

# 臺灣七種樹蛙的酯酶電泳分析

## 國中教師組生物科第二名

台北縣板橋國中

作者：曾志恩

### 一、研究動機和目的

在傳統的解剖學分類上，台灣地區樹蛙科 ( *Rhacophoridae* ) 共有台北樹蛙 ( *Rhacophorus taipeienus* )、莫氏樹蛙 ( *R. multirectis* )、裴翠樹蛙 ( *R. sp.* )、白領樹蛙 ( *Polypedates leucomystax* )、褐樹蛙 ( *R. robustus* ) 日本樹蛙 ( *R. japonicus* )、艾氏樹蛙 ( *R. eifingeri* ) 等七種，其中除白領樹蛙屬於 *Polypedates* 屬外，其餘六種均屬 *Rhacophorus* 屬 ( 呂，1982 )。

這七種樹蛙除裴翠樹蛙族群較小外，其餘六種在台灣都有不小的族群分佈，裴翠樹蛙是師大呂光洋老師實驗室民國七十年五月間新發現，依其外部形態與傳統解剖學分類，將其暫時歸屬於 *Rhacophorus* 屬，很可能是世界新種；本實驗目的之一，在研究裴翠樹蛙基本生化資料，進而對其在分類上位置之確定提供參考。

國內關於無尾類 ( *Anura* ) 的生化方面研究甚少，國外有關蟾蜍科 ( *Bufo* )、樹蟾科 ( *Hylidae* )、赤蛙科 ( *Raniidae* ) 等的生化分析論文發表相當多，但卻很少看到樹蛙科 ( *Rhacophoridae* ) 的文獻，因此樹蛙科的研究有其必要；本實驗目的之二，在研究台灣本區鄉土的樹蛙生化資料。

根據 Matthews ( 1975 ) 對蟾蜍 ( *Bufo* ) 的研究，Lewontin and Hubby ( 1966 ) 對果蠅 ( *Drosophila* ) 的研究，Hedgecock and Ayala ( 1974 ) 對山椒魚 ( *Salamandridae* ) 的研究，Adest ( 1977 ) 對蜥蜴 ( *Iguanidae* ) 的研究都顯示酯酶 ( *Esterase* ) 是多型性現象 ( *Polymorphism* ) 最明顯的一種酶，因此取酯酶做此研究甚為適合。

## 二、研究設備器材

### 1. 藥品：

Acrylamide monomer, N,N'-methylenebisacrylamide monomer crystallized, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, Tris ( hydroxy methyl ) aminomethane, IN HCl, Potassium Ferricyanide, Ammonium Persulfate, Glycine, Riboflavin, Acetone, Fast blue RR, Acetic acid,  $\alpha$ -Naphthylacetate.

### 2. 儀器：

天秤、冰箱、供電器 ( Power supply )、電泳槽、電泳管、冷凍離心機、離心管、研磨器、研磨機。

## 三、研究方法

### 1. 實驗材料的採集和處理：

本實驗所用皆為活標本，從野外帶回實驗室 2~3 天不給食物而後用於實驗。材料之獲得乃在民國 70 年 7 月至 71 年 8 月間，於台北縣後坑仔山、烏來、五峯山、苗栗縣獅頭山，南投縣溪頭，嘉義縣阿里山，台南縣關仔嶺，晚間 7:00~11:00 夜間採集而得。

### 2. 實驗方法：

將樹蛙穿刺，以解剖剪刀取下各約 0.2 克的肝臟、心肌、大腿肌及一個眼睛，分別置入研磨器中，加入 1ml PH8.3 的 tris-glycine 緩衝液於 0°C 下研磨，再置於高速冷凍離心機，在 0°C, 10,000 rpm 下離心 15 分鐘，倒出上清液供電泳之用。

