



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Lack of Genetic Variation Shows the Urgency of Conservation for *Megacrania tsudai* Shiraki (Phasmatodea: Phasmatidae) 【Scientific note】

缺乏遺傳變異亟待保育的津田氏大頭竹節蟲 (竹節蟲目：竹節蟲科) 【科學短訊】

I-Hsin Wu¹, Yu-Yen Chen², Ping-Shih Yang³, and Wen-Bin Yeh^{2*}

吳怡欣¹、陳攸雁²、楊平世³、葉文斌^{2*}

*通訊作者E-mail: wbyeh@nchu.edu.tw

Received: 2012/02/09 Accepted: 2012/03/03 Available online: 2012/03/01

Abstract

The distribution of *Megacrania tsudai* Shiraki, a threatened stick insect species in Taiwan, is limited to the Hengchun Peninsula and Green Island, with only a small population in each locality. Previous studies on this insect were mostly focused on its morphology and life history. In the present study, the 16S rDNA gene was used as a marker to study the genetic diversity, phylogenetic relationships, and phylogeography of *M. tsudai*. Crude DNA was extracted from 46 samples of eggs or partial mid-leg tarsi collected from three populations (Jioupeng, Kankau and Green Island). Sequence analyses of 16S rDNA, ~ 550 bp, from 23 successfully amplified samples showed no variation at all between and within populations. This result suggests that the populations of *M. tsudai* in Taiwan may have either descended from a limited number of ancestors (founder effect), or have experienced a bottleneck effect due to a small population size and restricted habitats. From a conservation point of view, the perfect genetic homogeneity of the *M. tsudai* populations will have a negative impact on the long-term survival of this species in Taiwan. In addition to enhancing their legal protection, it would also be helpful to conserve this species by preserving its habitats and broaden its distribution range. It is also very important that we explore potential genetic variation and preserve it in the wild populations.

摘要

分布於恆春半島及綠島少數地點的津田氏大頭竹節蟲 (*Megacrania tsudai* Shiraki) · 數量稀少 · 被列為珍貴稀有保育類動物。此物種的研究多關於形態與生活史的描述 · 未有遺傳組成相關資料。本研究利用粒線體16S rDNA序列 · 探討屏東港口、九棚及台東綠島三地津田氏大頭竹節蟲族群間的遺傳多樣性及地理親緣關係。基於保育原則 · 各樣本僅採成蟲中足一小段跗節或卵進行研究 · 而將個體釋回。除九棚及綠島的卵樣本外 · 所有的跗節樣本均可複製出DNA · 總計從 46 隻個體的樣本中成功複製增幅其中的 23 個樣本。16S rDNA區段約 550 個鹼基的結果顯示 · 各地津田氏大頭竹節蟲族群間全無遺傳變異 · 基因已完全均質化。推論台灣目前的津田氏大頭竹節蟲族群都是源自某一小族群或少數個體 · 顯現出拓荒者效應 (founder effect) 或曾經歷過瓶頸效應 (bottleneck effect) 的可能性。此遺傳組成非常不利於此物種的存活及保育 · 急需投入更多的保育措施。除列為保育物種外 · 更需突破分佈地域的侷限性 · 增加其棲地範圍 · 也需增加研究樣本 · 以保留或復育可能存在的遺傳變異個體及其後代。

Key words: *Megacrania tsudai* Shiraki, 16S rDNA, threatened insect

關鍵詞: 津田氏大頭竹節蟲、16S 核糖體去氧核糖核酸、保育昆蟲。

Full Text: [PDF \(0.59 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

缺乏遺傳變異亟待保育的津田氏大頭竹節蟲 (竹節蟲目：竹節蟲科)

