

國立臺灣大學生命科學院生態學與演化生物學研究所

碩士論文

Institute of Ecology and Evolutionary Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



透過全基因組核酸多態型資料研究台灣南部埃及斑蚊

在小尺度的族群結構

Fine-scale population structure of Aedes aegypti in southern

Taiwan inferred by genome-wide SNPs

曾奕承

Yi-Cheng Tseng

指導教授：王弘毅 博士

黃旌集 博士

Advisor: Hurng-Yi Wang, Ph.D.

Chin-Gi Huang, Ph.D.

中華民國 112 年 7 月

July, 2023

# 國立臺灣大學碩士學位論文

## 口試委員會審定書

透過全基因組核酸多態型資料研究台灣南部埃及斑蚊

在小尺度的族群結構

Fine-scale population structure of *Aedes aegypti* in southern Taiwan inferred by genome-wide SNPs

本論文係曾奕承君 (R08B44015) 在國立臺灣大學生態學與演化生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國112年6月27日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

考試院考試委員

陳錦生 博士

陳錦生

長庚大學公共衛生暨寄生蟲學科

陳維鈞 博士

陳維鈞

國立臺灣大學公共衛生學系

蔡坤憲 博士

蔡坤憲

國立臺灣大學生態學與演化生物學研究所

李承叡 博士

李承叡

國立臺灣大學臨床醫學研究所 (指導教授)

王弘毅 博士

王弘毅

所長

胡哲明

(簽名)

## 誌謝



首先，非常感謝王弘毅老師在 2020 的那年夏天願意給予我機會，並耐心地指導我，才能成就今天的我，在撥穗典禮老師幫我撥穗的那一刻，我心中百感交集，無法以言語形容的感謝只能化做「老師，真的非常謝謝您」，永久的刻在我心中。感謝黃旌集老師，做為我的共同指導老師，給予了我很多協助與建議，若缺少了老師的指導，我無法完成我的論文。感謝財團法人國家衛生研究院國家蚊媒傳染病防治研究中心的同仁們，謝謝您們提供本研究中所使用的樣本，您們真的辛苦了，沒有您們的話，就不會有這份研究，由衷感謝您們的辛勞。感謝口試委員陳錦生老師、陳維鈞老師、蔡坤憲老師、李承叡老師，在口試時給予我許多的建議與鼓勵，我會銘記於心。

在 R638 實驗室的同儕中，我想最先感謝戴睿紜學長，謝謝你教我寫程式，要是沒有您的幫忙，許多的問題我到現在還是無法解決，我們一起努力一起玩樂的時光，是無法忘記的美好回憶。感謝劉宇恩、陳冠蓁在實驗方面的指導與協助，因為有你們的幫忙，我才能順利完成本研究。感謝游宗翰、王芷琳、呂昊鈞、張永朋、彭翊倫、邱宇晨、陳毓蓉、Carina Terry、江允梵學姊、林鑫甫學長以及曾一起參與實驗室的每位夥伴們，在 meeting 時與平時討論提供良善的意見，我的碩士生涯因你們而完整。

## 摘要



埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)是登革熱(Dengue fever)等蚊媒傳染病(Mosquito-Borne Diseases)主要傳播的媒介。瞭解埃及斑蚊的分布及散播有益於控制病媒蚊的散播。本研究採集了臺南市、高雄市和屏東縣等地 168 個具有明確座標的埃及斑蚊樣本，利用雙切限制酶片段 DNA 定序法(ddRAD-seq)生成的核酸多態性資料，研究台灣南部埃及斑蚊的族群結構和親屬關係。結果顯示，各行政區埃及斑蚊的有效族群量約為兩萬，族群間的遺傳分化程度低。親屬關係分析顯示，表親關係(Loiselle's  $k$ :  $0.093875 > k > 0.046875$ )的蚊蟲最遠可相距 42.8 公里，遠超文獻記錄的自然情況下斑蚊可移動的距離。

另外在小尺度地理範圍(約 4 平方公里)內，不僅在不同行政區間的基因距離 (Rousset's  $a$  scores)有顯著差異，且地理距離與基因距離也呈現顯著的正相關。然而，在橫跨三個縣市的大尺度地理範圍內，本研究預期基因距離與地理距離間的關係可能因為人為活動的影響，而無顯著相關，但結果依然呈現顯著的正相關。但因有相距 42.8 公里的表親關係埃及斑蚊存在，表示人為的交通因素仍然可能影響埃及斑蚊的擴散能力，只是無法從基因距離與地理距離的顯著與否中得知。

關鍵詞：埃及斑蚊、有效族群數量、遺傳分化指數、親屬關係係數、基因距離

# ABSTRACT



This study aims to understand how *Aedes aegypti* spreads and different populations are interlinked. 168 samples were chosen from a dengue vector monitoring network in rural areas of southwestern Taiwan, in combination with the current urban ovitrap system, both of which were established by our team. We used single-nucleotide polymorphisms (SNPs) obtained from double-digest restriction-site associated DNA sequencing (ddRAD-seq) to study the population structure and phylogenetic relationships of *Ae. aegypti* in southern Taiwan. The results indicated that the effective population size of the *Ae. aegypti* in each administrative district is approximately 20,000, with low genetic differentiation between districts.

For understanding the dispersal range of *Ae. aegypti*, I used Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity (SPAGeDi) to calculate the kinship relationship. Then a pairwise relatedness across geographic distance plot was produced with the coordinates of collected samples. The results show that although the separation distances were up to 42.8 km, the pairwise relatedness of first cousin (Loiselle's  $k$ :  $0.093875 > k > 0.046875$ ) still can be found.

Additionally, within a small geographical scale (approximately 4 square kilometers), not only is there a significant difference in genetic distance (Rousset's  $a$  scores) between different administrative districts, there is also a significant positive correlation between geographical distance and genetic distance. However, across a large geographical scale spanning across three counties, contrary to our expectation that there may be no significant correlation between genetic and geographical distance due to human activities, the genetic and geographical distance show a significant positive correlation. However due to the presence of *Ae. aegypti* with cousin relationships as far

apart as 42.8 kilometer, indicating that human transportation factors could have an effect on the dispersal ability of the *Ae. aegypti*.



Key words: *Aedes aegypti*, effective population size,  $F_{ST}$ , kinship coefficient, genetic distance

# 目錄



口試委員會審定書 .....	i.
誌謝 .....	ii.
摘要 .....	iii.
ABSTRACT .....	iv.
表目錄 .....	viii.
圖目錄 .....	ix.
第一章 前言 .....	1.
埃及斑蚊的有效擴散距離 .....	2.
小尺度的族群分化模式 .....	2.
抗藥性基因 .....	3.
沃爾巴克氏體 .....	3.
第二章 材料與方法 .....	5.
1. 研究材料 .....	5.
1.1. 樣本採集 .....	5.
1.1.1. 國內樣本採集 .....	5.
1.1.2. 國外樣本收集 .....	5.
1.1.3. 實驗室樣本 .....	5.
1.2. DNA 萃取 .....	6.
1.3. 雙限制酶切位點標定法 .....	6.
1.4. 序列處理與遺傳多樣性分析 .....	7.
1.5. 主成分分析 .....	8.
1.6. 族群結構分析 .....	8.
2. 親屬關係 .....	9.
2.1. 親屬關係與地理距離 .....	9.
2.2. 可能的有效散佈距離分布 .....	10.
3. 基因距離 .....	11.
3.1. 基因距離與地理距離 .....	11.
3.2. 擴散屏障的評估 .....	11.
3.2.1. 以不同路寬探討道路屏障影響 .....	11.
3.2.2. 以行政區分群探討行政區是否影響擴散 .....	12.
4. 抗藥性基因 .....	12.
5. 沃爾巴克氏體 .....	12.
第三章 結果 .....	13.
資料庫整理 .....	13.
吸血過的埃及斑蚊對分析之影響 .....	13.
1.1. 遺傳多樣性分析 .....	14.
1.2. 主成分分析與族群結構分析 .....	14.
2. 親屬關係與地理距離 .....	16.
2.1. 可能的有效散佈距離分布 .....	17.
3. 基因距離與地理距離 .....	17.
3.1. 擴散屏障的評估 .....	18.
4. 抗藥性基因 .....	18.

5. 沃爾巴克氏體 .....	18
<b>第四章 討論 .....</b>	<b>19</b>
1. 遺傳多樣性分析與族群結構 .....	19
2. 親屬關係與地理距離 .....	19
3. 基因距離與地理距離 .....	20
3.1. 擴散屏障的評估 .....	20
4. 抗藥性基因 .....	21
5. 沃爾巴克氏體 .....	21
<b>第五章 結論 .....</b>	<b>22</b>
<b>第六章 參考文獻 .....</b>	<b>23</b>
<b>表 .....</b>	<b>28</b>
<b>圖 .....</b>	<b>38</b>
<b>附錄 .....</b>	<b>55</b>

## 表目錄

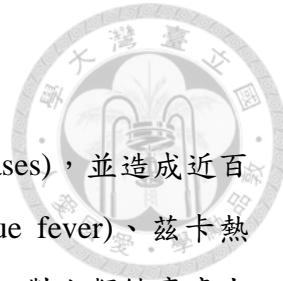


表一、埃及斑蚊各採樣地點之樣本數.....	28.
表二、序列處理的資料整理.....	29
表三、實驗室樣本對回埃及斑蚊( <i>Aedes aegypti</i> )、綿羊( <i>Ovis aries</i> )與人類( <i>Homo sapiens</i> )基因組 .....	30
表四、篩選後的資料整理.....	31
表五、不同採集區埃及斑蚊遺傳多樣性分析.....	32
表六、埃及斑蚊在各行政區之間的遺傳分化指數( $FST$ ).....	33
表七、以不同的標準分析埃及斑蚊可能的有效散佈距離分布.....	34
表八、埃及斑蚊遺傳距離與地理距離的相關性檢驗.....	35
表九、dbRDA 模型的 ANOVAs 分析結果 .....	35
表十、不同地區之埃及斑蚊的抗藥性基因(CCEae3a 與 CYP9J28)的非同義變異位點基因頻率 .....	36
表十一、埃及斑蚊和白線斑蚊的序列對回沃爾巴克氏體( <i>Wolbachia pipiens</i> wAlbB).....	37

## 圖目錄

圖一、埃及斑蚊國內樣本採樣地點.....	38.
圖二、以 1.5% 瓊脂凝膠電泳確認埃及斑蚊的基因組 DNA 的品質 .....	39
圖三、各個樣本的基因座數量分布圖.....	40
圖四、各個樣本的讀取深度分布圖.....	41
圖五、全部埃及斑蚊樣本的主成分分析.....	42
圖六、國內埃及斑蚊樣本的主成分分析.....	43
圖七、台灣鐵路管理局高雄機廠樣區埃及斑蚊樣本的主成分分析 .....	44
圖八、全部樣本的族群結構分析 .....	45
圖九、不計樣本數過少的國內族群的族群結構分析 .....	46
圖十、各 K 值的 estimated log-normal probability of the data.....	47
圖十一、親屬關係與地理距離 .....	48
圖十二、大尺度地理範圍可能的有效散佈距離分布(所有國內樣本).....	49
圖十三、小尺度地理範圍可能的有效散佈距離分布(台灣鐵路管理局高雄機廠樣區) .....	49
圖十四、大尺度地理範圍的遺傳距離與地理距離(所有國內樣本).....	50
圖十五、小尺度地理範圍的遺傳距離與地理距離(台灣鐵路管理局高雄機廠樣區) .....	51
圖十六、以不同路寬探討道路屏障影響 .....	52
圖十七、臺南市、高雄市、屏東市、東港鎮四個地區埃及斑蚊的抗藥性基因 (CCEae3a 與 CYP9J28) 的非同義變異位點基因頻率。 .....	53
圖十八、不同埃及斑蚊和白線斑蚊個體(X 軸)的序列對回沃爾巴克氏體 ( <i>Wolbachia pipiensis</i> wAlbB) 的比例(Y 軸)。 .....	54

# 第一章 前言



全球每年約有數億人感染蚊媒傳染病(mosquito-borne diseases)，並造成近百萬死亡案例[1]。其中埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)為登革熱(Dengue fever)、茲卡熱(Zika fever)及屈公病(Chikungunya)等蚊媒傳染病的主要傳染源，對人類健康產生重大威脅[2, 3]。埃及斑蚊棲息環境與人類居住區域密切相關，傾向在人類居住區域內尋找繁殖場所，其在室內的棲息率為 70–80% [4]，進而增加病毒傳播的風險。

此外，埃及斑蚊在不同溫度下的生態學特徵和發育特性也值得關注。研究發現，埃及斑蚊在各個階段的發育皆受溫度影響甚大[5]。在 12°C 以下或 40°C 以上的環境，埃及斑蚊的卵無法孵化。而在 16–36°C 範圍內，隨著溫度升高則卵孵化所需的天數會降低[6, 7]。台灣的氣候溫暖潮濕，夏季平均氣溫為 28°C，冬季為 15°C[8]，條件適合埃及斑蚊繁殖。臺灣夏季的溫度在攝氏 24 至 35 度間，此時埃及斑蚊卵孵化需約 3 天、幼蟲到蛹需要 6 至 14 天、成蟲壽命則是 18 至 28 天[9]。

埃及斑蚊在台灣主要分布於嘉義縣、臺南市、高雄市、屏東縣、臺東市等台灣南部縣市以及外島的澎湖縣馬公市[10]。因為冬季溫度偏低的關係，埃及斑蚊仍尚未向台灣北部擴散[11]。然而當今全球暖化日益嚴峻[12]，可能縮短蚊蟲發育的時間，或是加速病原的繁殖發育，甚至助長埃及斑蚊向北擴散[13]，對疾病傳播有著嚴重影響。

隨著全球氣候變化和都市化的加劇，蚊媒病毒的傳播風險持續升高[13]，預防和減少此類疾病的爆發主要依賴於對病媒蚊傳播的控制[14]。常規的方法包括減少源頭或以殺蟲劑撲殺來抑制埃及斑蚊的數量[15]。為了降低蚊媒病毒的傳播風險，制定更有效的防疫措施，有必要瞭解病媒蚊之基礎生態學及微演化(microevolutionary)過程[16-18]。例如透過遺傳資訊來推測蚊蟲在小尺度(fine scale)的活動範圍、族群分化、以及適應性基因組變化(adaptive genomic changes)，有助於了解埃及斑蚊的擴散以及殺蟲劑抗藥性形成[18, 19]。以上這些資料，可以更精確地預測和防範登革熱等疾病的傳播風險。也有助於制定針對性的防治策略與範圍，降低防治成本和提高防治效果，對於制定有效的病媒防治措施至關重要。



## 埃及斑蚊的有效擴散距離

要控制蚊媒傳染病的傳播主要通過控制蚊蟲媒介解決[14]，因此瞭解蚊蟲的擴散行為對於制定有效的病媒蚊控制策略至關重要[20, 21]。蚊蟲的擴散途徑可能有以下幾種：依靠成蟲自身的飛行能力、空氣流動或受人類活動的影響而移動到自身無法抵達的地方[22]。如果人類交通工具影響埃及斑蚊的散佈，則控制登革熱傳播的範圍需考量人類活動的途徑，且要在較大的範圍內使用殺蟲劑。但若蚊蟲的擴散受人為影響不大，主要依賴成蟲主動的飛行等非人為因素，則在控制疫情上可以縮小防疫的範圍。

依據標示再捕捉法(mark-release-recapture, MRR)的研究，雌性埃及斑蚊在尋找適合的產卵地點時，移動距離約可至 500 公尺[23-25]，也有文獻表示埃及斑蚊在都市中的移動距離可能低於 50 公尺[26]，然而使用傳統的標示再捕捉法測量擴散在實際操作上具有挑戰性，而且飼養和標記過程可能會改變蚊蟲在野外的適應性和運動行為[27]。

空間遺傳學方法為解決這一問題提供了新的契機，透過採自不同地區彼此間有親屬關係的個體，可評估蚊蟲的有效擴散距離，並估計擴散核心(dispersal kernel)的估計[28-30]。本研究分析埃及斑蚊的遺傳資訊，佐以它們的 GPS 定位資訊，估計台灣南部埃及斑蚊(*Ae. aegypti*)的有效擴散距離，作為制定控制計劃提供重要信息。

## 小尺度的族群分化模式

過去在小尺度地理範圍研究中，同縣市不同行政區之間的埃及斑蚊對不同殺蟲劑有不同的抗藥性[31, 32]，然而在許多研究發現不同縣市或地區的都市中，埃及斑蚊卻沒有族群分化的現象[33-36]。因此推測在小尺度的地理範圍上，埃及斑蚊藉由自身的飛行能力，可以達到地理距離與基因距離成正比的關係(isolation by distance)[37]。但在超過自身飛行能力的距離外，蚊蟲藉由人類運輸媒介做更長距離的移動，因此可能因為人為活動影響導致地理距離與基因距離並非成正比的關係[38]。

為了瞭解埃及斑蚊在不同尺度的分化模式，本研究選擇在高雄市鳳山區武慶二路 221 號的台灣鐵路管理局高雄機廠附近半徑一公里內，三個區級行政區的交界(分別為苓雅區、前鎮區、鳳山區)。探討在小尺度範圍內，不同行政區間的不

同的防疫方式下是否可能成為埃及斑蚊遺傳分化的原因之一。此外過去的研究發現都市中的道路對埃及斑蚊擴散有著顯著的阻礙效果[38]。為了評估台灣的道路與行政區劃是否有阻隔埃及斑蚊擴散的作用，本研究針對設於台灣鐵路管理局高雄機廠附近密集採樣的樣本進行分析。除了探討埃及斑蚊的在不同尺度上的遺傳分化。也試圖在小尺度的樣區藉由密集採樣探討台灣的道路、不同行政區是否有阻隔埃及斑蚊擴散的作用，使埃及斑蚊在小尺度的地理範圍產生遺傳分化。

### 抗藥性基因

在台灣南部地區埃及斑蚊是登革熱的主要傳播媒介，而化學防治不僅是控制和預防蟲媒疾病的一種重要措施，在疾病爆發時更是阻止病原擴散，最有效的方法。然而使用殺蟲劑可能使蚊蟲抗藥性的產生與增加，進而增加後續防治的困難。因此瞭解抗藥性相關資訊，將有助於增進藥劑防治的使用效益[19]。本研究在探討野外利用陷阱捕捉到的埃及斑蚊，是否在抗藥性基因方面出現突變，希望藉由探討台灣地區埃及斑蚊的抗藥性機制，為制定更有效的防治策略提供有力的參考依據。

### 沃爾巴克氏體

沃爾巴克氏體屬 (*Wolbachia*) 是立克次體目 (Rickettsiales) 無形體科 (Anaplasmataceae) 的一屬，主要感染節肢動物以及部分線蟲的細菌，許多文獻表示感染沃爾巴克氏體(*Wolbachia spp.*)的斑蚊會降低登革熱病毒在斑蚊體內的複製，進而抑制登革病毒量、減少登革熱的傳染[39-42]，故近年來常作為防治策略的選項。白線斑蚊在野外可以自然情況下感染沃爾巴克氏體[43]，而埃及斑蚊則尚未發現在野外有感染之情形，因此本研究想藉由 ddRAD-seq 資料，探究野外埃及斑蚊是否可能出現野外自然感染的跡象。

本研究配合由財團法人國家衛生研究院國家蚊媒傳染病防治研究中心建立的登革熱病媒蚊監測系統與誘卵桶陷阱系統，取得有明確地理位置座標的樣本。通過研究不同地區間和小尺度地理範圍內的族群結構和遺傳多樣性，了解埃及斑蚊在臺南、高雄、屏東三個地區的分布特性。同時也在小尺度的地理範圍，透過密集性的採樣，探討小尺度地理範圍內的埃及斑蚊在小族群間基因距離上是否存在差異，或是否與大尺度的分析結果存有差異。

然而傳統的遺傳標誌(genetic markers)方法，如簡單重複序列(simple sequence repeat, SSR)，無法精確鑑別細微的遺傳差異[44]。而全基因組定序(whole-genome sequencing, WGS)，雖然可以提供全面的遺傳信息，但成本過高，不適合大規模樣本分析。

過去已有的許多關於埃及斑蚊的研究皆利用雙切限制酶片段 DNA 定序法(double-digest restriction-site associated DNA sequencing，以下簡稱 ddRAD-seq)[45]來分析小尺度上的分化[38, 46-49]。與傳統方法相比，ddRAD-seq 具有以下優勢：1. 獲得接近全基因組水平的單核苷酸多態性(single-nucleotide polymorphism，SNP)資料，提高分析精確度。2. 成本遠低於全基因組定序，適合大規模樣本分析。3. 可以應對實際研究中的複雜情況，適用於不同尺度的遺傳分析。故本研究選擇 ddRAD-seq 來分析埃及斑蚊在台灣南部的遺傳多樣性和族群結構，並測試相關假設。

