

# 觀霧山椒魚溫度生理耐受性測量及族群遺傳多樣性分析

雪霸國家公園管理處委辦研究報告

中華民國 104 年 12 月

(本報告內容及建議，純屬研究小組意見，不代表本機關意見)

# 觀霧山椒魚溫度生理耐受性測量及族群遺傳多樣性分析

Thermal tolerance and population genetics of  
*Hynobius fuca*

受委託者：中國文化大學 生命科學系

中國文化大學 森林暨自然資源保育系

研究主持人：巫奇勳 助理教授

協同主持人：謝佳宏 助理教授

雪霸國家公園管理處委辦研究報告

中華民國 104 年 12 月

(本報告內容及建議，純屬研究小組意見，不代表本機關意見)

## 目次

目次.....	III
誌謝.....	IV
表次.....	V
圖次.....	VI
摘要.....	VII
第一章、緒論.....	9
第二章、材料與方法.....	13
第三章、結果與討論.....	23
第四章、結論與建議.....	47
第五章、參考文獻.....	51
附錄.....	56

## 誌謝

本研究的完成要感謝以下參與人員，特別是全程參與野外調查與室內實驗的梁桓瑄與陳汲緘，以及執行分生實驗的周家成。此外，也特別感謝以下人員參與野外調查，包括李昱、孫雅筠、劉俊良、羅丹怡、張揚德、李欣霖、陳勇全、劉品華以及石芳其。最後要非常感謝國立中興大學生命科學系的吳聲海教授，以及國立台灣師範大學生命科學系的賴俊祥博士分別慷慨提供觀霧與北橫的組織樣本做族群遺傳分析。

## 表次

表 3-1. 觀霧山椒魚捕獲記錄 .....	30
表 3-2. 在遮蔽物下所發現的其他陸域脊椎動物種類、數量(次)以及發現地點.....	33
表 3-3. 觀霧山椒魚( <i>Hynobius fuca</i> )粒線體 cyt-b 基因遺傳多樣性分析, 包括單倍基因型多樣性 (h)、核苷酸多樣性 ( $\pi$ )、Tajima's D 和 Fay and Wu's F 檢測 .....	42
表 3-4. 觀霧山椒魚( <i>Hynobius fuca</i> )族群間粒線體 cyt-b 基因遺傳分化指數 (Fixation index, FST) 與遺傳距離 (Genetic distance) .....	43
附錄 表 1. 溫度自動記錄器擺放地點與日期、所屬個體與遮蔽物類型與特徵.....	55

## 圖次

圖 2-1. 研究樣區 .....	13
圖 2-2. 在山椒魚發現處插入標牌並編號 .....	15
圖 2-3. 飼養山椒魚的動物生長箱 .....	16
圖 2-4. 飼養箱的布置 .....	16
圖 2-5. 野外埋設的溫度自動記錄器(翻開石頭時所看到的埋設現況) .....	17
圖 2-6. 溫度耐受度實驗裝置 .....	18
圖 2-7. 馴化兩周與馴化一個月的同批山椒魚(N=5)之間的溫度耐受度 ...	19
圖 3-1. 山椒魚下頷圖譜 .....	26
圖 3-2. 山椒魚的月數量變化 .....	27
圖 3-3. f1409 與 f1503 在大鹿林道西線同時間被發現的微棲地 .....	28
圖 3-4. 巨木群步道的山椒魚發現點 .....	29
圖 3-5. 各調查點遮蔽物底下所調查到的其他動物 .....	32
圖 3-6. 巨木群步道遮蔽物下「月平均最高溫」、「月均溫」與「月平均最低溫」變化.....	36
圖 3-7. 大鹿林道西線遮蔽物下「月平均最高溫」、「月均溫」與「月平均最低溫」變化.....	37
圖 3-8. 蜜月小徑遮蔽物下「月平均最高溫」、「月均溫」與「月平均最低溫」變化.....	38
圖 3-9. 四個樣區遮蔽物底下同時期(2015/10/10~2015/11/21)的均溫變化比較.....	38
圖 3-10. 不同溫度馴化後的山椒魚溫度耐受度表現.....	40
圖 3-11. 山椒魚粒線體 cyt-b 基因序列之親緣關係樹.....	44
圖 3-12. 觀霧山椒魚( <i>Hynobius fuca</i> )粒線體 cyt-b 基因最小關聯網狀圖 ...	45
圖 3-13. 觀霧山椒魚( <i>Hynobius fuca</i> )粒線體 cyt-b 基因以 Bayesian skyline plots 分析觀霧山椒魚過去族群大小的歷史變動.....	46

## 摘要

全球暖化潛在地影響物種的分布，對於熱帶及亞熱帶地區的物種衝擊更為嚴重，如生活在低緯度高海拔的山椒魚。由於溫度為影響兩棲類生理、生態與行為上最關鍵的環境因子之一，欲瞭解全球暖化對山椒魚的可能衝擊，釐清山椒魚的生理耐受及溫度馴化能力有其必要性。另外，透過遺傳資料可重建過去歷史中山椒魚族群的變動，並與過去歷史事件比對，用於推估氣候震盪對有效族群變動的影響。調查顯示巨木群步道(SB)所調查到的觀霧山椒魚數量最多，野外的溫度資料顯示該區的微棲地較能維持相對穩定的低溫，可能是吸引觀霧山椒魚利用的主要因素之一。觀霧山椒魚的高溫耐受度(Critical Temperature Maximum: CTMax)約 30°C，馴化在 20°C 的個體溫度耐受度(31.6°C)會顯著高於馴化在 15°C 的個體。從不同樣點觀霧山椒魚的暖化耐受度表現不同來看，顯示不同棲地個體未來面臨氣候暖化威脅不同，結果更凸顯維護山椒魚棲地的重要性。親緣關係樹分析，顯示觀霧山椒魚可區分為兩大支系，觀霧支系(GW)與北橫支系(NCIH)。兩支系間具明顯遺傳分化，而北橫支系相對於觀霧支系有較高的遺傳多樣性。觀霧支系內各族群間無顯著遺傳分化，可視為同一族群。親緣地理分析，指出觀霧山椒魚由低海拔往高海拔拓殖。有效族群變動分析，顯示冰河期時有族群擴張現象，間冰期時則呈現族群衰退現象。觀霧山椒魚適應低溫，目前觀霧與北橫可能為其避難所。預期全球暖化將會對觀霧山椒魚族群動態有負面衝擊。

**關鍵字:** 觀霧山椒魚、溫度耐受度、臨界高溫(CTMax)、暖化耐受度、馴化能力、族群遺傳、氣候暖化

## Abstract

Global warming potentially influences species distribution, especially for tropical and subtropical species, such as *Hynobius* salamanders living on high mountains at low latitudes. Temperature is one of the most important factor affecting physiology, ecology, and behavior of amphibians. Investigating thermal tolerance and acclimatory capacity of *Hynobius* salamanders is necessary if we want to predict the potential effects of global warming on them. Molecular sequences can be used to estimate the past population dynamics through time. According to the correlation between demographic history and geological events, we can inference the impact of climate oscillations on population dynamics. Results showed that there was a high abundance of *Hynobius fuca* in the SB site, where the microhabitats could maintain a stable low-temperature that is good for use by the salamander. The thermal tolerance (CTMax) of *H. fuca* was 30 C. The CTMax of salamanders acclimated at 20 C (31.6 C) was higher than that acclimated at 15 C. The populations of *H. fuca* in different sites expressed different warming tolerance, suggesting that the risk caused by climate change in different populations is different and the result shows maintaining suitable microhabitats is critical. Phylogenetic analysis revealed that *H. fuca* could be divided into two clades, the GW clade and the NCIH clade. High genetic differentiation was observed between the two clades. The genetic diversity of the NCIH population was higher than that of the GW population. Low genetic differentiation among populations of the GW clade indicated that they belong to the same population. Phylogeographic analysis revealed that *H. fuca* dispersed from low altitude to high altitude. Effective population dynamics analysis indicated the population expanded during latest glacial period but the population decayed during interglacial period. The GW and NCIH sites might be the refuges because *H. fuca* adapted to low temperature. We expect that climate warming will negatively impact the population dynamics of *H. fuca*.

**Keyword:** *Hynobius fuca*, thermal tolerance, critical temperature maximum (CTMax), warming tolerance, acclimation capacity, population genetics, and climate warming



# 第一章、緒論

## 一、研究緣起與目的

根據聯合國政府間氣候變遷小組(IPCC)的報告，預測 2016~2035 年間的全球平均氣溫將比 1850-1900 年上升 1~1.5°C (Kirtman et al. 2013)。全球暖化會影響物種的分布，甚至被預期會引起大規模滅絕(Sinervo et al. 2010)。要推論全球暖化對生物的可能影響，瞭解生物生理功能有關的機制很關鍵，特別是對環境會接近牠們最高溫度生理限制或遭遇生理壓力的物種而言(Duarte et al. 2011)。目前一些研究認為亞熱帶或熱帶物種會比溫帶物種面臨更大的暖化危機(Deutsch et al. 2008, Tewksbury et al. 2008)。

溫度是影響兩棲類生理、生態與行為上最關鍵的因子(Rome et al. 1992)。兩棲類可透過生理或行為上的機制去適應環境溫度的變動，其中調整溫度耐受度是重要的適應方式之一。一般我們習慣以動物在升溫狀況下失去正常反應的溫度，代表其可容忍的最高臨界溫度(Critical Temperature Maximum)，簡稱 CTMax，可用來評估溫度變化對動物可能造成的影響。近年，更有研究者應用暖化耐受度(warming tolerance)(WT)，即動物的 CTMax 與牠的環境最高溫的相差值，做為評估氣候暖化對兩棲類動物影響的指標；若 WT 值很大，表示特定物種在環境溫度不利或最終造成致命之前可以容忍潛在相當的升溫，反之，WT 值很小時，表示動物容易受溫度上升所影響(Duarte et al. 2011)。此外，由於兩棲類的溫度耐受度並不是固定的，是一種可塑特徵，會受許多環境條件所影響，特別是馴化溫度所影響(Noland and Ultsch 1981, Chen et al. 2001)。因此，透過將外溫動物馴養在不同溫度後，測其溫度耐受度變化，可得知溫度馴化能力(acclimatory capacity)(Stillman.2003)，可藉此評估動物在面對棲息地不斷增溫時，會如何進行生理上的調整。

欲評估氣候暖化對生物的影響，除了需要動物溫度生理資料，若能結合族群的遺傳資料，將有助於更深入的評估。利用 DNA 資料可以重建過去有效族群增長歷史，遺傳多樣性與有效族群量呈正比關係( $\theta=4N_e\mu$ )，藉由電腦模擬來重建族群遺傳多樣性變化歷史，可以推估過去有效族群變動狀態。探討族群變動歷史與地質事件的相關性，可得知冰河期與間冰期時族群變動狀態，藉此推估氣候震盪對有效族群增長的影響。因此，溫度生理指標研究可知目前觀霧山椒魚對溫度的耐受性，結合 DNA 資料所重建的有效族群變動歷史與地質事件相關性，將可客觀評估氣候暖化對觀霧山椒魚的影響，提供未來保育策略之擬定參考。

本研究將以高溫耐受度、暖化耐受度與溫度馴化能力去評估氣候變遷對觀霧山椒魚的影響。利用 DNA 遺傳多樣性資料，重建有效族群變動歷史狀態，結合地質事件資料，評估氣候震盪對觀霧山椒魚有效族群變動影響。

## 二、研究目標

1. 藉由測量觀霧山椒魚的高低溫耐受度、暖化耐受度與溫度馴化能力去評估氣候暖化對牠們族群的可能影響。
2. 瞭解觀霧山椒魚微棲地的溫度條件與時間變化。
3. 瞭解氣候震盪對觀霧山椒魚有效族群變動的影響
4. 提供生理生態的基礎研究資料，作為訂定觀霧山椒魚保育策略之參考。

## 三、前人研究

兩棲類是外溫動物，溫度是影響其生理、生態與行為的關鍵因子，在自然的環境下，這些動物必須面對日夜，甚至是季節性的溫度變動，因此

溫度調節機制對於兩棲類的生長與生存就顯得非常重要。一般說來，陸棲兩棲類面對溫度的變動，可直接透過行為選溫的方式調整(Rome et al. 1992)。然而，當環境無法提供動物進行選溫的條件時，就必須藉由調整溫度耐受度來提高生存機會(Licht and Brown 1967, Delson and Whitford 1973, Hutchison and Dupre 1992)。如生活在沙漠的虎紋鈍口螈成體(*Ambystoma tigrinum*)的幼體環境侷限在水中，因此必須以提高溫度耐受度的方式來適應高溫(Delson and Whitford 1973)。溫度耐受度與兩棲類的棲地與地理分布有關，以有尾類來說，Hutchison (1961)比較了 29 種蠵螈的溫度耐受度，結果發現不同物種的溫度耐受度與棲地以及物種本身的分布範圍有關。

兩棲類的溫度耐受度並不是固定的，它是一種可塑性的特徵，會受到包括體型(Keen and Schroeder 1975)、光週期(Floyd 1985)、繁殖時間(Cupp 1980)、繁殖棲地(Hutchison 1961, Noland and Ultsch 1981)、海拔高度(Manis and Claussen 1986)、地理分布(Cupp 1980, Manis and Claussen 1986)，以及馴化溫度(Keen and Schroeder 1975, Howard and Wallace 1983)等因素所影響。馴化溫度被認為是影響兩棲類溫度耐受度高低的直接因素，一般來說，高溫馴化下的動物溫度耐受度會表現比低溫馴化下的動物高(Keen and Schroeder 1975, Howard and Wallace 1983, Hutchison and Dupre 1992)。然而，不同種動物的溫度耐受度受溫度馴化影響所導致的變化幅度可能不同，即溫度馴化能力(acclimatory capacity)可能不同，因此這項能力也可以被用來評估氣候暖化對動物影響的一項指標(Stillman 2003, Calosi et al. 2008)。例如，高溫馴化能力低的物種被認為在未來受到氣候暖化的影響可能比較大(Stillman 2003, Calosi et al. 2008)，因為這代表牠們缺乏因應環境溫度變化的調整能力。

馴化溫度不只影響兩棲類的溫度耐受度，也會影響動物的溫度偏好。甚至高低溫馴化所產生的影響不同，例如，Stauffer et al.(1983)的研究顯示，高溫產生的馴化效應對共域蠵螈的溫度偏好影響較大，而低溫馴化對