吳怡欣¹、陳攸雁²、楊平世³、葉文斌^{2*}

¹ 台北市立動物園 11656 臺北市文山區新光路二段 30 號

² 國立中興大學昆蟲學系 40227 台中市南區國光路 250 號

³ 國立台灣大學昆蟲學系 10617 台北市羅斯福路四段 1 號

摘 要

分布於恆春半島及綠島少數地點的津田氏大頭竹節蟲 (*Megacrania tsudai* Shiraki)，數量稀少，被列為珍貴稀有保育類動物。此物種的研究多關於形態與生活史的描述，未有遺傳組成相關資料。本研究利用粒線體 16S rDNA 序列，探討屏東港口、九棚及台東綠島三地區津田氏大頭竹節蟲族群間的遺傳多樣性及地理親緣關係。基於保育原則，各樣本僅採成蟲中足一小段跗節或卵進行研究，而將個體釋回。除九棚及綠島的卵樣本外，所有的跗節樣本均可複製出 DNA，總計從 46 隻個體的樣本中成功複製增幅其中的 23 個樣本。16S rDNA 區段約 550 個鹼基的結果顯示，各地津田氏大頭竹節蟲族群間全無遺傳變異，基因已完全均質化。推論台灣目前的津田氏大頭竹節蟲族群都是源自某一小族群或少數個體，顯現出拓荒者效應 (founder effect) 或曾經歷過瓶頸效應 (bottleneck effect) 的可能性。此遺傳組成非常不利於此物種的存活及保育，急需投入更多的保育措施。除列為保育物種外，更需突破分佈地域的侷限性，增加其棲地範圍，也需增加研究樣本，以保留或復育可能存在的遺傳變異個體及其後代。

關鍵詞：津田氏大頭竹節蟲、16S 核糖體去氧核糖核酸、保育昆蟲。

前 言

津田氏大頭竹節蟲 (*Megacrania tsudai* Shiraki) 在分類地位上屬竹節蟲科

(Phasmatidae)，平頭竹節蟲亞科 (Platycraninae)，大頭竹節蟲屬 (*Megacrania*)，過去曾被認為是 *M. alpheus* (Westwood) 的台灣族群 (Wang and Chu,

*論文聯繫人

Corresponding email: wbyeh@nchu.edu.tw

1982; Chow and Lin, 1986; Chow and Tsai, 1987; Yamasaki, 1991)。本種成蟲體長約 13 至 15 公分，頭部卵圓形，觸角短，前胸背板之前側方較窄，中胸背板具有許多明顯的瘤突 (tubercle)，體色淡綠至深藍綠色，後翅黃褐色，腿節褐綠色，具有明顯的刺突，但脛節則無刺突，肛上片大約與中胸背板等長，尾毛長度超出肛上片 (operculum) (Hsiung, 1991, 2007)。Hsiung (1991) 根據形態上的特徵指出，本種與分布於印尼摩鹿加群島 (Moluccas) 之 *M. wegneri* Willemsen 有較近之外型，其形態差異在於 *M. wegneri* 中胸背板上的瘤突刺較多且後翅較大。

Liu and Yang (2002) 指出津田氏大頭竹節蟲在台灣主要分布於南部且大部分位於東海岸沿海地區以及離島的綠島與蘭嶼；Ushirokita (1998) 認為津田氏大頭竹節蟲的分布與海流散佈有關。Tseng (1997) 指出本種尚分布於所羅門 (Solomons) 及薩摩亞 (Samoa) 群島，此可能肇因於該作者將津田氏大頭竹節蟲與分布於斐濟 (Fiji) 的 *M. phelaus* (Westwood) 及分布於所羅門的 *M. batesii* Kirby 混淆所造成。另 Yamasaki (1991) 將日本琉球群島西表島 (Iriomote island) 之族群認定為 *Megacrana alpheus*；Kobayashi (1994) 則發現津田氏大頭竹節蟲分佈於琉球群島西表島與石垣島 (Ishigaki island)。因此，Ushirokita (1998) 及 Hsiung (2007) 認為西表島之 *Megacrana alpheus* 紀錄應為津田氏大頭竹節蟲之誤判，其族群可能是從臺灣東南地區或菲律賓，藉黑潮海流將卵粒漂上岸後所建立之族群。津田氏大頭竹節蟲在地理分布上尚有 Nakata (1961) 的研究。Hsiung (2001, 2003, 2007) 及 Hsiung and Yang (2000) 則比較大頭竹節蟲屬物種間的形態異同。

