic mandibles in Taiwanese stag beetle, *Lucanus formosanus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *57*(3), 1149–1161.
- Huang, J.-P., Wu, S.-P., Chen, W.-Y., Pham, G. J., & Kuan, Y.-H. (2024). Genomic data revealed inbreeding despite a geographically connected stable effective population size since the Holocene in the protected Formosan Long-Arm Scarab beetle, *Cheirotonus formosanus*. *Journal of Heredity*, *115*(3), 292–301.
- Keightley, P. D., Pinharanda, A., Ness, R. W., Simpson, F., Dasmahapatra, K. K., Mallet, J., Davey, J. W., & Jiggins, C. D. (2015). Estimation of the spontaneous mutation rate in *Heliconius melpomene*. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 239–243.
- Khan, A., Patel, K., Shukla, H., Viswanathan, A., van der Valk, T., Borthakur, U., Nigam, P., Zachariah, A., Jhala, Y. V., & Kardos, M. (2021). Genomic evidence for inbreeding depression and purging of deleterious genetic variation in Indian tigers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(49), e2023018118.
- Kimmitt, A. A., Pegan, T. M., Jones, A. W., Wacker, K. S., Brennan, C. L., Hudon, J., Kirchman, J. J., Ruegg, K., Benz, B. W., & Herman, R. (2023). Genetic evidence for widespread population size expansion in North American boreal

- birds prior to the Last Glacial Maximum. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 290(1991), 20221334.
- Kodo, M., & Shigeru, A. A. (1968). STUDIES OF THE CHROMOSOMES OF FORMOSAN RHOPALOCERA : 1. Papilionidae and Hesperidae. *Kontyû*, 36(2), 116–123.
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37(5), 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
- Lei, F.-M., Qu, Y.-H., & Song, G. (2014). Species diversification and phylogeographical patterns of birds in response to the uplift of the Qinghai-Tibet Plateau and Quaternary glaciations. *Current Zoology*, 60(2), 149–161.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079.
- Li, S.-H., Liu, Y., Yeh, C.-F., Fu, Y., Yeung, C. K., Lee, C.-C., Chiu, C.-C., Kuo, T. H., Chan, F.-T., & Chen, Y.-C. (2022). Not out of the woods yet: Signatures of the prolonged negative genetic consequences of a population bottleneck in a rapidly re-expanding wader, the black-faced spoonbill *Platalea minor*. *Molecular Ecology*, 31(2), 529–545.
- Lin, R.-C., Yeung, C. K.-L., & Li, S.-H. (2008). Drastic post-LGM expansion and lack of historical genetic structure of a subtropical fig-pollinating wasp (*Ceratosolen* sp. 1) of *Ficus septica* in Taiwan. *Molecular Ecology Notes*, 17(23), 5008–5022.
- Liu, G., Chang, Z., Chen, L., He, J., Dong, Z., Yang, J., Lu, S., Zhao, R., Wan, W., Ma, G., Li, J., Zhang, R., Wang, W., & Li, X. (2020). Genome size variation in

- butterflies (Insecta, Lepidoptera, Papilionoidea): A thorough phylogenetic comparison. *Systematic Entomology*, 45(3), 571–582.
- <https://doi.org/10.1111/syen.12417>
- Lu, C.-C., Wu, L.-W., Jiang, G.-F., Deng, H.-L., Wang, L.-H., Yang, P.-S., & Hsu, Y.-F. (2009). Systematic status of *Agehana elwesi* f. *Cavaleriei* based on morphological and molecular evidence. *Zoological Studies*, 48(2), 270–279.
- Lukhtanov, V. A., Dincă, V., Talavera, G., & Vila, R. (2011). Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-109>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., & Daly, M. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303.
- Novo, I., Ordás, P., Moraga, N., Santiago, E., Quesada, H., & Caballero, A. (2023). Impact of population structure in the estimation of recent historical effective population size by the software GONE. *Genetics Selection Evolution*, 55(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12711-023-00859-2>
- Pan, Z.-X., Ding, Y.-H., Zhang, S.-S., Li, L.-X., & Ma, F.-Z. (2023). Chromosome-Level Genome Assembly of *Papilio elwesi* Leech, 1889 (Lepidoptera: Papilionidae). *Insects*, 14(3), 304.
- Papadopoulou, A., & Knowles, L. L. (2016). Toward a paradigm shift in comparative phylogeography driven by trait-based hypotheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), 8018–8024.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P. I., & Daly, M. J. (2007). PLINK: a tool set

- for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, *81*(3), 559–575.
- Saito, K., Abe, A., Kugami, Y., & Koiwaya, S. (1982). Karyological Notes on *Sasakia funebris* LEECH and *Sasakia charonda* HEWITSON (Lepidoptera: Nymphalidae). *Lepidoptera Science*, *32*(3–4), 190–192.
- Santiago, E., Novo, I., Pardiñas, A. F., Saura, M., Wang, J., & Caballero, A. (2020). Recent demographic history inferred by high-resolution analysis of linkage disequilibrium. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(12), 3642–3653.
- Seppy, M., Manni, M., & Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Gene Prediction: Methods and Protocols*, 227–245.
- Van Breugel, M., Bongers, F., & Martínez-Ramos, M. (2007). Species dynamics during early secondary forest succession: Recruitment, mortality and species turnover. *Biotropica*, *39*(5), 610–619.
- Van Noordwijk, A. J., & Scharloo, W. (1981). Inbreeding in an island population of the great tit. *Evolution*, 674–688.
- Wilfert, L., Gadau, J., & Schmid-Hempel, P. (2007). Variation in genomic recombination rates among animal taxa and the case of social insects. *Heredity*, *98*(4), 189–197.
- Xue, Y.-L., Prado-Martinez, J., Sudmant, P. H., Narasimhan, V., Ayub, Q., Szpak, M., Frandsen, P., Chen, Y., Yngvadottir, B., & Cooper, D. N. (2015). Mountain gorilla genomes reveal the impact of long-term population decline and inbreeding. *Science*, *348*(6231), 242–245.
- Yamanaka, M. (1971). Distribution of Formosan butterflies (1). *Special Bulletin of the Lepidopterological Society of Japan*, *5*, 115–191.
- Yang, T.-R., & Sheu, B.-H. (2010). Studies on the seed germination and seedling

sprout from stand floor of the forest of Taiwan Sassafras. *Quarterly Journal of Forest Research*, 32(1), 32–50.

Yeh, L.-W., Wang, B.-C., Lu, C.-C., Huang, C.-L., Hsu, Y.-F., & Wu, L.-W. (2025).

Integrating Wing Morphometrics and Mitogenomic Sequences Supports

Species-level Distinction between *Papilio maraho* and *Papilio elwesi*

(Lepidoptera: Papilionidae). *Zoological Studies*, 64, 63.

<https://doi.org/10.6620/ZS.2025.64-63>

Yin, L., Zhang, H., Tang, Z., Xu, J., Yin, D., Zhang, Z., Yuan, X., Zhu, M., Zhao, S.,

Li, X., & Liu, X. (2021). rMVP: A Memory-Efficient, Visualization-Enhanced,

and Parallel-Accelerated Tool for Genome-Wide Association Study. *Genomics,*

Proteomics & Bioinformatics, 19(4), 619–628.