蝾螈溫度偏好的影響較小。由於溫度會影響兩棲類直接的生存，也會影響其溫度馴化能力，因此，選擇具有理想溫度的微棲地對蝾螈很重要。除了溫度，食物分布與掠食者都會影響蝾螈的微棲地選擇，而這些影響蝾螈棲地選擇的因子會因日夜而不同(Holomuzki 1986)。微棲地的溫濕度條件可能會影響落葉層的無脊椎動物的數量而影響有尾類的分布，這些影響可能會影響整個生態體系(Walton 2013)。以無肺蝾螈(plethodontid salamander)為例，牠們被認為是影響北美東部森林群聚結構的重要物種，這樣的效應預期會影響到整個森林生態系(Walton 2013)。

生活在低緯度高海拔的山椒魚被認為是最適合用來評估氣候暖化對生態系影響的指標生物(呂與賴 2010)，其分布的環境特徵是低溫、高年雨量與高濕度，且靠近小而緩流的水體(Lee et al. 2006)。台灣是世界山椒魚科動物分布的最南界，因此，台灣的山椒魚是分布在世界緯度最低的區域，也暗示這些動物未來可能最早也最容易受到氣候暖化的衝擊。然而，長期以來關於台灣的山椒魚研究多著重在分類(Lai and Lue 2008)與染色體分析(Seto and Utsunomiya 1987)、生活史(Lue and Chuang 1992)、行為生態(YEH et al. 1988)、族群棲息地需求與地理分布調查(陳與呂 1986, 葉等 1994, 侯文與陳 2007, 賴與呂 2007, 呂與賴 2010, Lai and Lue 2013)，相當缺乏生理適應方面的相關研究資料。

## 第二章、材料與方法

### 一、研究地區

研究地點主要位於觀霧遊憩區及周邊地區，包括觀霧山椒魚試驗棲地及其周邊、大鹿林道東線及西線、巨木群步道、榛山步道等地區(圖 2-1)。執行前半年，主要以觀霧山椒魚試驗棲地、大鹿林道西線、巨木群步道為主要調查與監測地點。觀霧地區在氣候分類上屬於寒帶重濕氣候型(歐等 2014)。



圖2-1. 研究樣區。

### 二、研究方法

#### A. 族群調查方法與監測

自 2015 年 2 月開始進行調查。族群調查與監測方式將採固定範圍法 (area-constrained survey)，此法為國內山椒魚調查所建議採用(呂光洋 and 賴俊祥 2010, 2012)。監測頻度至少兩個月一次，這樣的調查頻度被認為可減少對動物的過度干擾(呂光洋 and 賴俊祥 2012)。調查時採多人進行。調查時，沿著樣區，徒手翻開石頭或倒木(並記錄翻閱數)，檢視是否有山椒魚，記錄調查開始與結束時間，並記錄當時的氣溫與天候。此外，在翻尋的過程中，若在遮蔽物底下有發現其他脊椎動物也會一併做記錄。翻到

山椒魚時，會在發現處旁插入標牌並編號(圖 2-2)，同時紀錄微棲息地的相關資料，包括遮蔽物類型(石頭或木頭)、遮蔽物大小(測量長寬高)以及記錄上面是否長有苔蘚或其他植物。會將捕獲的山椒魚進行體重測量，並將個體擺放至方格紙上拍照記錄；由於觀霧山椒魚的下頷斑紋可做為個體辨識(歐辰雄 et al. 2014)，因此也特別針對下頷進行拍照。頭長、頭寬、體長以及尾長的測量是使用 image J 軟體(<http://imagej.nih.gov/ij/>)進行照片上的測量。最後會將動物釋放回原地並將環境復原，釋放前會在個體的尾巴進行螢光標記(四碼)。

## B. 動物採集與微環境測量

不定期自各樣區採集山椒魚以做為之後的溫度耐受度測量使用。採集時會同時記錄當時的氣溫。動物採集後均置於塑膠罐內，並擺放沾濕的海綿或落葉，然後擺入內有冰磚的冰桶內，目的是為了維持運送過程中的低溫條件以及避免溫度有太大的波動。動物帶回實驗室後，會飼養在加蓋的塑膠箱內，並擺入有自然光周期(12 小時光亮與 12 小時黑暗)的動物生長箱內(圖 2-3)，飼養溫度維持在 15°C(為原棲地的平均氣溫，數據參考自歐等 2014)。飼養期間會提供水、充足的食物(以蚯蚓或馬陸為主)與石塊提供躲藏(圖 2-4)。所有採集飼養的動物最後都會帶回原發現環境釋放。

一旦發現山椒魚，會在其躲藏環境底下擺放溫度自動記錄器(HOBO data logger)(圖 2-5)，以記錄這些被山椒魚所利用環境的溫度時間變化，溫度計設定每 4 小時記錄一次。之後會從記錄中選取期間的最高溫，做為暖化耐受度推估。



圖 2-2. 在山椒魚發現處插入標牌並編號。



圖 2-3. 飼養山椒魚的動物生長箱。



圖 2-4. 飼養箱的布置。





圖 2-5. 野外埋設的溫度自動記錄器(翻開石頭時所看到的埋設現況)。

### C. 溫度耐受度與暖化耐受度測量

溫度耐受度是以 CTM (Critical Thermal Maximum or Critical Thermal Minimum)作為指標，所謂臨界溫度是指動物失去平衡、緊急逃開等正常反應時的臨界溫度值，這種判定方法被廣泛使用(Hutchison 1961, Wu and Kam 2005)，其測量方式對動物的傷害也最小。而暖化耐受度的計算是依據「室內實驗所測得的高溫耐受度」與「研究期間野外所測得環境最高溫」之差值

本實驗是以恆溫循環水槽作為升溫裝置，在水槽內放置一個玻璃缸，然後在玻璃缸內置入塑膠水族箱，水族箱底部擺放過濾綿(圖 2-6)，過濾棉可墊高山椒魚以利其頭部探出水面；加水後的水位為 2 cm，並以裝有氣泡石的幫浦進行打氣，這樣可使水溫上升較為均質，也可避免動物因高溫缺氧而造成實驗判斷上的誤差。透過測量山椒魚失去正常反應時的水溫來代表其溫度耐受度。本實驗裝置的水溫上升速率是平均每分鐘  $0.4^{\circ}\text{C}$ ，比過去研究有尾類溫度耐受度所採用的溫度上升速率慢( $0.5\sim 1^{\circ}\text{C}$ ) (Hutchison 1961, Howard and Wallace 1983)，水溫改變速率緩慢可以減少動物體溫與水溫間的延遲效應(Hoppe 1978, Howard and Wallace 1983)。

每回合實驗使用 1 隻山椒魚，實驗前一天不進行餵食，測量前，會先以電子天秤秤重(濕重)。實驗的起始或下降溫度設定為飼養的溫度，在升溫或降溫前，會讓動物在預設環境中先適應 30 分鐘，之後才開始加熱或降溫，待動物達到 CTMax 定義的反應時(蝌蚪失去平衡，以溫度探棒反覆刺激沒有產生緊急逃開的行為)，將動物迅速撈到起始的水溫中，若山椒魚沒有清醒過來則將結果捨去。

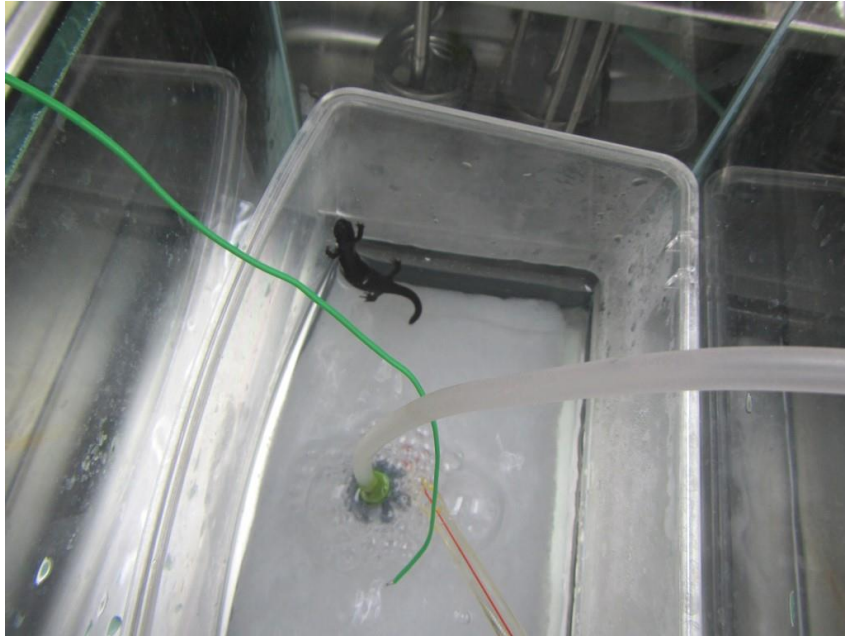


圖 2-6. 溫度耐受度實驗裝置。

#### D. 溫度馴化能力

將採集回來的山椒魚分成兩組，一組馴化 15°C，另一組馴化在 20°C。山椒魚轉至 20°C 馴化前，會以每兩天升溫 1°C 的方式，從 15°C 開始進行升溫，以避免升溫速度太快而對山椒魚產生壓力。為了瞭解兩周的溫度馴化時間是否足夠，前測實驗已先比較馴化在 15°C 兩周與馴化一個月的同批個體(N=5)之間的溫度耐受度(CTMax)，結果顯示之間沒有顯著差異(ANOVA,  $F_{1,8}=0.475$ ,  $P=0.51$ )(圖 2-7)。馴化至少兩周後，個別測量兩組動物的高溫耐受度，最後比較馴化溫度對高溫耐受度的影響。溫度馴化率(每提高 1°C 的馴化溫度對 CTMax 產生的影響)的計算公式是：

$$(CTM_{20^{\circ}C} - CTM_{15^{\circ}C}) / (20 - 15) \times 100\%$$

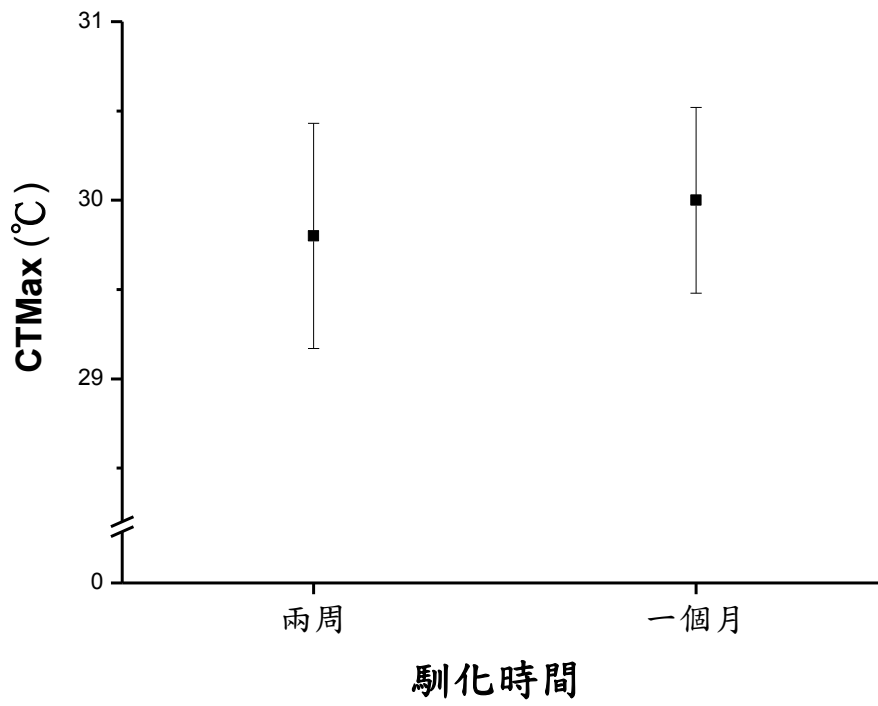


圖 2-7. 馴化兩周與馴化一個月的同批山椒魚(N=5)之間的溫度耐受度。

## E. 族群遺傳資料分析

### 1. DNA 粹取

做完溫度耐受實驗後的山椒魚個體，會先以 MS-222 (0.5 g/L) 進行麻醉 (Green 2001)，從尾部剪取 0.2~0.5 公分的組織，進行 DNA 粹取。本研究使用 ALS 組織 DNA 萃取試劑套組 (ALS Tissue Genomic DNA Extraction Kit, Kaohsiung, Taiwan) 萃取 DNA。根據操作手冊步驟完成 DNA 粹取，保存於 -20°C 冷凍櫃待用。

### 2. 粒線體基因增幅與定序

根據 MVZ-15L/MVZ16H 引子組，利用鏈聚合酶反應器增幅粒線體 *cyt-b* 基因序列 (Moritz et al., 1992)。PCR 之反應條件為：(1) 預熱 (prewarming) 94°C 3 分鐘；(2) 變性 (denaturing) 94°C 30 秒；(3) 黏合 (annealing) 48°C 1 分鐘；(4) 延伸 (extension) 72°C 1 分鐘；(5) 重複步驟 (2) 至 (4) 共 40 個循環；(6) 最終延長 (final extension) 72°C 10 分鐘，使反應更完全。PCR 產物以含 SYBR Green I stain (Bio Basic, Ontario, Canada) 之 TAE 緩衝溶液用 1% 之瓊脂電泳膠片進行電泳分析，於 UV 光下觀察、拍照並觀察其擴增片段。PCR 產物送至生技公司，利用 ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) 定序儀來獲得 DNA 序列。全部序列利用 Clustal X 2.0 (Larkin et al., 2007) 軟體進行序列排序。

### 3. 親緣關係樹之建立

分子親緣關係樹利用四種不同方法來重建：距離方法方面，以 Kimura 2 parameter 為運算模式來計算所有序列對的成對性演化距離並以鄰域加入法 (Neighbor-joining) 來重建親緣關係樹。不連續特徵法方面，最大儉約法 (Maximum Parsimony) 假設生物進化以最小數目改變為前提，將序列的每個點 (site) 視為不同的特徵 (character)，利用個分類單元享有的共衍徵推演共祖的關係，透過儉約性原理選出特徵改變次數