津田氏大頭竹節蟲在野外只以露兜樹科 (Pandanaeae) 的林投 (*Pandanus odoratissimus*) 為食，成蟲於清晨及黃昏之後活動，白天藏匿於林投葉鞘中。此竹節蟲以孤雌生殖方式繁衍後代，成蟲將卵產在林投葉鞘間；卵呈種子狀，卵期三個月；若蟲期有六個齡期，二齡若蟲開始分泌防禦性乳汁 (Tseng, 1997; Liu and Yang, 2002)；成蟲遭受攻擊時會由前胸腺體噴出防禦性物質獼猴桃鹼 (actinidine) (Chow and Lin, 1986; Chow and Tsai, 1987; Ho and Chow, 1993)。

在地理親緣分布及族群結構的相關研究中，DNA 序列分析是目前最常應用的資料。Frankam (2002) 指出粒線體去氧核糖核酸 (mitochondrial DNA, mtDNA) 演化速率較快，使粒線體 DNA 非常適合做種群演化歷史和親緣關係相近的分類單元的演化研究。因此，粒線體 DNA 序列成為研究族群結構、親緣關係 (Ballard and Rand, 2005)、親緣地理 (Emerson, 2002) 及生態保育 (Wan *et al.*, 2004) 等領域最適用的遺傳物質之一。

屬於保育物種的津田氏大頭竹節蟲僅出現在少數棲息地，除了其特定的寄主植物外，尚有不少其他限制因子影響族群發展。為了解台灣產津田氏大頭竹節蟲族群間的親緣地理關係及其遺傳變異，我們收集了台東縣綠島與屏東縣九棚及港口的族群樣本，分析其粒線體的 16S 核糖體去氧核糖核酸 (16S rDNA) 基因序列的變異，以探討各族群的分化程度，掌握此保育類物種在野外的遺傳變異狀況，期能應用於此物種的保育策略規畫。

材料與方法

樣本收集

於屏東縣九棚、港口及台東縣綠島等地點

表一 津田氏大頭竹節蟲之樣本資料

Table 1. Samples of *Megacrania tsudai* Shiraki used in this study

Sample Abbreviation	Source	Locality	Date	DNA Amplification*
Lyudao1-Lyudao10	Leg	Green Island, Taitung	22-09-2009	O
Lyudao15, Lyudao17	Egg	Green Island, Taitung	22-09-2009	O
Lyudao11-Lyudao14				
Lyudao16	Egg	Green Island, Taitung	22-09-2009	X
Lyudao18-Lyudao20				
Mts1-Mts3	Leg	Kankau, Pingtung	29-11-2009	O
Jiupeng1-Jiupeng8	Leg	Jiupeng, Pingtung	29-11-2009	O
Jiupeng9-Jiupeng23	Egg	Jiupeng, Pingtung	29-11-2009	X

*O: amplification succeeded; X: amplification failed.

進行樣本採集，基於保育此物種原則，本實驗僅採成蟲中足小部份跗節或卵做為樣本，而將竹節蟲釋回；採得的樣本帶回實驗室後以 99% 酒精保存在 -20°C 冰箱，以供 DNA 之抽取與複製。共分析 46 個樣本 (表一)，另自基因庫取得日本西表島津田氏大頭竹節蟲序列 (AB477471) 與長肛竹節蟲 (*Entoria okinawaensis* Shiraki) 序列 (AB477459) 各一條。

DNA 分析

將酒精浸泡之樣本以研磨棒搗破後，利用 Easy DNA High-Speed Extraction Kit 純化試劑組萃取 DNA。收集的樣本以 DNA 純化試劑 (DNA Purification Kit, Promega) 之方法略加修飾抽取 DNA，回溶的 DNA 存放於 -20°C 冰箱中備用。截至目前為止尚無任何竹節蟲 16S rDNA 基因序列發表，因此在應用 PCR 反應增幅目標 DNA 時所使用的引子組合，乃參考 Yeh *et al.* (1997) 為蜉蝣目所設計的 16SR21 及 16S22。所得之 PCR 增幅產物以 1% 的瓊脂糖凝膠進行電泳分析，確定複製產物的濃度及大小是否正確，再以反應試劑組 QIAquick PCR Purification kit 試劑或 QIAquick Gel Extraction Kit 試劑回收 PCR

