

陽明山國家公園向天池鰓足類動物的  
粒線體 DNA 鑑定

Mitochondrial DNA identification of branchiopods at  
Siangtian Pond in Yangmingshan National Park

陽明山國家公園管理處研究生研究計畫

中華民國 100 年 12 月

陽明山國家公園向天池總足類動物的粒線體DNA鑑定

陽明山國家公園管理處研究生研究計畫

100年度

陽明山國家公園向天池鰓足類動物的  
粒線體 DNA 鑑定

Mitochondrial DNA identification of branchiopods at  
Siangtian Pond in Yangmingshan National Park

研 究 生：黃婉萍

指 導 教 授：周蓮香

陽明山國家公園管理處研究生研究計畫

中華民國 100 年 12 月



## 目次

謝辭.....	III
表次.....	V
圖次.....	VII
摘要.....	IX
Abstract.....	XIII
第一章 緒論	
第一節 研究緣起.....	01
第二節 研究目的.....	06
第二章 研究方法	
第一節 野外採集或人工培養.....	09
第二節 DNA 純化.....	09
第三節 基因放大.....	09
第四節 電泳檢驗.....	10
第五節 DNA 定序與分析.....	10
第三章 研究結果	
第一節 向天池的真湖蚌蟲.....	11
第二節 向天池的貓眼蚌蟲.....	13
第四章 討論	
第一節 向天池貓眼蚌蟲的親緣關係.....	31
第二節 金門真湖蚌蟲的發現.....	31
第三節 向天池和金門蚌蟲的種內遺傳多樣性.....	32

第四節 亞洲真湖蚌蟲的親緣關係.....	33
第五節 建議.....	34
參考文獻.....	37
附錄.....	41



## 謝 辭

本研究得以完成，乃獲自許多人的協助。首先感謝陽明山國家公園管理處提供研究經費，承陽明山國家公園管理處叢祕書培芝、保育課羅課長淑英、以及保育巡查員陳振祥先生等人熱心協助行政業務，使本計畫能順利完成。研究期間，非常感謝國立台灣大學生態學與演化生物學研究所的博士生王俊傑先生進行向天池鰓足類動物的人工培育，並提供成體樣本。特別感謝中央研究院生物多樣性中心研究助理李欣縈小姐協助 DNA 純化、基因放大、以及電泳檢驗等技術，使本研究得以順利進行。尤其，國立台灣大學生態學與演化生物學研究所陳國勤教授和中央研究院生物多樣性中心博士後研究員蔣志超先生，對於 DNA 序列的分析，皆提供相當多的經驗與指導，在此僅致最高謝意。最後，還要感謝美國堪薩斯大學生物研究中心（Kansas Biological Survey, Kansas University）的分類學及生態學家羅傑斯（D. Christopher Rogers）先生在物種鑑定和文章寫作上的協助，以及新竹教育大學楊樹森教授在未來研究發展上的建議。





# 表 次

表 1 向天池總足類動物的分類表.....15

表 2 GenBank 中應用於本研究的物種及其編號與棲地.....16





# 圖 次

<b>圖 1 取樣地點</b>	
(A) 陽明山國家公園.....	07
(B) 向天池.....	07
<b>圖 2 真湖蚌蟲</b>	
(A) 雄性 (光學顯微攝影).....	23
(B) 雌性 (光學顯微攝影).....	23
(C) 雄性 (電子顯微攝影).....	23
(D) 雌性 (電子顯微攝影).....	23
(E) 雄性的 <b>重要特徵</b> .....	23
(F) 雌性的 <b>重要特徵</b> .....	23
<b>圖 3 真湖蚌蟲的種系發生樹 (NJ/ML phylogenetic trees)</b>	
(A) 12S rDNA 序列分析.....	24
(B) 16S rDNA 序列分析.....	25
(C) COI 序列分析.....	26
<b>圖 4 貓眼蚌蟲</b>	
(A) 雄性 (光學顯微攝影).....	27
(B) 雌性 (光學顯微攝影).....	27
(C) 雄性 (電子顯微攝影).....	27
(D) 雌性 (電子顯微攝影).....	27
(E) 雄性的 <b>重要特徵</b> .....	27
(F) 雌性的 <b>重要特徵</b> .....	27

**圖 5 貓眼蚌蟲的種系發生樹 (NJ/ML phylogenetic trees)**

(A) 12S rDNA 序列分析.....	28
(B) 16S rDNA 序列分析.....	29
(C) COI 序列分析.....	30



# 摘要

**關鍵詞：**向天池、鰓足類動物、粒線體 DNA

## 一、研究緣起與目的

向天池位於陽明山國家公園的西側，海拔約 818 公尺，大雨或颱風過後，可形成一個直徑約 80 公尺、深度約 2~3 公尺的水池。池水可由底部緩緩滲出，10~14 天後逐漸乾涸。在這短暫性的池水中，初期孕育出豐年蟲、圓蚌蟲和扁蚌蟲等特殊的鰓足類動物，後期出現許多蝌蚪。向天池豐年蟲的正式名稱為湖沼枝額蟲 (*Branchinella kugenumaensis*)，其生活史和族群生態已有充分的研究。圓蚌蟲的直徑約 0.3~0.5 cm，表面光亮而缺乏生長線，尾部短小，頭部具有一個大型的穹形弓片，第一對觸角成管狀，雄蟲具有一對執握器，卵呈圓球狀且表面光滑，周蓮香 et al.(2006) 鑑定其為貓眼蚌蟲 (*Lynceus biformis*)。扁蚌蟲的長度則約 0.4~0.8 cm，表面有 4~5 條生長線，尾部較長，突出於頭胸甲外，頭部具有一個圓錐形的額突器，第一對觸角成葉狀，雄蟲具有兩對執握器，卵呈圓柱形且表面有紋路。由於扁蚌蟲的種類眾多，加上各物種之間缺乏有效的分類依據，當時僅將其鑑定為真湖蚌蟲屬 (*Eulimnadia* sp.)，完整的學名尚未確定。本研究藉由 12S rRNA、16S rRNA 和 COI 三對粒線體 DNA 引子，首先建立向天池鰓足類動物的基因資料庫，並綜合形態與分子的比對，確定其學名與分類地位。

## 二、研究方法

陽明山向天池積水時，直接採集池水中豐年蟲和蚌蟲的成體，或於向天池乾涸後，收集池底的泥土，帶回實驗室後加水，使底土中的休眠卵孵化，並長為成體。將每一隻豐年蟲或蚌蟲分別浸置於盛有 300~500  $\mu$ l 酒精的微離心管中，利用紫外光科技公司的 BioKit 純化每一隻豐年蟲和蚌蟲的 DNA。然後三對粒線體

DNA 引子，即 12S rDNA、16S rDNA 和 COI (Richter et al. 2007)，分別對向天池豐年蟲、圓蚌蟲和扁蚌蟲進行基因放大反應 (PCR)。取部分基因放大產物，進行電泳檢驗，12S rDNA 約 340 個鹼基對 (bp)，16S rDNA 約 500 個鹼基對 (bp)，COI 約 780 個鹼基對 (bp)。使檢驗過的基因放大產物進行 DNA 定序，然後以電腦軟體 Contig Express 和 Ultra Edit 分析 DNA 序列，以電腦軟體 Mega 4、jModelTest 和 MrBayes 比對 GenBank 中相關鰓足類動物的 DNA 序列，並繪製種系發生樹 (phylogenetic tree)。

### 三、研究結果

#### (一) 向天池真湖蚌蟲的學名鑑定為 *Eulimnadia braueriana* Ishikawa, 1895

在三對粒線體 DNA 引子 (12S rDNA、16S rDNA 和 COI) 的分析中，向天池扁蚌蟲與日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia braueriana*) 的遺傳差異皆最小，且小於各物種之間的遺傳差異。綜合形態和構造特徵的比對，以及地理位置的相關性，我們鑑定向天池的扁蚌蟲與日本真湖蚌蟲同種，學名為 *Eulimnadia braueriana* Ishikawa, 1895。

#### (二) 向天池貓眼蚌蟲的學名鑑定為 *Lynceus biformis* (Ishikawa, 1895)

在三對粒線體 DNA 引子 (12S rDNA、16S rDNA 和 COI) 的分析中，向天池圓蚌蟲與日本貓眼蚌蟲 (*Lynceus biformis*) 的遺傳差異皆最小，且小於各物種之間的遺傳差異。綜合形態和構造特徵的比對，以及地理位置的相關性，我們鑑定向天池的圓蚌蟲與日本貓眼蚌蟲同種，學名為 *Lynceus biformis* (Ishikawa, 1895)。

### 四、討論與建議

#### (一) 向天池的貓眼蚌蟲與北歐和北美物種的親緣關係較澳洲物種接近

由 12S rDNA 的種系發生樹可知，向天池的貓眼蚌蟲與北歐和北美物種的親緣關係較接近，分支種化的年代較晚；而與澳洲物種的親緣關係較疏遠，其分支種化的年代則較早，符合大陸漂移說 (continental drift)。然而，確切的種化時間和演化關係有待日後更多分子或化石證據來估算。

## (二) 金門的扁蚌蟲極可能與向天池和日本的真湖蚌蟲同種

我們於 2008 年自金門古墓和龍口採集底土，分別在實驗室中培養出形似向天池真湖蚌蟲的扁蚌蟲，但體型較大。由 12S rDNA 的分析可知，此兩個採樣點的扁蚌蟲彼此間沒有遺傳差異 ( $K2P=0$ )，且與向天池真湖蚌蟲、日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia brauerian*) 的遺傳差異很小，皆小於各物種之間的遺傳差異。未來可進行電子顯微攝影，比對細微構造，綜合形態與分子的證據，應可確認該物種的學名為 *Eulimnadia braueriana* Ishikawa, 1895。

## (三) 向天池和金門蚌蟲的種內遺傳多樣性小

本計畫的 DNA 分析中，發現向天池和金門蚌蟲的單型 (haplotype) 少，種內遺傳多樣性小。種內遺傳多樣性的大小容易受到個體數、世代和取樣地點所影響，未來應增加不同時間、不同地點的採樣個體數，陸續進行 DNA 序列比對，以獲知向天池和金門之各種鰓足類動物的遺傳多樣性，將有助於了解真湖蚌蟲或貓眼蚌蟲在向天池、金門、日本等地的基因交流 (gene flow) 和演化。

## (四) 亞洲真湖蚌蟲與美洲或非洲物種的親緣關係需要更多的證據來推論

由 12S rDNA 的分析可知，向天池真湖蚌蟲、金門真湖蚌蟲與日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia braueriana*) 等亞洲真湖蚌蟲彼此親緣關係接近，甚至為同種，而與美洲真湖蚌蟲或非洲真湖蚌蟲的親緣關係最疏遠，顯示真湖蚌蟲之演化與地理分布的相關性。

2009 年小蘭嶼有發現形態近似於委內瑞拉的真湖蚌蟲 (*Eulimnadia cf. magdalenensis*)，顯示亞洲真湖蚌蟲與美洲物種的近親關係。然而，COI 的分析中，我們發現向天池和金門的真湖蚌蟲與非洲真湖蚌蟲 (*Eulimnadia Africana*) 的遺傳差異也很小，甚至小於各物種之間的遺傳差異，顯示亞洲真湖蚌蟲與非洲物種的親緣關係也非常接近。期待未來建立完整的粒線體 DNA 資料庫，以及細胞核 DNA (如 18S rDNA、28S rDNA、EF1 $\alpha$ ) 的序列分析，以進一步探討亞洲、美洲與非洲各地蚌蟲的演化及親緣關係。

## (五) 建議

### (1) 立即可行的建議～陽明山向天池的保育策略

向天池是台北市民假日登山旅遊的熱門景點，遊客在池水中洗手、游泳或捕捉的行為，極可能影響湖沼枝額蟲、真湖蚌蟲和貓眼蚌蟲的族群大小和群聚關係。此外，當池水乾涸後，許多善男信女在池心大石頭處燒香膜拜，焚燒金紙的結果，更可能污染向天池的土壤和水質，影響鰓足類動物的存活率，甚至改並其種內遺傳多樣性 (intra-specific genetic diversity) 與族群適存度 (fitness)，建議應有所規範。

### (2) 中長期建議～學術價值與未來展望

本研究首先建立向天池鰓足類動物的基因資料庫，並顯示向天池蚌蟲與日本若干蚌蟲具有接近的親緣地理關係。未來可進一步探討台灣鰓足類動物與世界各地物種的親緣地理 (phylogeography)、基因交流 (gene flow) 和演化 (evolution)，在學術價值上極富潛力。



# Mitochondrial DNA identification of branchiopods at Siangtian Pond in Yangmingshan National Park

## Abstract

**Key words :** Siangtian Pond, branchiopod, mitochondrial DNA

### I. Background and purposes

Siangtian Pond is an ephemeral pond in western side of Yangmingshan National Park. It would be filled with water after heavy rainfall, making a pool of 80 m in diameter and 3~5 m in depth. The inundation periods usually last only 10~14 days. During the wet period, three kinds of branchiopods emerged, including one fairy shrimp and two clam shrimp species. The scientific name of this fairy shrimp is *Branchinella kugenumaensis*, their life history and population ecology have been well studied. One clam shrimp has a spherical carapace with 0.3~0.5 cm in length and no growth line on surface. The telson is blunt and encompassed inside their carapace. Their head is embellished with a big and smooth fornix. The first antennae are tubular. Males have one pair of claspers modified from the first thoracopods. Their eggs are spherical with smooth surface. Chou et al. (2006) identified it as *Lynceus biformis*. The other clam shrimp has a flat carapace with 0.4~0.8 cm in length and 4~5 growth lines on surface. The telson is sharp and protruding outside their carapace. Their head shows a pyriform frontal organ posterior to their compound eyes. The first antennae are lobed. Males have two pairs of claspers modified from the first and second thoracopods. Their eggs are cylindrical with some sculptures on surface. The lack of valid characters makes it difficult for the species identification of flat clam shrimp,

and Chou et al. (2006) only identified it as *Eulimnadia* sp. In this project, we established the first mitochondrial DNA database of the branchiopods in Siangtian Pond, and identified these organisms based on 12S rDNA, 16S rDNA and COI DNA sequences, with morphological evidences as well.

## II. Methods

The branchiopods were collected from Siangtian Pond when it was filled with water, or cultured from the egg-cyst containing soil in laboratory. Each organism was immersed in single eppendorf tube with 300~500  $\mu$ l alcohol. Total DNA was extracted and purified from each individual using the Purification Kit of Violet BioScience Inc. Mitochondrial 12S rDNA, 16S rDNA, and COI (cytochrome c oxidase I) DNA were PCR (polymerase chain reaction) amplified following manufacture's instruction. The PCR product is about 340 bp for 12S rDNA, 500 by for 16S rDNA, and 780 bp for COI. All amplicons were checked by electrophoresis and sent to the company "Genomics BioScience Technology, Taiwan" for automatic DNA sequencing. All sequences were analyzed by Contig Express 和 Ultra Edit from the computer. The branchiopod DNA sequences obtained from the Genbank were aligned and pairwised for the calculation of genetic distance and the construction of phylogenetic tree.

## III. Results

### (A) The flat clam shrimp in Siangtian Pond is identified as *Eulimnadia braueriana* Ishikawa, 1895

In 12S rDNA, 16S rDNA, and COI analysis, the flat clam shrimp in Siangtian Pond showed the minimum genetic distances from the clam shrimp of Japan. Combined with the molecular and the morphological data, we identify the flat clam shrimp in Siangtian Pond as the same species of *Eulimnadia braueriana* Ishikawa, 1895.