<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.10.007>

Zhou, C., McCarthy, S. A., & Durbin, R. (2023). YaHS: Yet another Hi-C scaffolding

tool. *Bioinformatics*, 39(1), btac808.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac808>

表一、臺灣寬尾鳳蝶 *P. maraho*、中華寬尾鳳蝶 *P. elwesi*、大紫蛺蝶 *S. charonda* 與珠光鳳蝶 *T. magellanus* 的樣本資訊與定序情形

Sample ID	Species	Year	Locality	Number of reads	Mean coverage (%)	Mean Depth	Mean mapping Quality
21LW09029	<i>P. maraho</i>	2021	Taiwan; Taipingshan	93163087	85.20	39.08	57.74
22LW06005	<i>P. maraho</i>	2022	Taiwan; Taipingshan	88461722	85.18	36.31	57.87
22LW06237	<i>P. maraho</i>	2022	Taiwan; Taipingshan	40982857	84.25	15.42	56.93
22LW06267	<i>P. maraho</i>	2021	Taiwan; Taipingshan	481659764	85.41	192.16	57.98
22LW06288	<i>P. maraho</i>	2023	Taiwan; Taipingshan	71822592	84.54	26.07	56.79
22LW06303	<i>P. maraho</i>	2023	Taiwan; Taipingshan	87467255	84.30	31.27	56.71
22LW06343	<i>P. maraho</i>	2023	Taiwan; Taipingshan	75153482	84.69	30.13	57.75
22LW06373	<i>P. maraho</i>	2024	Taiwan; Taipingshan	73880545	83.77	24.13	57.12
Pa0003	<i>P. maraho</i>	2002	Taiwan; Mingchi	72473116	85.02	30.49	57.68
Pa0014	<i>P. maraho</i>	2006	Taiwan; Taipingshan	43409382	84.28	17.32	56.26
Pa0040	<i>P. maraho</i>	2002	Taiwan; Taipingshan	92537166	85.23	37.74	57.64
Pa0171	<i>P. maraho</i>	2004	Taiwan; Yingshi	99719885	85.20	41.00	57.55
Pa0209	<i>P. maraho</i>	2005	Taiwan; Taipingshan	29352134	83.72	12.06	55.85
Pa0235	<i>P. maraho</i>	2001	Taiwan; Taipingshan	42584134	83.91	16.38	56.30
Pa0241	<i>P. maraho</i>	2003	Taiwan; Mingchi	65392361	84.91	27.09	57.60
Pa0583	<i>P. maraho</i>	2004	Taiwan; Taipingshan	35527736	84.08	14.58	56.06
Pa0927	<i>P. maraho</i>	2007	Taiwan; Mingchi	40388393	84.08	16.05	56.28
Pa1341	<i>P. maraho</i>	2008	Taiwan; Tuleng	82231967	85.20	34.25	57.75
Pa1342	<i>P. maraho</i>	2008	Taiwan; Tuleng	68361611	84.98	28.39	57.62
Pa1409	<i>P. maraho</i>	2009	Taiwan; Jienshi	67047002	85.05	27.90	57.59
22LW06314	<i>P. elwesi</i>	2023	China; Fujian	101449279	86.19	41.67	57.87
22LW06321	<i>P. elwesi</i>	2023	China; Fujian	67811962	86.13	27.75	57.81
Pa0002	<i>P. elwesi</i>	2002	China; Chongqing	59607960	85.83	23.79	57.04

Sample ID	Species	Year	Locality	Number of reads	Mean coverage (%)	Mean Depth	Mean mapping Quality
Pa0006	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Zhejiang	52974970	85.76	22.14	57.27
Pa0008	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Guangdong	12972988	83.40	5.31	57.35
Pa0009	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Zhejiang	91337539	86.42	38.31	57.93
Pa0010	<i>P. elwesi</i>	2002	China; Chongqing	57145539	85.74	23.31	57.20
Pa0216	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Guangdong	79826164	85.83	32.65	57.37
Pa0219	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Guangdong	86041126	86.02	35.83	58.01
Pa0221	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Guangdong	103768599	86.36	43.25	57.99
Pa0224	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Zhejiang	94985485	86.32	39.66	57.87
Pa0231	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Jiangxi	64937374	85.64	26.53	57.20
Pa0236	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Zhejiang	82060949	86.37	33.84	57.95
Pa0238	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Zhejiang	51454194	85.80	21.69	56.28
Pa0242	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Guangdong	77284774	86.06	31.81	58.08
Pa0243	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Guangdong	77000134	86.18	31.55	57.97
Pa0244	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Zhejiang	83200532	86.53	34.48	57.67
Pa0245	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Zhejiang	74604289	86.19	30.63	58.07
Pa0248	<i>P. elwesi</i>	2004	China; Jiangxi	50713853	85.53	20.46	57.45
Pa0315	<i>P. elwesi</i>	2001	China; Zhejiang	95436844	86.43	39.34	58.01
Pa0511	<i>P. elwesi</i>	2006	China; Jiangxi	65604691	85.76	25.48	57.29
Pa0513	<i>P. elwesi</i>	2006	China; Guangxi	52226740	85.57	20.57	56.73
Pa0514	<i>P. elwesi</i>	missing	China; Guangxi	68029768	85.64	26.86	57.08
Pa0614	<i>P. elwesi</i>	2006	China; Chongqing	58146969	85.50	23.34	57.19
Pa0947	<i>P. pilumnus</i>	2008	USA; North of California	40388393	84.08	16.05	56.28
21LW12027	<i>S. charonda</i>	2010	Taiwan; Fuxing	71882903	92.06	20.15	58.87
22LW06097	<i>S. charonda</i>	2000	Taiwan; Fuxing	71234364	89.46	14.69	59.11

Sample ID	Species	Year	Locality	Number of reads	Mean coverage (%)	Mean Depth	Mean mapping Quality
22LW06100	<i>S. charonda</i>	2015	Taiwan; Fuxing	90838983	91.45	23.02	59.11
22LW06135	<i>S. charonda</i>	2022	Taiwan; Fuxing	51227090	91.25	12.42	56
22LW06236	<i>S. charonda</i>	2021	Taiwan; Fuxing	101623183	92.38	29.61	59.11
N1-0601	<i>S. charonda</i>	2005	Taiwan; Jian	79203433	91.91	23.56	59.21
21LW12002	<i>T. magellanus</i>	1996	Taiwan; Lanyu	35335073	73.21	8.23	57.07
21LW12003	<i>T. magellanus</i>	1998	Taiwan; Lanyu	27728821	76.05	8.76	57.75
21LW12006	<i>T. magellanus</i>	2000	Taiwan; Lanyu	25792012	71.32	5.86	56.89
21LW12011	<i>T. magellanus</i>	1999	Taiwan; Lanyu	23159158	75.9	7.59	57.71
21LW12012	<i>T. magellanus</i>	2003	Taiwan; Lanyu	27832572	75.68	8.44	56.99