產物。

增幅後之 DNA 經自動定序儀分析得到序列資料。再利用 BioEdit 軟體分析 (Hall, 1999)，進行 DNA 序列整理，並將序列送上 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，利用 Blast 的功能將序列和基因庫中其它竹節蟲序列比對。用 MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) 分析軟體，進行核酸序列差異探討，並選用臨接 (neighbor-joining) 類聚方法求得親緣關係。

結果與討論

16S rDNA 均質化的津田氏大頭竹節蟲

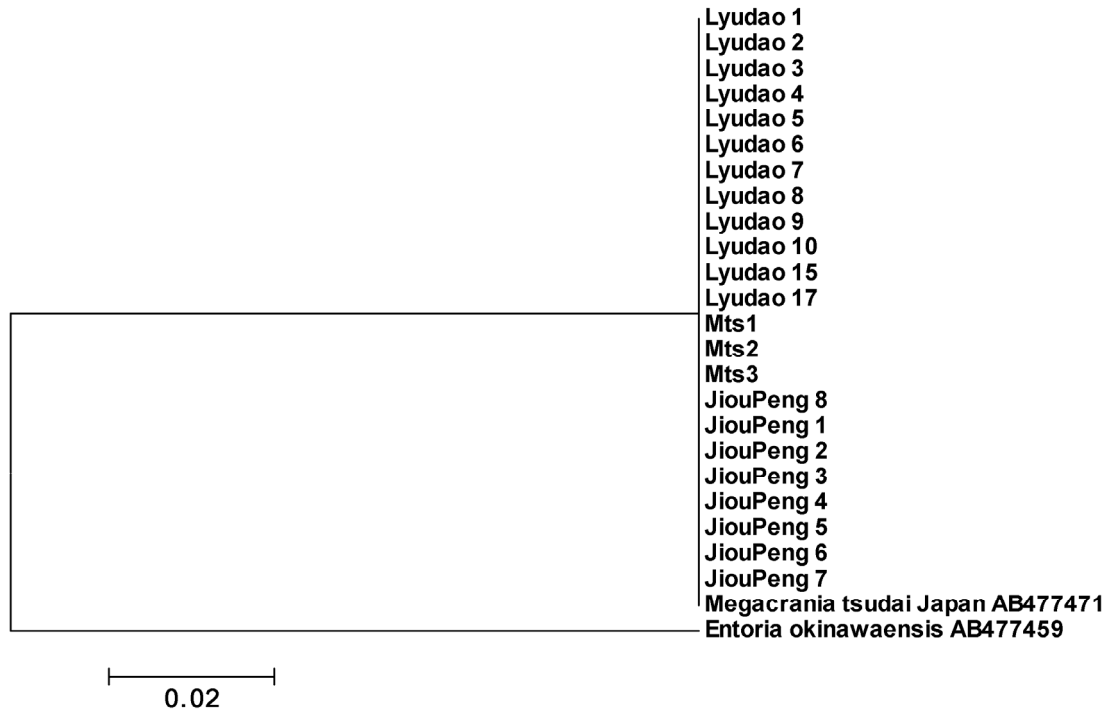
測試的 46 個樣本中，僅 23 個樣本成功複製出 DNA，分別來自 12 個綠島個體、8 個九棚個體及 3 個港口個體，16S rDNA 之定序長度約 550 個核苷酸。成功的樣本均如預期得到了目標 DNA 序列，複製情形不理想的樣本多為卵，可能是樣本卵的 DNA 含量少、新鮮度保存有問題或是 DNA 純化後純度不佳所致。未來，需克服卵樣本的 DNA 複製問題，以方便不傷害個體的情況下增加樣本數。

16S rDNA 序列如圖一所示，23 個樣本彼此間序列完全一致，未有變異。因此，親緣

GCCTGTTTAT CAAAAACATC TTTTCTTGTT TATTTATTG AGATTTGACC TGCTCTATGA TTTATTTAAT GGCCGCGGTA ATTTGACCGT GCAAAGGTAG
 CATAATCATT AGTCTATTA TTTGGACTT GTATGAATGG TTGGACGAAA TATTGACTGT CTCGTTATTA AATATTTAAT TAAATTTTG AGTTAAAATG
 CTAAATGTT TTTATAGGAC GAGAAGACCC TTTAGATCTT AAATTATTTA TTTTAAATTT TATTTTAGTT ATTATTTATT TATTAGGATT ATTTATTTTT
 TGTGGGGTG ACATGGAGAT ATAATTAAC TTTATAATT TTGTACAATT ATTTTGTGTT ATATGACCTT TTATTAATGT TATAAGATTT AGATACCTAA
 GGGATAACAG CGTAATTTTT CTTGAGAGTT CGTATCGACA GGAGAGGTTG CGACCTCGAT GTTGATTAA GATTATAGTT AGGTGTAGGT GCTTAATTTAA
 TAGTCTGTT CGACCTTTAA ATTCTTACAT GATCTGAGTT CAGACCGG