最少的為最佳的樹。最大似然性法 (Maximum Likelihood) 以適合之核苷酸替換模式，做出所有可能的親緣關係樹並給於統計值，評估並選出似然性最高的親緣關係樹。以上使用利用MEGA6軟體來製作(Tamura et al., 2013)，並利用bootstrap來檢測樹型支持程度。本研究亦利用貝葉氏導出式 (Bayesian inference) 來重建親緣關係樹。MrBayes version 3.1.2 程式 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) 用來重建親緣關係樹，隨機選取的樹為起始樹，Markov Chain Monte Carlo (MCMC)總共運算  $1 \times 10^6$  generations，而每 100 generations 取樣一次，並刪除前面不穩定的 10% generations，重建之親緣關係樹以 50% majority-rule consensus trees 來表示，而分支節點值為後檢驗概率值表支持程度。

#### 4. 親緣地理分析

最小關聯網狀圖 (Minimum spanning network)，計算各單倍基因型之間核苷酸的最大改變量，將具有單一改變量的單倍基因型彼此連接，形成一個網狀圖 (Templeton et al., 1993)。此網狀圖與親緣關係樹比較，可以推測物種演化過程、可能散播途徑與地理分布的關係。利用Hapview軟體來製作單倍基因型網狀圖 (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>)。

#### 5. 族群遺傳分析

單倍型多樣性 (haplotype diversity,  $h$ )、核苷酸多樣性 (nucleotide diversity,  $\pi$ )、Tajima's  $D$  和 Fay and Wu's  $F$ 利用 DnaSP version 5.10.1(Librado and Rozas, 2009)軟體來計算。族群分化指數 (Fixation index,  $F_{ST}$ )估算族群間之遺傳分化程度，計算族群內與族群間之平均核苷酸差異，以求得族群間遺傳差異程度。族群間遺傳距離以Kimura's two-parameter model來估算，利用MEGA6軟體來計算(Tamura et al., 2004)。族群變動歷史分析，藉著分析有效族群大小隨過去時間的變動，推測過去族群變動歷史與地質事件的相關性，分析氣候變遷對有效族群量的影響。本分析以 Bayesian skyline plots來進行分析，分子鐘選擇Lognormal relaxed clock

model，粒線體基因突變率參考蠓蠟使用0.64% per million years (My) per lineage (Weisrock et al., 2001)，MCMC運算總共運算  $1 \times 10^8$  generations，而每 1000 generations 取樣一次，並刪除前面不穩定的 10% generations，使用BEAST version 1.80軟體運算 (Drummond et al. 2012)，有效族群數量 (effective sample size)利用TRACER ver. 1.4 軟體來估算。

### 第三章、結果與討論

#### 一、山椒魚普查和固定樣區調查

本年度調查總共翻閱 11226 個遮蔽物(石頭與木頭)，共調查到 27 隻次觀霧山椒魚(表 3-1)，並且建立下頷斑紋圖譜(圖 3-1)；其中四隻為再捕獲個體，有兩隻為前人捕捉過的個體(編號分別是 f1409 與 f1307)(歐等 2014)，而另外兩隻 (f1515 與 f1516)為今年度重複被捕捉。因此，本年度調查到的新個體為 23 隻。

從地點分布來看，只在巨木群步道、大鹿林道西線與蜜月小徑等三個樣區有發現觀霧山椒魚，而山椒魚試驗地、大鹿林道東線與榛山步道均沒有記錄。從數量分布來看，以巨木群步道所調查到的數量最多(20 隻次，17 隻新個體)，大鹿林道西線次之(6 隻次，5 隻新個體)，蜜月小徑最少(1 隻次，為新個體)。巨木群步道為本區最穩定能發現山椒魚的地區，與先前的調查結果(呂與賴 2010, 歐等 2014)相符。以月份來看，四月份調查到的數量最多，八月最少，調查到的數量似乎有隨夏季來臨而有減少的趨勢，八月過後數量又開始增加(圖 3-2)。山椒魚數量從六月開始下降的情況，與呂與賴(2010)在北插地區以及毛(2009)在棲蘭山調查的情況相符。雖然歐等(2014)指出山椒魚的捕獲沒有明顯的季節性，然而，從他們過去三年(2012-2014 年)的調查結果來看，除 2014 年外，都有顯示調查數量從六月開始下降的趨勢。本年度調查期間有蘇迪勒颱風(2015 年 8 月 8 日)侵襲，但對於研究樣區並沒有產生顯著的破壞。

大多數被發現的山椒魚都躲藏在石塊下( $26/27 = 96.3\%$ )，僅有 1 隻是在倒木下發現，這與先前的研究結果相符(毛 2009；呂與賴 2010；歐等 2014)；其中有超過一半( $16/27 = 59.3\%$ )的遮蔽物上面有苔蘚附著。這些遮蔽物上頭適合生長這些植物，通常也反映這些環境濕度與位置穩定性較高(呂與賴 2010)。若與台灣其他種山椒魚的遮蔽物利用偏好比較，如阿

里山山椒魚(*Hynobius arisanensis*)，顯示觀霧山椒魚較偏好使用石頭，而阿里山山椒魚較偏好木頭不同(呂與賴 2010)。

捕捉到的最大的個體吻肛長為 61.5 mm (體重 5.42 g)，最小的個體吻肛長 16.4 mm (體重 0.13 g)。個體的平均吻肛長為  $50.2 \pm 9.9$  mm (N=24)，平均體重為  $3.3 \pm 1.5$  g (N=24)，與歐等(2014)累積三年的資料相近(吻肛長： $52.0 \pm 10.8$  mm；體重： $3.4 \pm 1.6$  g)。若比較北部分布棲蘭山族群(N=39)，則顯示彼此的吻肛長( $52.3 \pm 5.5$  mm)接近，但棲蘭山族群的體重( $3.8 \pm 1.0$  g)略重。若以 30 mm (呂與賴 2010)做為成體判定標準，大多數(96%)調查到的個體是成體，僅一隻是亞成體，成體捕獲機率較高的情況與歐等(2014)研究相符。此外，有三隻個體出現斷趾或曾斷掌重生的情況(表 3-1)，經比對歐等(2014)過去所標記的個體特徵，加上個體並沒有發現螢光標記，因此認定為新個體，然而，並不清楚斷趾的原因。

本年度發現兩隻前人(歐等 2014)所標記的個體(f1307 與 f1409)。f1307(第一次被捕捉時間是 2013 年 2 月 28 日)，歷經約兩年八個月再被捕捉，其吻肛長反而較過去(60.12 mm)短，且體重也較過去(3.85g)輕，由於本研究是以拍照後進行照片量測的方法量測體長，與前人直接量測不同，因此造成此差異的原因可能與量測方法不同有關。f1409(第一次被捕捉時間是 2014 年 4 月 23 日)，歷經約九個月再被捕捉，其吻肛長(38.6 mm)較過去(35.3 mm)長，而體重(1.3g)較過去(1.14g)略重(歐等 2014; 本研究的表 3-1)。這兩隻個體的辨識是依據歐等(2014)的下頷花紋圖譜與螢光色標資料來判定，這顯示下頷花紋是可靠的個體辨識特徵，且螢光色標可保留在觀霧山椒魚身上的時間(f1307, 約 970 天)比之前所記錄的時間(534 天, 歐等 2014)更長。

本年度的調查也顯示觀霧山椒魚對棲地可能有高依戀性或偏好，佐證包括：1. 本年度所發現的 f1307 與 f1409 個體，距離前次發現，至少已達八個月，但均在原先所記錄的樣區一帶(分別是巨木群步道與大鹿林道西線)被發現。2. 本年度七月所發現的個體，在八月調查時(已相隔 45



天)，又在同個遮蔽物(f1516)或鄰近的遮蔽物下被發現(f1515)。3. 不同個體有相似的遮蔽物偏好，如同個遮蔽物下同時發現兩隻山椒魚(f1515 與 f1516，2015/8/14)(圖 3-3)，或同時在緊鄰的遮蔽物下發現山椒魚(圖 3-4)。觀霧地區觀霧山椒魚對於棲地的依戀性現象，也在棲蘭山的族群被觀察到(毛 2009)。

				
f1501	f1502	f1503	f1504	f1505
				
f1506	f1507	f1508	f1509	f1510
				
f1511	f1512	f1513	f1514	f1515
				
f1516	f1517	f1518	f1519	f1307
				
f1520	f1521	f1522	f1523	

圖 3-1. 山椒魚下頷圖譜 (照片主要是梁桓瑄拍攝)

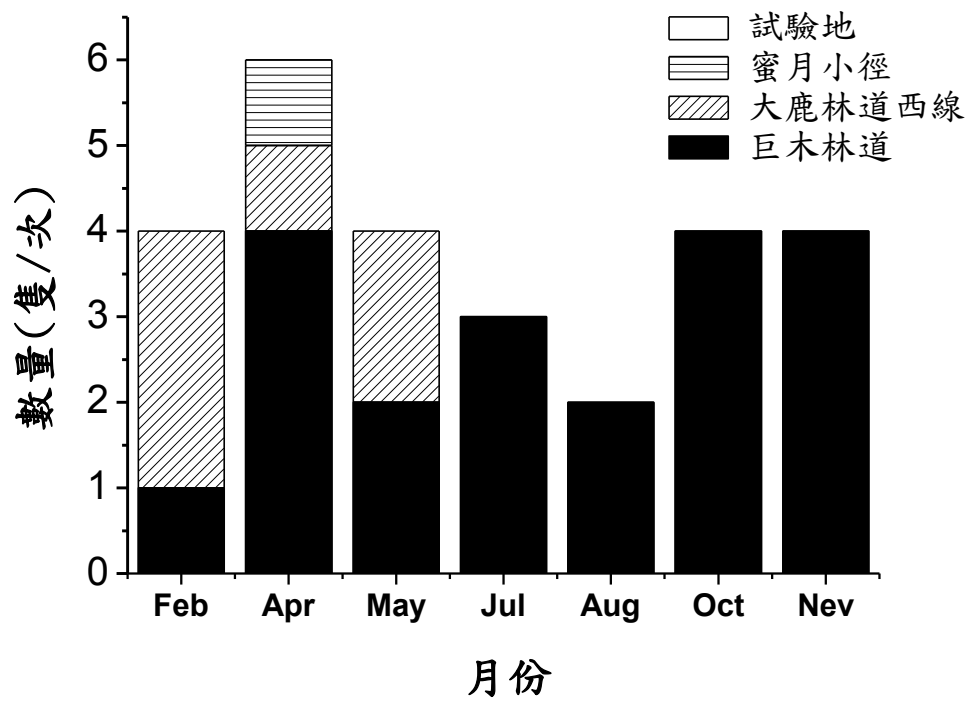


圖 3-2. 山椒魚的月數量變化。



圖 3-3. f1409 與 f1503 在大鹿林道西線同時被發現的微棲地，個體分別在相鄰的石頭下被發現。



圖 3-4. 巨木群步道的山椒魚發現點。箭頭 1 為發現 f1516 的點，而箭頭 2 為發現 f1515 的點。f1516 與 f1515 後來同時在 f1516(箭頭 1)的原發現點被記錄(2015/8/14)。

表 3-1. 觀霧山椒魚捕獲記錄。

個體編號	螢光色標 編號*	日期	體重 (g)	肋溝數	四肢趾 式	吻肛長 (mm)	頭長 (mm)	頭寬 (mm)	尾長 (mm)	備註
f1409	OOGO	2015.02.13	1.30	12	4-4-4-4	38.6		7.1	16.13	重覆捕捉個體
f1501		2015.02.13		12	4-4-4-4					沒有捕捉
f1502	BBBB	2015.02.13	3.12	12	4-4-4-4	54.6	12.5	9.3	28.2	
f1503		2015.02.14	1.28	13	4-4-4-4	37.0	8.3	6.9	19.4	
f1504	PPGP	2015.04.03	3.07	13	4-4-4-4	53.9	12.6	9.0	24.1	
f1505		2015.04.03	4.50	12	4-4-4-4	58.1	13.3	10.0	26.9	
f1506	PPGG	2015.04.03	2.87	12	4-4-4-4	49.0	10.6	8.5	26.0	
f1507		2015.04.03	2.77	13	4-4-4-4	50.5	10.7	8.3	25.0	
f1508		2015.04.03	5.42	12	4-4-4-4	61.5	14.4	10.1	33.2	
f1509	PGPP	2015.04.03	3.37	12	4-4-4-4	56.6	13.5	9.4	23.1	
f1510	PGGP	2015.05.02	6.48	12	4-4-4-4	56.2	15.3	10.1	36.2	
f1511	GPPP	2015.05.02	5.63	12	4-4-4-4	58.5	15.0	10.0	35.0	
f1512	GPPG	2015.05.02	5.42	12	4-4-4-4	56.4	15.1	10.3	31.1	
f1513	GPGP	2015.05.02	1.52	11	4-4-4-4	37.6	10.1	7.3	22.0	
f1514		2015.06.30	0.13		4-4-4-4	16.4	4.7	4.0	10.5	亞成體太小，不打色標
f1515	GPGG	2015.06.30	3.39	11	4-2-3-4	49.9	12.7	8.4	31.7	不明原因斷趾
f1516	GGPP	2015.07.01	4.10	12	4-3-4-4	51.3	12.6	9.1	32.3	不明原因斷趾

<b>f1517</b>	GGPG	2015.10.10	3.26	12	4-x-4-4	56.0	14.1	10.1	33.7	疑似斷掌重生
<b>f1518</b>	GGGP	2015.10.10	1.89	12	4-4-4-4	45.1	11.4	7.9	26.2	
<b>f1519</b>	OOOG	2015.10.10	3.39	12	4-4-4-4	53.2	12.9	9.0	31.1	
<b>f1307</b>	OPPO	2015.10.10	2.86	12	4-4-4-4	57.4	13.3	9.2	31.2	重覆捕捉個體
<b>f1520</b>	OOGO	2015.11.21	3.87	12	4-4-4-4	57.4	16.0	9.7	31.1	
<b>f1521</b>	OOGG	2015.11.21	3.78	12	4-4-4-4	51.1	14.2	9.1	30.2	
<b>f1522</b>	O	2015.11.21	1.4	11	4-4-4-4	40.3	10.0	6.9	24.8	個體小，色標只打一種顏色
<b>f1523</b>	OGOO	2015.11.21	4.97	12	4-4-4-4	57.3	13.9	9.7	32.6	

\*螢光色標代號: 藍色(B)、綠色(G)、橘色(O)、粉紅色(P)