本研究共分成五個部分，第一部分研究埃及斑蚊的遺傳多樣性、族群結構，對台灣南部的埃及斑蚊做初步的認知。第二部分利用埃及斑蚊間的親屬關係(kinship coefficient)推算可能的有效散佈距離。第三部分利用個體間的基因距離(genetics distance)探討埃及斑蚊的擴散在大尺度與小尺度地理範圍的差異，以及利用小尺度的地理範圍的密集採樣，探討細微的族群結構差異。第四部分比對野外埃及斑蚊 DNA 序列中幾種常見的抗藥性基因(resistance gene)，了解台灣南部的埃及斑蚊是否帶有抗藥性基因突變。而最後第五部分則是探討野外埃及斑蚊感染沃爾巴克氏體(*Wolbachia*)的可能性。由於台灣為蚊媒病毒傳播的高風險區域，因此希望這個針對台灣的埃及斑蚊的研究結果，能在制定合適的公共衛生策略、防控制蚊傳播上盡一份心力。

## 第二章 材料與方法



### 1. 研究材料

#### 1.1. 樣本採集

##### 1.1.1. 國內樣本採集

本研究的研究物種埃及斑蚊(*Ae. aegypti*)，是利用財團法人國家衛生研究院國家蚊媒傳染病防治研究中心所建立的有 GPS 定位的誘卵監測桶，針對台南、高雄、屏東三個縣市進行病媒蚊的蚊卵採集，於每周至誘卵桶中採集蚊卵回實驗室中孵化，並飼養孵化後之幼蟲直至成蟲或 4 齡幼蟲後鑑定，最後使用 95% 酒精保存。此次研究中。根據地區篩選出 168 個樣本，分別採集於臺南市中西區( $n=9$ )、臺南市南區(9)、高雄市鳳山區(35)、高雄市苓雅區(24)、高雄市前鎮區(32)、高雄市三民區(17)、屏東縣屏東市(18)、屏東縣東港鎮(18)、屏東縣萬丹鄉(3)、屏東縣潮州鎮(3)，如表一與圖一。其中高雄市三民區樣本與部分高雄市鳳山區(16 個)樣本，共 33 個採集時間於西元 2019 年 6 月至 12 月，其餘樣本採集時間皆於西元 2020 年 10 月至西元 2021 年 2 月(詳見附錄)。

##### 1.1.2. 國外樣本收集

本研究中也使用來自 4 個不同的國家的 8 個外國樣本，分別來自印尼(3 個)、越南(2 個)、聖多美(2 個)、泰國(1 個)。

##### 1.1.3. 實驗室樣本

本研究所使用的陷阱捕獲之埃及斑蚊皆由「誘卵陷阱桶」捕獲，將捕獲之蚊卵帶回實驗室中孵化、飼育後置於 95% 酒精中保存，並不存在有吸食其他動物血液之可能。

但為了瞭解若在「誘殺陷阱桶」捕獲腹內已有其他動物血液的埃及斑蚊時，是否影響後續實驗分析，故將實驗室繁殖的埃及斑蚊一雄一雌為一組，分為 A、B、C 三組，並讓同組埃及斑蚊產生子代，接著讓 A、B 組的子代餵以綿羊(*Ovis aries*)血，C 組的子代餵以人血，然後將吸血過的子代分別於吸血後的當天(Day 0)、吸血後三天(Day 3)及吸血後七天(Day 7)採樣。每組 2 個親代樣本、3 個子代樣本，三組共計 15 個實驗室樣本於本次實驗中使用。本研究實驗室的埃及斑蚊品系為「高埃 lab」來自高雄三民區，且親代樣本在實驗室繼代已達 279 代，子代樣本則

為第 280 代。

總計使用 168 個陷阱捕獲的台灣樣本，8 個國外樣本，15 個實驗室樣本，共 191 個樣本(表一)。



## 1.2. DNA 萃取

將採集的埃及斑蚊根據 DNA 萃取試劑套組(FavorPrep<sup>TM</sup> Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit, Cat: FATGK 001-1)之實驗操作手冊進行萃取，流程中加入 5 $\mu$ l RNase A，最後以體積 25 $\mu$ l 的去核酸酶水(nuclease-free water)進行回溶。接著以凝膠電泳檢查樣本之品質，如若樣本呈現如圖二第三道(lane)的模糊(smear)現象，將會移除該樣本，並以同陷阱桶或附近的其他陷阱點之樣本取代，重新抽取 DNA。最後以 Qubit 2.0 螢光計檢查樣本的濃度，篩選刪除 gDNA(genomic deoxyribonucleic acid) 總量小於 200 毫微克(ng)的樣本。

## 1.3. 雙限制酶切位點標定法

以 DDsilico 軟體[49]分析埃及斑蚊的基因組，結果顯示使用 NlaIII(5'-CATG-3')和 MseI(5'-TTAA-3') [50]此兩種限制酶進行酶切，讀取序列長(read length)為 350 至 450 bp 的序列數共有 117,548 個，優於其他限制酶組合，故使用此組限制酶組合。

抽取的 DNA 樣本交由國立台灣大學生命科學院的科技共同空間(Technology Commons，以下簡稱 TechComm) 建庫。TechComm 的建庫方式是依照 Peterson et al.的實驗步驟 [45]，建立 9 個資料庫(library)後，以下列配方配置主混合液(master mix):10X 3 $\mu$ l NEB SmartCut Buffer、0.5 $\mu$ l NlaIII(5U, 10U/ $\mu$ l)、0.1 $\mu$ l MseI(5U, 50U/ $\mu$ l)、6.4 $\mu$ l 的去核酸酶水。接著在每個 DNA 濃度為 10 ng/ $\mu$ l、體積為 20  $\mu$ l 的樣本中(200 ng DNA)加入體積為 10 $\mu$ l 之主混合液，然後於 37°C 下反應至隔天。

以 0.5-1x AMPure 清潔樣本(保留介於 1kb 至 200bp 的 DNA 片段)，再加入 20 $\mu$ l 的 0.1mM Low TE 後執行 resuspend beads，接著以 Qubit HS kit 定量所有樣本之濃度。隨後以 3 $\mu$ l T4 DNA ligase buffer、0.2 $\mu$ l T4 DNA ligase、high concentration(400U, 2000U/ $\mu$ l)、1 $\mu$ l Universal adapter(MseI, 5 $\mu$ M)、4.8 $\mu$ l 的去核酸酶水配置連接反應混合液(ligation mix)在每個樣本中加入 1  $\mu$ l SbfI BCA (5 $\mu$ M)與

9 $\mu$ l 的混合液，並於 16°C 下進行至少 3 小時的反應，藉此使 T4 DNA 連接酶在樣本中的序列上連接一組特定的條碼(barcode)。之後，將樣同一資料庫(library)的樣本集中置於一個 2mL 離心管中，同一管之體積不超過 720 $\mu$ l，接著依接著照 AMPure protocol 清潔樣本，最後加入 30 $\mu$ l 的 Low TE 後執行 resuspend beads。

使用 PCR 確認片段大小，首先以 10 $\mu$ l Q5 2X Master Mix、1 $\mu$ l FC1(10 $\mu$ M) INDEXED primer、1 $\mu$ l FC2(10 $\mu$ M) common primer、2 $\mu$ l Ligation elute、6 $\mu$ l 的去核酸酶水，配置 20 $\mu$ l 反應液，接著以下列條件執行 PCR: 98°C 30 秒、12 回合的「98°C 10 秒、60°C 15 秒、72°C 15 秒」、72°C 7 分鐘、維持在 4°C。以 6% Invitrogen TBE 凝膠執行電壓 80V 的電泳 90 分鐘。

接著將膠片放入 50mL TBE 緩衝液中，並加入 5 $\mu$ l SYBR 凝膠染色劑(Gold Gel Stain, Invitrogen)後搖晃 15 至 20 分鐘，隨後將凝膠上 350 至 450 bp 的 DNA 片段切下後，置於 1.5mL 離心管離心五分鐘，再加入 100 $\mu$ l 的去核酸酶水，並確保壓碎的凝膠溶於水中，最後於室溫下搖晃離心管至隔天。

將前述產生的碎膠放入有篩網的純化離心管(spin columns)中，藉由離心篩出後，以 AMPure beads 進行純化。接著使用 Q5 high fidelity PCR kit 將 Bar-Coded DNA 片段，使用與前述相同方式增幅(amplify)，增幅後再以 AMPure Beads 純化。最後藉由 Agilent 2100 (High-Sensitivity Kit protocol) 進行生物分析儀的(BioAnalyzer)片段分布與品質檢查，並送至基龍米克斯生技公司以 Illumina Novaseq 6000 依照 150 bp paired-end read 執行定序。

#### 1.4. 序列處理與遺傳多樣性分析

首先使用 Stacks2 v.2.59[51]的 process\_radtags 檢查並修正原始讀取序列(raw read)中的條碼(barcode)和 RAD 切點(cutting site)，並且以 15% 序列長度的滑動視窗(sliding window)篩選序列品質，保留 phred score 大於 10 的序列，刪除正確率低於 90% 的序列。

接著使用 bwa mem v0.7.17 [52]，設置參數: A (matching score) = 1 ; B (mismatch penalty) = 7，將篩選後的讀取序列(reads)對回至埃及斑蚊基因組 (*Ae. aegypti* strain: LVP\_AGWG, BioProject Accession: PRJNA392114)，保留序列錯誤率(sequence error rate)小於 1% 的序列(錯誤率公式為:  $0.75 \times \exp(-\log(4) \times B/A)$ )，A=1、

B=7 時，序列錯誤率約為 0.01109)。

最後使用 Stacks2 中的 `gstacks` 將已對回基因組的資料統整並建立基因座(locus)資料，再以 Stacks2 中的 `populations` 執行族群遺傳統計的運算。其中將參數 R (min-samples-overall) 設為 0.8，保留 80% 樣本數共有的基因座，計算核苷酸的核苷酸多態性位點(polymorphic sites)、核苷酸歧異度(nucleotide diversity,  $\pi$ )、遺傳分化指數(fixation index,  $F_{ST}$ )等資訊，並產生 vcf (variant call format) 資料，供後續分析使用。

## 1.5. 主成分分析

主成分分析(principal components analysis, PCA)，一種以線性轉換的方式，將相關變數的觀測值資料降低維數的簡化數據集統計分析方法[53]。本研究使用 vcf 檔案的 SNP 資料，以 R package “vcfR”[54] 讀取 vcf 檔案，再藉由 R packages “poppr”[54] 中的 function `vcfR2genlight` 將 data set 轉成 genlight object，之後藉由 function `glPca` 和 `ggplot` 產生 PCA plot。

## 1.6. 族群結構分析

為了研究埃及斑蚊在各行政區的族群結構，本研究使用程式 STRUCTURE v2.3.4[55]，將模擬的族群數 K 值設定為 2 到 7。在進行 3 次重複運算，每次的 burn-in 設定為 100,000，MCMC(Markov chain Monte Carlo) 設定為 200,000，透過等位基因頻率計算特定基因型來自基因群集(genetic cluster)的機率。

在檢測真實的 K 值方面，通常使用 STRUCTURE 輸出的最大值「 $\ln P(D)$ 」(estimated log-normal probability of the data) 作為判斷真實 K 值的依據。但是 STRUCTURE 手冊中[56]提到，一旦達到真實 K 值，比真實 K 值更大的 K 值下的  $\ln P(D)$  值會達到平穩或略微增加，所以將最先到達平穩的 K 值判斷為最佳 K 值。



## 2. 親屬關係

### 2.1. 親屬關係與地理距離

許多文獻中提及在執行親屬關係分析前需先篩選符合聯鎖平衡(linkage equilibrium)以及哈溫平衡(Hardy-Weinberg Equilibrium)的點位[38, 49, 57]。連鎖不平衡(linkage disequilibrium, LD)是指給定群體中不同位點的等位基因之間的非隨機聯合。這種現象可能是由於遺傳漂變、群體瓶頸和天擇等因素引起的[58]。在遺傳研究中，連鎖不平衡可能會混淆親屬關係的推斷 [59]。但本研究的目的是篩除「彼此間較靠近」且存在連鎖不平衡的位點，同時保留「彼此間相距較遠」但仍存在連鎖不平衡的位點，以確認親屬關係的存在，因為「彼此間較靠近」位點較容易產生連鎖不平衡效應[59]，反之「彼此間相距較遠」的位點，產生連鎖不平衡的機率就較「彼此間較靠近」的位點來得低，甚至「彼此間相距較遠」的連鎖不平衡位點有更高的機率是來自遺傳[60]，藉此可以更加的確認樣本間的親屬關係，因此本研究使用 50 kb (kilobase pair) 以及 5kb 兩種不同的滑動視窗大小，並皆以每 1 個變異位點為單位進行滑動的作為篩選條件，保留 linkage equilibrium  $r^2 < 0.2$  的連鎖位點，藉此比較不同滑動視窗大小是否存在差異。

關於哈溫平衡部分，由於本次研究涉及的地理區域涉及台灣南部三個縣市，兩相距最遠的樣本可達 65 公里，當涉及的地理區域範圍較大時，考慮到不同地理區域的族群可能存在顯著的遺傳結構差異，這意味著在這些族群中，基因頻率的變化可能不是均勻的。在這種情況下，使用 HWE  $p$ -value  $< 0.05$  的篩選條件可能會過於嚴格，導致很多具有地理區域特徵的遺傳變異被排除，從而影響對親屬關係的推斷[61]。在本研究中，本研究將篩選條件調整為  $10^{-3}$  和  $10^{-4}$ 。這樣可以在消除可能由於遺傳漂變、選擇等因素導致的顯著違反 Hardy-Weinberg 平衡的位點的同時，保留在不同地理區域具有代表性的遺傳變異。

親屬關係的分析部分，首先將 stacks2 populations 所產生 vcf 檔案，經由 VCFtools [62] 篩選，保留次要等位基因頻率(minor allele frequency, MAF)大於 0.05 且平均讀取深度(read depth)大於 5 的 SNP，接著使用 SPAGeDi v1.5[63] 計算 Loiselle 的親屬關係係數  $k$  (Loiselle's kinship coefficients  $k$ ) [64]。依照參考文獻[38, 65, 66]判定親屬關係，Loiselle's  $k$  大於 0.1875 的親屬關係為全手足關係(full-sibling)；介於 0.1875 至 0.09375 的親屬關係為半手足關係 (half-sibling)；介於

0.09375 至 0.046875 判定為表親(first cousin)，並將埃及斑蚊分為全手足、半手足、表親及非近親(non-close kinship)四類親屬關係，而藉由全手足、半手足、表親等近親關係可以推測埃及斑蚊的可能的有效散佈事件數量(the number of possible effective dispersal events)。

## 2.2. 可能的有效散佈距離分布

一對近親關係的個體所相距的地理距離，代表一至數個世代間成功繁殖且散佈的結果，每一種近親關係(全手足、半手足、表親)都有各自的有效散佈事件數量，藉由文獻[65]的方法，將近親關係間的地理距離除以該種親屬關係可能的散佈事件數量，得到一個世代的「有效的散佈距離」。結合所有近親關係的可能有效散佈距離資料，使用 R package *fitdistrplus* [67]，建立有效散佈距離的機率密度函數。依照文獻[65]中的舉例來說，一對關係為表親的埃及斑蚊相距  $x$  公尺，則依照此親屬關係與距離推測出來的可能有效散佈距離(possible effective dispersal distances)則為  $\{x/2, x/3, x/4, x/5\}$ 。

然而在本次研究中，使用的陷阱類型為誘卵陷阱桶，與誘殺陷阱桶相異之處在於誘卵陷阱桶本身就是繁殖地點，不會有採集到的一對斑蚊是從各自的繁殖地點飛進各自採樣陷阱的這兩段飛行事件，故在上述文獻[65]中提到的可能的散佈事件集合，全手足= $\{2, 3\}$ 、半手足= $\{2, 3, 4, 5\}$ 、表親= $\{2, 3, 4, 5\}$ ，在本研究中每個飛行事件數量都需要再減 2，應改成全手足= $\{1\}$ 、半手足= $\{1, 2, 3\}$ 、表親= $\{1, 2, 3\}$ 。而可能有效散佈距離則為全手足= $\{x/1\}$ 、半手足= $\{x/1, x/2, x/3\}$ 、表親= $\{x/1, x/2, x/3\}$ 。

結合所有近親關係(close kinship)，包含全手足、半手足、表親)所推測出來的可能有效散佈距離，使用 R package *fitdistrplus*[67]，結合最大似然估計法(maximum likelihood estimation)和有母數自舉法(parametric bootstrap)建立指數分布(exponential distribution)以及韋伯分布(Weibull distribution)兩種分布的有效散佈距離的機率密度函數(probability density function, pdf)。



### 3. 基因距離

#### 3.1. 基因距離與地理距離

為了驗證地理距離與遺傳分化間的關係，是否符合前言中提到的假說：在小尺度的地理範圍上，地理距離與基因距離成正比的關係；但在超過自身飛行能力的距離外的大尺度範圍，因人為活動影響，使基因距離與地理距離間的關係並無顯著相關。本研究參考文獻[38] 中的小尺度地理範圍，並將台灣鐵路管理局高雄機廠樣區(圖一 C)定義為本研究的小尺度的地理範圍，而大尺度地理範圍則設為圖一 A 中本研究所使用的所有台灣樣本。

接著本研究使用 SPAGeDi [63] 計算兩樣本間的基因距離 Rousset's a scores [68]，再以 R 語言中的 lm(linear model) function，檢視兩樣本間的地理距離與基因距離之線性關係(linear relationship)的斜率(slope)是否為正比關係，過去研究發現基因距離與地理距離的自然對數較接近線性關係[65, 69]，故以地理距離的自然對數執行分析。

除此之外，本研究也利用 R package “ecodist”[70] 以 1,000 permutations 執行 Mantel's correlation test[65]，判定地理距離的自然對數與基因距離是否有顯著相關。在小尺度地理範圍，本研究選擇在台灣鐵路管理局高雄機廠周圍(圖一 C)的樣本進行分析，共 75 個樣本。而大尺度的部分則是選用本研究中所有國內樣本(臺南、高雄、屏東)共 168 個執行分析。

#### 3.2. 擴散屏障的評估

##### 3.2.1. 以不同路寬探討道路屏障影響

在擴散屏障的評估(assessing barriers to dispersal)部分，於台灣鐵路管理局高雄機廠周圍，以街道分成 10 個區塊(block) (圖一 D)，探討不同路寬的道路是否對埃及斑蚊的移動有影響，本研究將區塊兩兩比較，以下列配對組進行討論：Ly1-Ly2, Ly2-Ly3, Ly1-Fs1, Fs1-Fs3, Fs3-Qz1, Qz1-Qz2, Qz3-Qz4，以 Qz4 及 Qz3 做為例子，本研究將 Qz4、Qz3 兩區的參數分別設為 0 和 1，並使用 SPAGeDi [63] 計算基因距離 Rousset's a scores [68]，接著使用 R package VEGAN [71] 中的 function *capscale* 配合每個個體各自擁有的參數，兩兩個體配對的基因距離資訊(Rousset's a scores)建立基於距離的冗餘分析(distance-based redundancy analyses, dbRDA)[72]

模型。最後以變異數分析(analysis of variance, ANOVA)檢測基因距離在個不同的區塊中是否存在顯著差異，檢視不同路寬道路之兩側區塊的埃及斑蚊基因距離是否存在顯著差異，進而探討街道是否影響埃及斑蚊的擴散。



### 3.2.2. 以行政區分群探討行政區是否影響擴散

在台灣鐵路管理局高雄機廠周圍以不同行政區分群，將鳳山區、苓雅區、前鎮區之參數分別設為 a、b、c，並以上述方式建立 dbRDA 模型，檢視不同行政區間之埃及斑蚊，是否因不同行政區間在行政上具有獨立性而有所差異。

## 4. 抗藥性基因

為了檢測陷阱捕捉之埃及斑蚊是否在抗藥性基因有突變發生，本研究使用 snpEff ver.5.1[73]，配合預設的參數設定以及埃及斑蚊基因集(gene set) AaegL5.2(ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-46)，標註(annotate)和預測(predict effects)經由 stacks2 篩選過的 SNP，再依照文獻[74-77]所提及與抗藥性相關之基因：CYP6BB2(AAEL014893)、CYP9J26(AAEL014609)、CYP9J28(AAEL014617)、CYP9J32(AAEL008846)、CYP9M6(AAEL001312)、CCEae3a(AAEL023844)、GSTD4(AAEL001054)、Voltage-gated sodium channel (AAEL013277, knockdown resistance, kdr)進行查找。

## 5. 沃爾巴克氏體

將同樣由財團法人國家衛生研究院國家蚊媒傳染病防治研究中心提供的 70 隻陷阱捕抓之白線斑蚊(*Aedes albopictus*)(其中 49 隻來自台北、21 隻來自台南)與本研究中的 191 隻埃及斑蚊經本研究第二章第 1.4 節序列處理中之方法處理後，將兩種斑蚊之序列對回在白線斑蚊中感染率較高[43]的 *W. pipiensis* wAlbB (RefSeq assembly accession: GCF\_004171285.1) 基因組上，探討斑蚊序列中是否有沃爾巴克氏體的 DNA，以及比較兩種斑蚊的是否存在差異。