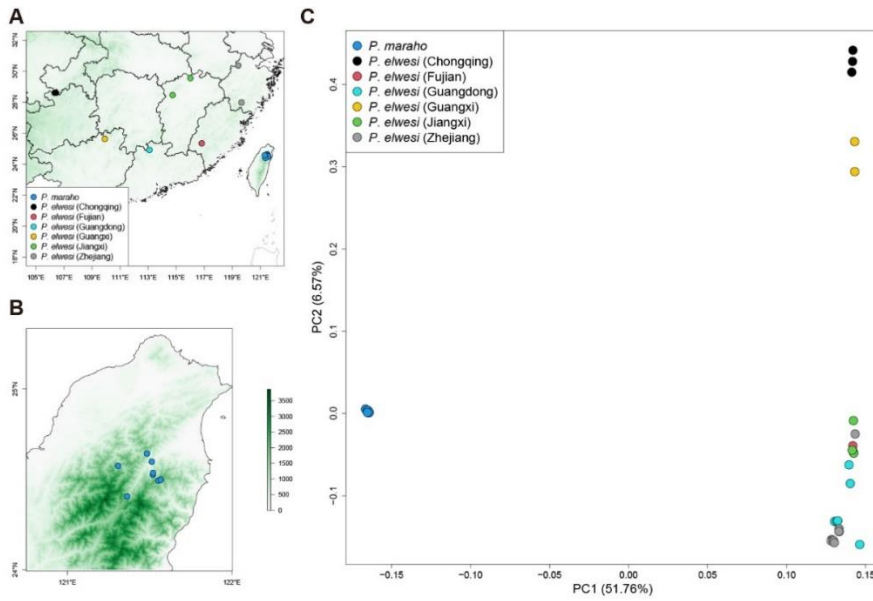
表二、臺灣寬尾鳳蝶與中華寬尾鳳蝶個體的 ROH 組成與 F_{ROH}

Sample ID	Species	Proportion (%) of R_k rate									F_{ROH}
		64	256	1024	4096	16384	32768	65536	262144	524288	
21LW09029	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	49.10	35.61	0.43	4.78	0.02	0.00	0.00	0.8994
22LW06005	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	52.05	30.82	2.46	4.06	0.00	0.00	0.00	0.8939
22LW06237	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	5.78	61.73	16.16	4.16	0.75	0.00	0.00	0.8858
22LW06267	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	36.51	45.62	2.69	4.81	0.00	0.00	0.00	0.8964
22LW06288	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	7.03	65.34	9.91	5.87	0.01	0.00	0.00	0.8815
22LW06303	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	0.00	46.90	32.49	5.38	2.26	0.00	0.00	0.8702
22LW06343	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	10.38	65.23	6.74	5.94	0.00	0.00	0.00	0.8829
22LW06373	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	0.00	47.47	33.91	2.87	2.19	0.00	0.00	0.8643
Pa0003	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	59.88	24.45	2.65	3.34	0.00	0.00	0.00	0.9033
Pa0014	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	10.54	58.91	14.62	3.26	1.01	0.00	0.00	0.8833
Pa0040	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	42.73	39.43	3.54	3.82	0.00	0.00	0.00	0.8953
Pa0171	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	52.75	30.52	2.94	3.70	0.00	0.00	0.00	0.8991
Pa0209	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	12.18	61.98	11.39	0.02	2.59	0.45	0.00	0.8862
Pa0235	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	0.00	50.23	32.29	1.50	3.21	0.00	0.00	0.8722
Pa0241	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	49.46	33.71	2.57	4.01	0.00	0.00	0.00	0.8975
Pa0583	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	8.81	61.77	13.35	2.47	1.92	0.00	0.00	0.8832
Pa0927	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	9.30	59.52	15.78	1.73	1.93	0.00	0.00	0.8826
Pa1341	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	62.57	22.23	2.41	3.32	0.00	0.00	0.00	0.9054
Pa1342	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	53.48	29.11	2.73	3.90	0.00	0.00	0.00	0.8923
Pa1409	<i>P. maraho</i>	0.00	0.00	55.43	28.88	2.32	3.99	0.00	0.00	0.00	0.9063
22LW06314	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.01	2.02	3.80	3.30	0.02	3.47	3.30	5.73	0.2165
22LW06321	<i>P. elwesi</i>	0.01	0.17	3.29	3.89	2.53	0.87	3.17	3.04	5.87	0.2284
Pa0002	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.00	1.28	2.00	1.71	0.04	3.70	2.80	7.22	0.1876
Pa0006	<i>P. elwesi</i>	0.03	0.18	1.36	3.11	3.09	0.36	2.65	4.79	3.71	0.1927
Pa0008	<i>P. elwesi</i>	0.01	0.08	2.92	4.49	0.29	4.13	0.05	0.00	30.22	0.4219
Pa0009	<i>P. elwesi</i>	0.15	0.66	2.85	3.05	2.33	0.83	2.61	4.67	3.59	0.2074
Pa0010	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.00	1.30	2.01	1.66	0.04	3.70	2.45	7.47	0.1862
Pa0216	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.00	3.36	3.00	3.05	0.10	3.23	3.76	5.18	0.2170
Pa0219	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.01	2.93	3.17	2.30	0.94	2.46	4.23	4.65	0.2071
Pa0221	<i>P. elwesi</i>	0.23	0.75	3.32	3.05	2.28	1.05	2.52	3.99	4.74	0.2193
Pa0224	<i>P. elwesi</i>	0.01	2.85	1.63	3.18	2.63	0.51	2.61	4.43	3.84	0.2171
Pa0231	<i>P. elwesi</i>	0.02	0.30	3.48	2.75	2.82	0.18	3.33	2.99	6.08	0.2193
Pa0236	<i>P. elwesi</i>	0.31	0.26	1.41	3.22	3.07	0.48	2.92	4.42	4.36	0.2046
Pa0238	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.01	1.08	2.36	3.42	0.01	3.64	2.68	6.92	0.2012
Pa0242	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.00	4.15	2.94	3.25	0.01	2.99	3.36	5.80	0.2250
Pa0243	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.00	3.10	3.31	2.44	0.90	2.49	4.20	4.61	0.2106
Pa0244	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.07	3.35	2.32	3.21	0.20	2.86	4.56	3.87	0.2044
Pa0245	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.04	1.42	3.01	3.21	0.08	3.15	4.21	4.58	0.1970
Pa0248	<i>P. elwesi</i>	0.02	0.07	0.28	4.48	1.92	0.78	3.51	3.21	6.27	0.2055