調查過程中，在遮蔽物底下所發現的其他脊椎動物，包括兩棲類 2 科 3 種，以盤古蟾蜍數量最多(47 隻次)，其次是梭德氏赤蛙(41 隻次)，斯文豪氏赤蛙只有 1 隻次；爬行動物 4 科 5 種，以台灣蜓蜥數量最多(表 3-2)。紀錄到的爬行動物在先前觀霧地區的研究調查中都有發現(歐等 2014)。以地點分布來看(圖 3-5)，大鹿西線記錄到的脊椎動物最多種(5 種)且數量也最多，其次是蜜月小徑(3 種)。在生態上，這些物種記錄可能代表是山椒魚空間利用上的競爭者或潛在掠食者。例如，會以山椒魚為食的史氏斜鱗蛇(李與呂 1996)就可能是觀霧山椒魚的潛在掠食者(毛 2009)。史氏斜鱗蛇只在蜜月小徑有翻閱到。在無脊椎動物方面，我們主要針對淡水蟹與蟻窩做記錄。淡水蟹主要出沒在巨木群步道與大鹿林道西線，且以巨木群步道所記錄到的數量最多(表 3-2)；蟻窩在五個樣區都有分布，其中以大鹿林道西線所記錄到的數量(以遮蔽物為單位)最多，只有巨木群步道沒有發現(表 3-2)。

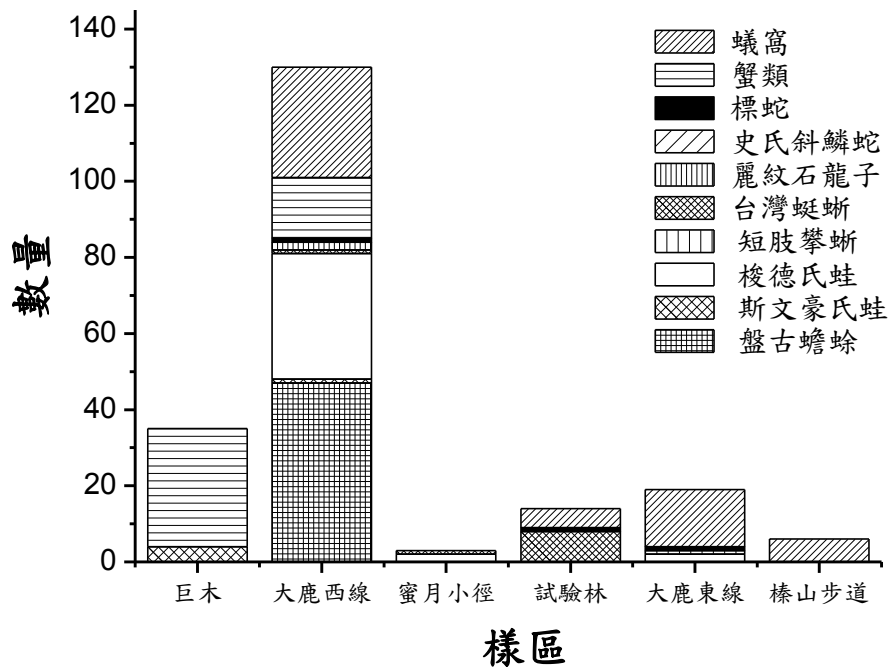


圖 3-5. 各調查點遮蔽物底下所調查到的其他動物



表 3-2. 在遮蔽物下所發現的其他陸域脊椎動物種類、數量(次)以及發現地點。

	試驗池	巨木群步道	蜜月小徑	大鹿西線	大鹿東線	榛山步道	總計
<b>脊椎動物</b>							
<b>蟾蜍科(Bufo)</b>							
盤古蟾蜍( <i>Bufo bankorensis</i> )				47			47
<b>赤蛙科(Rana)</b>							
斯文豪氏赤蛙( <i>Odorrana swinhoana</i> )				1			1
梭德氏赤蛙( <i>Rana sauteri</i> )	4	2		33	2		41
<b>飛蜥科</b>							
短肢攀蜥					1		1
<b>石龍子科(Scincidae)</b>							
台灣蜓蜥( <i>Sphenomorphus taiwanensis</i> )	8		1	1			10
麗紋石龍子				2			2
<b>黃領蛇科(Colubridae)</b>							
史丹吉氏斜鱗蛇( <i>Pseudoxenodon stejnegeri stejnegeri</i> )			1				1
<b>閃皮蛇科(Xenodermatidae)</b>							
標蛇( <i>Achalinus niger</i> )	1			1	1		3
<b>其他</b>							
蟹類		31		16			47
蟻窩	5			29	15	6	55

## 二、山椒魚微棲地的溫度監測

從四月開始至今，總共擺放 13 個溫度自動記錄器於各樣區下的遮蔽物，其中 6 個擺放在調查數量最多的巨木群步道地區，其次是大鹿西線(4 個)，蜜月小徑擺放 1 個；試驗棲地樣區雖然沒有發現山椒魚，但為了比較此樣區與其他樣區的溫度變化差異，我們 10 月份在此區隨機找了 2 個遮蔽物擺放溫度記錄器(附錄，表 1)。結果顯示巨木群步道、大鹿西線與蜜月小徑三個地區的山椒魚遮蔽物底下溫度顯示日夜與季節性波動，整體而言，最低溫出現在四月，最高溫出現在六月(圖 3-6、3-7 與 3-8)。巨木群步道遮蔽物底下的四月均溫為  $11.20 \pm 0.14^{\circ}\text{C}$  (N=4)，六月均溫為  $15.92 \pm 0.40^{\circ}\text{C}$  (N=5)；大鹿林道西線遮蔽物下的四月均溫為  $12.70 \pm 1.06^{\circ}\text{C}$  (N=3)，六月均溫為  $17.63 \pm 1.68^{\circ}\text{C}$  (N=4)；蜜月小徑遮蔽物下只擺放一個溫度計，四月均溫為  $12.5^{\circ}\text{C}$ ，六月均溫為  $16.6^{\circ}\text{C}$ 。巨木群步道遮蔽物下記錄到的最低溫為  $3.6^{\circ}\text{C}$ ，最高溫為  $19^{\circ}\text{C}$ ；大鹿林道西線遮蔽物下記錄到的最低溫為  $6.4^{\circ}\text{C}$ ，最高溫為  $27.3^{\circ}\text{C}$ ；蜜月小徑遮蔽物下記錄到的最低溫為  $7^{\circ}\text{C}$ ，最高溫為  $17.6^{\circ}\text{C}$  (2015/10/10—2015/11/20)。巨木群步道的遮蔽物下的月高低溫差通常介於  $1 \sim 2^{\circ}\text{C}$  (N=5) (圖 3-6)。介於巨木群林道與大鹿林道西線的蜜月小徑，月高低溫差約  $1.27^{\circ}\text{C}$  (N=1) (圖 3-8)。大鹿林道西線遮蔽物下的月高低溫差變化較大，屬於靠近路邊的遮蔽物(f1409 與 f1509)下的高低溫差至少達到  $3^{\circ}\text{C}$ ，甚至可高達  $7.6^{\circ}\text{C}$  (f1409 的擺放點) (圖 3-7)；大鹿林道西線唯一溫差比較低的遮蔽物是木頭遮蔽物(f1502)，是位在森林底層，記錄期間的月高低溫差最高不超過  $1^{\circ}\text{C}$  (圖 3-7)。

觀霧山椒魚通常棲息在鬱閉度高(73%)的森林底層(毛 2009)，這樣的環境可能較有利於維持環境的濕度、相對低溫與溫度變化幅度。以山椒魚記錄較多的兩個樣點做比較，整體而言，巨木群步道遮蔽物下的溫度或高低溫差都低於大鹿林道西線所測得的資料(除了 f1502 的點)。山椒魚偏好分布在低溫的氣候條件(Lee et al. 2006)。巨木群步道有較完整的林相遮蔽，所以微棲地可能較能維持潮濕(此區遮蔽物有相對較多的淡水蟹利用，也顯示此區棲地能維持較佳的濕度，參考圖 3-5 與表 3-2)且穩定低溫的環境條件，這可能解釋為什麼巨木群步道一直都是本區最穩定能發現山椒魚的地區(呂與賴 2010, 歐等 2014)的因素之一。此外，微棲地的溫度與其變化幅度可能與不同地點

山椒魚的月分布變化有關。在四、五月月均溫較低時，大鹿林道西線均可發現山椒魚，然而，到六月時，此區的微棲地均溫高於巨木群步道的月均溫約 2°C，微棲地最高溫甚至高於 20°C，最高甚至達 27.3°C，此區六月開始就沒有發現山椒魚(圖 3-2)，可能與此區微棲地無法維持相對低溫以及溫差較大有關。林(2010)指出觀霧地區屬於西向坡的巨木群林道的山椒魚棲息地，較東向坡的山椒魚試驗地來得為潮濕和低溫。進一步我們比較同時期各樣點的均溫變化，可明顯發現巨木林道所有擺放溫度計的地點與大鹿林道西線位於森林底層的地點(f1502)，相較於其他樣點，都維持較低溫且溫度變化幅度小(圖 3-9)；而今年度較少發現山椒魚(蜜月小徑)以及沒有發現山椒魚的地點(試驗棲地)，其遮蔽物下的均溫都偏高於其他地點(圖 3-9)，這更進一步說明棲地是否能維持相對且穩定的低溫對山椒魚的棲地利用很重要。

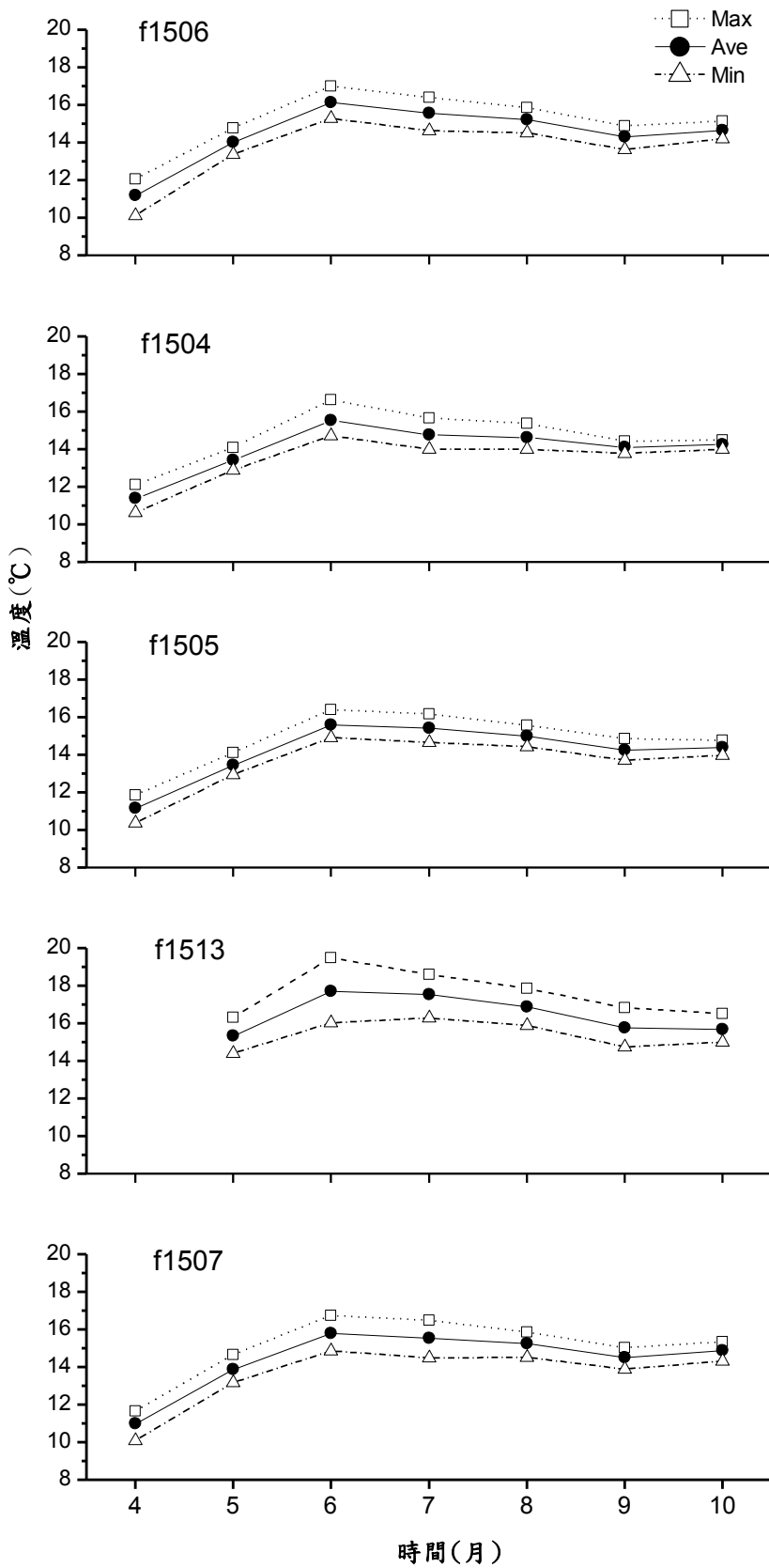


圖 3-6. 巨木群步道遮蔽物下「月平均最高溫」、「月均溫」與「月平均最低溫」變化。圖上的編號(f1504, 1505, f1506, f1507 與 f1513)為遮蔽物所屬的山椒魚編號。