## 第三章 結果



### 資料庫整理

本研究共使用埃及斑蚊 191 個樣本(表一、圖一)執行 ddRAD-seq，定序結果得到總數據量共計 290.32Gb，平均一個樣本 1.52Gb。原始資料首先經由 stacks2[51]“process\_radtags”處理，保留正確率高於 90% 的序列(phred score > 10)。之後使用 bwa mem 貼回埃及斑蚊基因組，僅保留差異(mismatch)小於 1% 的序列。總計 191 個樣本得到 2,970,350 個基因座(loci)(表二)。平均基因座長度為 247.3 個鹼基(base pair, bp)，標準差為 45.9 bp。樣本的基因座數量最多 638,397 個基因座，最少 437,734 個(圖三)，平均一個樣本的基因座數量為 566,019 個，標準差 42,903。平均讀取深度為 6.3(標準差: 0.9)，最大值為 8.5，最小值為 2.3(圖四)。

### 吸血過的埃及斑蚊對分析之影響

雖然本次使用的樣本均由誘卵桶採集後孵化的個體，本研究也針對吸血後的雌蚊進行分析(材料與方法)，以了解自野外採集的成蟲其體內可能帶有血液對後續分析的影響。

將 A、B、C 三組埃及斑蚊及其親代之序列，對各自吸血對象的基因組後，使用 SAMtools v1.12 [78]檢視，可以看到 A、B 組的第 0 天樣本，雖然有 35.9%、36.3 % 的序列(read)對上綿羊的基因組，但真正對上的位點卻只有 5.3%、5.8% (表三)，同樣情形也可以在 C 組的第 0 天樣本回貼至人類基因組時看到，對上人類的序列为 39.1 %，對上的位點卻為 5.9%。

即使在吸血後當天的樣本，回貼上吸血對象的基因組時有稍高比例的序列對上。但在吸血三天後的樣本中，無論是序列或位點對上的比例皆已降至與未吸血之雄蚊無異。上述結果說明使用吸血後三天的雌蚊進行分析，就與無吸血的雄蚊無異，不會對後續分析造成影響。



## 1.1. 遺傳多樣性分析

利用 stacks2 “populations”去除僅存在少數個體的基因座，僅保留 80% 以上樣本共有的基因座，共得到 390,905 個基因座(表四)，包含 99,579,353 位點，平均一個基因座有 251.53 位點(標準差: 0.07)。若不計頻率小於 5% 的等位基因，則有 447,467 為變異位點(variant sites)。

部分採集點或行政區樣本數僅 1 至 3 個(表一)，如國內樣本潮州、萬丹；國外樣本越南、泰國、印尼、聖多美，其結果可能無法代表整個族群。若不計上述地區的樣本，台灣不同行政區埃及斑蚊的核苷酸多樣性 (nucleotide diversity,  $\pi$ ) 在 0.00121 至 0.00126 之間(表五)。而取自實驗室樣本的核苷酸多樣性僅為 0.00089，大約是野外族群的 72%。若根據每一個世代核苷酸突變率  $1.5 \times 10^{-8}$  來計算[49]，野生族群的有效族群數在 20,166 – 21,000 之間。而實驗室族群的有效族群數為 14,833。

表五顯示埃及斑蚊不同野外採集點間擁有相似的遺傳多樣性，而且樣本內不存在 private allele，表示樣本間沒有明顯的族群分化。另一方面，實驗室的樣本不僅遺傳多樣性低，而且擁有 7,479 個 private alleles。因此實驗室樣本與野外樣本應有較高的遺傳分化。為了檢驗採集點間族群分化的程度，本研究計算倆倆採樣點之間的遺傳分化指數，以代表採樣點間的分化程度。若  $F_{ST}$  介於 0 – 0.05 表示族群間分化程度低，介於 0.05 – 0.15 表示族群間中度分化，介於 0.15 – 0.25 表示族群間高度分化[79]。以不同行政區分群比較族群分化指數( $F_{ST}$ )，發現本次研究之國內樣本各行政區間除了屏東縣萬丹鄉和潮州鎮，可能因為樣本數低而影響結果外，其餘國內樣本各行政區間之遺傳分化指數都介於 0.012 – 0.027，表示國內各行政區間之埃及斑蚊的遺傳分化程度低，而野外族群與實驗室樣本的  $F_{ST}$  指數則皆介於 0.09 – 0.11 間，表示兩者之間有較高的遺傳分化(表六)。

## 1.2. 主成分分析與族群結構分析

根據 393,100 個 SNP 進行的主成分分析結果(圖五)，實驗室樣本( $n=15$ )與其他陷阱捕捉樣本( $n=176$ )呈現明顯分群。此外，國外樣本(越南 VNM、聖多美 STP、印度尼西亞 IDN)與國內樣本也有明顯分群現象。若進一步以國內樣本執行主成分分析，發現臺南市樣本與其他國內樣本有分群的現象(圖六)。然而，在台灣鐵

路管理局高雄機廠樣區（小尺度樣區）中，將不同行政區設定為族群時，並無明顯的分群現象(圖七)。

為了更進一步探討分群現象，本研究進行了 STRUCTURE 分析，並將結果與主成分分析結果進行比較以確認一致性，然而在平均變異位點數為 447,467、總平均讀取深度為 6.28 的 191 個樣本中，泰國樣本 THA\_Tak (變異位點數 59,410 個；平均讀取深度：2.35) 和前鎮樣本 1641E090589005 (變異位點數 130,492；平均讀取深度：3.02) 的兩項數值均偏低。考慮到這些樣本可能對分析結果產生影響，例如泰國樣本若獨立成一群，無法判定是否是因為變異位點數較低所致，因此在進行 STRUCTURE 分析前決定將這兩個樣本排除。

本研究使用 PLINK 1.9[80]，並將滑動視窗大小(window size) 設定為 50 個變異位點，以每 10 個變異位點為單位進行滑動。在保留 linkage equilibrium  $r^2 < 0.2$  的位點的條件下，篩選出 80% 樣本中共有的位點，最終獲得 48,305 個聯鎖平衡(linkage equilibrium)的位點，並以這些位點執行 STRUCTURE 分析得到結果如圖八。當  $K=2$  時，可區分實驗室樣本(代號 1)與其它樣本。 $K=3$  時，可再區分越南(12)與聖多美(14)的樣本。 $K=4$  時，越南(12)與聖多美(14)分屬不同族群。隨著  $K$  值上升，在  $K=5$  時，國內陷阱捕捉樣本中的台南樣本與其他地區樣本存在差異，與主成分分析之類似。然而當  $K=6$  和  $K=7$  時，台南和東港樣本分別與其他地區的樣本表現不同的特徵，但在主成分分析的部分東港樣本並沒有明顯的分群現象。

接下來分析樣本數大於 10 的行政區(包括臺南市、高雄市三民區、鳳山區、苓雅區、前鎮區、屏東市及東港鎮)(圖九)，從結果中可以發現主要仍然是分成臺南市、東港鎮以及其他各區三個群。有趣的是高雄市、屏東市和臺南市隸屬不同縣市，然而屏東市的個體卻沒有像臺南市的個體一樣，在族群結構上與高雄有異。

依據 STRUCTURE 使用手冊的指引，最佳  $K$  值可由  $\ln P(D)$  值最先達到平穩或略微增加時的  $K$  值來判斷。然而在全部樣本的 STRUCTURE 分析中，本研究發現  $\ln P(D)$  (圖十 A)僅在  $K=5$  時明顯低於其他組別。對於其他  $K$  值， $\ln P(D)$  值相差甚微。而在樣本數大於 10 的行政區中(圖十 B)雖然是  $K$  值越大  $\ln P(D)$  則越大，但僅在  $K=3$  時有明顯分出台南市、東港鎮以及其他各區三個群，後續至  $K=7$  也沒有表現出分出更多群的現象。另外 STRUCTURE 使用手冊亦提及， $\Delta K$  的值越高，表示在該  $K$  值下發現的群體劃分比其他  $K$  值更可靠，然而在本研究中

估計的  $\ln P(D)$  標準差小於 0.0000001，無法計算 Delta K，因此難以推測最佳的 K 值。



## 2. 親屬關係與地理距離

在分析親屬關係的部分，由於許多文獻篩選聯鎖平衡(linkage equilibrium)以及哈溫平衡(Hardy-Weinberg Equilibrium)的點位方式有差異[38, 49, 57]，因此本研究做了多種篩選的搭配如表七。表七的第 1 點( $1.\text{MAF}>0.05, \text{DP}>5$ )為只有篩選次等為基因頻大於 0.05 及平均讀取深度大於 5 的位點。而若多篩選了哈溫平衡  $p$ -value 大於 0.05 的條件(第二點:  $2. \text{MAF}>0.05, \text{DP}>5, \text{hwe}>0.05$ )，在大尺度(全部台灣樣本)的變異位點數由第 1 點的 390,734 的位點變成第 2 點 229,530 個位點，足足少了 161,204 個位點。如同在第二章第 2.1 節中的預期，哈溫平衡  $p$ -value 大於 0.05 的條件並不適合在較大尺度的研究中作為篩選條件。而篩選條件為 HWE  $p$ -value  $< 10^{-3}$  和  $10^{-4}$  的兩種篩選條件得到的平均有效分布距離相差不大。為了兼顧篩選效果和保留遺傳變異，因此認為應該選擇相對寬鬆的 HWE  $p$ -value  $< 10^{-4}$  篩選標準。

另外在篩選 linkage equilibrium 的結果中發現在滑動視窗大小為 50 kb (kilobase pair)、每 1 個變異位點為單位進行滑動的篩選條件設定下，篩選保留 linkage equilibrium  $r^2 < 0.2$  的連鎖平衡位點，比起滑動視窗大小 5kb 的篩選條件，去除了更多的近親關係配對。如同第二章第 2.1 節說明，本研究期望篩除的是「彼此間較靠近」的位點。因此，本研究選擇使用 5kb 的篩選結果。綜上所述，最後除了篩選刪除頻率小於 5% 的等位基因以及平均讀取深度小於 5 的位點外，本研究以滑動視窗大小為 5 kb (kilobase pair)且每 1 個變異位點為單位進行滑動的 linkage equilibrium  $r^2 < 0.2$  的連鎖平衡位點，同時 HWE  $p$ -value  $< 10^{-4}$  的位點，作為篩選條件進行親屬關係的分析。

利用親屬關係探討埃及斑蚊的傳播距離時，本研究依據兩誘卵桶陷阱間的距離，與兩蚊間的親屬關係，來探討埃及斑蚊可能移動的距離，親屬關係依據 Loiselle's 的  $k$  值[64]大於 0.1875 判斷為全手足關係(full-sibling)，即親兄弟姊妹關係。若  $K$  值介於 0.1875 至 0.0938 之間，則判定為半手足關係(half-sibling)，即同父異母關係[38, 66]。當在兩個不同地點的陷阱中捕獲全手足關係的斑蚊，則表示

其親代母蚊在某陷阱產卵後又飛至另一處陷阱產卵，可視為這隻母蚊至少的移動了兩陷阱間的距離。[65]。本次研究中在台灣樣本的部分，總共記錄到三對親兄弟姊妹關係與四對同父異母關係的埃及斑蚊，以及 60 對表親關係的埃及斑蚊。其中一對親兄弟姊妹關係、一對同父異母關係與 14 對的埃及斑蚊來自小尺度樣區。另外相距最遠的兩個具有親兄弟姊妹關係的樣本來自東港，其距離達到了 522.9 公尺。（圖十一）。

## 2.1. 可能的有效散佈距離分布

根據文獻 [65] 計算指數分佈的有效散佈距離平均值 (the mean of the exponentially distributed effective dispersal distance) 結果 (表七第八點)，大尺度地理範圍 (圖一 A) 的有效散佈平均距離為 2.1 公里，而小尺度地理範圍 (圖一 C) 的平均距離為 350 公尺。然而以 Weibull 分布比較大尺度和小尺度地理範圍的可能的有效散佈距離分布。在分位圖 (quantile-quantile plot, Q-Q plot) 的部分，大尺度地理分佈的分位圖 (圖十二)，在有效的散佈距離較大時偏離參考線 (reference line)，表示較大的有效的散佈距離實際值與理論值不一致。而在小尺度地理範圍的有效散佈距離分位圖 (圖十三)，有效的散佈距離並沒有偏離參考線，因此在探討可能的有效散佈距離分布時，以小尺度地理範圍的分析結果較為可信。

## 3. 基因距離與地理距離

在驗證地理距離與基因距離間的關係的分析中 (表八)，在大尺度的地理範圍，地理距離的自然對數與基因距離有顯著相關 (mantel  $r = 0.0025$ , CI 95% = 0.0021 – 0.0048,  $p = 0.001$ )。然而線性關係的斜率僅為 0.0058 (圖十四)，顯示雖然遺傳距離與地理距離有正比關係，但是相關性不高。而在小尺度的台灣鐵路管理局高雄機廠樣區，地理距離的自然對數與基因距離雖為正比關係 (slope = 0.0031)，但並沒有顯著相關 (mantel  $r = 0.0006$ , CI = -0.0006 – 0.0467,  $p$ -value = 0.399) (圖十五)。

為了讓 IBD (Isolation-by-distance analysis) 分析反映長期的群體過程，應該將高度相關的個體從分析中剔除 [81]。在將近親關係的配對移除後，無論在大尺度或小尺度地理距離與基因距離皆呈正比且顯著相關 (表八)，故推測在小尺度的地理範圍中受到的近親遷移影響較大。



### 3.1. 擴散屏障的評估

在台灣鐵路管理局高雄機廠周圍，根據道路分成不同區塊(圖一 D)，比較道路的隔離效應，結果顯示不同路寬道路之道路兩側區塊(block)的埃及斑蚊基因距離皆沒有顯著差異(圖十六)。

若以行政區劃分作為依據分群，即使在如圖一 C 僅有約 4 平方公里的地理範圍中，不同行政區間之埃及斑蚊在基因距離上，則是有顯著差異( $p$ -value = 0.001)(表九)。

## 4. 抗藥性基因

在篩選標準為所有樣本的替代等位基因頻率(alternative allele frequency)大於 0.05 的情況下，只找到兩個基因共六個非同義變異位點(non-synonymous variant sites)的 SNP。其中，CCEae3a 的 F225V 和 F31L 在臺南地區的替代等位基因頻率較其他區域為高。另外四個 SNP: CCEae3a 的 S 68 N 、A 22 T 、K 15 R 和 CYP9J28 的 S 174 N 在野外樣本中的等位基因頻率僅介於 0.047 – 0.122 之間(表十、圖十七)。

## 5. 沃爾巴克氏體

將 191 個埃及斑蚊和 70 個白線斑蚊的序列與 *W. pipiensis* wAlbB 的基因組進行比對。在 191 個埃及斑蚊樣本中，圖十八顯示 X 軸代表樣本，Y 軸代表每個樣本與 *W. pipiensis* wAlbB 基因組比對後對上的位點(bases mapped)的百分比。從圖中可以看出，白線斑蚊與沃爾巴克氏體的對上位點確實比埃及斑蚊多。

根據表十一，88.5% 的埃及斑蚊樣本(共 169 個)與 *W. pipiensis* wAlbB 基因組對上的位點比例低於十萬分之一( $10^{-5}$ )。然而，在 70 個白線斑蚊樣本中，僅有 5.7 % 的樣本(4 個)對上位點比例低於十萬分之一。反之卻有 94.3% 的白線斑蚊樣本(共 66 個)對上位點比例高於十萬分之一。

## 第四章 討論



### 1. 遺傳多樣性分析與族群結構

相較於外國文獻[49]的 574,715 個基因座，本研究總計 191 個樣本共 2,970,350 個基因座，足足多了五倍之多。因此，本研究更能全面呈現埃及斑蚊在不同地區的遺傳多樣性和族群結構，提供更為精確的遺傳資訊以瞭解埃及斑蚊在台灣的分布和演化。

從 STRUCTURE 和 PCA 結果來看，高雄和屏東的埃及斑蚊族群結構相近。這可能是由於高雄和屏東地區之間的交通網絡發達，使得兩地的埃及斑蚊有較高的流動性，導致族群結構的相似性，過去也有研究[38]推測蚊蟲很可能藉由人類運輸媒介導致斑蚊的長距離移動，這些結果對於制定有針對性的防治策略和瞭解埃及斑蚊在台灣的演化過程具有重要意義。

### 2. 親屬關係與地理距離

由於埃及斑蚊雌蚊一生極少交尾超過一次[82, 83]，依照文獻[65] 計算方式與第二章第 2.2 節提及誘殺桶與誘卵桶之差異，在計算本研究中半手足及表親的最小可能的移動距離時，皆是除以三，舉例來說，本研究在相距 42.8 公里兩陷阱中，發現一對親屬關係為表親的埃及斑蚊(圖十一)，這表示產下該對埃及斑蚊的兩母蚊及其祖母，分攤了 42.8 公里的移動距離，也就是平均飛行 16.3 公里，這超出捉放法文獻[23-25]提及的斑蚊移動距離(約 500 公尺)，因此懷疑有可能是受人為交通因素影響，將埃及斑蚊帶至靠蚊蟲自身能力難以抵達的地方[38]。也就是說，埃及斑蚊在大尺度的擴散上偶而受到人為活動的影響，使得其實際值與理論值發生偏差。這也解釋了在推算可能的有效散佈距離部分，大尺度的分位圖有效的散佈距離實際值與理論值不一致的情況。在小尺度的分析上，實際值與理論值得到的結果類似，平均散佈距離為 350 公尺(95% CI 330–370)。這與過去標示再捕捉的結果符合[23]。但 Filipović et al.,(2020)[65]分析新加坡的埃及斑蚊所推估的有效散佈距離卻只有 45.2 公尺(95% CI 39.7–51.3)，兩個研究的結果差異甚大。根據過去的研究，埃及斑蚊棲息環境與人類居住區域密切相關，其在室內的棲息率為 70–80% [4]，傾向在人類居住區域內尋找繁殖場所。新加坡的採樣地點為較

明亮寬敞的社區，不同建物之間有空置的空間，可能影響的埃及斑蚊的移動。而本研究採集點社區均為密集式建物，房屋之間缺乏間隔。由於埃及斑蚊偏好室內的習性[4]，使得其可以在這些建物之間移動，故能有較大的移動距離。

此外在新加坡的研究中，其採樣尺度僅約 600 公尺。若以再捕捉法所估計埃及斑蚊移動距離可達 500 為基準[23]，該研究可能無法反映較長距離的擴散。

### 3. 基因距離與地理距離

在大尺度範圍內，雖然無論是否將近親(close kinship)移除，基因距離與地理距離皆有顯著相關。然而其相關程度 Mantel r 僅為 0.0025，顯示地理影響蚊蟲分化的效果甚微。根據親屬關係的分析發現，在相距 42.8 公里兩陷阱中，發現一對親屬關係為表親的埃及斑蚊(圖十一)。這表示產下該對埃及斑蚊的兩母蚊及其祖母，分攤了 42.8 公里的移動距離，也就是平均飛行 16.3 公里，這超出捉放法文獻[23-25]提及的斑蚊移動距離(約 500 公尺)。因此很有可能是受人為交通因素影響，將埃及斑蚊帶至靠蚊蟲自身能力難以抵達的地方[38]。所以在長距離的傳播上人為因子可能佔有很重要的影響。

在小尺度範圍內，地理距離與遺傳距離在僅在移除了近親之後兩者呈現微弱但是顯著的相關性。因此，埃及斑蚊在小尺度的移除分化主要受到近親之間移動的影響。

#### 3.1. 擴散屏障的評估

與過去的研究結果不同，本研究發現臺灣的道路無法阻止埃及斑蚊的散播。在提及道路對埃及斑蚊擴散產生顯著阻礙效果的文獻[38]，所涉及的澳洲凱恩斯的高速公路寬約 50 公尺，而本次研究的道路最寬 30 公尺。很可能是道路寬度不足以影響埃及斑蚊的擴散。其次建築物的密集程度以及空曠狀況也可能對斑蚊的移動距離產生影響。在本研究中，所選擇的樣區除了道路較為狹窄，建築物亦相對密集。而澳洲的研究中，除了道路本身較為寬敞建築物也較為空曠。因此道路寬度、空曠程度以及人為交通活動等因素可能共同影響了埃及斑蚊的移動距離和擴散能力。因此，在防治埃及斑蚊方面，需要綜合考慮這些因素，針對不同的環境條件制定合適的防疫策略，以期在各種情況下都能有效地控制埃及斑蚊的擴散。

然而除了道路之外，本研究發現行政區對於埃及斑蚊的分化有很大的影響(表九)。推測可能是因為現行埃及斑蚊的防治在直轄市中是以「區」為單位。不同「區」有不同的防治規劃，可能因此影響了埃及斑蚊的族群結構。



#### 4. 抗藥性基因

根據文獻[84]得知 F225V 和 F31L 其實是已知的多態性位點 (polymorphism site)，而非新發現的突變，不會影響抗藥性。因此，在本次研究中並未發現具有高等位基因頻率且穩定存在於族群中的抗藥性相關突變基因位點。然而，這可能只是因為 ddRAD-seq 方法的局限性所導致，由於 ddRAD-seq 是隨機截取基因組上的片段，因此在研究中僅觀察到有限的非同義變異位點，並不代表在本研究所研究的野外樣本中抗藥性相關基因的突變並不普遍，只是剛好沒有被 ddRAD-seq 隨機選取到。

因此在未來的研究中，若要探討抗藥性基因突變，雖然 ddRAD-seq 有機會可以作為一個發現新突變的管道，但無法作為一個反向證明沒有突變發生的管道。本研究在野外捕捉的埃及斑蚊樣本中雖然未發現具有高等位基因頻率且穩定存在於族群中的抗藥性相關突變基因，但這並不能排除野外埃及斑蚊中存在抗藥性的可能性。