圖一 津田氏大頭竹節蟲 16S rDNA 序列。

Fig. 1. Nucleotide sequence of the partial 16S rDNA gene of *Megacrania tsudai*.



圖二 綠島、九棚、港口及西表島津田氏大頭竹節蟲族群，依 16S rDNA 序列以鄰接法所建構之的親緣關係。比例尺代表百分比變異大小。長肛竹節蟲 (*Entoria okinawaensis*) 為參考外群。

Fig. 2. A molecular phylogeny of the *Megacrania tsudai* populations from Green Island, Jioupeng, Kankau, and Iriomote island. The tree was constructed using the neighbor-joining method based on 16S rDNA sequences, and the scale represents the percentage variation per site. *Entoria okinawaensis* served as the outgroup.

分析結果也可以看出其全部聚在一起的狀況 (圖二)，與參考物種 (長肛竹節蟲，*Entoria okinawaensis* Shiraki) 相距甚遠；而西表島的序列 (AB477471) 也與台灣地區的樣本完全一樣。一些研究結果指出，16S rDNA 於台灣各地族群間是具有變異存在的 (Yeh *et al.*,

1997, 1998, 2004, 2005; Lin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007, 2008); 而未具遺傳變異的研究結果則都提出是近期擴殖或遷移的可能性 (Wang *et al.*, 1999, 2004; Lee *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006)。津田氏大頭竹節蟲三個族群樣本的 16S rDNA 區段具完全一致的序

列，呈現高度均質性 (homogeneity)，推測此物種過去可能會發生過瓶頸效應 (bottleneck effect)，或三個族群都是源自於一均質族群或少數個體而出現拓荒者效應 (founder effect)。配合歷史來看，本種在過去曾有相當的捕捉壓力，可能因此產生瓶頸效應，而人為散播某一特定族群也是可能原因之一。

津田氏大頭竹節蟲拓荒者效應的可能性

Hsiung (2007) 的報告指出，全世界 *Megacrania* 共有 12 種，均分佈於西太平洋地區赤道附近，台灣已是此屬物種分佈的北界。過去認為其地理分佈最北界線是台灣的綠島地區，但近年在琉球也採到 *M. tsudai*，算是本屬之最北紀錄 (Kobayashi, 1994)。學者認為 *M. tsudai* 是透過林投海飄的特性，將卵夾帶其中而漂流至台灣或琉球 (Ushirokita, 1998)。台灣地區的 *M. tsudai* 分佈也都在台灣的南部地區，像墾丁及綠島等黑潮流經之地；若此，可推論津田氏大頭竹節蟲是藉由海漂來到台灣，為典型的拓荒者效應演化而來的物種。至於此物種是多久以前來到台灣，立足台灣後是否一直處於族群很小的組成下，則需搜集更多樣本，或加入其它 *Megacrania* 相關物種共同分析，才可能得出較明確的結論。

加速津田氏大頭竹節蟲保育

因野外族群數量稀少、獵捕壓力大、寄主的特有性、分布範圍狹窄及棲地破壞等問題，津田氏大頭竹節蟲亟需投入更多的保育措施。台北市立動物園為了推廣保育教育，已建立津田氏大頭竹節蟲人工繁殖技術及生活史等資料 (數據尚未發表)，有助於復育此竹節蟲。Tseng (1997) 曾提出四點保育建議事項，若能進一步考量下列幾項保育措施，應可讓此竹節蟲的族群結構更為健康，讓此受人喜