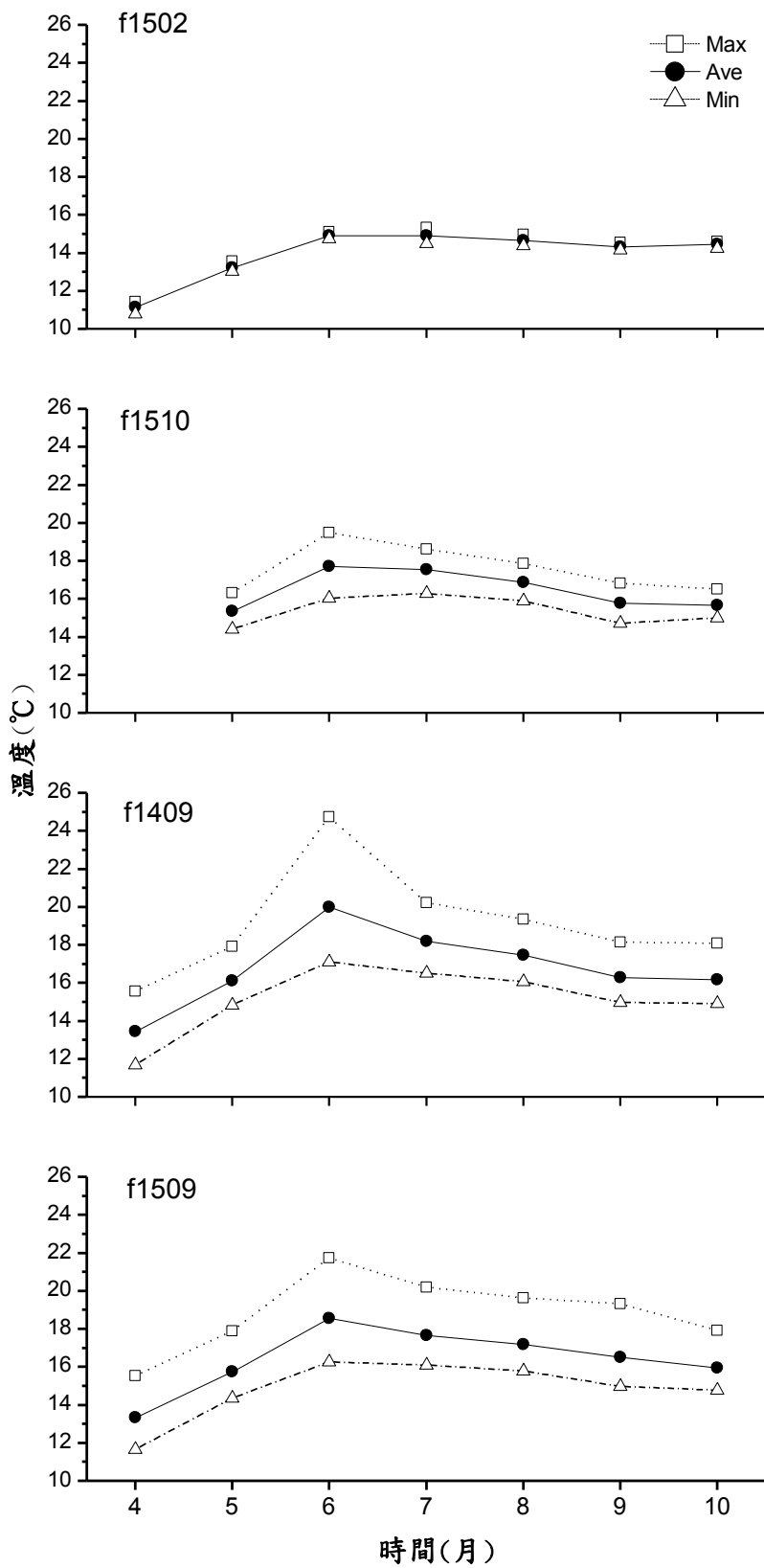


圖 3-7. 大鹿林道西線遮蔽物下「月平均最高溫」、「月均溫」與「月平均最低溫」變化。圖上的編號(f1409, 1502, f1509 與 f1510)為遮蔽物所屬的山椒魚編號。

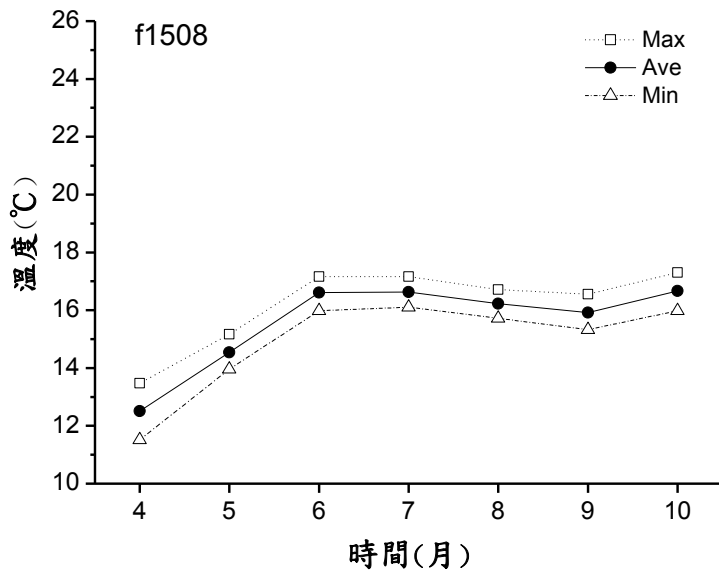


圖 3-8. 蜜月小徑遮蔽物下「月平均最高溫」、「月均溫」與「月平均最低溫」變化。圖上的編號(f1508)為遮蔽物所屬的山椒魚編號。

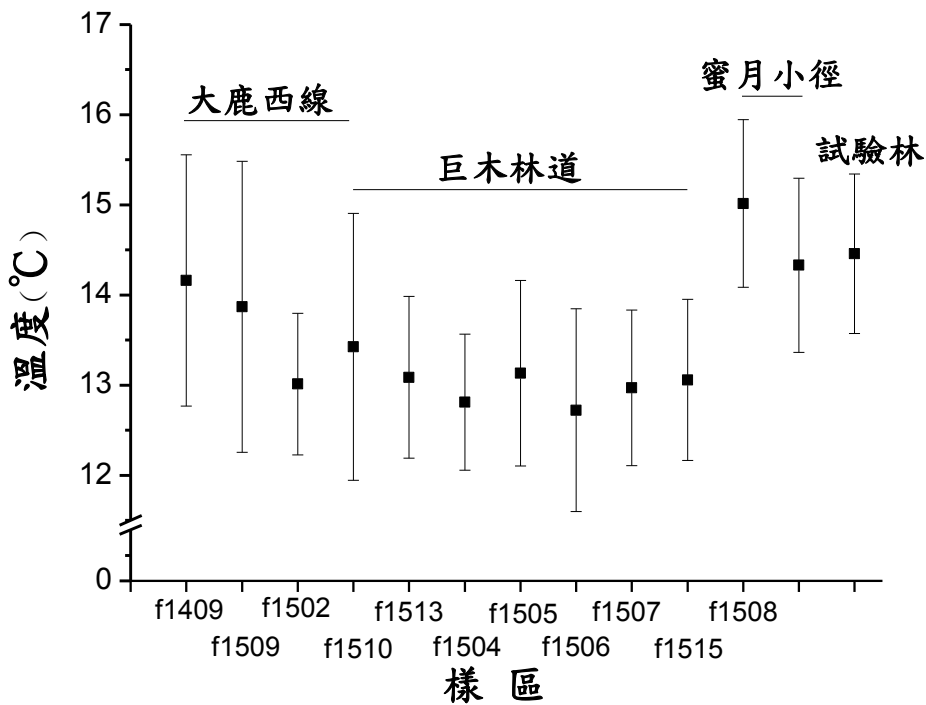


圖 3-9. 四個樣區遮蔽物底下同時期(2015/10/10~2015/11/21)的均溫變化比較。所有值以平均值±標準差(SD)表示。

### 三、溫度耐受度、暖化耐受度與溫度馴化能力

就目前我們所知，本研究首次提供台灣產山椒魚的溫度耐受度資料，同時也是目前世界第一次有山椒魚(*Hynobius*)溫度耐受度的研究報導。蝾螈的溫度耐受度(CTMax)表現與棲地以及物種分布的範圍有關(Hutchison 1961)。溫度耐受度研究除了可提供物種溫度生理的基本資料，也可以應用在氣候暖化對物種影響的評估。近年，應用在兩棲類的暖化耐受度就被視為一種暖化威脅程度的指標(Duarte et al. 2011)。暖化耐受度是以物種能忍受的環境最高溫去減其棲地會出現的最高溫，物種的暖化耐受度低，即顯示環境最高溫度比較接近其耐受高溫，表示物種在未來可能會受到氣候暖化的威脅會比較大。巨木群步道是觀霧山椒魚分布密度最高的地區，以此樣區所測得的最高溫(19°C)來計算，其暖化耐受度(WT)為 $30 - 19 = 11^{\circ}\text{C}$ ；但以大鹿林道西線所測得的棲地最高溫(27.3°C)來計算，其暖化耐受度為 $30 - 27.3 = 2.7^{\circ}\text{C}$ 。對照無尾類的蝌蚪的研究案例(Duarte et al. 2011)，巨木群步道族群暖化耐受度與溫帶蝌蚪(WT=9.4°C，Duarte et al. 2011)接近，顯示有較高的暖化耐受度，表示此區的山椒魚未來受氣候暖化的影響較小；而大鹿林道西線族群的暖化耐受度則與亞熱帶暖溫地區的蝌蚪(WT=3.5°C，Duarte et al. 2011)類似，則顯示其面臨較高的氣候暖化威脅。

面對未來環境條件的持續增溫，物種除了本身須具備較高的溫度耐受度外，有能力隨環境升溫而提高溫度耐受度也很重要，有較好溫度馴化能力的物種在未來受氣候暖化的影響會比較小。本研究顯示馴化在 15°C 的山椒魚，其 CTMax 為 $30.06 \pm 0.47^{\circ}\text{C}$  (N=7)，而馴化在 20°C 的山椒魚，其 CTMax 為 $31.58 \pm 0.52^{\circ}\text{C}$  (N=6)，結果顯示馴化在 20°C 的個體溫度耐受度顯著高於馴化在 15°C 的個體溫度耐受度(圖 3-10)(ANOVA,  $F_{1,11}=26.485$ ,  $P<0.0001$ )。觀霧地區觀霧山椒魚的溫度馴化率為 0.31，即每提高 1°C 馴化溫度，會提升 0.31°C 的 CTMax。北美其他種蝾螈的高度馴化能力，其值一般是介於 0.1~0.34(依據原始文獻去換算所得到的結果)(Hutchison 1961; Keen and Schroeder 1975)，顯示觀霧山椒魚的高度馴化能力與目前已知的種類相近。

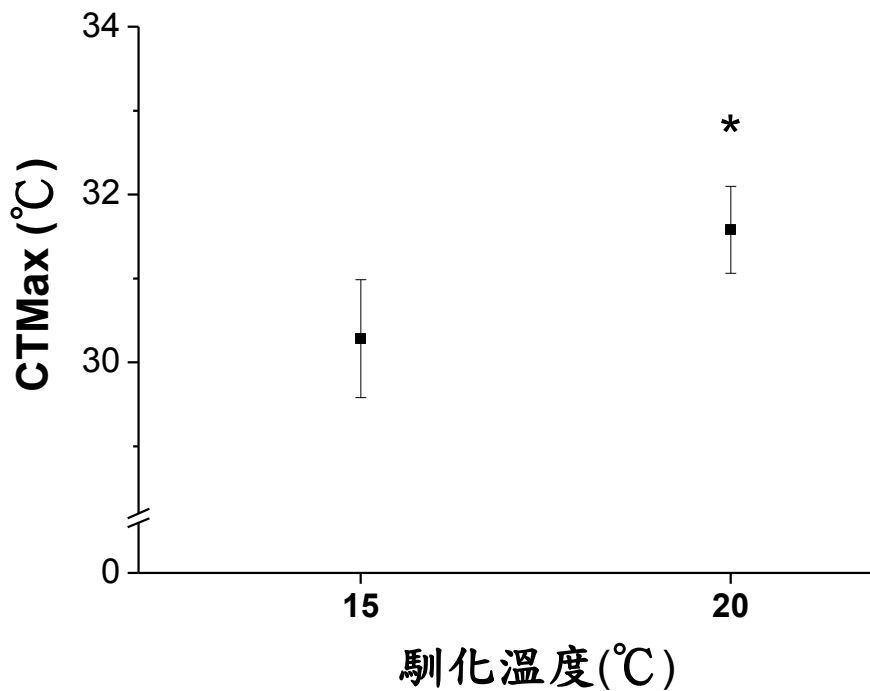


圖 3-10. 不同溫度馴化後的山椒魚溫度耐受度表現。

#### 四、族群遺傳資料分析

自 2012 年至 2015 年 11 月共累積 99 筆觀霧山椒魚 DNA 樣本(2012 至 2014 年的組織樣本由中興大學吳聲海副教授提供)，觀霧(GW)區分為 4 個族群分別為大鹿林道西線(SW)11 筆，巨木群步道(SB)80 筆，蜜月小徑(SH) 5 筆，試驗棲地(EH)3 筆(表 3-3)。另外，北橫(NCIH)兩個族群亦加入分析，分別為拉拉山(LLS)4 樣本與北插天山(NCTM)4 樣本(表 3-3)。總共 107 筆 DNA 樣本，粒線體 *cyt-b* 基因序列經過排序後，擷取 791bp 進行親緣關係與族群遺傳分析。全部樣本經分析後，共可區分為 11 種單倍基因型，觀霧共有 7 種單倍基因型，北橫共有 4 種單倍基因型(表 3-3)。觀霧地區以 H2 分佈最為廣泛且數量最多，其餘單倍基因型數量少且僅分佈於某些族群。巨木群步道族群單倍基因型分佈最多，共有 5 種單倍基因型，試驗棲地族群僅有 1 種單倍基因型為最少(表 3-3)。北橫地區的北插天山有 3 種單倍基因型，而拉拉山僅有 1 種單倍基因型(表 3-3)。觀霧 4 個族群的單倍基因型多樣性指數 ( $h$ ) 皆呈現低指數(表 3-3)，單倍基因型多樣性皆不高。核苷酸多樣性指數 ( $\pi$ ) 在 4 個族群亦呈現低指數值(表 3-3)，試驗棲地族群指數為 0，表示族群內個體基因序列完全相同無差異。北橫北插天山族



群的單倍基因型多樣性指數 ( $h$ ) 皆呈現高指數(表 3-3)，但拉拉山僅有 1 種單倍基因型。核苷酸多樣性指數 ( $\pi$ ) 在北插天山族群相對於觀霧 4 個族群呈現高指數值(表 3-3)，拉拉山族群指數為 0，表示族群內個體基因序列完全相同無差異。整體而言，北橫族群相較於觀霧族群，單倍基因型多樣性指數與核苷酸多樣性指數皆較高(表 3-3)。中性假說檢測(表 3-3)，Tajima's D 與 Fu and Li's F 雖皆為負值，但經統計檢測後皆呈現不顯著狀態，表示 *cyt-b* 基因序列不論在觀霧或北橫各族群並未偏離中性假說。

表 3-3. 觀霧山椒魚(*Hynobius fuca*)粒線體 *cyt-b* 基因遺傳多樣性分析，包括單倍基因型多樣性 ( $h$ )、核苷酸多樣性 ( $\pi$ )、Tajima's  $D$  和 Fay and Wu's  $F$  檢測