#### 5. 沃爾巴克氏體

根據文獻[43]台灣的白線斑蚊具有高達 97% 的沃爾巴克氏菌感染率。這個數據與白線斑蚊在與 *W. pipiens* wAlbB 基因組進行序列比對時，對上位點比例高於十萬分之一( $10^{-5}$ )的樣本數比例(94.3%)相當接近。因此懷疑在埃及斑蚊樣本中，有 22 個樣本(高雄 15 個、台南 5 個、萬丹 1 個、聖多美 1 個)的對上位點比例高於十萬分之一( $10^{-5}$ )，這並非由定序過程中的誤差所導致。然而，ddRAD-seq 數據無法確切證實沃爾巴克氏菌的感染情況。為了更精確地驗證這些蚊蟲是否受到沃爾巴克氏菌感染，後續研究需要進一步通過聚合酶鏈反應 (PCR) 實驗加以驗證 [85]。

## 第五章 結論



本研究透過 ddRAD-seq 分析埃及斑蚊在台灣南部的遺傳多樣性和族群結構，探討其有效散佈距離、基因與地理距離的關係，以及可能的擴散屏障。發現高雄和屏東地區的埃及斑蚊族群結構具有高度的相似性，顯示兩地埃及斑蚊在基因上可能有著較高的流動性，這可能受到交通網絡的影響[22, 38]。此外，透過親屬關係的推算，本研究發現台灣的埃及斑蚊有效散佈距離 350 公尺遠超過國外以往的文獻的 45.2 公尺[65]，這可能受房屋密集程度的影響，本研究所選擇的樣區為房屋較密集的社區，而國外樣區的社區則較為寬敞，房屋間彼此距離較遠，配合埃及斑蚊偏好棲息於室內的習性[4]，造就了埃及斑蚊在房屋密集的區域有更遠距離的移動能力的結果。

在探討基因距離與地理距離的關係時，本研究發現在大尺度與小尺度範圍內，當移除近親關係的配對後，以反映出長期的群體過程的結果來看，基因距離與地理距離都呈現顯著的正相關。這與本研究預期的由於人為活動的影響，基因距離與地理距離間可能無顯著相關的推測不符。然而，由於存在著相距 42.8 公里且呈現表親關係的埃及斑蚊證據，本研究仍然認為人為的交通因素可能影響埃及斑蚊的擴散能力，只是無法從基因距離與地理距離的顯著與否中觀察得知。

此外，本研究也探討了野外埃及斑蚊可能的沃爾巴克氏體感染情況和抗藥性基因突變情況。儘管本研究並未在本次研究中發現高等位基因頻率的抗藥性相關突變基因，但這可能是由於本研究使用的 ddRAD-seq 方法的局限性，並不能排除野外埃及斑蚊中存在抗藥性的可能性。對於沃爾巴克氏體的感染情況，則需要進一步的研究來確認。

總之，本研究為了解埃及斑蚊在台灣的族群結構、遺傳多樣性和散佈模式提供了重要的資訊，這對於制定有效的防治策略以及理解埃及斑蚊在台灣的演化過程具有重要的價值。本研究的研究也指出了人為的交通可能影響埃及斑蚊的擴散能力。未來可以進一步探討城市間交通交流程度與埃及斑蚊族群結構、遺傳多樣性以及擴散模式的具體關係，以期提供更有針對性的防治建議。

## 第六章 參考文獻



1. W.H.O. and UNICEF, Global vector control response 2017-2030. 2017.
2. Bogoch, I.I., O.J. Brady, M.U. Kraemer, et al., Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *The Lancet*, 2016. **387**(10016): p. 335-336.
3. Weaver, S.C. and M. Lecuit, Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *New England Journal of Medicine*, 2015. **372**(13): p. 1231-1239.
4. Delatte, H., G. Gimonneau, A. Triboire, et al., Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *Journal of medical entomology*, 2009. **46**(1): p. 33-41.
5. Teng, H.-J. and C.S. Apperson, Development and survival of immature *Aedes albopictus* and *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) in the laboratory: effects of density, food, and competition on response to temperature. *Journal of medical entomology*, 2000. **37**(1): p. 40-52.
6. Carrington, L.B., M.V. Armijos, L. Lambrechts, et al., Effects of fluctuating daily temperatures at critical thermal extremes on *Aedes aegypti* life-history traits. *PloS one*, 2013. **8**(3): p. e58824.
7. Marinho, R.A., E.B. Beserra, M.A. Bezerra-Gusmão, et al., Effects of temperature on the life cycle, expansion, and dispersion of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in three cities in Paraíba, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 2016. **41**(1): p. 1-10.
8. 交通部中央氣象局. 臺灣氣候特徵簡介. Available from: [http://www.cwb.gov.tw/V7/climate/climate\\_info/taiwan\\_climate/taiwan\\_1.html](http://www.cwb.gov.tw/V7/climate/climate_info/taiwan_climate/taiwan_1.html).
9. 陳易呈、陳彥圻、鄧華真等, 埃及斑蚊及白線斑蚊之生態特性及傳播病毒能力的文獻回顧. 疫情報導, 2013. **35**(13): p. 172-86.
10. 羅林巧、王智源和鄧華真, 2009-2011 年臺灣地區登革熱病媒蚊分布調查. 疫情報導, 2014. **30**(15): p. 304-310.
11. Chang, L.-H., E.-L. Hsu, H.-J. Teng, et al., Differential survival of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae exposed to low temperatures in Taiwan. *Journal of medical entomology*, 2007. **44**(2): p. 205-210.
12. Hansen, J., M. Sato, R. Ruedy, et al., Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(39): p. 14288-14293.
13. Tran, B.-L., W.-C. Tseng, C.-C. Chen, et al., Estimating the threshold effects of climate on dengue: a case study of Taiwan. *International journal of environmental research and public health*, 2020. **17**(4): p. 1392.
14. W.H.O, Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. 2012, Geneva: World Health Organization.
15. Focks, D.A., R.J. Brenner, J. Hayes, et al., Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. 2000: p. 11-18.
16. Hoffmann, A.A., B. Montgomery, J. Popovici, et al., Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 2011. **476**(7361): p. 454-457.
17. Barton, N.H. and M. Turelli, Spatial waves of advance with bistable dynamics: cytoplasmic and genetic analogues of Allee effects. *The American Naturalist*,

2011. **178**(3): p. E48-E75.
18. Yan, G., D.D. Chadee, and D.W. Severson, Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics*, 1998. **148**(2): p. 793-800.
19. Moyes, C.L., J. Vontas, A.J. Martins, et al., Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS neglected tropical diseases*, 2017. **11**(7): p. e0005625.
20. Sánchez C, H.M., J.B. Bennett, S.L. Wu, et al., Modeling confinement and reversibility of threshold-dependent gene drive systems in spatially-explicit *Aedes aegypti* populations. *BMC biology*, 2020. **18**(1): p. 1-14.
21. Marshall, J.M. and O.S. Akbari, Can CRISPR-based gene drive be confined in the wild? A question for molecular and population biology. *ACS chemical biology*, 2018. **13**(2): p. 424-430.
22. Kramer, L.D. and G.D. Ebel, Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res*, 2003. **60**: p. 187-232.
23. Harrington, L.C., T.W. Scott, K. Lerdthusnee, et al., Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2005. **72**(2): p. 209-220.
24. Reiter, P., Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2007. **7**(2): p. 261-273.
25. Trpis, M. and W. Hausermann, Dispersal and other population parameters of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1986. **35**(6): p. 1263-1279.
26. Bergero, P.E., C.A. Ruggerio, R.J. Lombardo Berchesi, et al., Dispersal of *Aedes aegypti*: field study in temperate areas using a novel method. *Journal of Vector Borne Diseases*, 2013. **50**(3): p. 163-170.
27. Dickens, B.L. and H.L. Brant, Effects of marking methods and fluorescent dusts on *Aedes aegypti* survival. *Parasites & Vectors*, 2014. **7**(1): p. 1-9.
28. Winskill, P., D.O. Carvalho, M.L. Capurro, et al., Dispersal of engineered male *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS neglected tropical diseases*, 2015. **9**(11): p. e0004156.
29. Trewin, B.J., D.E. Pagendam, M.P. Zalucki, et al., Urban landscape features influence the movement and distribution of the Australian container-inhabiting mosquito vectors *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 2020. **57**(2): p. 443-453.
30. Marcantonio, M., T. Reyes, and C.M. Barker, Quantifying *Aedes aegypti* dispersal in space and time: a modeling approach. *Ecosphere*, 2019. **10**(12): p. e02977.
31. Wu, H., Y. Lin, H. Pai, et al., Insecticide resistance status in *Aedes aegypti* (L.) adults from Southern Taiwan. *Form. Entomol*, 2014. **33**: p. 253-270.
32. Lin, Y., H. Wu, E. Hsu, et al., Insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae in southern Taiwan. *Formos. Entomol*, 2012. **32**: p. 107-121.
33. Gorrochotegui-Escalante, N., C. Gomez-Machorro, S. Lozano-Fuentes, et al., Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2002. **66**(2): p. 213-222.
34. Bosio, C.F., L.C. Harrington, J.W. Jones, et al., Genetic structure of *Aedes*

- aegypti populations in Thailand using mitochondrial DNA. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2005. **72**(4): p. 434-442.
35. Urdaneta-Marquez, L., C. Bosio, F. Herrera, et al., Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2008. **78**(3): p. 479-491.
36. Hlaing, T., W. Tun-Lin, P. Somboon, et al., Spatial genetic structure of *Aedes aegypti* mosquitoes in mainland Southeast Asia. *Evolutionary applications*, 2010. **3**(4): p. 319-339.
37. Wright, S., Isolation by distance. *Genetics*, 1943. **28**(2): p. 114.
38. Schmidt, T.L., I. Filipović, A.A. Hoffmann, et al., Fine-scale landscape genomics helps explain the slow spatial spread of Wolbachia through the *Aedes aegypti* population in Cairns, Australia. *Heredity*, 2018. **120**(5): p. 386-395.
39. Moreira, L.A., I. Iturbe-Ormaetxe, J.A. Jeffery, et al., A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 2009. **139**(7): p. 1268-1278.
40. Bian, G., Y. Xu, P. Lu, et al., The endosymbiotic bacterium Wolbachia induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS pathogens*, 2010. **6**(4): p. e1000833.
41. Blagrove, M.S., C. Arias-Goeta, A.-B. Failloux, et al., Wolbachia strain w Mel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(1): p. 255-260.
42. Mousson, L., K. Zouache, C. Arias-Goeta, et al., The native Wolbachia symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2012. **6**(12): p. e1989.
43. Tsai, C.-H., T.-H. Chen, C. Lin, et al., The impact of temperature and Wolbachia infection on vector competence of potential dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the transmission of dengue virus serotype 1 in southern Taiwan. *Parasites & vectors*, 2017. **10**(1): p. 1-11.
44. Goubert, C., G. Minard, C. Vieira, et al., Population genetics of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*, an invasive vector of human diseases. *Heredity*, 2016. **117**(3): p. 125-134.
45. Peterson, B.K., J.N. Weber, E.H. Kay, et al., Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one*, 2012. **7**(5): p. e37135.
46. Rašić, G., N. Endersby-Harshman, W. Tantowijoyo, et al., *Aedes aegypti* has spatially structured and seasonally stable populations in Yogyakarta, Indonesia. *Parasites & vectors*, 2015. **8**: p. 1-12.
47. Rašić, G., R. Schama, R. Powell, et al., Contrasting genetic structure between mitochondrial and nuclear markers in the dengue fever mosquito from Rio de Janeiro: implications for vector control. *Evolutionary applications*, 2015. **8**(9): p. 901-915.
48. Rašić, G., N.M. Endersby, C. Williams, et al., Using Wolbachia-based release for suppression of *Aedes* mosquitoes: insights from genetic data and population simulations. *Ecological Applications*, 2014. **24**(5): p. 1226-1234.
49. Rašić, G., I. Filipović, A.R. Weeks, et al., Genome-wide SNPs lead to strong signals of geographic structure and relatedness patterns in the major arbovirus vector, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 2014. **15**(1): p. 275.

50. Li, B., Q. Gao, L. Cao, et al., Conserved profiles of digestion by double restriction endonucleases in insect genomes facilitate the design of ddRAD. *動物分類學報*, 2018. **43**(4): p. 341-355.
51. Rochette, N.C., A.G. Rivera-Colón, and J.M. Catchen, Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, 2019. **28**(21): p. 4737-4754.
52. Li, H., Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv: Genomics*, 2013.
53. Jolliffe, I.T. and J. Cadima, Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2016. **374**(2065): p. 20150202.
54. Kamvar, Z.N., J.F. Tabima, and N.J. Grünwald, Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2014. **2**: p. e281.
55. Pritchard, J.K., M. Stephens, and P. Donnelly, Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000. **155**(2): p. 945-959.
56. Pritchard, J.K., W. Wen, and D. Falush, Documentation for STRUCTURE software: Version 2. 2003.
57. Pichler, V., P. Kotsakiozi, B. Caputo, et al., Complex interplay of evolutionary forces shaping population genomic structure of invasive *Aedes albopictus* in southern Europe. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2019. **13**(8): p. e0007554.
58. Slatkin, M., Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 2008. **9**(6): p. 477-485.
59. Pritchard, J.K. and M. Przeworski, Linkage disequilibrium in humans: models and data. *The American Journal of Human Genetics*, 2001. **69**(1): p. 1-14.
60. McVean, G.A., A genealogical interpretation of linkage disequilibrium. *Genetics*, 2002. **162**(2): p. 987-991.
61. Wigginton, J.E., D.J. Cutler, and G.R. Abecasis, A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *The American Journal of Human Genetics*, 2005. **76**(5): p. 887-893.
62. Danecek, P., A. Auton, G. Abecasis, et al., The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* (Oxford, England), 2011. **27**(15): p. 2156-2158.
63. Hardy, O.J. and X. Vekemans, SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular ecology notes*, 2002. **2**(4): p. 618-620.
64. Loiselle, B.A., V.L. Sork, J. Nason, et al., Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American journal of botany*, 1995. **82**(11): p. 1420-1425.
65. Filipović, I., H.C. Hapuarachchi, W.-P. Tien, et al., Using spatial genetics to quantify mosquito dispersal for control programs. *BMC biology*, 2020. **18**(1): p. 104-104.
66. Iacchei, M., T. Ben-Horin, K.A. Selkoe, et al., Combined analyses of kinship and FST suggest potential drivers of chaotic genetic patchiness in high gene-flow populations. *Molecular Ecology*, 2013. **22**(13): p. 3476-3494.
67. Delignette-Muller, M.L. and C. Dutang, fitdistrplus: An R package for fitting distributions. *Journal of statistical software*, 2015. **64**: p. 1-34.
68. Rousset, Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, 2000. **13**(1): p. 58-62.
69. Shirk, A., E. Landguth, and S. Cushman, A comparison of individual-based

- genetic distance metrics for landscape genetics. *Molecular Ecology Resources*, 2017. **17**(6): p. 1308-1317.
70. Goslee, S.C. and D.L. Urban, The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software*, 2007. **22**: p. 1-19.
71. Oksanen, J., R. Kindt, P. Legendre, et al., The vegan package: community ecology package. *R package version*, 2007. **1**: p. 1-190.
72. Legendre, P. and M.J. Anderson, Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological monographs*, 1999. **69**(1): p. 1-24.
73. Cingolani, P., A. Platts, L.L. Wang, et al., A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 2012. **6**(2): p. 80-92.
74. Djiappi-Tchamen, B., M.S. Nana-Ndjangwo, K. Mavridis, et al., Analyses of insecticide resistance genes in *aedes aegypti* and *aedes albopictus* mosquito populations from cameroon. *Genes*, 2021. **12**(6): p. 828.
75. Melo Costa, M., K.B. Campos, L.P. Brito, et al., Kdr genotyping in *Aedes aegypti* from Brazil on a nation-wide scale from 2017 to 2018. *Scientific reports*, 2020. **10**(1): p. 1-12.
76. David, J.-P., H.M. Ismail, A. Chandor-Proust, et al., Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013. **368**(1612): p. 20120429.
77. Sene, N.M., K. Mavridis, E.H. Ndiaye, et al., Insecticide resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* populations from Senegal. *PLoS neglected tropical diseases*, 2021. **15**(5): p. e0009393.
78. Danecek, P., J.K. Bonfield, J. Liddle, et al., Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, 2021. **10**(2).
79. Wright, S., Evolution and the Genetics of Populations. IV. Variability within and among natural populations., 1978.
80. Chang, C.C., C.C. Chow, L.C. Tellier, et al., Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 2015. **4**(1).
81. Bowman, A.W. and A. Azzalini, *Applied smoothing techniques for data analysis: the kernel approach with S-Plus illustrations*. Vol. 18. 1997: OUP Oxford.
82. Degner, E.C. and L.C. Harrington, Polyandry depends on postmating time interval in the dengue vector *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2016. **94**(4): p. 780.
83. Helinski, M.E., L. Valerio, L. Facchinelli, et al., Evidence of polyandry for *Aedes aegypti* in semifield enclosures. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2012. **86**(4): p. 635.
84. Poupardin, R., W. Srisukontarat, C. Yunta, et al., Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014. **8**(3): p. e2743.
85. Lee, S.F., V.L. White, A.R. Weeks, et al., High-throughput PCR assays to monitor Wolbachia infection in the dengue mosquito (*Aedes aegypti*) and *Drosophila simulans*. *Applied and environmental microbiology*, 2012. **78**(13): p. 4740-4743.

# 表

表一、埃及斑蚊各採樣地點之樣本數

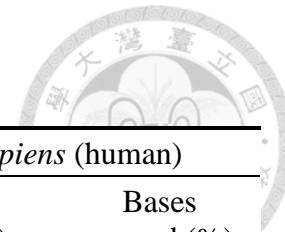


採樣地點	樣本數
臺南市中西區	9
臺南市南區	9
高雄市鳳山區	35
高雄市苓雅區	24
高雄市前鎮區	32
高雄市三民區	17
屏東縣屏東市	18
屏東縣東港鎮	18
屏東縣萬丹鄉	3
屏東縣潮州鎮	3
印尼	3
越南	2
聖多美	2
泰國	1
實驗室	15

表二、序列處理的資料整理

樣本數	191
總基因座數	2,970,350
平均基因座長度	247.3bp (SD: 45.9)
平均樣本的基因座數	566,019 (SD: 42,903.0)
樣本的基因座數最大值	638,397
樣本的基因座數最小值	437,734
平均讀取深度	6.3 (SD: 0.9)
讀取深度最大值	8.5
讀取深度最小值	2.3

表三、實驗室樣本對回埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)、綿羊(*Ovis aries*)與人類(*Homo sapiens*)基因組  
A與B吸食羊血，C吸食人血。



reference genome	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Ovis aries</i> (sheep)		<i>Homo sapiens</i> (human)		
	sample	Reads mapped (%):	Bases mapped (%):	Reads mapped (%):	Bases mapped (%):	Reads mapped (%):	Bases mapped (%):
A	A_Day0	95.4	88.9	<b>35.9</b>	<b>5.3</b>	4.1	3.2
	A_Day3	97.9	91.1	9.1	1.6	10.5	1.9
	A_Day7	98.0	91.5	8.9	1.5	10.3	1.7
	A_Mother	98.0	91.8	9.2	1.7	10.7	1.9
	A_Father	97.7	91.1	8.9	1.6	10.4	1.9
B	B_Day0	96.3	90.0	<b>36.3</b>	<b>5.8</b>	4.8	3.0
	B_Day3	98.7	91.5	11.4	2.3	13.0	2.6
	B_Day7	98.0	91.6	10.2	2.3	11.7	2.5
	B_Mother	98.0	91.7	10.2	2.3	11.7	2.5
	B_Father	97.9	91.6	9.6	2.1	11.0	2.3
C	C_Day0	95.2	87.9	6.1	4.8	<b>39.1</b>	<b>5.9</b>
	C_Day3	97.9	91.3	8.7	1.5	10.1	1.7
	C_Day7	98.0	91.4	8.8	1.5	10.3	1.7
	C_Mother	98.6	91.4	10.9	2.0	12.4	2.2
	C_Father	97.7	91.2	9.1	1.8	10.6	2.0

表四、篩選後的資料整理

80% 樣本數共有基因座；次等位基因頻率 $> 0.05$	
基因座數	390,905
位點數	99,579,353
變異位點數	447,467
平均基因座長度	251.5 (SD: 0.07)
平均讀取深度 $> 5$	
變異位點數	393,100
平均樣本變異位點數	119,845.9 (SD: 10845.9)
平均讀取深度	9.93 (SD: 1.62)