**(B) The round clam shrimp in Siangtian Pond is identified as *Lynceus biformis* (Ishikawa, 1895)**

In 12S rDNA, 16S rDNA, and COI analysis, the round clam shrimp in Siangtian Pond showed the minimum genetic distances from the clam shrimp of Japan. Combined with the molecular and the morphological data, we identify the round clam shrimp in Siangtian Pond as the same species of *Lynceus biformis* (Ishikawa, 1895).

**IV. Discussion and suggestions**

**(A) The round clam shrimp showed closer phylogenetic relationships to the species in Northern Europe and Northern Americas than which in Australia**

The phylogenetic tree based on 12S rDNA analysis demonstrated the closer phylogenetic relationships and later speciation event between the lynceiids in Siangtian Pond and the lynceiids in Northern Europe or Northern Americas. However, the exact period of each divergent evolution needs more molecular evidences or fossil record to proof.

**(B) The flat clam shrimp in Kinmen might be the same species as *Eulimnadia brauerian* in Japan**

The flat clam shrimp cultured from the soil of Kinmen in 2008 was morphologically similar to *Eulimnadia braueriana* of Siangtian Pond. There were no genetic differences between the two populations in Kinmen. The genetic distances among the limnadiids in Kinmen, Siangtian Pond, and Japan were very tiny and even smaller than any inter-specific genetic distances. Combined morphological data like SEM might confirm it as the same species as *Eulimnadia brauerian* in Japan.

**(C) The clam shrimp of Siangtian Pond and Kinmen showed the low intra-specific genetic diversity**

The very few haplotypes of the clam shrimp in either Siangtian Pond or Kinmen

demonstrated the low intra-specific genetic diversity. The genetic diversity was prone to the number of individuals, the generation, and the sampling site. The DNA sequence comparisons with sample size increase from contemporaries to localities would be included to clarify the genetic diversity. This might contribute to the issue of the migration and evolution for the clam shrimps from Siangtian Pond, Kinmen, and Japan.

**(D) More evidences are needed to infer the phylogenetic relationships of the clam shrimp among Asian, Americas, and Africa**

The 12S rDNA analysis has proved the very close phylogenetic relationships of the Asian clam shrimp in Siangtian Pond, Kinmen, and Japan. The relatively far relationships to the clam shrimp in Americas and Africa revealed the positive correlation between the evolution and geographical distribution.

The *Eulimnadia cf. magdalenensis* found from Siaolanyu Island in 2009 further demonstrated the close phylogenetic relations between the species in Asia and Americas. However, our COI analysis presented the very small genetic differences between the species in Asian and Africa. In the very near future, the nuclear DNA database and complete mitochondrial DNA sequences are expected to be constructed for further research on the phylogenetic and phylogeographic relations of the clam shrimps from Asia, Americas, and Africa.

**(E) Suggestions**

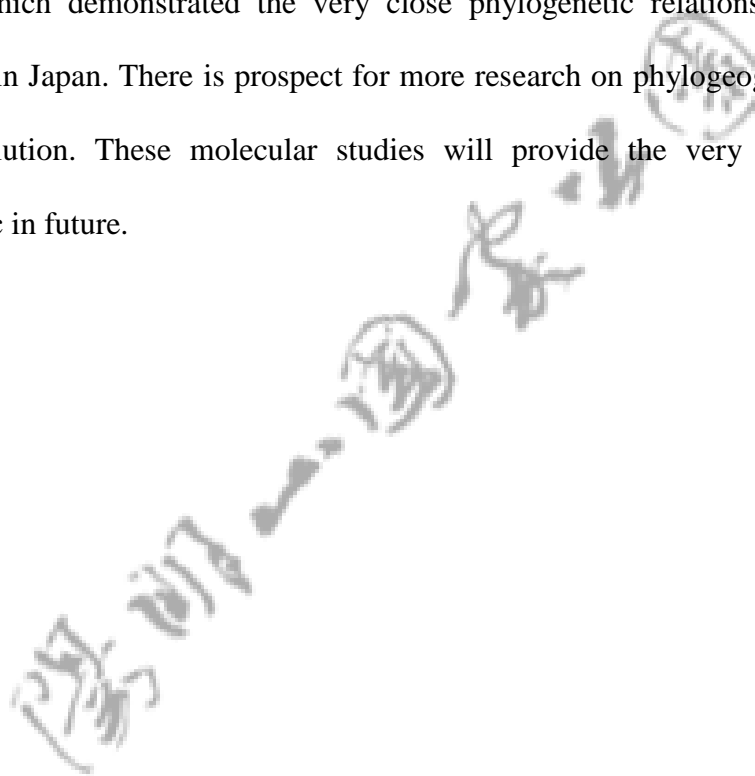
**(1) Immediate actions: conservation of Siangtian pool in Yangmingshan**

Siangtian Pond is a very popular hiking spot for Taipei citizen. Many visitors swim or wash in the pond, and even take some branchiopods away. These could change the population size and community structure of the branchiopods. In addition, some visitors come here for natural worship and discard burnt or half-used scents in

the pool. These could lower the quality of water, the survival rate of branchiopods, and even the intra-specific genetic diversity. We recommend more regulations to curb all these behaviors, protecting the water quality of the pond for the conservation of the rare species of branchiopods.

**(2) Long-term recommendations: values in education and future research**

This project established the first DNA database of branchiopods in Siangtian Pond, which demonstrated the very close phylogenetic relationships to the clam shrimps in Japan. There is prospect for more research on phylogeography, gene flow, and evolution. These molecular studies will provide the very high potential in academic in future.





# 第一章 緒 論

## 第一節 研究緣起

陽明山原名草山，位於台灣的北部，由群山所組成。「陽明山國家公園」於民國七十四年成立，總面積約 11,455 公頃，群山佇立，以七星山為中央，北有竹子山，東有磺嘴山，南有紗帽山，西有大屯山、面天山及向天山，陽明山國家公園以火山地形及景觀為其最大特色。

向天山位於整個陽明山區的最西側（圖 1），海拔約 818 公尺，峰頭圓鈍，為一座鐘形火山，大約四十萬年前形成，目前無火山活動。向天山的火山口現生許多草本植物，包括燈心草科、莎草科、以及禾本科（如蘆葦），大雨過後，特別是颱風來襲，豐沛的雨水形成一個直徑約 80 公尺、深度約 2~3 公尺的水池，稱為「向天池」。向天池是一種短暫性池塘（ephemeral pond），池水可由底部緩緩滲出，10~14 天後逐漸乾涸。在這短暫性的池水中，孕育了特殊的生物相，初期以鰓足類動物為主，包括豐年蟲（fairy shrimp）和蚌蟲（clam shrimp，圖 2，4）（林&周, 1991；周&黃, 2004），後期陸續出現許多蝌蚪。

向天池鰓足類動物群聚中的的豐年蟲，依據林&周（1991）的研究，鑑定為湖沼枝額蟲，學名為 *Branchinella kugenumaensis*（林曜松 and 周蓮香 1991），在分類上屬於動物界（Kingdom Animalia）、節肢動物門（Phylum Arthropoda）、甲殼亞門（Subphylum Crustacea）、鰓足綱（Class Branchiopoda）、無甲目（Order Anostraca）、釵額蟲科（Family Thamnocephalidae）、枝額蟲屬（Genus *Branchinella*）（表 1），其生活史和族群生態也有充分的研究（林曜松 and 周蓮香 1991，周蓮香 and 黃祥麟 2004，黃祥麟 and 周蓮香 2005）。

在湖沼枝額蟲 (*Branchinella kugenumaensis*) 發育成長的同時，向天池群聚中還孕育著另外兩種鰓足綱動物，通稱蚌蟲。蚌蟲最大的特徵就是雙瓣型的頭胸甲 (carapace)，形似蛤蜊、河蚌等軟體動物，故名。常見牠們在水體中，不停地擺動頭胸甲，悠遊自在地漂浮與游泳。有時，牠們也藉由頭胸甲的開閉，刮食岩石或附著物上的藍綠菌與藻類。向天池中這兩種共域的蚌蟲，不論頭胸甲的形狀或大小，都有明顯的不同。其中一種蚌蟲的頭胸甲較扁平，長度約 0.4~0.8 cm，表面有 4~5 條生長線 (growth line) (圖 2)；另一種蚌蟲的頭胸甲較圓鈍，直徑約 0.3~0.5 cm，表面光亮而缺乏生長線 (圖 4)。

蚌蟲頭胸甲的形態多變化，尤其牠們的體型小，許多細微特徵包覆於頭胸甲內而難以辨識，更增加物種鑑定與分類的困難度。Mattox (1957) 曾描述美國各地的蚌蟲，並比較其頭胸甲的形狀、大小和生長線數目。例如伊利諾州 (Illinois) 的貓眼蚌蟲 (*Lynceus brachyurus* O. F. Muller 1776) 具有球面的頭胸甲，表面沒有任何生長線。伊利諾州的真湖蚌蟲 (*Eulimnadia diversa* Mattox, 1937，與 *Eulimnadia inflecta* Mattox, 1939 同名，兩者為相同物種) 則具有扁長型的頭胸甲，且表面具有 2~4 條生長線。而奧克拉荷馬州 (Oklahoma) 的小隱婦蚌蟲 (*Caenestheriella belfragei* (Packard, 1871))，其扁平的頭胸甲上竟有多達 21~35 條生長線。此外，Mattox (1957) 還介紹麻薩諸塞州 (Massachusetts) 湖蚌蟲 (*Limnadia lenticularis* (Linnaeus, 1761))、加州 (California) 的蚌蟲 (*Cyzicus californicus* (Packard, 1883))、德州 (Texas) 的小隱婦蚌蟲 (*Caenestheriella setosa* (Pearse 1912)) 和狹甲蚌蟲 (*Leptestheria compleximanus* (Packard, 1877))，顯示美國各地蚌蟲之頭胸甲的多樣性 (Mattox 1957, Belk 1989)。然而，頭胸甲大小和生長線多寡與蚌蟲的成長發育有關，年齡愈大的蚌蟲，頭胸甲愈大，伴隨的



生長線也愈多 (Mattox 1957, Vidrine et al. 1987, Belk 1989)。因此，頭胸甲的形態和生長線的數目恐怕難以成為有效的物種鑑定與分類之依據。

蚌蟲在目前分類上，屬於動物界、節肢動物門、甲殼亞門、鰓足綱、雙甲目。牠們包括三個亞目：平尾亞目 (*Laevicaudata* Linder, 1945)、棘尾亞目 (*Spinicaudata* Linder, 1945) 和環甲亞目 (*Cyclestherida* Sars, 1899) (Martin and Boyce 2004, Stenderup et al. 2006)。平尾亞目的蚌蟲具有一個雙瓣型、球體狀的頭胸甲，兩瓣頭胸甲於背部癒合並向內深陷而形成溝狀殼軸，殼面光滑而無生長線。尾部 (telson) 短小，缺乏尾絲 (caudal furcae)，且完全包覆於頭胸甲內，與殼緣平齊而不外露，故名「平尾亞目 (*Laevicaudata*)」。頭部具有一個大型、平整的穹形弓片 (fornix)，第一對觸角 (first antennae) 成管狀。雄蟲的第一對胸足 (thoracopod) 特化為鉤狀的執握器 (clasper)，用來緊握雌蟲的頭胸甲，以利進行有性生殖。常見成熟雌蟲帶卵於頭胸甲內的背板 (dorsal lamellae) 處，牠們的卵呈圓球狀，表面光滑而無明顯紋路 (Martin et al. 1986, Martin and Belk 1988, Martin and Boyce 2004)。

棘尾亞目的蚌蟲也有一個雙瓣型的頭胸甲，所不同的是，牠們的頭胸甲較扁平且狹長，兩瓣頭胸甲雖於背部癒合，但無向內深陷，形成摺狀殼軸，而殼面則有若干生長線。此外，尾部 (telson) 較長，具有尾絲 (caudal furcae)，且尾部末端常伸出於頭胸甲外，宛如刺或棘，故名「棘尾亞目 (*Spinicaudata*)」。棘尾蚌蟲的第一對觸角 (first antennae) 呈葉狀 (lobed)，也與平尾蚌蟲 (*Laevicaudata*) 的管狀不同 (Martin 1989, Roessler 1995, Pereira and García 2001, Richter and Timms 2005, Timms and McLay 2005, Timms 2009)。再者，雄蟲的執握器有兩對，較平尾蚌蟲多，由第一對和第二對胸足特化而來，以便進行異體受精。有性生殖

所產生的卵或呈圓球狀、或為圓柱形，表面有獨特的紋路或裝飾，這些特徵與平尾蚌蟲明顯不同 (Belk 1989, Rabet 2010)。棘尾亞目包括三個常見的科：蚌蟲科 (Cyzicidae Stebbing, 1910)、湖蚌蟲科 (Limnadiidae Baird, 1849) 和狹甲蚌蟲科 (Leptestheriidae Daday, 1923)。這三個科的最大差別，在於額突器 (frontal organ 或 dorsal organ) 和喙突棘 (rostral spine) 的有無。額突器是湖蚌蟲科特有的構造，位於複眼後方，為額頭上的圓錐體構造。喙突棘是吻端前方的突起，僅狹甲蚌蟲具有。湖蚌蟲科僅具額突器而無喙突棘，狹甲蚌蟲科僅具喙突棘而無額突器，蚌蟲科則兩者皆缺如 (Martin and Boyce 2004, Richter and Timms 2005, Babu and Nandan 2010)。

環甲亞目只包含一個科，即環甲蚌蟲科 (Cyclestheriidae Sars, 1899)，過去列屬於棘尾亞目，2001 年以後升格並獨立為環甲亞目 (Olesen et al. 1996, Olesen 1999, Martin and Davis 2001, Olesen et al. 2001, Martin et al. 2003, Martin and Boyce 2004, Olesen 2005)。和所有雙甲目蚌蟲一樣，環甲蚌蟲具有一個雙瓣型的頭胸甲，其頭胸甲大致呈圓形，似乎尾蚌蟲；然而，兩瓣頭胸甲於背部癒合形成摺狀殼軸，且殼面有若干生長線 (雖不明顯)，似棘尾蚌蟲。此外，第一對觸角呈管狀，雄蟲只有一對執握器，這些特徵較像平尾蚌蟲；而尾部具有若干尾絲，這點則較像棘尾蚌蟲。牠們的雌蟲也會帶卵於頭胸甲內的背板 (dorsal lamellae) 處，然而最大的特點是，牠們的卵可在雌蟲的頭胸甲內孵化並發育為幼蟲，宛如枝角亞目 (Cladocera, 俗稱水蚤)，是唯一卵胎生 (ovo-viviparous) 的蚌蟲 (Olesen et al. 1996, Olesen 1999, Martin and Davis 2001, Olesen et al. 2001, Martin et al. 2003, Martin and Boyce 2004, Olesen 2005)。

陽明山國家公園向天池中的圓蚌蟲，頭胸甲較圓鈍，直徑約 0.3~0.5 cm，表面光亮而缺乏生長線。尾部短小，包覆於頭胸甲內，與殼緣平齊而不外露。頭部

具有一個大型、平整的穹形弓片，第一對觸角成管狀。雄蟲具有一對由第一對胸足特化而成的執握器。雌蟲的背板處可見許多圓球狀、表面光滑的卵（圖 4）。周蓮香 et al. (2006) 的初步研究中，依據形態與構造的特徵，以及美國大型鰓足類動物（large branchiopod）的分類學家羅傑斯（D. Christopher Rogers）的協助，將向天池的圓蚌蟲鑑定為貓眼蚌蟲屬，學名為 *Lynceus biformis* (周蓮香 et al. 2006)。