Population	$n$	Haplotype										$h$	$\pi$	Tajima's $D$	Fu and Li's $F$	
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10					H11
<b>GW</b>																
SB	80	1	74	2	2			1					0.145	0.00019	-1.68	-1.74
SW	11		8	1		1	1						0.491	0.00069	-1.60	-2.03
SH	5		4			1							0.400	0.00051	-0.82	-0.77
EH	3		3										0	0	-	-
Subtotal	99	1	89	3	2	2	1	1					0.192	0.00025	-1.86*	-2.12
<b>NCIH</b>																
LLS	4								4				0	0	-	-
NCTM	4									2	1	1	0.833	0.00147	-1.32	0.50
Subtotal	8								4	2	1	1	0.750	0.00158	0.33	0.34
Total	107	1	89	3	2	2	1	1	4	2	1	1	0.307	0.00304	-1.32	-0.17

觀霧(GW)，大鹿林道西線(SW)，巨木群步道(SB)，蜜月小徑(SH)，試驗棲地(EH)，北橫(NCIH)，拉拉山(LLS)，北插天山(NCTM)

觀霧 4 個族群間遺傳距離介於 0.0001-0.0006 間，數值低顯示族群間遺傳組成相似，而族群間遺傳分化指數皆接近 0 或為負值，顯示此 4 族群間無顯著分化現象(表 B)。本研究遺傳多樣性分析，顯示觀霧地區的觀霧山椒魚遺傳多樣性極低，遺傳分化指數指出 4 個樣點間無顯著分化情形，表示基因交流無限大，因此觀霧地區的觀霧山椒魚可視為單一個族群。北橫 2 個族群間遺傳距離介於 0.0022 間，數值高於觀霧各族群間遺傳距離，而族群間遺傳分化指數亦高於觀霧個族群間，顯 2 族群間有分化現象(表 3-4)。觀霧與北橫族群間比較，兩地族群間遺傳距離大且遺傳分化指數高呈現明顯分化現象(表 3-4)。

表 3-4. 觀霧山椒魚(*Hynobius fuca*)族群間粒線體 *cyt-b* 基因遺傳分化指數 (Fixation index,  $F_{ST}$ ) 與遺傳距離 (Genetic distance) (粗體字)

	SB	SW	EH	SH	LLS	NCTM
SB		<b>0.0004</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0207</b>	<b>0.0203</b>
SW	-0.011		<b>0.0003</b>	<b>0.0006</b>	<b>0.0210</b>	<b>0.0206</b>
EH	0.008	<0.001		<b>0.0003</b>	<b>0.0206</b>	<b>0.0203</b>
SH	0.002	-0.083	<0.001		<b>0.0209</b>	<b>0.0205</b>
LLS	0.995	0.983	1.000	0.988		<b>0.0022</b>
NCTM	0.958	0.947	0.963	0.951	0.667	

大鹿林道西線(SW)，巨木群步道(SB)，蜜月小徑(SH)，試驗棲地(EH)，拉拉山(LLS)，北插天山(NCTM)

觀霧山椒魚親緣關係重建，自 GenBank 下載觀霧山椒魚 *cyt-b* 基因序列，及臺灣另外四種山椒魚，包括臺灣山椒魚(*H. formosanus*)、阿里山山椒魚(*H. arisanensis*)、楚南氏山椒魚(*H. sonani*)與南湖山椒魚(*H. glacialis*)，亦選擇 3 種臺灣無分佈但親緣關係接近的山椒魚當作外群(*H. spp.*)。觀霧山椒魚樣本利用先前分析所得出的 11 種單倍基因型與 GenBan 下載樣本序列來進行親緣關係樹重建。分子親緣關係樹利用四種不同方法來重建(圖 3-11)，結果顯示觀霧山椒魚為單系群，bootstrap 值呈現高支持度，而觀霧山椒魚可再分為兩大分支，霞喀羅大山族群(DQ652198)與觀霧族群歸為同一個單系群，北橫族群為另一個單系群。觀霧山椒魚曾有一共同祖先，隨後分化為北橫支系與觀霧支系等 2 大支系，支系間具有明顯的地理隔離，推測雪山山脈的造山運動導致稜線隆起，地質運動可能造成地理分隔的因素。臺灣 5 種山椒魚親緣關係(Li et al., 2011)，顯示觀霧山椒魚以外的 4 種山椒魚由同一共同祖先分化而來，而這個未知的共同祖先曾與觀霧山椒魚曾有一共同祖先。觀霧山椒魚僅分佈於雪山山脈，其他 4 種山椒魚大多分佈於中央山脈，部分亦分佈於雪山山脈(Lai and Lue, 2008)，推測臺灣五種山椒魚分化早期可能跟雪山山脈地質變動相關。

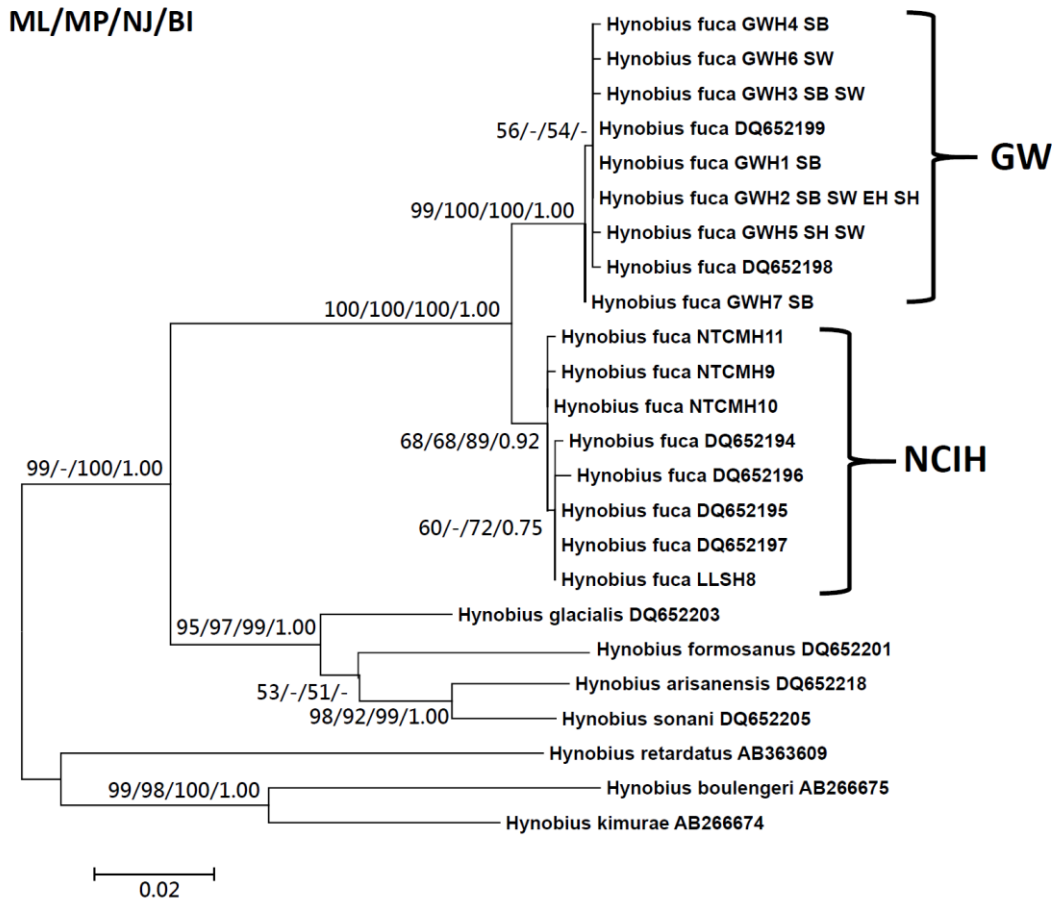


圖 3-11.山椒魚粒線體 *cyt-b* 基因序列利用最大似然性法(ML)重建之親緣關係樹，分支節點值表支持程度，分別為最大似然性法、最大儉約法(MP)、鄰域加入法(NJ)之 bootstrap 與貝葉氏導出式之後檢驗概率值(BI)。觀霧山椒魚可分為兩大分支，觀霧支系與北橫支系；觀霧(GW)：大鹿林道西線(SW)，巨木群步道(SB)，蜜月小徑(SH)，試驗棲地(EH)；北橫(NCIH)：拉拉山(LLS)，北插天山(NCTM)。

根據觀霧山椒魚單倍基因型來建構最小關聯網狀圖(圖 3-12)，結果顯示觀霧山椒魚分兩群，觀霧群(GW)與北橫群(NCIH)，最小關聯網狀圖顯示這兩群間呈現明顯的地理分隔。觀霧群 H2 單倍型數量最多為最主要的單倍型，最小關聯網狀圖顯示觀霧其他單倍型是由 H2 突變延伸出，呈現星狀關係，而 H2 在觀霧 4 個樣點皆出現，其他單倍基因型皆是 H2 延伸出並無地理分隔產生線性連續性變異現象，表示觀霧 4 個族群無明顯地理分化現象，應將視為一個族群。北橫群共有 4 種單倍基因型，北插天山樣本就佔了 3 個單倍基因型。最小關聯網狀圖顯示北橫樣本亦由一主要的單倍基因型衍生出另外 3 個單倍基因型，北插天山族群遺傳多樣性較高，拉拉山僅有 1 單倍基因型且由北插天山衍生，拉拉山族群由北插天山族群拓殖建群，推測觀霧山椒魚可能由低

海拔往高海拔拓殖。

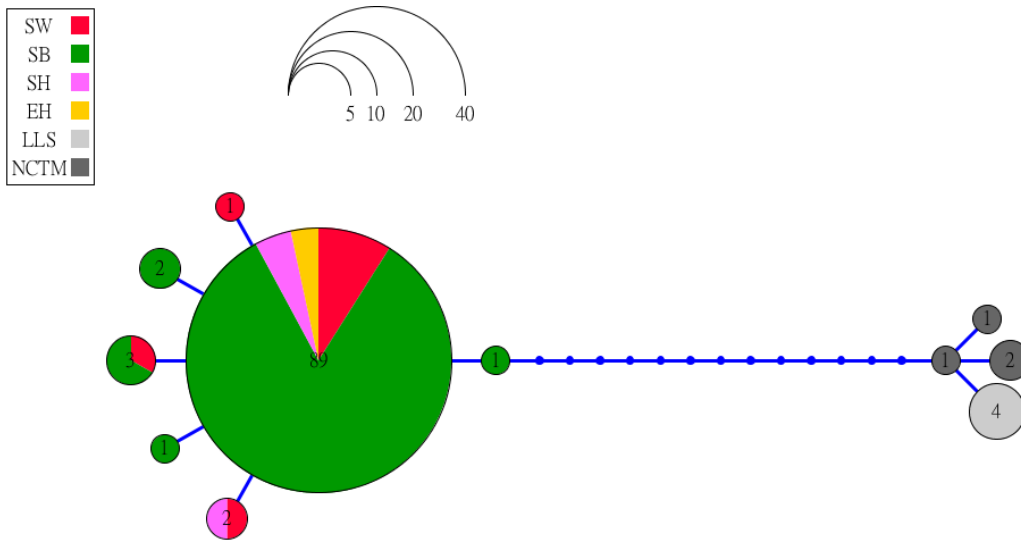


圖 3-12. 觀霧山椒魚(*Hynobius fuca*)粒線體 *cyt-b* 基因最小關聯網狀圖。分析族群包含大鹿林道西線(SW)，巨木群步道(SB)，蜜月小徑(SH)，試驗棲地(EH)，拉拉山(LLS)，北插天山(NCTM)。觀霧山椒魚可分為兩大地理分支，觀霧群與北橫群。

族群變動歷史分析，Bayesian skyline plots 分析結果顯示觀霧族群(圖 3-13A)與北橫族群(圖 3-13B)過去歷史上，有效族群大小並無明顯變動狀態，呈現穩定狀態。結合北橫與觀霧群(圖 3-13C)，以種的角度分析全部觀霧山椒魚過去族群變動歷史，顯示最近一次最大冰期約 18000 年到 24000 年前(Tsukada, 1966)，有族群擴張的現象，直到冰期結束後至目前間冰期，呈現族群衰退的現象。推測觀霧山椒魚適應低溫，冰河期時的低溫有助於族群擴張，而間冰期溫度較高，可能限制了其族群拓殖。目前觀霧與北橫的採樣點，可能是觀霧山椒魚目前處於間冰期時的避難所。前述親緣地理分析，近期觀霧山椒魚可能是由低海拔往高海拔拓殖，可能是為了要適應間冰期高溫而族群往低溫位置遷移避難。因此，全球暖化不利於觀霧山椒魚的生存，氣候變遷對觀霧山椒魚族群變動有顯著影響。