愛的保育類昆蟲長久存活於台灣地區。

1) 進行津田氏大頭竹節蟲的生物學、分布、現存數量及遺傳組成等基本研究，並進行族群量的監測；本種若蟲、成蟲均攝食林投葉片，行孤雌生殖，主要分布於恆春半島河岸及海岸林投林 (Liu and Yang, 2002)，雖已建立人工繁殖技術，但其野外的存活及分布狀況應長期監測，以及時掌握野外族群量。此外，應擴大族群及樣本數量，除克服卵樣本的 DNA 複製問題，也可擴大取樣範圍，增加樣本數或加入其它基因的分析，以便對此物種遺傳組成及變異做出更正確的瞭解及評估。若有遺傳變異個體，可藉由人工繁殖技術，提高族群內該遺傳特性的頻率，協助度過遺傳漂變的現況。

2) 加強津田氏大頭竹節蟲現有棲地的保護；以多樣性的觀點來看，高度均質化的遺傳組成非常不利於此物種的保育。因此，當務之急為加強此物種的保護，嚴禁不當的採集及棲地破壞。墾丁地區的林投植群有很多位於人群活動頻繁的海岸地區，應進一步研究受干擾地區及未受干擾地區的族群分布狀況，若人為活動對本竹節蟲族群量有影響，應進行棲地保護之工作，劃設區域型的保護棲息地。而恆春半島諸多地區均為重要觀光景點，棲地開發壓力大，會造成林投植群消失，為本種存活的一大隱憂，應謹慎評估開發案件的申請。

3) 擴展津田氏大頭竹節蟲的分布範圍；許多離島地區，像澎湖、小琉球、龜山島、綠島與蘭嶼皆有林投之分布，但本種僅於綠島有大量族群之記錄，蘭嶼則僅有一筆觀察記錄 (Liu and Yang, 2002)。應積極審慎評估將津田氏大頭竹節蟲的棲地擴展到其它離島或地區，以提高野外的分佈範圍及族群數量，如此較有可能避過突如其來的災難式 (catastrophic) 選汰 (例如墾丁地區常發生之林投林火災) 而繼續存活。因此須建立各離島

或擴展地區的生態環境之基本資料，評估是否適合做為津田氏大頭竹節蟲的野放棲所，及其可能帶來的生態衝擊。

4) 加強生物地理學研究，促進國際學術性合作；Kobayashi (1994) 發現津田氏大頭竹節蟲也分佈於琉球群島的西表島與石垣島。圖二的結果顯示，台灣地區與日本西表島的津田氏大頭竹節蟲序列未有差異，若加入更多日本地區的樣本，則更能明確掌握台灣族群與日本族群間的遺傳變異。Yang (1997) 也建議應用分子系統分類學 (molecular systematics) 探討本屬各種間的親緣關係。而 Hsiung (1991) 基於形態特徵也指出，本種與錫蘭的 *M. alpheus* (Westwood) 及印尼摩鹿加群島之 *M. wegneri* Willemse 具有較近之外型，其遺傳差異到底有多大則未知。Hsiung (2007) 歸納大頭竹節蟲屬在西太平洋赤道地區的分佈狀況，顯示這些物種具極高的地理親緣特性，若了解津田氏大頭竹節蟲從何演化而來適應於台灣，定有助於本種的保育工作的進行。

5) 加強昆蟲保育教育的推廣工作；由於津田氏大頭竹節蟲大型亮麗，會分泌類似牙膏氣味的防禦物質，是受到喜愛且容易觀察的物種，一般民眾都對其充滿好奇，也都有意願參與此蟲的保育行動；但若沒有具備正確的保育觀念與知識，常會造成有心做保育，但結果卻是會危害到野生族群。目前全台各處有許多以昆蟲保育為口號的生態農場，但其多為繁殖場，並不一定是昆蟲復育工作。Wu *et al.* (2010) 指出，原本已分化於中央山脈東西兩邊的黃裳鳳蝶，因人為飼養，東捉西放或西捉東放的原因，已將族群隔離的遺傳特性又混雜一起，目前尚無法評估其影響為何，但可以確定的是，野外族群的遺傳特質已受人為干擾。因此，加強保育教育的推廣工作是刻不容緩的