陽明山國家公園向天池中的扁蚌蟲，頭胸甲較扁平，長度約 0.4~0.8 cm，表面有 4~5 條生長線。尾部較長，突出於頭胸甲外，具有若干尾絲。頭部具有一個圓錐形的額突器，第一對觸角成葉狀。雄蟲具有兩對由第一和第二對胸足特化而成的執握器。雌蟲的背板處可見許多圓柱形、表面有紋路的卵（圖 2）。額突器是湖蚌蟲科（Limnadiidae Baird, 1849）的最大特徵，我們可以確定向天池的扁蚌蟲屬於湖蚌蟲科。然而湖蚌蟲科中的物種眾多，特徵差異小，不容易辨認與區別。美國大型鰓足類動物（large branchiopod）的分類學家羅傑斯（D. Christopher Rogers）認為，向天池的扁蚌蟲形似美洲若干物種，單就成體的形態和構造，難以確定其學名。周蓮香 et al. (2006) 的初步研究中，也僅將向天池的扁蚌蟲鑑定為真湖蚌蟲屬，學名暫列為 *Eulimnadia* sp. (周蓮香 et al. 2006)。尤其，湖蚌蟲科中各物種之間缺乏有效的分類特徵，更造成物種鑑定的困難度。因此，有些學者建議以卵的特徵做為有效的形態證據 (Belk 1989, Rabet 2010)，有些學者則以 DNA 分子序列的相似度做為物種鑑定的依據 (Richter et al. 2007, Schwentner et al. 2009)。顯然，向天池扁蚌蟲需要更多形態或分子的證據，才能進一步確認與鑑定。因此本計畫的目的，希望藉由粒線體 DNA 的序列分析，確定真湖蚌蟲的學名；並建立向天池豐年蟲和蚌蟲的 DNA 資料庫，期望與國外的文獻資料比對，

陽明山國家公園向天池總足類動物的粒線體 DNA 鑑定

以了解向天池總足類動物的親緣地理關係。

## 第二節 研究目的

利用 12S rRNA、16S rRNA 和 COI 三對粒線體 DNA 引子，建立向天池總足類動物的基因資料庫，並確定其學名與分類地位。



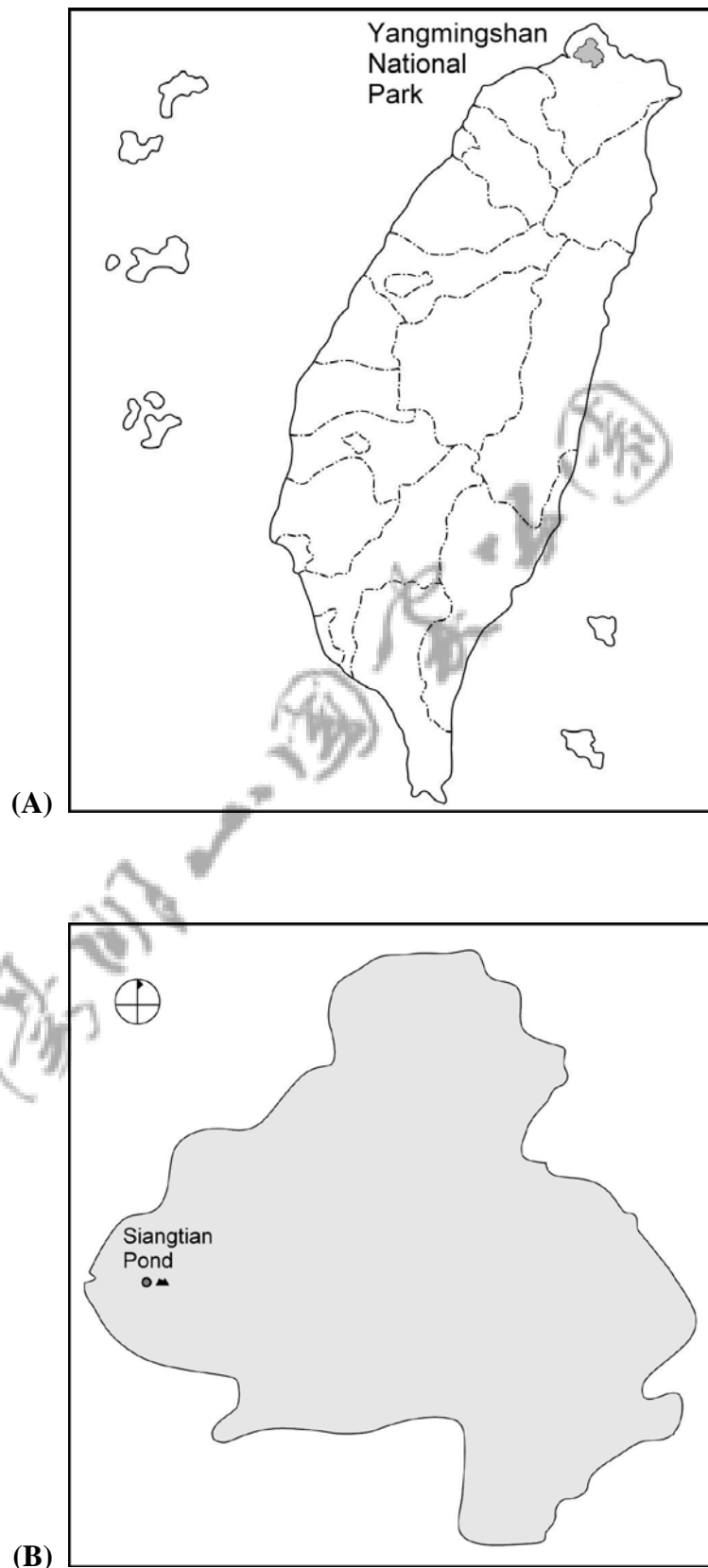


圖 1 取樣地點 (A)陽明山國家公園 (B)向天池



## 第二章 研究方法

### 第一節 野外採集或人工培養

陽明山向天池積水時，可直接進行野外採集，收集池水中豐年蟲和蚌蟲的成體。此外，向天池乾涸後，可收集池底的泥土，其中含有豐年蟲和蚌蟲的休眠卵，帶回實驗室後加水使其孵化，控制水溫於 22~25°C，約一週亦可長為成體。

### 第二節 DNA 純化

取微離心管 (ependorf tube, 1.5 mL)，加入 300~500  $\mu$ l 酒精。將每一隻豐年蟲或蚌蟲分別浸置於盛有 300~500  $\mu$ l 酒精的微離心管中。利用紫外光科技公司的 BioKit 純化每一隻豐年蟲和蚌蟲的 DNA，並以分光光度計 (NanoDrop 2000) 檢測其濃度。

### 第三節 基因放大

依據 Richter et al. 2007，合成三對粒線體 DNA 引子，即 12S rDNA、16S rDNA 和 COI (Richter et al. 2007)。利用每一對粒線體 DNA 引子，分別對向天池豐年蟲、圓蚌蟲和扁蚌蟲進行基因放大反應 (PCR; polymerase chain reaction)。基因放大儀 (BIO-RAD, MJ mini) 中的程式設定包括鏈解 (denature): 94°C 15 sec、起始 (initiation): 48°C 15 sec、延長 (elongation): 72°C 15 sec，共計 35 個循環，每一份基因放大產物的總體積為 20 $\mu$ l。

## 第四節 電泳檢驗

配製 1.5% 洋菜膠片 (Bioman Scientific Co. Ltd, agarose ; 慧眾生物科技), 內含 5% 螢光染劑 (HealthView dye)。取 4 $\mu$ l 基因放大產物, 置於洋菜膠片中, 進行電泳 (Scientific Biotech Corp., mupid 2-plus ; 賽恩斯生物科技) 分離。於紫外光箱 (UV box) 上檢驗基因放大產物的大小, 12S rDNA 約 340 bp (base pair ; 鹼基對), 16S rDNA 約 500 bp, COI 約 780 bp。

## 第五節 DNA 定序與分析

利用粒線體 DNA 引子 : 12S rDNA、16S rDNA 和 COI, 使上述基因放大產物進行 DNA 定序 (DNA sequencing) (Genomics BioSci & Tech ; 基龍米克斯)。以電腦軟體 Contig Express 和 Ultra Edit 分析 DNA 序列, 並以電腦軟體 Mega 4、jModelTest 和 MrBayes 比對 GenBank 中相關鰓足類動物的 DNA 序列。



## 第三章 研究結果

### 第一節 向天池的真湖蚌蟲

向天池扁蚌蟲的 DNA 以紫外光科技公司的 BioKit 純化後，分別以 12S rDNA 引子進行基因放大 (PCR; polymerase chain reaction)。將基因放大產物置於洋菜膠片中進行電泳 (Scientific Biotech Corp., mupid 2-plus; 賽恩斯生物科技) 檢測，可得長度約 340 bp 的 DNA 片段 ( $n = 32$ )。將此基因放大產物送至基龍米克斯公司 (Genomics BioSci & Tech) 進行 DNA 定序 (DNA sequencing) 後，以電腦軟體 Contig Express 和 Ultra Edit 分析，並選取 GenBank 中湖蚌蟲 (*Limnadia lenticularis*) 的 DNA 序列作為外群 (out-group)，以電腦軟體 Mega 4、jModelTest 和 MrBayes 同時比較 GenBank 中若干真湖蚌蟲 (*Eulimnadia* sp.) 的 DNA 序列 (表 2)。在 279 個鹼基對 (bp; base-pair) 的比對中，向天池扁蚌蟲 (ES; *Eulimnadia* from Siangtian Pond) 與日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia brauerian*) 的遺傳差異最小 ( $K2P = 0.029 \sim 0.033$ )，且小於各物種之間的遺傳差異 ( $K2P > 0.060$ )，顯示向天池的扁蚌蟲與日本真湖蚌蟲的親緣關係最接近，極可能為同種 (圖 3A)。

此外，以 16S rDNA 引子進行基因放大和電泳 (Scientific Biotech Corp., mupid 2-plus; 賽恩斯生物科技) 檢測，可得長度約 500 bp 的 DNA 片段 ( $n = 32$ )。將此基因放大產物送至基龍米克斯公司 (Genomics BioSci & Tech) 進行 DNA 定序 (DNA sequencing) 後，以電腦軟體 Contig Express 和 Ultra Edit 分析，並選取 GenBank 中湖蚌蟲 (*Limnadia lenticularis*) 的 DNA 序列作為外群 (out-group)，以電腦軟體 Mega 4、jModelTest 和 MrBayes 同時比較 GenBank 中若干真湖蚌蟲 (*Eulimnadia* sp.) 的 DNA 序列 (表 2)。在 402 個鹼基對 (bp; base-pair) 的比

對中，向天池扁蚌蟲 (ES; *Eulimnadia* from Siangtian Pond) 與日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia braueriana*) 的遺傳差異最小 (K2P = 0.020 ~ 0.025)，且小於各物種之間的遺傳差異 (K2P = 0.095)，顯示向天池的扁蚌蟲與日本真湖蚌蟲的親緣關係最接近，極可能為同種 (圖 3B)。

還有，以 COI 引子進行基因放大和電泳 (Scientific Biotech Corp., mupid 2-plus; 賽恩斯生物科技) 檢測，可得長度約 780 bp 的 DNA 片段 (n = 32)。將此基因放大產物送至基龍米克斯公司 (Genomics BioSci & Tech) 進行 DNA 定序 (DNA sequencing) 後，以電腦軟體 Contig Express 和 Ultra Edit 分析，以電腦軟體 Mega 4、jModelTest 和 MrBayes 同時比較 GenBank 中若干真湖蚌蟲 (*Eulimnadia* sp.) 的 DNA 序列 (表 2)。在 724 個鹼基對 (bp; base-pair) 的比對中，向天池扁蚌蟲 (ES; *Eulimnadia* from Siangtian Pond) 與日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia braueriana* EF189667 Japan) 的遺傳差異很小 (K2P = 0.128 ~ 0.136)，與非洲真湖蚌蟲 (*Eulimnadia Africana* FJ499195 Botswana, *Eulimnadia Africana* FJ499220 Botswana, *Eulimnadia Africana* FJ499202 South Africa) 的遺傳差異也不大 (K2P = 0.132 ~ 0.151)，且都小於各物種之間的遺傳差異 (K2P > 0.156)。由於日本的地理位置較接近台灣，因此向天池的扁蚌蟲極可能與日本真湖蚌蟲同種，且與非洲真湖蚌蟲近似 (圖 3C)。

綜合上述三對粒線體 DNA 引子 (12S rDNA、16S rDNA 和 COI) 的研究結果 (圖 3)，加上形態和構造特徵的比對 (表 1，圖 2) (周蓮香 et al. 2006)，以及地理位置的相關性，我們鑑定向天池的扁蚌蟲與日本真湖蚌蟲同種，學名為 *Eulimnadia braueriana* Ishikawa, 1895。

## 第二節 向天池的貓眼蚌蟲

向天池圓蚌蟲的 DNA 以紫外光科技公司的 BioKit 純化後，分別以 12S rDNA 引子進行基因放大 (PCR; polymerase chain reaction)。將基因放大產物置於洋菜膠片中進行電泳 (Scientific Biotech Corp., mupid 2-plus; 賽恩斯生物科技) 檢測，可得長度約 340 bp 的 DNA 片段 ( $n = 27$ )。將此基因放大產物送至基龍米克斯公司 (Genomics BioSci & Tech) 進行 DNA 定序 (DNA sequencing) 後，以電腦軟體 Contig Express 和 Ultra Edit 分析，並選取 GenBank 中環甲蚌蟲 (*Cyclestheria hislopi*) 的 DNA 序列作為外群 (out-group)，以電腦軟體 Mega 4、jModelTest 和 MrBayes 同時比較 GenBank 中若干貓眼蚌蟲 (*Lynceus* sp.) 的 DNA 序列 (表 2)。在 282 個鹼基對 (bp; base-pair) 的比對中，向天池圓蚌蟲 (LS; *Lynceus* from Siangtian Pond) 與日本貓眼蚌蟲 (*Lynceus biformis*) 的遺傳差異最小 ( $K2P = 0.063$ )，且小於各物種之間的遺傳差異 ( $K2P > 0.180$ )，顯示向天池的圓蚌蟲與日本貓眼蚌蟲的親緣關係最接近，極可能為同種 (圖 5A)。

此外，以 16S rDNA 引子進行基因放大和電泳 (Scientific Biotech Corp., mupid 2-plus; 賽恩斯生物科技) 檢測，可得長度約 500 bp 的 DNA 片段 ( $n = 32$ )。將此基因放大產物送至基龍米克斯公司 (Genomics BioSci & Tech) 進行 DNA 定序 (DNA sequencing) 後，以電腦軟體 Contig Express 和 Ultra Edit 分析，並選取 GenBank 中環甲蚌蟲 (*Cyclestheria hislopi*) 的 DNA 序列作為外群 (out-group)，以電腦軟體 Mega 4、jModelTest 和 MrBayes 同時比較 GenBank 中若干貓眼蚌蟲 (*Lynceus* sp.) 的 DNA 序列 (表 2)。在 278 個鹼基對 (bp; base-pair) 的比對中，向天池圓蚌蟲 (LS; *Lynceus* from Siangtian Pond) 與日本貓眼蚌蟲 (*Lynceus biformis*) 的遺傳差異最小 ( $K2P = 0.033 \sim 0.045$ )，且小於各物種之間的遺傳差