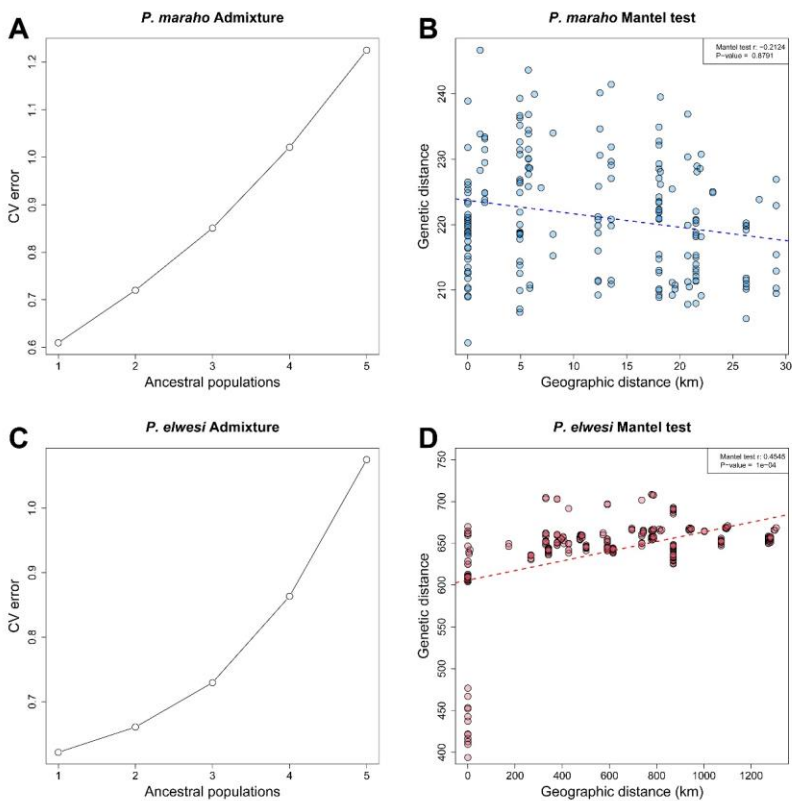
Sample ID	Species	Proportion (%) of R_k rate									F_{ROH}
		64	256	1024	4096	16384	32768	65536	262144	524288	
Pa0315	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.02	1.39	2.75	3.17	0.17	3.12	4.21	4.49	0.1934
Pa0511	<i>P. elwesi</i>	0.26	0.15	1.75	2.99	2.67	0.46	3.10	3.49	5.78	0.2065
Pa0513	<i>P. elwesi</i>	0.00	0.00	0.85	1.89	2.62	0.00	3.73	2.22	7.60	0.1892
Pa0514	<i>P. elwesi</i>	0.02	0.10	0.32	2.57	1.87	0.50	3.36	3.04	6.80	0.1858
Pa0614	<i>P. elwesi</i>	0.02	0.17	1.46	2.63	1.35	0.09	3.55	2.94	7.19	0.1940

表三、不同突變類別之間的 Chi-square test 與統計顯著性

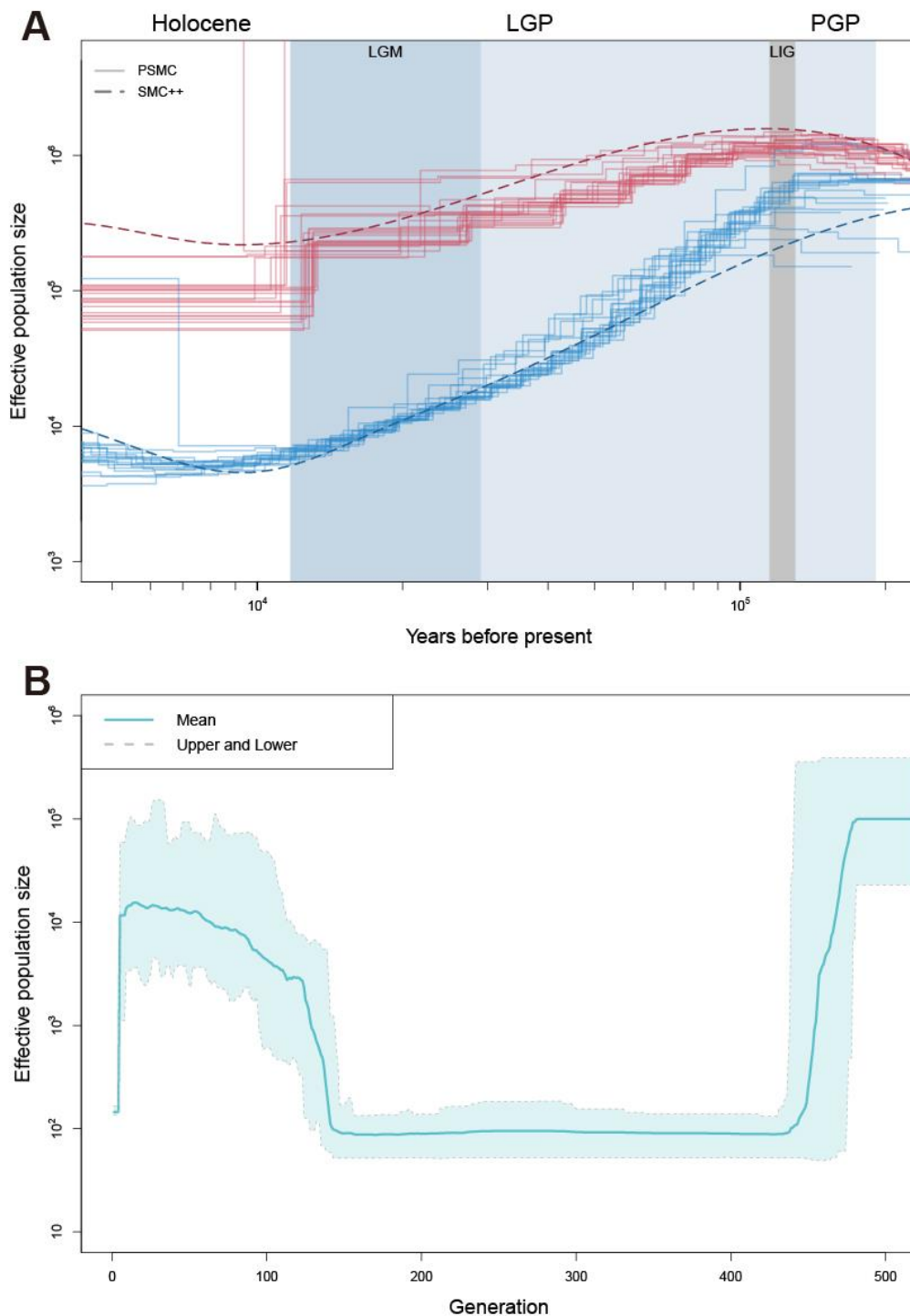
Categories	Group	X^2	p-value
LoF-Synonymous	<i>P. maraho</i>	99.19	< 0.001
LoF-Synonymous	<i>P. elwesi</i> 1	51.46	< 0.001
LoF-Synonymous	<i>P. elwesi</i> 2	46.26	< 0.001
LoF-Synonymous	<i>P. elwesi</i> 3	48.72	< 0.001
Missense-Synonymous	<i>P. maraho</i>	11.74	0.90
Missense-Synonymous	<i>P. elwesi</i> 1	11.34	0.90
Missense-Synonymous	<i>P. elwesi</i> 2	13.34	0.82
Missense-Synonymous	<i>P. elwesi</i> 3	14.47	0.82