表五、不同採集區埃及斑蚊遺傳多樣性分析

Population	Num Indv	Sites	Private sites	Polymorphism sites	Private SNP	P	Obs_Het	Exp_Het	Fis	Tajima's D	$\pi$	$Ne$
實驗室樣本	15	98,322,854	7479	230,155	0	0.857	0.33	0.34	-0.01	1.4	0.00089	14,833.3
台南市中西區與南區	18	98,324,409	0	358,875	0	0.8	0.27	0.31	0.15	1.14	0.00123	20,500.0
高雄市三民區(2019)	17	98,324,409	0	364,683	0	0.801	0.27	0.31	0.11	1.01	0.00123	20,500.0
高雄市鳳山區(2019)	16	98,324,409	0	364,886	0	0.796	0.28	0.31	0.12	1.04	0.00126	21,000.0
高雄市鳳山區	19	98,324,409	0	366,946	0	0.798	0.27	0.31	0.14	1.15	0.00125	20,833.3
高雄市苓雅區	24	98,324,409	0	374,595	0	0.796	0.27	0.31	0.12	1.32	0.00126	21,000.0
高雄市前鎮區	32	98,324,409	0	378,440	0	0.798	0.26	0.30	0.13	1.47	0.00124	20,666.7
屏東縣屏東市	18	98,324,409	0	366,547	0	0.797	0.27	0.31	0.15	1.12	0.00126	21,000.0
屏東縣東港鎮	18	98,324,409	0	358,192	0	0.803	0.26	0.31	0.16	1.08	0.00121	20,166.7
屏東縣潮州鎮	3	98,248,361	0	218,724	0	0.835	0.41	0.47	0.12	0.38	0.00114	19,000.0
屏東縣萬丹鄉	3	97,979,017	0	233,016	0	0.827	0.43	0.46	0.07	0.31	0.00120	20,000.0
越南	2	94,007,405	0	90,219	0	0.918	0.58	0.57	-0.03	0.23	0.00061	10,166.7
印尼	3	98,157,552	0	195,964	0	0.845	0.34	0.48	0.29	0.54	0.00107	17,833.3
聖多美	2	97,225,115	0	106,444	0	0.899	0.56	0.58	0.02	0.4	0.00072	12,000.0
泰國	1	84,617,785	0	30,024	0	0.921	1.00	1.00	0.00	NA	0.00038	6,333.3
全部樣本	191	98,324,409	NA	393,100	NA	0.788	0.24	0.30	0.19			

Num Indv: 族群中樣本數

Site: 族群中的位點數

Private site: 族群中的獨有位點數

polymorphic sites: 族群中的核苷酸多態性(SNP)位點

Private SNP: 族群中的獨有的 SNP 位點數

P: 族群中每個 SNP 位點上最常見等位基因的平均頻率

Obs\_Het: SNP 位點的異型合子觀測值

Exp\_Het: SNP 位點的異型合子期望值

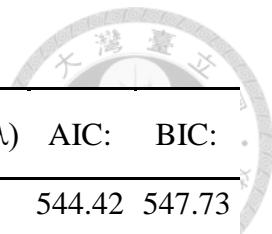
Fis: 近交係數(inbreeding coefficient)

Tajima's D: 田島 D 檢驗

 $\pi$ : 所有位點的核苷酸歧異度Ne: 有效族群量 ( $\mu = 1.5 \times 10^{-8}$  per site per generation)

表六、埃及斑蚊在各行政區之間的遺傳分化指數( $F_{ST}$ )

	台南市	三民區 (2019)	鳳山區 (2019)	鳳山區	苓雅區	前鎮區	屏東市	東港鎮	潮州鎮	萬丹鄉	越南	泰國	印尼	聖多美 (n=2)
實驗室樣本(n=15)	0.109	0.108	0.109	0.108	0.100	0.093	0.107	0.111	0.135	0.130	0.094	0.158	0.133	0.198
台南市中西區與南區(n=18)		0.024	0.025	0.024	0.021	0.019	0.025	0.027	0.039	0.035	0.035	0.075	0.056	0.148
高雄市三民區(2019)(n=17)			0.019	0.019	0.016	0.013	0.019	0.023	0.037	0.032	0.035	0.077	0.057	0.149
高雄市鳳山區(2019)(n=16)				0.019	0.016	0.014	0.020	0.024	0.037	0.032	0.036	0.079	0.058	0.150
高雄市鳳山區(n=19)					0.016	0.013	0.020	0.023	0.034	0.029	0.033	0.073	0.055	0.146
高雄市苓雅區(n=24)						0.012	0.017	0.020	0.027	0.023	0.026	0.060	0.046	0.131
高雄市前鎮區(n=32)							0.014	0.017	0.021	0.018	0.022	0.051	0.039	0.119
屏東縣屏東市(n=18)								0.023	0.035	0.030	0.034	0.073	0.055	0.145
屏東縣東港鎮(n=18)									0.040	0.035	0.036	0.080	0.060	0.154
屏東縣潮州鎮(n=3)										0.127	0.182	0.260	0.162	0.298
屏東縣萬丹鄉(n=3)											0.165	0.248	0.152	0.288
越南(n=2)												0.385	0.174	0.350
泰國(n=1)												0.247	0.393	
印尼(n=3)													0.285	



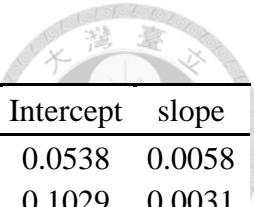
表七、以不同的標準分析埃及斑蚊可能的有效散佈距離分布

filtering	scale	close kinship pair	No. effective dispersal	1/λ (km)	95%CI(1/λ)	exponential estimate(λ)	Std.Error(λ)	AIC:	BIC:
1. MAF>0.05, DP>5	large	66	201	1.420	0.809-2.027	0.71	0.05	544.42	547.73
	fine	12	34	0.267	0.180-0.355	3.74	0.64	-19.70	-18.17
2. MAF>0.05, DP>5 hwe>0.05	large	35	99	0.830	0.308-1.352	1.21	0.12	163.06	165.65
	fine	9	25	0.225	0.126-0.323	4.45	0.89	-22.68	-21.46
3. MAF>0.05, DP>5 hwe>10 <sup>-3</sup>	large	47	135	1.046	0.545-1.547	0.96	0.08	284.04	286.95
	fine	9	25	0.225	0.126-0.323	4.45	0.89	-22.68	-21.46
4. MAF>0.05, DP>5 hwe>10 <sup>-4</sup>	large	50	144	1.006	0.536-1.477	0.99	0.08	291.85	294.82
	fine	9	25	0.225	0.126-0.323	4.45	0.89	-22.68	-21.46
5. MAF>0.05, DP>5 linkage r <sup>2</sup> <0.2 (50kb)	large	40	114	0.835	0.381-1.289	1.20	0.11	188.94	191.68
	fine	7	19	0.047	0.034-0.060	21.15	4.85	-75.97	-75.03
6. MAF>0.05, DP>5 linkage r <sup>2</sup> <0.2 (5kb)	large	80	234	1.699	1.126-2.273	0.59	0.04	718.17	721.62
	fine	16	46	0.352	0.259-0.444	2.84	0.42	-2.13	-0.30
7. MAF>0.05, DP>5 hwe>10 <sup>-4</sup> , linkage r <sup>2</sup> <0.2 (50kb)	large	36	102	0.881	0.374-1.387	1.14	0.11	180.11	182.73
	fine	7	19	0.047	0.034-0.060	21.15	4.85	-75.97	-75.03
8. MAF>0.05, DP>5 hwe>10 <sup>-4</sup> , linkage r <sup>2</sup> <0.2 (5kb)	large	67	195	2.103	1.293-2.914	0.48	0.03	681.94	685.21
	fine	16	46	0.352	0.259-0.444	2.84	0.42	-2.13	-0.30

MAF: Minor allele Frequency

DP: Read Depth

Hwe: Significant cut off for Hardy-Weinberg Equilibrium

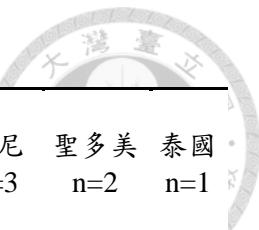


表八、埃及斑蚊遺傳距離與地理距離的相關性檢驗

	mantelr	pval	llim.2.5%	ulim.97.5%	Intercept	slope
large scale (n=168)	0.0025	0.001	0.0021	0.0048	0.0538	0.0058
fine scale (n=75)	0.0006	0.399	-0.0006	0.0467	0.1029	0.0031
large scale (remove close kinship)	0.0622	0.001	0.0590	0.0652	0.0558	0.0056
fine scale (remove close kinship)	0.0382	0.001	0.0287	0.0458	0.1104	0.0020

表九、dbRDA 模型的 ANOVAs 分析結果

	Sum of Squares	F value	P value
行政區	0.038	1.815	0.001



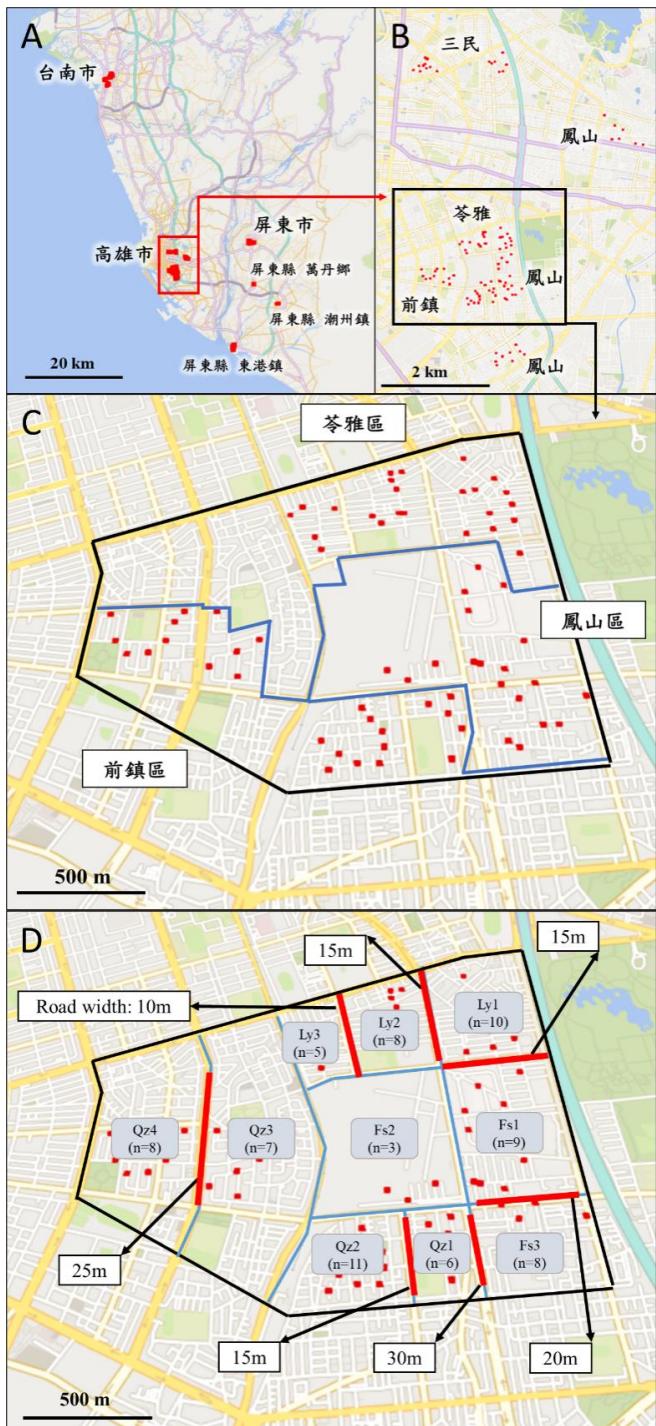
表十、不同地區之埃及斑蚊的抗藥性基因(CCEae3a 與 CYP9J28)的非同義變異位點基因頻率

Gene_id	Chr:Pos	Ref	Alt	A.A. mutation	全部樣本 n=191	實驗室樣本 n=15	臺南市 n=18	高雄市 n=108	屏東鎮 n=18	東港鎮 n=18	潮州鎮 n=3	萬丹鄉 n=3	越南 n=2	印尼 n=3	聖多美 n=2	泰國 n=1
AAEL023844 (CCEae3a)	2:174415202	A	C	F 225 V	0.21	0	0.639	0.127	0.278	0.382	0	0.167	0.75	0	0	0
AAEL023844 (CCEae3a)	2:174415672	C	T	S 68 N	0.065	0.417	0.111	0.014	0.029	0.088	0.333	0	0	0	NA	NA
AAEL023844 (CCEae3a)	2:174415782	G	T	F 31 L	0.15	0.033	0.5	0.109	0.156	0.25	0	0.167	1	0	0	NA
AAEL023844 (CCEae3a)	2:174415811	C	T	A 22 T	0.122	0	0.056	0.17	0.083	0.088	0	0	0	0.5	0	NA
AAEL023844 (CCEae3a)	2:174415831	T	C	K 15 R	0.047	0.333	0.111	0.005	0.029	0.062	0.333	0	0	0	NA	NA
AAEL014617 (CYP9J28)	3:368628298	C	T	S 174 N	0.091	0	0.071	0.089	0.125	0.167	0.167	0	0	0.167	0	NA

表十一、埃及斑蚊和白線斑蚊的序列對回沃爾巴克氏體(*Wolbachia pipiensis* wAlB)

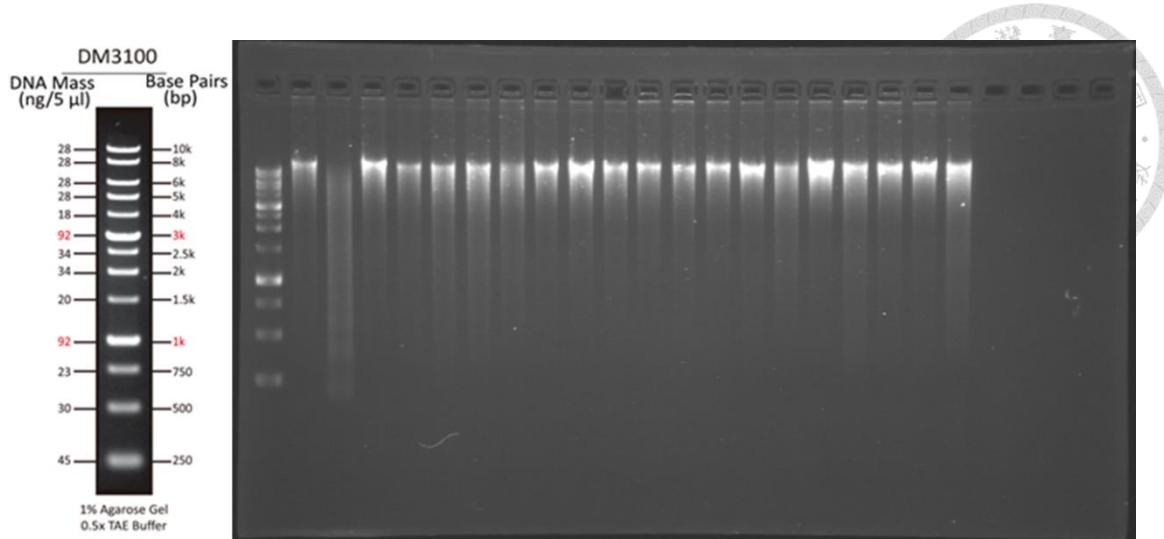
	樣本數	Bases Mapped(%) $< 10^{-5}$ 的樣本數	Bases Mapped(%) $> 10^{-5}$ 的樣本數
埃及斑蚊( <i>Aedes aegypti</i> )	191	169 (88.5%)	22 (11.5%)
白線斑蚊( <i>Aedes albopictus</i> )	70	4 (5.7%)	66 (94.3%)

# 圖



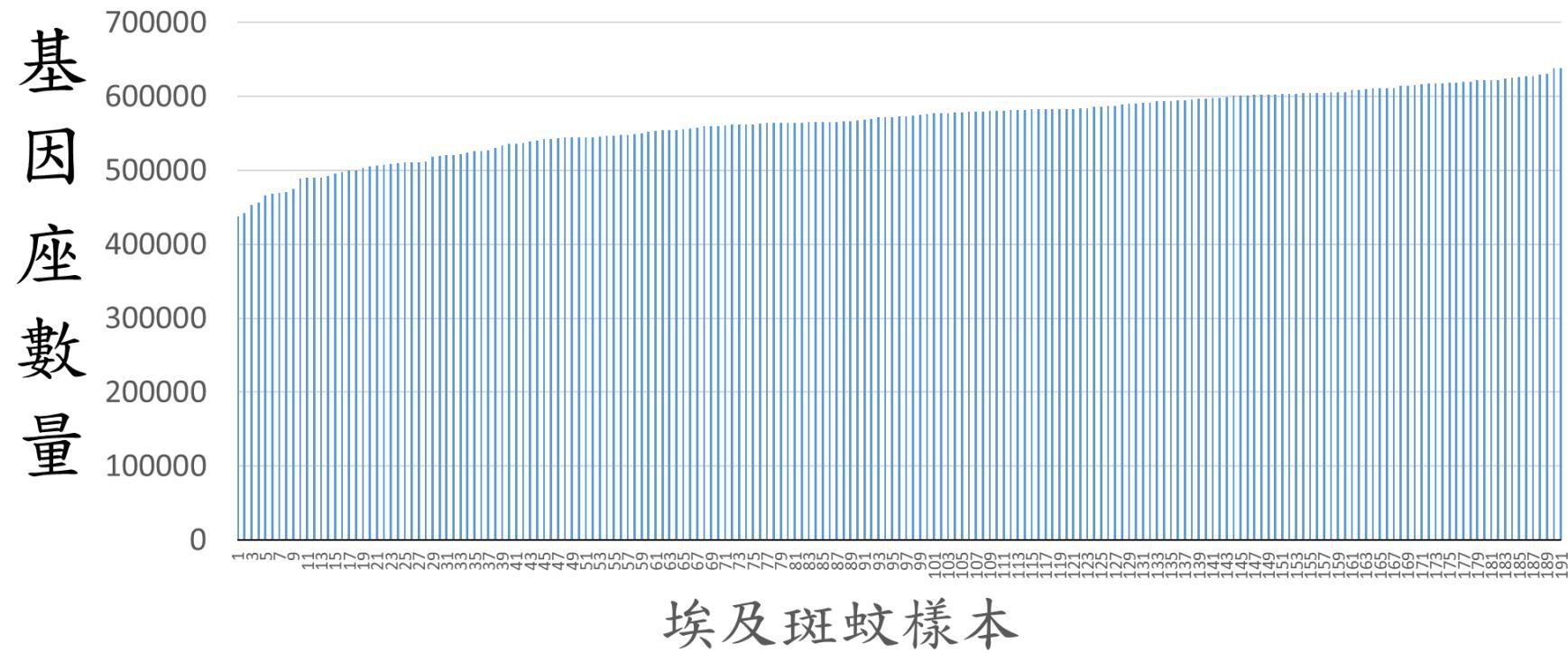
圖一、埃及斑蚊國內樣本採樣地點

- A: 本研究台灣南部 168 個埃及斑蚊樣本的採樣地點。
- B: 本研究高雄 108 個埃及斑蚊樣本的採樣地點。
- C: 台灣鐵路管理局高雄機廠樣區，75 個埃及斑蚊樣本的採樣地點。
- D: 在擴散屏障的評估的部分，不同路的路寬，以及各區塊內的樣本數。



圖二、以 1.5% 琼脂凝膠電泳確認埃及斑蚊的基因組 DNA 的品質  
由左至右 lane 1 為 DNA 標誌，lane2 至 lane 20 為埃及斑蚊樣本，其中 lane3 的樣本有模糊的現象，因此會將該樣本移除，以確保樣本品質。