異 ( $K2P > 0.084$ )，顯示向天池的圓蚌蟲與日本貓眼蚌蟲的親緣關係最接近，極可能為同種 (圖 5B)。

還有，以 COI 引子進行基因放大和電泳 (Scientific Biotech Corp., mupid 2-plus; 賽恩斯生物科技) 檢測，可得長度約 780 bp 的 DNA 片段 ( $n = 32$ )。將此基因放大產物送至基龍米克斯公司 (Genomics BioSci & Tech) 進行 DNA 定序 (DNA sequencing) 後，以電腦軟體 Contig Express 和 Ultra Edit 分析，並選取 GenBank 中環甲蚌蟲 (*Cyclestheria hislopi*) 的 DNA 序列作為外群 (out-group)，以電腦軟體 Mega 4、jModelTest 和 MrBayes 同時比較 GenBank 中若干貓眼蚌蟲 (*Lynceus* sp.) 的 DNA 序列 (表 2)。在 547 個鹼基對 (bp; base-pair) 的比對中，向天池圓蚌蟲 (LS; *Lynceus* from Siangtian Pond) 與日本貓眼蚌蟲 (*Lynceus biformis*) 的遺傳差異最小 ( $K2P = 0.156 \sim 0.159$ )，且小於各物種之間的遺傳差異 ( $K2P > 0.189$ )，顯示向天池的圓蚌蟲與日本貓眼蚌蟲的親緣關係最接近，極可能為同種 (圖 5C)。

綜合上述三對粒線體 DNA 引子 (12S rDNA、16S rDNA 和 COI) 的研究結果 (圖 5)，加上形態和構造特徵的比對 (表 1，圖 4) (周蓮香 et al. 2006)，以及地理位置的相關性，我們鑑定向天池的圓蚌蟲與日本貓眼蚌蟲同種，學名為 *Lynceus biformis* (Ishikawa, 1895)。

表 1 向天池總足類動物的分類表

Class 綱	Order 目	Suborder 亞目	Family 科	Genus 屬	Species 種
Branchiopoda Latreille, 1817 總足綱	Anostraca Sars, 1867 無甲目 ● 有眼柄 ● 無頭胸甲	---	Thamnocephalidae Simon, 1886 鉸額蟲科	<i>Branchinella</i> Sayce, 1903 枝額蟲屬	● <i>Branchinella</i> <i>kugenumaensis</i> (Ishikawa, 1895) 湖沼枝額蟲
	Diplostraca Gerstaecker, 1866 雙甲目 ● 無眼柄 ● 頭胸甲為雙瓣型 ● 第二對觸角為雙肢型	Laevicaudata Linder, 1945 平尾亞目 ● 頭胸甲側面圓厚， 殼軸內陷，無生長線 ● 尾節無尾絲， 與頭胸甲平齊	Lynceidae Baird, 1845 貓眼蚌蟲科 ● 頭部有穹形弓片 ● 第一對觸角呈管狀 ● 雄性有一對執握器 ● 卵呈球狀且表面光滑	<i>Lynceus</i> Müller, 1776 貓眼蚌蟲屬	● <i>Lynceus</i> <i>brachyurus</i> (Ishikawa, 1895) 貓眼蚌蟲
		Spinicaudata Linder, 1945 棘尾亞目 ● 頭胸甲側面扁薄， 殼軸平褶，有生長線 ● 尾節有尾絲， 露於頭胸甲外	Limnadiidae Baird, 1849 湖蚌蟲科 ● 頭部有額突器 ● 第一對觸角呈葉狀 ● 雄性有兩對執握器 ● 卵呈柱狀且表面有紋路	<i>Eulimnadia</i> Packard, 187 真湖蚌蟲屬	● <i>Eulimnadia</i> <i>braueriana</i> Ishikawa, 1895 真湖蚌蟲

(Martin et al. 1986, Olesen 1998, Olesen and Grygier 2003, Martin and Boyce 2004, Olesen 2005)

表 2 GenBank 中應用於本研究的物種及其編號與棲地

Species	12S rDNA	16S rDNA	COI	Locality
<i>Eulimnadia africana</i> Brauer, 1877			FJ499195.1	Botswana
<i>Eulimnadia africana</i> Brauer, 1877			FJ499202.1	South Africa
<i>Eulimnadia africana</i> Brauer, 1877			FJ499220.1	Botswana
<i>Eulimnadia agassizii</i> Packard, 1874			FJ499198.1	MA, US
<i>Eulimnadia agassizii</i> Packard, 1874			FJ499201.1	MA, US
<i>Eulimnadia braueriana</i> Ishikawa, 1895	EF189599.1			Lake Biwa area, Japan
<i>Eulimnadia braueriana</i> Ishikawa, 1895		DQ470602.1		Mise, Japan; Otsu, Japan; Shiga, Japan
<i>Eulimnadia braueriana</i> Ishikawa, 1895		EF189604.1		Lake Biwa area, Japan
<i>Eulimnadia braueriana</i> Ishikawa, 1895			EF189667.1	Lake Biwa area, Japan
<i>Eulimnadia braueriana</i> Ishikawa, 1895			FJ499132.1	Japan
<i>Eulimnadia colombiensis</i> Roesler, 1989	AY779645.1			Venezuela
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989	AY779644.1			Venezuela
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989	AY779647.1			Mexico
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989	AY779650.1			Mexico
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989	AY779651.1			Mexico
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989	AY779669.1			Galapagos Islands, Ecuador
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989	AY779670.1			Galapagos Islands, Ecuador
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989			FJ499138.1	Japan
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989			FJ499139.1	Japan
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989			FJ499167.1	Martinique, FWI(French West Indies)
<i>Eulimnadia cylindrova</i> Belk, 1989			FJ499168.1	Desirade, FWI(French West Indies)
<i>Eulimnadia dahlia</i> Sars, 1896			FJ499142.1	WA, Australia
<i>Eulimnadia dahlia</i> Sars, 1896			FJ499143.1	WA, Australia
<i>Eulimnadia dahlia</i> Sars, 1896			FJ499144.1	WA, Australia
<i>Eulimnadia dahlia</i> Sars, 1896			FJ499148.1	WA, Australia
<i>Eulimnadia dahlia</i> Sars, 1896			FJ499149.1	WA, Australia
<i>Eulimnadia dahlia</i> Sars, 1896			FJ499211.1	WA, Australia
<i>Eulimnadia dahlia</i> Sars, 1896			FJ499212.1	WA, Australia
<i>Eulimnadia diversa</i> Mattox, 1937	AY779664.1			AZ, US

<u>Species</u>	<u>12S rDNA</u>	<u>16S rDNA</u>	<u>COI</u>	<u>Locality</u>
<i>Eulimnadia diversa</i> Mattox, 1937	AY779678.1			AZ, US
<i>Eulimnadia diversa</i> Mattox, 1937			FJ499216.1	IN, US
<i>Eulimnadia diversa</i> Mattox, 1937			FJ499218.1	MS, US
<i>Eulimnadia diversa</i> Mattox, 1937			FJ499219.1	MS, US
<i>Eulimnadia magdalenensis</i> Roessler, 1990	AY779643.1			Venezuela
<i>Eulimnadia magdalenensis</i> Roessler, 1990	AY779646.1			Venezuela
<i>Eulimnadia magdalenensis</i> Roessler, 1990	AY779681.1			Venezuela
<i>Eulimnadia mauritiana</i> Guerin, 1837	AY779675.1			Mauritius Island
<i>Eulimnadia packardiana</i> Ishikawa, 1895	AY779679.1			Japan
<i>Eulimnadia texana</i> Packard, 1871	AY779659.1			NM, US
<i>Eulimnadia texana</i> Packard, 1871	AY779667.1			NM, US
<i>Eulimnadia texana</i> Packard, 1871	AY779674.1			NM, US
<i>Eulimnadia texana</i> Packard, 1871	AY779680.1			NM, US
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499155.1	WA, Australia
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499163.1	WA, Australia
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499164.1	WA, Australia
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499166.1	WA, Australia
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499170.1	WA, Australia
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499171.1	WA, Australia
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499172.1	WA, Australia
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499191.1	WA, Australia
<i>Linnadia badia</i> Wolf, 1911			FJ499192.1	WA, Australia
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1758	AY779654.1			FL, US
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1758	AY779655.1			FL, US
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1758	AY779682.1			FL, US
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1761		EF189609.1		Morava flood plain, Austria
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1761			EF189671.1	Morava flood plain, Austria
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1761			FJ499127.1	FL, US
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1761			FJ499128.1	FL, US
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1761			FJ499169.1	Italy
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1761			FJ499183.1	Austria
<i>Linnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1761			FJ499193.1	Austria



<u>Species</u>	<u>12S rDNA</u>	<u>16S rDNA</u>	<u>COI</u>	<u>Locality</u>
<i>Limnadia lenticularis</i> Linnaeus, 1761			FJ499194.1	Austria
<i>Limnadia nipponica</i> Ishikawa, 1895			FJ499186.1	Japan
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499146.1	WA, Australia
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499147.1	WA, Australia
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499151.1	WA, Australia
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499152.1	WA, Australia
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499153.1	WA, Australia
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499154.1	WA, Australia
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499165.1	WA, Australia
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499178.1	WA, Australia
<i>Limnadia sordida</i> King, 1855			FJ499179.1	WA, Australia
<i>Limnadia stanleyana</i> King, 1855			FJ499174.1	NSW, Australia
<i>Limnadia stanleyana</i> King, 1855			FJ499175.1	NSW, Australia
<i>Limnadia urukhai</i> Webb & Bell, 1979			FJ499173.1	NSW, Australia
<i>Lynceus bififormis</i> Ishikawa, 1895	AF494481.1			Lake Biwa area, Japan
<i>Lynceus bififormis</i> Ishikawa, 1895		DQ467712.1		Japan
<i>Lynceus bififormis</i> Ishikawa, 1895		DQ467713.1		Japan
<i>Lynceus bififormis</i> Ishikawa, 1895		DQ470605.1		Shiga, Japan; Liusatsu, Japan; Kataoka-Cho, Japan
<i>Lynceus bififormis</i> Ishikawa, 1895		EF189611.1		Lake Biwa area, Japan
<i>Lynceus bififormis</i> Ishikawa, 1895			EF189672.1	Lake Biwa area, Japan
<i>Lynceus brachyurus</i> Muller, 1776	AF494480.1			Copenhagen, Denmark
<i>Lynceus brachyurus</i> Muller, 1776		DQ470604.1		Ulvshale, Denmark; Mon, Denmark
<i>Lynceus brachyurus</i> Muller, 1776		GQ328954.1		(NA)
<i>Lynceus gracilicornis</i> Packard, 1871		DQ467710.1		FL, US
<i>Lynceus gracilicornis</i> Packard, 1871		DQ467711.1		FL, US
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467731.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467732.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467736.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467737.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467738.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467739.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467742.1		SA, Australia



<u>Species</u>	<u>12S rDNA</u>	<u>16S rDNA</u>	<u>COI</u>	<u>Locality</u>
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467743.1		SA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467744.1		SA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467745.1		SA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467746.1		SA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467747.1		SA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467748.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467749.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467750.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467751.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467752.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467753.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467754.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467755.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467756.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467757.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467758.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467769.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467770.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467771.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467772.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467773.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467774.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467775.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467776.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467778.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467779.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467780.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467781.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467782.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467783.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467786.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467787.1		WA, Australia

<u>Species</u>	<u>12S rDNA</u>	<u>16S rDNA</u>	<u>COI</u>	<u>Locality</u>
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467789.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467790.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467791.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467792.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467793.1		SA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467794.1		SA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467797.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467798.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467799.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467800.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467801.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467802.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467803.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467804.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ467806.1		WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ680816.1		(NA)
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ680817.1		(NA)
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ680818.1		(NA)
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ680819.1		(NA)
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ680820.1		(NA)
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855		DQ680821.1		(NA)
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467679.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467680.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467681.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467683.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467684.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467685.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467686.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467687.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467688.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467689.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467690.1	WA, Australia

<u>Species</u>	<u>12S rDNA</u>	<u>16S rDNA</u>	<u>COI</u>	<u>Locality</u>
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467691.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467692.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467693.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467694.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467695.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467696.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467697.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467698.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467699.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467700.1	SA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467701.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467702.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467703.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467704.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467705.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467706.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467707.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467708.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ467709.1	WA, Australia
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855			DQ680815.1	(NA)
<i>Lynceus macleyanus</i> King, 1855	AF494479.1			Paroo area, NSW, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467714.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467715.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467716.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467717.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467718.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467719.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467720.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467721.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467722.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467723.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467724.1		WA, Australia

<u>Species</u>	<u>12S rDNA</u>	<u>16S rDNA</u>	<u>COI</u>	<u>Locality</u>
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467725.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467726.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467727.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467728.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467729.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467730.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467733.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467734.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467735.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467740.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467741.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467759.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467760.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467761.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467762.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467763.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467764.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467765.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467766.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467767.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467768.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467777.1		WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467784.1		NSW, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		DQ467795.1		QLD, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886		EF189612.1		Paroo area, NSW, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886			DQ467678.1	WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886			DQ467682.1	WA, Australia
<i>Lynceus tatei</i> Brady, 1886			EF189673.1	Paroo area, NSW, Australia