事，若長期忽視其對民眾影響，除誤導正確的保育觀念外，也可能無心而傷害到物種的保育。

致 謝

感謝台北市立動物園提供研究計畫經費之支持 (臺北市立動物園 98 年動物認養計畫)；行政院農業委員會林務局核發許可 (農授林物字第 098700947 號)；蕭忠義先生協助樣本收集；劉恒鍵先生協助野外觀察；國立陽明大學榮陽基因體研究中心定序核心設施提供定序技術服務。

引用文獻

- Ballard JWO, Rand DM. 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 36: 621-642.
- Chen SF, Rossiter SJ, Faulkes CG, Jones G. 2006. Population genetic structure and demographic history of the endemic Formosan lesser horseshoe bat (*Rhinolophus monoceros*). *Mol Ecol* 15: 1643-1656.
- Chow YS, Lin YM. 1986. Actindine, a defensive secretion of stick insect, *Megacrania alpheus* Westwood (Orthoptera: Phasmida). *J Entomol Sci* 21: 97-101.
- Chow YS, Tsai RS. 1987. Recent studies of insect chemical communication in Taiwan. *Chinese J Entomol* 7: 81-85.
- Emerson BC. 2002. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic

- approaches to understanding pattern and process. *Mol Ecol* 11: 951-966.
- Frankam R, Ballou JD, Barisco DA.** 2002. Introduction to conservation genetics. New York: Cambridge Inc. 617 pp.
- Hall TA.** 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp Ser* 41: 95-98.
- Ho HY, Chow YS.** 1993. Chemical identification of defensive secretion of stick insect, *Megacrania tsudai* Shiraki. *J Chem Ecol* 19: 39-46.
- Hsiung CC, Yang JT.** 2000. Systematic study of *Megacrania* species of Australia (Cheleutoptera: Phasmatidae). *J Orth Res* 8: 71-75.
- Hsiung CC.** 1991. The identity of *Megacrania* species of Taiwan (Cheleutoptera: Phasmatidae). *Orient Ins* 25: 171-177.
- Hsiung CC.** 2001. *Megacrania* species in Indonesia (Cheleutoptera: Phasmatidae). *J Orth Res* 10: 293-301.
- Hsiung CC.** 2003. Two new species of *Megacrania* Kaup (Cheleutoptera: Phasmatidae) from the Admiralty Islands. *J Orth Res* 12: 31-35.
- Hsiung CC.** 2007. Revision of the genus *Megacrania* Kaup (Cheleutoptera: Phasmatidae). *J Orth Res* 16: 207-221.
- Kobayashi J.** 1994. Tsudai stick insect. *Tama Zool Garden* 1994: 31.
- Lee HC, Yang MM, Li F, Yeh WB.** 2007. Genetic variation of *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae) in Taiwan based on mitochondrial 16S rDNA sequence. *Formosan Entomol* 27: 157-168. (in Chinese)
- Lee HC, Yang MM, Yeh WB.** 2008. Identification of two invasive *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae) lineages based on two mitochondrial sequences and restriction fragment length polymorphism of COI amplicon. *J Econ Entomol* 101: 1152-1157.
- Lee JW, Jiang L, Su YC, Tso IM.** 2004. Is Central Mountain Range a geographic barrier to the giant wood spider *Nephila pilipes* (Araneae: Tetragnathidae) in Taiwan? A population genetic approach. *Zool. Stud.* 43: 112-122.
- Lin JS, Wang CL, Yeh WB.** 2003. Molecular identification of multiplex-PCR and PCR-RFLP for quarantine pest, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Formosan Entomol* 23: 353-366.
- Liu HC, Yang JT.** 2002. Field survey on spatial distribution, life history and feeding behavior of Tsudai stick insects, *Megacrania tsudai* Shiraki (Phasmatodea: Phasmatidae), in Taiwan (thesis). Taichung: National Chung Hsing University. 36 pp. (in Chinese)
- Nakata S.** 1961. Some notes on the occurrence of Phasmatodea in Oceania. *Pacific Ins Monogr* 2: 107-121.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-