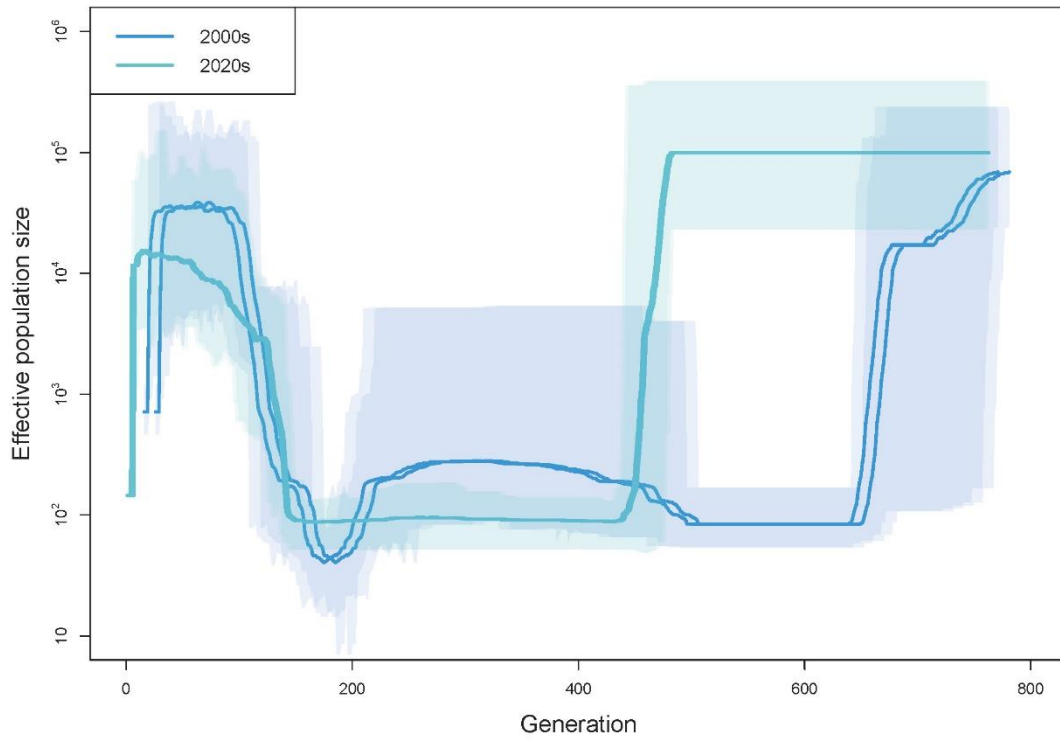
圖一、採樣地點與主成分分析 (PCA) 結果。(A) *P. maraho* 與 *P. elwesi* 在中國大陸與臺灣的採樣分布地圖，(B) *P. maraho* 在臺灣的採樣分布地圖，(C) 基於所有 *P. maraho* 與 *P. elwesi* 個體的 PCA 結果中，PC1 與 PC2 的散佈圖。



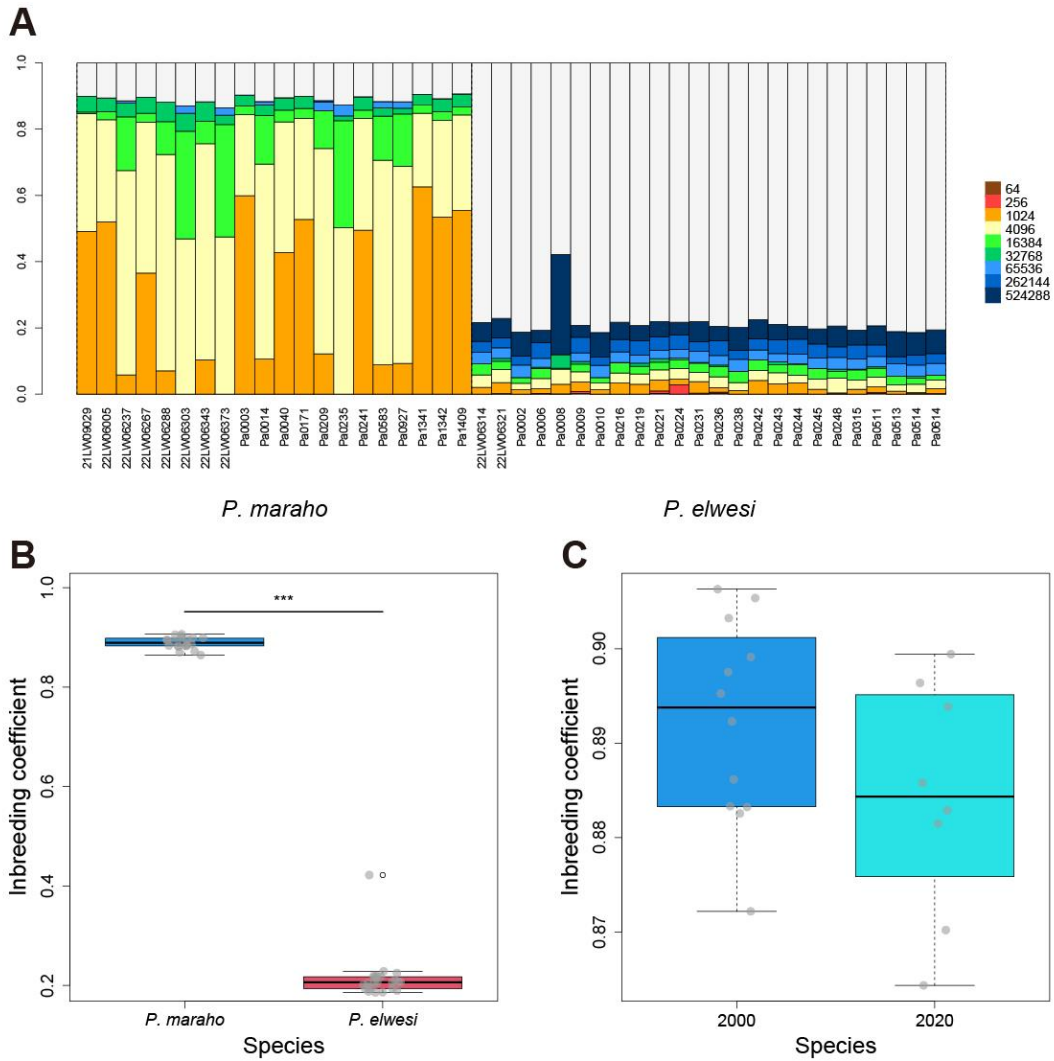
圖二、Admixture 分析與 Mantel test 結果。左側圖顯示 *P. elwesi* (A) 與 *P. maraho* (C) 在不同假設祖先族群數 (K) 下的 CV error。右側圖顯示 *P. elwesi* (B) 與 *P. maraho* (D) 中，樣本兩兩之間的地理距離與歐氏遺傳距離之間的 Mantel 檢定結果。