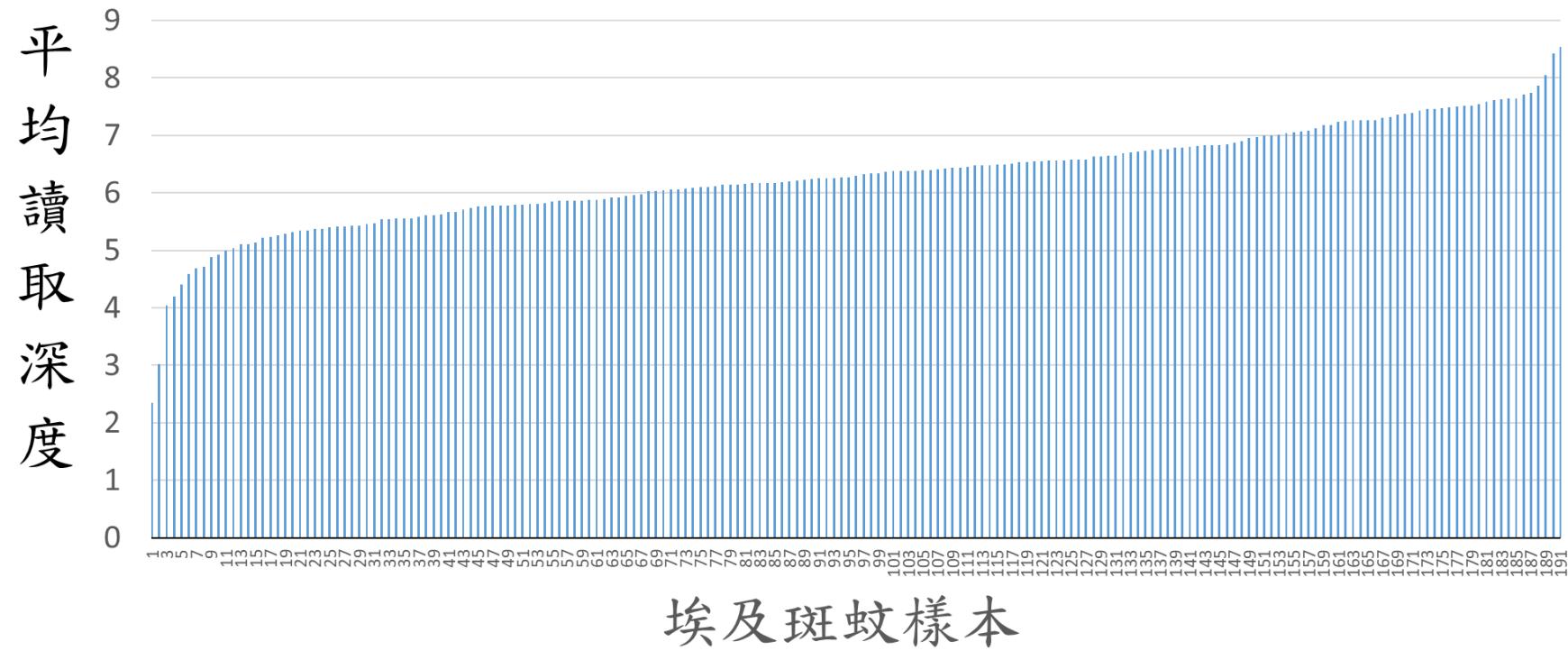
## 各個埃及斑蚊樣本的基因座數量



圖三、各個樣本的基因座數量分布圖

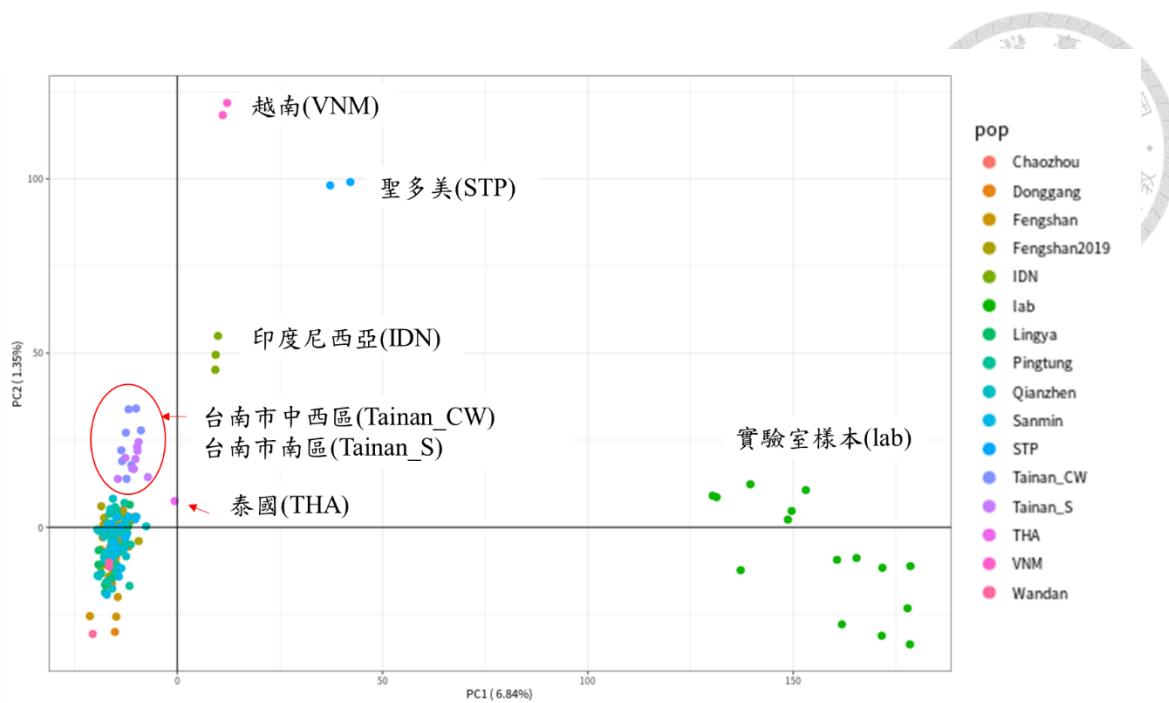
X 軸為各樣本，依基因座數量由小至大排列，共 191 個樣本，Y 軸為各樣本的基因座數。

## 各個樣本的平均讀取深度



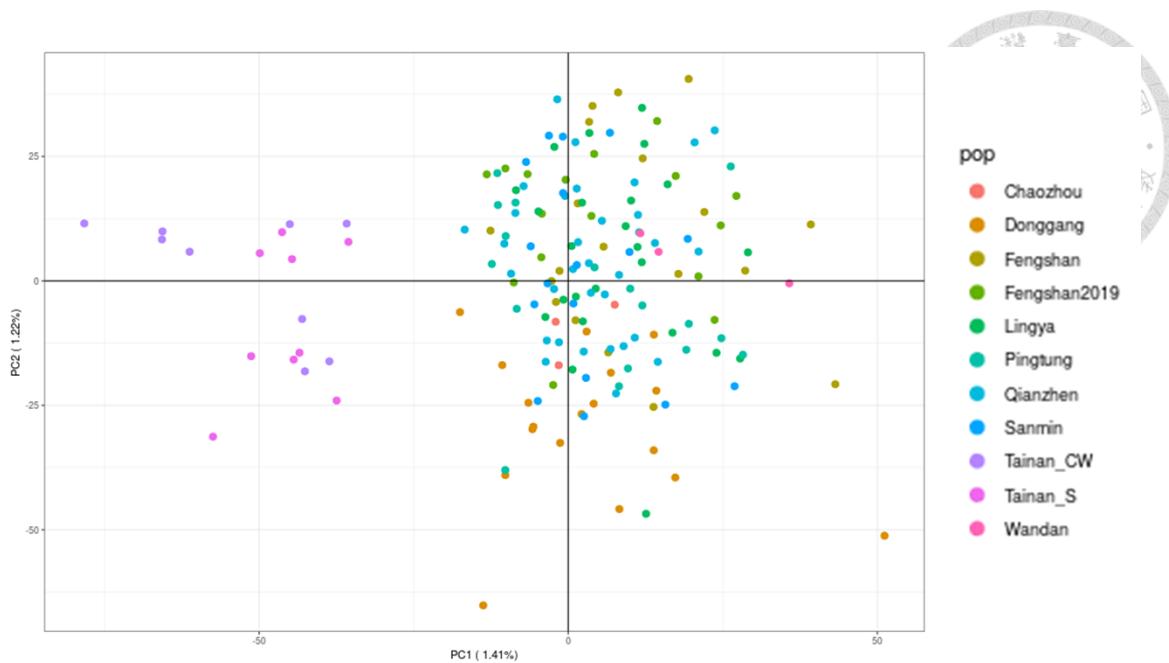
圖四、各個樣本的讀取深度分布圖

X 軸為各樣本，依平均讀取深度由小至大排列，共 191 個樣本，Y 軸為各樣本的平均深度。



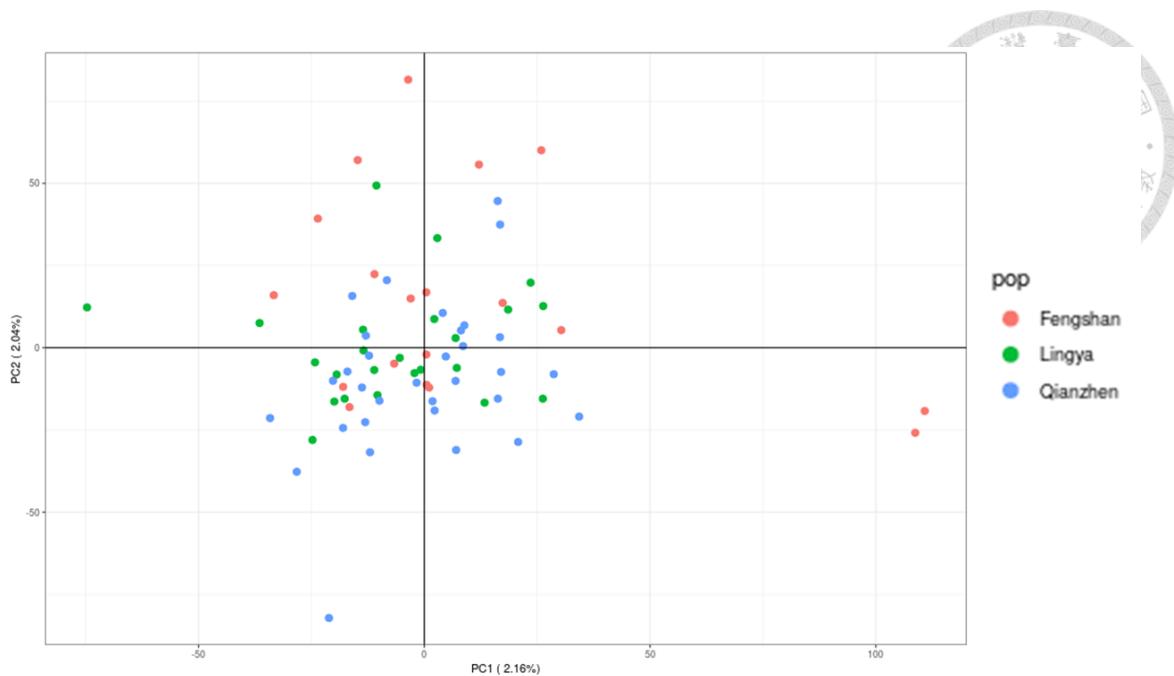
圖五、全部埃及斑蚊樣本的主成分分析

根據 393,100 個 SNP 進行的埃及斑蚊全部樣本的主成分分析，實驗室樣本(lab)與其他陷阱捕捉樣本呈現明顯分群。此外，國外樣本(越南 VNM、聖多美 STP、印度尼西亞 IDN)與國內樣本也有明顯分群現象。



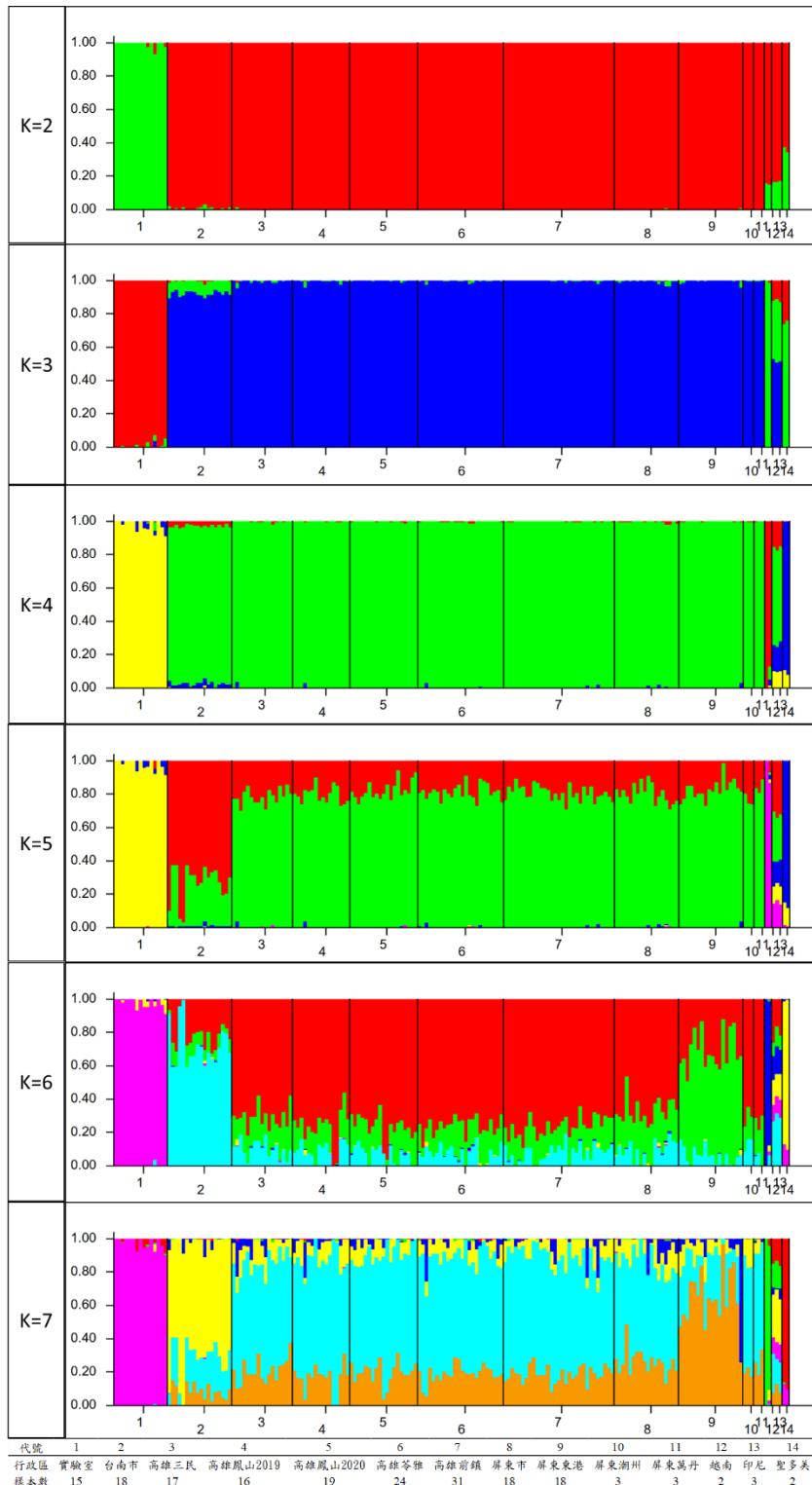
圖六、國內埃及斑蚊樣本的主成分分析

根據 393,100 個 SNP 進行的埃及斑蚊國內樣本的主成分分析，臺南市樣本與其他國內樣本有分群的現象，而在高雄市與屏東市則沒有分群的現象，可見高雄市與屏東市之間的埃及斑蚊可能有基因交流的現象。



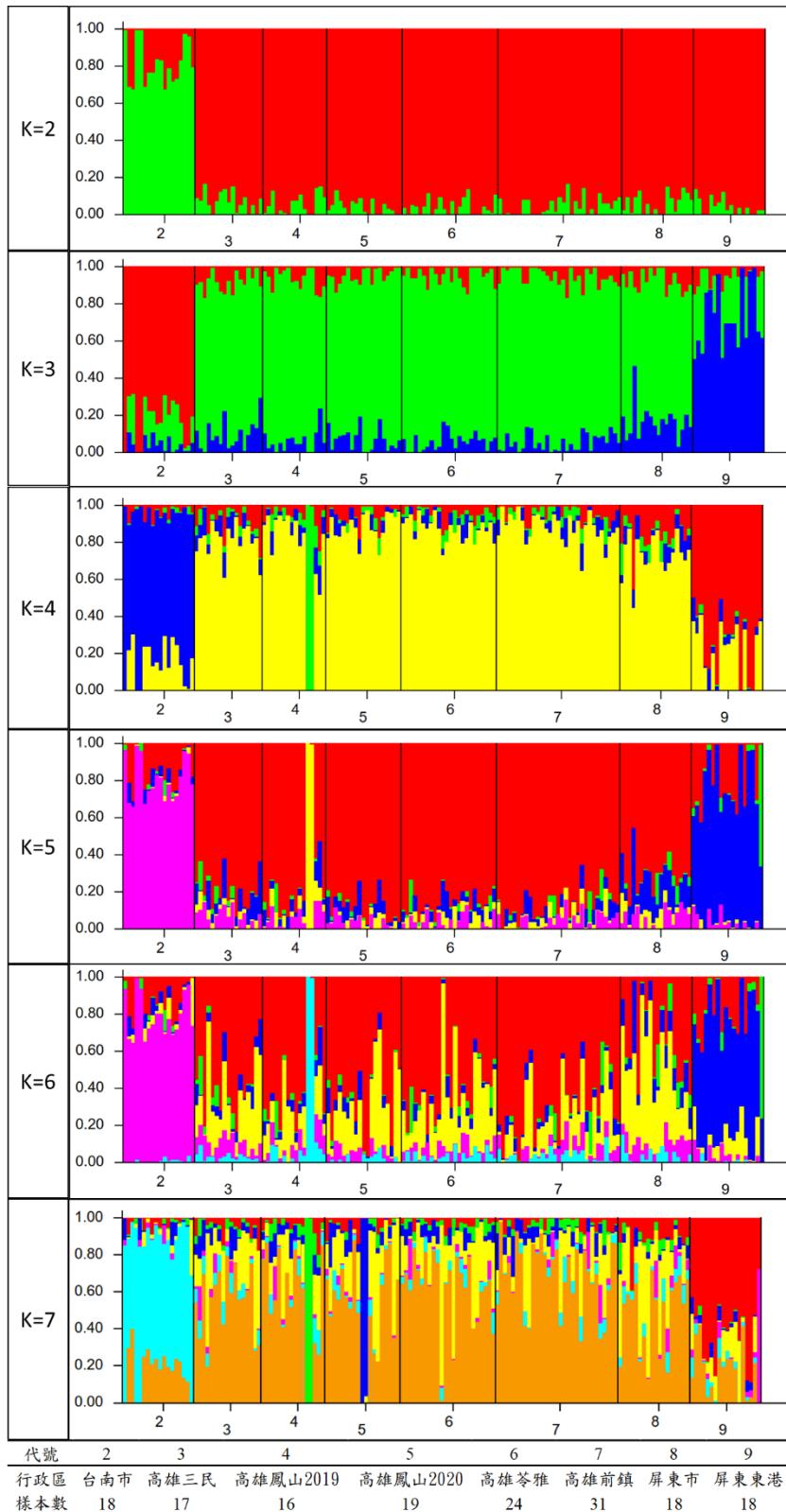
圖七、台灣鐵路管理局高雄機廠樣區埃及斑蚊樣本的主成分分析

根據 393,100 個 SNP 進行在台灣鐵路管理局高雄機廠樣區的埃及斑蚊樣本的主成分分析，鳳山、苓雅、前鎮三個區的埃及斑蚊並沒有明顯的分群。



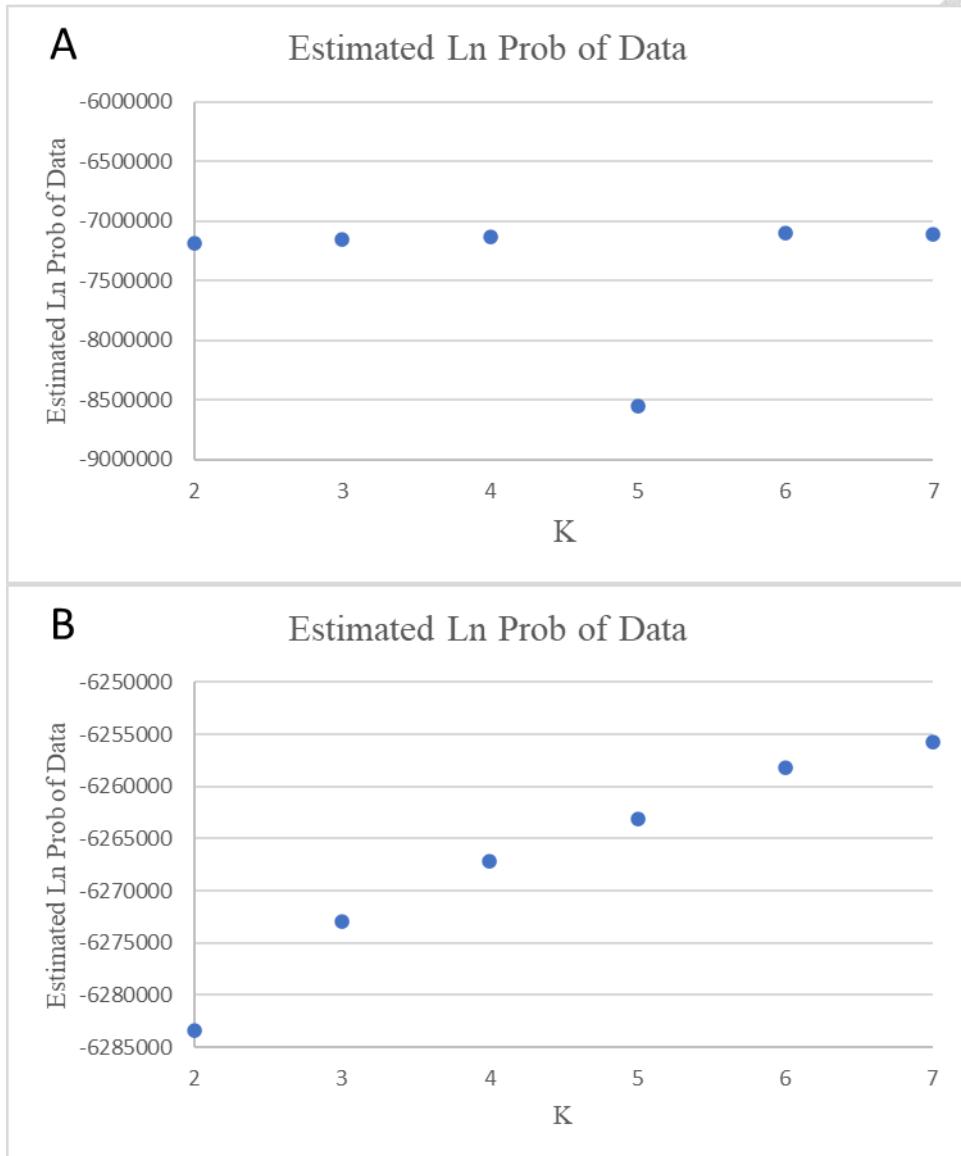
圖八、全部樣本的族群結構分析

在移除兩個平均讀取深度過低的樣本後(一個泰國樣本與一個高雄前鎮樣本)，  
 K=2 至 K=4 時，台灣的樣本差異都不大，直到 K=5 和 K=6 時，台南樣本(代號 2)  
 和東港樣本(代號 9)才分別與台灣其他樣本有不同的特徵，而屏東市樣本(代號 8)  
 則始終沒有與高雄的樣本(代號 3 至 7)有明顯的差異。