本研究採用垂直管狀聚丙烯醯胺膠體電泳法 ( Vertical disc polyacrylamide gel electrophoresis ) ( Davis, 1964 ) 來分析脂酶，電泳膠：stacking gel 濃度 4%，Separating gel 濃度 7%，電泳緩衝液為 0.05 M Tris-

glycine Buffer PH 8.3 電壓 90 V，電流 3 mA / tube，時間 3.5 小時。

電泳後將膠體打出，先置於 0.1 M PH 6.5 的磷酸緩衝液中，中和 10 分鐘，然後再以 Shaw (1970) 的方法染色約 20 分鐘，染色後之膠體以 Methyl alcohol : Acetic acid : H<sub>2</sub>O = 20 : 1 : 20 的固定液固定保存，記錄染色帶 ( Bands ) 之相關位置供分析之用。

#### 四、實驗結果

本研究中種與種間遺傳相似性 ( genetic identity ) 和遺傳距離 ( genetic distance ) 的分析是依據 Nei (1972) 的方法：

$I_k$ : X, Y 兩族群在 k 異構酶區的遺傳相似性。

$x_i$ : x 族群 i 異構酶的出現頻率。

$y_i$ : Y 族群 i 異構酶的出現頻率。

D: X Y 兩族群的遺傳距離。

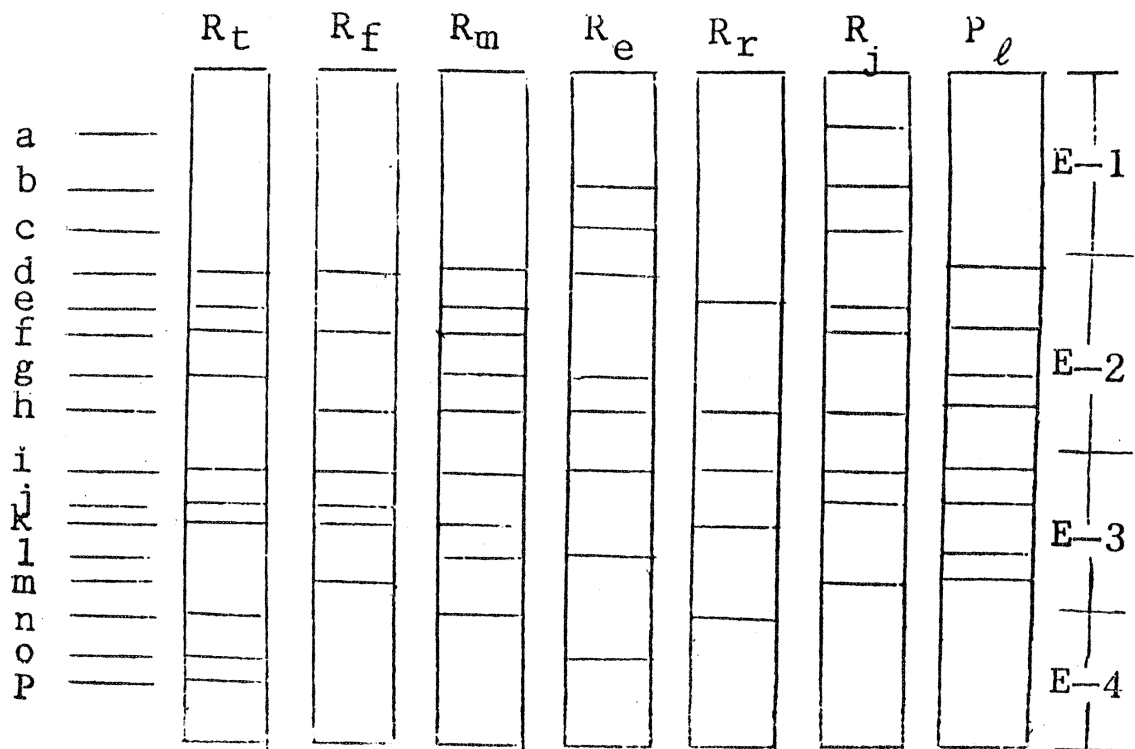
I: X Y 兩族群的遺傳相似性。

設有 X, Y 兩族群，首先求 X, Y 兩族群每一異構酶區的遺傳相似性： $I_k = \sum x_i y_i / \sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}$  而後將所有異構酶區的遺傳相似性數值加起來，除以異構酶區的數目，即得 X Y 兩族群的遺傳相似性 (I)，再將遺傳相似性數值代入下列公式即得 X, Y 兩族群的基因距離 (D)： $D = -\ell n I$