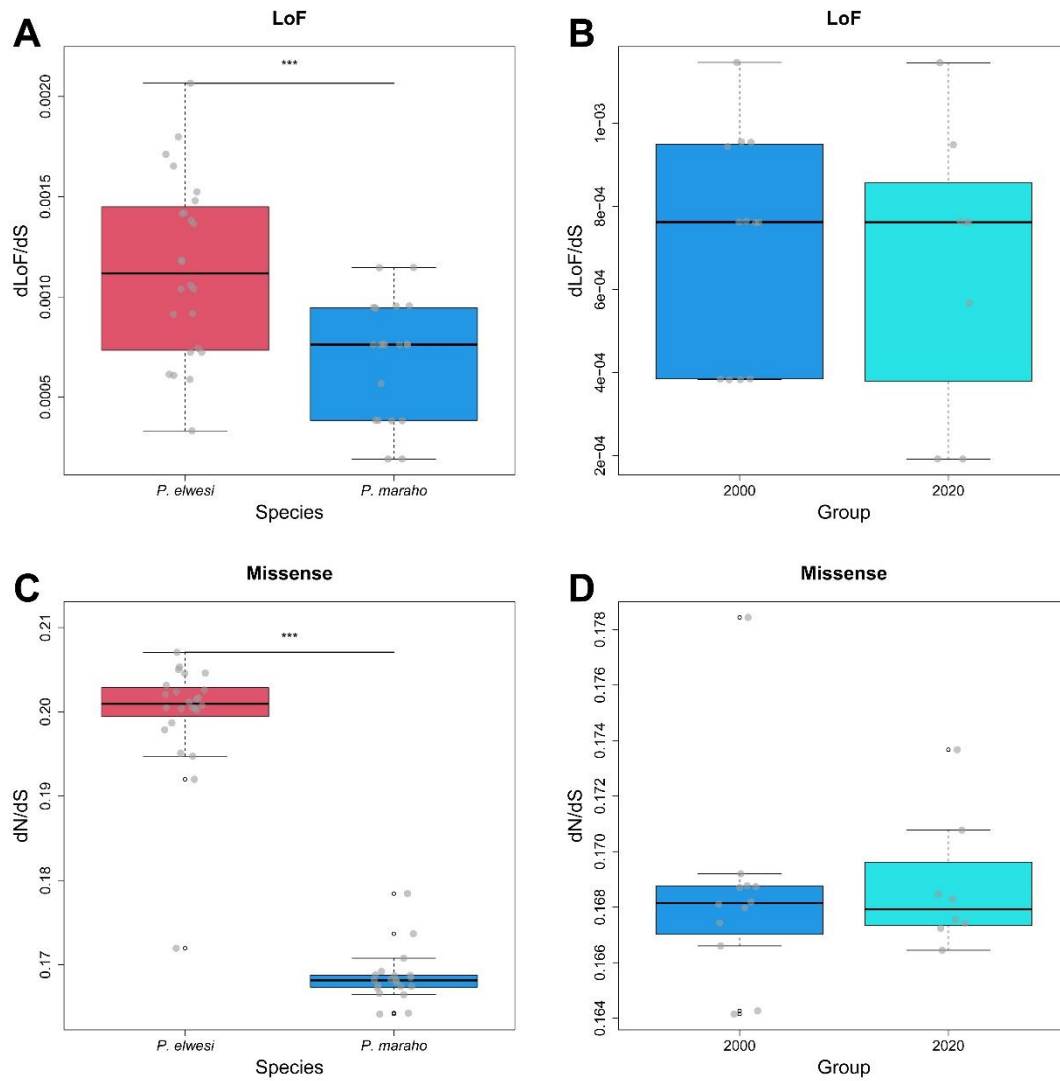
圖三、*P. maraho* 與 *P. elwesi* 在不同時間尺度下的族群大小歷史變化。(A) *P. elwesi* 與 *P. maraho* 在過去 10 萬年內的歷史族群動態。紅色代表 *P. elwesi*，藍色代表 *P. maraho*。每條階梯狀線條為單一個體的 PSMC 結果，深色虛線則表示兩物種分別由 SMC++ 推估的族群大小變化。(B) 由 GONE 推估的 *P. maraho* 在最近 1,000 代內的有效族群大小 (N_e) 變化，；灰色虛線為 GONE 計算結果的上下界。縮寫：LGM，末次盛冰期；LGP，末次冰期；LIG，末次間冰期極盛；PGP，倒數第二次冰期。



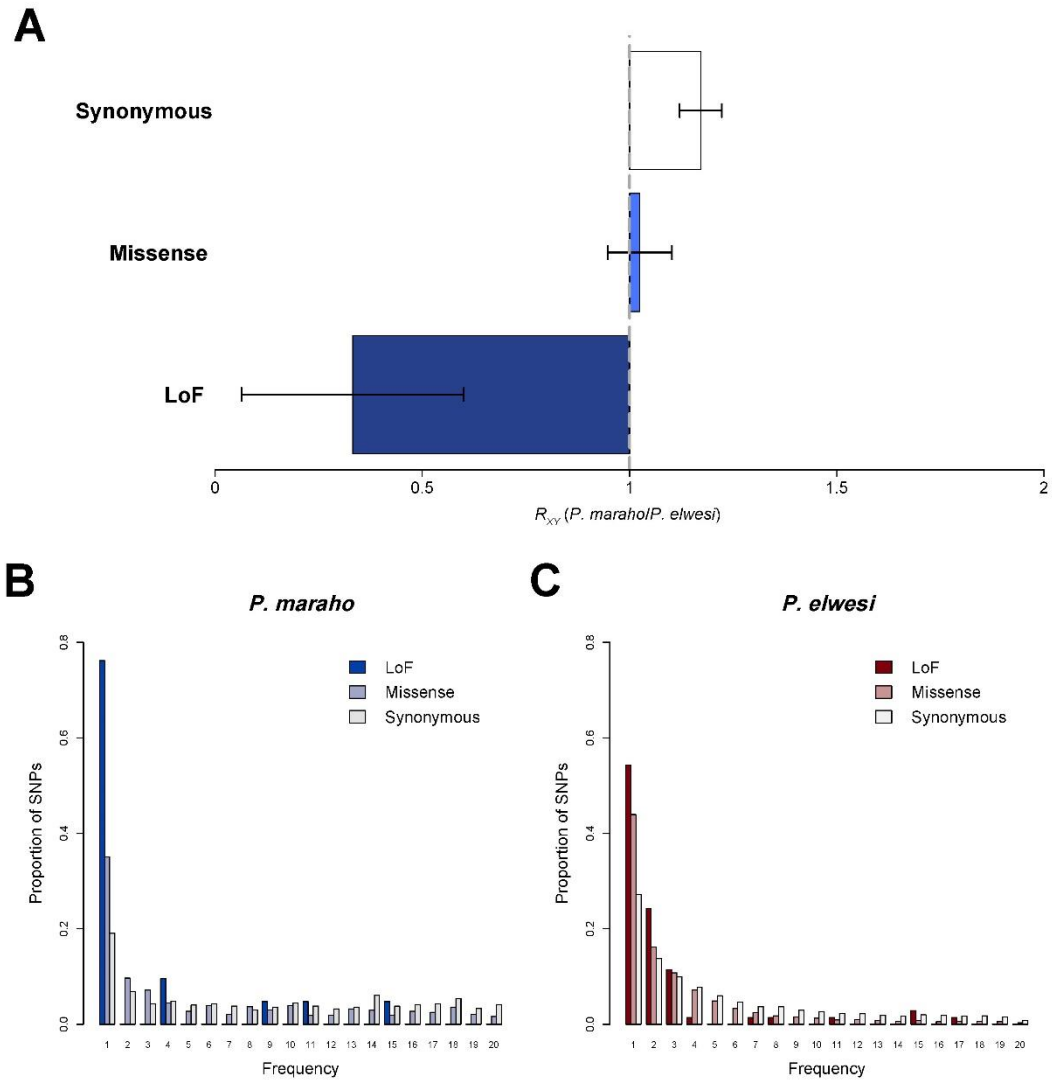
圖四、利用 GONE 進行的 2000 年代與 2020 年代樣本的族群動態推算。實線顯示推估的族群歷史，每個資料集包含兩條代表因採樣年代不同所造成的時間平移；陰影區域表示有效族群大小 N_e 的上下界；不同顏色對應不同資料集。族群動態軌跡的水平位移反映了採樣時間產生的變異。