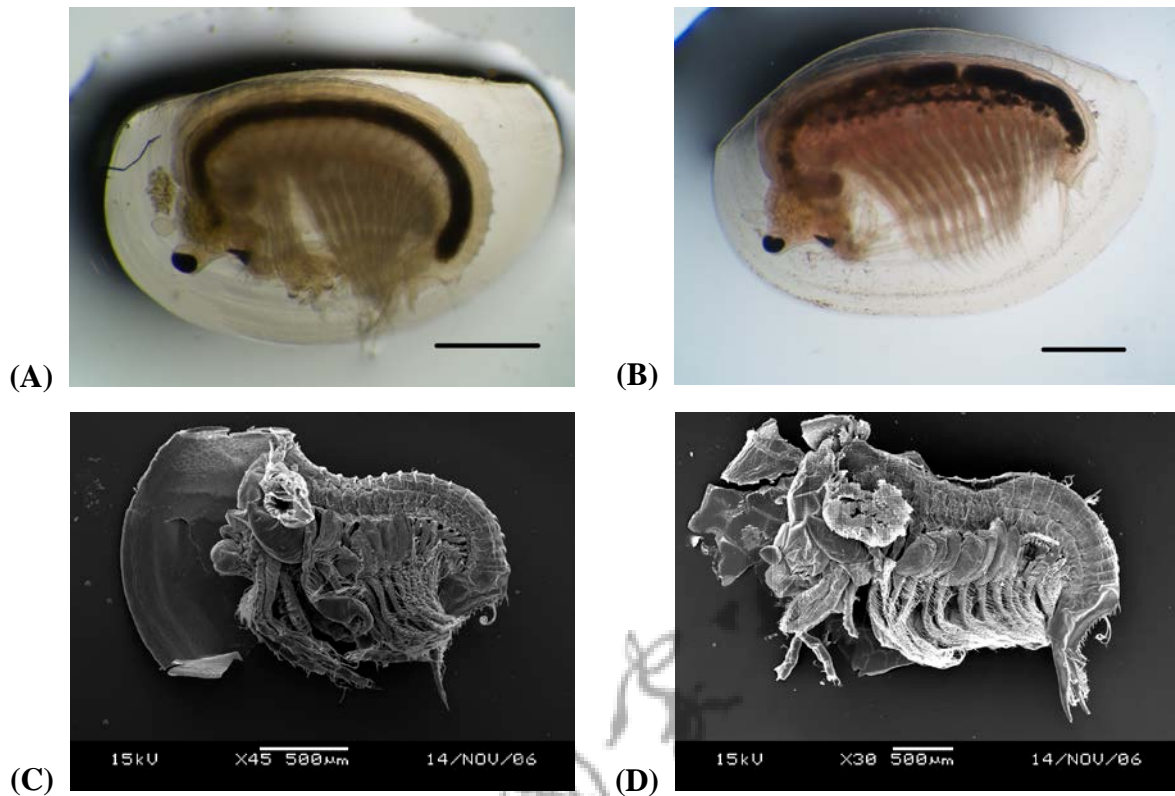
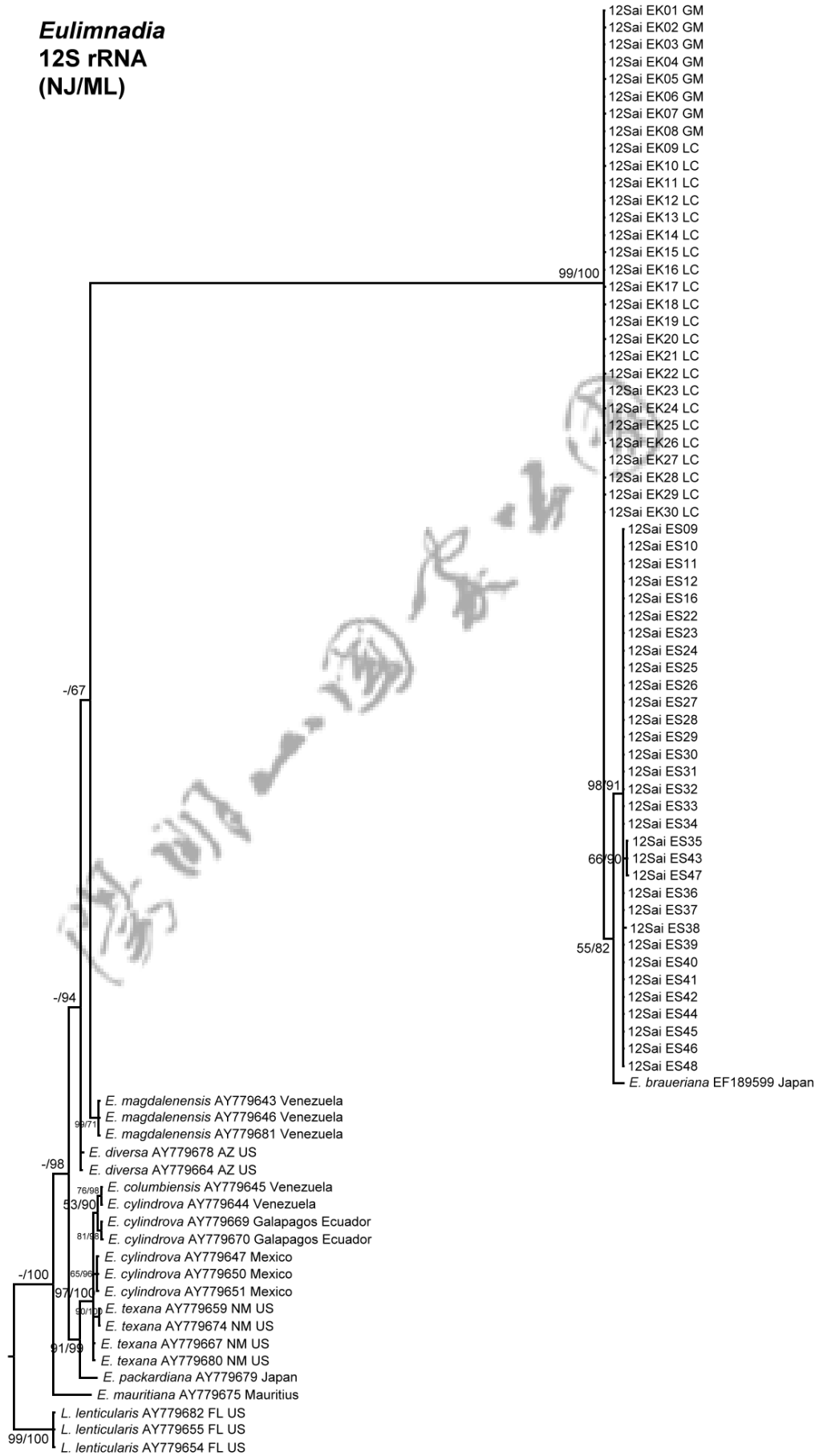


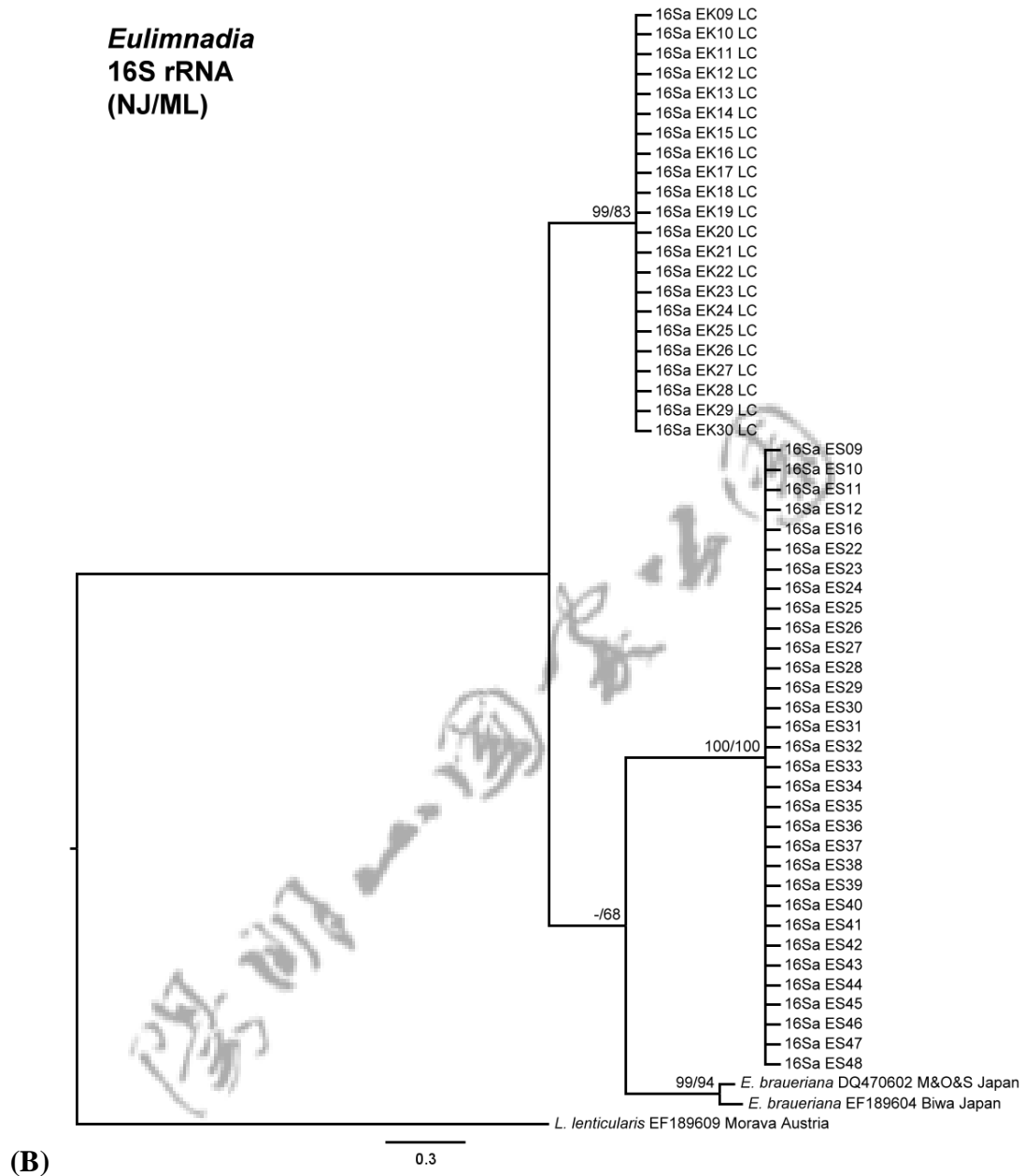
圖 2 真湖蚌蟲

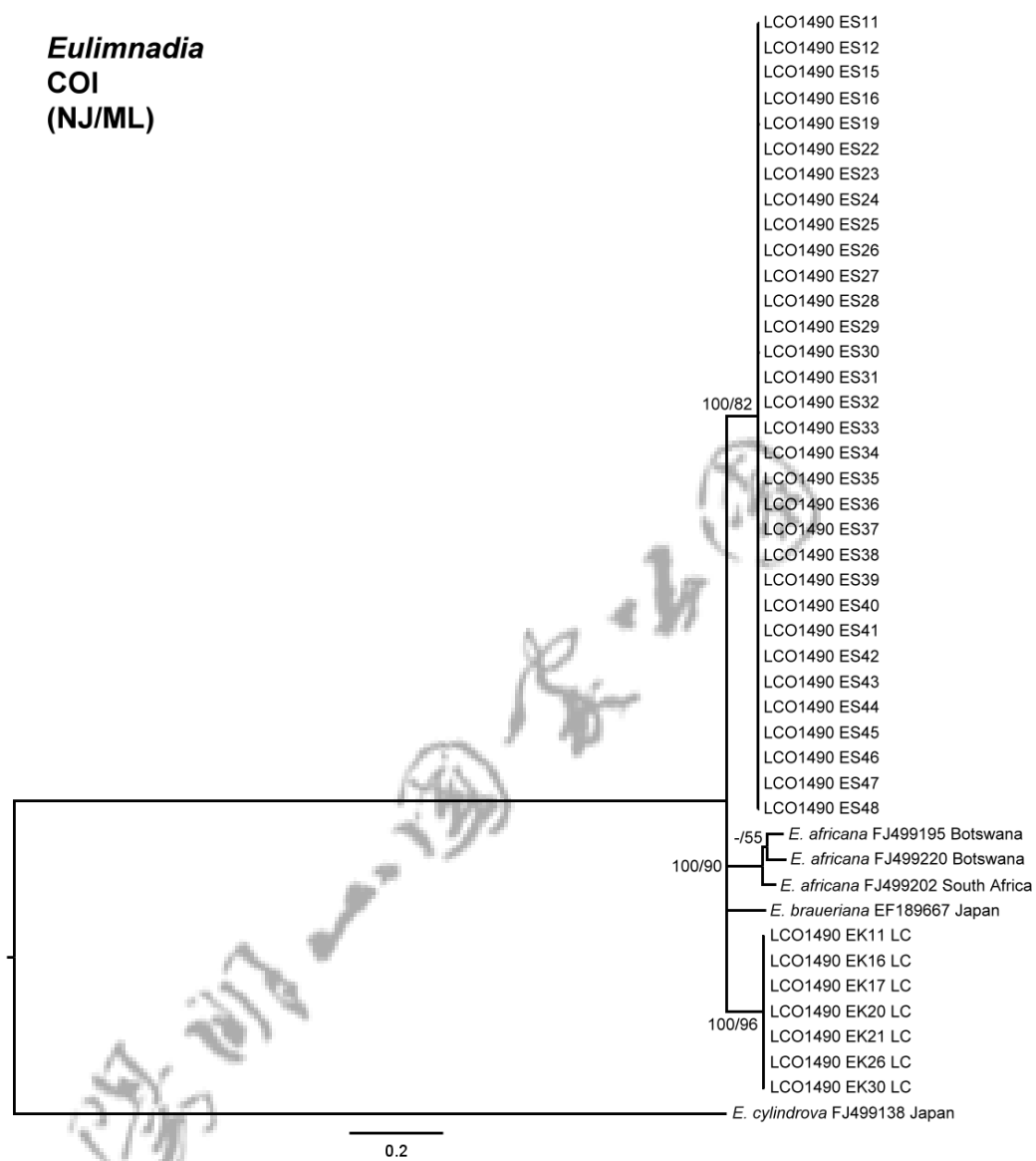
(A) 雄性 (光學顯微攝影) (尺規 = 1 mm) (B) 雌性 (光學顯微攝影) (尺規 = 1 mm) (C) 雄性 (電子顯微攝影) (D) 雌性 (電子顯微攝影) (E) 雄性的主要特徵 (F) 雌性的主要特徵

***Eulimnadia***  
**12S rRNA**  
**(NJ/ML)**



(A)





(C)

圖 3 真湖蚌蟲的種系發生樹 (NJ/ML phylogenetic trees)