種內異合子比例 ( Proportion Heterozygosity ) 是依 Lewontin and Hubby (1966) 的求法：

設某種樹蛙第一個異構酶區有 a b c 三個異構酶，其出現頻率分別為  $a_f, b_f, c_f$ ，則第一個異構酶區的異合子比例 =  $2 a_f b_f + 2 b_f c_f + c_f a_f$ ，同法算出其他異構酶區的異合子比例，再求所有異構酶區異合子比例的算術平均數，即得該種的異合子比例。

依本實驗結果顯示，台灣七種樹蛙的酶已有多型性的現象，如圖一：



圖一：台灣七種樹蛙酯酶的多型性。主染色帶 (major band) 頻率  $\leq 0.95$  時視為多型性。a—P 表出現的異構酶，a—c 為酯酶第一異構酶區 (E—1) d—h 第二異構酶區，i—m 第三異構酶區，n—P 第四異構酶區，四個異構酶區的假定，主要是依台北樹蛙，因其表現的最清楚且分離。R<sub>t</sub>：台北樹蛙，R<sub>f</sub>：裴翠樹蛙，R<sub>m</sub>：莫氏樹蛙，R<sub>e</sub>：艾氏樹蛙，R<sub>r</sub>：褐樹蛙，R<sub>j</sub>：日本樹蛙，P<sub>l</sub>：白領樹蛙。

在圖一所假定的四個異構酶區下，酯酶異構酶出現頻率如下表：

表一：台灣七種樹蛙的酯酶異構酶頻率，E—k 表 Esterase 第 k 異構酶區，a—P 表出現的異構酶。代號 R<sub>t</sub>—P<sub>l</sub> 如圖一。

		R <sub>t</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>m</sub>	R <sub>e</sub>	R <sub>r</sub>	R <sub>j</sub>	P <sub>ℓ</sub>
E-1	a	—	—	—	—	—	0.444	—
	b	—	—	—	0.500	—	0.278	—
	c	—	—	—	0.500	—	0.278	—
E-2	d	0.250	0.334	0.288	0.666	—	—	0.292
	e	0.250	—	0.288	—	0.500	0.444	—
	f	0.250	0.333	0.162	—	—	0.444	0.291
	g	0.250	—	0.162	0.167	—	—	0.292
	h	—	0.333	0.100	0.167	0.500	0.112	0.125
E-3	i	0.333	0.417	0.333	0.750	0.500	0.389	0.375
	j	0.334	0.167	—	—	—	0.389	0.125
	k	0.333	0.166	0.333	—	0.500	—	—
	l	—	—	0.334	0.250	—	—	0.125
	m	—	0.250	—	—	—	0.222	0.375
E-4	n	0.583	—	1.000	—	1.000	—	—
	o	0.083	—	—	1.000	—	—	—
	p	0.334	—	—	—	—	—	—

依 Lewontin and Hubby (1966) 的方法求出異合子比例如下表：

表二：台灣七種樹蛙酯酶的異合子比例 (Proportion Heterozygosity)

	R <sub>t</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>m</sub>	R <sub>e</sub>	R <sub>r</sub>	R <sub>j</sub>	P <sub>ℓ</sub>
E-1	—	—	—	0.500	—	0.648	—
E-2	0.750	0.667	0.765	0.501	0.500	0.593	0.729
E-3	0.667	0.709	0.667	0.375	0.500	0.648	0.688
E-4	0.542	—	0	0	0	—	—
mean	0.653	0.688	0.480	0.344	0.333	0.630	0.708