圖九、不計樣本數過少的國內族群的族群結構分析

進一步只看樣本數大於 10 的國內樣本，在 K=3 時，台南和東港的樣本就已經與其他地方有明顯的差異，然而一直到 K=7，屏東市的樣本始終與高雄市的樣本沒有太大的差異，說明屏東市和高雄市的埃及斑蚊，可能較多的基因交流。



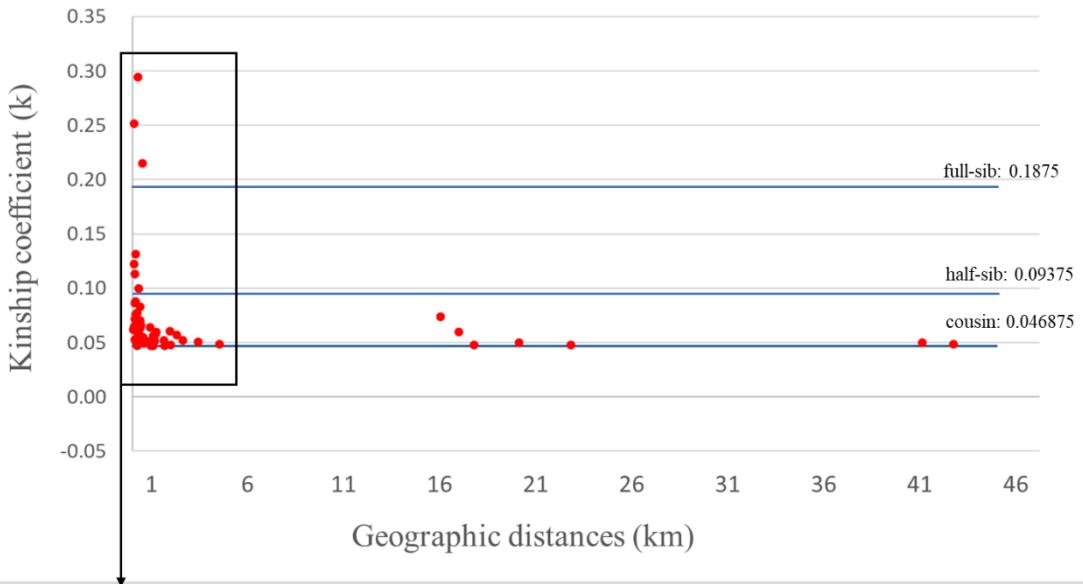
圖十、各 K 值的 estimated log-normal probability of the data

A: 全部樣本；B: 不計樣本數過少的國內族群。

在全部樣本的部分， $\ln P(D)$  僅在  $K=5$  時低於其他組別，無法推測最佳的 K 值。而在不計樣本數過少的國內族群的部分，雖然  $\ln P(D)$  在  $K=7$  時為最高，但從 STRUCTURE 分析結果來看，在  $K=4$  之後，除了台南和東港，並沒有在有明顯的分群，所以也無法從  $\ln P(D)$  判斷最佳 K 值。

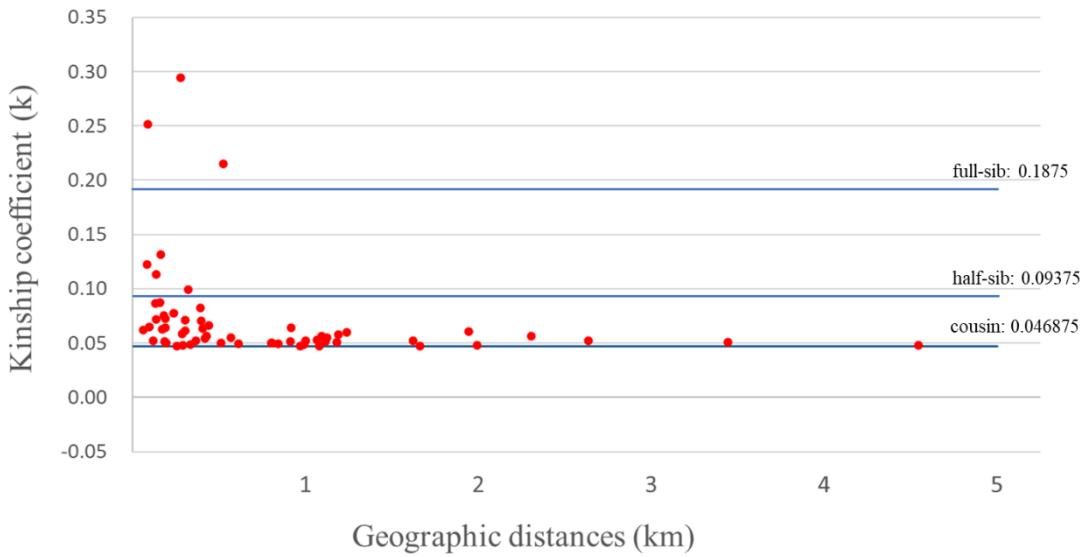
A

### Kinship coefficient across geographic distances



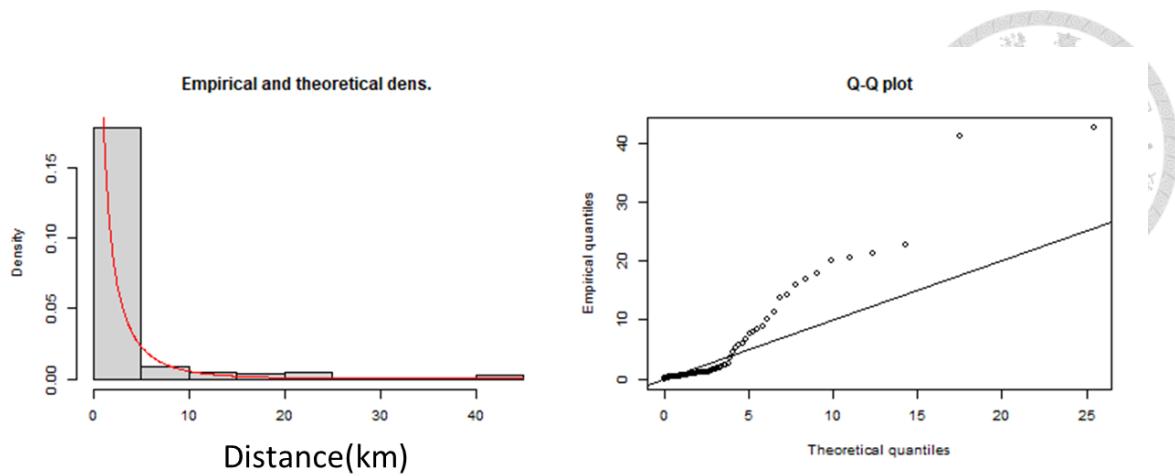
B

### Kinship coefficient across geographic distances



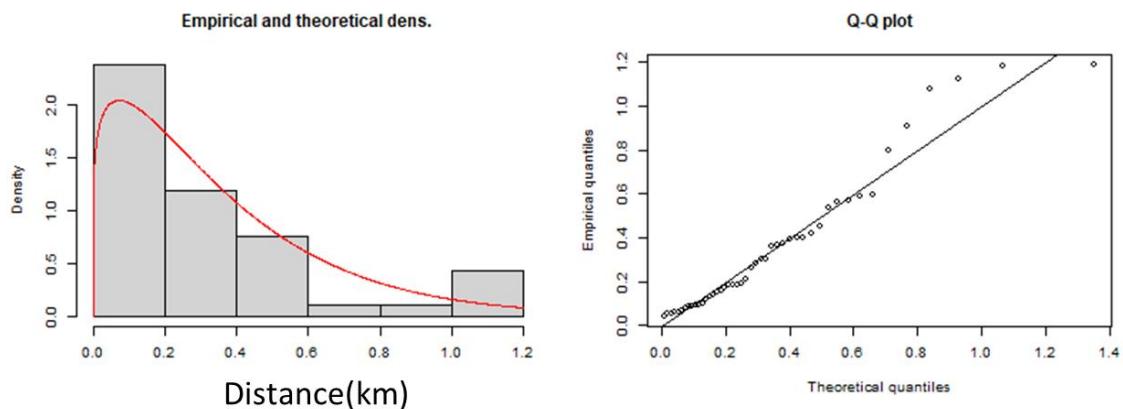
圖十一、親屬關係與地理距離

每一個點為一對樣本，X 軸為該樣本對相距之距離，Y 軸為其親屬關係(Loiselle's  $k$ )。(A: 所有  $k > 0.046875$  的樣本對。B:  $k > 0.046875$  且相距小於 5 公里的樣本對)

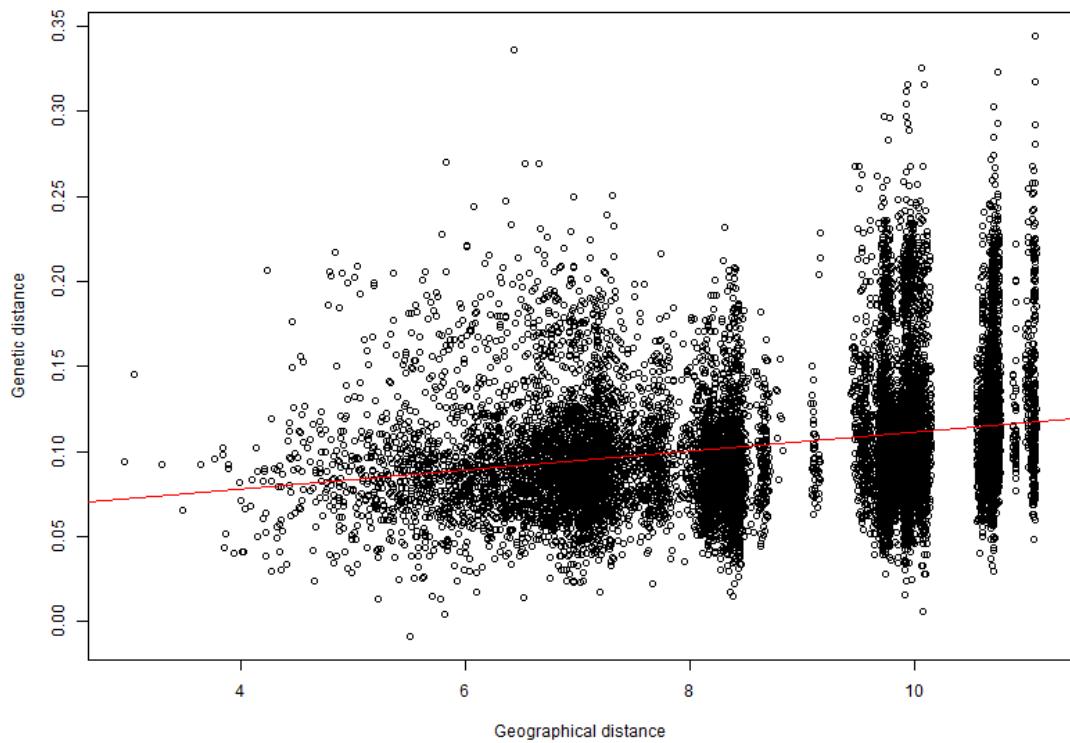


圖十二、大尺度地理範圍可能的有效散佈距離分布(所有國內樣本)

使用近親關係(全手足、半手足、表親)推測出來的可能有效散佈距離，建立韋伯分布的有效散佈距離的機率密度函數。當 QQ plot 中的點偏離參考線時，則表示觀察不符合預期，在大尺度的分布中 QQ plot 的點往上偏移，表示實際觀察到的值較預期的值大，推測可能因為人為活動，將埃及斑蚊帶至靠蚊蟲自身能力難以抵達的地方。



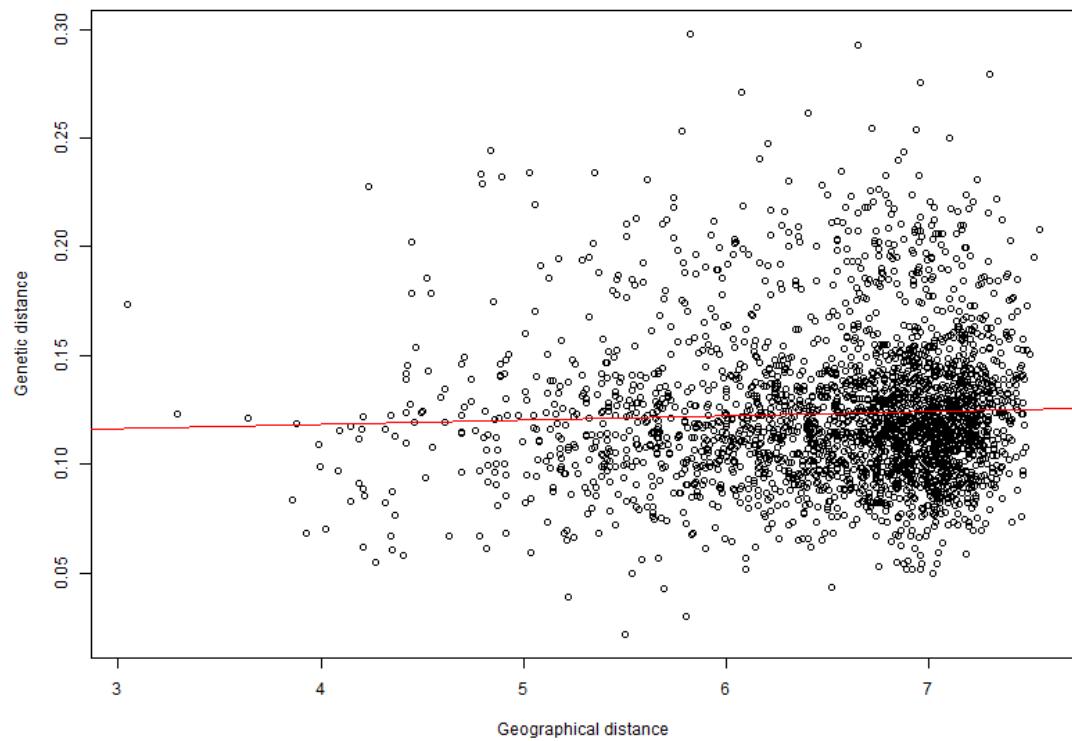
圖十三、小尺度地理範圍可能的有效散佈距離分布(台灣鐵路管理局高雄機廠樣區)  
在小尺度的部分，QQ plot 中的點貼近參考線，表示觀察值符合預期的值，表示即使受人為影響，也在自身可移動範圍內。



圖十四、大尺度地理範圍的遺傳距離與地理距離(所有國內樣本)

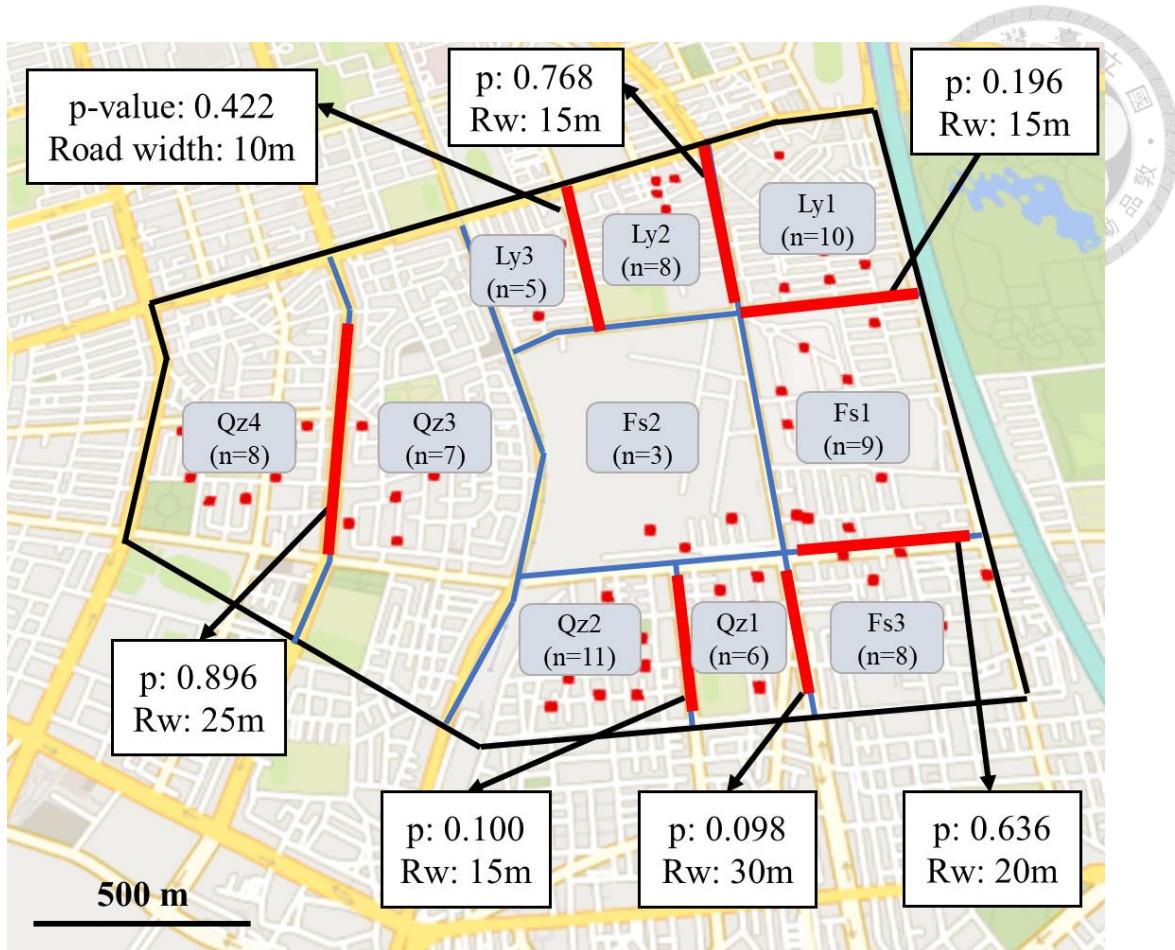
X 軸為地理距離的自然對數，Y 軸為基因距離(Rousset's a scores)

以本研究中所有國內樣本作為探討大尺度的地理範圍的對象，圖為移除近親關係的配對後，以倆倆樣本間基因距離與地理距離的自然對數所繪製的散佈圖。由圖中的紅線可知，在大尺度地理範圍內，即使人類活動可能影響埃及斑蚊的移動，但基因距離與地理距離的自然對數仍呈現正相關，這個結果與本研究的預期有所不同。



圖十五、小尺度地理範圍的遺傳距離與地理距離(台灣鐵路管理局高雄機廠樣區)  
X軸為地理距離的自然對數，Y軸為基因距離(Rousset's a scores)

以本研究中台灣鐵路管理局高雄機廠樣區之樣本作為探討小尺度的地理範圍的對象，圖為移除近親關係的配對後，以倆倆樣本間基因距離與地理距離的自然對數所繪製的散佈圖。在小尺度方面，基因距離與地理距離的自然對數呈現正相關，與預期相符，在小尺度的地理範圍上，埃及斑蚊藉由自身的移動能力，可以達到地理距離與基因距離成正比的關係。