(A)12S rDNA 序列分析 (B)16S rDNA 序列分析 (C)COI 序列分析



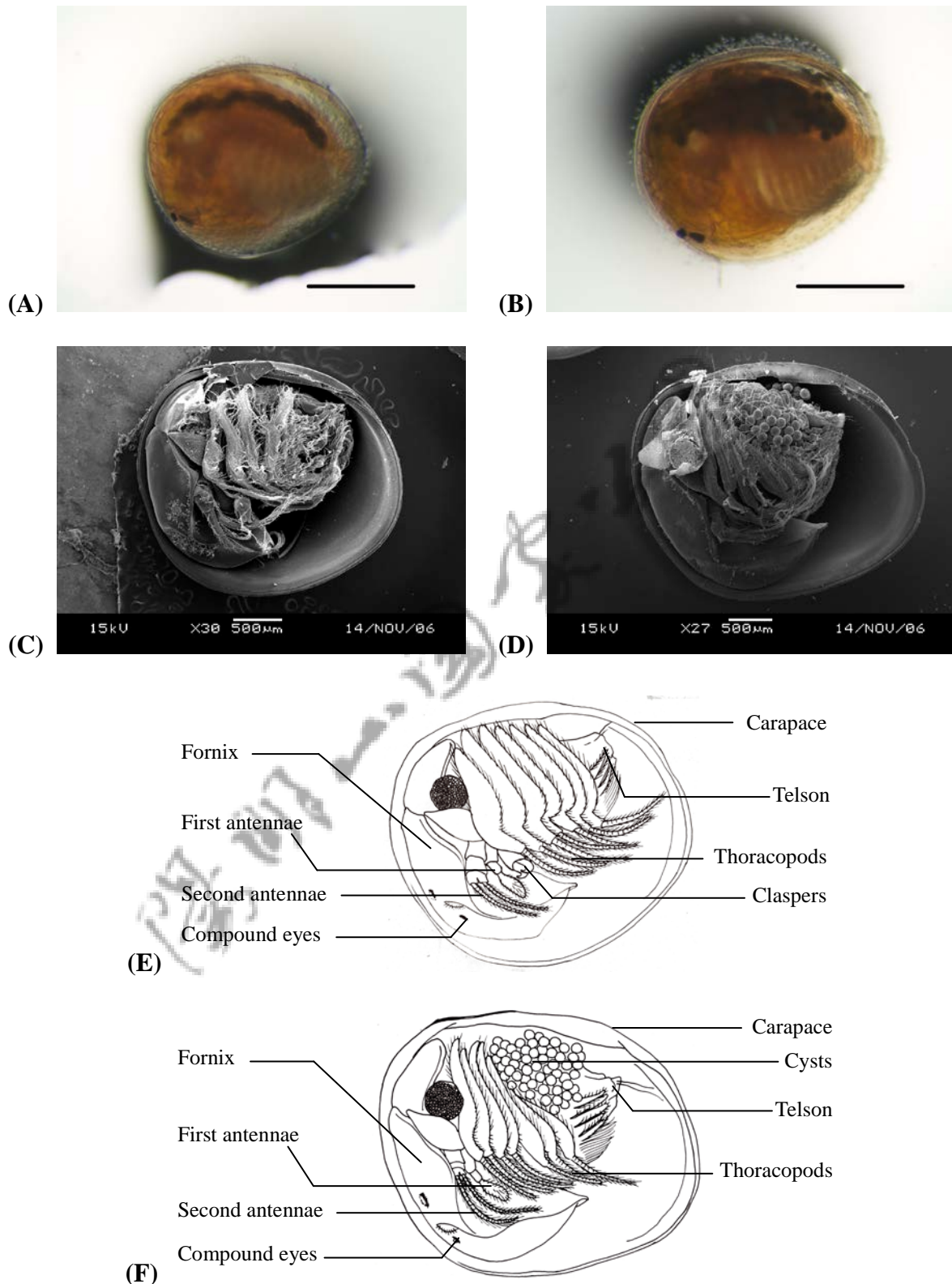
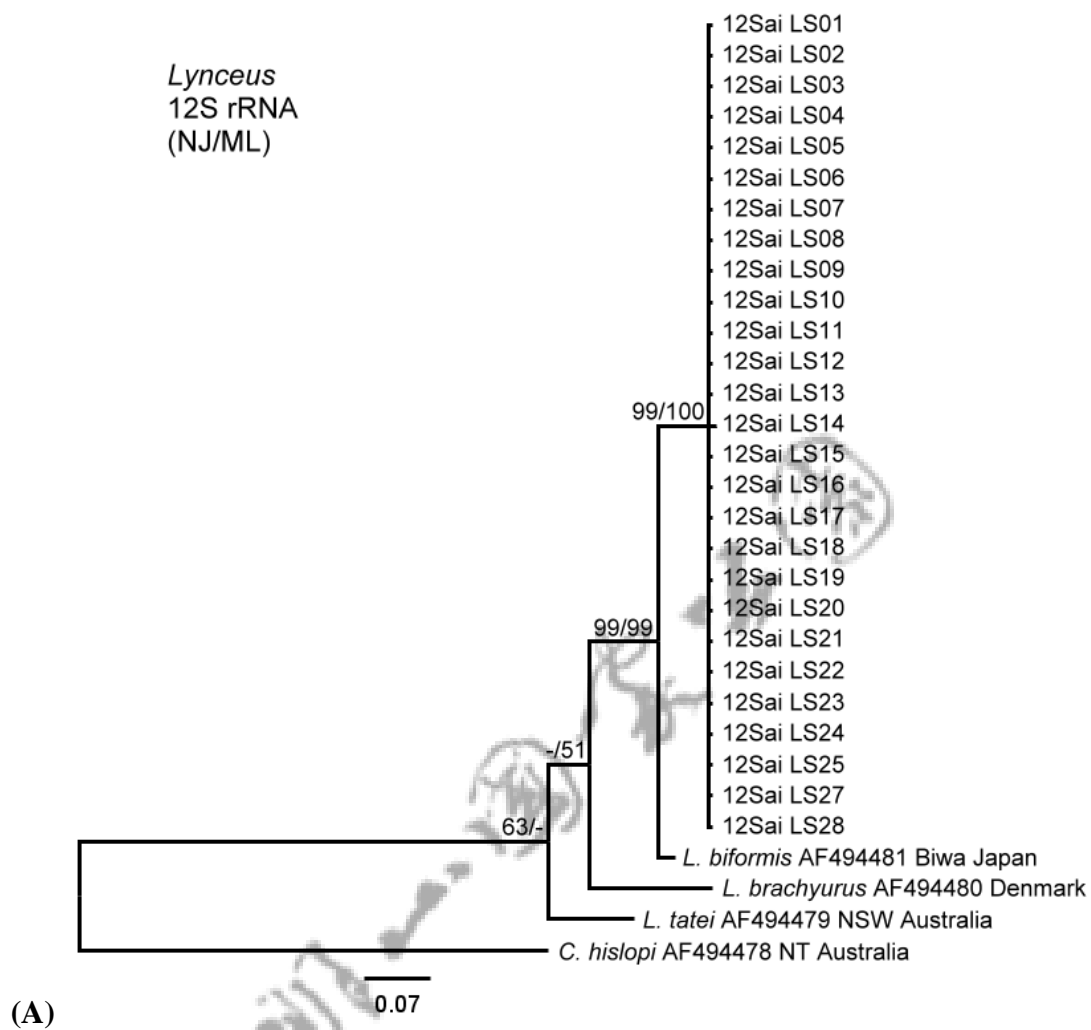
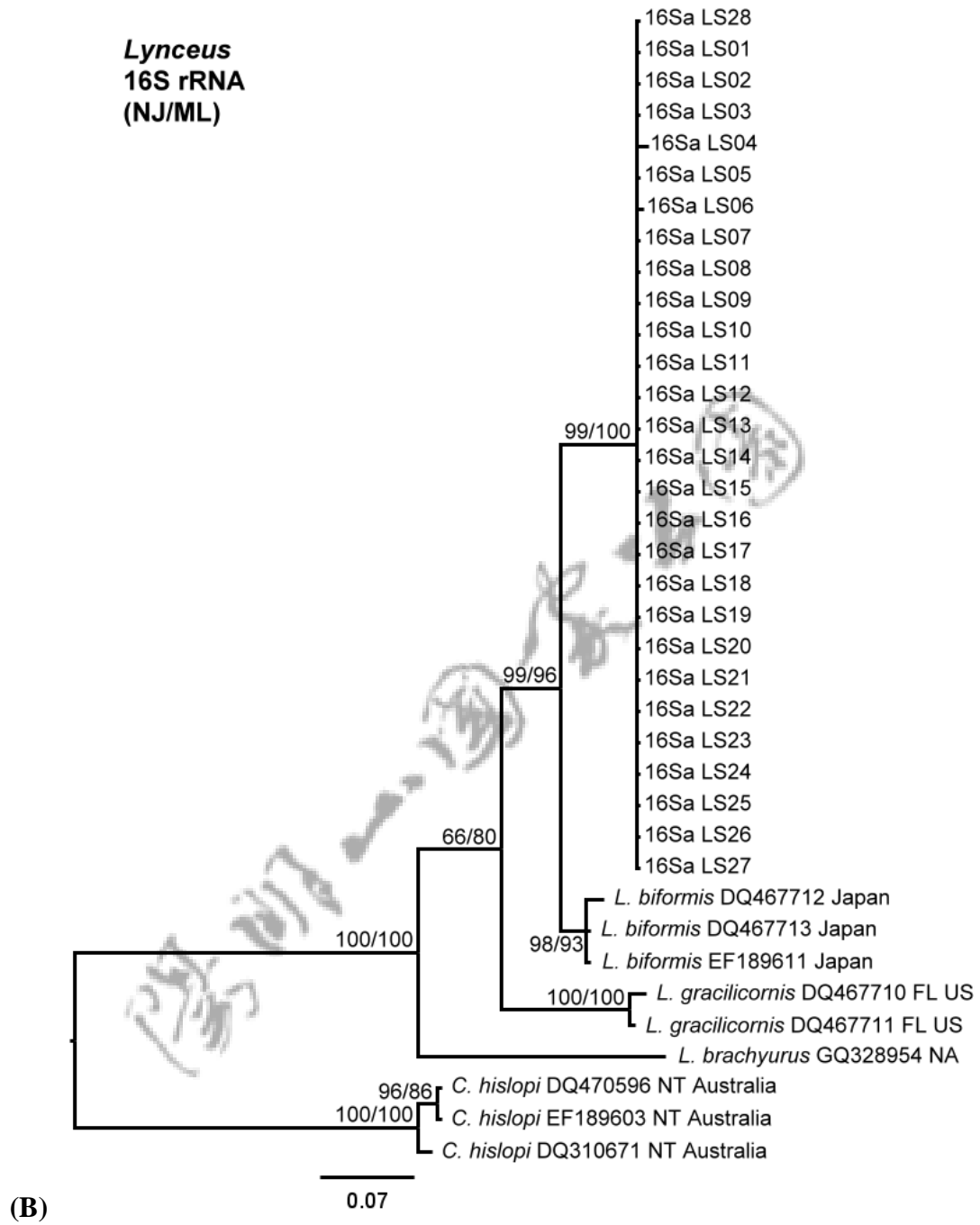
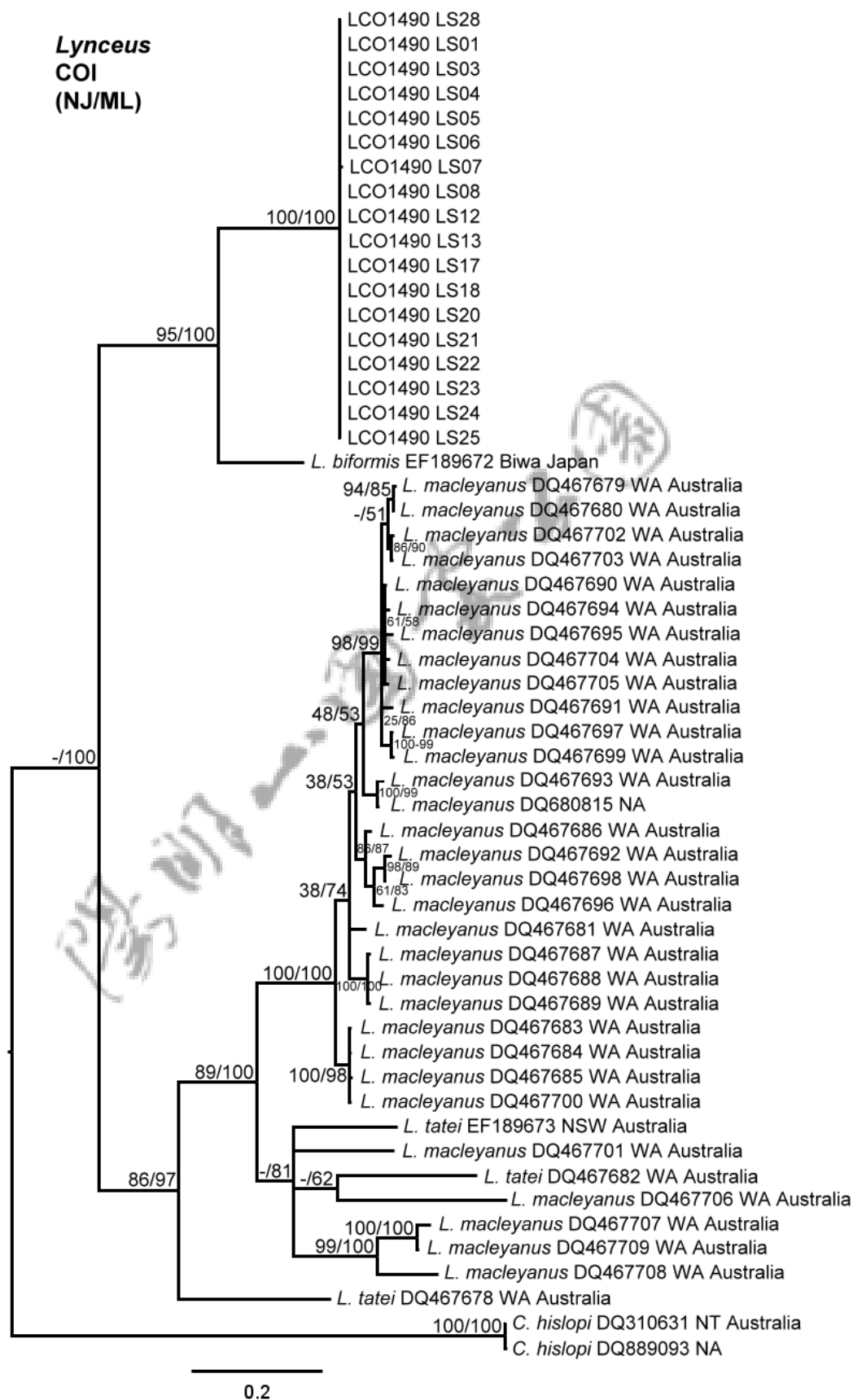


圖 4 貓眼蚌蟲

(A) 雄性 (光學顯微攝影) (尺規 = 1 mm) (B) 雌性 (光學顯微攝影) (尺規 = 1 mm) (C) 雄性 (電子顯微攝影) (D) 雌性 (電子顯微攝影) (E) 雄性的主要特徵 (F) 雌性的主要特徵







(C)

圖 5 貓眼蚌蟲的種系發生樹 (NJ/ML phylogenetic trees)

(A)12S rDNA 序列分析 (B)16S rDNA 序列分析 (C)COI 序列分析

## 第四章 討 論

### 第一節 向天池貓眼蚌蟲的親緣關係

由 12S rDNA 的分析可知，向天池的貓眼蚌蟲 (12Sa LS) 與日本貓眼蚌蟲 (*Lynceus biformis* AF494481 Japan) 的親緣關係最接近，其次為丹麥貓眼蚌蟲 (*L. brachyurus* AF494480 Denmark)，而與澳洲貓眼蚌蟲 (*L. tatei* AF494479 NSW Australia) 最疏遠(圖 5A)。丹麥物種 *L. brachyurus* 也廣泛分布於北美各地 (Martin and Belk 1988)。由此顯示，向天池的貓眼蚌蟲與北歐和北美物種的親緣關係較接近，分支種化的年代較晚；而與澳洲物種的親緣關係較疏遠，其分支種化的年代則較早。澳洲遠在中生代就與其他大陸分離，向天池貓眼蚌蟲與澳洲物種間較疏遠的親緣關係，符合大陸漂移說 (continental drift)，然而，確切的種化時間和演化關係有待日後更多分子或化石證據來估算。

### 第二節 金門真湖蚌蟲的發現

我們於 2008 年自金門古墓 (北緯 24 度 27 分 066 秒、東經 118 度 19 分 856 秒，以 GM 表示) 和龍口 (北緯 24 度 27 分 534 秒、東經 118 度 21 分 406 秒，以 LC 表示) 採集底土，分別在實驗室中培養出形似向天池真湖蚌蟲的扁蚌蟲 (EK; *Eulimnadia* from Kinmen)，但體型較大。

由 12S rDNA 的分析可知，此兩個採樣點的扁蚌蟲(12Sai EK GM 與 12Sai EK LC) 彼此間沒有遺傳差異 ( $K2P = 0$ )，且與向天池真湖蚌蟲、日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia brauerian*) 的遺傳差異很小 ( $K2P = 0.029 \sim 0.033$ )，小於各物種之間的遺傳差異 ( $K2P > 0.060$ )，顯示金門的扁蚌蟲極可能與向天池和日本的真湖

蚌蟲同種（圖 3A）。

未來可進行電子顯微攝影，比對細微構造，綜合形態與分子的證據，應可確認該物種的學名為 *Eulimnadia braueriana* Ishikawa, 1895。

### 第三節 向天池和金門蚌蟲的種內遺傳多樣性

向天池真湖蚌蟲族群的 DNA 分析中，僅見其 12S rDNA 片段（12Sai ES）具有 3 種單型（haplotype），16S rDNA 和 COI DNA 皆只見 1 種單型（haplotype），顯示向天池真湖蚌蟲的遺傳多樣性小。

向天池貓眼蚌蟲族群的 DNA 分析中，僅見其 16S rDNA 片段（16Sa LS）具有 3 種單型（haplotype），12S rDNA 和 COI DNA 皆只見 1 種單型（haplotype），顯示向天池貓眼蚌蟲的遺傳多樣性也很小。

由金門採回的底土至目前為止僅孵育出真湖蚌蟲，尚無貓眼蚌蟲出現。金門的真湖蚌蟲在本研究中，不論 12S rDNA、16S rDNA 或 COI DNA，皆只見 1 種單型（haplotype），顯示其極小的遺傳多樣性。