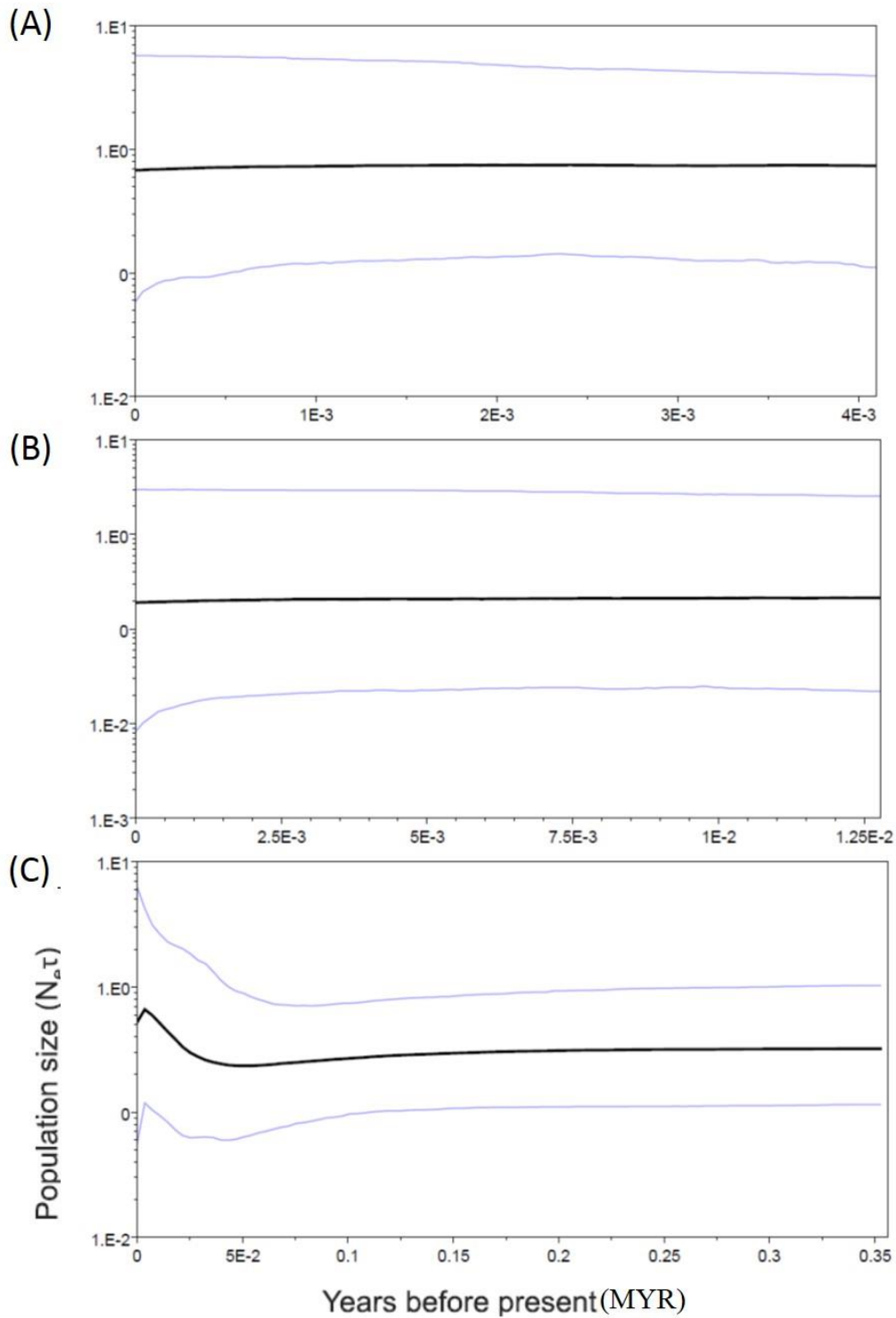


圖 3-13. 觀霧山椒魚(*Hynobius fuca*)粒線體 *cyt-b* 基因以 Bayesian skyline plots 分析觀霧山椒魚過去族群大小的歷史變動。(A)觀霧族群(B)北橫族群 (C)觀霧與北橫族群合併分析。

## 第四章、結論與建議

本年度的調查顯示巨木群步道所調查到的觀霧山椒魚數量最多，本區仍為最穩定能發現山椒魚的區域，顯示其棲地條件在觀霧地區有其不可取代性。觀霧山椒魚通常棲息在鬱閉度高的森林底層，相較於其他樣點，巨木群步道有較完整的林相遮蔽，這樣的環境似乎較有利於維持微棲地環境的濕度、以及相對且穩定的低溫。此外，觀霧山椒魚對棲地利用可能有高依戀性。

環境所具備的溫度與濕度條件，除了會影響山椒魚的微棲地(遮蔽物)利用的偏好，也可能影響其他生物的利用，這些物種的出現可能代表山椒魚空間利用上的競爭者或潛在掠食者。就試驗棲地來說，今年並沒有在此區發現任何山椒魚，此區的遮蔽物通常被台灣蜓蜥或螞蟻所利用。此區微棲地有較多的台灣蜓蜥利用，也顯示此區日照較充足、溫度偏高且不易積水(黃等 2005)，而我們的溫度資料也的確顯示此區遮蔽物下的均溫高於其他地點，可能較不利於吸引山椒魚利用。

本研究首次提供台灣產山椒魚的溫度耐受度資料。觀霧山椒魚的溫度耐受度約介於30至31.6°C之間，馴化在20°C的個體溫度耐受度會顯著高於馴化在15°C的個體。從馴化能力的資料來看，觀霧山椒魚面對氣候暖化會有一定的生理調整能力。然而，不同族群蝾螈的溫度馴化率表現可能會有差異(Hutchison 1961)，未來應考慮比較低海拔山椒魚族群的溫度耐受度以及溫度馴化能力，以利於更完整的評估。此外，透過暖化耐受度的資料，可做為不同樣區山椒魚面臨氣候暖化的威脅程度評估。巨木群步道族群有比較高的暖化耐受度，表示此區的山椒魚未來受氣候暖化的影響較小；而大鹿林道西線族群有較低的暖化耐受度，則顯示未來面臨較高的氣候暖化威脅；這樣的結果也凸顯維護山椒魚棲地的重要性，因為良好(能維持低溫潮濕)的棲息地有利於緩和氣候暖化的威脅。

觀霧地區的觀霧山椒魚遺傳多樣性極低，樣點間無顯著地理分化，加上有效族群大小的變動跟冰河期與間冰期變動相關，溫度限制了觀霧山椒魚的拓殖與生存。透過族群變動歷史分析，推測觀霧山椒魚適應低溫，冰河期時的低溫有助於族群擴張，而間冰期溫度較高，可能限制了其族群拓殖。目前觀霧與北橫的採樣點，可能是觀霧山椒魚目前處於間冰期時的避難所。前述的親緣地理分析，近期觀霧山椒魚可能是由低海拔往高海拔拓殖，可能是為了要適應間冰期高溫而族群往低溫位置遷移避難。因

此，預期全球暖化不利於觀霧山椒魚的生存，氣候變遷對觀霧山椒魚族群變動有顯著影響。

以下就本研究的結果，就立即可行建議及長期性建議，分別提出以下說明：

## 一、立即可行的建議

主辦機關：雪霸國家公園

協辦機關：中國文化大學生命科學系

建議事項：

過去四年來，觀霧地區持續有研究團隊在此進行山椒魚族群的監測，已累積不少成果。目前已確定巨木群步道與大鹿林道西線為山椒魚穩定出現且適合持續監測的樣點。山椒魚的野外調查時間投資報酬率低，須仰賴持續不斷的監測，才可能收集較多的基礎生物學資料。另外，要評估氣候暖化對山椒魚族群的影響，除了溫度生理學以及族群遺傳資料的輔助，持續的野外監測更是必要。因此，仍建議管理處應持續針對觀霧地區的山椒魚族群進行監測，以利對山椒魚族群動態的瞭解以及保育策略調整的參考。

## 二、長期性的建議

主辦機關：雪霸國家公園

協辦機關：中國文化大學生命科學系

建議事項：

1. 目前研究顯示觀霧山椒魚偏好分布在有穩定低溫條件的微棲地的巨棲地，而有限的證據也顯示觀霧山椒魚對棲地利用有高依戀性。有尾類的微棲地利用受到濕度所限制，因此使得牠們利用的微棲地都屬於溫度異質性較低的環境(即較不能提供多樣溫度選擇條件的微棲地)，這使得牠們常被認為是不善於以行為方式選溫的生物(Camp et al. 2013)，倘若如此，在氣候暖化下，牠們將無法適



當調整自己的溫度偏好，而限制牠們的棲地利用與分布，進而影響族群的延續。目前我們缺乏對觀霧山椒魚的溫度偏好的基本瞭解，這將不利於山椒魚未來的保育以及評估氣候暖化對牠們的可能威脅。建議未來能進行選溫方面的研究，研究方式可透過讓動物在室內的梯溫槽進行選溫，以及搭配野外追蹤裝置研究山椒魚的活動範圍與行為模式，這將有助於更進一步瞭解觀霧山椒魚的棲地利用與環境偏好。

2. 本研究目前只針對觀霧地區的族群進行溫度耐受度研究。然而，初步分子親緣關係樹與親緣地理已顯示觀霧族群與北橫族群(低海拔族群)有顯著遺傳分化，所以其族群差異也可能反應在溫度生理的表現上。因此建議未來應進一步針對這些族群間的遺傳分化與溫度生理表現做比較，甚至比較雪霸國家公園的其他種類，如此可能凸顯觀霧地區觀霧山椒魚在保育上的重要性與特殊性。
3. 關於山椒魚試驗棲地改善問題：歐等(2014)評估認為目前山椒魚試驗棲地環境適合觀霧山椒魚生育，而從試驗棲地的底棲無脊椎動物類群組成百分比與其他樣區沒有顯著差異來看，也顯示此區應可提供山椒魚潛在的食物來源。目前比較大的問題可能是此區的潛在可利用的微棲環境較無法維持相對且穩定的低溫，而前人研究也已指出屬於東向坡的山椒魚試驗地原本就不如屬於西向坡的巨木群林道潮濕和低溫(林 2009)。坡向的問題無法改變，林相是否會演替成較鬱閉的環境條件也仍有待觀察。蔡與洪(2010)指出受兩次颱風重創的巨木群林道，在坡度平緩與草本植物低的環境增加擺放石塊或木頭等潛在微棲地後，有利於提高山椒魚的利用意願，但需要時間等待，才會看到山椒魚利用。因此，目前可以考慮改善的方式是在該區鬱閉度較高的區域增加石塊放置，提高山椒魚的利用可能，並同時監控遮蔽物溫度變化以評估持續改善的可能。
4. 遺傳多樣性的維持，有助於適應未來氣候變遷對族群變動的影響，未來如果要提升各族群內多樣性，根據遺傳分化分析，觀霧地區可視為單一大族群前提下，4 樣點間依照單倍基因型差異進行個體異地交換保育是可被接受的，並有

助於各樣點遺傳多樣性之維持與提升。然而，觀霧山椒魚棲地選擇性高，適應低溫況下，要慎選地點。

## 第五章、參考文獻

- Calosi, P., D. T. Bilton, and J. I. Spicer. 2008. Thermal tolerance, acclimatory capacity and vulnerability to global climate change. *Biology Letters* **4**:99-102.
- Camp, C. D., J. A. Wooten, J. B. Jensen, and D. F. Bartek. 2013. Role of temperature in determining relative abundance in cave twilight zones by two species of lungless salamander (family Plethodontidae). *Canadian Journal of Zoology*, **92**: 119-127.
- Chen, T. C., Y. C. Kam, and Y. S. Lin. 2001. Thermal physiology and reproductive phenology of *Buergeria japonica* (Rhacophoridae) breeding in a stream and a geothermal hot spring in Taiwan. *Zoological Science* **18**:591-596.
- Cupp, J., P. V. 1980. Thermal tolerance of five salientian amphibians during development and metamorphosis. *Herpetologica* **36**:234-244.
- Delson, J. and W. G. Whitford. 1973. Stages in desert and montane populations of *Ambystoma tigrinum*. *Herpetologica* **29**:352-355.
- Deutsch, C. A., J. J. Tewksbury, R. B. Huey, K. S. Sheldon, C. K. Ghalambor, D. C. Haak, and P. R. Martin. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:6668-6672.
- Duarte, H., M. Tejedo, M. Katzenberger, F. Marangoni, D. Baldo, J. F. Beltrán, D. A. Martí, A. Richter-Boix, and A. Gonzalez-Voyer. 2011. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology* **18**:412-421.
- Drummond, A.J., M. A. Suchard, D. Xie, and A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 1969-1973.
- Floyd, R. B. 1985. Effects of photoperiod and starvation on the temperature tolerance of larvae of Giant toad, *Bufo marinus*. *Copeia* **1985**:625-631.
- Green, D. E. 2001. Anesthesia of amphibians in the field. USGS Standard Operating Procedure. ARMI SOP.

- Holomuzki, J. R. 1986. Predator avoidance and diel patterns of microhabitat use by larval tiger salamanders. *Ecology* **67**:737-748.
- Hoppe, D. M. 1978. Thermal tolerance in tadpoles of the chorus frog *Pseudacris triseriata*. *Herpetologica* **34**:318-321.
- Howard, J. H. and R. L. Wallace. 1983. Critical thermal maxima in populations of *Ambystoma macrodactylum* from different elevations. *Journal of Herpetology* **17**:402-404.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- Hutchison, V. H. 1961. Critical thermal maxima in salamanders. *Physiological Zoology*:92-125.
- Hutchison, V. H. and R. K. Dupre. 1992. Thermoregulation. Pages 206-249 in M. E. Feder and W. W. Burggren, editors. *Environmental Physiology of the Amphibians*. The University of Chicago Press Chicago and London.
- Kirtman, B., S.B. Power, J.A. Adedoyin, G.J. Boer, R. Bojariu, I. Camilloni, F.J. Doblas-Reyes, A.M. Fiore, M. Kimoto, G.A. Meehl, M. Prather, A. Sarr, C. Schär, R. Sutton, G.J. van Oldenborgh, G. Vecchi and H.J. Wang, 2013: Near-term Climate Change: Projections and Predictability. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 953–1028, doi:10.1017/CBO9781107415324.023.
- Keen, W. H. and E. E. Schroeder. 1975. Temperature selection and tolerance in three species of *Ambystoma* larvae. *Copeia* **1975**:523-530.
- Lai, J.-S. and K.-Y. Lue. 2008. Two new *Hynobius* (Caudata: Hynobiidae) salamanders from Taiwan. *Herpetologica* **64**:63-80.
- Lai, J.-S. and K.-Y. Lue. 2013. Microhabitat Preference of the Alishan Salamander

- (*Hynobius arisanensis*). *Current Herpetology* **32**:125-134.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, and R. Lopez. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947-2948.
- Lee, P.-F., K.-Y. Lue, and S.-H. Wu. 2006. Predictive distribution of hynobiid salamanders in Taiwan. *Zoological Studies* **45**:244-254.
- Li J., Fu C., and G. Lei. 2011. Biogeographical Consequences of Cenozoic Tectonic Events within East Asian Margins: A Case Study of *Hynobius* Biogeography. *PLoS ONE* **6**(6): e21506. doi:10.1371/journal.pone.0021506.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Licht, P. and A. G. Brown. 1967. Behavioral thermoregulation and its role in the ecology of the red-bellied newt, *Taricha rivularis*. *Ecology* **48**:598-611.
- Lue, K. and K. Chuang. 1992. The discovery of metamorphosed juveniles of formosan salamander (*Hynobius formosanus*) in Yu-Shan national park. *Bulletin Institute Zoology, Academia Sinica* **31**:312-316.
- Manis, M. L. and D. L. Claussen. 1986. Environmental and genetic influences on the thermal physiology of *Rana sylvatica*. *J. them. Bio.* **11**:31-36.
- Moritz, C., C. J. Schneider, and D. B. Wake. 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology* **41**:273-291.
- Noland, R. and G. R. Ultsch. 1981. The roles of temperature and dissolved oxygen in microhabitat selection by tadpoles of a frog (*Rana pipens*) and a toad (*Bufo terrestris*). *Copeia* **1981**:645-652.
- Rome, L. C., E. D. Stevens, and H. B. John-Alder. 1992. Environmental Physiology of the Amphibians. Pages 183-205 in M. E. Feder and W. W. Burggren, editors. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Seto, T. and T. Utsunomiya. 1987. Chromosome analysis of *Hynobius arisanensis* Maki, a