依 Nei (1972) 的方法求出的遺傳距離和遺傳相似性如下表：

表三：台灣七種樹蛙酯酶的遺傳距離 (D)和遺傳相似性 (I)。

I \ D	R <sub>t</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>m</sub>	R <sub>e</sub>	R <sub>r</sub>	R <sub>j</sub>	P <sub>ℓ</sub>
R <sub>t</sub>	—	0.776	0.357	1.146	0.390	1.011	0.790
R <sub>f</sub>	0.460	—	0.849	1.019	0.942	0.772	0.172
R <sub>m</sub>	0.700	0.428	—	1.011	0.227	1.398	0.844
R <sub>e</sub>	0.318	0.361	0.364	—	1.532	1.070	1.013
R <sub>r</sub>	0.677	0.390	0.797	0.216	—	1.309	1.537
R <sub>j</sub>	0.364	0.462	0.247	0.343	0.270	—	0.858
P <sub>ℓ</sub>	0.454	0.842	0.430	0.363	0.215	0.424	—

## 五、討 論

台灣七種樹蛙的酯酶多型性現象 (圖一, 表一), 因種而異, 體內存在的酯酶異構酶 (Esterase Isozymes) 種類 5—10 種不等, 其中以褐樹蛙最少 (5 種), 台北樹蛙最多 (10 種), 此結果與 Rogers (1972), Mattews (1975) 對蟾蜍 (Bufo) 的研究結果相似。本實驗另一結果顯示台灣樹蛙的異合子比例 (Lewontin and Hubby, 1966) 都在 0.708—0.333 之間 (表二), 其中以白領樹蛙最高 (0.708), 褐樹蛙最低 (0.333) 根據 Dessauer, Nevo and chuang (1975) 的研究報告指出: 種的遺傳多變性 (genetic variation) 可能是對環境變化的選擇反應, 而異合子 (Heterozygosity) 可使生物具有代謝的適應可塑性 (Matabolic plasticity)。由此推論, 台灣樹蛙酯酶的多型性和異合子可能與其棲息環境和食性有很大的相關。

應用 Nei (1972) 的方法求出台灣七種樹蛙的遺傳距離 (D), 和遺傳相似性 (I) 如表三。Gorman and Renzi (1979) 利用 Nei 的方法研究標本數量多少對所求得遺傳距離精確度的影響時發現: 種與種之間的比較, 一個個體已經足夠, 此時遺傳距離

的誤差 $\leq 0.1$ 而此誤差並不影響演化系統樹的推論 (phylogenetic inference)，本實驗標本數量都在 1 以上，故可靠性甚高，其誤差可忽略，依本實驗結果 (表三) 約可將台灣七種樹蛙分成四群：

第一群：白領樹蛙、裴翠樹蛙，兩者  $I = 0.842$   $D = 0.172$ 。

第二群：莫氏樹蛙、台北樹蛙、褐樹蛙，三者  $I$  平均 = 0.725  $D$  平均 = 0.322

第三群：日本樹蛙，與其他六種的  $I$  平均 = 0.352， $D$  平均 = 1.044

第四群：艾氏樹蛙，與其他六種的  $I$  平均 = 0.328， $D$  平均 = 1.115。

據 Hedgecock and Ayala (1974) 的研究 *Taricha* 的  $D_{\text{between subspecies}} = 0.145 \pm 0.027$ ， $D_{\text{between species}} = 0.466 \pm 0.021$ ，Ayala et al (1973) 的研究 *Drosophila willistani* group 的  $D_{\text{between subspecies}} = 0.230 \pm 0.016$ ， $D_{\text{between nonsibling species}} = 1.056 \pm 0.068$ ，Adent (1977) 所引用資料 *Anniela* 的  $D_{\text{between subspecies}} = 0.1$ ， $D_{\text{between species}} = 0.25$  可惜未見有關無尾類的資料，但從上面的資料顯示就酯酶而言，第一群裴翠樹蛙與白領樹蛙血源很近，幾乎像是同種中的亞種，第二群褐樹蛙、莫氏樹蛙、台北樹蛙三者則介於同種與不同種之間，而第三群日本樹蛙，第四群艾氏樹蛙則是與其他幾種分的很開的種。