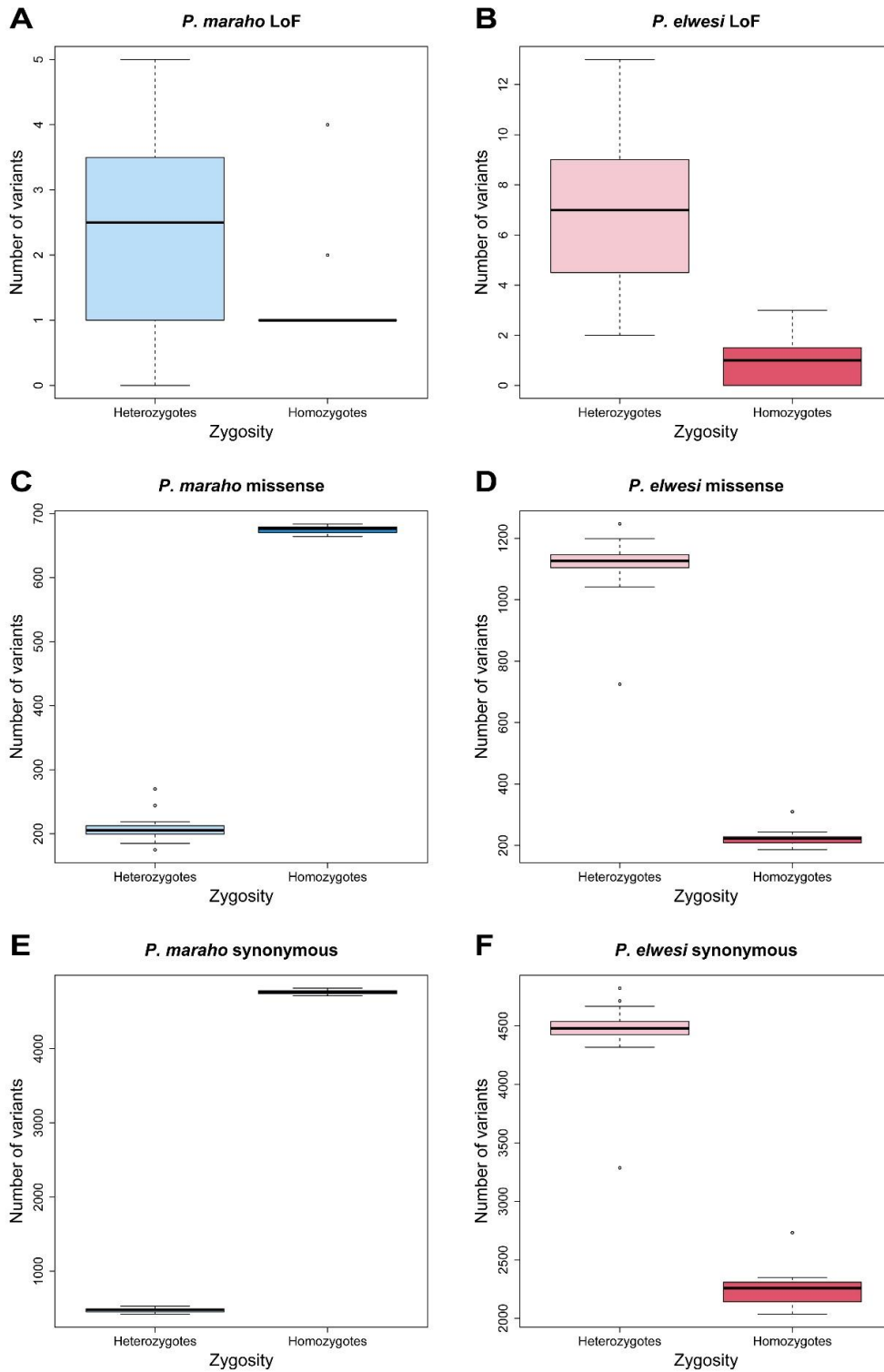
圖五. *P. maraho* 與 *P. elwesi* 的 ROH 片段組成與 F_{ROH} 。(A) 個體 ROH 片段的 R_k 比率分布，不同顏色的區塊表示圖右側欄位所對應的各 R_k 比率。(B) *P. maraho* 與 *P. elwesi* 之間個體近交係數 F_{ROH} 的盒狀圖。(C) *P. maraho* 在 2000 年代與 2020 年代樣本之間個體近交係數 F_{ROH} 的盒狀圖。



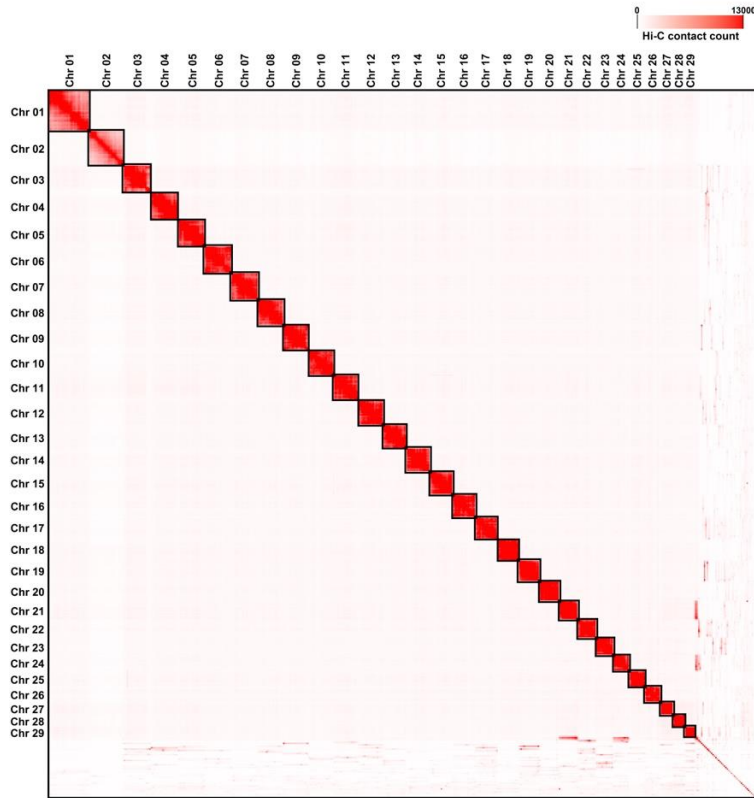
圖六、*P. maraho* 與 *P. elwesi* 間衍生的功能缺失突變比例 ($dLoF/dS$) 及錯義突變比例 (dN/dS) 之比較 (A, C)，以及 *P. maraho* 在不同採集年代 (2000 年代與 2020 年代) 個體之間比較 (B, D)。每一個灰色點代表一個個體。