種內遺傳多樣性的大小常以單型（haplotype）數目的多少來表示，而單型（haplotype）數目容易受取樣的個體所影響。當取樣的個體數太少時，容易獲得極小的遺傳多樣性。此外，實驗室中培養的族群小，尤其相同年份的底土所孵育出來的族群，休眠卵可能來自近親交配，更容易造成遺傳多樣性下降。未來，每當向天池因豪雨或颱風而積水時，可收集不同地點的成體，陸續進行 DNA 序列比對，以獲知向天池和金門之各種鰓足類動物的遺傳多樣性，將有助於釐清真湖蚌蟲或貓眼蚌蟲在向天池、金門、日本等地的基因交流（gene flow）和演化。

#### 第四節 亞洲真湖蚌蟲的親緣關係

由 12S rDNA 的分析可知，本研究中的向天池真湖蚌蟲 (12Sai ES)、金門真湖蚌蟲 (12Sai EK GM 與 12Sai EK LC) 與日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia braueriana* EF189599 Japan) 等亞洲真湖蚌蟲彼此親緣關係接近，甚至為同種，形成相當獨立的動物類群 (圖 3A)。其次為美洲真湖蚌蟲，包括美國 *E. diversa* 和 *E. texana*、墨西哥 *E. cylindrova*、委內瑞拉 *E. magdalenensis* 和 *E. columbiensis*，而非洲真湖蚌蟲 (模里西斯 *E. mauritiana* AY779675 Mauritius) 與亞洲真湖蚌蟲的親緣關係最疏遠 (圖 3A)，顯示真湖蚌蟲之演化與地理分布的正相關性。

尤其，圖 3A 中有一種日本真湖蚌蟲 (*E. packardiana* AY779679 Japan) 的 12S rDNA 序列與美洲若干真湖蚌蟲的親緣關係更顯接近，有文獻指出 *E. packardiana* 與 *E. braueriana* 為同名物種 (Naganawa 2001, Naganawa and Orgiljanova 2001, Olesen and Grygier 2003, Alonso and Naganawa 2008)，這意味著亞洲真湖蚌蟲與美洲物種的親緣關係確實十分接近，在圖 3A 中可見一個更大且完整的類群。另外，2009 年小蘭嶼有發現形態近似於委內瑞拉 *Eulimnadia magdalenensis* 的真湖蚌蟲 (*Eulimnadia* cf. *magdalenensis*) (李政璋 and 柯風溪 2009)，也顯示亞洲真湖蚌蟲與美洲物種的近親關係。

然而，COI DNA 的分析中 (圖 3C)，我們發現向天池和金門的真湖蚌蟲 (LCO1490 ES, LCO1490) 不僅與日本真湖蚌蟲 (*Eulimnadia braueriana* EF189667 Japan) 的遺傳差異小 ( $K2P = 0.128 \sim 0.136$ )，且與非洲真湖蚌蟲 (*Eulimnadia Africana* FJ499195 Botswana, *Eulimnadia Africana* FJ499220 Botswana, *Eulimnadia Africana* FJ499202 South Africa) 的遺傳差異也不大 ( $K2P = 0.132 \sim 0.151$ )，都小於各物種之間的遺傳差異 ( $K2P > 0.156$ ) (圖 3C)，顯示亞

洲真湖蚌蟲與非洲物種的親緣關係也非常接近。

向天池的真湖蚌蟲與美洲或非洲物種的親緣關係有待進一步的追蹤和驗證，完整的粒線體 DNA 資料庫，以及細胞核 DNA（如 18S rDNA、28S rDNA、EF1 $\alpha$ ）的序列分析，將可提供更多比對資訊。目前，向天池鰓足類動物缺乏細胞核 DNA 的序列，國際文獻中也尚無完整的蚌蟲粒線體 DNA 的資料庫，因此亞洲、美洲與非洲各地蚌蟲的演化及親緣地理關係有待未來深入探討。

## 第五節 建議

### 一、立即可行的建議～陽明山向天池的保育策略

陽明山國家公園的向天池是台北市民假日登山旅遊的熱門景點，承受極大的旅遊壓力。有些遊客會在池水中洗手或游泳，有些遊客還會帶走池中的鰓足類動物，這些行為極可能影響湖沼枝額蟲、真湖蚌蟲和貓眼蚌蟲等物種的族群大小和群聚關係。此外，當池水乾涸後，常見許多善男信女在池心大石頭處燒香膜拜，焚燒金紙的結果，可能造成向天池積水成池後，池中鰓足類動物（包括湖沼枝額蟲、真湖蚌蟲和貓眼蚌蟲）承受水質污染的隱憂，影響存活率與生殖策略，甚至改變其種內遺傳多樣性（intra-specific genetic diversity），降低個體適應力（adaptation）與族群適存度（fitness），建議應有所規範。

### 二、中長期建議～學術價值與未來展望

陽明山向天池的湖沼枝額蟲、真湖蚌蟲和貓眼蚌蟲由於生活史很短，非常容易觀察，是研究胚胎發育、生長模式及生殖策略的良好教材。尤其，本研究首先建立向天池鰓足類動物的基因資料庫，並顯示向天池蚌蟲與日本若干蚌蟲具有接近的親緣地理關係。未來可進一步探討台灣鰓足類動物與亞洲、美洲或非洲各地



物種的親緣地理 (phylogeography)、基因交流 (gene flow) 和演化 (evolution)，  
在學術價值上極富潛力。





## 參考文獻

- Alonso, M. and H. Naganawa. 2008. A new fairy shrimp *Galaziella murae* (Branchiopoda: Anostraca) from Mongolia. *Journal of biological research - Thessaloniki* **10**:119-128.
- Babu, K. K. S. and S. B. Nandan. 2010. Two new clam shrimp species (Crustacea: Branchiopoda: Spinicaudata) from Kerala, India. *Zootaxa* **2713**:55-64.
- Belk, D. 1989. Identification of species in the conchostracan genus *Eulimnadia* by egg shell morphology. *Journal of crustacean biology* **9**:115-125.
- Martin, J. W. 1989. *Eulimnadia belki*, a new clam shrimp from Cozumel, Mexico (Conchostraca: Limnadiidae), with a review of Central and South American species of the genus *Eulimnadia*. *Journal of crustacean biology* **9**:104-114.
- Martin, J. W. and D. Belk. 1988. Review of the clam shrimp family Lynceidae Stebbing, 1902 (Branchiopoda: Conchostraca) in the Americas. *Journal of crustacean biology* **8**:451-482.
- Martin, J. W. and S. L. Boyce. 2004. Crustacea: non-cladoceran Branchiopoda. *Freshwater invertebrates of the Malaysian region*:284-297.
- Martin, J. W., S. L. Boyce, and M. J. Grygier. 2003. New records of *Cyclestheria hislopi* (baird, 1859) (Crustacea: Branchiopoda: Diplostraca: Cyclestherida) in southeast Asia. *The Raffles bulletin of zoology* **51**:215-218.
- Martin, J. W. and G. E. Davis. 2001. An updated classification of the recent crustacea. *Natural History Museum of Los Angeles County, Science series* **39**:1-124.
- Martin, J. W., B. E. Felgenhauer, and L. G. Abele. 1986. Redescription of the clam shrimp *Lynceus gracilicornis* (Packard) (Branchiopoda, Conchostraca, Lynceidae) from Florida, with notes on its biology. *Zoologica scripta* **15**:221-232.
- Mattox, N. T. 1957. A new Estheriid Conchostracan with a review of the other North American forms. *The American midland naturalist* **58**:367-377.
- Naganawa, H. 2001. Current classification of recent 'large branchiopods'. *Japanese journal of limnology* **62**:75-86 (in Japanese with English abstract, tables, and appendix).
- Naganawa, H. and T. I. Orgiljanova. 2001. Current prospect of the recent large branchiopodan fauna of East Asia: 2. Order Anostraca. *Aquabiology* **23**:186-194 (in Japanese and English).
- Olesen, J. 1998. A phylogenetic analysis of the Conchostraca and Cladocera (Crustacea, Branchiopoda, Diplostraca). *Zoological journal of the Linnean Society* **122**:491-536.

- Olesen, J. 1999. Larval and post-larval development of the branchiopod clam shrimp *Cyclestheria hislopi* (Baird, 1859) (Crustacea, Branchiopoda, Conchostraca, Spinicaudata). *Acta zoologica* (Stockholm, Sweden) **80**:163-184.
- Olesen, J. 2005. Larval development of *Lynceus brachyurus* (Crustacea, Branchiopoda, Laevicaudata): redescription of unusual crustacean nauplii, with special attention to the molt between last nauplius and first juvenile. *Journal of morphology* **264**:131-148.
- Olesen, J. and M. J. Grygier. 2003. Larval development of Japanese 'conchostracans': part 1, larval development of *Eulimnadia braueriana* (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata, Limnadiidae) compared to that of other limnadiids. *Acta zoologica* (Stockholm, Sweden) **84**:41-61.
- Olesen, J., J. W. Martin, and E. W. Roessler. 1996. External morphology of the male of *Cyclestheria hislopi* (Baird, 1859) (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata), with a comparison of male claspers among the Conchostraca and Cladocera and its bearing on phylogeny of the 'bivalved' Branchiopoda. *Zoologica scripta* **25**:291-316.
- Olesen, J., S. Richter, and G. Scholtz. 2001. The evolutionary transformation of phyllopodous to stenopodous limbs in the Branchiopoda (Crustacea) - Is there a common mechanism for early limb development in arthropods? *The International journal of developmental biology* **45**:869-876.
- Pereira, G. and J. V. García. 2001. A review of the clam shrimp family Limnadiidae (Branchiopoda, Conchostraca) from Venezuela, with the description of a new species. *Journal of crustacean biology* **21**:640-652.
- Rabet, N. 2010. Revision of the egg morphology of *Eulimnadia* (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata). *Zoosystema* **32**:373-391.
- Richter, S., J. Olesen, and W. C. Wheeler. 2007. Phylogeny of Branchiopoda (Crustacea) based on a combined analysis of morphological data and six molecular loci. *Cladistics* **23**:301-336.
- Richter, S. and B. V. Timms. 2005. A List of the recent clam shrimps (Crustacea: Laevicaudata, Spinicaudata, Cyclestherida) of Australia, including a description of a new species of *Eocycticus*. *Records of the Australian Museum* **57**:341-354.
- Roessler, E. W. 1995. Review of Colombian Conchostraca (Crustacea) - ecological aspects and life cycles - families Lynceidae, Limnadiidae, Leptestheriidae and Metalimnadiidae. *Hydrobiologia* **298**:125-132.
- Schwentner, M., B. V. Timms, R. Bastrop, and S. Richter. 2009. Phylogeny of Spinicaudata (Branchiopoda, Crustacea) based on three molecular markers-An Australian origin for *Limnadopsis*. *Molecular phylogenetics and evolution* **53**:716-725.
- Stenderup, J. T., J. Olesen, and H. Glenner. 2006. Molecular phylogeny of the Branchiopoda

- (Crustacea)—Multiple approaches suggest a 'diplostracan' ancestry of the Notostraca. *Molecular phylogenetics and evolution* **41**:182-194.
- Timms, B. V. 2009. A revision of the Australian endemic clam shrimp genus *Limnadopsis* Spencer & Hall (Crustacea: Branchiopoda: Spinicaudata: Limnadiidae). *Records of the Australian Museum* **61**:49-72.
- Timms, B. V. and C. McLay. 2005. A new species of *Eulimnadia* (Crustacea: Spinicaudata: Limnadiidae) from New Zealand. *Journal of the Royal Society of New Zealand* **35**:409-415.
- Vidrine, M. E., S. L. Sissom, and R. E. McLaughlin. 1987. *Eulimnadia texana* Packard (Conchostraca: Limnadiidae) in rice fields in southwestern Louisiana. *The Southwestern naturalist* **32**:1-4.
- 林曜松 and 周蓮香. 1991. 豐年蝦生態之調查研究. 內政部營建署陽明山國家公園管理處, 台北市.
- 周蓮香 and 黃祥麟. 2004. 陽明山國家公園湖沼枝額蟲 (*Branchinella kugenumaensis*, Ishikawa) 之生活史研究. 內政部營建署陽明山國家公園管理處, 台北市.
- 周蓮香, 黃婉萍, and 黃祥麟. 2006. 陽明山國家公園向天池蚌蟲之分類學鑑定及溫度對其生長速率的影響. 內政部營建署陽明山國家公園管理處, 台北市.
- 黃祥麟 and 周蓮香. 2005. 陽明山國家公園湖沼枝額蟲 (*Branchinella kugenumaensis*, Ishikawa) 族群生態研究. 內政部營建署陽明山國家公園管理處, 台北市.
- 李政璋 and 柯風溪. 2009. 小蘭嶼自然資源調查計畫. 國立海洋生物博物館, 屏東縣.



(附錄)