傳統分類將台灣樹蛙分成 *Rhacophorus* 與 *Polypedates* 兩屬，但本研究結果卻顯示唯一屬於 *Polypedates* 屬的白領樹蛙與其他六種 (皆屬於 *Rhacophorus* 屬) 的遺傳距離平均 ( $D$  平均) 為 0.869 反不如屬於 *Rhacophorus* 屬的日本樹蛙、艾氏樹蛙與本身外六種之距離那麼遠 (日本， $D$  平均 = 1.044; 艾氏， $D$  平均 = 1.115)。此外，若依傳統分類，新發現的裴翠樹蛙歸屬於 *Rhacophorus* 屬，但從結果發現  $D_{\text{裴翠—白領}} = 0.172$ ，故新發現的裴翠樹蛙似乎應屬 *Polypedates* 屬而非 *Rhacophorus*

屬。故本實驗與傳統分類有很大的出入，因此，有關台灣樹蛙的研究實在有待更進一步的探討。

## 六、結 論

以聚丙烯醯胺膠體電泳法 ( Polyacrylamide Gel Electrophoresis ) 分析台灣七種樹蛙的酯酶 ( Esterase ) ，發現台灣七種樹蛙酯酶都有多型性現象 ( Polymorphism ) ，異合子比例 ( Proportion Heterozygosity ) 介於 0.708 至 0.333 之間，此二現象可能與其棲息環境和食性有關。

利用 Nei 的統計方法，發現新發現的裴翠樹蛙可能屬於 Polypedates 屬而非 Rhacophorus 屬。白領樹蛙與 Rhacophorus 屬六種樹蛙之遺傳距離平均 ( D 平均 ) 為 0.869 ，反不如屬於 Rhacophorus 屬的日本樹蛙、艾氏樹蛙與其他六種樹蛙遺傳距離那麼遠 ( 日本，D 平均 = 1.044 ，艾氏，D 平均 = 1.115 ) 。故本實驗與傳統分類有頗大出入，有關台灣樹蛙有待更進一步的研究。

## 七、參考資料

1. 呂光洋、張正雄、陳世煌，1982，台灣的兩棲類 P 64-96。
2. Ayala, F.J., Tracey, M.L., Hedgecock, D., and Richmond, R.C. 1973. Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evolution* 28: 576-592.
3. Adest, G.A. 1977. Genetic relationships in the Genus *Uma* ( Iguanidae ). *Copeia* 1977: 47-52.
4. Case, S.M., Haneline, P.G., and Smith, M.F. 1975. Protein variation in several species of *Hyla*. *Syst. Zool.* 24: 281-295.
5. Davis, B.J. 1964. Davis electrophoresis I. Method and application to human serum protein. *Ann.M.Y.*,



- Acad. Sci. 121 : 404-407.
6. Dessauer, H.C., Nevo, E., and Chuang, K.C. 1975. High genetic variability in an ecologically variable vertebrate, *Bufo viridis*. *Biochem. Genet.* 13 : 651-661.
  7. Gorman, G.C., and Rezi, J. 1979. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: Effects of Sample Size. *Copeia* 1979 : 242-249.
  8. Hedgecock, D., and Ayala, F.J. 1974. Evolutionary divergence in the Genus *Taricha* (Salamandridae). *Copeia* 1974 : 738-747.
  9. Lewontin, R.C., and Hubby, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudobscura*. *Genetics* 54 : 595-609.
  10. Matthews, T.C. 1975. Biochemical polymorphism in populations of the Argentin Toad, *Bufo arenarum*. *Copeia* 1975 : 454-465.
  11. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106 : 283-292.
  12. Rogers, J.S. 1973. Protein polymorphism, genic heterozygosity and divergence in the Toad *Bufo cognatus* and *B. speciosus*. *Copeia* 1972 : 322-330.
  13. Shaw, C.R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4 : 297-320.

評語：廣泛採集台灣的樹蛙，七種樹蛙利用形態構造的特徵加以鑑定

發現有一為新種，再以電泳法分析其酯酶以和其他六種比較，雖然結果還不能確定，但却可供作鑑定種的依據，作者研究態度嚴謹，觀察仔細，其論文的撰寫格式與文字表達，均有一般論文的水準。