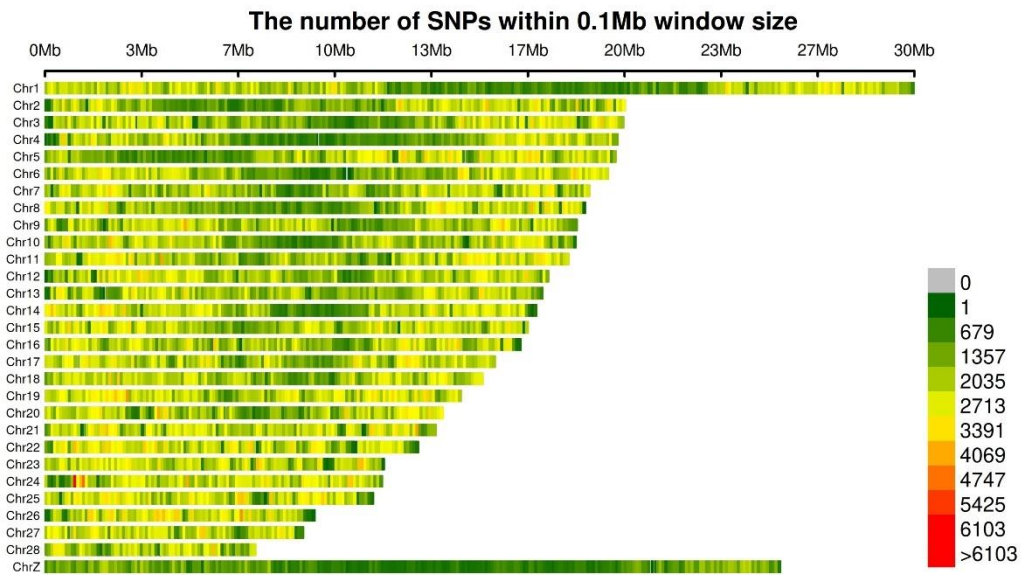
圖七、(A) 三種突變類別的相對可能性比值 R_{XY} 。 $R_{XY} < 1$ 代表 *P. maraho* 相較於 *P. elwesi* 具有較低的等位基因頻率； $R_{XY} > 1$ 則表示較高的等位基因頻率。水平線表示以 jackknife 重抽樣計算之 95% 信賴區間。(B) *P. maraho* 不同突變類別的 SFS。(C) *P. elwesi* 不同突變類別的 SFS。



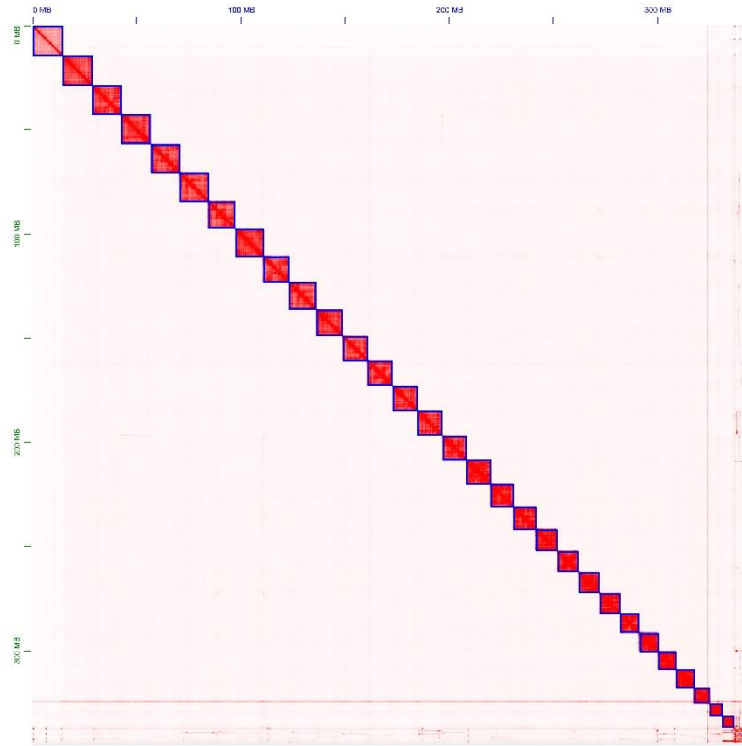
圖八、*P. maraho* 與 *P. elwesi* 各突變類別中的基因型(同型合子/異型合子)分布。所有比較皆顯示兩種基因型之間的變異數具有顯著差異。(A) *P. maraho* 的 LoF 突變 (W = 278, $p < 0.05$)。 (B) *P. elwesi* 的 LoF 突變 (W = 571, $p < 0.05$)。 (C) *P. maraho* 的錯義突變 (W = 0, $p < 0.05$)。 (D) *P. elwesi* 的錯義突變 (W = 576, $p < 0.05$)。 (E) *P. maraho* 的同義突變 (W = 0, $p < 0.05$)。 (F) *P. elwesi* 的同義突變 (W = 576, $p < 0.05$)。



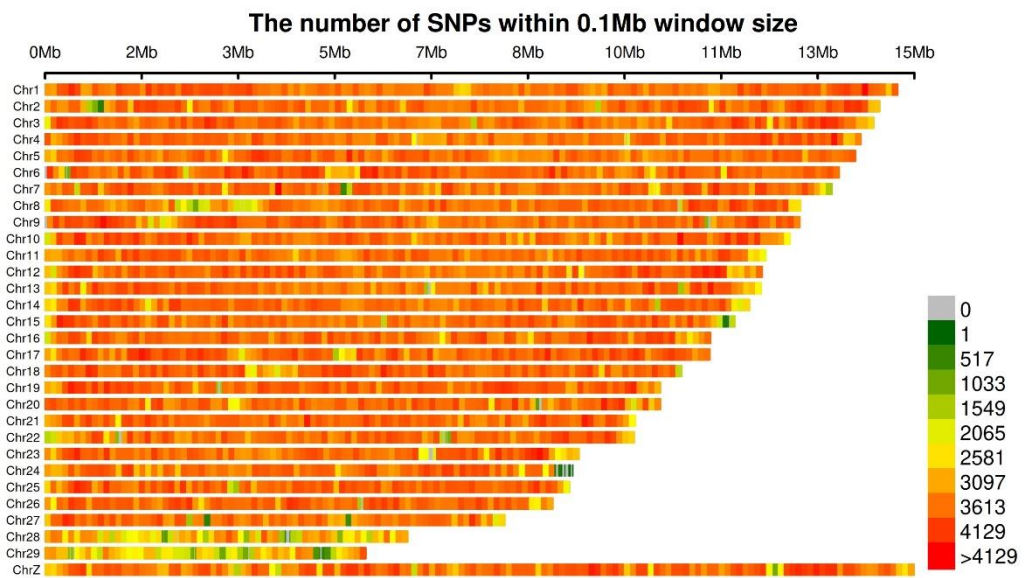
圖九、大紫蛺蝶的 Hi-C 關聯矩陣圖。



圖十、大紫蛺蝶之 SNPs 以每 0.1 Mb 為區間所計算之密度分布圖



圖十一、黃裳鳳蝶之 Hi-C 關聯矩陣圖



圖十二、珠光鳳蝶以黃裳鳳參考基因體分析所獲得之 SNPs 以每 0.1 Mb 為區間所計算之密度分布圖。