向天池積水期



向天池乾涸期







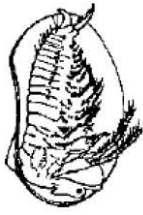
野外採集



人工培養





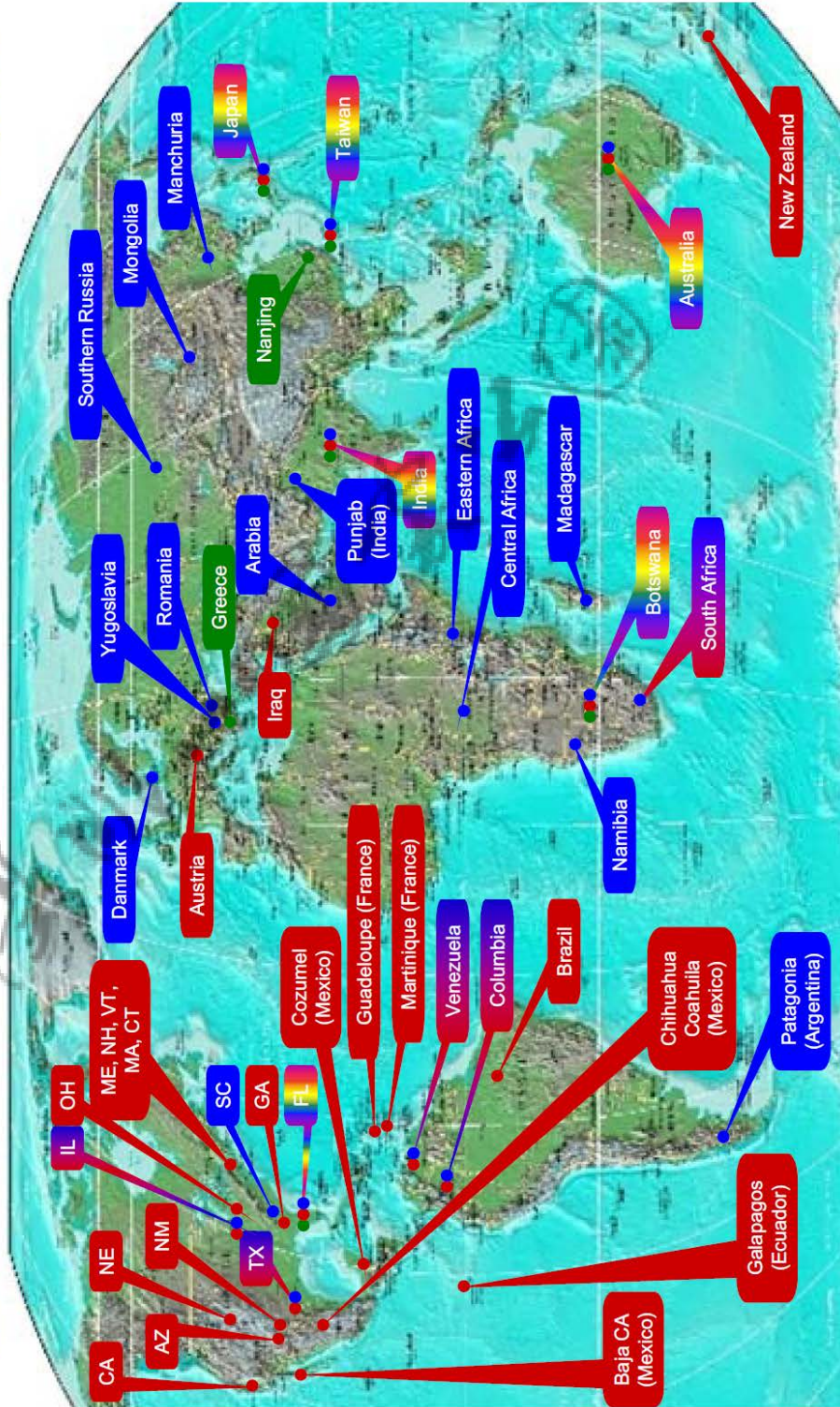


# Distribution



● *Eulimnadia* ● *Lynceus*

● *Branchinella*

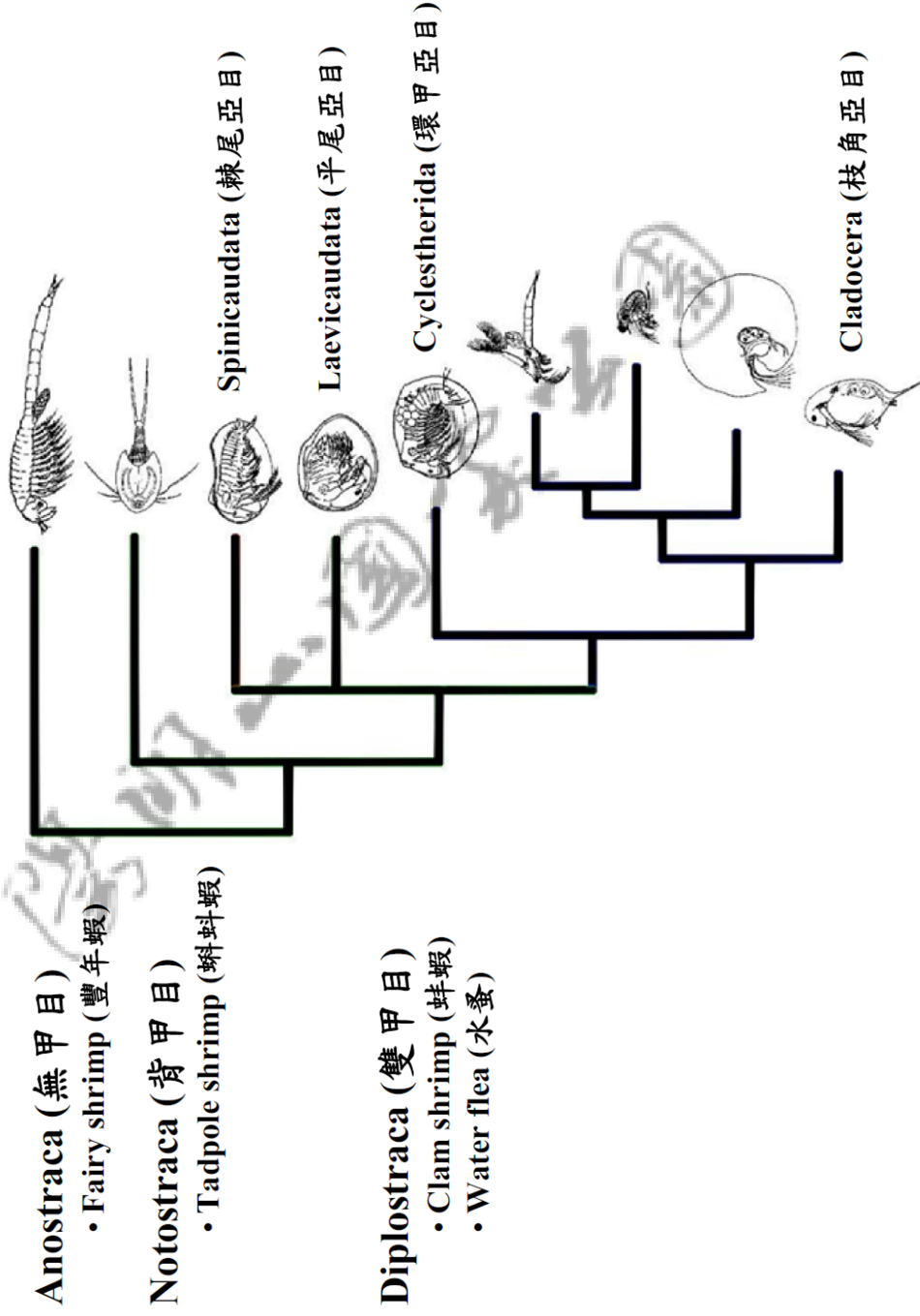


總足類動物在世界各地的分布與研究





# (Taylor et al. 1999) Branchiopoda (總足綱)



總足類動物的親緣關係





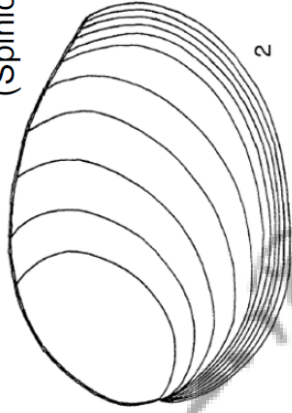
# Carapace

(Mattox 1957)

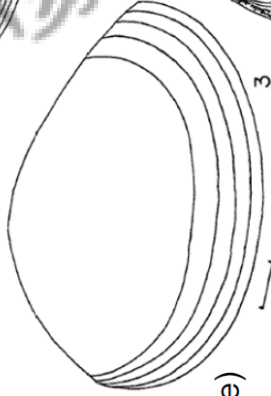
*Lynceus brachyurus*  
(Laevicauda, Lynceidae)



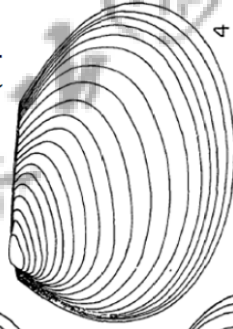
*Limnadia lenticularis*  
(Spinicaudata, Limnadiidae)



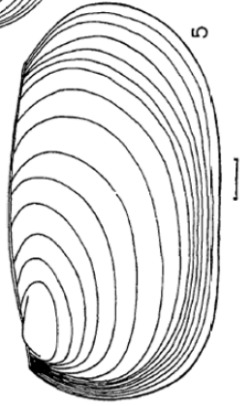
*Eulimnadia inflecta*  
(Spinicaudata, Limnadiidae)



*Caenestheriella setosa*  
(Spinicaudata, Limnadiidae)



*Leptestheria compleximanus*  
(Spinicaudata, Limnadiidae)

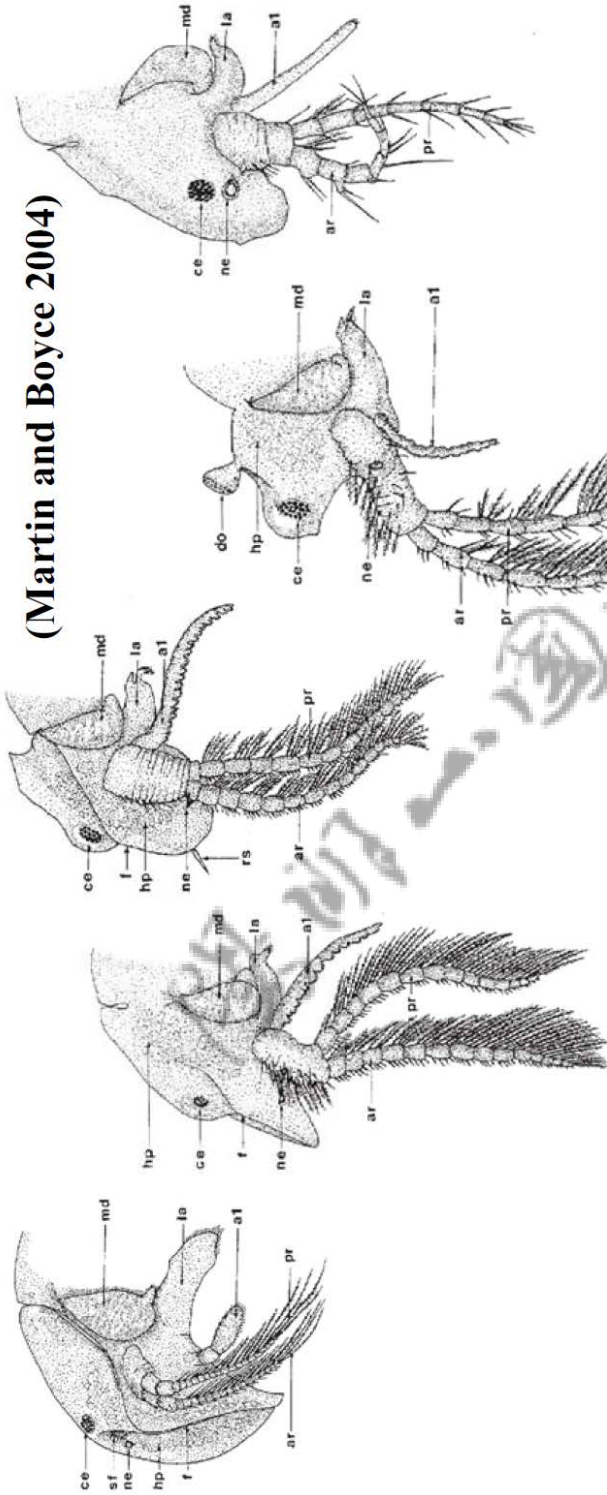


## 蚌蟲的頭胸甲特徵





(Martin and Boyce 2004)



- Order Diplostraca
  - Suborder Laevicaudata
    - Family Lynceidae — 3 genera, *Lynceus*, *Lynceiopsis*, *Paralimneta*
    - Suborder Spinicaudata
      - Family Cyzicidae — 4 genera, *Caenestheria*, *Caenestheriella*, *Cyzicus*, *Eocyzicus*
      - Leptestheriidae — 5 genera
      - Linnadiidae — 6 genera
  - Suborder Cyclestherida
    - Family Cyclestheriidae — 1 genus, *Cyclestheria*
  - Suborder Cladocera
    - (4 infraorders and 10 families, see Silva-Briano and Mirabdullayev 2004)

蚌蟲的頭部特徵

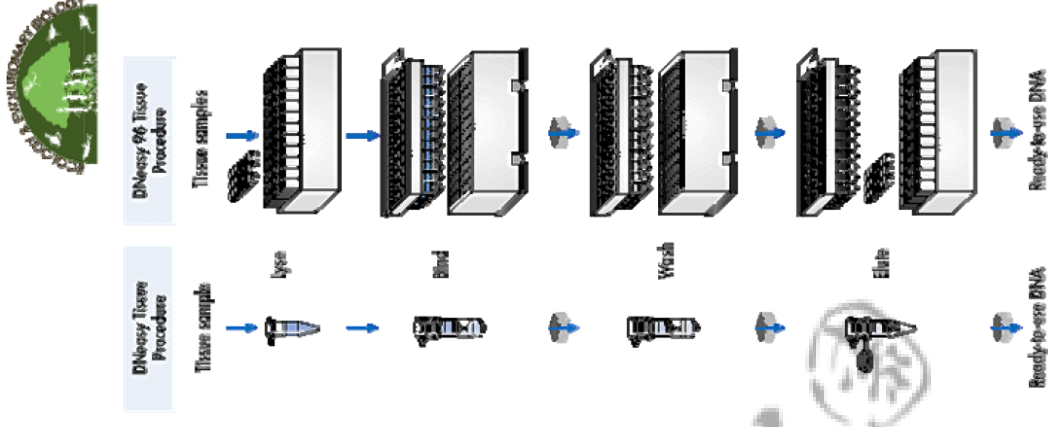


# Method

- DNA preparation
  - ◆ Violet BioScience Inc
  - Primer synthesis
    - ◆ (Richter et al. 2007)
      - Nuclear gene
        - > 18S rRNA
        - > 28S rRNA
        - > EF1 $\alpha$  (Elongation Factor)
      - Mitochondrial gene
        - > 12S rRNA
        - > 16S rRNA
        - > CO I (Cytochrome c Oxidase I)



紫外光  
科技有限公司



基龍米克斯  
生物科技有限公司

實驗流程





# Molecular markers

## ■ Primers (Richter et al. 2007)

18S rRNA	1F	5'-TAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AG-3'
	5R	5'-CTT GGC AAA TGC TTT CGC-3'
	3F	5'-GTT CGA TTC CGG AGA GGG A-3'
	Bi	5'-GAG TCT CGT TCG TTA TCG GA-3'
	A2.0	5'-ATG GTT GCA AAG CTG AAA C-3'
	9R	5'-GAT CCT TCC GCA GGT TCA CCT AC-3'
	rd1a	5'-CCC SCG TAA YTT AGG CAT AT-3'
28S rRNA	28Sb	5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC-3'
	rd4b	5'-CCT TGG TCC GTG TTT CAA GAC-3'
	28Sa	5'-GAC CCG TCT TGA AAC ACG GA-3'
	28Sbout	5'-CCC ACA GCG CCA GTT CTG CTT ACC-3'
	rd3a	5'-AGT ACG TGA AAC CGT TCA GG-3'
	rd4.8a	5'-ACC TAT TCT CAA ACT TTA AAT GG-3'
	rd7b1	5'-GAC TTC CCT TAC CTA CAT-3'
12S rRNA	12Sai	5'-AAA CTA GGA GTA GAT ACC CTA TTA T-3'
	12Sbi	5'-AAG AGC GAC GGG CGA TGT GT 5'
16S rRNA	16Sa	5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'
	16Sb	5'-CTC CGG TTT GAA CTC AGA TCA-3'
COI	LCO1490	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'
	HCOOUTOUT	5'-GTA AAT ATA TGR TGD GCT C-3'
EF1 $\alpha$	HaF2For1	5'-GGG YAA AGG WTC CTT CAA RTA TGC-3'
	2R53ST	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACG CGA ACT TGC AAG CAA TGT GAG C-3'

常用的 DNA 引子序列 (本研究中使用的三對粒線體 DNA 引子，即 12S rRNA、16S rRNA、COI)





# Branchiopods of Taiwan

- **Kinmen Island**
  - ◆ *Branchinella kugenumaensis*
  - ◆ *Eulimnadia braueriana*
- **Taipei**
  - ◆ *Branchinella kugenumaensis*
  - ◆ *Eulimnadia braueriana*
  - ◆ *Lynceus biformis*
- **Siaolanyu Island**
  - ◆ *Streptocephalus queenslandicus*
  - ◆ *Eulimnadia cf. magdalenensis*



台灣鯉足類動物的分布



書名：陽明山國家公園向天池總足類動物的  
粒線體DNA鑑定  
著者：黃婉萍、周蓮香  
出版機關：陽明山國家公園管理處  
地址：台北市士林區竹子湖路1-20 號  
電話：(02)2861-3601  
網址：<http://www.ymsnp.gov.tw>  
出版年月：中華民國一〇〇年十二月  
版次：初版  
工本費：新台幣100元整