- 1599.
- Tseng Y.** 1997. Tsuda phasmid (*Megacrania tsudai* Shiraki)-a rare and valuable insect. Nature Conservation 17: 38-40. (in Chinese)
- Ushirokita M.** 1998. Eggs of stick insects drifting in the wake of screw pine's seed. Insectarium 4: 108-115.
- Wan QH, Wu H, Fujihara T, Fang SG.** 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue. Electrophoresis 25: 2165-2176.
- Wang CH, Chu YI.** 1982. The morphological study of the egg shell of the Tsuda's giant stick insect *Megacrania alpheus* Westwood. Phytopathologist and Entomologist (National Taiwan University) 9: 98-109.
- Wang HY, Tsai MP, Yu MJ, Lee SC.** 1999. Influence of glaciation on divergence patterns of the endemic minnow, *Zacco pachycephalus*, in Taiwan. Mol. Ecol. 8: 1879-1888.
- Wang JP, Lin HD, Huang S, Pan CH, Chen XL, Chiang TY.** 2004. Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes. Mol Phylogenet Evol 31: 1143-1156.
- Wu IH, Yang PS, Liu CY, Yeh WB.** 2010. Genetic differentiation of *Troides aeacus formosanus* (Lepidoptera: Papilionidae), based on cytochrome oxidase I sequences and amplified fragment length polymorphism. Ann Entomol Soc Am 103: 1018-1024.
- Yamasaki T.** 1991. Occurrence of *Megacrania alpheus* (Cheleutoptera: Phasmatidae) in Iriomote-jima Island, the Ryukyus. Proc Jap Soc Syst 44: 49-56.
- Yang JT.** 1997. Tsuda's big-headed stick insect and its relatives. Taiwan Natural Science 16: 74-77. (in Chinese)
- Yeh WB, Chang YL, Lin JS, Wu FS, Yang JT.** 2004. Genetic differentiation of *Loxoblemmus appendicularis* complex (Orthoptera: Gryllidae): speciation through vicariant and glaciation events. Ann Entomol Soc Am 97: 613-623.
- Yeh WB, Yang CT, Hui CF.** 1998. Phylogenetic relationships of the Tropicuchidae-group (Homoptera: Fulgoroidea) of planthoppers inferred through nucleotide sequences. Zool Stud 37: 45-55.
- Yeh WB, Yang CT, Hui CF.** 2005. A molecular phylogeny of planthoppers (Homoptera: Fulgoroidea) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. Zool stud 44: 337-353.
- Yeh WB, Yang CT, Kang SC.** 1997. Identification of two sibling species, *Ephemer formosana* and *E. sauteri* (Ephemeroptera: Ephemeridae), based on mitochondrial DNA sequence analysis. Chinese J Entomol 17: 257-268.

收件日期：2012年2月9日

接受日期：2012年3月3日

Lack of Genetic Variation Shows the Urgency of Conservation for *Megacrania tsudai* Shiraki (Phasmatodea: Phasmatidae)

I-Hsin Wu¹, Yu-Yen Chen², Ping-Shih Yang³, and Wen-Bin Yeh^{2*}

¹ Animal Department, Taipei Zoo, Taipei City, Taiwan

² Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan

³ Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei City, Taiwan

ABSTRACT

The distribution of *Megacrania tsudai* Shiraki, a threatened stick insect species in Taiwan, is limited to the Hengchun Peninsula and Green Island, with only a small population in each locality. Previous studies on this insect were mostly focused on its morphology and life history. In the present study, the 16S rDNA gene was used as a marker to study the genetic diversity, phylogenetic relationships, and phylogeography of *M. tsudai*. Crude DNA was extracted from 46 samples of eggs or partial mid-leg tarsi collected from three populations (Jioupeng, Kankau and Green Island). Sequence analyses of 16S rDNA, ~ 550 bp, from 23 successfully amplified samples showed no variation at all between and within populations. This result suggests that the populations of *M. tsudai* in Taiwan may have either descended from a limited number of ancestors (founder effect), or have experienced a bottleneck effect due to a small population size and restricted habitats. From a conservation point of view, the perfect genetic homogeneity of the *M. tsudai* populations will have a negative impact on the long-term survival of this species in Taiwan. In addition to enhancing their legal protection, it would also be helpful to conserve this species by preserving its habitats and broaden its distribution range. It is also very important that we explore potential genetic variation and preserve it in the wild populations.

Key words: *Megacrania tsudai* Shiraki, 16S rDNA, threatened insect

* Corresponding email: wbyeh@nchu.edu.tw