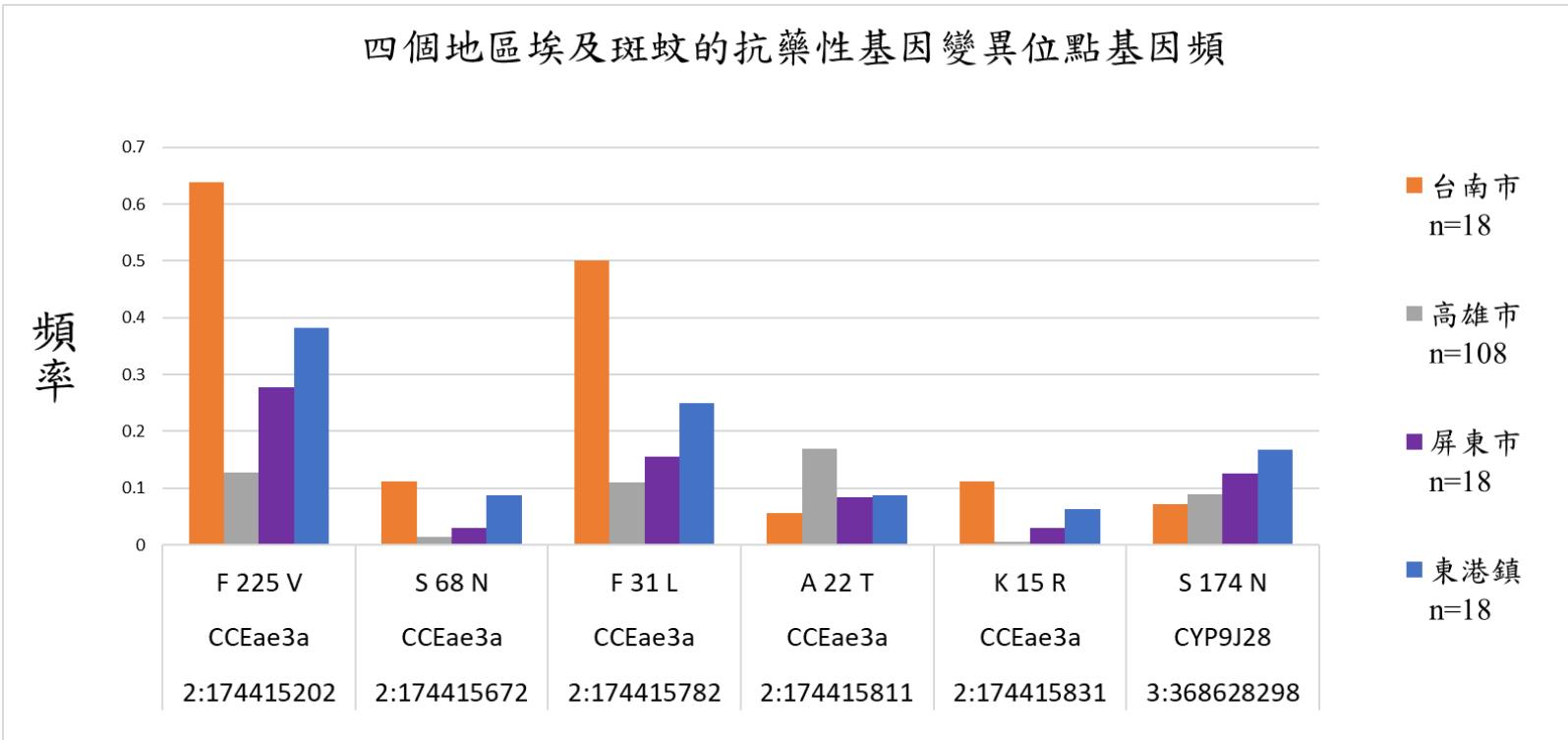


圖十六、以不同路寬探討道路屏障影響

黑線範圍內台灣鐵路管理局高雄機廠樣區，並以藍線切分為 10 個區塊，紅線為本研究中探討道路屏障影響時所討論的路段。Road width (Rw) 表示路寬。當  $p$ -value  $< 0.05$  時表示路段(紅線)兩側的兩區中的埃及斑蚊，在基因距離上有顯著差異，說明該路段可能作為屏障，影響埃及斑蚊的擴散。然而本研究中，並沒有路段的  $p$ -value  $< 0.05$ ，顯示在這些路段無法阻隔埃及斑蚊的擴散。

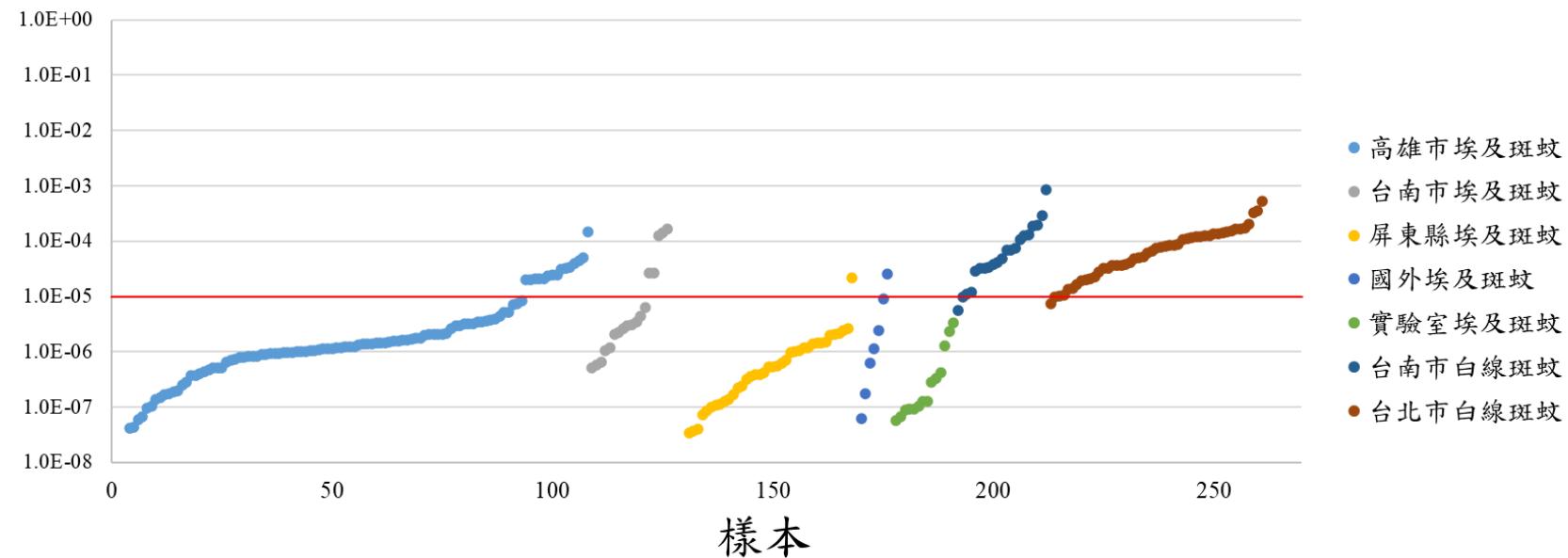


### 四個地區埃及斑蚊的抗藥性基因變異位點基因頻



圖十七、臺南市、高雄市、屏東市、東港鎮四個地區埃及斑蚊的抗藥性基因(CCEae3a 與 CYP9J28)的非同義變異位點基因頻率。然而上述變異位點都與已知的抗藥性位點無關，因此在本次研究中並未發現具有高等位基因頻率且穩定存在於族群中的抗藥性相關突變基因位點。

## 埃及斑蚊和白線斑蚊的序列對回沃爾巴克氏體的基因組



圖十八、不同埃及斑蚊和白線斑蚊個體(X軸)的序列對回沃爾巴克氏體(*Wolbachia pipiens* wAlbB)的比例(Y軸)。

X軸代表各個樣本，Y軸代表每個樣本與沃爾巴克氏體基因組比對後對上的位點的比例。因為此圖為對數呈現的圖表，若對上的位點為0，則不會出現於圖上，其中包含3個高雄市樣本，4個屏東縣樣本，1個實驗室樣本，1個外國樣本(泰國)。搭配表十一可以看到白線斑蚊對上位點比例，幾乎(94.3%)都高於十萬分之一(1.0E-05)，若依據文獻[43]台灣的白線斑蚊具有高達97%的沃爾巴克氏菌感染率來看，22個對上位點比例高於十萬分之一的樣本，可能也感染了沃爾巴克氏體。

## 附錄



附錄表一、臺南市中西區與南區埃及斑蚊樣本採集日期與經緯度座標(WGS84)

樣本編號	行政區	採集日期	WGS84-X	WGS84-Y
1852D020059001	臺南市中西區	20201003	120.201457	22.998925
1852D080059003	臺南市中西區	20201003	120.200378	22.996617
1852D080059004	臺南市中西區	20201003	120.204875	22.994915
1852D080059007	臺南市中西區	20201003	120.203780	22.996995
1852D080409006	臺南市中西區	20201003	120.200543	22.995019
1852D080409007	臺南市中西區	20201003	120.199814	22.992948
1852D080409008	臺南市中西區	20201003	120.199874	22.991124
1852D080409009	臺南市中西區	20201003	120.200259	22.991876
1852D080409010	臺南市中西區	20201003	120.198102	22.990609
1852D020279001	臺南市南區	20201201	120.190442	22.987880
1852D020279004	臺南市南區	20201103	120.189020	22.985913
1852D020279005	臺南市南區	20210105	120.189204	22.986148
1852D020279008	臺南市南區	20201201	120.187727	22.986809
1852D020079004	臺南市南區	20201006	120.193913	22.979770
1852D020079006	臺南市南區	20201201	120.194846	22.978773
1852D020089002	臺南市南區	20201201	120.197146	22.979019
1852D020089003	臺南市南區	20201006	120.196950	22.977546
1852D020089008	臺南市南區	20201201	120.192661	22.975547

附錄表二、高雄市三民區埃及斑蚊樣本採集日期與經緯度座標(WGS84)

樣本編號	行政區	採集日期	WGS84-X	WGS84-Y
1924KSBU903	高雄市三民區	20190715	120.331251	22.651238
1924KSBU904	高雄市三民區	20190715	120.332282	22.651251
1924KSBU906	高雄市三民區	20190729	120.333059	22.649484
1924KSBU907	高雄市三民區	20190624	120.333750	22.649532
1924KSBU909	高雄市三民區	20190624	120.331661	22.650896
1924KSBY905	高雄市三民區	20190729	120.333675	22.652819
1924KSBY909	高雄市三民區	20190617	120.334347	22.650682
1924KSWH902	高雄市三民區	20190624	120.321889	22.649573
1924KSWH906	高雄市三民區	20190729	120.320572	22.650308
1924KSWH907	高雄市三民區	20190805	120.320118	22.651688
1924KSWH908	高雄市三民區	20190624	120.319674	22.650846
1924KSWH909	高雄市三民區	20190715	120.319718	22.651894
1924KSWJ902	高雄市三民區	20190624	120.318606	22.650471
1924KSWJ903	高雄市三民區	20190617	120.319423	22.650538
1924KSWJ904	高雄市三民區	20190624	120.319921	22.650034
1924KSWJ907	高雄市三民區	20190715	120.318814	22.649587
1924KSWJ908	高雄市三民區	20190624	120.317588	22.649781

附錄表三、高雄市鳳山區埃及斑蚊樣本採集日期與經緯度座標(WGS84)

樣本編號	行政區	採集日期	WGS84-X	WGS84-Y
1632E120649022	高雄市鳳山區	20201124	120.331581	22.613184
1632E120649023	高雄市鳳山區	20201124	120.329743	22.612932
1632E120649024	高雄市鳳山區	20201124	120.330504	22.612547
1637KF0C901	高雄市鳳山區	20201201	120.333987	22.612381
1637KF0C902	高雄市鳳山區	20201101	120.333039	22.613253
1637KF0C904	高雄市鳳山區	20201101	120.334179	22.612978
1637KF0C907	高雄市鳳山區	20201101	120.332980	22.615366
1637KF0C908	高雄市鳳山區	20201101	120.333506	22.617220
1637KF0C909	高雄市鳳山區	20201101	120.332889	22.616142
1637KF0C910	高雄市鳳山區	20201101	120.334463	22.616456
1637KF0C916	高雄市鳳山區	20201101	120.335271	22.612432
1637KF0C917	高雄市鳳山區	20201101	120.334602	22.611842
1637KF0C919	高雄市鳳山區	20201101	120.334065	22.610268
1637KF0C920	高雄市鳳山區	20201101	120.334446	22.610026
1637KF0C921	高雄市鳳山區	20201101	120.335395	22.610834
1637KF0C922	高雄市鳳山區	20201101	120.335979	22.610863
1637KFOC903	高雄市鳳山區	20210201	120.333292	22.613191
1637KFOC905	高雄市鳳山區	20201101	120.335019	22.614119
1637KFOC914	高雄市鳳山區	20201101	120.337121	22.611942
1932KFSM902	高雄市鳳山區	20190822	120.332426	22.599334
1932KFSM903	高雄市鳳山區	20190822	120.332467	22.600734
1932KFSM904	高雄市鳳山區	20190815	120.333637	22.600170
1932KFSM906	高雄市鳳山區	20190815	120.334928	22.600853
1932KFSM907	高雄市鳳山區	20190822	120.336049	22.602185
1933KFFJ901	高雄市鳳山區	20190826	120.335431	22.599392
1933KFFJ907	高雄市鳳山區	20190826	120.332614	22.598658
1933KFYJ903	高雄市鳳山區	20190826	120.337535	22.600565
1933KFYJ908	高雄市鳳山區	20190826	120.336784	22.601068
1945KFWD902	高雄市鳳山區	20191127	120.351979	22.641949
1945KFWH901	高雄市鳳山區	20191204	120.353875	22.640133
1945KFWH910	高雄市鳳山區	20191120	120.353332	22.637809
1945KFWS910	高雄市鳳山區	20191112	120.355348	22.639452
1945KFWY902	高雄市鳳山區	20191112	120.354616	22.637842
1945KFWY905	高雄市鳳山區	20191120	120.357577	22.637059
1945KFWY907	高雄市鳳山區	20191112	120.358901	22.636848

附錄表四、高雄市前鎮區埃及斑蚊樣本採集日期與經緯度座標(WGS84)

樣本編號	行政區	採集日期	WGS84-X	WGS84-Y
1641E090549010-2	高雄市前鎮區	20201008	120.327266	22.610267
1641E090549013-1	高雄市前鎮區	20201008	120.327920	22.609791
1641E090549013-2	高雄市前鎮區	20201008	120.327920	22.609791
1641E090589005	高雄市前鎮區	20201104	120.331940	22.611271
1641E090589006	高雄市前鎮區	20201104	120.332073	22.611904
1641E090589007	高雄市前鎮區	20201104	120.331228	22.611629
1641E090589008	高雄市前鎮區	20201202	120.329062	22.611069
1641E090599003	高雄市前鎮區	20201202	120.331967	22.609600
1641E090599015	高雄市前鎮區	20201014	120.329371	22.609454
1652E090549026	高雄市前鎮區	20201104	120.328574	22.609451
1652E090549027	高雄市前鎮區	20201104	120.327544	22.609211
1652E090589017	高雄市前鎮區	20201216	120.328768	22.611492
1652E090599023-1	高雄市前鎮區	20201014	120.332400	22.610713
1652E090599023-2	高雄市前鎮區	20201014	120.332400	22.610713
1652E090599024	高雄市前鎮區	20201118	120.329492	22.610610
1652E090599025-1	高雄市前鎮區	20201014	120.329543	22.610042
1652E090599025-2	高雄市前鎮區	20201014	120.329543	22.610042
1901E090439001-1	高雄市前鎮區	20201001	120.323147	22.615307
1901E090439001-2	高雄市前鎮區	20201001	120.323147	22.615307
1901E090439005	高雄市前鎮區	20201201	120.324864	22.614158
1901E090439006	高雄市前鎮區	20201201	120.323002	22.613076
1901E090439008	高雄市前鎮區	20201101	120.324113	22.612692
1901E090439010-1	高雄市前鎮區	20201001	120.324030	22.613676
1901E090439010-2	高雄市前鎮區	20201001	120.324030	22.613676
1901E090459012	高雄市前鎮區	20201101	120.321265	22.614116
1901E090459013	高雄市前鎮區	20201101	120.321544	22.614885
1901E090459014	高雄市前鎮區	20201201	120.321882	22.615320
1901E090459016	高雄市前鎮區	20201101	120.319023	22.615199
1901E090459018-2	高雄市前鎮區	20201001	120.319330	22.614108
1901E090459019-1	高雄市前鎮區	20201001	120.319838	22.613577
1901E090459019-2	高雄市前鎮區	20201001	120.319838	22.613577
1901E090459020	高雄市前鎮區	20201001	120.320645	22.613635

附錄表五、高雄市苓雅區埃及斑蚊樣本採集日期與經緯度座標(WGS84)

樣本編號	行政區	採集日期	WGS84-X	WGS84-Y
1634E080489017	高雄市苓雅區	20201208	120.327199	22.618024
1634E080489019	高雄市苓雅區	20201222	120.325908	22.619626
1634E080499014	高雄市苓雅區	20201222	120.329312	22.619577
1634E080499024	高雄市苓雅區	20201027	120.327735	22.619941
1634E080529005	高雄市苓雅區	20201103	120.330421	22.619708
1634E080529006	高雄市苓雅區	20201117	120.330625	22.619709
1634E080529009	高雄市苓雅區	20210113	120.330347	22.620873
1634E080529015	高雄市苓雅區	20201110	120.329664	22.619254
1635E080549009	高雄市苓雅區	20201201	120.334175	22.619724
1635E080549011	高雄市苓雅區	20201201	120.333149	22.618762
1635E080559001	高雄市苓雅區	20210106	120.334968	22.620711
1635E080559003	高雄市苓雅區	20201201	120.335156	22.620143
1635E080559004	高雄市苓雅區	20201201	120.334266	22.618975
1635E080559007-1	高雄市苓雅區	20201201	120.335169	22.619376
1635E080559023	高雄市苓雅區	20201103	120.333139	22.620749
1636E080599026	高雄市苓雅區	20201103	120.335245	22.617850
1649E080489021	高雄市苓雅區	20201124	120.326411	22.620008
1649E080489036	高雄市苓雅區	20201027	120.326934	22.618583
1649E080519026	高雄市苓雅區	20201103	120.330139	22.621667
1649E080519030	高雄市苓雅區	20201117	120.330140	22.621324
1649E080519032	高雄市苓雅區	20201124	120.330605	22.621732
1649E080539039	高雄市苓雅區	20201103	120.333654	22.620841
1649E080569034-1	高雄市苓雅區	20201103	120.334517	22.621423
1649E080569040	高雄市苓雅區	20201103	120.333287	22.622420

附錄表六、屏東縣東港鎮、屏東市、萬丹鄉、潮州鎮埃及斑蚊樣本採集日期與經緯度座標(WGS84)

樣本編號	行政區	採集日期	WGS84-X	WGS84-Y
1715T030019006	屏東縣東港鎮	20201006	120.452135	22.468567
1715T030019008	屏東縣東港鎮	20201103	120.450872	22.46831
1715T030019010	屏東縣東港鎮	20201103	120.450753	22.466603
1715T030029002	屏東縣東港鎮	20201103	120.450671	22.470206
1715T030029003	屏東縣東港鎮	20201006	120.449849	22.469137
1715T030029004	屏東縣東港鎮	20201006	120.450432	22.468986
1715T030029004-1	屏東縣東港鎮	20201006	120.450432	22.468986
1715T030029006	屏東縣東港鎮	20201006	120.45242	22.470131
1715T030029008	屏東縣東港鎮	20201006	120.450771	22.469258
1715T030059003	屏東縣東港鎮	20201006	120.451573	22.465468
1715T030059005-1	屏東縣東港鎮	20201103	120.449362	22.466824
1715T030059007	屏東縣東港鎮	20201201	120.448409	22.467146
1715T030059009	屏東縣東港鎮	20201103	120.450321	22.46531
1715T030089003	屏東縣東港鎮	20201103	120.448046	22.465618
1715T030089008	屏東縣東港鎮	20201006	120.446955	22.46379
1717T030129004	屏東縣東港鎮	20201103	120.450428	22.460343
1717T030129005	屏東縣東港鎮	20201006	120.450538	22.459495
1717T030129006	屏東縣東港鎮	20201006	120.449439	22.459798
1809T010089002	屏東縣屏東市	20201007	120.480747	22.672238
1809T010089003	屏東縣屏東市	20201007	120.481216	22.671761
1811T010079002-1	屏東縣屏東市	20201104	120.482335	22.671737
1811T010079007-3	屏東縣屏東市	20201202	120.483352	22.673032
1811T010079009-1	屏東縣屏東市	20201007	120.482039	22.672657
1810T010189001	屏東縣屏東市	20201104	120.490255	22.669505
1810T010189002	屏東縣屏東市	20201007	120.490759	22.670021
1810T010189003	屏東縣屏東市	20201007	120.490641	22.670156
1810T010189005	屏東縣屏東市	20201104	120.490637	22.668829
1810T010189006	屏東縣屏東市	20201007	120.489556	22.668997
1810T010189009	屏東縣屏東市	20201007	120.491511	22.669292
1810T010349001-1	屏東縣屏東市	20201007	120.48813	22.667882
1810T010349005	屏東縣屏東市	20201007	120.488518	22.668136
1811T010339005	屏東縣屏東市	20201007	120.480655	22.668101
1811T010339010	屏東縣屏東市	20201202	120.481329	22.667535
1811T010359004	屏東縣屏東市	20201007	120.483131	22.666899
1811T010359006	屏東縣屏東市	20201007	120.483679	22.668897
1811T010359008	屏東縣屏東市	20210106	120.485014	22.668242
1936T050019003	屏東縣萬丹鄉	20201001	120.491372	22.587968
1936T050019005	屏東縣萬丹鄉	20201105	120.490264	22.587857
1936T050039001	屏東縣萬丹鄉	20201105	120.491011	22.588338
1938T020029003	屏東縣潮州鎮	20201105	120.540621	22.550123
1938T020029007-1	屏東縣潮州鎮	20201203	120.541536	22.549584
1938T020039009	屏東縣潮州鎮	20201001	120.537745	22.549447