- salamander endemic to Taiwan. *Herpetologica*:117-119.
- Sinervo, B., F. Mendez-De-La-Cruz, D. B. Miles, B. Heulin, E. Bastiaans, M. Villagrán-Santa Cruz, R. Lara-Resendiz, N. Martínez-Méndez, M. L. Calderón-Espinosa, and R. N. Meza-Lázaro. 2010. Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science* **328**:894-899.
- Stauffer, J. R. J., J. E. Gates, and W. L. Goodfellow. 1983. Preferred temperature of two sympatric *Ambystoma* larvae: a proximate factor in niche segregation? *Copeia* **1983**:1001-1005.
- Stillman, J. H. 2003. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science* **301**:65-65.
- Tsukada, M. 1966. Late Pleistocene vegetation and climate in Taiwan (Formosa). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **55**: 543-584.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and S. Kumar. 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Templeton, A. R., and C. F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analysis with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134: 659-669.
- Tewksbury, J. J., R. B. Huey, and C. A. Deutsch. 2008. Putting the heat on tropical animals. *Science* **320**:1296.
- Walton, B. M. 2013. Top-down regulation of litter invertebrates by a terrestrial salamander. *Herpetologica* **69**:127-146.
- Weisrock, D.W., J.R. Macey, I.H. Ugurtas, A. Larson, and T. J. Papenfuss. 2001. Molecular phylogenetics and historical biogeography among salamandrids of the “true” salamander clade: rapid branching of numerous highly divergent lineages in *Mertensiella luschani* associated with the rise of Anatolia. *Molecular Phylogenetic Evolution* 18: 434-448.
- Wu, C. S. and Y. C. Kam. 2005. Thermal tolerance and thermoregulation by Taiwanese

- rhacophorid tadpoles (*Buergeria japonica*) living in geothermal hot springs and streams. *Herpetologica* **61**:35-46.
- Yeh, K., K. Chuang, K. Lue, and S. Chen. 1988. The study of antipredator behavior of formosan salamander (*Hynobius formosanus*). *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica* **27**:37-48.
- 毛俊傑. 2009. 棲蘭山 100 線林道觀霧山椒魚之分布與環境. Page 31. 行政院退除役官兵輔導委員會榮民森林保育事業管理處.
- 林博雄. 2010. 觀霧地區雲霧環境之監測與模式建立. 雪霸國家公園管理處委託辦理計畫成果報告.
- 呂光洋、賴俊祥. 2010. 觀霧山椒魚(*Hynobius fuca*)之分布及棲息地的調查. 國立臺灣師範大學.
- 呂光洋、賴俊祥. 2012. 阿里山山椒魚監測及監測模式標準作業程序制定. 國立臺灣師範大學.
- 李文傑、呂光洋. 1996. 台灣地區蛇類食性的初探. *師大生物學報* **31**:119-124.
- 侯文祥、陳君翔. 2007. 台灣阿里山山椒魚活動力與水邊棲地狀態之關係研究. *臺灣水利* **55**:82-91.
- 陳世煌、呂光洋. 1986. 臺灣產山椒魚之研究 (二) 阿里山地區山椒魚之族群生態研究. *師大生物學報* **21**:47-72.
- 黃淑萍、蕭之維、杜銘章. 2005. 高海拔長期生態研究-塔塔加地區之台灣蜓蜥的族群量變化及其棲地利用. *生物科學* **40**: 68-75.
- 葉明欽、呂光洋、賴俊祥. 1994. 阿里山及玉山國家公園台灣山椒魚族群生態之研究. *師大生物學報* **29**:79-87.
- 歐辰雄、邵廣昭、吳聲海、陸聲山、邱清安. 2014. 觀霧地區觀霧山椒魚及相關物種調查. 雪霸國家公園管理處委託辦理計畫成果報告.
- 蔡尚惠、洪美珠. 2010. 觀霧山椒魚棲地改善後之族群監測. 林務局新竹林區管理處委託報告。
- 賴俊祥、呂光洋. 2007. 阿里山地區阿里山山椒魚的分布與族群監測. *Bio Formosa* **42**:105-117.

## 附錄

表 1. 溫度自動記錄器擺放地點與日期、所屬個體與遮蔽物類型與特徵。

所屬個體編號	地點	新個體(N)/重複捕捉(R)	遮蔽物類型	是否附著其他植物	擺放日期
f1409、f1503	大鹿西線	R	石頭		2015.04.03
f1502	大鹿西線	N	倒木	V	2015.04.03
f1509	大鹿西線	N	石頭		2015.04.03
f1510	大鹿西線	N	石頭		2015.05.02
f1513	巨木群步道	N	石頭	V	2015.05.02
f1504	巨木群步道 2.1-2.2K	N	石頭	V	2015.04.03
f1505	巨木群步道 2.1K	N	石頭		2015.04.03
f1506	巨木群步道約 2.25K	N	石頭	V	2015.04.03
f1507	巨木群步道約 2.25K	N	石頭	V	2015.04.03
f1508	蜜月小徑近出口處	N	石頭		2015.04.03



f1515、f1516	巨木群步道	R	石頭		2015.10.10
	試驗棲地	無補捉紀錄	木頭		2015.10.10
	試驗棲地	無補捉紀錄	木頭		2015.10.10

# 「104 年觀霧山椒魚溫度生理耐受性測量及族群遺傳多樣性分析」 第 1 次期中審查會議紀錄

壹、會議時間：104 年 7 月 29 日（星期三）下午 2 時 0 分

貳、會議地點：雪霸國家公園管理處第 1 會議室

參、主席：陳處長貞蓉

記錄：胡景程

肆、出(列)席單位及人員：詳如簽到簿

伍、討論事項

委員	委員提問	中國文化大學回覆
吳聲海 委員	<p>(一) 可延用照相方式拍攝觀霧山椒魚下頷斑點，紀錄個體，與過去累積資料比對。</p> <p>(二) 請在表 4 增加北橫和其他地點之單倍基因型。</p> <p>(三) 請增加觀霧山椒魚兩支系遺傳距離資料，若能增加北橫採集個體更佳。</p> <p>(四) 溫度耐受性之研究成果，可用於預測較低海拔族群之反應。</p> <p>(五) 若能於雪霸國家公園範圍內之兩種高海拔山</p>	<p>(一)本年度的調查研究有繼續延用此方法，並實際比對今年捕捉到的個體，相關文字敘述與照片會在期末報告書呈現。</p> <p>(二)親緣地理分析即可看出單倍型分佈，未來會增加列表補足資料，於期末報告書呈現。</p> <p>(三)會在期末報告書加入兩支系遺傳距離資料，北橫族群需另外向林務局申請採集，未來會參酌建議</p>

	<p>椒魚種類，測試溫度耐受性，可評估各種暖化程度及暖化程度對不同種的影響。</p> <p>(六) 平均低溫的算法請列於報告書中。</p> <p>(七) 請分析日溫度變動(最高減最低)與數量出現與否之關係。</p>	<p>增加資料。</p> <p>(四)會在期末報告嘗試進行討論。</p> <p>(五)會評估可行性後，在未來的計畫中進行。</p> <p>(六)遵照辦理，會補充到期末報告書。</p> <p>(七)會依照建議，補充到期末報告書。</p>
<p>本處 人員</p>	<p>(一) 請將個體判斷依據的照片(大頭照)納入報告書中並建檔，並與吳聲海老師的過去調查成果做比對。</p> <p>(二) 試驗棲地沒有發現山椒魚，是因為溫度的關係還是其他因素?或是濕度、坡向的問題?如何改善試驗地的環境並吸引山椒魚前來利用?</p> <p>(三) 最能夠解釋並預測存有山椒魚的環境因子會是什麼?應該可以先找出影響山椒魚棲地選擇的</p>	<p>(一)本年度的調查研究有繼續延用此方法，並實際比對今年捕捉到的個體，相關文字敘述與照片會在期末報告書呈現。</p> <p>(二)目前的結果尚無法回答這個問題。溫度與坡向都可能是影響因素。研究有發現此區的石頭底下被其他動物，特別是台灣蜓蜥或螞蟻所利用，因此也可能是此區容易吸引其他微棲地競爭者</p>

	<p>環境因子，並利用迴歸來導出存有山椒魚的預測方程式，看看到底哪一種環境因子最能夠解釋山椒魚的有或無。</p> <p>(四) 山椒魚的生殖棲地從來沒有被發現過，若一直都不能發現生蛋的棲地，我們也很難知道到底是什麼環境適合山椒魚繁殖。</p> <p>(五) 本研究的山椒魚再捕獲率低，是不是表示山椒魚的族群量很大或是活動範圍廣呢？</p> <p>(六) HOBO 能否多放置幾處並加以定位，未來也可將這些資料與山椒魚的分布結合並透過套疊呈現在地圖上。</p> <p>(七) 遺傳多樣性是否能回推有效族群量的大小？</p> <p>(八) 請將簡報檔上的重點整理文字也放到報告書內。</p> <p>(九) 土壤質地與密度</p>	<p>利用而導致山椒魚利用情況不佳。</p> <p>(三)過去的文獻(Lin et al. 2006)曾指出溫度與濕度是台灣其他三種山椒魚最佳的分布預測因子。未來將參酌現有資料去分析出可能影響因子。</p> <p>(四)前人的調查往往也顯示這方面資料的缺乏。未來會盡可能探查與找出山椒魚可能的繁殖環境。</p> <p>(五)不排除任何可能性，但現有資料有限，仍無法回答此問題。</p> <p>(六)遵照辦理，會增加擺放在野外的溫度自動記錄器，特別是山椒魚試驗地。</p> <p>(七)根據 <math>\theta=4N_e\mu</math>，可以推導出有效族群(<math>N_e</math>)大小，此數據會在期末</p>
--	--	--

	<p>是否會影響山椒魚的棲地選擇?又底棲生物的種類數量與食物鏈是否也是影響因子之一呢?</p>	<p>報告書呈現。</p> <p>(八)遵照辦理，會將重點整理文字放在期末報告書上。</p> <p>(九)依呂與賴(2010)的報告指出，觀霧山椒魚利用的底質以泥土、腐植土及碎石為主，但不同樣區間的比例會有差異。底棲生物的種類數量不排除為影響因子，不同動物種類的出現可能代表之間為不同的競爭者、掠食者或獵物的互動關係。</p>
--	---	---

## 陸、結論

一、本次審查會議原則通過，請受託單位依各與會人員之建議修正，並將修正意見列表函覆本處。

二、請受託單位依合約規定辦理撥付第 2 期款。

柒、散會：下午 15 時 40 分

# 「觀霧山椒魚溫度生理耐受性測量及族群遺傳多樣性分析」委託辦理案期末審查會議紀錄

壹、會議時間：104 年 12 月 23 日（星期三）上午 10 時整

貳、會議地點：雪霸國家公園管理處第 1 會議室

參、主席：鍾副處長銘山 記錄：傅國銘

肆、出(列)席單位及人員：詳如簽到簿

## 六、討論事項

### 一、吳委員聲海：

- (一) 報告書中文摘要部分，請註明及加上最高溫度耐受度；第 12 頁第 7 行應為北美東部及第 45 頁最大冰期的年代加註參考文獻。
- (二) 結論結果顯示巨木步道族群的耐受度比大鹿林道西線大，可是實驗室測試並沒有分不同地區的山椒魚族群，請問結論從何而來？另建議對北橫觀霧山椒魚族群做溫度耐受性實驗，以確定比較高馴化溫度造成最高溫度耐受度提高的實驗結果。
- (三) 請加註實驗室中飼養箱的溫度。
- (四) 建議未來可持續研究方向如下：一、比較不同地區(海拔)之最高溫度耐受度。二、建議以觀霧之高山澤蟹作為另一實驗物種，因觀霧山椒魚和高山澤蟹有相似棲地和生活需求，可探討其是否對暖化反應也應相似。
- (五) 目前已累積多年有關觀霧山椒魚的研究資料，也對山椒魚的生殖策略、生態習性等有所瞭解，建議管理處應考量開始繁殖山椒魚的試驗研究。

### 受託單位回應：

- (一) 報告書有文字錯誤或需加註的部分會於期末完稿報告書一併修正。
- (二) 觀霧山椒魚的暖化耐受度實驗因樣本取得僅 10 隻，在實驗室測試時是沒有分不同區域，巨木步道所測得的最高溫較低，而大鹿林道西線族群最高溫較高，因此計算暖化耐受度以巨木族群較高，所以推測大鹿林道西

線族群面臨暖化的壓力較大。

- (三) 飼養溫度基本上為 15 度，會在成果報告書中補充。
- (四) 未來如還有持續進行相關研究計畫時，會參考委員所提研究方向進行，保育類觀霧山椒魚確實取得不易，也許可以利用高山澤蟹來取代進行類似實驗。

## 二、本處意見：

- (一) 實驗如能加上對照組，更可驗證實驗結果。
- (二) 大鹿林道西線月均溫較高而觀霧山椒魚暖化耐受度低，但實驗室的結果，20 度的馴化結果比 15 度的暖化耐受度還高，是否有所衝突？
- (三) 目前試驗地棲地未找到任何觀霧山椒魚，未來的經營管理上請提出建議方向。
- (四) 如果有需要發布新聞稿時，請協助提供相關資料內容及影片、照片等。

## 受託單位回應：

- (一) 暖化耐受度的實驗必須在同一個基礎上來比較，也有可能大鹿林道西線樣本做出來的結果比較高，實驗是把所有樣本混合來做，並沒有特別分巨木步道族群或大鹿林道西線族群。未來考量做不同溫度變化來看山椒魚的溫度耐受度實驗。
- (二) 觀霧山椒魚對棲地的偏好上，巨木步道的族群相對比較穩定，試驗棲地及蜜月小徑上於 6 月份無調查到，原因有待進一步調查討論。另巨木群步道為西向坡相對於來說較潮濕，而試驗棲地為東向坡，先天環境條件試驗棲地相對較弱，林務局以往的報告也提出可鋪設石板以增加山椒魚躲藏的機會，可再考量看看。
- (三) 如管理處有要發布新聞稿的需要，本團隊於成果繳交時將提供所拍攝之影片、照片等資料。

## 陸、結論

一、請受託單位依各與會人員之建議修正成果報告。

二、本次期末簡報審查原則通過，請受託單位依據合約內容辦理請款，並繳交結案報告與契約書規定相關資料事宜。

柒、散會：中午 11 時 20 分